

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones orales de voriconazol

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Teresa Gallego Arranz

Director

Santiago Torrado Durán

Madrid

© Teresa Gallego Arranz, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones orales de
voriconazol**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Teresa Gallego Arranz

DIRECTOR

Santiago Torrado Durán

Madrid, 2020

Agradecimientos

Son muchas personas las que se han cruzado, me han acompañado o han llegado para quedarse. Todas ellas me han enseñado, me han servido como apoyo y han dejado su huella en este trabajo. Con estas líneas me gustaría demostrarles el agradecimiento y cariño que siento.

Hace ya unos años que aterricé en la Universidad Complutense de Madrid. Desde el primer momento fui acogida y tratada con simpatía por todo el personal del departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Por ello, me gustaría agradecerles su disposición y la ayuda prestada. También quiero dar las gracias a la dirección por haberme permitido aprender y trabajar aquí, disfrutando de los materiales y equipos, y haciéndome sentir que el departamento también es mi casa.

Tuve la suerte de encontrarme con el Dr. Santiago Torrado, la generosidad hecha carne, quien me adoptó con afecto desde el primer instante. Nunca podré agradecerle lo suficiente la dedicación, los conocimientos transmitidos, las molestias tomadas y la preocupación por mí. Él es el alma de este trabajo, siempre alegre y motivador.

No quiero dejar de mencionar a la Dra. Susana Torrado, quien anima y motiva constantemente a todo el que se cruza con ella, al Dr. Damián Córdoba, quien ha compartido conmigo vivencias y anécdotas de las que he aprendido mucho, al Dr. Juan Torrado, que conoce tan bien los equipos del laboratorio que podría enseñar cómo utilizarlos con los ojos cerrados, y al Dr. Guillermo Torrado, quien me ha permitido acceder a las instalaciones de la Universidad de Alcalá y me ayudó a descubrir el mundo de la industria farmacéutica.

Durante el camino aparecieron compañeros que se han convertido en amigos de verdad y han conseguido hacer mella en mí. Han sido muchos los cafés, los parloteos y, sobre todo, las risas que hemos compartido. Carlos y Víctor, que me han hecho la vida mucho más fácil trabajando codo con codo, creo que hemos formado un gran equipo. Esther, con su optimismo perpetuo y el buen rollo que transmite, consigue que los problemas parezcan más pequeños. Vero, que por mucha carga de trabajo y estrés que soporte, saca tiempo de donde sea para echar una mano a quien lo necesite. Juan, uno de mis grandes apoyos que, ya sea con su presencia o desde la distancia, siempre logra animarme y sacarme la sonrisa. Mario, Mónica y Nico han hecho divertidas las comidas y los pequeños descansos. Carlos (Benavent) con su experiencia y sus anécdotas ha sabido cómo templar mis nervios.

El Dr. Javier Capilla, Xavi, me dio la oportunidad de realizar una estancia de investigación en la Universitat Rovira i Virgili. A mi llegada me dio un cálido recibimiento y hasta ahora no ha dejado de ayudarme. Gracias a él pude vivir la experiencia de zambullirme en un laboratorio de una rama diferente a la mía, haciéndome ganar perspectiva y desarrollar gusto por la microbiología. En Reus aprendí formas de trabajo diferentes, otras técnicas e infinidad de nuevos recursos. La Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental está llena de gente amable que ha hecho todo lo posible por que me sintiera como en casa, cosa que siempre he valorado y por la que les estaré eternamente agradecida. Quiero hacer una mención especial al Dr. Pep Cano, constantemente preocupado por los demás, con quien sé que siempre podré contar. También tengo mucho que agradecerles a mis compañeros, con los que ha sido un verdadero placer coincidir. A Alba le debo mucho más que un agradecimiento. Ella se ha volcado en ayudarme, aunque no tuviera tiempo ni para sus cosas, y nunca ha dejado de ilustrarme. Con Ana, generosa y divertida, pasé grandes ratos y me reí a carcajadas escuchando sus historias, Dani me recordó la importancia de tener nuestra pequeña zona de confort, Dayana compartió conmigo experiencias increíbles, Isa fue compañera de viajes y actividades de aventura, la Dra. Loida López me enseñó nuevos trucos, Elena me ayudó mucho en la experimentación y Gertru me alegró los momentos fuera del laboratorio. Y si hay alguien que me ha hecho sentir que en Reus también tenía un hogar, esa es Viridiana. Hemos compartido muchas charlas y momentos, y los que nos quedan, porque esto no se acaba aquí. Todas ellas son personas maravillosas de los que me llevo recuerdos fantásticos y siempre van a formar parte de mí.

Quiero mencionar también mi experiencia dentro de la industria farmacéutica, de la que tanto he aprendido. Durante los años que pasé en Chemo he trabajado con profesionales, he conocido de primera mano los procesos productivos y los entresijos de una planta farmacéutica. Además, allí encontré amigos dispuestos siempre a echar un cable y levantar el ánimo de quien lo necesitase. María Isabel, quien empezó aquel camino conmigo y en quien me he apoyado constantemente, para la que no tengo palabras de agradecimiento y de cariño suficientes. Paula me formó pacientemente y siempre estuvo a mi lado apagando fuegos. Lore, con su temple y optimismo, me hizo mirar las situaciones desde otras perspectivas y me enseñó a valorar lo que importa de verdad. No puedo dejar de mencionar al resto del equipo, que me ha ayudado, instruido y a quienes realmente aprecio, Jesús, José Luis, Fabi, Belén, Javi, Chema, Nicoleta, Ana, Bárbara y Juanjo. Me alegro de haber coincidido con todo ellos y haber tenido la oportunidad de conocerlos.

Y por supuesto, no me puedo olvidar del respaldo que he tenido desde fuera del ambiente académico. Las chicas de la farmacia de Nava del Rey también han arrimado el hombro. Nos ha tocado pasar una época dura, pero gracias al esfuerzo de todas hemos salido adelante. Cris y Montse, a pesar de toda la presión que tenían encima, no han dejado de darlo todo. Y un reconocimiento especial para Irene que, pese a todos los problemas, se ha desvivido por allanarme el camino.

Mis padres siempre han creído en mí y me han animado a perseguir lo que me hiciera feliz, aunque fuese una locura tan grande como esta. Ellos han estado a mi lado cuando más falta me ha hecho y no han dejado de apoyarme ni un solo instante. Sin su motivación nada de esto hubiese sido posible.

Nunca hubiera pensado que fuese a necesitar tanto un soporte firme durante este proceso. Por suerte, Ramón ha estado a mi lado, aportándome todo lo que ha hecho falta. Con su templanza, paciencia y comprensión consigue que todo parezca fácil. Soy consciente de que este trabajo ha sido fatigoso también para él, y sin embargo sólo ha mostrado buena disposición y afecto.

Muchas gracias a todos.

Índice

Abreviaturas	17
Resumen	19
Summary	23
1. Introducción	27
• Infecciones fúngicas	29
○ Definición y clasificación	29
○ Aspergilosis invasora	30
• Tratamientos antifúngicos.....	32
○ Clasificación de fármacos antifúngicos.....	32
○ Tratamiento de infecciones fúngicas no sistémicas	32
○ Evolución en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas.....	34
• Voriconazol.....	37
○ Mecanismo de acción	37
○ Indicaciones terapéuticas	38
○ Características farmacocinéticas	38
○ Toxicidad y reacciones adversas.....	40
○ Interacciones	41
○ Formulaciones comercializadas	44
○ Relación farmacocinética/farmacodinamia	45
○ Resistencias de <i>Aspergillus</i> spp.	45

• Dispersiones sólidas y sistemas micelares	48
○ Definición y características	48
○ Clasificación de dispersiones sólidas.....	49
○ Ventajas de las dispersiones sólidas.....	51
○ Problemas de las dispersiones sólidas.....	52
○ Métodos de fabricación.....	52
○ Sistemas micelares	56
2. Objetivo y planteamiento.....	59
• Objetivo	61
• Planteamiento	61
3. Materiales y métodos.....	63
• Materiales	65
• Fabricación de las formulaciones.....	70
• Métodos analíticos	71
○ Espectrofotometría de segunda derivada.....	71
· Procedimiento analítico	71
· Validación	71
○ Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	74
· Procedimiento analítico	74
· Validación	75
• Ensayo de velocidad de disolución.....	78
• Caracterización.....	79
○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)	79
○ Difracción de rayos X	79
○ Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	80

• Sensibilidad <i>in vitro</i>	81
○ Método de microdilución.....	81
○ Método de difusión.....	84
• Ensayos <i>in vivo</i>	85
○ Farmacocinética.....	85
○ Biodistribución.....	86
· Dosis única	86
· Dosis múltiple	86
4. Resultados	89
• Métodos analíticos	91
○ Validación de los métodos de espectrofotometría de segunda derivada	91
○ Validación del método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	110
○ Discusión parcial.....	115
• Ensayo de velocidad de disolución.....	118
○ Desarrollo de formulaciones	118
○ Estudio de perfiles de disolución	121
○ Discusión parcial.....	127
• Caracterización.....	131
○ Microscopía electrónica de barrido (SEM)	131
○ Difracción de rayos X	137
○ Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	139
○ Discusión parcial.....	141
• Sensibilidad <i>in vitro</i>	145
○ Método de microdilución.....	145
○ Método de difusión.....	146
○ Discusión parcial.....	150

• Ensayos <i>in vivo</i>	154
○ Farmacocinética.....	154
○ Biodistribución.....	155
· Dosis única	155
· Dosis múltiple	157
○ Discusión parcial.....	159
5. Discusión.....	165
6. Conclusiones.....	175
Publicación.....	179
Material suplementario.....	191
Bibliografía.....	197
Índice de figuras	227
Índice de tablas.....	231

Abreviaturas

Abs: absorbancia.	DSC: calorimetría diferencial de barrido.
ADN: ácido desoxirribonucleico.	EDS: espectroscopía de energía dispersada.
AI: aspergilosis invasora.	EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
AINE: antiinflamatorio no esteroideo.	FDA: Food and Drug Administration.
ALT: alanina aminotransferasa.	HLB: equilibrio hidrófilo-lipófilo.
ARN: ácido ribonucleico.	HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.
AST: aspartato aminotransferasa.	HPC: hidroxipropilcelulosa.
AUC: área bajo la curva.	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.
MIC: minimum inhibitory concentration.	HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa.
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.	IA: invasive aspergillosis.
C_{max}: concentración máxima.	ICH: International Conference on Harmonisation.
C: concentración.	K1ph: kolliphor RH40.
CMC: concentración micelar crítica.	L-AmB: anfotericina B liposomal.
CMI: concentración mínima inhibitoria.	Lbr: labrasol.
c.s.p.: cantidad suficiente para.	L-HPC: hidroxipropilcelulosa de baja sustitución.
CYP450: citocromo P450.	Mdx: maltodextrina.
D: disolución.	MF: mezcla física.
DE: desviación estándar.	
DMSO: dimetilsulfóxido.	
DS: dispersión sólida.	

Mnt: manitol.

MP: materia prima.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: agar de patata y dextrosa.

PEG: polietilenglicol.

PK/PD: farmacocinética/farmacodinamia.

PVP: polivinilpirrolidona.

RC: recristalizado.

ROS: especie reactiva de oxígeno.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

SEM: microscopía electrónica de barrido.

SM: sistema micelar.

t: tiempo.

t_{1/2}: semivida de eliminación.

TAC: tomografía computarizada de alta resolución.

t_{max}: tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima.

Tw: Tween.

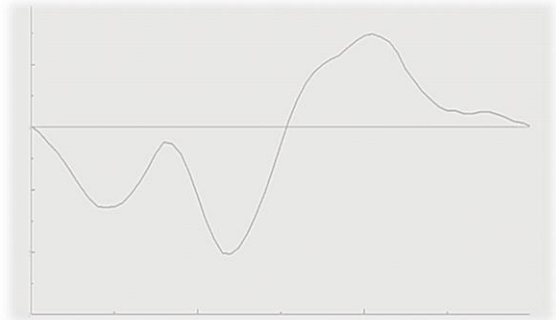
UFC: unidad formadora de colonia.

USP: United States Pharmacopeia.

UV: ultravioleta.

VCZ: voriconazol.

Resumen



La aspergilosis invasora (AI) es una micosis sistémica producida por hongos del género *Aspergillus*, siendo la especie patógena más común *A. fumigatus*. Por lo general los conidios alcanzan el organismo por inhalación y la enfermedad afecta en primer lugar a los pulmones. La AI se produce cuando la infección se disemina, lo que ocurre principalmente en individuos inmunocomprometidos, y está asociada con una elevada mortalidad. El tratamiento de elección de la AI es el voriconazol, sin embargo, su eficacia se ve limitada por su baja solubilidad en agua. Otro problema de este fármaco es su elevada hepatotoxicidad, que puede provocar la suspensión del tratamiento. Las limitaciones mencionadas se pueden resolver mediante la fabricación de dispersiones sólidas y sistemas micelares. Estas formulaciones tienen la propiedad de formar micelas en presencia de un medio acuoso, lo que proporciona ventajas como el aumento de la solubilidad, el incremento de la biodisponibilidad, la modificación en la biodistribución y la atenuación de la toxicidad.

Con el objetivo de conseguir incrementar la eficacia del tratamiento por vía oral con voriconazol y reducir su toxicidad, se desarrollaron diferentes formulaciones de este principio activo elaboradas mediante un método de evaporación del solvente.

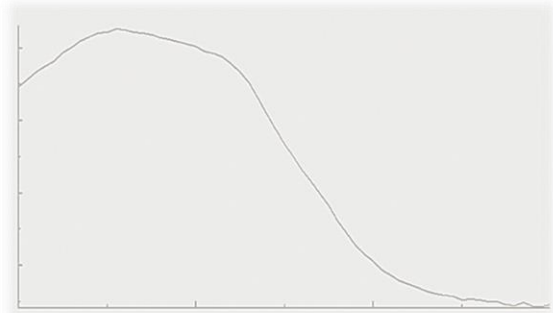
Como herramienta para realizar los estudios, se adaptaron y validaron dos tipos de métodos analíticos de cuantificación, uno de espectrofotometría de segunda derivada para muestras *in vitro* y otro de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para muestras biológicas. Ambos métodos demostraron ser comparables en especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango y robustez.

Sobre las formulaciones se llevaron a cabo estudios de disolución y caracterización. Los sistemas micelares mostraron perfiles rápidos en medios con diferente pH, evidenciando importantes mejoras en la velocidad de disolución del voriconazol, ocasionados por el aumento de la humectabilidad producido por la presencia de polisorbato 80, un tensoactivo no iónico. En estas formulaciones, la cristalinidad del principio activo se vio disminuida en estas formulaciones debido al proceso de fabricación.

Los ensayos de sensibilidad *in vitro* revelaron valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) menores para los sistemas micelares que para la materia prima frente a diferentes cepas de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Candida*. La formación de micelas en las nuevas formulaciones provocó un incremento en la penetración del voriconazol en el interior celular y la evasión de las bombas de eflujo presentes en las células fúngicas como mecanismo de defensa.

La formulación SM-1:3:0,05 fue seleccionada debido a la mejora conseguida en el perfil farmacocinético. Su baja proporción de manitol evitó que se produjeran retrasos en la absorción, consiguiéndose un aumento de la biodisponibilidad. Además, presentó una biodistribución adecuada que hizo pensar en un efecto local ampliado y una disminución de la toxicidad, pues se alcanzaron niveles elevados en cerebro, pulmones y riñones, mientras que se evitó su acumulación en el hígado. Asimismo, se vio incrementado el parámetro AUC/CMI, índice que cuantifica la relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), lo que indicó una mejor eficacia terapéutica del tratamiento.

Summary



Invasive aspergillosis (IA) is a systemic fungal infection caused by fungi of the genus *Aspergillus*, being *A. fumigatus* the most common pathogenic species. Conidia usually reach the body by inhalation, and the disease first affects the lungs. IA takes place when haematological dissemination occurs, which mainly happens in immunocompromised individuals, and it is associated with high mortality. Voriconazole is currently the first-line treatment for IA, however its effectiveness is limited by its low solubility in water. Another problem with this drug is its elevated hepatotoxicity, which can cause treatment discontinuation. These limitations can be overcome by manufacturing solid dispersions and micellar systems. These formulations have the property of forming micelles in the presence of an aqueous medium, which provides advantages such as increased solubility, risen bioavailability, modification in biodistribution and attenuation of toxicity.

In order to increase the efficacy of oral treatment with voriconazole and reduce its toxicity, different formulations of this drug were developed using a solvent evaporation method.

Two types of analytical quantification methods were developed and validated, one of second derivative spectrophotometry for *in vitro* samples and the other of high performance liquid chromatography (HPLC) for *in vivo* samples. Both methods were shown to be comparable in specificity, linearity, accuracy, precision, range, and robustness.

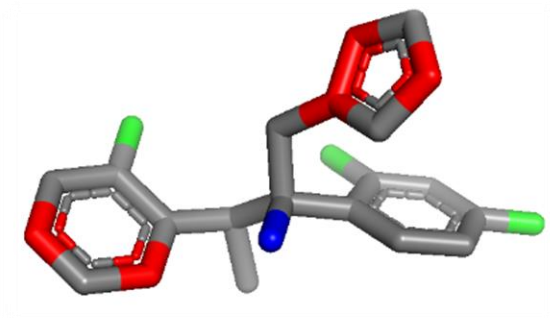
Dissolution and characterization studies were carried out on the formulations. The micellar systems showed fast profiles in media with different pH, showing significant improvements in the dissolution rate of voriconazole, caused by the increased wettability produced by the presence of polysorbate 80, a nonionic surfactant. The crystallinity of the active pharmaceutical ingredient was decreased in these formulations due to the manufacturing process.

In vitro susceptibility testing revealed lower minimum inhibitory concentration (MIC) values for the micellar systems than for the raw material against different strains of fungi of *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. Micelle formation in the new formulations caused an increase in the penetration of voriconazole into the cell and the avoidance of the efflux pumps present in the fungal cells as a defense mechanism.

SM-1:3:0.05 was selected due to the improvement achieved in the pharmacokinetic profile. Its low proportion of mannitol prevented delays in absorption, achieving an increase in bioavailability. In addition, it presented an adequate biodistribution that suggested expanded local effect and decreased toxicity, since high levels were reached in the brain,

lungs and kidneys, while its accumulation in the liver was avoided. Likewise, the AUC/MIC ratio was enhanced. It is an expression of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship, which indicated a better therapeutic efficacy of the treatment.

Introducción



Infecciones fúngicas

Definición y clasificación

Los hongos son organismos eucariotas saprófitos y parásitos [1,2]. Por lo general, poseen una membrana celular que está rodeada por la pared fúngica. La membrana está constituida principalmente por ergosterol y zimosterol, mientras que los principales componentes de la pared son quitina, β -glucanos, mananoproteínas y galactomananos, que aportan rigidez [1,3]. Además, tienen estructuras en la superficie formadas por polisacáridos, que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del huésped [4]. Estos organismos se reproducen por esporas y pueden ser unicelulares, como las levaduras, o multicelulares, con cuerpos compuestos por hifas que forman el micelio [5].

Las micosis, o infecciones fúngicas, son las enfermedades infecciosas producidas por hongos [6]. Las infecciones fúngicas en humanos se pueden clasificar en micosis superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas o diseminadas [2,7,8]. Las **micosis superficiales** se producen en el estrato córneo, la capa más externa de la piel, y no conllevan proceso inflamatorio, ya que los microorganismos viven en las células muertas convertidas en queratina que conforman esta capa de la epidermis [2,8,9]. Las **infecciones cutáneas** involucran la epidermis (estrato córneo y capas más profundas) así como sus apéndices, incluyendo pelo y uñas, y cursan con inflamación de la piel [8]. Las **micosis subcutáneas** comprenden las infecciones de los tejidos subcutáneos, normalmente producidas como resultado de un trauma de la piel seguido del inóculo directo de hongos en el tejido subcutáneo, ya que en condiciones normales la piel intacta actúa como barrera contra los patógenos. Cursan con inflamación del tejido subcutáneo y puede extenderse a la epidermis. Este tipo de infección puede mantenerse localizada o expandirse a tejidos adyacentes e incluso diseminarse, aunque este último hecho es raro en individuos inmunocompetentes [2,8,9]. Las **infecciones fúngicas sistémicas** se diseminan a través del torrente sanguíneo y afectan a órganos, huesos y/o sistema nervioso central. Las vías de entrada más comunes son la vía pulmonar, el tracto gastrointestinal y la vía sanguínea [2,8].

Aspergilosis invasora

La aspergilosis invasora (AI) es una infección fúngica sistémica producida por hongos filamentosos del género *Aspergillus*. La especie que causa esta enfermedad con más frecuencia es *A. fumigatus* [5], seguida por *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* [10]. *A. fumigatus* es uno de los organismos eucariotas más globalizados. Su presencia en todo el planeta se debe a su alta prevalencia como saprófito en la materia vegetal en descomposición y el carácter altamente dispersivo en forma de aerosol de sus conidios [10,11].

Por lo general, los conidios alcanzan el tracto respiratorio por inhalación dando lugar en principio a una aspergilosis pulmonar invasora. La enfermedad diseminada es la etapa final de la complicación de aspergilosis pulmonar invasora, afectando principalmente a los riñones y el cerebro. Los microorganismos también pueden alcanzar al huésped por traumatismos o por catéteres infectados [12]. La progresión de la enfermedad normalmente se debe a la falta de diagnóstico y posteriores complicaciones, sobre todo en pacientes con enfermedades subyacentes severas o avanzadas [7,13]. Esta infección afecta principalmente a individuos inmunocomprometidos, en especial a pacientes que presentan neoplasias hematológicas, receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas u órganos sólidos, neutropenia grave y/o prolongada, terapia inmunosupresora prolongada y/o en altas dosis, SIDA en etapa avanzada y quimioterapia [14,15].

La AI no presenta ningún signo clínico específico. En pacientes neutropénicos la fiebre persistente a antibióticos de amplio espectro debería ser motivo para realizar un examen en profundidad. Se han reportado algunos casos de tos y dolor en el pecho, con o sin hematopoyesis, como signos de infarto pulmonar provocado por obstrucción vascular por hongos [16,17]. También puede producirse un deterioro de la función pulmonar y fiebre refractaria. Las convulsiones u otros signos neurológicos pueden ser manifestaciones de diseminación cerebral. Esta enfermedad raramente se manifiesta en órganos extrapulmonares [13].

Se estima que cada año se dan 200.000 casos de AI. La mortalidad depende de la condición de cada paciente. Así, un 22% de los casos de AI en receptores de trasplantes de órganos sólidos termina en muerte, aumentando el porcentaje hasta un 67-82% en receptores de trasplantes de pulmón [12] y siendo de un 50% en el caso de receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas. La mortalidad es de un 50% en pacientes con neoplasias hematológicas, va del 46 al 80% en pacientes críticos en cuidados intensivos con AI y alcanza

porcentajes cercanos al 100% en los casos en los que el microorganismo alcanza el cerebro, sin importar la patología subyacente [13,18].

Para realizar el diagnóstico de la AI existen varias pruebas que permiten detectar la presencia del microorganismo patógeno. La primera evidencia de la enfermedad puede ser detectada con métodos de imagen como la tomografía computarizada de alta resolución (TAC), que es capaz de detectar nódulos, aunque esto no sirve como confirmación ya que estas lesiones no siempre están presentes o pueden ser producidas por otras causas. Actualmente, el ensayo más común es el cultivo de una muestra de tejido seguido de un examen con el microscopio, sin embargo, se tarda un tiempo en obtener el resultado y la biopsia conlleva un riesgo para el paciente. En los cultivos de muestras de sangre no se detecta la presencia del hongo. Existen ensayos de detección de biomarcadores en suero o en fluidos fisiológicos, como el antígeno de galactomanano o el (1→3)-β-glucano, con alta especificidad, aunque tienen una sensibilidad media y pueden producirse falsos positivos. Una herramienta con alta sensibilidad es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de plasma y suero, aunque aún no es un método estandarizado por la variación entre técnicas de extracción, objetivos moleculares, métodos de amplificación y protocolos [12,13,16,19].

El tratamiento de primera elección de la AI es el voriconazol. Las formulaciones liposomales de anfotericina B (L-AmB) presentan una alternativa al tratamiento en caso de necesidad. En pacientes de alto riesgo de infección se recomienda la profilaxis con L-AmB, itraconazol o voriconazol, dependiendo de la patología [12,13].

Tratamientos antifúngicos

Clasificación de fármacos antifúngicos

Los fármacos antifúngicos pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción de la siguiente manera:

- Fármacos que actúan sobre la membrana celular
 - Polienos: anfotericina B, nistatina.
 - Azoles
 - Imidazoles: clotrimazol, miconazol, ketoconazol.
 - Triazoles
 - De primera generación: fluconazol, itraconazol.
 - De segunda generación: voriconazol, posaconazol, isavuconazol, ravuconazol.
 - Alilaminas: terbinafina, naftifina.
- Fármacos que actúan sobre la pared celular
 - Equinocandinas: caspofungina, micafungina y anidulafungina.
- Fármacos que actúan sobre la síntesis de ADN
 - Antimetabolitos: flucitosina.
- Fármacos antimitóticos
 - Benzofuranos: griseofulvina.
- Otros: yoduro potásico, ciclopirox, tolnaftato.

Tratamiento de infecciones fúngicas no sistémicas

En 1939 se aisló por primera vez la griseofulvina, un producto natural obtenido del hongo *Penicillium griseofulvum* [20]. Inhibe el crecimiento fúngico por inhibición de la mitosis al interrumpir la función del huso mitótico [21,22]. Se utiliza para el tratamiento oral de infecciones superficiales de la piel producidas por hongos dermatofitos [23].

En 1944 se reportó la actividad antifúngica del benzimidazol, un compuesto perteneciente al grupo de los azoles. Este grupo de fármacos debe su actividad a la inhibición

de la enzima fúngica 14 α -desmetilasa, lo que detiene la síntesis de ergosterol, un componente fundamental de las membranas de los hongos, e interrumpe el crecimiento fúngico. A finales de los años sesenta se introdujeron tres nuevos compuestos tópicos para el tratamiento de micosis superficiales: clotrimazol, miconazol y econazol [24,25].

La nistatina es un antifúngico de amplio espectro perteneciente al grupo de los polienos. Estos fármacos interactúan con los esteroides de las membranas celulares y forman poros en las mismas. Esto provoca la fuga de componentes celulares e iones, lo que conduce a la modificación del gradiente eléctrico y a la muerte celular [26]. La afinidad de los principios activos por el ergosterol limita su toxicidad [27]. La nistatina se utiliza para administración tópica porque su uso sistémico es demasiado tóxico para humanos [28,29].

El tolnoftato es un agente antifúngico utilizado en el tratamiento de micosis superficiales [30,31]. Fue descubierto en 1962 y actualmente se utiliza en formulaciones tópicas. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición selectiva de la escualeno epoxidasa fúngica y el bloqueo de la biosíntesis del ergosterol presente en las membranas celulares de los hongos. La acumulación de escualeno y la deficiencia de ergosterol provocan la inhibición del crecimiento fúngico [32,33].

Las alilaminas son una clase de antifúngicos sintéticos que bloquean la síntesis de ergosterol al inhibir la escualeno epoxidasa, sin afectar al citocromo P450 [34-38]. El primer compuesto que se descubrió perteneciente a este grupo fue la natifina, sintetizada por primera vez en 1974 y comercializada en 1985 únicamente en formulaciones tópicas [37,39]. La terbinafina pertenece a este grupo de fármacos y fue aprobado en 1992 por la Agencia de Medicamentos y Alimentación de los Estados Unidos de América (Food and Drug Administration, FDA) para su uso tópico y en 1998 para su administración oral [40]. Este grupo de antifúngicos se utiliza para tratar infecciones superficiales de la piel y las uñas [36].

El ciclopirox es un fármaco antifúngico sintético derivado de la hidroxipiridona utilizado en el tratamiento de micosis producidas por dermatofitos [41,42]. Se ha utilizado como agente tópico durante más de tres décadas y fue aprobado en 2004 por la FDA [43]. Su principal mecanismo de acción es la quelación de cationes polivalentes, lo que causa la inhibición de enzimas dependientes de metales y conduce a la interrupción de varias funciones celulares [43,44].

Evolución en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas

La primera evidencia de un tratamiento antifúngico sistémico data de 1903, cuando se trató un caso de esporotricosis con yoduro potásico [45,46]. Actualmente no se conoce el mecanismo de acción de la actividad antifúngica de este compuesto, aunque se barajan dos hipótesis. La primera es que presenta un mecanismo fungicida que promueve la lisis celular. La segunda consiste en una mejora de la actividad inmune mediante el incremento de la fagocitosis [46]. Existen evidencias de degeneración y lisis de células fúngicas en presencia de yoduro potásico mediante la liberación de enzimas lisosomales. Sin embargo, son necesarios más estudios para conocer el mecanismo de acción exacto [47,48].

Los polienos fueron uno de los primeros agentes antifúngicos utilizados para el tratamiento terapéutico de infecciones producidas por hongos. Se trata de productos naturales sintetizados principalmente por *Streptomyces nodosus*, una bacteria gran positiva de clase actinomiceto [49-51] y, en menor medida, por el hongo *Penicillium nalgiovense* Laxa [52,53]. Los polienos interaccionan con los esteroides de la membrana celular de los hongos y forman canales que causan la fuga de iones y moléculas pequeñas, lo que conduce a la muerte celular [1,26,40]. La anfotericina B muestra una mayor afinidad por el ergosterol de las células fúngicas, aunque puede interaccionar en menor grado con el colesterol de las membranas celulares de los mamíferos, produciendo así toxicidad [49,50]. A pesar de haberse identificado un elevado número de polienos, su uso en rutina se limita a un reducido número de moléculas, como la anfotericina B y la nistatina [29]. La anfotericina B, antifúngico macrólido aislado por primera vez en 1955 [54,55] y aprobado para su uso pocos años después por la FDA, ha sido el tratamiento de elección de las infecciones fúngicas sistémicas durante muchos años gracias a su amplio espectro de actividad. Sin embargo, presentaba un serio problema de toxicidad renal y otros efectos adversos [29].

En 1968 se utilizó por primera vez la flucitosina en humanos para el tratamiento de candidiasis y criptococosis sistémicas [56]. Se trata de un análogo de pirimidina sintético descubierto en 1957 [57,58]. Cuando este principio activo alcanza el citoplasma de las células fúngicas es desaminado en 5-fluorouracilo por la citosina desaminasa, que no está presente en células mamíferas, y posteriormente es fosforilado e incorporado al ácido ribonucleico (ARN), interfiriendo con la síntesis normal de proteínas y produciendo la inhibición del crecimiento celular [59]. El 5-fluorouracilo también puede ser incorporado directamente al

ácido desoxirribonucleico (ADN), interfiriendo con la síntesis de ADN [1,40]. Pronto se limitó su uso por resistencias y la elevada toxicidad.

Los azoles son compuestos sintéticos que poseen algún anillo de cinco elementos con dos o tres nitrógenos. En función del número de nitrógenos del anillo imidazólico, se clasifican en imidazoles (dos nitrógenos) y triazoles (tres nitrógenos). Los azoles inhiben la 14 α -desmetilasa, enzima del citocromo P450 fúngico, que participa en la síntesis de ergosterol, elemento fundamental de las membranas celulares de los hongos, lo que resulta en la inhibición del crecimiento celular. Este grupo de fármacos son mejor tolerados que la anfotericina B. En 1977 se desarrolló el antifúngico oral ketoconazol, un compuesto azólico perteneciente a los imidazoles de amplio espectro. En 1981, la FDA lo aprobó para su uso sistémico. Poco tiempo después su uso comenzó a disminuir debido a los efectos adversos que produce, como hepatotoxicidad, desregulación endocrina e interacción con múltiples fármacos. Actualmente se utiliza como tratamiento tópico de micosis cutáneas y sólo se recomienda su uso oral como tratamiento de segunda línea en micosis severas [45]. El desarrollo de los triazoles aportó ventajas como mayor polaridad, mejor solubilidad, menor unión a proteínas plasmáticas, aumento de especificidad, espectro antifúngico más amplio y menor toxicidad [26]. El fluconazol fue introducido en la práctica clínica en 1990 y el itraconazol en 1992, son azoles de primera generación y demostraron una excelente actividad contra *Candida* spp., aunque la anfotericina B seguía siendo superior en el tratamiento de infecciones invasoras de hongos filamentosos, tales como aspergilosis y mucormicosis. A mediados de la década de 1990, aparecieron formulaciones lipídicas de anfotericina B que reducían su toxicidad. La segunda generación de azoles conserva su acción antifúngica contra *Candida* spp. y, además, son efectivos contra hongos filamentosos, cubriendo un amplio espectro de actividad. Esta generación de azoles presenta una mayor potencia antifúngica que los de primera generación [24,60]. A esta generación pertenecen el voriconazol, cuyo uso se aprobó en el año 2002, y el posaconazol, en 2006. En el año 2015 aparece el isavuconazol, con un espectro de actividad similar pero mayor biodisponibilidad [40,61,62].

Las equinocandinas son compuestos semisintéticos, puesto que son obtenidas de la modificación química de subproductos de ciertos hongos [63]. Actúan inhibiendo la enzima 1,3- β -glucano sintetasa [34], ausente en las células de los mamíferos [26], lo que detiene la síntesis de 1,3- β -glucano, un componente fundamental de la pared celular. La pared celular se vuelve porosa y más permeable, lo que conduce a un desequilibrio en la presión osmótica intracelular y termina dando lugar a la lisis de la célula [64]. La primera equinocandina en ser

aislada fue la anidulafungina en 1974 de un subproducto del hongo *Aspergillus nidulans*, pero no fue aprobada por la FDA hasta 2006. En 1989 se aisló la caspofungina de un subproducto del hongo filamentoso *Glarea lozoyensis* y fue aprobada en 2001. Por último, la micafungina se obtuvo en 1990 del hongo *Aspergillus nidulans* y se aprobó en 2005 [29,65,66]. Las equinocandinas son muy eficaces en el tratamiento de *Candida* spp., incluso en casos de microorganismos resistentes a azoles, y muestran actividad contra *Aspergillus* spp., aunque solo se utilizan en terapia combinada para su tratamiento [34]. Estos compuestos apenas muestran efectos secundarios e interacciones con otros fármacos, sin embargo, solo están disponibles en formulaciones parenterales debido a su pobre absorción gastrointestinal [40].

Voriconazol

Mecanismo de acción

El voriconazol es un agente antifúngico de segunda generación de amplio espectro perteneciente al grupo de los triazoles. Estos azoles impiden la biosíntesis de ergosterol a partir de lanosterol, componente de la membrana celular del hongo, afectando a la integridad y funcionalidad de la misma [26,67,68]. El ergosterol también cumple un papel como hormona en las células fúngicas, estimulando su crecimiento y proliferación. Sin embargo, esta función solo se ve interrumpida cuando el ergosterol se agota completamente [69]. El bloqueo de la biosíntesis de ergosterol se consigue por inhibición de la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (CYP51 o Erg11p) del citocromo P450 fúngico, localizada en la membrana externa del retículo endoplasmático [70-72]. Mediante la unión de uno de los nitrógenos del anillo triazólico al hierro del grupo hemo localizado en el sitio activo de la enzima se consigue la inhibición de la misma. Además, el resto de la molécula de antifúngico se une a la proteína en múltiples residuos, deformando la superficie proteica, lo que definirá la fuerza de la inhibición [72-75]. Cuando el ergosterol se agota, los 14 α -metilesteroles (precursores de ergosterol) se acumulan en la membrana, impidiendo el crecimiento celular. En general, los triazoles son fungistáticos, es decir, detienen el crecimiento y desarrollo de los hongos. Sin embargo, el voriconazol funciona como un agente fungicida contra *Aspergillus* spp., acabando con el microorganismo [29,76]. El voriconazol ha demostrado ser más selectivo para las enzimas del citocromo P450 fúngico que para los sistemas enzimáticos del citocromo P450 de varios mamíferos [77].

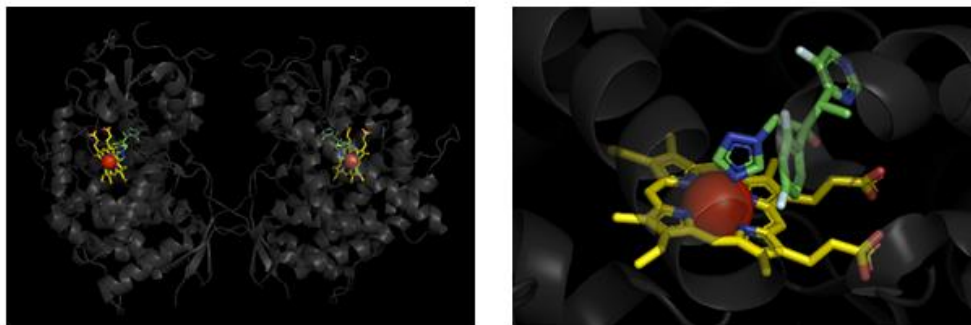


Figura 1: Enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (CYP51 o Erg11p) del citocromo P450 fúngico con voriconazol unido al grupo hemo (imagen de la izquierda). Voriconazol unido a su diana, el grupo hemo de la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (imagen de la derecha). Imágenes obtenidas con el programa informático PyMOL.

Indicaciones terapéuticas

Gracias a su amplio espectro de actividad, voriconazol se emplea para el tratamiento y profilaxis de varias enfermedades invasoras causadas por hongos.

Es el tratamiento de elección para AI e infecciones producidas por *Candida krusei* [78]. Está indicado también en candidemias en pacientes no neutropénicos, infecciones invasoras graves producidas por *Candida* resistentes a fluconazol, candidiasis esofágicas e infecciones refractarias provocadas por *Scedosporium* spp. o *Fusarium* spp. [29,76].

Se usa también como profilaxis de infecciones fúngicas invasoras en neoplasias hematológicas, en receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas y trasplantes de pulmón y en pacientes pediátricos inmunocomprometidos [79,80].

Características farmacocinéticas

Disolución

El voriconazol es muy soluble acetona, etanol y metanol, sin embargo, presenta una solubilidad en agua limitada (0,7 mg/mL a 37°C) [81-83]. Tiene una constante de disociación $pK_a = 1,76$. En cuanto a su lipofilia, se han reportado valores de $\log P$ entre 1,65 y 2,06 [81,84-86].

Absorción

El voriconazol es absorbido rápida y casi completamente desde formulaciones orales. El tiempo que tarda en alcanzarse concentraciones máximas en sangre (t_{max}) ronda las 2 horas. Se calcula que la biodisponibilidad absoluta tras administración oral es del 96%. La absorción no se ve afectada por cambios del pH intragástrico, sin embargo, las comidas, especialmente las que son ricas en grasa, reducen su valor de concentración máxima (C_{max}) y su área bajo la curva (AUC) en un 34% y un 24% respectivamente, su biodisponibilidad se ve reducida en un 22% aproximadamente y su t_{max} se retrasa [87,88].

Distribución

Presenta una extensa distribución en los tejidos, tanto extracelular como intracelularmente, tal como indica su valor de volumen de distribución, 4,6 L/kg. Se estima que se une a proteínas plasmáticas en un 58% [89,90].

Metabolismo

Varias isoenzimas del citocromo P450 hepático son las encargadas de metabolizar el voriconazol, principalmente la CYP2C19 y en menor medida la CYP2C9 y la CYP3A4. La vía mayoritaria de biotransformación es la N-oxidación (el N-óxido representa un 72% de los metabolitos radiomarcados circulantes en plasma), siendo la hidroxilación otra de las rutas metabólicas que se producen [91].

Existe una alta variabilidad interindividual en la farmacocinética debido al polimorfismo genético de la enzima CYP2C19 que determina su actividad enzimática en función de las variantes alélicas [92]. Los individuos pueden clasificarse en metabolizadores lentos o rápidos, llegando a haber diferencias en los valores de AUC y C_{max} de hasta cuatro veces superiores en metabolizadores lentos comparando con metabolizadores rápidos homocigóticos [93]. Brevemente, el 15-20% de la población asiática son metabolizadores lentos, mientras que este porcentaje se reduce a un 3-5% en los individuos caucásicos y de raza negra [94]. CYP2C19*1 está considerada la enzima con actividad normal, CYP2C19*2-CYP2C19*8 son metabolizadores lentos y los individuos que presentan la variante alélica CYP2C19*17 son metabolizadores rápidos [95]. Los metabolizadores rápidos representan un 1-4% de la población asiática y un 17-22% en caucásicos y negros [96,97].

La farmacocinética que presenta es no lineal debido a la saturación del metabolismo, correspondiendo con una cinética de Michaelis-Menten. Esto se traduce en incrementos desproporcionados de AUC al aumentar la dosis [79,98].

Eliminación

Se elimina mayoritariamente por metabolismo hepático, apareciendo inalterado menos de un 2% de la dosis en orina [99]. Al administrar dosis radiomarcadas, ya sean orales o intravenosas, el 80-83% de la radioactividad se recupera en orina y menos de un 20% en heces [75].

La semivida de eliminación ($t_{1/2}$) es de 6 horas aproximadamente para dosis terapéuticas, aunque puede variar dependiendo de la dosis debido a la cinética no lineal (semivida dosis-dependiente) [92].

Toxicidad y reacciones adversas

El voriconazol se asocia a una serie de reacciones adversas, que pueden ser leves, moderadas o severas. Para evitar su aparición se ha establecido un rango terapéutico de concentraciones plasmáticas de voriconazol: 1,0-5,5 $\mu\text{g/mL}$. Si la concentración se mantiene por debajo de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ el tratamiento no sería eficaz y si sobrepasa los 5,5 $\mu\text{g/mL}$ daría lugar a toxicidad [79,100,101].

Los eventos adversos más significativos que han sido reportados son:

- **Toxicidad hepática:** se produce aproximadamente en un 18% de los pacientes y se relaciona con altas concentraciones plasmáticas de voriconazol [102]. Son las reacciones más graves, incluyendo ictericia, hepatitis y fallo hepático fulminante, que van asociadas a un aumento de las transaminasas [89]. Durante el tratamiento es necesario evaluar los niveles de las transaminasas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa (AST y ALT) periódicamente para controlar la función hepática. En pacientes con trastornos subyacentes y en niños se recomienda monitorizar los niveles de voriconazol en sangre. Con estas pruebas se pueden resolver problemas reajustando la dosis y, en algunos casos, suspendiendo el tratamiento [93,103].

- **Reacciones adversas visuales:** frecuentemente se dan alteraciones visuales transitorias y reversibles, experimentadas aproximadamente en un 30% de los pacientes. Los pacientes que las sufren presentan generalmente visión borrosa, fotofobia, alteración en los colores y alteración de la percepción visual. Normalmente ocurren entre 15 y 30 minutos después de la administración y desaparecen en 30 minutos. Se desconoce el mecanismo de acción, aunque se asocian a mayores concentraciones plasmáticas [79,89,104].

- **Reacciones dermatológicas:** Se han dado reacciones cutáneas como erupciones, fotosensibilidad y eritema. Casos graves de reacciones exfoliativas han sido reportados. Las erupciones deben ser controladas, y si progresan las lesiones, debe suspenderse el tratamiento [105,106].

- **Nefrotoxicidad:** se ha observado insuficiencia renal en pacientes gravemente enfermos. Las formulaciones de administración intravenosa, para ayudar a la solubilización

del voriconazol, contienen sulfobutileter- β -ciclodextrina, que tiene un carácter nefrotóxico, pudiendo contribuir a la toxicidad renal [90,107].

- **Reacciones neurotóxicas:** alucinaciones visuales y auditivas, agitación, mareo, ansiedad, confusión o encefalopatía se incluyen entre estos eventos. Se cree que hay una relación entre las concentraciones de voriconazol en sangre y estas reacciones adversas [77,79].

- **Reacciones cardiovasculares:** puede producirse una prolongación del intervalo QT. Se han reportado casos de *torsades de pointes*, un tipo de arritmia ventricular, en pacientes con factores de riesgo. Por lo tanto, debe administrarse con precaución a estos pacientes [77,101].

Interacciones

Dado que el voriconazol es metabolizado en el hígado por las enzimas CYP2C19, CYP2C9 y CYP3A4, la administración concomitante con sustancias que inhiben o inducen estas isoenzimas puede alterar los niveles de antifúngico. De la misma forma, el voriconazol puede modular los niveles de otros sustratos del citocromo P450 [75].

El metabolismo mediante la enzima CYP3A4 es la ruta mayoritaria en el hígado humano, siendo muchos fármacos sustratos o moduladores de esta isoenzima. Además, el polimorfismo en la isoenzima CYP2C19 afecta también al metabolismo de varios fármacos [94]. Por ello, el listado de interacciones del voriconazol es muy amplio. Dichas interacciones pueden agruparse en: fármacos que aumentan la concentración de voriconazol, fármacos que disminuyen la concentración de voriconazol y fármacos que ven afectadas sus concentraciones por coadministración con voriconazol. A continuación, se enumeran las interacciones más relevantes, con fármacos ampliamente utilizados o que tienen efecto notable sobre la actividad y la toxicidad de las sustancias activas.

Fármacos que aumentan la concentración de voriconazol

Antibióticos macrólidos (eritromicina y azitromicina): la eritromicina es un conocido inhibidor de CYP3A4 por la unión covalente de un metabolito con esta enzima, dando lugar a su inactividad. Los valores de C_{max} y AUC de voriconazol aumentan un 8% y un 1% respectivamente [90,101] por la administración concomitante con eritromicina y azitromicina.

Inhibidores de la bomba de protones (omeprazol y pantoprazol): estos fármacos son sustratos de la CYP2C19 y la CYP3A4 y su concentración puede verse aumentada por la administración concomitante con voriconazol. El AUC del voriconazol puede aumentar al administrarse junto con estos fármacos [84,108]. En tratamiento con dosis altas de inhibidores de la bomba de protones se recomienda reducir la dosis de los mismos [109].

Everolimus: fármaco inmunosupresor que es sustrato de la enzima CYP3A4. Las concentraciones plasmáticas de voriconazol pueden verse aumentadas. Debe evitarse la coadministración [110].

Fármacos que disminuyen la concentración de voriconazol

Fenitoína: es un fármaco antiepiléptico de estrecho margen terapéutico, sustrato de la CYP2C9 y la CYP2C19 y potente inductor del citocromo P450 (CYP450). Durante la coadministración, los niveles de fenitoína se ven aumentados, mientras que los de antifúngico disminuyen. Debe evitarse la administración concomitante, sin embargo, si el beneficio es superior al riesgo, se recomienda monitorizar las concentraciones de fenitoína y ajustar la dosis de voriconazol [111-113].

Rifampicina y rifabutina: se trata de antibióticos inductores del citocromo P450. Ambos fármacos producen una disminución en los niveles de voriconazol. La administración concomitante con rifampicina está contraindicada, ya que es un inductor más potente. Debe evitarse administrar voriconazol con rifabutina, pero en caso necesidad, hay que incrementar la dosis de voriconazol y vigilar las reacciones adversas de la rifabutina [75,77].

Hierba de San Juan: el extracto de *Hypericum perforatum*, utilizado como antidepresivo, es un potente inductor del CYP450 y la glicoproteína P. Está contraindicado su uso junto con el tratamiento con voriconazol ya que disminuye los niveles de antifúngico [75,77].

Carbamazepina y barbitúricos (fenobarbital y mefobarbital): son potentes inductores del CYP450. Su uso conjunto está contraindicado, ya que se puede reducir significativamente la concentración de voriconazol [77,89].

Efavirenz: se trata de un fármaco antirretroviral inhibidor de la transcriptasa inversa que es inductor del CYP450 e inhibidor y sustrato de la CYP3A4. En la coadministración, las concentraciones plasmáticas de voriconazol se ven reducidas, mientras que las de efavirenz

aumentan. Para su uso concomitante debe aumentarse la dosis del antifúngico y reducirse la del antirretroviral [114].

Ritonavir: es un fármaco antirretroviral inhibidor de la proteasa, inductor del CYP450 e inhibidor y sustrato del CYP3A4. Por lo general los niveles de voriconazol se ven reducidos en la coadministración, aunque en metabolizadores lentos de la CYP2C19 puede producirse el efecto contrario. El uso concomitante con altas dosis de ritonavir está contraindicado y a dosis bajas debe evaluarse el balance beneficio/riesgo [115].

Fármacos que ven afectadas sus concentraciones por coadministración con voriconazol

Inmunosupresores (tacrolimus, sirolimus y ciclosporina): el voriconazol inhibe el metabolismo de estos fármacos, viéndose aumentadas las C_{max} y AUC de los fármacos inmunosupresores. La administración concomitante con sirolimus está contraindicada. Cuando se administra voriconazol junto con tacrolimus y ciclosporina se recomienda reducir la dosis del inmunosupresor, ya que niveles altos de estos se asocian con nefrotoxicidad. Cuando se suspende el tratamiento con voriconazol, la dosis de tacrolimus y ciclosporina puede aumentarse tanto como sea necesario [116-118].

Opiáceos (oxicodona, fentanilo y alfentanilo): estos fármacos son metabolizados por la CYP3A4. Las concentraciones del fármaco opiáceo se ven aumentadas durante la coadministración con voriconazol. Se recomienda monitorizar y reducir la dosis de opiáceos [77,119,120].

Warfarina: es un anticoagulante sustrato de la CYP2C9. Se observa un incremento en el tiempo del máximo de protrombina, es decir, un aumento del efecto de la warfarina. Se recomienda monitorizar el tiempo de protrombina y ajustar la dosis del anticoagulante [121].

Benzodiazepinas (alprazolam, midazolam y tridazolam): son sustratos de la CYP3A4, por lo que su administración concomitante con inhibidores de esta isoenzima, incluidos los azoles, puede aumentar las concentraciones de benzodiazepinas. Si es posible, se recomienda utilizar benzodiazepinas que no se metabolicen mediante la CYP3A4, como lorazepam, oxazepam y temazepam [122,123].

Alcaloides ergotamínicos (ergotamina y dihidroergotamina): sus niveles pueden verse aumentados al administrarse con voriconazol, ya que son sustratos de la CYP3A4. Debido a la alta toxicidad de los alcaloides ergotamínicos, está contraindicado administrarlos junto con inhibidores de la CYP3A4 [124].

Glucocorticoides (prednisolona y prednisona): son sustratos de la CYP3A. Por ello, su concentración plasmática se ve aumentada al administrarlos junto con el voriconazol [101].

Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (ibuprofeno y diclofenaco): estos antiinflamatorios son sustratos de la CYP2C9. En su administración concomitante pueden verse aumentados los niveles de AINE, por lo que se recomienda monitorizar la toxicidad y reacciones adversas, pudiendo llegarse a reducir la dosis [125].

Formulaciones comercializadas

Actualmente hay formulaciones de voriconazol de diferentes dosis comercializadas en las siguientes formas farmacéuticas:

- Comprimidos recubiertos con película.
- Polvo para suspensión oral.
- Polvo para solución para perfusión.

Debido a que se tarda entre 5 y 7 días en alcanzar el estado estacionario, se administran dosis de carga las primeras 24 horas para conseguir alcanzar el primer día concentraciones cercanas al equilibrio estacionario [89].

Para evitar pérdida de eficacia, debe administrarse una hora antes o una hora después de las comidas.

En la Tabla 1 se recogen las recomendaciones posológicas:

	Vía intravenosa		Vía oral		
	Adultos y adolescentes entre 12 y 14 años con peso \geq 50 kg	Niños y adolescentes entre 12 y 14 años con peso < 50 kg	Adultos con peso \geq 40 kg y adolescentes entre 12 y 14 años con peso \geq 50 kg	Adultos con peso < 40 kg	Niños y adolescentes entre 12 y 14 años con peso < 50 kg
Dosis de carga (primeras 24 horas)	6 mg/kg cada 12 horas	9 mg/kg cada 12 horas	400 mg cada 12 horas	200 mg cada 12 horas	No se recomienda
Dosis de mantenimiento	4 mg/kg cada 12 horas	8 mg/kg cada 12 horas	200 mg cada 12 horas	100 mg cada 12 horas	9 mg/kg cada 12 horas (350 mg máximo cada dosis)

Tabla 1: Posología de las formulaciones comercializadas de voriconazol.

La duración del tratamiento debe ser la más corta posible, teniendo en cuenta la respuesta microbiológica y clínica del paciente [77].

Relación farmacocinética/farmacodinamia

La relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) se define como la relación entre la exposición al principio activo y su eficacia antifúngica contra un microorganismo determinado. Se puede expresar con el ratio entre la concentración máxima alcanzada y la concentración mínima inhibitoria (C_{max}/CMI), con el tiempo que la concentración se mantiene por encima de la CMI o con el ratio AUC/CMI. Este parámetro combinado con un método estadístico, la simulación de Montecarlo, se utiliza como herramienta para obtener información sobre la posología óptima del tratamiento y la predicción del resultado clínico [126–130].

Se considera que el índice AUC/CMI es la correlación que permite obtener mejores predicciones de la efectividad del voriconazol frente a *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. [131]. Dado que el CMI es diferente en función de cada microorganismo, son necesarios estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la relación PK/PD. Los ensayos *in vitro* aportan información sobre la susceptibilidad de cada microorganismo al antifúngico y los resultados *in vivo* permiten predecir datos clínicos, tales como posología, concentraciones plasmáticas, eficacia antifúngica y efectos tóxicos. Se ha observado que un ratio de AUC_{0-24}/CMI en un rango 20-25 conlleva resultados satisfactorios [89,126,132].

Resistencias de *Aspergillus* spp.

La resistencia al voriconazol es la capacidad del hongo para crecer en un entorno con una concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de los aislados susceptibles. Clínicamente, se determina como un aumento en la CMI medida de acuerdo a los métodos estandarizados por los organismos competentes, como pueden ser el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) o el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [133].

El voriconazol, como el resto de azoles, no es mutagénico, por lo tanto, los hongos del género *Aspergillus* presentan una resistencia adquirida. Se entiende por resistencia adquirida aquella que surge por mutación o recombinación espontánea y la posterior selección de los individuos que sobrevivan a la exposición del fármaco [134]. Varios autores han reportado una doble fuente de exposición prolongada a los fármacos que genera resistencia a los azoles. La

primera es la práctica clínica, en la que los pacientes son tratados con antifúngicos durante largos periodos de tiempo. La segunda, y probablemente la mayoritaria, tiene origen medioambiental y se debe al uso de azoles como fungicidas en agricultura [134-137].

Son varios los mecanismos por los que se genera resistencia al voriconazol y los azoles en general. El mecanismo de resistencia mayoritario es la alteración en la lanosterol 14 α -desmetilasa, enzima que participa en la ruta de síntesis del ergosterol y que es inhibida por el voriconazol. Está codificada por el CYP51 fúngico, que puede sufrir mutaciones que alteran la estructura de la enzima. Si esta modificación afecta al punto de unión con el voriconazol, este no podrá unirse y por tanto, no ejercerá su efecto antifúngico [138,139]. La mutación también puede afectar a la estructura de la proteína, bloqueando los canales por los que el voriconazol accede al sitio de unión, y evitándose así también el efecto antifúngico [140,141].

Otro mecanismo ampliamente estudiado consiste en la sobreexpresión de CYP51, que origina una mayor cantidad de enzimas lanosterol 14 α -desmetilasa. Una dosis normal de voriconazol no inhibiría la totalidad de enzimas de la célula fúngica, por lo que se produciría el crecimiento del hongo. En este caso sería necesaria una mayor concentración de voriconazol para conseguir inhibir todas las enzimas y evitar la proliferación fúngica [71,142].

Las células fúngicas poseen proteínas transmembrana que son bombas de eflujo y se encargan de expulsar diferentes moléculas del interior celular [143,144]. El rápido eflujo de las moléculas de antifúngico impide que estas se acumulen y alcancen niveles letales [145]. Estas proteínas reconocen una amplia variedad de sustratos, entre ellos el voriconazol [146,147]. Presentan varios sitios de reconocimiento y unión al sustrato que se encuentran en los dominios transmembrana. Una vez que el voriconazol alcanza estos puntos de unión y es reconocido, la bomba de eflujo se encarga de expulsarlo al exterior de la célula [148].

La biosíntesis del ergosterol es una ruta metabólica compleja que incluye un gran número de enzimas y productos intermedios [149]. La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) es una reductasa que cataliza uno de los primeros pasos. La HMG-CoA contiene un dominio que desempeña una regulación negativa de su propia actividad reductasa. Se han descrito mutaciones en dicho dominio que dan lugar a la acumulación de precursores de ergosterol sin necesidad de participación de la CYP51, lo que hace que la célula fúngica sea viable a pesar de la presencia de voriconazol [142,150].

Existen respuestas al estrés celular por parte de las células fúngicas implicadas en la resistencia al voriconazol. Los azoles promueven la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) que conducen a la inhibición del crecimiento celular.

El complejo I mitocondrial está implicado en la producción de ROS. Mutaciones o inhibición de dicho complejo suprimen la liberación de ROS [142]. La chaperona Hsp90 activa la fosfatasa alcalina para regular la respuesta al estrés celular y la calcineurina interviene en funciones celulares tales como la homeostasis iónica y la biogénesis de la pared celular. La activación de estas proteínas es otro de los mecanismos de respuesta al estrés celular [151].

Las biopelículas son formaciones microbianas que consisten en poblaciones celulares adheridas a superficies y rodeadas por una matriz extracelular de polisacáridos. Estas estructuras confieren a los hongos resistencia tanto a fármacos como al sistema inmune [142].

Otro de los mecanismos de resistencia es la importación de colesterol exógeno a la célula fúngica. Por lo general, este colesterol es almacenado por la célula. Sin embargo, en parte es incorporado a la membrana fúngica para compensar la depleción de ergosterol producida por el voriconazol [142].

Dispersiones sólidas y sistemas micelares

Definición y características

La mayoría de los medicamentos desarrollados son formas farmacéuticas sólidas para administración oral, ya que esta vía es la más accesible y menos invasiva. Además, las formas farmacéuticas sólidas presentan buena estabilidad, ocupan poco volumen, tienen una dosis precisa y su producción es sencilla [152]. Los principios activos contenidos en las formas farmacéuticas sólidas han de disolverse en el medio acuoso del tracto gastrointestinal para ser absorbidos por el organismo y ejercer su efecto terapéutico. Sin embargo, un porcentaje significativo de los principios activos utilizados presentan baja solubilidad en agua y una disolución lenta [153], lo que provoca que no se absorba la totalidad de la dosis, mostrando una biodisponibilidad baja y disminuyéndose la eficacia del fármaco. Por tanto, el aumento de la velocidad de disolución de estos principios activos es un asunto de gran importancia para conseguir el efecto terapéutico deseado [154,155].

Una de las estrategias más utilizadas para solventar esta problemática es la formulación de dispersiones sólidas [82]. Se define “dispersión sólida” como una formulación en la cual uno o más principios activos poco solubles en agua están dispersados de manera homogénea en un vehículo sólido inerte e hidrófilo [152,156–158]. El principio activo puede ser dispersado como moléculas separadas, partículas amorfas o partículas cristalinas mientras que el vehículo puede estar en estado amorfo o cristalino [155].

Cuando la dispersión sólida entra en contacto con un medio acuoso, el vehículo hidrófilo se disuelve y el principio activo se libera como partículas coloidales muy pequeñas. Debido a este aumento en la superficie de contacto del principio activo, su velocidad de disolución y su biodisponibilidad aumentan [158].

Clasificación de dispersiones sólidas

Las dispersiones sólidas se pueden clasificar como cristalinas o amorfas en función del estado físico del vehículo. Sin embargo, la forma más común de clasificarlas es en cuatro generaciones [152,155]:

Primera generación

Se trata de dispersiones sólidas cristalinas, en las cuales un principio activo cristalino es dispersado en un vehículo cristalino también, formando una mezcla eutéctica. La primera dispersión sólida para uso farmacéutico fue estudiada y publicada en 1961 por Sekiguchi y Obi, quienes observaron que mediante la formulación de mezclas eutécticas se mejoraba la velocidad de disolución de principios activos poco solubles en agua y, en consecuencia, se mejoraba su biodisponibilidad [159]. Durante esta década se desarrollaron numerosas dispersiones sólidas de primera generación [160-162]. Las mezclas eutécticas se preparan mediante la cristalización rápida y simultánea de dos componentes líquidos mezclados que presentan una pobre velocidad de disolución en estado sólido [158,163]. La velocidad de disolución se mejora debido a la reducción del tamaño de partícula, la mejora de la humectabilidad y los cambios polimórficos. Se define humectabilidad como la tendencia de un líquido a extenderse cuando se sitúa sobre la superficie de un sólido. Se trata del primer paso en la disolución de una formulación [164]. Los vehículos cristalinos más comúnmente utilizados son urea y azúcares como sorbitol y manitol, que normalmente presentan un punto de fusión alto. La principal desventaja de estas dispersiones sólidas es la estabilidad termodinámica alta que presentan los vehículos, que retrasa la velocidad de disolución comparado con la de las dispersiones sólidas amorfas.

Segunda generación

En estas dispersiones sólidas se utilizan vehículos amorfos, que normalmente son polímeros. Se pueden clasificar como soluciones sólidas amorfas y suspensiones sólidas amorfas en función del estado físico del principio activo. En las primeras el principio activo y el vehículo forman una mezcla molecular homogénea, mientras que los segundos constan de dos fases separadas. A menudo el principio activo se presenta en estado amorfo y cristalino y puede estar disuelto y disperso en la formulación al mismo tiempo. En todos los casos, el

principio activo está disperso con tamaños muy pequeños de partícula (cercano al tamaño molecular) y se encuentra supersaturado debido a la solubilización forzada. La velocidad de disolución de estos sistemas se ve aumentada debido a la reducción del tamaño de partícula del principio activo, al aumento de la humectabilidad y a la rápida disolución del vehículo amorfo debido a su baja estabilidad termodinámica. Los polímeros utilizados como vehículos pueden ser sintéticos o basados en productos naturales. Los polímeros sintéticos más utilizados son polivinilpirrolidona (PVP) [165] y sus derivados, polietilenglicoles (PEG) [166] y polimetacrilatos [167]. Los polímeros basados en productos naturales son principalmente derivados del almidón, como las ciclodextrinas [168], o derivados de la celulosa, como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) [169] o hidroxipropilcelulosa (HPC) [157]. La estrategia de formulación de dispersiones sólidas de segunda generación ha sido utilizada por varios autores para mejorar la velocidad de disolución de diferentes principios activos [170-172]. La desventaja de estos sistemas es que, debido a la supersaturación del principio activo, este puede precipitar.

Tercera generación

Esta generación apareció como respuesta al problema de precipitación generada por la supersaturación del principio activo en la segunda generación de dispersiones sólidas. En estos sistemas se utilizan agentes emulsificantes como vehículos o como aditivos. La introducción de surfactantes no solo mejora el perfil de disolución, sino también la estabilidad física y química del principio activo. Además, los emulsificantes aumentan la humectabilidad y previenen la precipitación mediante la adsorción en la superficie de las partículas del principio activo o al formar micelas que contienen a las mismas. En el caso de que se produzca la formación de micelas, estas formulaciones son conocidas como “sistemas micelares”. Estos sistemas alcanzan el grado más alto de biodisponibilidad oral en principios activos poco solubles en agua. Existen surfactantes que se utilizan como vehículos, como Poloxamer [173] o Soluplus [174], o que se añaden al sistema en el que otro material es el vehículo, como lauril sulfato sódico [175,176] o polisorbato 80 [177].

Cuarta generación

Se trata de dispersiones sólidas de liberación controlada que contienen principios activos con baja solubilidad en agua y una vida media corta. Este tipo de formulaciones

mejora la solubilidad del principio activo y modula su liberación. El principio activo se encuentra disperso en la matriz polimérica, lo que mejora su solubilidad en agua. Se utilizan polímeros insolubles en agua o polímeros hinchables que retrasan la liberación del principio activo al medio. Este tipo de sistemas permiten reducir la frecuencia de administración de dosis, disminuir los efectos secundarios y conseguir un efecto terapéutico constante y prolongado de principios activos poco solubles en agua [155]. Estos sistemas han sido ampliamente estudiados [178-180].

Ventajas de las dispersiones sólidas

Existen otras técnicas para mejorar la solubilidad de principios activos poco solubles en agua, que se pueden abordar desde el punto de vista químico, físico o de formulación. El enfoque químico implica la modificación molecular de la estructura del principio activo. Esta estrategia abarca la formación de sales, la inclusión de grupos polares en la molécula y la configuración de polimorfos. El resultado de estos cambios puede ser un cambio en la potencia del fármaco o la precipitación *in vivo* del principio activo. Los cambios físicos se basan en el aumento de la superficie de contacto debido a una disminución del tamaño de partícula mediante una técnica de micronización [181]. El planteamiento del desarrollo de formulaciones es bastante amplio, englobando sistemas líquidos basados en tensoactivos o sistemas sólidos basados en técnicas de solubilización y reducción del tamaño de partícula [182]. Las dispersiones sólidas presentan importantes ventajas que las convierten en la estrategia más prometedora [156].

Las partículas de las dispersiones sólidas presentan un tamaño reducido y están dispersas en un vehículo. Este hecho representa una doble ventaja, ya que, tras la disolución del vehículo, las partículas del principio activo quedan dispersas en el medio de disolución, evitándose su aglomeración, y debido a su pequeño tamaño, presentan un área superficial grande, lo que aumenta la velocidad de disolución. Además, el principio activo es liberado en un estado de supersaturación, lo que es ventajoso para una rápida absorción. Por otro lado, las dispersiones sólidas presentan, por lo general, una estructura porosa, lo que acelera el perfil de disolución [183].

La humectabilidad de las partículas del principio activo es mayor. Incluso vehículos inertes, sin actividad superficial, incrementan esta propiedad [161]. El uso de surfactantes mejora notablemente esta cualidad.

El cambio de estado de los principios activos a amorfos incrementa la solubilidad de los mismos, ya que se requiere una energía menor para romper la estructura cristalina durante el proceso de disolución [184]. En el estado polimórfico tienen gran importancia el método de preparación de la dispersión sólida y las interacciones fisicoquímicas entre el principio activo y el vehículo.

Estos sistemas pueden ser formulados como formas farmacéuticas sólidas, lo que hace que sean mejor aceptadas por los pacientes. Los métodos de fabricación de dispersiones sólidas son más simples que otras técnicas para la mejora de la solubilidad como la formación de sales o la formulación de microemulsiones [152,155].

Problemas de las dispersiones sólidas

El problema más común de estas formulaciones es la recristalización durante el almacenamiento o durante la fabricación. Al tratarse de formulaciones inestables termodinámicamente tienden a sufrir cambios hacia un estado más estable. La temperatura y la humedad durante el almacenamiento son factores cruciales en el proceso de recristalización. Si se produce este fenómeno, la solubilidad y la velocidad de disolución se ven afectadas, dando lugar a un descenso en la biodisponibilidad.

En función del método de preparación de las dispersiones sólidas, surgen problemas a tener en cuenta antes de la formulación. Algunos de estos inconvenientes son inestabilidad térmica en el método de fusión, residuos de solvente en el de evaporación del solvente, etc. [152,155].

Métodos de fabricación

Existen varios métodos para la fabricación de dispersiones sólidas [185].

Métodos de fusión

Este método consiste en la fusión simultánea mediante calentamiento de la mezcla del principio activo y el vehículo a una temperatura por encima de su punto eutéctico. A continuación, el líquido es enfriado o solidificado mediante diferentes técnicas, como agitación en un baño de hielo, en un desecador, mediante inmersión en nitrógeno líquido o

extendiéndolo en placas de acero inoxidable seguido de una corriente fría de agua o aire. El producto sólido que se obtiene es molido, tamizado y pulverizado para reducir su tamaño de partícula. Asimismo, la mezcla homogénea puede ser inyectada en las formas de dosificación antes de su enfriamiento, ahorrándose así el paso de molienda [186].

Fue el primer método utilizado por Sekiguchi y Obi [159]. Tiene la ventaja de que no requiere la utilización de ningún solvente [185]. Sin embargo, el método presenta limitaciones a tener en cuenta. Debido a las altas temperaturas, todos los componentes deben ser termoestables para que no sufran degradación. El principio activo y el vehículo han de ser compatibles y miscibles a la temperatura de calentamiento para que no ocurra una separación de fases. Esta segregación puede tener lugar también durante el proceso de enfriamiento. Con el fin de superar estas limitaciones se han desarrollado variantes del método:

- **Extrusión por fusión en caliente:** consiste en el mezclado, calentamiento, fusión, homogeneizado y extrusión simultánea del principio activo y el vehículo en forma de escamas, varillas o gránulos, o bien, en la molienda y la mezcla con otros excipientes. El mezclado intenso y la agitación ocasionados por la maquinaria utilizada produce la desagregación de las partículas del principio activo en el polímero molido, dando como resultado una dispersión homogénea. Los componentes de la dispersión sólida son sometidos a la alta temperatura durante un corto periodo de tiempo, lo que reduce el riesgo de degradación. Se trata de un proceso continuo, eficiente y fácilmente escalable y da lugar a productos termodinámicamente estables. Esta metodología ha sido utilizada para la fabricación de comprimidos, gránulos, pellets o implantes tanto de liberación inmediata como sostenida [187-191].

- **Meltrex[®] y aglomeración en estado fundido:** Meltrex[®] es un proceso de fabricación patentado basado en el método de extrusión por fusión en caliente. El equipo consta de una extrusora de doble tornillo con dos tolvas independientes en las que se puede controlar la temperatura en un rango desde 30°C hasta 250°C. Esta máquina permite transportar continuamente la masa extruida a través del canal de extrusión y así reducir el tiempo de residencia del principio activo en el extruido y disminuir el estrés térmico al que se someten los componentes. Esta tecnología permite eliminar por completo el oxígeno y la humedad de la mezcla, lo que la hace adecuada para trabajar con principios activos sensibles a la oxidación y la hidrólisis [152,155,186].

En la aglomeración en estado fundido el vehículo tiene la función de aglutinante fundible y puede llevarse a cabo en mezcladores convencionales de cizalla o en procesadores rotativos. Existen tres variantes: adición del vehículo molido mezclado con el principio activo sobre los excipientes calentados, adición del vehículo molido a una mezcla calentada del principio activo con excipientes o calentamiento de la mezcla del principio activo, el vehículo y los excipientes. Con este método se reduce la temperatura del proceso [152,192].

Métodos de evaporación del solvente

El principio activo y el vehículo se disuelven en un solvente volátil para ser mezclados homogéneamente. La formulación final se obtiene mediante la evaporación del disolvente a baja temperatura para minimizar el riesgo de la degradación térmica. La dispersión sólida puede ser triturada y tamizada [186,193]. Por lo general, el principio activo y el vehículo se disuelven en el mismo solvente. Algunos de los más utilizados son el etanol [194] y el cloroformo [195]. Sin embargo, una variante común del proceso es la utilización de vehículos parcialmente suspendidos en vez de disueltos. La velocidad de eliminación del solvente determina el estado físico del principio activo, siendo este más amorfo cuanto más rápido sea el proceso.

Es el método más utilizado en la industria farmacéutica para solventar el problema de los fármacos poco solubles en agua. La principal ventaja es que permite trabajar con materiales inestables a altas temperaturas. Además, permite el uso de vehículos con un punto de fusión muy alto [193]. Las principales limitaciones que presenta es encontrar un solvente o un cosolvente en el que el principio activo y el vehículo sean lo suficientemente solubles, la utilización de un solvente apto que no sea tóxico y la permanencia de un residuo del disolvente en la formulación final, que puede ocasionar toxicidad y la separación de fases durante el almacenamiento. Para minimizar estos problemas se puede utilizar una mezcla de solventes. Otras desventajas que presenta este método son los problemas medioambientales que conlleva y los altos costes de producción originados por la eliminación de los solventes y las protecciones antiexplosión. Existen diferentes técnicas y variantes del método: secado por vacío y evaporación rotatoria, secado por aspersion, liofilización, criogenización, extracción con fluidos supercríticos, coprecipitación, giro electrostático, recubrimiento en lecho fluido, etc. A continuación, se explican las más importantes:

- **Secado con vacío y evaporación rotatoria:** el secado con vacío y la evaporación rotatoria se llevan a cabo a una temperatura moderada para disminuir el riesgo de la separación de fases y la degradación de los componentes. La dispersión sólida final puede ser almacenada en un desecador con vacío para eliminar por completo los residuos del solvente. Estos métodos son sencillos, sin embargo su procedimiento es largo y puede producirse la recristalización y la separación de fases durante el secado [196].

- **Secado por atomización (spray drying):** el principio activo y el vehículo se disuelven o se suspenden en un solvente y son atomizados en finas gotas con gran superficie específica en una corriente de aire caliente para eliminar el solvente [152]. Este proceso es muy rápido, la evaporación del solvente de las pequeñas gotas, y por tanto la formación de la dispersión sólida, ocurre en segundos. El tamaño de partícula de la dispersión sólida puede ser modulado mediante el ajuste de tamaño de las gotas atomizadas. Las condiciones de temperatura, humedad y flujo de aire están controladas dentro del equipo de producción [185]. Esta técnica presenta numerosas ventajas, ya que, por lo general, se generan formulaciones con principios activos en estado amorfo, el proceso de fabricación es continuo y fácilmente escalable, se obtiene una buena uniformidad de tamaño y el rendimiento del proceso es muy alto.

- **Liofilización o congelación y secado a vacío (freeze drying):** el principio activo y el vehículo se disuelven en un solvente común y esta mezcla es congelada, normalmente mediante inmersión en nitrógeno líquido, para obtener un producto sólido. A continuación, se realiza un primer secado en el que se elimina el hielo mediante sublimación. Es necesario controlar la presión, la temperatura y la duración del proceso. Por último, se ejecuta un secado secundario, que consiste en eliminar los residuos de solvente adsorbidos sobre la matriz sólida. Este paso se lleva a cabo bajo condiciones de vacío y a una temperatura superior [197]. La ventaja de este método es el bajo riesgo de separación de fases. La principal desventaja es que la mayoría de los solventes orgánicos presentan una temperatura muy baja de congelación y no se mantienen congelados durante la sublimación. Además, la duración del proceso depende de la temperatura de congelación del solvente, pudiendo alargarse demasiado si dicha temperatura es muy baja.

- **Secado en lecho fluido:** en esta técnica el principio activo y el vehículo se disuelven en un solvente común y la mezcla es rociada sobre la superficie de pellets neutros o de gránulos en un equipo de lecho fluido. El solvente es eliminado por una corriente de aire y el principio activo y el vehículo coprecipitan simultáneamente al depositarse en la superficie

de los pellets o los gránulos. Este método tiene la ventaja de que los gránulos o los pellets obtenidos pueden ser comprimidos o encapsulados sin más pasos adicionales [198].

Método de fusión- evaporación

Es una combinación del método de evaporación del solvente y el método de fusión. En esta técnica el principio activo se disuelve en un solvente apropiado y la disolución se mezcla con el vehículo previamente fundido. A continuación, el solvente es eliminado mediante evaporación y la formulación se solidifica dando lugar a la dispersión sólida. Las ventajas que aporta este proceso son tiempos de mezclado y temperaturas menores, lo que protege al principio activo frente a la degradación térmica y que el vehículo, al estar fundido, se dispersa más fácilmente en el solvente [155].

Sistemas micelares

Este tipo de sistemas pertenecen a la tercera generación de las dispersiones sólidas. Son formulaciones compuestas por un vehículo, uno o varios principios activos y un surfactante o una mezcla de surfactantes. Tienen la propiedad de formar micelas al entrar en contacto con el medio debido a la presencia del tensoactivo.

Las micelas son nanoestructuras formadas por tensoactivos. Los tensoactivos, también conocidos como surfactantes o agentes emulsificantes, son compuestos anfifílicos. Esto quiere decir que tienen una estructura característica que posee tanto grupos hidrófobos (apolares) como hidrófilos (polares) [156]. Se clasifican en cuatro categorías en función de la carga eléctrica de su extremo hidrófilo:

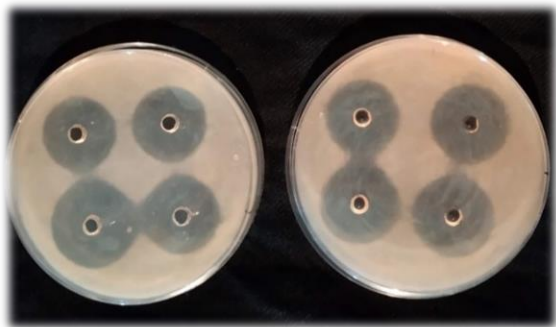
- Tensoactivos no iónicos: su extremo polar no tiene carga. Son los menos irritantes.
- Tensoactivos iónicos: región polar con carga eléctrica.
 - Aniónicos: presentan carga negativa.
 - Catiónicos: su carga es positiva.
 - Anfóteros o zwitteriónicos: pueden poseer carga positiva, negativa o neutra en función del pH del medio.

Debido a su naturaleza anfifílica, cuando los surfactantes se disuelven un medio acuoso, se autoensamblan configurando micelas [199]. Para que se produzca la formación

espontánea de estas estructuras, los tensoactivos tienen que alcanzar una cierta concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC) [200,201]. Las micelas tienen una estructura compuesta por un núcleo hidrófobo y una cubierta hidrófila que está en contacto con el medio. El núcleo puede contener moléculas de principios activos hidrófobos, mejorando así su solubilidad y la cubierta hidrófila aísla el fármaco encapsulado del medio externo [202]. Además de la solubilización de moléculas poco solubles, las micelas proporcionan otras ventajas, como: modificación en la liberación de los fármacos, pudiendo conseguirse liberaciones sostenidas; protección de la degradación; cambio en el metabolismo; alteración en la eliminación al prevenir la filtración glomerular y así aumentar el tiempo de residencia del principio activo en el organismo; aumento de la biodisponibilidad; modificación en la biodistribución y atenuación de la toxicidad como consecuencia de la menor acumulación en ciertos órganos [203-205]. Asimismo, son capaces de mejorar la captación celular del fármaco encapsulado en micelas y ofrecer una vía alternativa de internalización, como endosomas. Esto puede ser de vital importancia en ciertas patologías en las cuales el éxito de la terapia puede verse afectado por mecanismos de resistencia tales como la expulsión del principio activo del interior de la célula [206].

El uso de surfactantes en las dispersiones sólidas, además de las capacidades ya comentadas producidas por la formación de micelas, confiere otras ventajas a las formulaciones. Brevemente, se aumenta la velocidad de disolución de principios activos poco solubles en agua, se mejora su estabilidad física, se reduce la recristalización, se incrementa la humectabilidad de la formulación y se previene la precipitación del principio activo en medio acuoso [156].

Objetivo y planteamiento



Objetivo

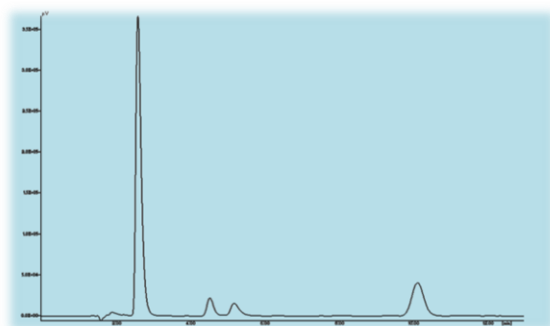
El objetivo global de este trabajo fue el desarrollo una formulación micelar de voriconazol de administración por vía oral que permitiera el tratamiento de la aspergilosis invasora con alta eficacia y toxicidad reducida.

Planteamiento

Para alcanzar el objetivo se siguieron estas etapas que permitieron seleccionar un candidato:

1. Puesta a punto de métodos analíticos adecuados para la cuantificación de voriconazol.
2. Desarrollo galénico de sistemas micelares de voriconazol de rápida disolución.
3. Caracterización de las formulaciones y determinación del grado de cristalinidad del principio activo.
4. Determinación de las CMI's frente a los hongos patógenos.
5. Evaluación de perfiles farmacocinéticos.
6. Estudio de la biodistribución.

Materiales y métodos



Materiales

Materias primas

- Agar de patata y dextrosa (PDA): Pronadisa, Madrid, España.
- Carboximetilcelulosa sódica: Sigma, Copenhague, Dinamarca.
- Ciclofosfamida (Genoxal): Baxter Oncology GmbH, Alemania.
- Fluorouracilo: Accord Healthcare, Reino Unido.
- Heparina sódica: concentración 5.000 UI/mL: Reig Jofre, Barcelona, España.
- Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución: L-HPC, Shin-Etsu, Japón.
- Kolliphor RH40: BASF, Argentina.
- Labrasol: Gattefosse, Madrid, España.
- Maltodextrina: Glucidex 12D, Roquette, Francia.
- Manitol: Pearlitol 200SD, Roquette, Francia.
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 sintético: Merck, Alemania.
- Nimodipino: Fagron, Barcelona, España.
- Tween 80: polisorbato 80 NF, Fagron, Bélgica.
- Voriconazol: Normon, Madrid, España.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado farmacéutico o superior

- Acetato sódico trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$): Panreac Química S.A., Barcelona.
- Ácido acético glacial (CH_3COOH) 2N: Calidad PA-ACS-ISO. Panreac Química S.A., Barcelona.
- Ácido bórico (H_3BO_3): Panreac Química S.A., Barcelona.
- Ácido clorhídrico (HCl) 37%: Calidad PA. Panreac Química S.A., Barcelona.
- Ácido morfolino propano sulfónico (MOPS): Merck, Alemania.
- Cloruro de potasio (KCl): Panreac Química S.A., Barcelona.
- Etanol: Panreac Química S.A., Barcelona.
- Éter dietílico: Panreac Química S.A., Barcelona.
- Fosfato de potasio (KH_2PO_4): Calidad PA-ACS. Panreac Química S.A., Barcelona.
- Hidróxido sódico (NaOH) PRS. Panreac Química S.A., Barcelona.

- Metanol: Calidad HPLC. Lab-Scan Analytical Science, Dublín.
- Suero fisiológico estéril 0,9%: Ern, Barcelona, España.

Soluciones

Los **tampones** utilizados se elaboraron siguiendo las indicaciones estipuladas por la USP 38 (2015) [207].

- Tampón acetato pH 5,0
 - o 4,7 g acetato sódico trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)
 - o 0,85 mL ácido acético glacial (CH_3COOH) 2N
 - o Agua c.s.p. 1 L
- Tampón ácido clorhídrico 0,1 M pH 1,2
 - o 6,3 mL ácido clorhídrico (HCl) 37%
 - o Agua c.s.p. 1 L
- Tampón acetato a pH 4,5
 - o 2,99 g acetato sódico trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)
 - o 1,6 mL ácido acético glacial (CH_3COOH) 2N
 - o Agua c.s.p. 1 L
- Tampón fosfato a pH 6,8
 - o 6,8 g fosfato de potasio (KH_2PO_4)
 - o 0,896 g hidróxido sódico (NaOH)
 - o Agua c.s.p. 1 L
- Tampón borato pH 9,0
 - o 3,0925 g ácido bórico (H_3BO_3)
 - o 3,7275 g cloruro de potasio (KCl)
 - o 0,832 g hidróxido sódico (NaOH)
 - o Agua c.s.p. 1 L

Los **medios de cultivo** se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Medio RPMI 1X (con glutamina, sin bicarbonato y tamponado con MOPS, ajustado a pH $7,0 \pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa)
 - o 17,4 g RPMI
 - o 54,4 g MOPS
 - o Agua c.s.p. 1L

- PDA 1X
 - 15 g agar
 - Agua c.s.p. 1 L

Equipos

- Agitador magnético Agimatic-N (España).
- Agitador Vortex (Fisher scientific, Estados Unidos).
- Aparato de disolución Erweka DT80 con baño termostatzado.
- Autoclave HA-3D. Hirayama Manufacturing Corporation (Japón).
- Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AJ 100.
- Baño de ultrasonidos.
- Bomba de vacío Büchi Vac V-500 con controlador Büchi Vacuum Controller B-721.
- Calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo modelo TC15 TA Controller.
- Centrífuga concentradora: Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA.
- Centrífuga de tubos.
- Centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Alemania).
- Cromatógrafo modular Jasco (Tokio, Japón) que consta de:
 - Inyector automático de muestras AS-2050 Plus (Jasco, Japón).
 - Bomba de alta presión modelo PU-1580 (Jasco, Japón).
 - Desgasificador DG-2080-53 (Jasco, Japón).
 - Sistema de detección UV-1575 (Jasco, Japón).
 - Módulo de interfaz JMBS Hercule Lite.
 - Programa de integración de datos Borwin.
- Difractómetro de rayos X Philips X'Pert-MPD.
- Espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-730.
- Estufa Memmert, Barcelona, España.
- Evaporador de carbón Quorum Q150T E.
- Homogeneizador Ultra Turrax T25 Basic, IKA Labortechnik, Alemania.
- Metalizador Quorum Q150R S.
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400.
- Microscopio óptico Olympus.
- pH-metro MP 230 Mettler Toledo.
- Purificador de agua Milli-Q Millipore: Billerica, USA.

Animales

- Ratas Wistar macho: Criffa S.A., Barcelona, España.
- Ratonos OF-1 macho: Charles River, Criffa S.A., Barcelona, España.

Material de laboratorio

- Agitador magnético.
- Botellas de vidrio.
- Calibre pie de rey Mitutoyo Corp, Japón.
- Cámara de Neubauer.
- Columna de análisis Waters C18 (4,6 x 150 mm; 5 μ m).
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro.
- Espátulas.
- Espejo invertido con soporte.
- Filtro de jeringa de 0,45 μ m Millipore filter, Millex-HV, Hydrophilic PVDF, Cork, Ireland.
- Filtro de membrana de 0,45 μ m Acrodisc, Ann Arbor, USA.
- Frasco lavador.
- Frascos de vidrio.
- Gradillas para tubos.
- Materiales fungibles: gasas estériles, asas de siembra estériles, tubos de ensayo de plástico estériles, cinta de doble cara, cápsulas de aluminio, puntas de pipeta desechables, jeringas, agujas, tubos eppendorf, tubos falcon, pipetas pasteur de plástico desechables.
- Matraces aforados de vidrio.
- Membrana de nylon 0,45 μ m.
- Microplacas estériles de 96 pocillos de fondo cóncavo.
- Parafilm, Bemis.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Pipeta multicanal Gilson, Estados Unidos.
- Pipetas automáticas Gilson, Estados Unidos.
- Placas de Petri.
- Probetas de vidrio.

- Sonda buco gástrica para ratas.
- Sonda buco gástrica para ratones.
- Tamiz luz de malla 0,297 mm, serie 5v ASTM.
- Temporizador Analtec, Córdoba, España.
- Tijeras quirúrgicas de acero inoxidable.
- Tubos de ensayo de vidrio.
- Vasos de precipitados de vidrio.
- Viales de vidrio (con y sin septum).
- Vidrio de reloj.
- Visturí.

Fabricación de las formulaciones

Se prepararon diferentes tipos de formulaciones para ser analizadas: voriconazol recristalizado, mezclas físicas, dispersiones sólidas y sistemas micelares.

El voriconazol recristalizado se preparó mediante la disolución de voriconazol en etanol en una proporción de 10 mg de voriconazol por cada 100 μ L de etanol. Posteriormente se secó en una estufa a 40°C durante 24 horas.

Se mezclaron las cantidades correspondientes de voriconazol y excipientes en envases de vidrio para obtener las mezclas físicas.

Las dispersiones sólidas se fabricaron mediante el método de evaporación del solvente, utilizando etanol como disolvente. Se ensayaron tres vehículos diferentes: un manitol (Pearlitol 200SD), una maltodextrina (Glucidex 12D) y una celulosa (L-HPC). La formulación DS-1:6 se preparó disolviendo 50 mg de voriconazol en 0,36 mL de etanol con ayuda de un agitador vortex y adsorbiéndolo en 300 mg de vehículo mediante agitación manual. La formulación se dejó durante 24 horas en una estufa a 40°C para permitir la evaporación del disolvente. La formulación DS-1:3 se preparó en dos etapas debido a que el máximo volumen de etanol que se podían adsorber en 300 mg de vehículo era 0,36 mL. Por ello, 50 mg de voriconazol se disolvieron en 0,36 mL de etanol. La disolución se adsorbió sobre 300 mg de vehículo y se secó la formulación a 40°C. Después de 24 horas, otros 50 mg de voriconazol se disolvieron en 0,36 mL de etanol y se adsorbieron mediante agitación manual sobre la dispersión sólida preparada anteriormente. Por último, se volvió a meter en la estufa a 40°C durante 24 horas. Las dispersiones sólidas se pasaron a través de un tamiz con luz de malla de 297 μ m.

Los sistemas micelares se prepararon con el mismo método que las dispersiones sólidas. Se ensayaron tres surfactantes: Tween 80, Kolliphor RH40 y Labrasol. Todos ellos son de carácter no iónico y presentan valores de HLB de 14-15; 14-16 y 12 respectivamente [208-210]. Para la elaboración de estas formulaciones se siguieron los mismos pasos que en las dispersiones sólidas, pero previamente se disolvió la cantidad correspondiente de tensoactivo en el etanol y se usó esta mezcla como disolvente para el voriconazol. Sobre la disolución se añadió el vehículo y se humectó mediante agitación manual. Las formulaciones fueron secadas a 40°C durante 24 horas. Una vez secas, todas las formulaciones fueron pasadas a través de un tamiz con luz de malla de 297 μ m.

Métodos analíticos

Espectrofotometría de segunda derivada

Procedimiento analítico

Como método de análisis del voriconazol en muestras *in vitro* se utilizó la espectrofotometría ultravioleta.

La espectroscopía derivada es una operación matemática que permite obtener el dato de la velocidad de cambio de la absorbancia respecto a la longitud de onda, es decir, es la medida de la curvatura del espectro [211]. Es una técnica analítica rápida, simple y precisa para cuantificar compuestos en formulaciones farmacéuticas. Presenta la propiedad de mejorar la selectividad debido al tratamiento matemático de derivación del espectro [212]. Ha sido comparada al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en muchos estudios y se ha llegado a la conclusión de que son comparables en precisión y repetitividad, pero la espectroscopía es más sencilla, barata y rápida, ya que no es necesario hacer un pretratamiento a las muestras [212-216].

Se usó un espectrofotómetro Jasco V-730 con un software Spectra Manager Suite para procesar y tratar los datos. Las muestras se filtraron con un filtro de membrana de 0,45 μm y se pasaron a cubetas de cuarzo. Fueron introducidas en el equipo, se realizaron barridos entre 280 y 250 nm y se midió la pendiente del espectro mediante el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada. La curva recogida mostró un pico máximo a 270,5 nm. Este pico se tomó como punto para la determinación del voriconazol en las muestras.

Se realizaron rectas de calibrado para cada uno de los medios y se validaron los métodos.

Validación

Los métodos de cuantificación de voriconazol fueron validados siguiendo las pautas marcadas por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, International Conference on Harmonisation) en el documento Q2 (R1) sobre validación de métodos

analíticos [217]. El objetivo de validar un método analítico es demostrar que dicho método es adecuado para cumplir su propósito.

Para validar los métodos analíticos se evaluaron las siguientes capacidades:

- **Especificidad:** capacidad de un método de evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que se espera que estén presentes.

Para comprobar la ausencia de interferencias, se estudió la especificidad de los métodos respecto a:

- Medios de disolución: se hicieron medidas de muestras filtradas de cada medio con un porcentaje de etanol superior al presente en las disoluciones utilizadas para realizar las rectas de calibrado.
- Excipientes: se prepararon tres disoluciones: la primera con voriconazol a una concentración de 20 µg/mL, la segunda con manitol y Tween 80 en concentraciones mayores de las que corresponden a las formulaciones y la tercera consistió en una mezcla 1:1 de las anteriores. Las muestras se filtraron, se situaron en cubetas y se analizaron.

- **Linealidad:** en un método analítico debe existir una relación lineal entre la concentración de analito en la muestra y los resultados obtenidos en el equipo de medición.

Se disolvieron 10 mg de voriconazol en 50 mL de etanol, obteniéndose una solución madre con una concentración de 200 µg/mL. Esta solución se llevó a un baño de ultrasonidos durante 5 min para su desgasificación y completa disolución del activo. Se utilizó etanol como disolvente para asegurar la completa disolución del voriconazol.

A partir de la solución madre se prepararon diluciones en las siguientes concentraciones: 0,5; 1,0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 y 25 µg/mL. Estas diluciones se realizaron utilizando el respectivo medio de disolución como diluyente. Todas ellas se llevaron a un baño de ultrasonidos durante 5 min para ser desgasificadas y asegurar su homogeneidad. Las muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro y se pasaron a cubetas de cuarzo para ser analizadas por espectrofotometría de segunda derivada.

Este proceso se ejecutó por triplicado y se determinaron las ecuaciones de las rectas obtenidas, las cuales relacionaron el valor de absorbancia obtenido con la concentración de voriconazol en las muestras.

Se obtuvieron valores medios de absorbancia que englobaban los valores de las tres réplicas. Con estos resultados se determinó la ecuación de la recta media por el método de

los mínimos cuadrados, las desviaciones estándar de la pendiente y la ordenada en el origen y los coeficientes de correlación y de determinación. Además, se realizaron análisis estadísticos ANOVA de la regresión y de la varianza utilizando la herramienta de análisis de datos del programa informático Excel.

- **Exactitud:** expresa el grado de coincidencia entre el valor obtenido y el valor real o el valor de referencia aceptado.

Se prepararon tres disoluciones madre de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se realizaron diluciones de 1,0; 5,0; 12,5; 17,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada una de ellas. Todas las diluciones fueron filtradas y analizadas en el espectrofotómetro.

Se determinaron los porcentajes de voriconazol recuperado, la media de todos los resultados y la desviación estándar entre ellos.

- **Precisión:** grado de dispersión entre un número de mediciones de muestras obtenidas a partir de la misma muestra homogénea.

Se estudió la repetibilidad para comprobar la precisión bajo las mismas condiciones durante un corto intervalo de tiempo. Se comprobó la precisión intermedia entre días y entre analistas.

- Repetibilidad: se preparó una disolución madre de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de la que se realizaron 6 diluciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada una. Se midieron todas ellas y se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad.
- Precisión intermedia: se prepararon disoluciones madre de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos días diferentes por dos analistas distintos. Se hicieron 6 diluciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se midieron y se calcularon las desviaciones estándar y los coeficientes de variabilidad.

- **Límites de detección y cuantificación:** el límite de detección se define como la concentración más baja de analito que puede ser detectada sin necesidad de ser cuantificada exactamente. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas.

Para realizar el cálculo de ambos límites se utilizó el método matemático basado en los parámetros de la recta de calibrado. Las ecuaciones aplicadas fueron:

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{Pendiente}}$$

Donde σ = desviación estándar de la ordenada en el origen.

- **Rango:** intervalo entre la concentración mayor y menor de analito para las que se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

El rango se determinó a partir de los ensayos de linealidad, precisión y exactitud. El límite inferior se definió a partir del límite de cuantificación calculado.

- **Robustez:** medida de la capacidad del método de no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros. Proporciona información sobre su fiabilidad durante su uso habitual.

Se preparó una disolución madre de 200 µg/mL. Se hicieron dos diluciones de 15 µg/mL y se analizaron recién preparadas, a las 6 horas y transcurridas 24 horas. Una de las diluciones se conservó a 4°C y la otra a 25°C para comparar su estabilidad térmica. Los resultados se expresaron como el porcentaje de voriconazol que permaneció inalterado en cada una de las muestras.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Procedimiento analítico

La cuantificación del voriconazol contenido en las muestras biológicas se realizó mediante HPLC.

El equipo de HPLC utilizado fue un cromatógrafo modular Jasco (Tokio, Japón). Los resultados fueron adquiridos y procesados mediante el software de integración de datos Borwin.

El método utilizado fue una adaptación de métodos previamente publicados [218-220]. Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Fase móvil: mezcla de metanol y tampón acetato con pH 5,0 en una proporción 60:40. Antes de utilizarse, fue filtrada con una membrana de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y desgasificada en un baño de ultrasonidos.

- Flujo: la fase móvil se bombea a una velocidad constante de 1,0 mL/min.
- Fase estacionaria: la separación de los compuestos se consiguió con una columna de análisis Waters C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm).
- Volumen de inyección: 50 µL de muestra fueron utilizados en cada análisis.
- Longitud de onda: se fijó en 255 nm, ya que el voriconazol presenta un máximo de absorción en ese punto de su espectro.

Se construyó una recta de calibrado a partir de soluciones patrón mezcladas con plasma de voluntarios sanos.

Validación

El método de HPLC para la cuantificación de voriconazol se validó siguiendo las pautas marcadas por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, International Conference on Harmonisation) en el documento Q2 (R1) sobre validación de métodos analíticos [217]. Se evaluaron las siguientes capacidades del método:

- **Especificidad:** para comprobar la ausencia de interferencias, se estudió la especificidad de los métodos respecto a:
 - Medio de disolución: se analizaron muestras de fase móvil filtradas.
 - Excipientes: se prepararon tres disoluciones: la primera con voriconazol a una concentración de 15 µg/mL, la segunda con manitol y Tween 80 en concentraciones mayores de las que corresponden a las formulaciones y la tercera consistió en una mezcla 1:1 de las anteriores. Las muestras se filtraron, se situaron en viales y se inyectaron en el equipo para ser analizadas.
 - Plasma: se tomaron muestras de plasma de voluntarios sanos que no habían recibido tratamiento con voriconazol y se sometieron al mismo proceso de extracción que las muestras de sangre empleadas en el ensayo de farmacocinética. El residuo sólido se resuspendió en fase móvil y se inyectó en el equipo de HPLC.
 - Órganos: se extrajeron cerebro, pulmones, hígado y riñones de animales control que habían recibido un tratamiento con placebo. Los órganos se homogeneizaron y se efectuó el mismo proceso de extracción que el ejecutado en las muestras de biodistribución. El residuo sólido se resuspendió en fase móvil y se inyectó en el equipo de HPLC.

- **Linealidad:** se disolvieron 10 mg de voriconazol en 50 mL de etanol, obteniéndose una solución madre con una concentración de 200 µg/mL. Esta solución se llevó a un baño de ultrasonidos durante 5 min para su desgasificación y completa disolución del activo. Se utilizó etanol como disolvente para asegurar la completa disolución del voriconazol.

A partir de la solución madre se prepararon diluciones en las siguientes concentraciones: 0,7; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 y 20 µg/mL utilizando plasma blanco de individuos sanos como diluyente.

Se tomaron 400 µL de cada una de las diluciones, se añadieron 30 µL de una disolución de nimodipino (estándar interno) de concentración 200 µg/mL y se homogeneizó con vortex (3.000 rpm) durante 1 min. Se añadieron 0,5 mL de éter dietílico, se mezcló en vortex a 30.000 rpm durante 2 min para extraer las sustancias activas. Se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm durante 5 min, se separó el sobrenadante y se evaporó en una centrifuga concentradora (Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA) conectada a un sistema de enfriamiento, con vacío a 40°C durante 30 min. El residuo sólido se resuspendió en 400 µL de fase móvil agitándolo en el vortex durante 1 min y posteriormente se pasó a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 µm para su posterior análisis mediante HPLC.

Este proceso se ejecutó por triplicado y se determinaron las ecuaciones de las rectas obtenidas, las cuales relacionaron el valor del área del pico con la concentración de voriconazol en las muestras.

Se obtuvieron valores medios de las áreas que englobaban los valores de las tres réplicas. Con estos resultados se determinó la ecuación de la recta media por el método de los mínimos cuadrados, las desviaciones estándar de la pendiente y la ordenada en el origen y los coeficientes de correlación y de determinación. Además, se realizaron análisis estadísticos ANOVA de la regresión y de la varianza utilizando la herramienta de análisis de datos del programa informático Excel.

- **Exactitud:** se prepararon tres disoluciones madre de 200 µg/mL y se realizaron diluciones de 5,0; 10 y 15 µg/mL de cada una de ellas, siguiendo los mismos pasos que en la preparación de las muestras de linealidad. También se utilizó plasma blanco como diluyente y nimodipino como estándar interno. Todas las diluciones fueron filtradas e inyectadas en el equipo de HPLC para su análisis.

Se determinaron los porcentajes de voriconazol recuperado, la media de todos los resultados y la desviación estándar entre ellos.

- **Precisión:** se estudió la repetibilidad para comprobar la precisión bajo las mismas condiciones durante un corto intervalo de tiempo. Para ello se preparó una disolución madre de 200 µg/mL a partir de la que se realizaron seis diluciones de 5 µg/mL utilizando el mismo método que en los pasos anteriores, con plasma blanco como diluyente y nimodipino como estándar interno. Se midieron todas ellas y se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad.

- **Límites de detección y cuantificación:** para realizar el cálculo de ambos límites se utilizó el método matemático basado en los parámetros de la recta de calibrado. Las ecuaciones aplicadas fueron:

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{Pendiente}}$$

Donde σ = desviación estándar de la ordenada en el origen.

- **Rango:** el rango se determinó a partir de los ensayos de linealidad, precisión y exactitud. El límite inferior se definió a partir del límite de cuantificación calculado.

- **Robustez:** se preparó una disolución madre de 200 µg/mL y a partir de esta se elaboró una muestra de 5 µg/mL de la misma forma que en los pasos anteriores, con plasma blanco y nimodipino. Se analizó recién preparadas, a las 6 horas y transcurridas 24 horas. La muestra se conservó a 24°C. Los resultados se expresaron como el porcentaje de voriconazol que permaneció inalterado en cada una de las muestras.

Ensayo de velocidad de disolución

Este ensayo permite conocer el perfil de liberación de voriconazol en cada formulación.

Se empleó un aparato de disolución Erweka DT80 tipo II, acorde a la USP (método de paletas) conectado a un baño termostaticado.

Debido a la solubilidad pH-dependiente del voriconazol, el ensayo se realizó en tres medios de disolución diferentes, seleccionados de acuerdo a las directrices de la FDA [221]: medio ácido clorhídrico 0,1 M a pH 1,2; tampón acetato a pH 4,5 y tampón fosfato a pH 6,8. Estos mismos medios han sido utilizados previamente para ensayos de disolución con formulaciones de voriconazol [222]. Se usó un volumen de 500 mL de cada uno de los medios a una temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La velocidad de rotación de las paletas se fijó en 50 rpm. Una cantidad equivalente a 10 mg de cada formulación se introdujo en los vasos de disolución. Alícuotas de 5 mL fueron tomadas con reposición de medio en los siguientes intervalos de tiempo: 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se hizo pasar cada muestra a través de un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$. Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado.

Caracterización

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica permite la caracterización morfológica de las muestras. Se utiliza para conocer la forma y el tamaño de las partículas y comprobar el aspecto de la superficie.

Los equipos utilizados para realizar esta prueba fueron un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400, un evaporador de carbón Quorum Q150T E y un metalizador Quorum Q150R S.

Las muestras fueron fijadas con cinta de doble cara a un soporte, secadas y recubiertas de una fina capa de carbón y una segunda película de oro de unos 15 nm de grosor, utilizando primero el evaporador y a continuación el metalizador, ambos equipos operados bajo unas condiciones de vacío de $5 \cdot 10^{-5}$ mbar. Las imágenes fueron capturadas con el microscopio electrónico, operado a un voltaje de aceleración de 20 kV.

El microscopio electrónico utilizado cuenta con un sistema de análisis EDS (espectroscopía de energía dispersada de rayos X), lo que permite conocer la composición elemental cualitativa y semicuantitativa de las muestras.

Difracción de rayos X

Este ensayo permite conocer el grado de cristalinidad de las muestras.

Para llevar a cabo esta técnica se utiliza un difractómetro de rayos X Philips X'Pert-MPD.

Las muestras se colocaron en un portamuestras y se introdujeron en el difractómetro. Fueron sometidas a una radiación $K\alpha$ monocromática de cobre con ángulos de incidencia desde 5° hasta 50° (2θ) y un intervalo de $0,04^\circ$ y 1 segundo entre cada paso. El voltaje y la intensidad utilizados fueron 30 mV y 30 mA, respectivamente.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El DSC es una forma de determinar las temperaturas y las entalpías de fusión de las formulaciones. Los resultados dan información acerca del estado físico de las mismas.

Para realizar el ensayo se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo modelo TC15 TA Controller conectado a un sistema de enfriamiento.

Muestras con un peso equivalente de 2 mg de voriconazol de cada formulación se colocaron en el interior de cápsulas de aluminio que fueron selladas y analizadas en el calorímetro, utilizando como referencia una cápsula vacía. Se calentaron las muestras de 25°C a 225°C a una velocidad de 10°C/min con un flujo constante de nitrógeno de 30 mL/min.

Sensibilidad *in vitro*

Este tipo de ensayos permiten determinar la actividad antifúngica de las formulaciones frente a diferentes cepas de hongos. Los ensayos se realizaron en cepas del género *Aspergillus* y del género *Candida*. Todos los procedimientos se realizan con material estéril y bajo condiciones de esterilidad.

Método de microdilución

Mediante este método se determinó la CMI de cada formulación para cada una de las cepas ensayadas. Para ello se utilizaron placas de microdilución con diluciones seriadas de las formulaciones en las que se inocularon los hongos con medio de cultivo. Se define CMI como la concentración más baja de antifúngico en la que no hay crecimiento visible del hongo. Los métodos utilizados fueron los estandarizados por el CLSI en los documentos M38 ed.3 (2017) [223] para hongos filamentosos (ensayos en *Aspergillus* spp.) y M27 (2017) [224] para levaduras (ensayos en *Candida* spp.).

Preparación de los antifúngicos

El CLSI indica en el protocolo que para realizar este ensayo debe utilizarse dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente para el voriconazol, debido a su baja solubilidad en agua. El DMSO es un disolvente orgánico cuya polaridad es menor que la del agua. Por ello, en este caso se utilizará agua como disolvente, ya que las formulaciones ensayadas deben formar micelas al entrar en contacto con el medio. Además, dado que el medio gástrico en acuoso, este modelo es más fiel a la realidad.

Tras hacer una valoración de cada una de las formulaciones ensayadas de voriconazol mediante espectroscopía de segunda derivada, se disolvió la cantidad correspondiente en agua purificada estéril para obtener una solución madre de concentración 160 µg/mL, diez veces superior a la concentración más alta a ensayar, tal como marca el protocolo. Todas las soluciones madre se pasaron a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro y se realizaron diluciones dobles seriadas, siempre con agua purificada estéril, siguiendo el esquema marcado por el CLSI. A continuación, con cada una de las soluciones anteriores, se

realizaron diluciones 1:5 en medio RPMI 1640 sintético (con glutamina, sin bicarbonato y tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) ajustado a pH $7,0 \pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa). En este momento la concentración de antifúngico era el doble que la concentración final ensayada.

Preparación del inóculo

Este paso varía en función de si se trabaja con hongos filamentosos o con levaduras. El ensayo se realizó con 8 cepas de *Aspergillus* spp. y 7 cepas de *Candida* spp. obtenidas de la Universitat Rovira i Virgili de Reus, España. Las especies incluidas en el estudio fueron: *A. calidoustus* (n = 2), *A. terreus* (n = 1), *A. flavus* (n = 2), *A. fumigatus* (n = 3), *C. auris* (n = 2), *C. tropicalis* (n = 2), *C. parapsilosis* (n = 2) y *C. krusei* (n = 1).

Las cepas de *Aspergillus* spp. se incubaron en placas de agar de patata y dextrosa (PDA) a 35°C hasta que se produjo la esporulación. Con ayuda de un asa de siembra, se rascaron las placas, arrastrando hifas y conidios, y se pasaron a un tubo con solución salina fisiológica estéril. Esta suspensión se homogeneizó y se filtró a través de una gasa estéril para eliminar las hifas y restos de medio, de forma que quedase una suspensión de conidios únicamente. La suspensión se ajustó a $4 \cdot 10^6$ células/mL con una cámara de Neubauer y se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI. De esta forma el inóculo estaba el doble de concentrado que en el momento de realizar el ensayo. Para asegurar la viabilidad de los inóculos, se sembraron en placas de PDA diluciones 1:10 de los inóculos ajustados en la cámara de Neubauer. Estas placas se incubaron a 35°C y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) de cada una de las cepas.

Las cepas de *Candida* spp. se incubaron en placas de PDA a 35°C durante 48 horas. Se tomaron dos o tres colonias de cada cepa con ayuda de un asa de siembra y se resuspendieron en un tubo con solución salina fisiológica estéril. La suspensión se homogeneizó y se ajustó el preinóculo a $3 \cdot 10^6$ células/mL con la cámara de Neubauer. A continuación, se realizó una dilución 1:50 en agua destilada y posteriormente otra dilución 1:20 en medio RPMI 1640. Como con los hongos filamentosos, también se realizaron estudios de viabilidad de los inóculos. Para ello, se sembraron en placas de PDA diluciones 1:10 del preinóculo ajustado en la cámara de Neubauer, se incubaron a 35°C y se determinó el número de UFCs en cada placa.

Inoculación e incubación de las microplacas

Se utilizaron microplacas estériles de 96 pocillos de fondo cóncavo. Para cada formulación se usó una microplaca. Las diluciones de las diferentes formulaciones se dispensaron en las placas con ayuda de una pipeta multicanal, añadiendo 100 μL en cada pocillo.

En la misma placa multipocillo se realizó el estudio con todas las cepas de *Aspergillus* spp. o con las cepas de *Candida* spp., pero no se ensayaron hongos filamentosos y levaduras en la misma microplaca. Con una pipeta multicanal se añadieron 100 μL del inóculo final en cada pocillo, utilizando una fila de la microplaca para cada cepa de hongo. Tras la dispensación del inóculo, se obtuvo un rango de concentraciones de antifúngico de 16 a 0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tal como marcan las directrices del CLSI, la columna 11 de todas las microplacas se utilizó como control de esterilidad del medio, añadiendo 200 μL de medio RPMI, y la columna 12 se usó como control de crecimiento del hongo (control negativo), dispensando 100 μL de inóculo junto con 100 μL de medio RPMI. En la figura 2 se representa un esquema de las microplacas utilizadas para el ensayo.

Las microplacas se incubaron a 35°C durante 48 horas. Todos los pasos de este ensayo, tanto la preparación de las diluciones de antifúngico como los inóculos, se realizaron durante el mismo día para evitar que las micelas se estropearan, el voriconazol se degradara o el hongo siguiese creciendo.

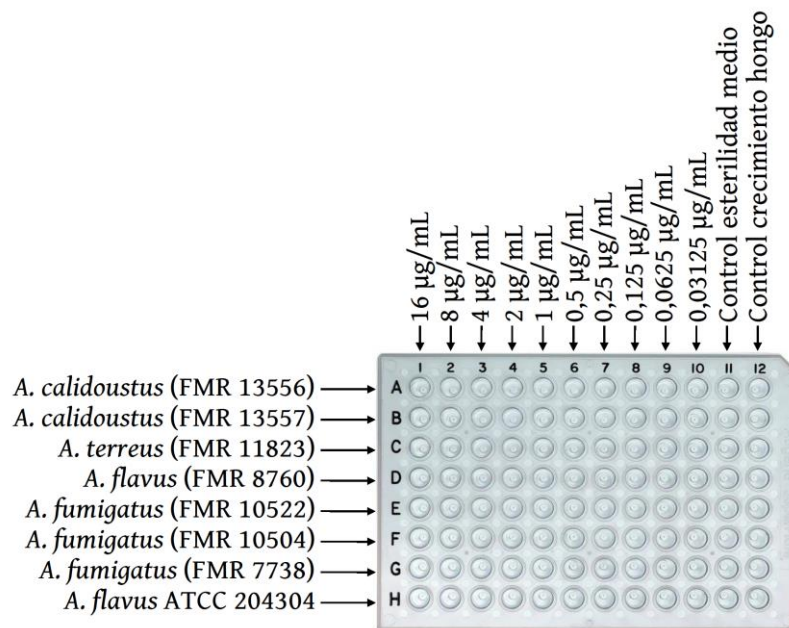


Figura 2: Esquema de las microplacas utilizadas en el ensayo de sensibilidad *in vitro*.

Lectura e interpretación de resultados

La lectura de las microplacas se realizó de forma visual con ayuda un espejo invertido acoplado a un soporte. Siguiendo el protocolo del CLSI, la CMI para *Aspergillus* spp. se estableció en la menor concentración de fármaco en la que no se aprecia crecimiento fúngico, es decir, su crecimiento está inhibido totalmente; mientras que para *Candida* spp. se tomó como CMI la concentración de fármaco que produce una reducción del 50% en el crecimiento fúngico en comparación con el control positivo.

Método de difusión

Esta prueba permite comparar los halos de inhibición de crecimiento fúngico que producen cada una de las formulaciones. El método utilizado es una adaptación ensayo previamente descrito por Siopi et al. [225,226]. Este ensayo se llevó a cabo con las mismas cepas de los géneros *Aspergillus* y *Candida* que el ensayo de microdilución.

Con el objetivo de preparar placas de Petri con medio sólido con una cantidad de $3 \cdot 10^5$ células por placa, se preparó agar PDA a concentración 2X en una botella y medio RPMI 2X en otra botella, con la cantidad necesaria de MOPS, ajustado a pH 7,0 con NaOH. Ambos medios se esterilizaron, el PDA en el autoclave y el RPMI mediante filtración. Se preparó un inóculo con una concentración de $2,5 \cdot 10^7$ células/mL ajustado en la cámara de Neubauer. Se añadió el inóculo al medio RPMI en una proporción de 300 μ L por cada 12,5 mL de medio y se homogeneizó. El medio RPMI inoculado se mezcló con el agar fundido a partes iguales, de tal forma que ambos medios quedaron en una concentración 1X, y se vertieron 25 mL en cada placa de Petri, quedando en cada placa la cantidad requerida de células. Se dejaron solidificar y se hicieron pocillos de la misma medida con un molde estéril. Siguiendo el mismo protocolo que en el ensayo de microdilución, se prepararon disoluciones de las formulaciones. Se dispensaron 80 μ L de las disoluciones de antifúngico en los pocillos practicados en las placas de Petri. En las cepas de *Aspergillus* spp. se ensayaron concentraciones de 8 μ g/mL, mientras que en las cepas de *Candida* spp. la concentración utilizada fue 12 μ g/mL. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. A continuación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento formados en cada una de las cepas con ayuda de un calibre pie de rey. También se tomaron fotos de los resultados obtenidos y se midieron con una mayor precisión en el ordenador mediante el programa Image J.

Ensayos *in vivo*

Farmacocinética

El estudio de farmacocinética permite conocer cómo evoluciona la concentración de voriconazol de cada formulación en el plasma tras la administración de una dosis.

Este estudio se realizó en ratas Wistar macho sanas con pesos comprendidos entre 400 y 450 g. Los animales se dividieron en grupos de seis individuos y se les administró una dosis única de 40 mg/kg [227-235]. Las formulaciones ensayadas fueron el voriconazol materia prima, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025, las cuales se suspendieron en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 0,75%. Inmediatamente después de la reconstitución se administraron 400 µL de la suspensión mediante sonda oral a los animales.

Se tomaron muestras de sangre en tubos heparinizados en los tiempos: 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8 y 24 horas después de administrar la dosis. Los tubos se centrifugaron a 7.000 rpm durante 15 min para separar el plasma, que quedó como sobrenadante en el tubo. Se tomó el sobrenadante y se congeló a -4°C hasta su análisis.

Para realizar el análisis, fue necesario hacer una extracción del voriconazol con un disolvente orgánico. Una vez descongelado, se tomaron 200 µL de plasma, se añadieron 30 µL de una disolución de nimodipino (estándar interno) con una concentración de 200 µg/mL y se homogeneizó con vortex (3.000 rpm) durante 1 minuto. Se añadieron 0,5 mL de éter dietílico, se mezcló en vortex a 30.000 rpm durante 2 minutos para extraer las sustancias activas. Se centrifugaron los tubos a 4.000 rpm durante 5 minutos, se separó el sobrenadante y se evaporó en una centrífuga concentradora (Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA) conectada a un sistema de enfriamiento, con vacío a 40°C durante 30 minutos. El residuo sólido se resuspendió en 400 µL de fase móvil agitándolo en el vortex durante 1 minuto y posteriormente se pasó a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 µm para su posterior análisis mediante HPLC.

Biodistribución

El ensayo de biodistribución permite conocer la concentración de voriconazol en varios órganos cierto tiempo después de la administración de dosis.

Dosis única

Los mismos animales utilizados para realizar el ensayo de farmacocinética fueron sacrificados 24 horas después de recibir el tratamiento mediante inhalación de CO₂ [236]. Sus cerebros, pulmones, hígados y riñones fueron extraídos quirúrgicamente. Los órganos se pesaron, se añadió a cada uno su peso de agua y se homogeneizaron mecánicamente con el equipo Ultra Turrax T25 Basic. Estas muestras se congelaron a -4°C hasta ser analizadas.

Se tomó un peso exactamente conocido de cada muestra y se añadieron 30 µL de una disolución de nimodipino de 200 µg/mL, mezclándolo durante 1 min en vortex. Se adicionó 1 mL de tampón borato a pH 9,0 y se agitó 30 segundos en vortex. Para hacer la extracción al disolvente orgánico, se añadieron 2 mL de éter dietílico y se mantuvo 2 minutos en el vortex. La mezcla se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y se pasó el sobrenadante a tubos de la centrífuga concentradora para ser evaporado bajo las mismas condiciones que las muestras de plasma (vacío, 40°C, 30 minutos). El residuo sólido fue resuspendido en 400 µL de fase móvil mediante agitación en vortex durante 1 minuto y filtrado por 0,45 µm para ser analizado mediante HPLC.

Varios autores han analizado muestras de plasma y órganos utilizando métodos de extracción de voriconazol con disolventes orgánicos, tales como acetonitrilo [219,220,237] o éter dietílico [218,238].

Dosis múltiple

Este estudio se realizó en ratones macho OF-1 (Charles River, Criffa S.A., Barcelona) entre 29 y 31 g de peso. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar con acceso libre a comida y bebida. Tres días antes de comenzar el tratamiento, se sustituyó el agua por zumo de pomelo (Granini, Barcelona, España) diluido en agua al 50% para ralentizar el metabolismo del fármaco en los animales y obtener niveles detectables en los órganos. Los ratones son metabolizadores ultrarrápidos de voriconazol y presentan un aclaramiento rápido del

principio activo, lo que se traduce en concentraciones mínimas del fármaco su organismo. El zumo de pomelo inhibe enzimas del citocromo P450 que están involucradas en el metabolismo del voriconazol, lo que permite obtener resultados biológicamente significativos, es decir, extrapolables a los seres humanos [236,239,240]. Este método ha sido empleado previamente por otros autores [230-233,235,241-244]. Debido a que la gran mayoría de los pacientes tratados con voriconazol están inmunosuprimidos, dos días antes de comenzar el tratamiento los ratones fueron sometidos a una inmunosupresión sistémica mediante la administración de una dosis intraperitoneal de ciclofosfamida de 200 mg/kg y una dosis intravenosa de 5-fluorouracilo de 150 mg/kg [231,235,242]. Los animales se dividieron en tres grupos de diez ratones. Al grupo control se le administró placebo (SM-0:3:0,05), a los animales del grupo de referencia se les administró la materia prima y al tercer grupo se le administró la formulación SM-1:3:0,05. Las dosis de voriconazol que recibieron los animales fueron de 30 mg/kg cada 12 horas, ya que esta es la posología utilizada en los pacientes. Las formulaciones se suspendieron en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 0,75% y se administraron 200 μ L de suspensión a cada animal mediante sonda oral. Se seleccionó esta dosis porque se ha demostrado en estudios previos que prolongaba significativamente la supervivencia de ratones infectados [242]. Otros autores utilizaron esta dosis previamente [241]. Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron tras recibir dos dosis de tratamiento y sus cerebros, pulmones, hígados y riñones fueron extraídos quirúrgicamente para comprobar los niveles de voriconazol 24 horas después del inicio del tratamiento. Los ratones restantes se sacrificaron cuando llevaban 5 días recibiendo tratamiento, es decir tras recibir diez dosis. Todos los sacrificios se hicieron 4 horas después de la administración de la última dosis [235,245,246]. Las muestras se trataron y se analizaron de la misma forma que en el ensayo de dosis única.

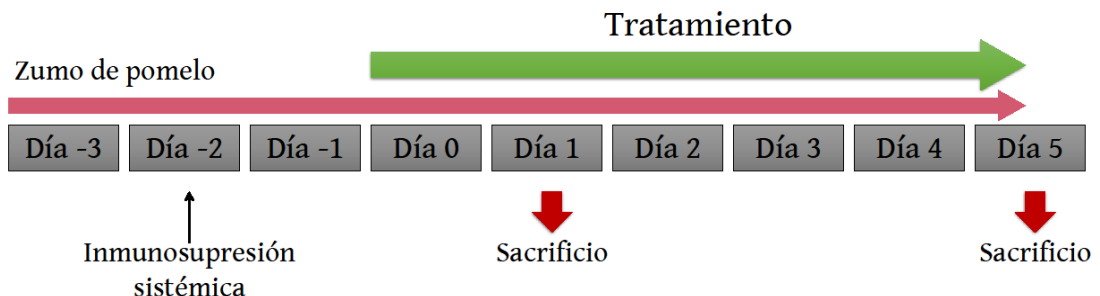
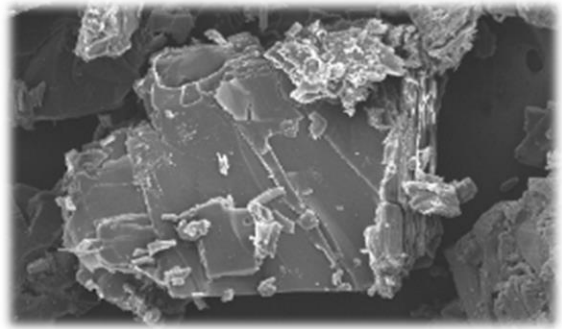


Figura 3: Esquema del ensayo de biodistribución en dosis múltiple en ratones inmunosuprimidos.

Resultados



Métodos analíticos

Validación de los métodos de espectrofotometría de segunda derivada

La Figura 4 revela el espectro del barrido del voriconazol entre 280 y 250 nm. La Figura 5 muestra la gráfica de la transformación de dicho barrido mediante el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada.

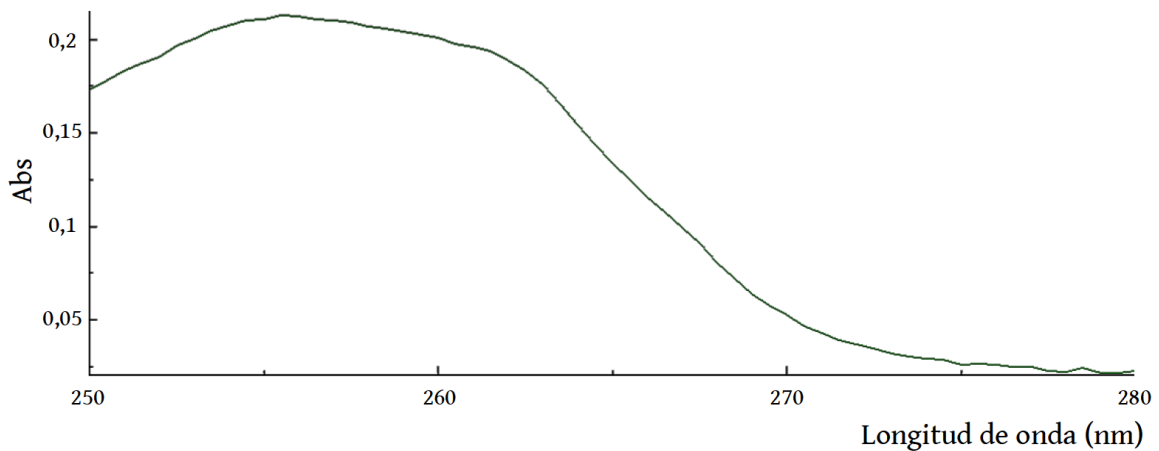


Figura 4: Espectro del barrido UV de voriconazol de 250 nm a 280nm.

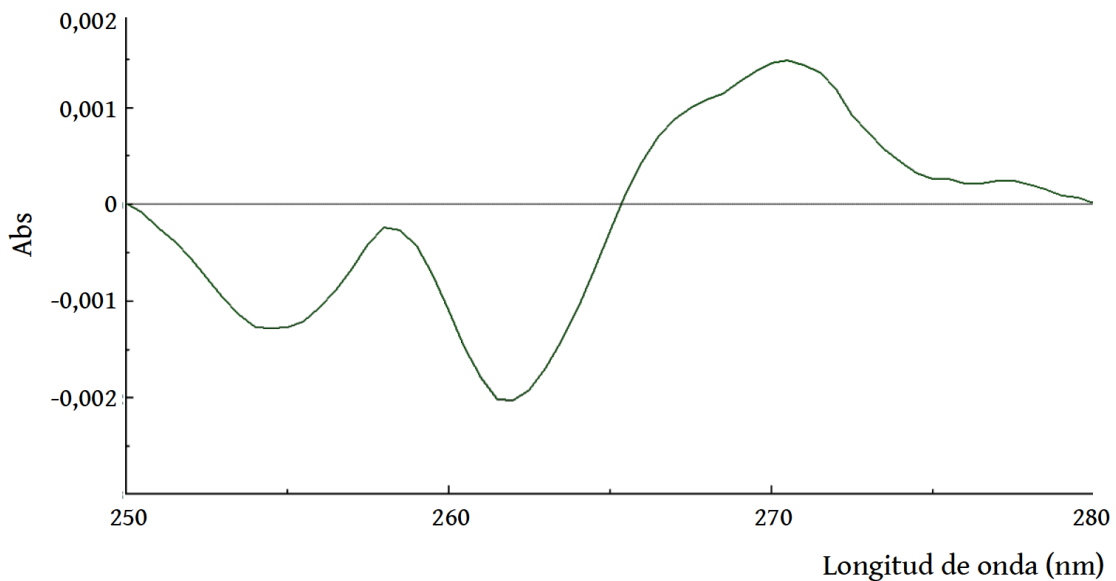


Figura 5: Transformación mediante el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada del espectro UV del voriconazol de 250 nm a 280nm.

Medio pH 1,2

- **Especificidad**

Tras el análisis del medio de disolución con etanol se obtuvo un espectro que no reveló ningún máximo correspondiente al voriconazol. A dicho espectro se le aplicó el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada y, nuevamente, no se detectó ningún máximo, por lo que se comprobó que no tenía lugar ninguna interferencia entre el medio y el voriconazol.

En el espectro de la disolución de los excipientes no se detectó ningún máximo correspondiente al voriconazol, ni tampoco en la conversión de segunda derivada. Los espectros de la disolución de voriconazol y la mezcla de ambas sirvieron como referencia para asegurar la ausencia de máximos correspondientes al principio activo. Así se confirmó que los excipientes tampoco interferían en los resultados.

- **Linealidad**

Las rectas de calibrado construidas se recogen en la Tabla 2 y sus gráficas aparecen representadas en la Figura 6.

	Ecuación	Coefficiente de determinación (R ²)	DE pendiente	DE ordenada en el origen
Recta 1	$Abs = 0,000175923332901996 \cdot C + 0,0000433977924470474$	0,999110323	1,74989E-06	2,30057E-05
Recta 2	$Abs = 0,0001732350307839 \cdot C + 0,0000495776285159707$	0,998855614	1,95456E-06	2,56964E-05
Recta 3	$Abs = 0,000170434090104202 \cdot C + 0,0000601254093509497$	0,998371588	2,29441E-06	-3,01644E-05

Tabla 2: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Todas las rectas presentaron coeficientes de determinación $R^2 > 0,998$, por lo que la linealidad es aceptable en todas ellas.

Con los valores medios de las tres rectas de calibrado se obtuvo una línea de regresión calculada por el método de los mínimos cuadrados cuya gráfica se representa en la Figura 7. La ecuación de dicha recta fue: $Abs = 0,000173197484596699 \cdot C + 0,0000510336101046558$.

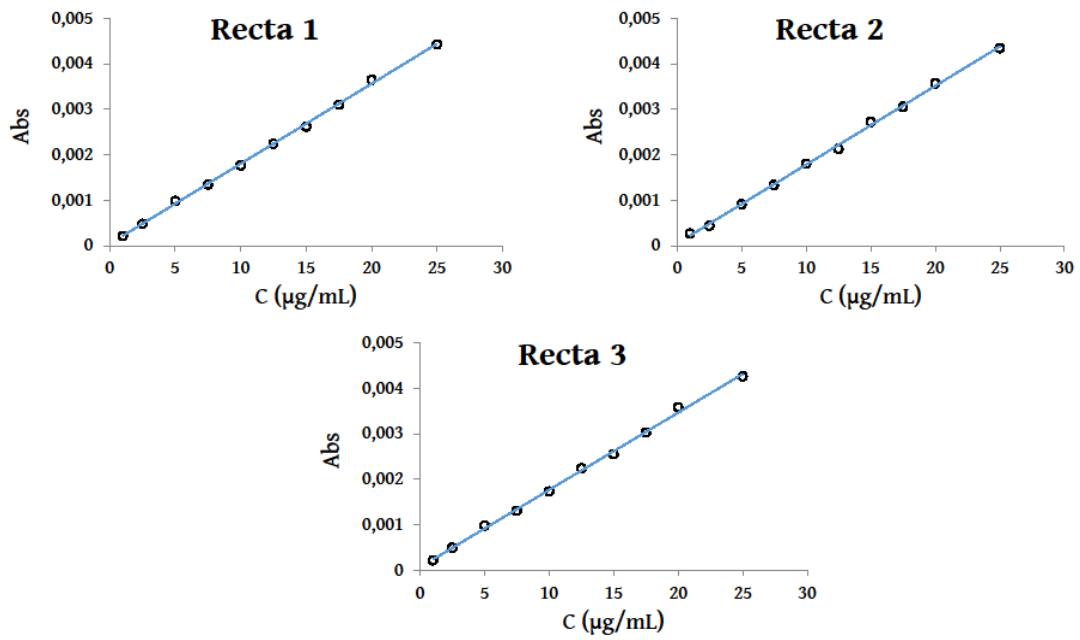


Figura 6: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

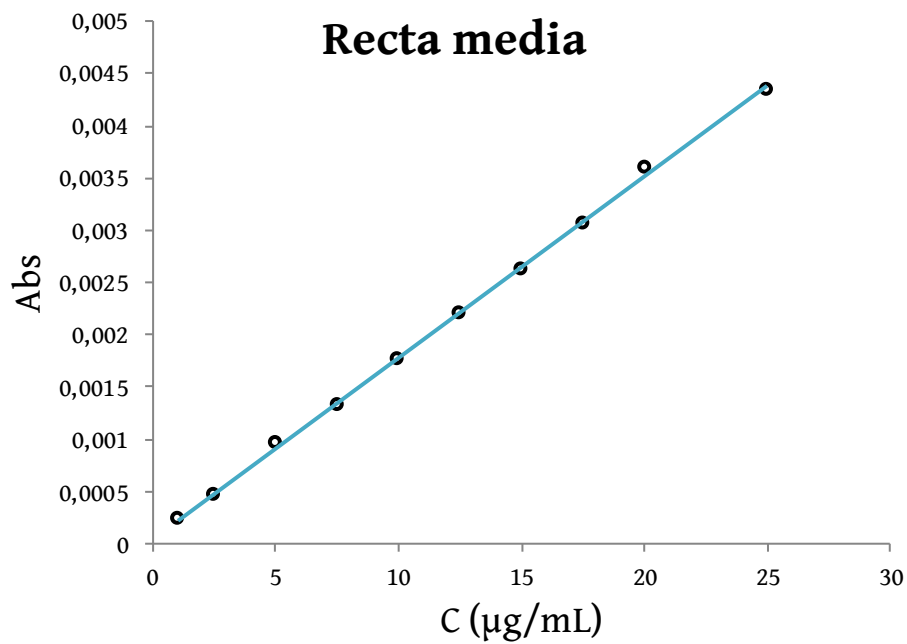


Figura 7: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

El análisis de la regresión se muestra en la Tabla 3 y las estadísticas de la recta media están recogidas en la Tabla 4.

	Valor	DE	Estadístico T	Probabilidad (Valor p)
Pendiente	0,000173197	1,44844E-06	119,5752852	0,00
Ordenada en el origen	5,10336E-05	1,90425E-05	2,679988098	0,03

Tabla 3: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Coefficiente de correlación múltiple R	0,99968542
Coefficiente de determinación R ²	0,99937095
R ² ajustado	0,99930105
Error típico	3,7419E-05

Tabla 4: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Los valores de los coeficientes de correlación y de determinación indicaron que el método analítico presentaba una linealidad adecuada con una relación fuerte entre las variables.

Se realizó un análisis de la varianza cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Probabilidad (Valor p)
Regresión	2,00205E-05	2,00205E-05	14298,24883	0,00
Residuos	1,26019E-08	1,40021E-09		
Total	2,00331E-05			

Tabla 5: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

El valor p del análisis de la varianza determina si el método es significativo. En este caso $p < 0,01$, por lo que es altamente significativo con un nivel de confianza $> 99\%$.

En la Figura 8 se representan la absorbancia obtenida frente a la pronosticada por el análisis ANOVA de la regresión.

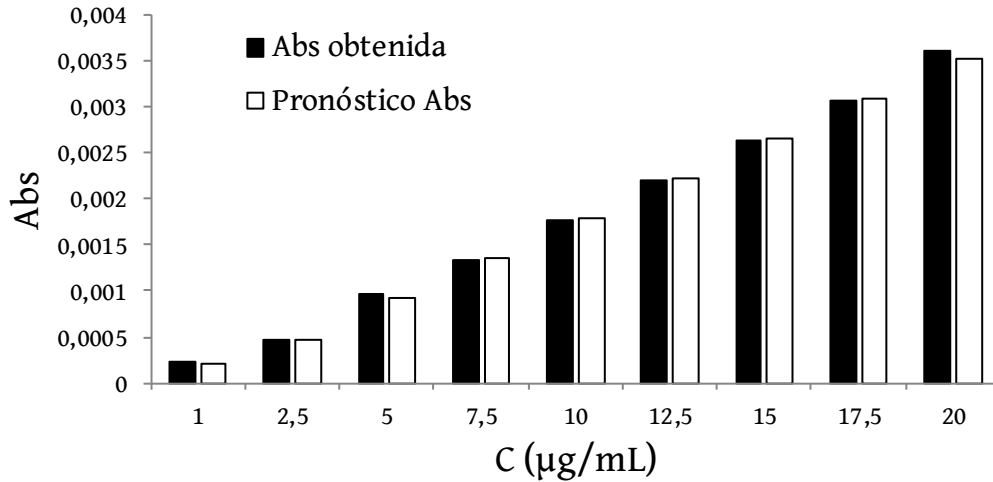


Figura 8: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

- **Exactitud**

C (µg/mL)	Abs	C detectada (µg/mL)	Recuperación (%)
1	0,000221379	0,983532701	98,353%
1	0,000226785	1,014746377	101,475%
1	0,000217579	0,961593998	96,159%
5	0,000914305	4,984320227	99,686%
5	0,000911051	4,965530486	99,311%
5	0,000898251	4,891623558	97,832%
12,5	0,00224244	12,65264559	101,221%
12,5	0,002220667	12,52693191	100,215%
12,5	0,00224218	12,65114441	101,209%
17,5	0,00310212	17,61622807	100,664%
17,5	0,00305762	17,35929593	99,196%
17,5	0,003028	17,18827728	98,219%
25	0,00442954	25,28042714	101,122%
25	0,0043468	24,80270657	99,211%
25	0,004397936	25,09795137	100,392%

Tabla 6: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

- Recuperación media = 99,618%
- Desviación estándar = 1,512%

El método analítico ofrece una exactitud aceptable.

- **Precisión**

Repetibilidad

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 7.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Abs
10	0,001785213
10	0,0018031
10	0,001779518
10	0,001789277
10	0,001778309
10	0,00176599

Tabla 7: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Análisis estadístico de los datos:

- Media = 0,001783568
- Desviación estándar = 1,24084E-05
- Coeficiente de variación = 0,696%

Precisión intermedia

Los datos obtenidos por el primer y el segundo analista los días 1 y 2 se muestran en la Tabla 8.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 1	Analista 2
	Día 1	Día 2
	Abs	Abs
10	0,00178521	0,00179296
10	0,0018031	0,00177361
10	0,00177952	0,00177956
10	0,00178928	0,00179175
10	0,00177831	0,00176982
10	0,00176599	0,00178941
Media	0,00178357	0,00178285
DE	1,2408E-05	9,9039E-06
Coeficiente de variación	0,696%	0,556%

Tabla 8: Resultados obtenidos los días 1 y 2 por el primer y el segundo analista en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Se realizó un análisis estadístico de todos los datos y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Media = 0,00178321
- Desviación estándar = 1,07103E-05
- Coeficiente de variación = 0,601%

Se trata de un método con una precisión adecuada, tanto en la repetibilidad como en la precisión intermedia entre días y entre analistas.

- **Límite de detección y límite de cuantificación**

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot 1,9042E - 05}{0,0001732} = 0,363 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot 1,9042E - 05}{0,0001732} = 1,099 \mu\text{g/mL}$$

- **Rango**

El límite inferior del rango del método lo marcó el límite de cuantificación y el límite superior se determinó atendiendo a los resultados de linealidad, exactitud y precisión. Por lo tanto, el rango del método de espectrofotometría de segunda derivada en el medio a pH 1,2 sería: 1,0 – 25 $\mu\text{g/mL}$.

- **Robustez**

Mediante los análisis de las diluciones que se mantuvieron a 25°C y a 4°C se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 9.

Tiempo	25 °C		4 °C	
	Abs	% VCZ inalterado	Abs	% VCZ inalterado
0 horas	0,00262612	100,00%	0,00267984	100,00%
6 horas	0,00262024	99,78%	0,00268262	100,10%
24 horas	0,00261784	99,68%	0,00268079	100,04%

Tabla 9: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.

Se trataba de un método analítico robusto, ya que no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos a lo largo del tiempo de la misma muestra, tanto si la temperatura de conservación era de 4°C o de 25°C.

Medio pH 4,5

- **Especificidad**

El espectro obtenido tras el análisis del medio de disolución con etanol no reveló ningún máximo correspondiente al voriconazol. Tampoco se detectó ningún máximo en el de segunda derivada, por lo que se verificó que no tenía lugar ninguna interferencia entre el medio y el voriconazol.

En el espectro de la disolución de los excipientes no se detectó ningún máximo correspondiente al voriconazol, ni tampoco en la conversión de segunda derivada. Los espectros de la disolución de voriconazol y la mezcla de ambas sirvieron como referencia para asegurar la ausencia de máximos correspondientes al principio activo. Así se confirmó que los excipientes tampoco interferían en los resultados.

- **Linealidad**

En la Tabla 10 están recogidas las ecuaciones y el coeficiente de determinación de las rectas que se utilizaron en la validación. Las gráficas de estas rectas están representadas en la Figura 9.

	Ecuación	Coficiente de determinación (R ²)	DE pendiente	DE ordenada en el origen
Recta 1	Abs = 0,000177176150037458 · C + 0,00000436177460328216	0,999888061	6,24883E-07	8,21527E-06
Recta 2	Abs = 0,000173973661649527 · C + 0,000037791401620922	0,99978767	8,45111E-07	1,11106E-05
Recta 3	Abs = 0,000176909490935095 · C - 0,0000184318539944159	0,99933327	1,52317E-06	2,0025E-05

Tabla 10: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Los coeficientes de determinación de todas las rectas fueron R² < 0,999, así que la correlación entre las variables es buena en todas ellas.

Con los valores medios de las tres rectas de calibrado se obtuvo una línea de regresión calculada por el método de los mínimos cuadrados cuya gráfica se representa en la Figura 10. La ecuación de dicha recta fue: Abs = 0,000176019767540693 · C + 0,00000790710740992918.

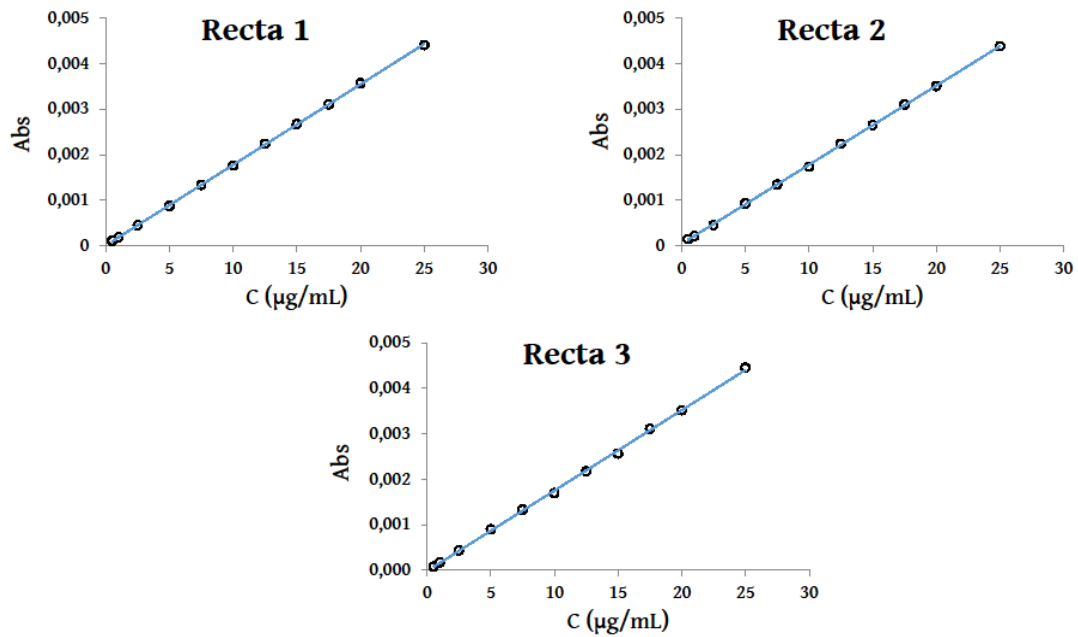


Figura 9: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

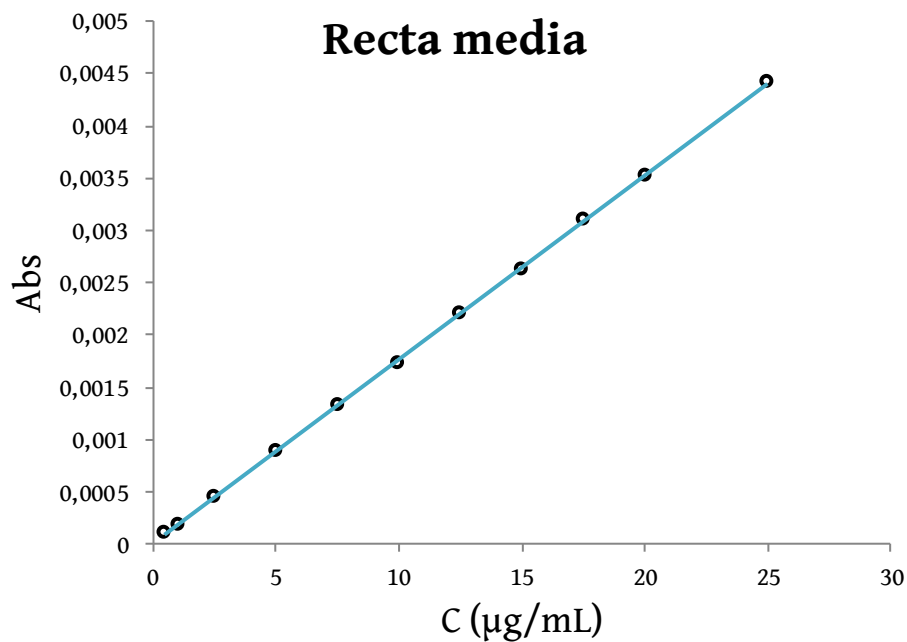


Figura 10: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

El análisis de la regresión se muestra en la Tabla 11 y sus estadísticas están recogidas en la Tabla 12.

	Valor	DE	Estadístico T	Probabilidad (Valor p)
Pendiente	0,00017602	6,71837E-07	261,99772	0,00
Ordenada en el origen	7,90711E-06	8,83257E-06	0,89522136	0,39

Tabla 11: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Coefficiente de correlación múltiple R	0,99993445
Coefficiente de determinación R ²	0,9998689
R ² ajustado	0,99985434
Error típico	1,7356E-05

Tabla 12: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Los altos valores de los coeficientes de correlación y de determinación indicaron una linealidad adecuada del método analítico.

Se realizó un análisis de la varianza y se obtuvieron los resultados que aparecen en la Tabla 13.

	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Probabilidad (Valor p)
Regresión	2,06783E-05	2,06783E-05	68642,80526	0,00
Residuos	2,71121E-09	3,01245E-10		
Total	2,0681E-05			

Tabla 13: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

El valor $p < 0,01$ indica que el método es significativo.

En la Figura 11 se representan la absorbancia obtenida frente a la pronosticada por el análisis ANOVA de la regresión.

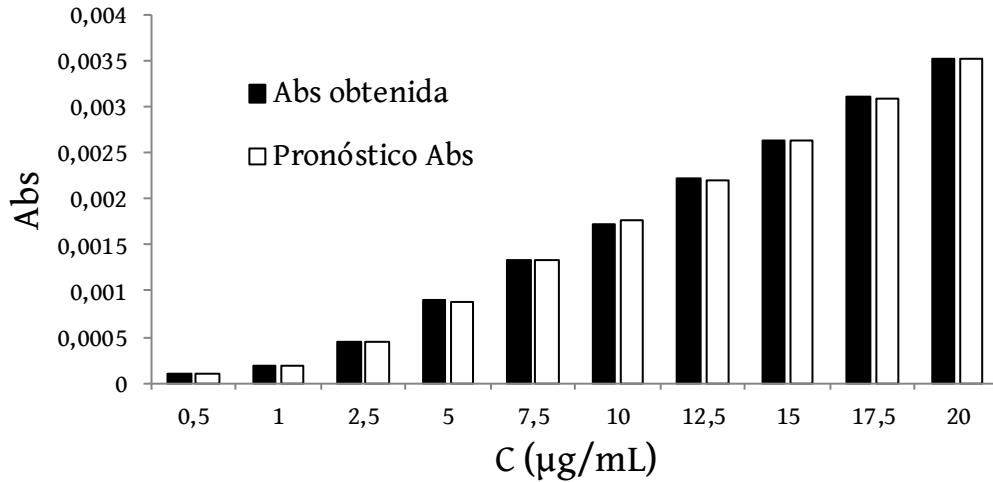


Figura 11: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

- **Exactitud**

C (µg/mL)	Abs	C detectada (µg/mL)	Recuperación (%)
1	0,000178064	0,966691284	96,67%
1	0,000185943	1,01145529	101,15%
1	0,000180593	0,981059656	98,11%
5	0,000872872	4,914023116	98,28%
5	0,000890603	5,014756998	100,30%
5	0,0008968	5,04996061	101,00%
12,5	0,002175638	12,3152703	98,52%
12,5	0,002169822	12,28222541	98,26%
12,5	0,00217358	12,30357773	98,43%
17,5	0,003044149	17,24943509	98,57%
17,5	0,003022634	17,12720435	97,87%
17,5	0,00310611	17,60144861	100,58%
25	0,004346914	24,65068228	98,60%
25	0,004301852	24,39467276	97,58%
25	0,0044504	25,2386022	100,95%

Tabla 14: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

- Media = 98,991%
- Desviación estándar = 1,0416%

El método presenta una exactitud adecuada.

- **Precisión**

Repetibilidad:

En la Tabla 15 se muestran los datos obtenidos.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Abs
10	0,001741383
10	0,001743416
10	0,00174334
10	0,00175965
10	0,00173205
10	0,001725736

Tabla 15: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Análisis estadístico:

- Media = 0,001740929
- Desviación estándar = 1,1596E-05
- Coeficiente de variación = 0,666%

Precisión intermedia:

Los datos obtenidos por el primer y el segundo analista los días 1 y 2 se muestran en la Tabla 16.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 1	Analista 2
	Día 1	Día 2
	Abs	Abs
10	0,00174138	0,00173402
10	0,00174342	0,00175439
10	0,00174334	0,00174492
10	0,00175965	0,00174891
10	0,00173205	0,00175936
10	0,00172574	0,00176139
Media	0,00174093	0,0017505
DE	1,1596E-05	1,0174E-05
Coeficiente de variación	0,666%	0,581%

Tabla 16: Resultados obtenidos los días 1 y 2 por el primer y el segundo analista en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Se realizó un análisis estadístico con todos los datos y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Media = 0,00174571
- Desviación estándar = 1,1539E-05
- Coeficiente de variación = 0,661%

A la vista de los coeficientes de variación se concluyó que se trata de un método repetible con una buena precisión intermedia entre días y entre analistas.

- **Límite de detección y límite de cuantificación**

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot 8,8326E - 06}{0,00017602} = 0,166 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot 8,8326E - 06}{0,00017602} = 0,502 \mu\text{g/mL}$$

- **Rango**

El límite inferior del rango del método lo marcó el límite de cuantificación y el límite superior se determinó atendiendo a los resultados de linealidad, exactitud y precisión. Por lo tanto, el rango del método de espectrofotometría de segunda derivada en el medio a pH 4,5 sería: 0,5 – 25 $\mu\text{g/mL}$.

- **Robustez**

Mediante los análisis de las diluciones que se mantuvieron a 25°C y a 4°C se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 17.

Tiempo	25 °C		4 °C	
	Abs	% VCZ inalterado	Abs	% VCZ inalterado
0 horas	0,00267292	100,00%	0,00259623	100,00%
6 horas	0,0026501	99,15%	0,00258102	99,41%
24 horas	0,00268012	100,27%	0,00258905	99,72%

Tabla 17: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.

Se trata de un método analítico robusto.

Medio pH 6,8

- **Especificidad**

Durante el análisis del espectro del medio de disolución con etanol y su correspondiente conversión de segunda derivada no se observaron máximos correspondientes al voriconazol, por lo que se concluyó que no existía interferencia entre el medio y el principio activo mediante este método analítico.

Tampoco se detectaron señales en las longitudes de onda del voriconazol durante el análisis de los excipientes. La disolución de voriconazol y la mezcla de ambas se utilizaron como referencia para poder comparar.

El método analítico es específico respecto al medio de disolución y a los excipientes incluidos en las formulaciones.

- **Linealidad**

En la Tabla 18 se recogen las ecuaciones de las rectas realizadas y sus correspondientes coeficientes de determinación. En la Figura 12 están representadas las ecuaciones de estas rectas.

	Ecuación	Coefficiente de determinación (R ²)	DE pendiente	DE ordenada en el origen
Recta 1	Abs = 0,000205929412463393 · C - 0,0000262176501804805	0,999548143	1,45947E-06	1,91875E-05
Recta 2	Abs = 0,000202312060028605 · C - 0,000038486699393857	0,99951151	1,49085E-06	1,96001E-05
Recta 3	Abs = 0,000167085446121365 · C - 0,0000177514702853643	0,999143107	1,63105E-06	2,14432E-05

Tabla 18: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Todas las rectas presentan unos valores de R² > 0,999, lo que significa una buena correlación entre las variables.

Con los valores medios de las tres rectas de calibrado se obtuvo una línea de regresión calculada por el método de los mínimos cuadrados cuya gráfica se representa en la Figura 13. La ecuación de dicha recta fue: Abs = 0,000191775639537787 · C - 0,0000274852732865668.

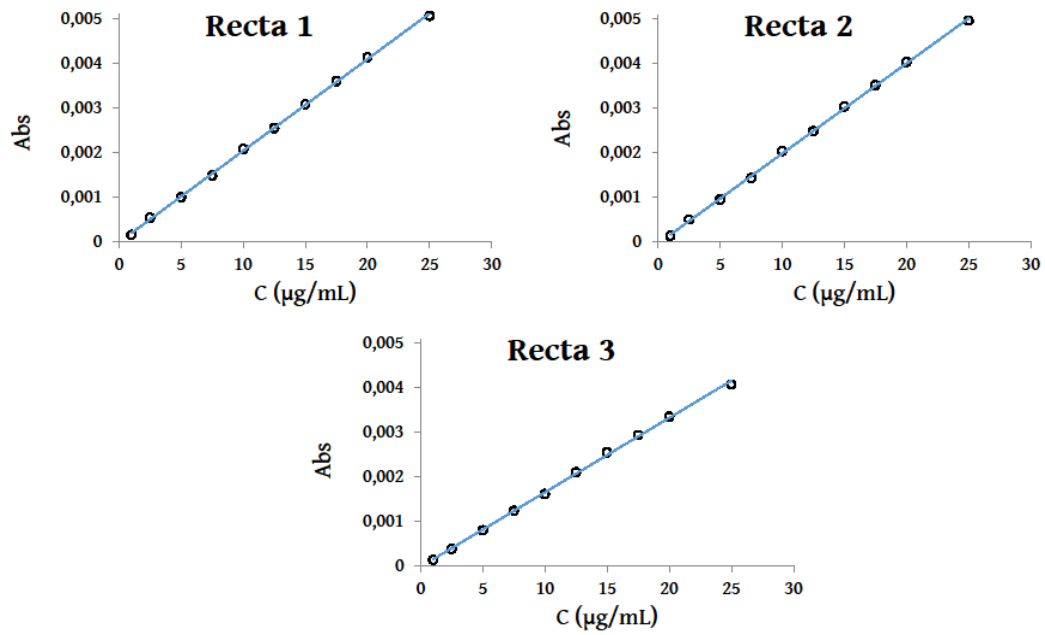


Figura 12: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

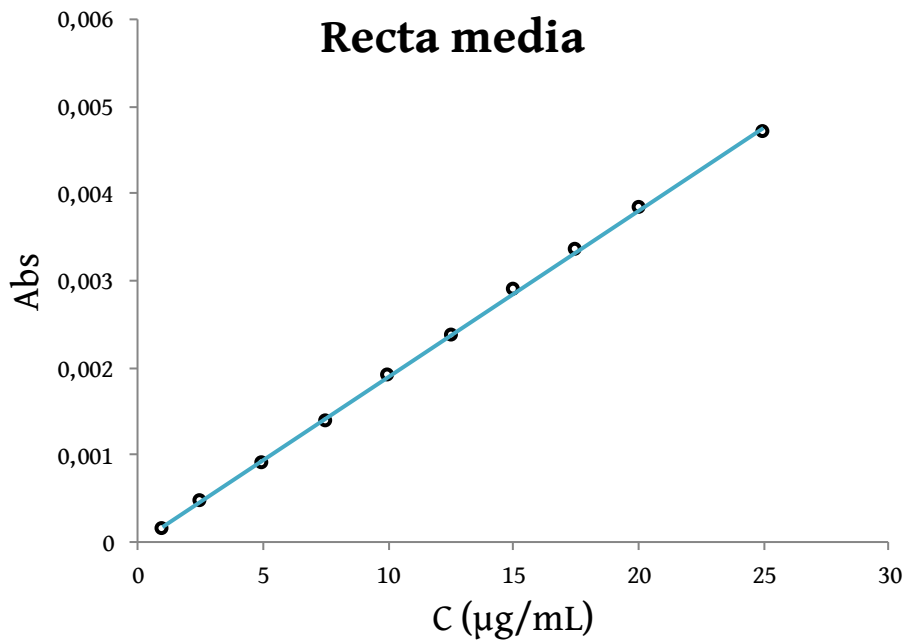


Figura 13: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Se realizó un análisis de la recta de regresión, recogido en la Tabla 19. En la Tabla 20 se representan las estadísticas de la regresión.

	Valor	DE	Estadístico T	Probabilidad (Valor p)
Pendiente	0,000191776	1,28636E-06	149,0843878	0,00
Ordenada en el origen	-2,7485E-05	1,69116E-05	-1,62523256	0,14

Tabla 19: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Coefficiente de correlación múltiple	0,9997976
Coefficiente de determinación R^2	0,99959524
R^2 ajustado	0,99955026
Error típico	3,3232E-05

Tabla 20: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Estos resultados permitieron asegurar que la linealidad del método analítico es adecuada.

Se llevó a cabo un análisis de la varianza, cuyos resultados se resumen en la Tabla 21.

	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Probabilidad (Valor p)
Regresión	2,45459E-05	2,45459E-05	22226,15467	0,00
Residuos	9,93933E-09	1,10437E-09		
Total	2,45558E-05			

Tabla 21: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Los resultados obtenidos son significativos con un nivel de confianza > 99%, ya que el valor de $p < 0,01$.

En la Figura 14 se representan la absorbancia obtenida frente a la pronosticada por el análisis ANOVA de la regresión.

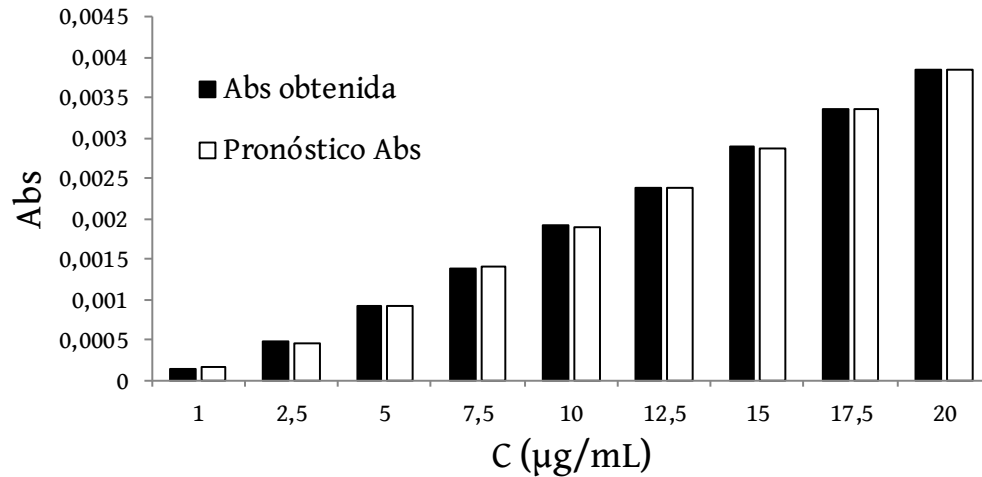


Figura 14: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

- **Exactitud**

C (µg/mL)	Abs	C detectada (µg/mL)	Recuperación (%)
1	0,000156296	0,958313283	95,831%
1	0,00016255	0,990924988	99,092%
1	0,00016998	1,029668178	102,967%
5	0,000947689	5,08497469	101,699%
5	0,000894825	4,809319242	96,186%
5	0,000970027	5,201454552	104,029%
12,5	0,00248282	13,08980264	104,718%
12,5	0,00229903	12,13144317	97,052%
12,5	0,002394773	12,63069024	101,046%
17,5	0,00351501	18,47208166	105,555%
17,5	0,003352838	17,62644506	100,723%
17,5	0,00359653	18,89716171	107,984%
25	0,00496478	26,03180094	104,127%
25	0,004786914	25,10433177	100,417%
25	0,00496253	26,02006848	104,080%

Tabla 22: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

- Media = 101,700%
- Desviación estándar = 3,569%

La exactitud del método analítico es aceptable.

- **Precisión**

Repetibilidad

En la Tabla 23 se muestran los datos obtenidos.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Abs
10	0,001741383
10	0,001743416
10	0,00174334
10	0,00175965
10	0,00173205
10	0,001725736

Tabla 23: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Análisis estadístico:

- Media = 0,001740929
- Desviación estándar = 1,1596E-05
- Coeficiente de variación = 0,666%

Precisión intermedia

Los datos obtenidos por el primer y el segundo analista los días 1 y 2 se muestran en la Tabla 24.

C ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 1	Analista 2
	Día 1	Día 2
	Abs	Abs
10	0,00174138	0,0017534
10	0,00174342	0,0017544
10	0,00174334	0,00177562
10	0,00175965	0,00176185
10	0,00173205	0,00176972
10	0,00172574	0,00176139
Media	0,00174093	0,00176273
DE	1,1596E-05	8,6491E-06
Coeficiente de variación	0,666%	0,491%

Tabla 24: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Se hizo un análisis estadístico de todos los datos obteniéndose los siguientes resultados:

- Media = 0,001751829
- Desviación estándar = 1,49915E-05
- Coeficiente de variación = 0,856%

El método es preciso, tanto en su repetibilidad como en la precisión intermedia entre analista y entre días.

- **Límite de detección y límite de cuantificación**

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot 1,6912E - 05}{0,00019178} = 0,291 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot 1,6912E - 05}{0,00019178} = 0,882 \mu\text{g/mL}$$

- **Rango**

El límite inferior del rango del método lo marcó el límite de cuantificación y el límite superior se determinó atendiendo a los resultados de linealidad, exactitud y precisión. Por lo tanto, el rango del método de espectrofotometría de segunda derivada en el medio a pH 6,8 sería: 1,0 – 25 $\mu\text{g/mL}$.

- **Robustez**

En la Tabla 25 se recogen los resultados obtenidos mediante el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C.

Tiempo	25 °C		4 °C	
	Abs	% VCZ inalterado	Abs	% VCZ inalterado
0 horas	0,0026998	100,00%	0,00257784	100,00%
6 horas	0,0026985	99,95%	0,00258229	100,17%
24 horas	0,00268894	99,60%	0,0025762	99,94%

Tabla 25: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.

Se trataba de un método analítico robusto, ya que no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos a lo largo del tiempo de la misma muestra, tanto si la temperatura de conservación era de 4°C o de 25°C.

Validación del método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La Figura 15 muestra el cromatograma de una de las muestras ensayadas para la realización de la recta de calibrado. El voriconazol mostró tiempos de retención cercanos a 5 minutos y el nimodipino tiempos de retención de 10 minutos aproximadamente.

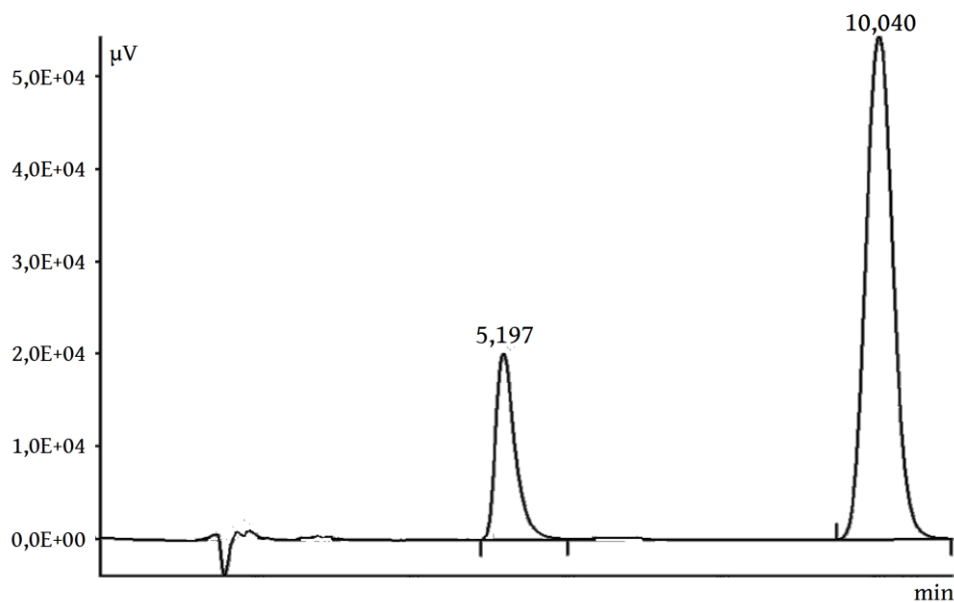


Figura 15: Cromatograma de HPLC de una muestra de plasma blanco con voriconazol (tiempo de retención 5,197 minutos) y con nimodipino (tiempo de retención 10,040 minutos) utilizada para elaborar una recta de calibrado.

- **Especificidad**

El cromatograma obtenido para la muestra que contenía fase móvil no mostró ningún pico en el tiempo de retención correspondiente al voriconazol, quedando demostrado que no interfiere con su señal.

En la disolución de los excipientes no se detectó pico a los 5 minutos. Los cromatogramas de la disolución de voriconazol y la mezcla de ambas sirvieron como referencia para asegurar la ausencia de máximos correspondientes al principio activo. Así se confirmó que los excipientes tampoco interferían en los resultados.

La muestra de plasma inyectada tampoco mostró ningún pico en el tiempo de retención del voriconazol. Los restos de proteínas plasmáticas que permanecen en las muestras biológicas analizadas no interfieren en la cuantificación del principio activo.

En las muestras de órganos analizadas no apareció ningún pico en el tiempo de retención del principio activo, por lo que los restos de componentes de cerebro, pulmones, hígado y riñones no interfirieron en los resultados.

- **Linealidad**

En la Tabla 26 están recogidas las ecuaciones de las rectas de regresión construidas y en la Figura 16 aparecen representadas las gráficas.

	Ecuación	Coefficiente de determinación (R ²)	DE pendiente	DE ordenada en el origen
Recta 1	$\text{Área} = 56152,0117947606 \cdot C - 11554,5050357083$	0,997315172	1101,18009	11479,3756
Recta 2	$\text{Área} = 56033,3623307921 \cdot C - 329,29892280366$	0,999836261	253,52041	2862,946647
Recta 3	$\text{Área} = 56418,3498664234 \cdot C - 2172,5833944623$	0,999648359	374,111683	4224,755673

Tabla 26: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

Los coeficientes de determinación de todas ellas fueron $R^2 > 0,997$, lo que indica una relación lineal aceptable entre las variables.

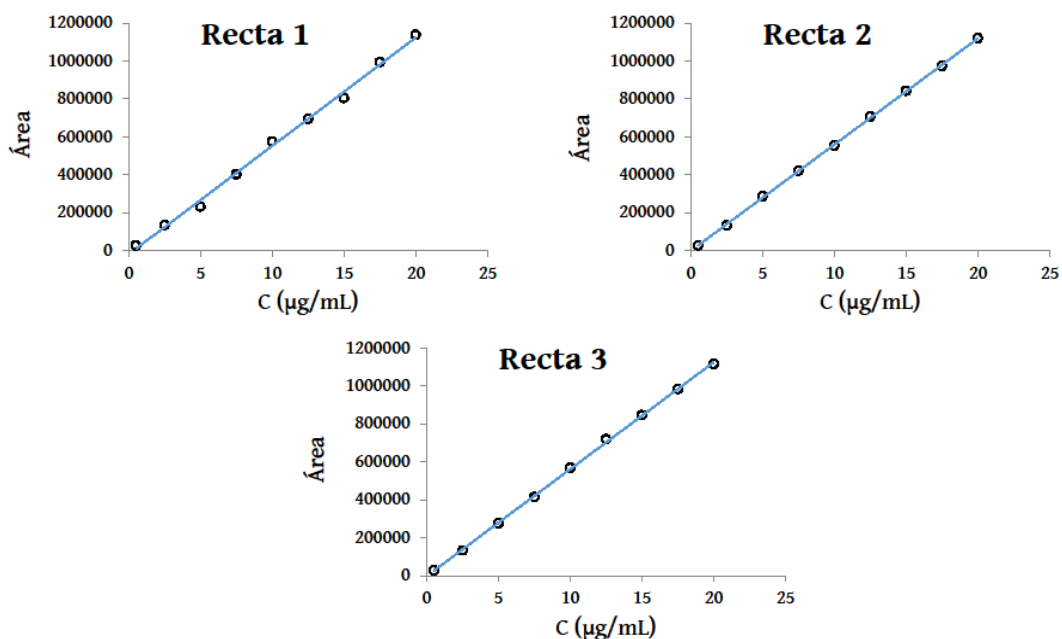


Figura 16: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

Con los datos de las tres rectas se calcularon valores medios con los que se construyó una recta media de regresión, cuya gráfica aparece representada en la Figura 17. Su ecuación fue: $\text{Área} = 56431,0670067096 \cdot C - 5461,72504069272$.

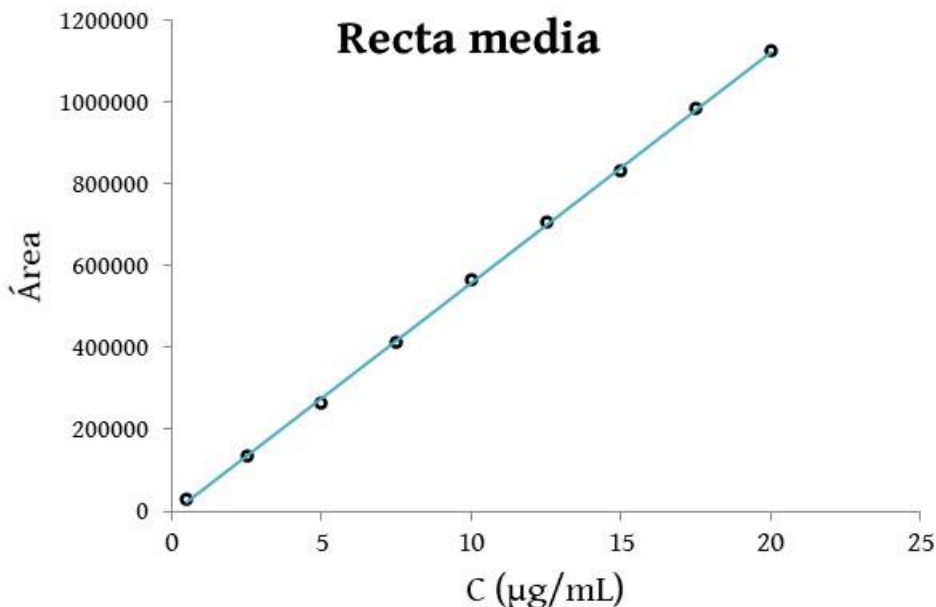


Figura 17: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

El análisis de la regresión se muestra en la Tabla 27 y las estadísticas de la recta media están recogidas en la Tabla 28.

	Valor	DE	Estadístico T	Probabilidad (Valor p)
Pendiente	56431,067	331,670039	170,142191	0,00
Ordenada en el origen	-5461,72504	3745,47212	-1,45822072	0,18

Tabla 27: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

Coefficiente de correlación múltiple R	0,99986185
Coefficiente de determinación R^2	0,99972372
R^2 ajustado	0,99968919
Error típico	7066,80257

Tabla 28: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

Los valores de los coeficientes de correlación y de determinación indicaron que el método analítico presentaba una linealidad adecuada.

Se realizó un análisis de la varianza cuyos resultados se muestran en la Tabla 29.

	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	F	Probabilidad (Valor p)
Regresión	1,4457E+12	1,44567E+12	28948,365	0,00
Residuos	399517588	49939698,53		
Total	1,4461E+12			

Tabla 29: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

El valor p del análisis de la varianza determina si el método es significativo. En este caso $p < 0,01$, por lo que es altamente significativo con un nivel de confianza $> 99\%$.

En la Figura 18 se representan el área obtenida frente al área pronosticada por el análisis ANOVA de la regresión.

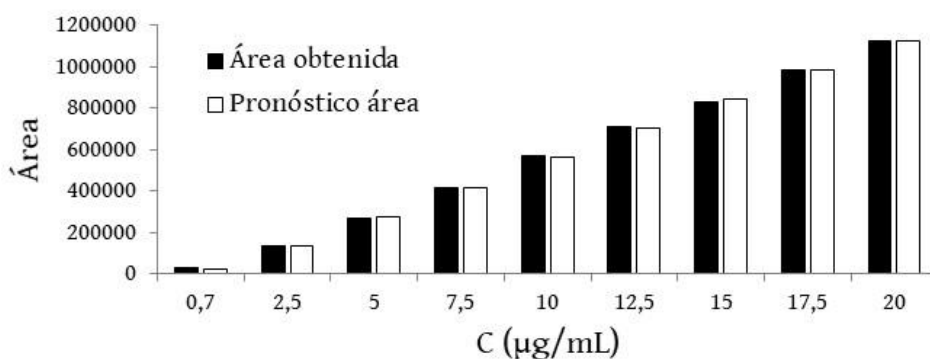


Figura 18: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.

- **Exactitud**

C _{teórica} (µg/mL)	Área	Extracción (%)	C _{muestra} (µg/mL)	Recuperación (%)
5	244780,89	88,35%	5,019446888	100,39%
5	232982,40	85,46%	4,94409628	98,88%
5	247526,40	89,50%	5,009110053	100,18%
10	494201,60	87,61%	10,10675045	101,07%
10	459935,37	83,07%	9,928274172	99,28%
10	482291,94	85,02%	10,16596789	101,66%
15	740231,01	89,58%	14,75200126	98,35%
15	733046,80	87,10%	15,02467152	100,16%
15	732698,80	86,64%	15,09788172	100,65%

Tabla 30: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de HPLC.

En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo.

Análisis estadístico:

- Recuperación media = 100,070%
- Desviación estándar = 1,060%

Este método posee una exactitud adecuada.

- **Precisión**

Repetibilidad

En la Tabla 31 están recogidos los resultados obtenidos.

$C_{teórica}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Extracción (%)	$C_{muestra}$ ($\mu\text{g/mL}$)
5	247526,40	89,50%	5,00911005
5	237271,57	87,00%	4,94409628
5	244149,29	87,30%	5,06666667
5	237232,18	85,70%	5,01853873
5	249576,40	88,50%	5,10652876
5	235112,15	87,08%	4,89548361

Tabla 31: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de HPLC.

- Concentración media de las muestras = 5,00673735
- Desviación estándar = 0,077454566
- Coeficiente de variación = 1,547%

La repetibilidad del método es adecuada.

- **Límite de detección y límite de cuantificación**

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \cdot 3745,47212}{56431,067} = 0,219 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot 3745,47212}{56431,067} = 0,664 \mu\text{g/mL}$$

- **Rango**

El límite inferior del rango del método lo marcó el límite de cuantificación y el límite superior se determinó atendiendo a los resultados de linealidad, exactitud y precisión. Por lo tanto, el rango del método de HPLC sería: 0,7 – 20 µg/mL.

- **Robustez**

En la Tabla 32 se recogen los datos obtenidos.

Tiempo	Área	Extracción (%)	C _{muestra} (µg/mL)	Recuperación (%)
0 horas	247526,4	89,50%	5,00911005	100,18%
6 horas	247718,223	89,53%	5,01093659	100,22%
24 horas	246157,469	89,47%	4,98358923	99,67%

Tabla 32: Resultados obtenidos en el análisis de la muestra utilizada para evaluar la robustez del método analítico de HPLC.

El método era robusto.

Discusión parcial

Para demostrar que los métodos analíticos utilizados para la cuantificación del voriconazol son adecuados se llevó a cabo una validación de todos ellos.

La especificidad es la capacidad del método analítico de evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes presentes en las muestras que puedan ocasionar interferencias. En el caso de los métodos de espectrofotometría de segunda derivada, se evaluó la especificidad frente a los medios de disolución que se utilizaron y frente al resto de excipientes presentes en las formulaciones. En el método de HPLC se estudió la especificidad frente a la fase móvil, utilizada como medio de disolución, frente a los excipientes de las formulaciones, frente a plasma y frente a los órganos utilizados (cerebro, pulmones, hígado y riñones), ya que con este método se analizaron las muestras biológicas. Quedó demostrado que no existían interferencias en ninguno de los casos, por tanto, los métodos analíticos utilizados son capaces de detectar inequívocamente el voriconazol en presencia del resto de componentes de las muestras, es decir, los métodos son específicos.

Mediante la linealidad se evaluó la calidad de la relación entre la concentración de voriconazol en la muestra y los resultados obtenidos en los equipos de medición. Se

realizaron tres rectas patrón, se calcularon los valores medios y con ellos se elaboraron rectas medias de regresión por el método de los mínimos cuadrados. Se efectuaron análisis estadísticos ANOVA de las regresiones y las varianzas. Estos análisis permitieron confirmar que existía una relación estadísticamente significativa entre los valores de absorbancia y las concentraciones, en el caso de los métodos de espectrofotometría de segunda derivada, y entre las áreas y las concentraciones, en el caso del método de HPLC. En todos los casos la correlación entre las variables fue buena, por lo que los métodos presentaron una linealidad adecuada.

El estudio de exactitud indica el grado de coincidencia entre el valor obtenido en la medición de una muestra y el valor de referencia aceptado. En los métodos de espectrofotometría de segunda derivada se hicieron cinco diluciones de concentración conocida por triplicado y se sometieron al análisis. En el método de HPLC se utilizaron tres diluciones por triplicado. Se calculó el porcentaje de voriconazol cuantificado en cada método y se calcularon las medias y las desviaciones estándar. El porcentaje de error viene dado por la desviación estándar. Debido a que en todos los casos la desviación estándar tuvo valores bajos, se concluyó que la exactitud de los métodos fue adecuada. Es necesario remarcar que los métodos espectrofotométricos con medios a pH 1,2 y pH 4,5 fueron los más exactos, mientras que la espectrofotometría de segunda derivada con medio a pH 6,8 y el método de HPLC obtuvieron porcentajes de error $\geq 3,0\%$.

La precisión se define como el grado de dispersión entre los resultados de varias mediciones de muestras que proceden de la misma muestra homogénea. Para su estudio se evaluó la repetibilidad. Se prepararon seis diluciones de la misma concentración a partir de una madre para cada método y se analizaron. Con los resultados se calcularon las medias, las desviaciones estándar y los coeficientes de variabilidad. Los coeficientes de variabilidad obtenidos tuvieron bajos valores, con porcentajes $< 1,0\%$ en los métodos espectrofotométricos y $< 1,5\%$ en el método de HPLC. Se concluyó que los métodos tenían una repetibilidad adecuada. En los métodos de espectrofotometría de segunda derivada se hizo un análisis de precisión intermedia entre días y entre analistas. Para ello, dos analistas diferentes en dos días distintos prepararon seis diluciones de la misma concentración a partir de dos madres. Con los resultados obtenidos se calcularon los promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variabilidad. Nuevamente, todos los coeficientes de variabilidad fueron $< 1,0\%$, demostrándose así que los métodos presentaban una adecuada precisión intermedia entre días y entre analistas. Por lo tanto, se trata de métodos analíticos precisos.

El límite de detección se define como la concentración menor de analito que puede ser detectada por un método sin necesidad de ser cuantificada exactamente. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Ambos límites se calcularon para todos los métodos analíticos aplicando un método matemático que se basa en las ecuaciones de las rectas. El límite de cuantificación determinó el límite inferior del rango de cada método. El límite superior se determinó a partir de los ensayos de linealidad, exactitud y precisión. Así, para cada método se obtuvo un intervalo de concentraciones entre las cuales existe un nivel adecuado de linealidad, exactitud y precisión. Todos los métodos presentaron un límite de cuantificación $< 1,1 \mu\text{g/mL}$, siendo el menor el de la espectrofotometría de segunda derivada con medio a pH 4,5, cuyo valor fue $0,5 \mu\text{g/mL}$, seguido por el método de HPLC, que mostró un límite de cuantificación $< 0,7 \mu\text{g/mL}$.

La robustez de un método es la medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas variaciones en los parámetros. Se evaluó la robustez de los métodos del paso del tiempo desde la preparación de la muestra hasta su análisis y, en el caso de los métodos espectrofotométricos, se determinó la influencia de la temperatura de conservación de la muestra. Todos los métodos presentaron valores de voriconazol detectado cercanos al 100%, por lo que se concluyó que los métodos eran robustos.

Varios autores han comparado los métodos espectrofotométricos de segunda derivada con los métodos de HPLC [212-216]. Mediante la validación de todos los métodos analíticos utilizados en este trabajo, se comprobó que ambos métodos analíticos fueron comparables en especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango y robustez. Los bajos valores de los límites de cuantificación de los métodos espectrofotométricos de segunda derivada permitieron detectar bajas concentraciones de voriconazol en las muestras, equivalentes a las detectadas por el equipo de HPLC. La espectrofotometría es una técnica más barata y rápida que el análisis por HPLC, por lo que fue seleccionada para el análisis de las muestras obtenidas en los ensayos *in vitro*. Sin embargo, las muestras de los ensayos *in vivo* fueron analizadas mediante HPLC debido al pequeño volumen de muestra obtenida y a la presencia de componentes biológicos, para los que no fue demostrada la especificidad de los métodos espectrofotométricos.

Ensayo de velocidad de disolución

El voriconazol presenta una solubilidad pH-dependiente, por lo que el ensayo de velocidad de disolución se llevó a cabo en tres medios diferentes: medio ácido clorhídrico 0,1 M pH 1,2; tampón acetato a pH 4,5 y tampón fosfato a pH 6,8. Los mismos medios de disolución fueron utilizados previamente por Miletic, T. et al. [222]. Todos los medios fueron elaborados siguiendo las indicaciones marcadas por la USP 38 (2015) [207].

Desarrollo de formulaciones

Los ensayos de disolución se llevaron a cabo para estudiar los perfiles de disolución de las distintas formulaciones. Además, este ensayo se utilizó como herramienta para el desarrollo de las formulaciones de acuerdo con los resultados obtenidos.

Con el objetivo de seleccionar un vehículo para las formulaciones se realizaron ensayos con excipientes con los que se tenía experiencia previa. Se utilizaron un manitol (Pearlitol 200SD), una maltodextrina (Glucidex 12D) y una celulosa (L-HPC) [157,247,248]. Se formularon dispersiones sólidas con proporciones 1:3 y 1:6 de todos los excipientes y se realizaron ensayos de disolución a pH 1,2. También se llevó a cabo este ensayo con el voriconazol materia prima para utilizarlo como referencia.

La Figura 19 muestra los perfiles de disolución obtenidos. Con el excipiente L-HPC se obtuvieron perfiles de disolución más lentos que el de la materia prima, por lo tanto, se concluyó que este excipiente sostiene su liberación, por lo que fue descartado para futuras formulaciones. Con el manitol y la maltodextrina se consiguieron perfiles de disolución más rápidos que el de la materia prima. El manitol presentó perfiles ligeramente más rápidos que la maltodextrina. Sin embargo, antes de descartar el excipiente se realizaron ensayos de disolución a pH 4,5, ya que a este pH el voriconazol se disuelve más lentamente y, por lo tanto, se apreciarían mejor las diferencias entre los perfiles.

En la Figura 20 se muestran los perfiles de disolución a pH 4,5. En la gráfica se aprecia que el manitol presentó perfiles de disolución ligeramente más rápidos que la maltodextrina. Este resultado, unido al obtenido en el medio a pH 1,2, hicieron que el manitol fuera seleccionado como vehículo para las formulaciones. En estudios previos otros autores han seleccionado el manitol como un buen candidato para ser utilizado como vehículo en dispersiones sólidas [249].

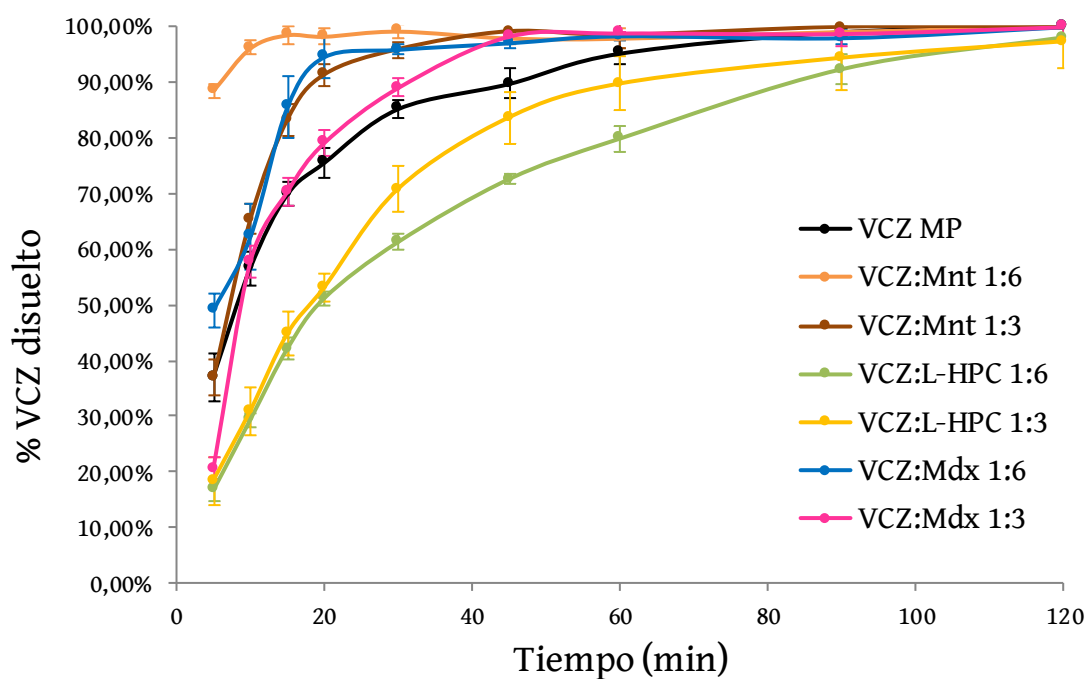


Figura 19: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el vehículo.

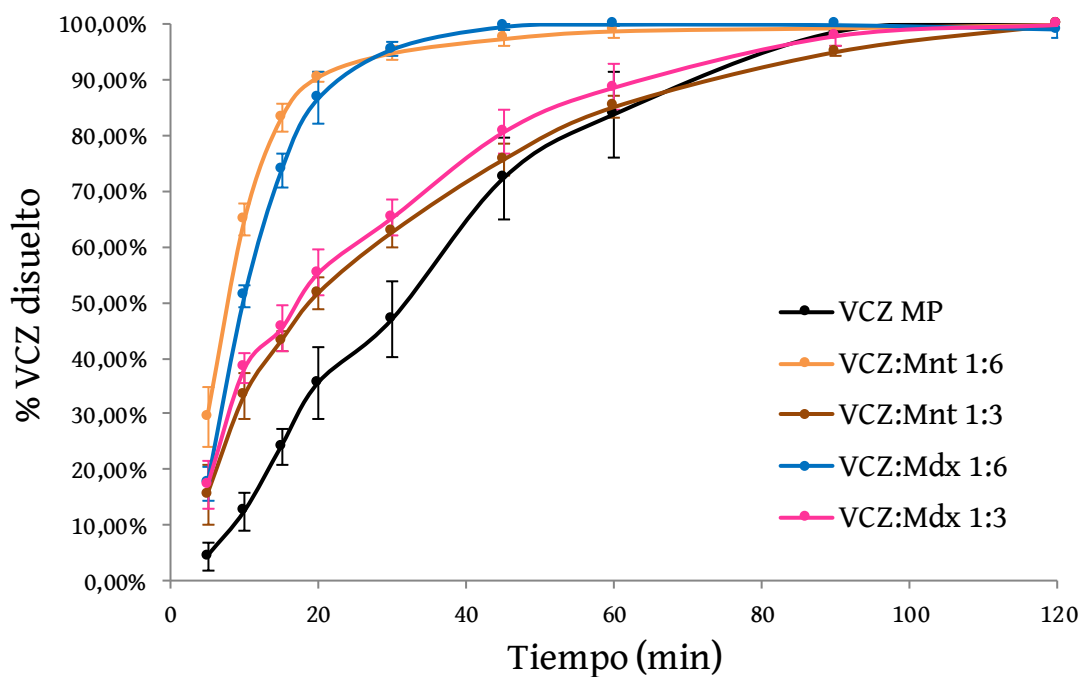


Figura 20: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el vehículo.

Para seleccionar un tensoactivo que funcionase como agente formador de micelas, se hicieron ensayos con surfactantes con los que se tenía experiencia previa. Se utilizaron tres

tensoactivos no iónicos: Kolliphor RH40, Tween 80 y Labrasol [156,250,251]. Se prepararon formulaciones con manitol en proporciones 1:6:0,1. Se utilizaron proporciones altas de los surfactantes para poder observar más claramente el efecto. El ensayo se realizó a pH 4,5 porque se veían mejor las diferencias.

En la Figura 21 se representan los perfiles de disolución. El Kolliphor RH40 y el Tween 80 presentaron perfiles de disolución muy similares. La formulación con Labrasol presentó porcentajes de disolución menores en los primeros tiempos. Para poder apreciar mejor las diferencias entre los tensoactivos se hicieron ensayos a pH 4,5 con proporciones 1:3:0,1. Estas gráficas aparecen representadas en la Figura 21. En los tiempos iniciales del ensayo, la formulación con Tween 80 presentó los mayores porcentajes de voriconazol disuelto, por lo que este surfactante fue el seleccionado para las futuras formulaciones.

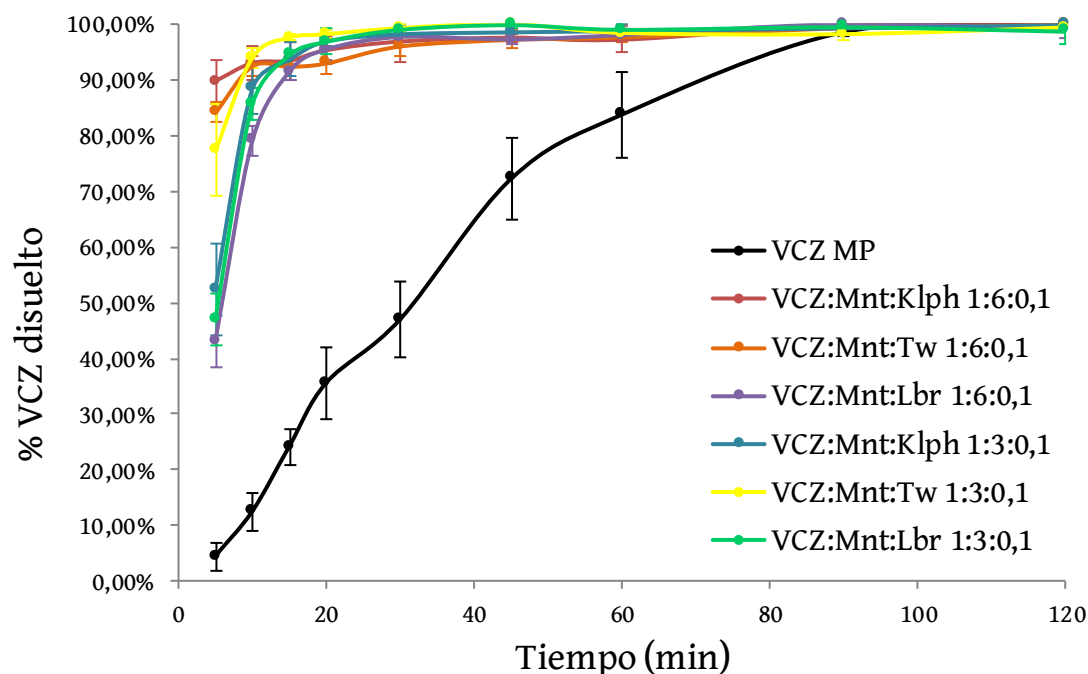


Figura 21: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el tensoactivo.

A continuación, se probaron proporciones menores de tensoactivo, buscando seleccionar la menor cantidad de surfactante que presentase un perfil de disolución rápido. Para ello, se realizaron ensayos de disolución a pH 4,5 con cantidades menores de surfactante en formulaciones con manitol en proporción 1:3 y 1:6, puesto que se quería seleccionar un candidato con mayor proporción de manitol y otro con una cantidad menor de vehículo. En la Figura 22 se muestran las gráficas.

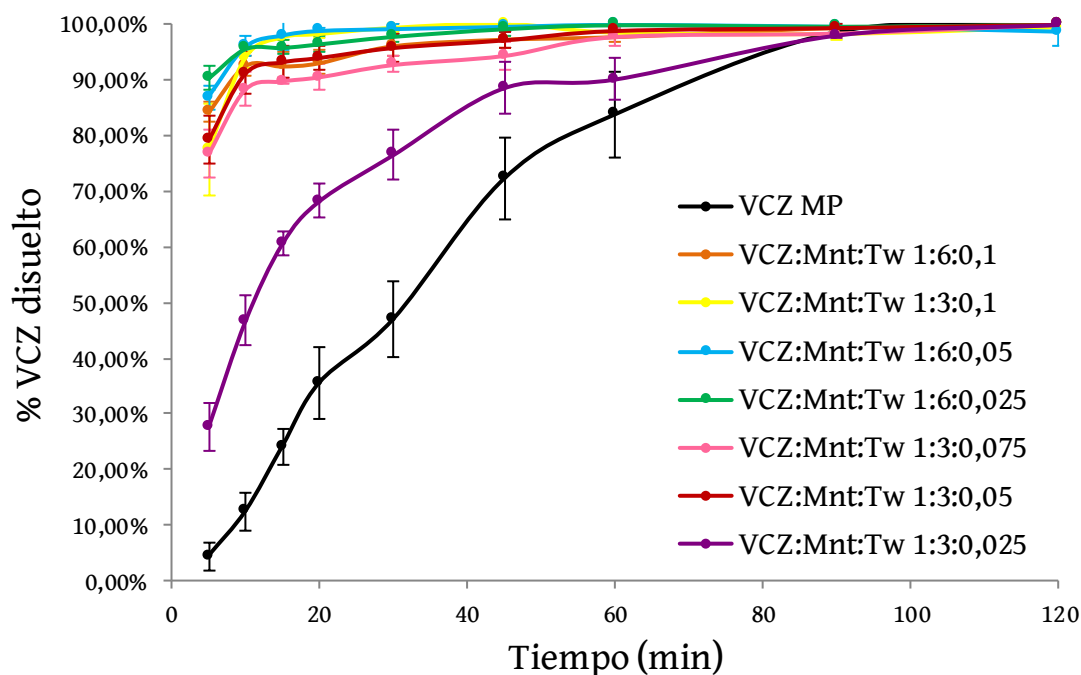


Figura 22: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar la proporción de tensoactivo.

Las formulaciones con mayor proporción de manitol presentaron todas ellas un perfil de disolución muy parecido, por lo tanto, se seleccionó la que contenía una menor proporción de Tween 80, SM-1:6:0,025. En las formulaciones con menor cantidad de vehículo sí que se apreciaron diferencias, por lo tanto, se seleccionó la que presenta un perfil rápido con menor cantidad de tensoactivo, es decir, SM-1:3:0,05.

Estudio de perfiles de disolución

Se llevó a cabo el ensayo de disolución en los tres medios para las dos dispersiones sólidas, DS-1:3 y DS-1:6, sus respectivas mezclas físicas, MF-1:3 y MF-1:6, los sistemas micelares seleccionados en el punto anterior, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025, y los sistemas micelares con el doble de cantidad de surfactante que los candidatos, SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,05, para poder observar si había un cambio significativo en los perfiles de disolución. También se realizaron ensayos con la materia prima y el voriconazol recristalizado para comparar la mejora conseguida.

En la Figura 23 se muestran los perfiles de disolución de las formulaciones con mayor proporción de vehículo (1:6) a pH 1,2. En la Figura 24 aparecen representados los perfiles de

estas formulaciones en el medio con pH 4,5 y en la Figura 25 se revelan los perfiles en el medio a pH 6,8.

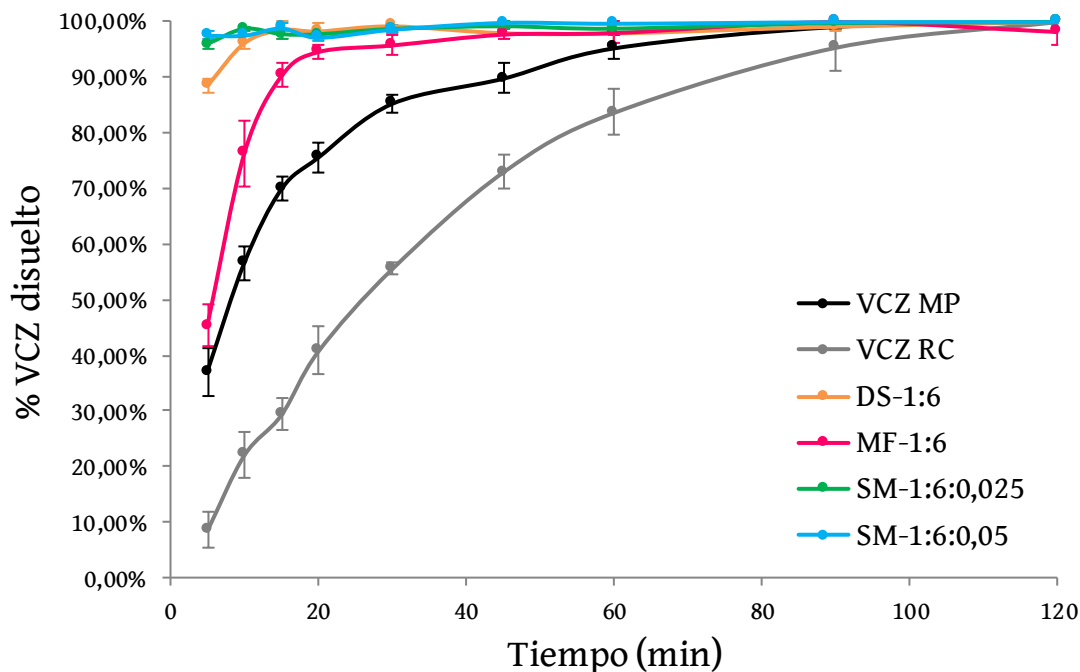


Figura 23: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.

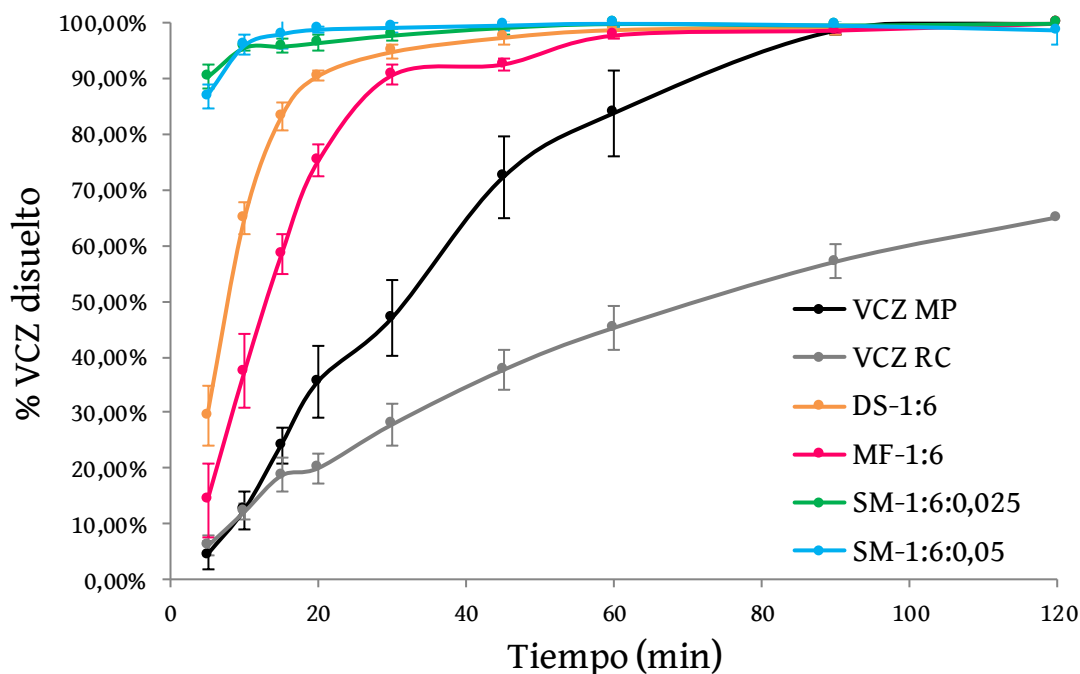


Figura 24: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.

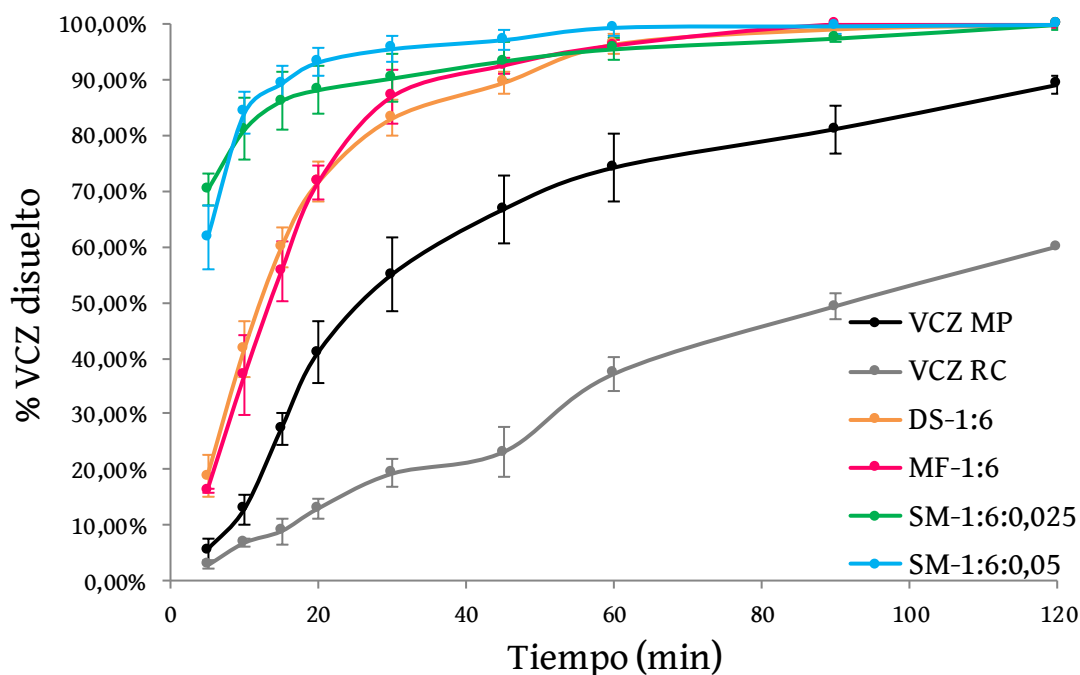


Figura 25: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 6,8 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.

La velocidad de disolución del voriconazol disminuyó a medida que se incrementó el pH. En el medio con pH 1,2, que simula el medio gástrico, se observaron perfiles de disolución rápidos para todas las formulaciones, alcanzando porcentajes superiores a un 90% en los 15 minutos. Las únicas formulaciones que disolvieron porcentajes menores fueron la materia prima y el recristalizado ($69,81 \pm 2,17\%$ y $29,32 \pm 2,89\%$ respectivamente). En todos los medios la formulación recristalizada fue la que obtuvo perfiles de disolución más lentos, presentando una velocidad de disolución menor que la de la materia prima.

Mediante la elaboración de la mezcla física, MF-1:6, se incrementó la velocidad de disolución notablemente debido a que el voriconazol estaba adsorbido sobre la superficie de las partículas hidrofílicas del manitol.

La dispersión sólida, DS-1:6, mostró perfiles de disolución superiores a la mezcla física, sin embargo, la diferencia entre ambos perfiles fue disminuyendo a medida que se aumentó el pH, siendo sus porcentajes de disolución a los 15 minutos $98,52 \pm 1,71\%$ y $90,22 \pm 2,17\%$ a pH 1,2, $83,18 \pm 2,51\%$ y $58,45 \pm 3,68\%$ a pH 4,5 y $59,88 \pm 3,52\%$ y $55,58 \pm 5,24\%$ a pH 6,8 respectivamente.

En los sistemas micelares las velocidades de disolución se vieron aumentadas respecto a la dispersión sólida. No se observaron grandes diferencias entre ambas formulaciones, SM-1:6:0,025 y SM-1:6:0,05. Sus perfiles se mantuvieron prácticamente iguales

en los medios con pHs 1,2 y 4,5 y sólo se apreciaron pequeñas diferencias en el medio con pH 6,8, cuyos porcentajes de disolución a los 15 minutos fueron $89,36 \pm 2,99$ y $86,24 \pm 5,23\%$ respectivamente.

En la Figura 26 se muestran los perfiles de disolución de las formulaciones con proporciones de vehículo 1:3 a pH 1,2. En la Figura 27 se representan los perfiles de disolución de las formulaciones en el medio a pH 4,5 y en la Figura 28 se exponen las gráficas de disolución en el medio con pH 6,8.

Igual que ocurría con las formulaciones con un porcentaje superior de manitol, la mezcla física MF-1:3 mostró perfiles de disolución más rápidos que la materia prima. Estos perfiles fueron ligeramente más lentos que en MF-1:6, alcanzando a los 15 minutos porcentajes de $87,06 \pm 2,13\%$ a pH 1,2, $63,20 \pm 4,07\%$ a pH 4,5 y $47,50 \pm 4,95\%$ a pH 6,8, frente a los valores de MF-1:6 $90,22 \pm 2,17\%$ a pH 1,2, $58,45 \pm 3,68\%$ a pH 4,5 y $55,58 \pm 5,24\%$ a pH 6,8.

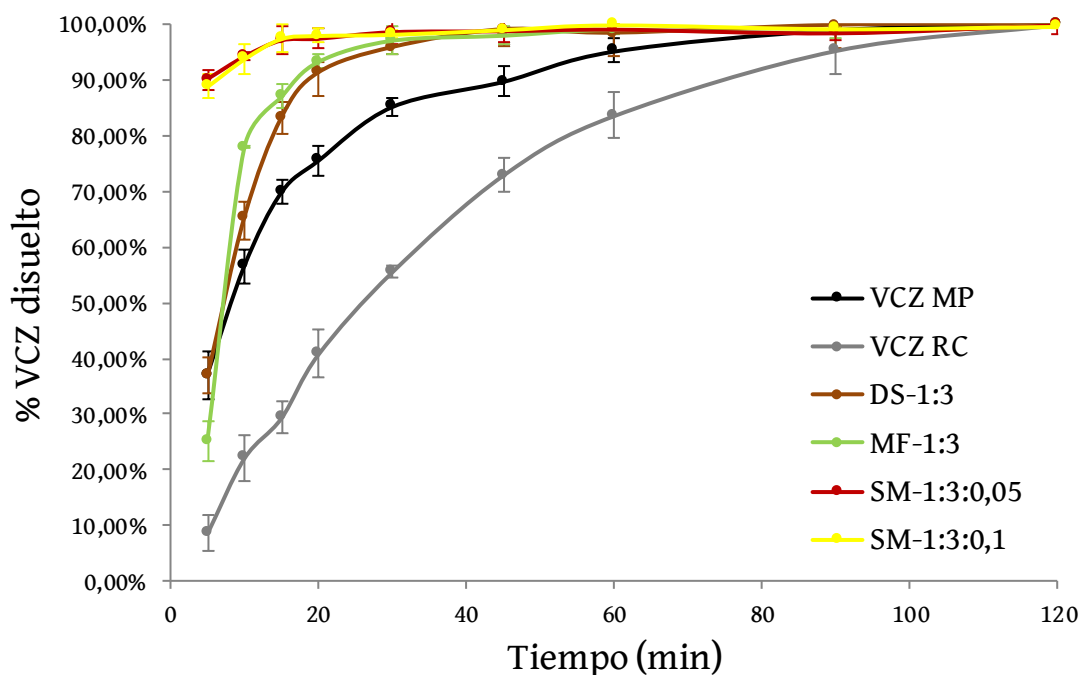


Figura 26: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.

La dispersión sólida, DS-1:3, exhibió un comportamiento diferente a DS-1:6. A pH 1,2 mostró una velocidad de disolución semejante a la de la mezcla física, con un porcentaje de disolución de $83,26 \pm 2,96\%$ a los 15 minutos. En el medio con pH 4,5, su perfil de disolución cayó por debajo del de la mezcla física, acercándose al de la materia prima, con un valor de disolución del $43,12 \pm 1,71\%$ a los 15 minutos. Finalmente, en el medio con pH 6,8, el perfil se

ralentizó a partir de los 30 minutos de ensayo, mostrándose incluso por debajo del de la materia prima, con un $51,59 \pm 3,30\%$ disuelto a los 45 minutos frente al $66,71 \pm 6,21\%$ que obtuvo en la materia prima a ese tiempo.

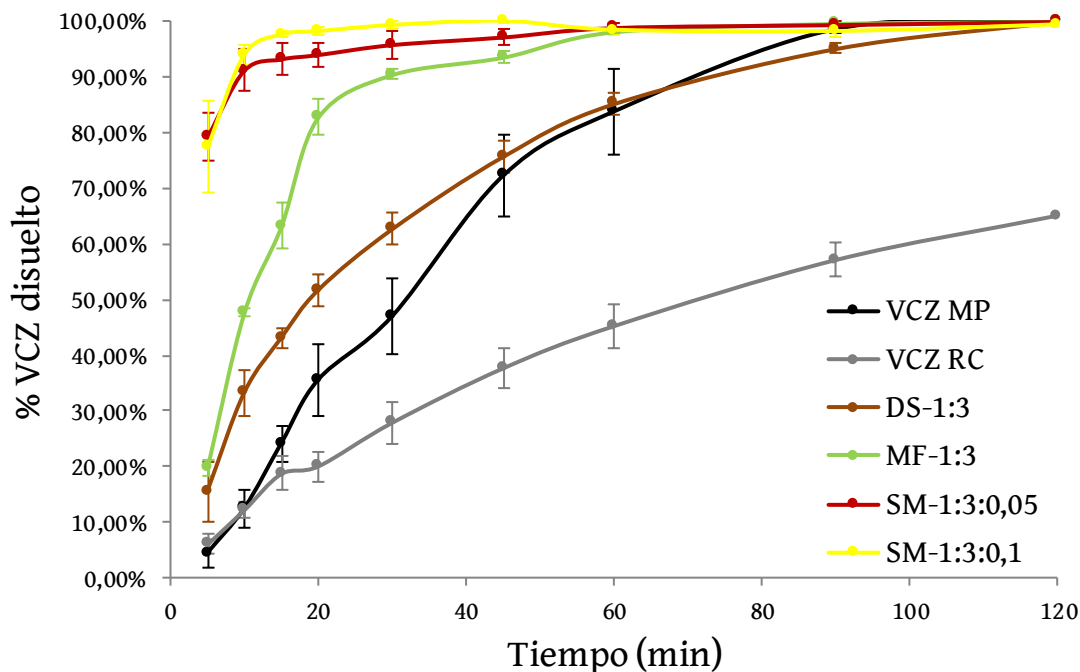


Figura 27: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.

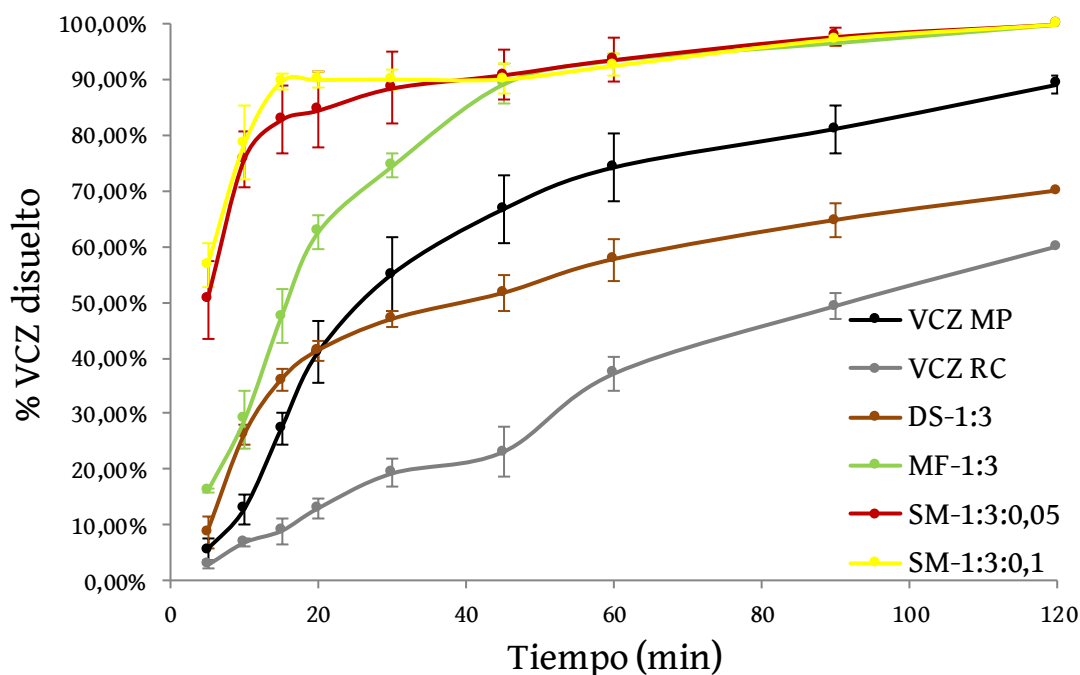


Figura 28: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 6,8 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.

Formulación	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)
VCZ MP	69,81 ± 2,17	89,76 ± 2,74	10	30	24,15 ± 3,28	72,32 ± 7,40	45	60	27,30 ± 2,89	66,71 ± 6,21	30	120
VCZ RC	29,32 ± 2,89	72,95 ± 3,07	30	90	18,69 ± 3,03	37,62 ± 3,47	90	> 120	8,96 ± 2,36	23,14 ± 4,49	120	> 120
MF-1:6	90,22 ± 2,17	97,74 ± 1,02	10	15	58,45 ± 3,68	92,65 ± 1,04	15	30	55,58 ± 5,24	92,58 ± 1,37	15	30
MF-1:3	87,06 ± 2,13	98,09 ± 1,70	10	15	63,20 ± 4,07	93,58 ± 1,19	15	30	47,50 ± 4,95	89,23 ± 3,63	20	45
DS-1:6	98,52 ± 1,71	97,95 ± 1,29	< 5	< 5	83,18 ± 2,51	97,44 ± 1,50	10	20	59,88 ± 3,52	89,52 ± 1,99	15	45
DS-1:3	83,26 ± 2,96	99,06 ± 0,00	10	20	43,12 ± 1,71	75,69 ± 3,02	20	60	36,06 ± 2,02	51,59 ± 3,30	45	> 120
SM-1:6:0,025	97,71 ± 0,89	99,19 ± 0,73	< 5	< 5	95,84 ± 1,29	99,22 ± 1,38	< 5	< 5	86,24 ± 5,23	93,40 ± 3,44	< 5	20
SM-1:6:0,05	98,86 ± 0,66	99,87 ± 0,79	< 5	< 5	98,05 ± 2,80	99,63 ± 0,97	< 5	< 5	89,36 ± 2,99	97,25 ± 1,74	< 5	15
SM-1:3:0,05	97,19 ± 2,63	98,87 ± 2,02	< 5	< 5	93,24 ± 2,80	97,20 ± 1,45	< 5	10	82,84 ± 6,11	90,89 ± 4,51	10	30
SM-1:3:0,1	97,52 ± 2,36	99,12 ± 0,33	< 5	< 5	97,58 ± 0,54	100,00 ± 0,14	< 5	< 5	89,72 ± 1,45	90,17 ± 2,75	< 5	15

Figura 29: Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados para estudiar los perfiles de las formulaciones seleccionadas en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media ± DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.

Los sistemas micelares, SM-1:3:0,05 y SM-1:3:0,1, mostraron perfiles de disolución más rápidos que la mezcla física, similares a los de los sistemas micelares con proporciones superiores de manitol. En todos los medios ambos perfiles fueron semejantes.

En la Tabla 29 se muestran los datos del porcentaje de voriconazol disuelto a los 15 y los 45 minutos y el tiempo que tarda en disolverse el 50 y el 85% de las formulaciones estudiadas en los tres medios.

En la Tabla 40, en el apartado de “Material suplementario”, se recogen los datos de todos los ensayos de disolución llevados a cabo.

Discusión parcial

El primer objetivo del ensayo de disolución era seleccionar el vehículo y el tensoactivo más apropiados para las formulaciones. Se escogieron materiales con los que se tenía experiencia previa en formulaciones de liberación rápida. Las condiciones que se requieren para los vehículos es que sean inertes, hidrófilos y de fácil manejo [152,156]. Los tensoactivos es necesarios que sean poco tóxicos, de fácil manejo y compatibles con el resto de componentes de la formulación [252,253]. Este proceso se explica paso a paso en el subapartado “Desarrollo de formulaciones”, en el cual se seleccionaron manitol y Tween 80 como materias primas.

La formulación que se desarrolló en este trabajo fue un polvo sólido para administración por vía oral. La forma farmacéutica final serían cápsulas de gelatina dura de manera que no varíe el estado físico de la formulación ni su perfil de disolución. La dosis para un adulto en tratamiento con voriconazol por vía oral es de 200 mg [77]. Por ello, era necesario que las proporciones de excipientes utilizadas no fuesen demasiado altas para que posteriormente se pudiera encapsular. Por otro lado, en la fabricación de las formulaciones se utilizó etanol como disolvente para el voriconazol y, una vez disuelto, se adsorbió sobre el vehículo inerte, que debía ser insoluble en el etanol. El volumen máximo de etanol que pudo ser adsorbido sobre 100 mg de manitol fueron 120 μ L. En este volumen de disolvente la máxima cantidad que se consiguió disolver fueron 16,67 mg de voriconazol. Por lo tanto, la proporción de voriconazol:manitol 1:6 sería la menor proporción que se podía formular en un solo paso. Sin embargo, se prepararon formulaciones con proporción 1:3 realizando un doble paso de disolución del principio activo y evaporación del solvente, tal y como se explica en el subapartado “Fabricación de las formulaciones”, reduciéndose a la mitad la cantidad de

vehículo utilizada. Durante todo el estudio se trabajó con ambas proporciones para estudiar la influencia de la cantidad de manitol y del proceso de fabricación.

Una vez establecidas las materias primas y las proporciones, tanto de vehículo como de tensoactivo, con las que se iba a trabajar, se realizaron estudios de los perfiles de disolución a tres pHs diferentes, ya que el voriconazol muestra velocidades de disolución pH-dependientes [222]. En este trabajo se tomó el voriconazol materia prima como referencia, tanto en este como en los demás ensayos, ya que, debido a la ausencia de otros componentes se obtienen resultados claros con los que se pueden comparar las modificaciones que sufre el principio activo en las formulaciones elaboradas. Además, se realizaron los ensayos sobre el voriconazol recristalizado para conocer el comportamiento de una formulación totalmente cristalina y poder compararla también con el resto de las formulaciones. Se llevó a cabo el ensayo de disolución en las dispersiones sólidas DS-1:3 y DS-1:6 y en las mezclas físicas MF-1:3 y MF-1:6 para comprobar la influencia del proceso de fabricación en el perfil de disolución. Se estudiaron también los sistemas micelares estudiados con los que se obtuvieron resultados más prometedores durante el desarrollo de las formulaciones (SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025) y los sistemas micelares con el doble de cantidad de tensoactivo (SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,05) para comprobar si los candidatos seleccionados presentaban un perfil de disolución lo suficientemente rápido que permitiese usar las pequeñas proporciones de surfactante seleccionadas. Asimismo, se pudo evaluar el efecto del tensoactivo al comparar los perfiles con los de las dispersiones sólidas.

La velocidad de disolución del voriconazol, tanto de la materia prima como de las formulaciones, disminuyó a medida que aumentó el pH del medio de disolución. El voriconazol recristalizado presentó un perfil más lento que la materia prima en todos los ensayos, agrandándose la diferencia en los medios con pH más alto.

Las mezclas físicas, MF-1:3 y MF-1:6, mostraron perfiles muy similares entre ambas, apreciándose una ligera diferencia a pH 6,8. Sin embargo, su disolución fue más rápida que la de la materia prima en todos los casos. En la materia prima, las moléculas hidrófobas de voriconazol se aglomeraron entre ellas al entrar en contacto con el medio acuoso, por lo tanto, disminuyó su superficie de contacto, por lo que su disolución fue más lenta. En las mezclas físicas, las partículas voriconazol estaban adsorbidas sobre la superficie de las partículas hidrófilas del manitol, lo que evitó su aglomeración al entrar en contacto con el medio acuoso y, por tanto, la superficie de contacto con el medio de disolución fue mayor [157,254,255]. Los perfiles de MF-1:6 fueron ligeramente más rápidos que los de MF-1:3, ya que

en MF-1:3 las partículas de voriconazol estaban más cerca las unas de las otras, puesto que había una menor cantidad de vehículo sobre el que adsorberse y, por tanto, su superficie de contacto con el medio era menor que en MF-1:6, disminuyéndose así levemente su velocidad de disolución.

La dispersión sólida DS-1:6 manifestó perfiles de disolución más rápidos que la materia prima en todos los medios. Los perfiles fueron también más rápidos que los de las mezclas físicas, aunque estas diferencias se fueron reduciendo a medida que aumentó el pH. El hecho de que los perfiles de disolución de MF-1:6 y DS-1:6 fuesen diferentes a pesar de tener ambas formulaciones la misma composición, indicó que durante el proceso de fabricación de DS-1:6, el voriconazol sufrió cambios estructurales pasando a ser más amorfo que la materia prima y presentando, por tanto, una velocidad de disolución mayor [82,256,257].

La dispersión sólida DS-1:3 evidenció perfiles lentos, especialmente a pHs altos, llegando a situarse su curva de disolución entre medias de la de la materia prima y la del voriconazol recristalizado. En este caso, la diferencia entre MF-1:3 y DS-1:3 fue más grande que en las formulaciones con mayor proporción de manitol, por lo que se produjeron cambios diferentes en la estructura del voriconazol durante el proceso de fabricación. La curva de disolución de esta formulación se acercó a la del voriconazol recristalizado a medida que aumentó el pH, lo que hizo pensar que el principio activo tenía una estructura parcialmente cristalina, pudiendo haber tenido lugar una recristalización del voriconazol durante el proceso de fabricación al realizar un doble paso de disolución del principio activo y evaporación del solvente [258,259]. Sin embargo, su grado de cristalinidad sería menor que el de la formulación recristalizada, ya que su perfil de disolución fue más rápido.

Los sistemas micelares exhibieron perfiles rápidos en todos los pHs. Todas las curvas de disolución evidenciaron una mejora frente a las mezclas físicas y a las dispersiones sólidas, lo que sugirió que la presencia de tensoactivo facilitaba la disolución del principio activo. Los sistemas micelares con mayor proporción de manitol, SM-1:6:0,025 y SM-1:6:0,05, mostraron curvas prácticamente iguales en los medios con pHs 1,2 y 4,5. A pH 6,8, SM-1:6:0,05 se disolvió ligeramente más rápido que SM-1:6:0,025, aunque esta diferencia no es trascendental, puesto que ambas formulaciones presentaron disoluciones superiores al 85% a los 15 minutos de ensayo. Las diferencias que sí habría que considerar son las que presentaron con DS-1:6, puesto que los perfiles mostrados por los sistemas micelares fueron más rápidos, agrandándose la disimilitud a medida que aumentó el pH. La presencia de surfactante en la formulación mejoró la humectabilidad de las partículas, facilitando así su disolución [156,260].

Además, la adición del tensoactivo durante el proceso de fabricación probablemente aumentó el grado de amorfización del voriconazol al prevenir su cristalización durante la evaporación del solvente [155,156], sin embargo, son necesarios los estudios de caracterización para poder asegurar este hecho.

Los sistemas micelares con proporciones menores de manitol, SM-1:3:0,05 y SM-1:3:0,1, revelaron perfiles muy rápidos, similares a los de las formulaciones con más cantidad de vehículo, siendo, por tanto, más rápidos que los de MF-1:3 y los de DS-1:3. Ambas curvas fueron semejantes entre ellas, diferenciándose ligeramente en los medios con pH más alto, aunque dichas diferencias no fueron significativas. La considerable diferencia entre las curvas de los sistemas micelares y las de DS-1:3 revelaron que la adición de tensoactivo durante el proceso de fabricación evitó que el voriconazol recristalizase, como sí ocurrió en la dispersión sólida. Asimismo, igual que con las formulaciones con más manitol, las velocidades de disolución fueron mayores debido a que la presencia del tensoactivo mejoró la humectabilidad de las partículas [209,261,262]. Los estudios de caracterización revelarían si el voriconazol presentaba un menor grado de cristalinidad provocado por la presencia del polisorbato 80.

Caracterización

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante este ensayo se constató la forma, el tamaño de partícula y la morfología superficial de las formulaciones. En la Tabla 33 aparecen las microfotografías del voriconazol materia prima, el recristalizado, el manitol y las formulaciones MF-1:3; MF-1:6; DS-1:3; DS-1:6; SM-1:3:0,05; SM-1:3:0,1; SM-1:6:0,025 y SM-1:6:0,05.

Las partículas del voriconazol materia prima presentaron tamaños muy dispares, comprendidos entre 10 y 100 μm . Mostraron forma irregular con aristas y bordes redondeados. Presentaron pequeños cristales geométricos con bordes poco afilados adheridos a la superficie. Esta morfología es propia de una sustancia semicristalina.

Observando la microfotografía del voriconazol recristalizado se pudo apreciar que este principio activo cristalizó en capas, pues los cristales formaron láminas en las partículas. Era una formulación totalmente cristalina, con formas geométricas y bordes afilados. Los cristales formados fueron de tamaños muy superiores a los de la materia prima, llegando a medir hasta 600 μm . Esta estructura cristalina explicaba los perfiles de disolución lentos en todos los medios estudiados en el ensayo de disolución.

El manitol presentó partículas homogéneas en tamaño y forma. En la fotografía se apreciaron gránulos esféricos de tamaños comprendidos entre 100 y 150 μm recubiertos de una capa lisa con muy pocas irregularidades. Esta morfología le otorgaba al producto buenas características de fluidez. En la superficie se observaron pequeñas partículas aciculares adheridas (5-10 μm).

En las microfotografías de las mezclas físicas, MF-1:6 y MF-1:3, se apreciaron gránulos de manitol con partículas semicristalinas de voriconazol adsorbidas sobre su superficie. Las pequeñas irregularidades en la superficie de las partículas del vehículo facilitaron que las partículas del principio activo se adhirieran a la superficie. No se observaron cambios físicos en ninguno de los componentes de las formulaciones.

Las dispersiones sólidas que no contenían surfactante, DS-1:6 y DS-1:3, mostraron partículas redondeadas más grandes que las de manitol, con tamaños comprendidos entre 200 y 300 μm . Su superficie también fue más irregular que la del manitol y presentaron pequeñas partículas semicristalinas de voriconazol (5-10 μm) adheridas a ella e integradas en

las rugosidades. La formulación DS-1:3 tuvo la superficie ligeramente más rugosa que la SD-1:6, debido a que hay el doble de partículas de voriconazol en cada gránulo de manitol. También influyó el proceso de fabricación, pues en la DS-1:3 se realizó dos veces el paso de disolución del principio activo y evaporación del solvente, frente a una en la DS-1:6.

Las formulaciones con surfactante se presentaron como gránulos grandes y redondeados, con tamaños comprendidos entre 200 y 300 μm . Todas ellas tenían en su superficie partículas de voriconazol que, a primera vista, parecía estar en estado amorfo o semicristalino. La morfología de la superficie de cada una de las formulaciones dependió de la concentración de Tween 80. Las formulaciones que contenían menos manitol (SM-1:3:0,05 y SM-1:3:0,1) presentaron una superficie muy rugosa, pero se diferenciaron en que en SM-1:3:0,1 aparecieron adheridas partículas aciculares flexibles, más largas y finas que las del manitol. En la formulación SM-1:6:0,025 se observaron estas mismas partículas, aunque en este caso la superficie era lisa con algunas irregularidades. Estas agujas pertenecían al surfactante, que recubre los gránulos formando una red de fibrillas. Finalmente, en la formulación SM-1:6:0,05, el tensoactivo formó una película que recubría por completo los gránulos de producto, dando a su superficie una apariencia suave. A medida que aumentó la cantidad de surfactante en las formulaciones, su presencia se hizo patente en las microfotografías. Al principio se observaron superficies muy rugosas, luego aparecieron fibrillas que recubrían los gránulos y finalmente se formó una fina película alrededor.

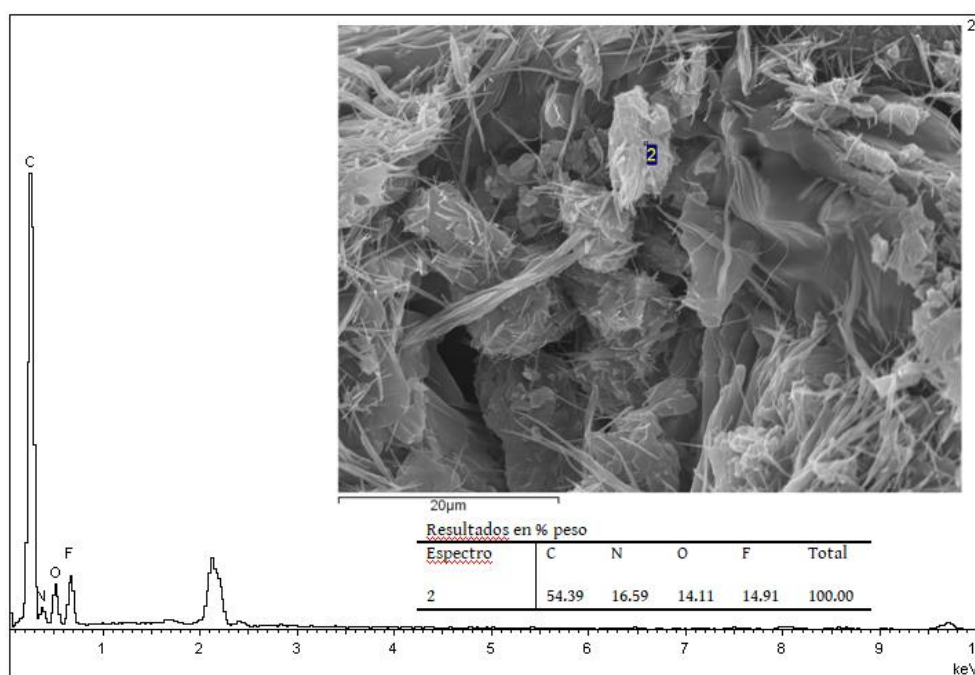


Figura 30: Resultado del análisis EDS. Se muestra la microfotografía de la formulación sometida al análisis y los elementos presentes en el punto señalado.

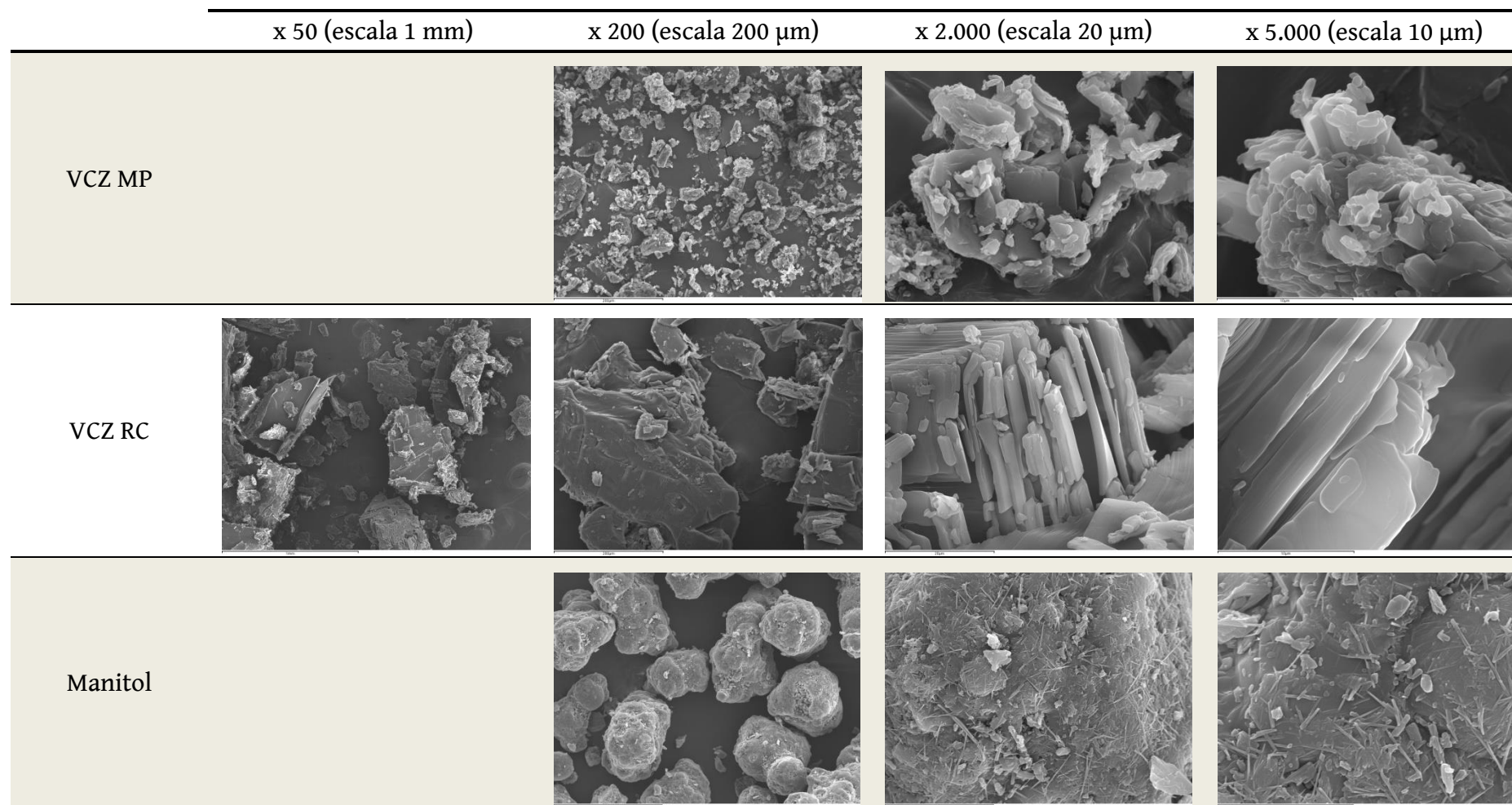


Tabla 33: Microfotografías obtenidas por SEM de las formulaciones ensayadas.

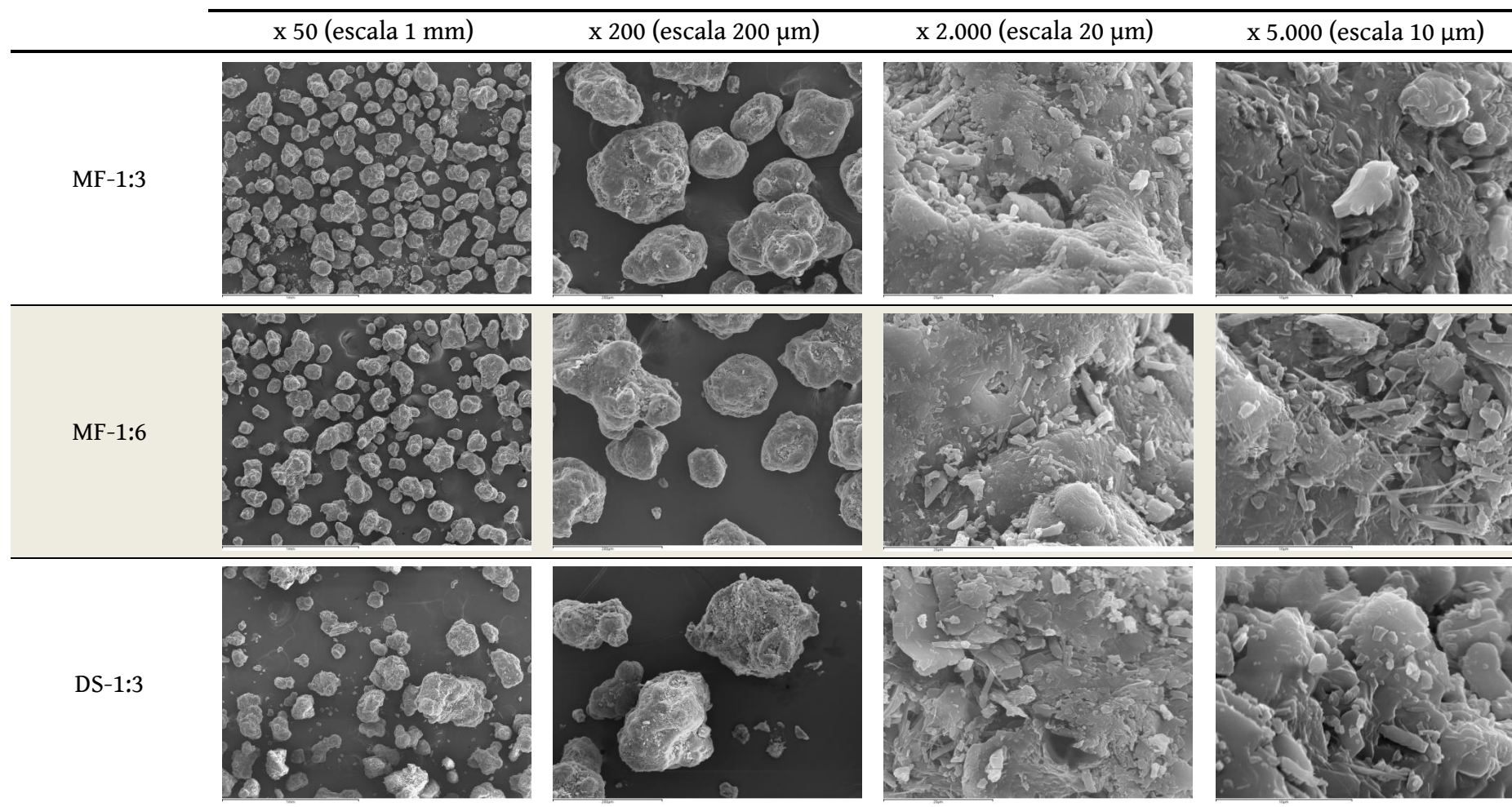


Tabla 33 (continuación): Microfotografías obtenidas por SEM de las formulaciones ensayadas.

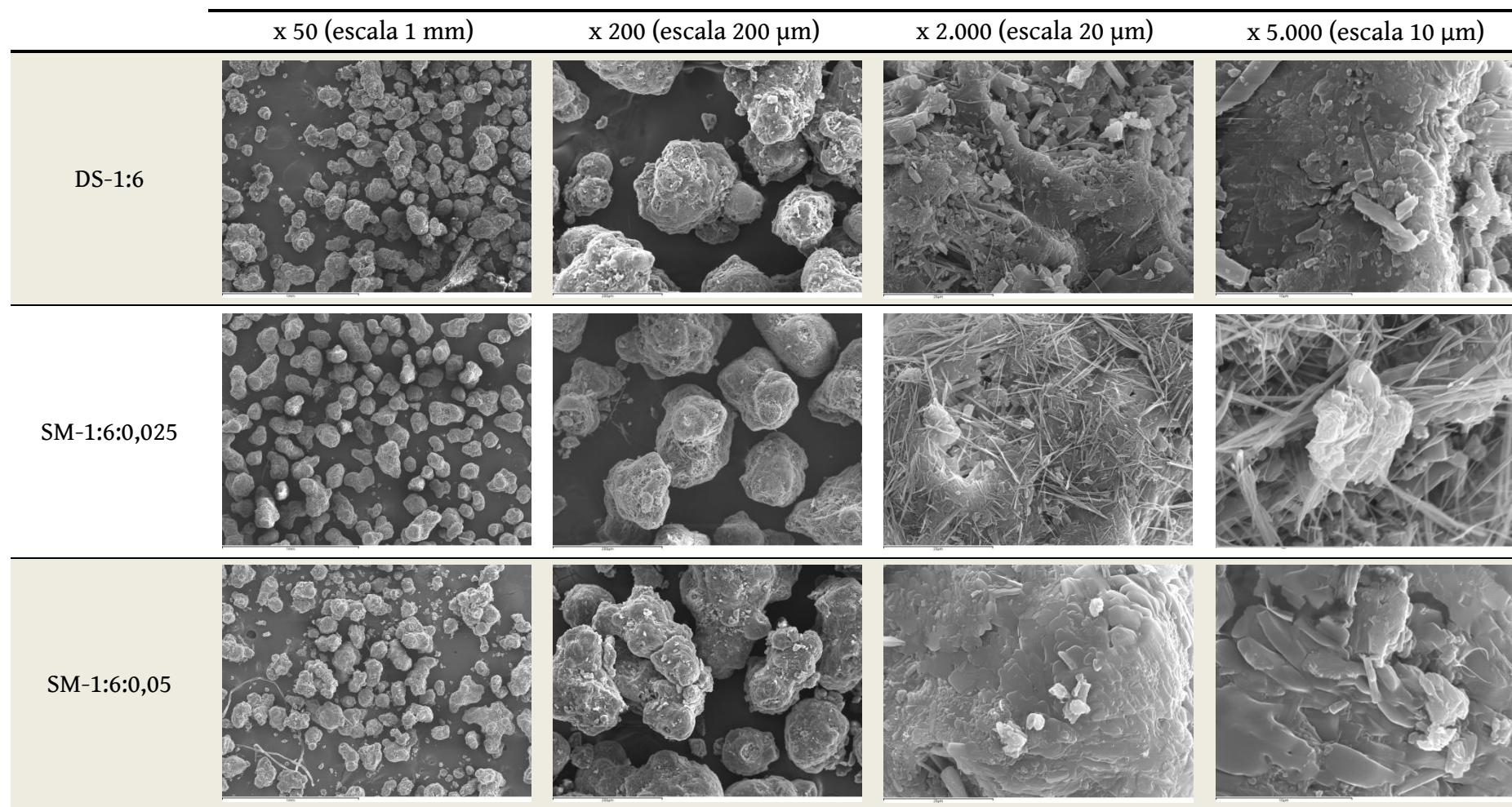


Tabla 33 (continuación): Microfotografías obtenidas por SEM de las formulaciones ensayadas.

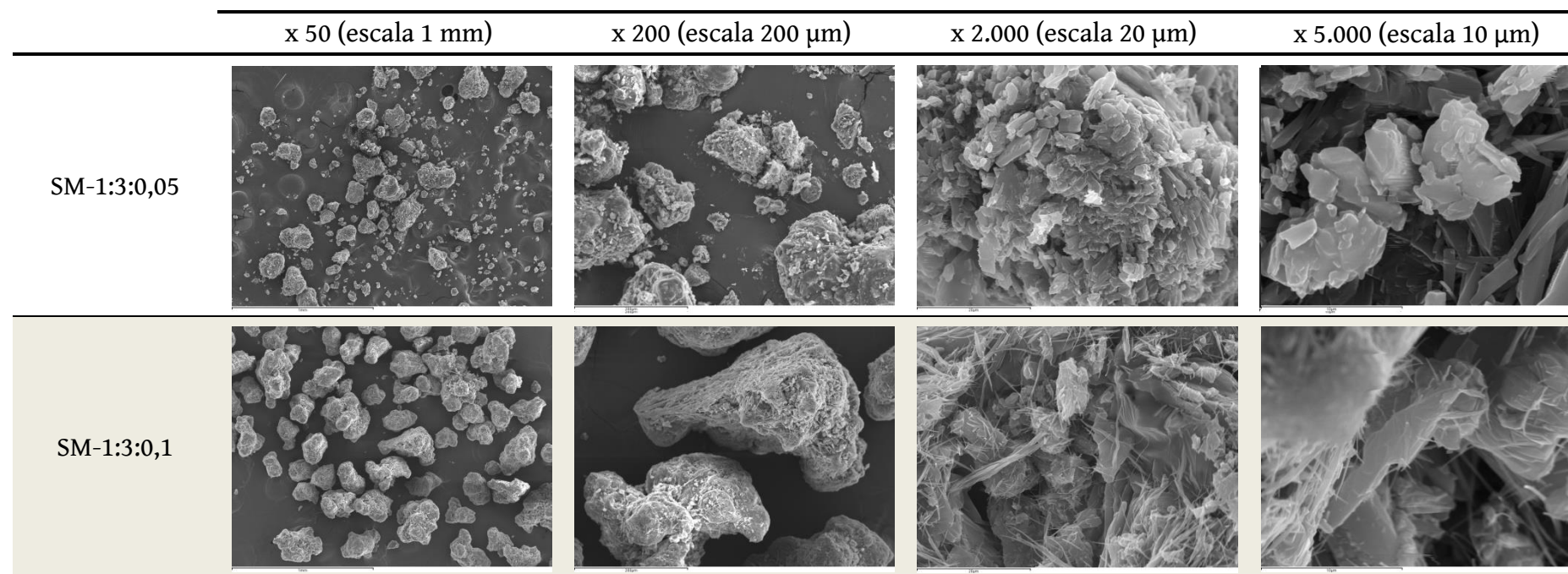


Tabla 33 (continuación): Microfotografías obtenidas por SEM de las formulaciones ensayadas.

Para asegurar que las partículas adheridas a la superficie eran realmente de voriconazol, se realizó sobre ellas un análisis de espectroscopía de energía dispersada (EDS). Como el voriconazol era el único componente de las formulaciones que contenía flúor en su estructura química, el hecho de que se detectase este elemento permitió asegurar que se trata del principio activo. En la Figura 30 se representa un ejemplo de los resultados obtenidos por EDS. El punto de la microfotografía que está marcado con el número 2 está compuesto por carbono, nitrógeno, oxígeno y flúor, por lo que se identificó esa partícula como voriconazol.

Difracción de rayos X

Este ensayo se realizó para comprobar la cristalinidad del voriconazol en las diferentes formulaciones. En la Figura 31 se representan todos los difractogramas.

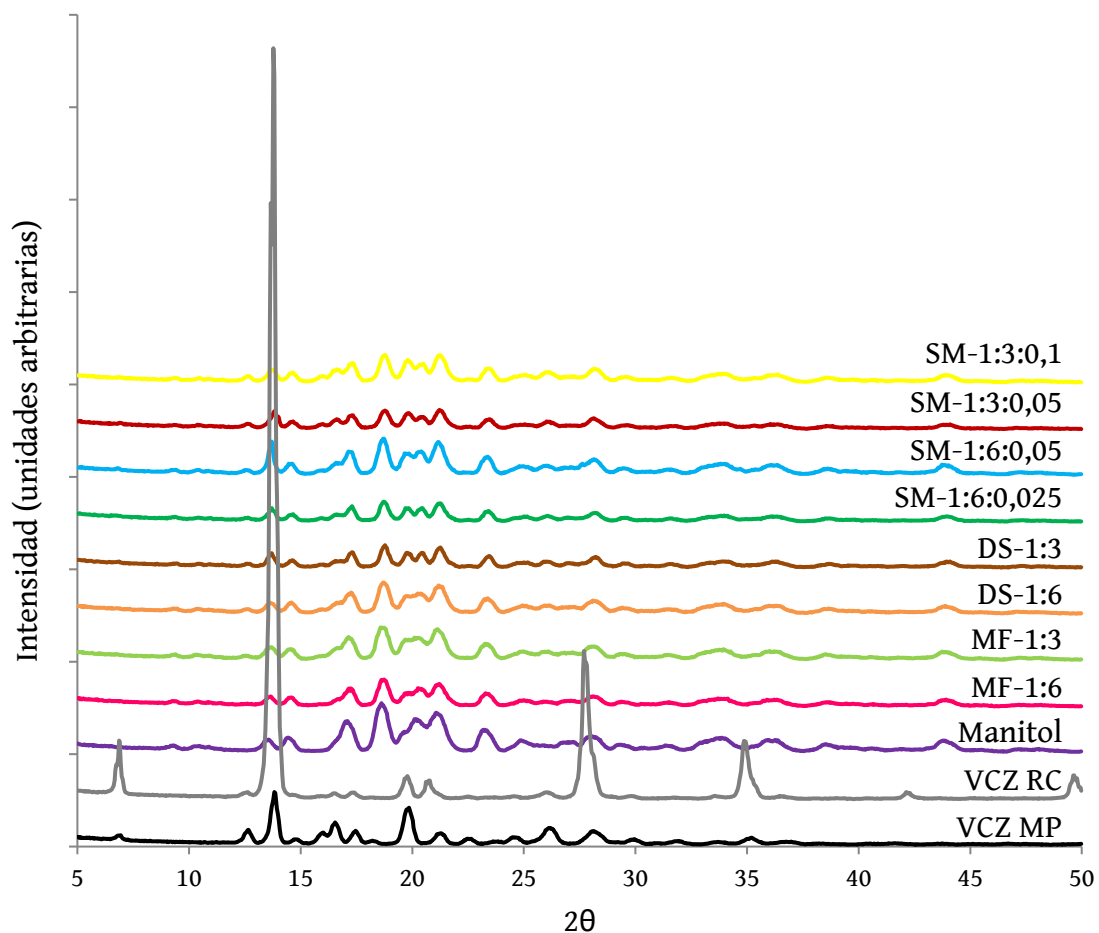


Figura 31: Difractogramas de las formulaciones seleccionadas.

El difractograma del voriconazol materia prima reveló picos característicos en los ángulos de difracción 6,94°; 13,82°; 16,54°; 19,86°; 26,14° y 28,02° 2θ. Patrones similares han sido reportados previamente por otros autores [82,263]. Estos picos no fueron demasiado afilados y presentaron valores de intensidad propios de una sustancia semicristalina.

La formulación de voriconazol recristalizado tuvo menos picos que la materia prima, sin embargo, fueron más pronunciados, alcanzando intensidades altas, lo que indicó que tenía una mayor cristalinidad y había sufrido una reorganización de las moléculas durante el proceso de cristalización.

El difractograma del manitol mostró que se trataba de un polvo semicristalino, ya que contenía varios picos anchos de intensidades moderadas (17,10°; 18,62°; 20,14°; 21,06° y 23,22° 2θ). El hecho de que el voriconazol presentase picos en ángulos de difracción similares a los del manitol representó una dificultad para observar bajos valores de cristalinidad del principio activo mediante rayos X.

Los patrones de las mezclas físicas, MF-1:6 y MF-1:3, presentaron picos típicos del voriconazol y del manitol. En la gráfica pudo apreciarse que los picos del voriconazol estaban incluidos en los picos del manitol, lo que dificultó la apreciación de valores bajos de cristalinidad mediante rayos X. Se pudo apreciar un ligero descenso en la cristalinidad del voriconazol, que fue atribuido al efecto de la dilución.

Las formulaciones DS-1:6 y DS-1:3 mostraron picos de intensidad en los ángulos 17,30°; 18,74°; 21,22° y 23,38° 2θ. Las dispersiones sólidas sin surfactante presentaron una ausencia de los picos de intensidad correspondientes al voriconazol, lo que indicó que el principio activo estaba incluido en el vehículo hidrófilo y su cristalinidad era menor [264]. Como cabía esperar, una mayor intensidad fue observada en los picos del manitol en la formulación DS-1:6 en comparación con los de la DS-1:3 debido a la mayor proporción de este excipiente.

No se observaron picos de intensidad en los ángulos de difracción correspondientes al voriconazol en las formulaciones SM-1:3:0,05 y SM-1:3:0,1. La intensidad de los picos del manitol fue superior en la formulación con mayor proporción de tensoactivo (SM-1:3:0,1). Los resultados obtenidos en las formulaciones con mayor cantidad de manitol (SM-1:6:0,025 y 1:6:0,05) fueron similares. La intensidad de los picos de manitol en los sistemas micelares que contenían proporciones superiores de surfactante fue incluso mayor que la de los picos obtenidos en la formulación DS-1:6.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el fin de comprobar las temperaturas de fusión, entalpías y cambios entre formulaciones se llevaron a cabo los ensayos de calorimetría diferencial de barrido. Los resultados proporcionaron información sobre el estado físico de las formulaciones. En la Figura 32 están recogidos los termogramas.

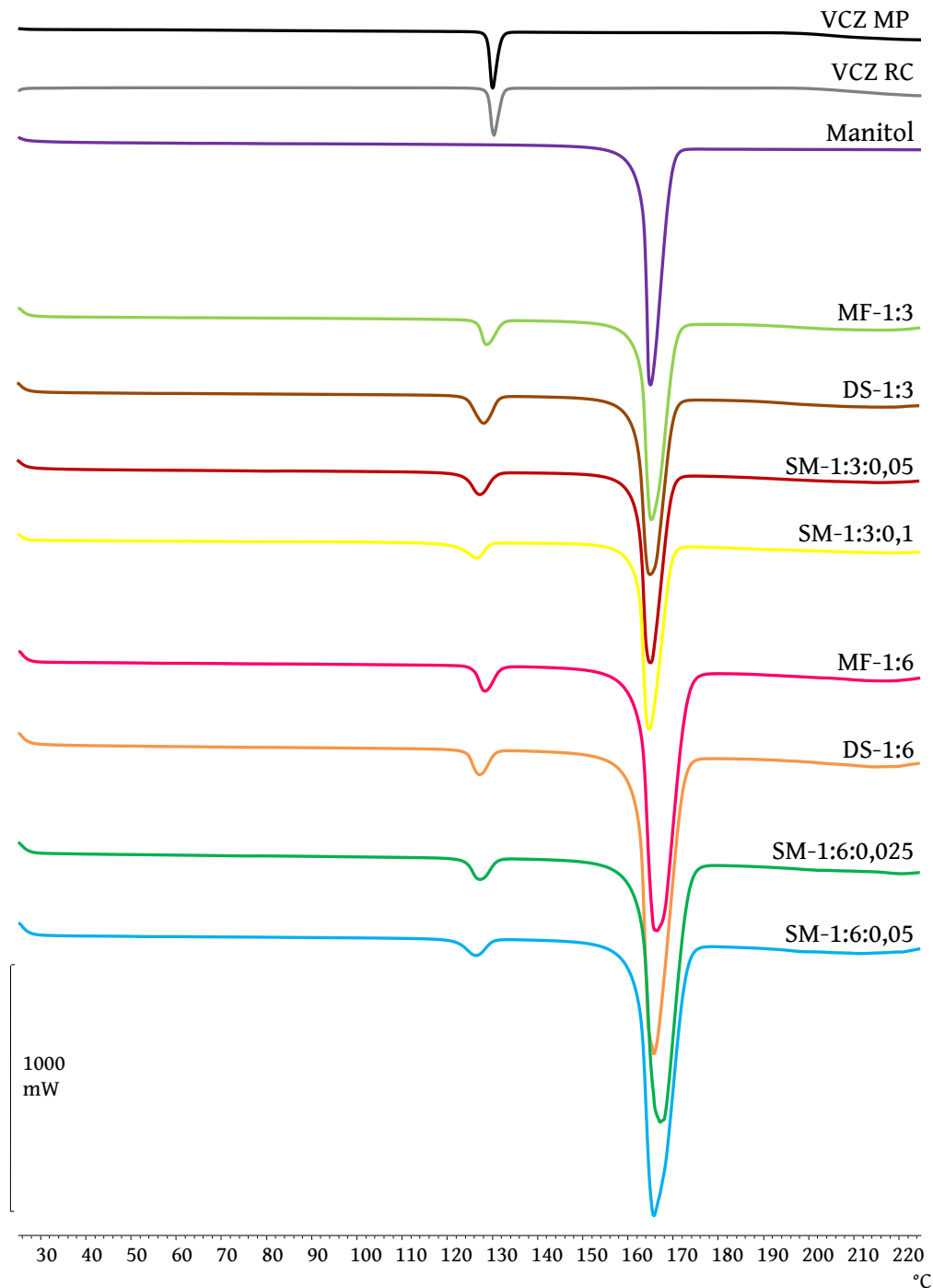


Figura 32: Termogramas obtenidos en el análisis por DSC de las formulaciones seleccionadas.

El voriconazol materia prima mostró un pico de fusión con una entalpía de 1341,09 J/g a los 130°C. Este resultado concuerda con las temperaturas de fusión reportadas [81,222,263,265,266].

El voriconazol recristalizado presentó un pico endotérmico similar a los 130,31°C con una entalpía que supuso el 104,20% del valor de la materia prima. Este ligero incremento en la entalpía que se asoció con una mayor cristalinidad. Sin embargo, este valor no fue tan alto como se esperaba teniendo en cuenta los resultados del ensayo de rayos X y el SEM.

El manitol presentó un pico endotérmico a los 164,9°C con una entalpía de 3982,81 J/g, coincidiendo con las temperaturas reportadas por otros autores [267].

Las mezclas físicas, MF-1:3 y MF-1:6, mostraron un ligero descenso en la cristalinidad del voriconazol, traducido en un valor más bajo de la temperatura de fusión (en torno a 128°C) y un valor de entalpía que supuso aproximadamente un 75% del valor del voriconazol materia prima.

En la formulación DS-1:3 no hubo ningún cambio destacable en la entalpía del pico correspondiente al voriconazol respecto a la materia prima, no obstante, la temperatura de fusión disminuyó hasta los 128,1°C, lo que significa que ocurrió una recristalización durante el proceso de fabricación. La temperatura de fusión más baja que en la materia prima indicó que hubo un cambio físico en el voriconazol, sin embargo, la entalpía apenas varió respecto a la materia prima cuando cabría esperar que este valor disminuyese, por lo que se puede suponer que había recristalizado. Esta explicación soporta los resultados obtenidos en los ensayos de disolución, en los cuales se obtuvo un perfil más lento para DS-1:3. En DS-1:6 se obtuvo un porcentaje de entalpía respecto a la materia prima de 78,48% a los 127,07°C, correspondiente a la fusión del voriconazol. Los valores más bajos de entalpía y temperatura de fusión indicaron que el voriconazol era menos cristalino en esta formulación que la materia prima. Este resultado explicó el incremento en la velocidad de disolución en DS-1:6.

En los sistemas micelares la presencia de surfactante causó temperaturas de fusión del voriconazol más bajas, en torno a 127°C para las formulaciones SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025 y alrededor de 126,5°C para las formulaciones con más cantidad de surfactante, SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,05. Las entalpías del pico de fusión de voriconazol fueron también menores en todos los casos (1084,35 J/g en SM-1:6:0,025 y 1072,60 J/g para SM-1:3:0,05). Como ocurría con la temperatura, los valores más bajos de entalpía fueron observados en las formulaciones con mayor concentración de polisorbato, disminuyendo hasta los 792,23 J/g en SM-1:3:0,1 y 771,20 J/g en SM-1:6:0,05. Estos efectos fueron atribuidos a la presencia del surfactante, que

redujo la cristalinidad del voriconazol, lo que concordó con los resultados obtenidos en los ensayos de disolución y rayos X.

En la Tabla 34 se recogen los parámetros obtenidos en el ensayo de DSC.

Formulación	Pico voriconazol			Pico manitol	
	Temperatura (°C)	Anchura del pico (°C)	% cristalinidad respecto a la materia prima	Temperatura (°C)	Anchura del pico (°C)
VCZ MP	130	2,4	100,00%		
VCZ RC	130,31	2,96	104,20%		
Manitol				164,9	4,34
MF1:6	128,24	4,76	76,80%	166,33	7,16
MF-1:3	128,79	4,04	74,45%	165,21	4,68
SD-1:6	127,07	5,26	78,48%	165,66	6,42
SD-1:3	128,41	7,74	98,33%	165,13	5,82
SM-1:6:0,025	127,24	9,1	80,86%	165,69	6,08
SM-1:6:0,05	126,5	8,12	57,51%	165,68	6,38
SM-1:3:0,05	127,48	6,68	79,98%	165,33	5,52
SM-1:3:0,1	126,54	8,72	59,07%	164,69	4,76

Tabla 34: Resultados del análisis por DSC de las formulaciones seleccionadas.

Discusión parcial

El hecho de combinar varias técnicas analíticas de caracterización es altamente recomendable, ya cada una por separado tiene limitaciones que podrían enmascarar resultados o hacer que se obtuviesen conclusiones erróneas [268]. En este trabajo se llevaron a cabo análisis de SEM, difracción de rayos X y DSC. Los ensayos de caracterización se llevaron a cabo con las formulaciones estudiadas en los ensayos de disolución. La materia prima se utilizó como referencia para comprobar los cambios que sufrió el voriconazol en las formulaciones durante el proceso de fabricación. El voriconazol recrystalizado se tomó como punto de referencia del estado cristalino del principio activo. Se caracterizó el manitol como excipiente para conocer su influencia en el resultado de las pruebas realizadas a las formulaciones. El resto de las formulaciones ensayadas fueron las dos dispersiones sólidas,

DS-1:3 y DS-1:6, sus respectivas mezclas físicas, MF-1:3 y MF-1:6, los sistemas micelares seleccionados en el desarrollo de las formulaciones, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025, y los sistemas micelares con mayor proporción de surfactante, SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,05. Los resultados permitirían evaluar la influencia sobre el voriconazol de las formulaciones de: la proporción de vehículo, el proceso de fabricación, la presencia de tensoactivo y la proporción de surfactante.

El voriconazol materia prima utilizado se presentó como una sustancia semicristalina. La morfología de las partículas mostró formas irregulares, tanto con aristas como con bordes redondeados y tamaños dispares. Los picos mostrados por el difractograma alcanzaron intensidades medias. La entalpía de fusión fue tomada como referencia para medir el grado de cristalinidad del resto de formulaciones.

La microfotografía del voriconazol recristalizado mostró cristales geométricos con aristas afiladas. El difractograma de esta formulación fue claramente diferente del de la materia prima, revelando picos de intensidades mucho más altas que reflejaron la reorganización sufrida en las moléculas de voriconazol durante el proceso de fabricación [269,270]. Se produjo un aumento en la entalpía de fusión, sin embargo, no fue tan pronunciado como se esperaba a la vista de los resultados de la microscopía electrónica y la difracción por rayos X.

El manitol presentó gránulos esféricos con superficie lisa y tamaños homogéneos, morfología típica en excipientes con buenas propiedades de flujo. El ensayo de difracción de rayos X reveló que se trataba de una sustancia semicristalina dada la anchura e intensidad de sus picos. El ensayo de DSC no aportó información nueva sobre este excipiente.

Ambas mezclas físicas obtuvieron resultados similares en los ensayos de caracterización, debiéndose las diferencias entre ambas al efecto de la proporción de manitol. Las microfotografías mostraron gránulos de manitol con partículas de voriconazol adsorbidas sobre su superficie. Esta morfología justificó los perfiles de disolución obtenidos con las mezclas físicas, ya que debido a la adsorción se evitó que las partículas hidrófobas de voriconazol se aglomerasen entre ellas al entrar en contacto con el medio acuoso, incrementándose así su superficie de contacto y disolviéndose más rápidamente. Los difractogramas revelaron picos del principio activo y del excipiente superpuestos, lo que dificultó la valoración del grado de cristalinidad mediante este ensayo. En el ensayo de DSC se obtuvieron temperaturas de fusión del voriconazol más bajas con valores menores de entalpía, lo que fue atribuido al efecto de la dilución con manitol. El descenso en la

temperatura de fusión del voriconazol se favoreció por la presencia del excipiente manitol durante el barrido calorimétrico. La separación entre las temperaturas de fusión es indicador de una buena compatibilidad entre el voriconazol y el manitol. Resultados similares han sido reportados por otros autores con mezclas físicas de voriconazol [222,263,265,271].

Por el contrario, sí se observaron diferencias entre ambas dispersiones sólidas en los ensayos de caracterización. Ambas se presentaron como gránulos de manitol con pequeñas partículas de voriconazol integradas en su superficie. La formulación DS-1:3 presentó una superficie más rugosa que DS-1:6, probablemente por la mayor proporción de voriconazol por cada gránulo de vehículo. El doble paso de disolución del principio activo y evaporación del solvente durante su fabricación provocó que las partículas del principio activo se adsorbiesen unas sobre otras, otorgando una morfología más rugosa a la superficie de los gránulos. Además, este hecho pudo ser una de las causas del perfil de disolución más lento, ya que las partículas de voriconazol estaban situadas unas sobre otras, unidas íntimamente, disminuyéndose su superficie de contacto con el medio de disolución. En el ensayo de difracción por rayos X ambas dispersiones sólidas mostraron ausencia de picos de intensidad del voriconazol en los difractogramas, indicando que el principio activo estaba incluido en el vehículo hidrófilo [264]. El ensayo de DSC nuevamente puso de manifiesto diferencias en los resultados de las dos dispersiones sólidas. La temperatura de fusión de formulación DS-1:6 fue más baja que la de la materia prima, con un valor de entalpía también menor, indicando una menor cristalinidad del principio activo [182,269]. Los perfiles de disolución más rápidos de DS-1:6 quedaron justificados con el menor grado de cristalinidad del voriconazol y con la mayor superficie de contacto con el medio, ya que las partículas del principio activo se encontraban adsorbidas en la superficie del manitol. La formulación DS-1:3 obtuvo una temperatura de fusión menor que la de la materia prima, lo que implicó que hubo un cambio físico en el voriconazol. Sin embargo, el valor de entalpía fue prácticamente igual que el de la referencia, lo que hace pensar que ocurrió una recristalización del voriconazol durante la fabricación. La cristalización de un principio activo en estado amorfo ocurre en dos etapas, nucleación y crecimiento de los cristales. Durante el proceso se forman pequeños núcleos cristalinos a partir de los cuales se produce el crecimiento de los cristales [272]. El proceso de recristalización depende en gran medida de las condiciones del proceso de fabricación, tales como la temperatura, el estado de saturación del principio activo o la agitación. La nucleación se ve favorecida por una solución supersaturada y el crecimiento de los cristales requiere que las moléculas tengan capacidad de movimiento [273]. El proceso de elaboración de la

formulación DS-1:3 se llevó a cabo en dos etapas, lo que pudo favorecer la nucleación, ya que las moléculas adsorbidas sobre el manitol en el primer paso podrían actuar a su vez como núcleos cristalinos [274-276]. Este hecho, unido a la menor superficie de contacto de las partículas de principio activo revelado en el SEM, justificaría las curvas obtenidas en los ensayos de disolución.

Los sistemas micelares se mostraron en el SEM como gránulos grandes y redondeados con partículas de voriconazol en su superficie. La diferencia entre las proporciones de tensoactivo se puso de manifiesto en la morfología de sus superficies. La formulación SM-1:3:0,05 mostró una superficie rugosa, en las formulaciones SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,025 se apreciaron fibrillas de surfactante recubriendo toda la formulación y la formulación SM-1:6:0,05 exhibió una película de tensoactivo que recubría los gránulos. La presencia de surfactante en la superficie incrementó la humectabilidad de las partículas, permitiendo una disolución más rápida de las formulaciones [262]. Además, el tensoactivo previno la aglomeración de las partículas hidrófobas, incrementándose por ello también la velocidad de disolución [152]. En los difractogramas no se observaron picos de intensidad en los ángulos de difracción correspondientes al voriconazol, igual que ocurría en las dispersiones sólidas. En el ensayo de DSC se revelaron temperaturas de fusión menores que en las demás formulaciones. Los valores de entalpía obtenidos correspondieron aproximadamente a un 80% del valor de la materia prima en las formulaciones con menos tensoactivo de cada una de las proporciones de vehículo (SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025) y a un 60% en las formulaciones con más surfactante (SM-1:3:0,1 y SM-1:6:0,05). Las temperaturas de fusión fueron más bajas cuanto menor fue el valor de la entalpía, lo que también ocurrió en el resto de formulaciones [269]. Por tanto, valores bajos de temperatura y entalpía indicaron un estado más amorfo del principio activo. Estos resultados revelaron un estado más amorfo del voriconazol producido por la presencia del surfactante, disminuyéndose la cristalinidad al aumentar la cantidad de tensoactivo [260]. Este hecho, unido al incremento de la humectabilidad de las partículas producido por el surfactante, provocó los perfiles de disolución más rápidos de estas formulaciones. Además, hay que destacar el hecho de que no se detecta que ocurra una recrystalización del principio activo en los sistemas micelares con menor proporción de manitol, al contrario de lo que ocurría con la formulación DS-1:3. A la vista de este resultado se puede decir que la presencia de Tween 80 previno la recrystalización del voriconazol durante el proceso de fabricación [155,277], además de aportar las ventajas ya mencionadas.

Sensibilidad *in vitro*

Método de microdilución

Las CMI obtenidas con las nuevas formulaciones se compararon con las del voriconazol materia prima. En la Tabla 35 se recogen los resultados obtenidos con los hongos filamentosos *Aspergillus* spp. En todos los casos, los resultados de la formulación DS-1:3 fueron los mismos que los de la materia prima. Los sistemas micelares mostraron valores más bajos de CMI en todas las cepas de *A. fumigatus* y la cepa ATCC204304 de *A. flavus*, mientras que no se apreciaron diferencias en *A. calidoustus* (FMR 13556 y FMR 13557) o *A. terreus* (FMR 11823). En la cepa FMR 8760 de *A. flavus*, solo con la formulación SM-1:6:0,025 se obtuvo una CMI menor que con las otras formulaciones.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	VCZ	DS-1:3	SM-1:3:0,05	SM-1:3:0,1	SM-1:6:0,025
<i>Aspergillus calidoustus</i> (FMR 13556)	8	8	8	8	8
<i>Aspergillus calidoustus</i> (FMR 13557)	16	16	16	16	16
<i>Aspergillus terreus</i> (FMR 11823)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 10522)	1	1	0,5	0,5	0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 10504)	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 7738)	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25
<i>Aspergillus flavus</i> (FMR 8760)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25

Tabla 35: Valores de CMI obtenidas en el ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución realizado en hongos filamentosos del género *Aspergillus*.



Figura 33: Fotografía de una microplaca con los resultados del ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución.

En la Tabla 36 se recogen las CMI's obtenidas en las diferentes cepas de *Candida* spp. ensayadas. De la misma forma que ocurría en *Aspergillus* spp., todos los resultados obtenidos con la formulación SD-1:3 fueron los mismos que con la materia prima. En *C. krusei* ATCC 6258 solamente hubo crecimiento fúngico en la columna de control de crecimiento, por lo que se estableció un valor de CMI de 0 µg/mL para todas las formulaciones. Por lo general, en los ensayos con las formulaciones micelares se obtuvieron valores de CMI's más bajos que con la materia prima, salvo en las excepciones que se comentan a continuación. Para *C. auris* (FMR 17043) la CMI fue 0,03125 µg/mL, tanto en la materia prima como en el resto de las formulaciones. Con la formulación SM-1:3:0,05 el valor de CMI se mantuvo igual que con la referencia para *C. parapsilosis* (FMR 17180); con *C. parapsilosis* (FMR 17181) la CMI disminuyó a la mitad y con el resto de las cepas la CMI se redujo a un cuarto del valor de la materia prima. La CMI de SM-1:3:0,1 se redujo a la mitad en ambas cepas de *C. tropicalis* y en *C. parapsilosis* (FMR 17180) y se alcanzó un 25% del valor de CMI de la referencia en *C. auris* (FMR 17034) y en *C. parapsilosis* (FMR 17181). Con la formulación SM-1:6:0,025 se disminuyó el valor de CMI a la mitad en todas las cepas a excepción de *C. tropicalis* (FMR 14600), en la cual se mantuvo igual que en la referencia.

Cepa	CMI (µg/mL)				
	VCZ	DS-1:3	SM-1:3:0,05	SM-1:3:0,1	SM-1:6:0,025
<i>Candida auris</i> (FMR 17034)	16	16	4	4	8
<i>Candida auris</i> (FMR 17043)	0,03125	0,03125	0,03125	0,03125	0,03125
<i>Candida tropicalis</i> (FMR 14603)	4	4	1	2	2
<i>Candida tropicalis</i> (FMR 14600)	2	2	0,5	1	2
<i>Candida parapsilosis</i> (FMR 17180)	0,125	0,125	0,125	0,0625	0,0625
<i>Candida parapsilosis</i> (FMR 17181)	0,25	0,25	0,125	0,0625	0,125
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0

Tabla 36: Valores de CMI's obtenidas en el ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución realizado en hongos levaduriformes del género *Candida*.

Método de difusión

Los resultados se expresaron como los mm de los diámetros de cada uno de los halos de inhibición. Para representarlos se agruparon por especie y se hizo una media de la medida de sus diámetros. De esta forma se pudieron comparar los halos de inhibición formados con

cada una de las formulaciones con los del voriconazol materia prima. En la Figura 34 se recogen los resultados obtenidos en *Aspergillus* spp.

Ninguna de las cepas de *A. calidoustus* (FMR 13556 y FMR 13557) mostró halo de inhibición con ninguna de las formulaciones ensayadas ni con el voriconazol materia prima. Este resultado, unido a los elevados valores de CMI que presentaron en el ensayo de microdilución, hicieron pensar que ambas cepas de *A. calidoustus* son resistentes al voriconazol.

Con la formulación DS-1:3 solamente en *A. terreus* se consiguió un halo de inhibición mayor que el del voriconazol materia prima. En las cepas de *A. flavus* se mantuvo prácticamente igual ($18,03 \pm 2,21$ mm frente a $18,39 \pm 0,15$ mm del voriconazol materia prima), mientras que el halo fue ligeramente más pequeño con las cepas de *A. fumigatus* ($17,94 \pm 2,17$ mm frente a $19,39 \pm 1,34$ mm del voriconazol materia prima).

Con todos los sistemas micelares se obtuvieron halos de inhibición más grandes en las cepas de *A. fumigatus* y *A. flavus*. Sin embargo, en el *A. terreus*, con la única formulación que se consiguió mejorar el resultado del voriconazol materia prima fue con SM-1:3:0,05, llegando a medir $16,21 \pm 0,21$ mm frente a $13,98 \pm 1,02$ mm del voriconazol materia prima.

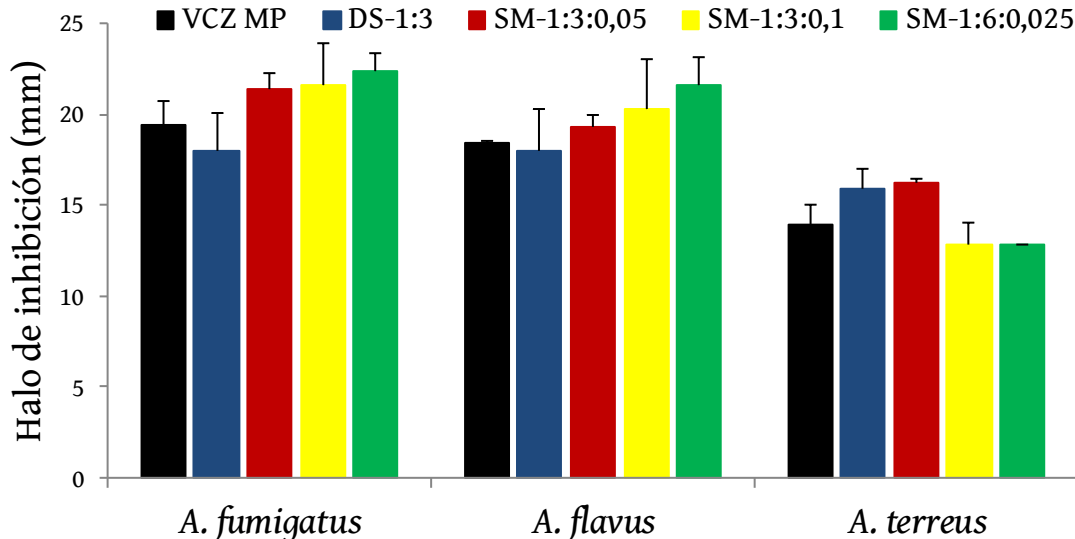


Figura 34: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión con hongos filamentosos del género *Aspergillus*. Resultados agrupados por especie, expresados como el valor medio (barras de colores) \pm DE (barras de error).

Estos resultados soportaron los valores de CMI obtenidos en el ensayo de microdilución. Las diferencias entre los halos de inhibición de DS-1:3 y la materia prima no supusieron ningún cambio en los valores de CMI. Esto mismo ocurrió con todas las

formulaciones en *A. terreus*, ya que los cambios en los halos de inhibición no supusieron ninguna variación en los valores de CMI, manteniéndose en $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los casos. En las cepas de *A. flavus* se apreciaron halos de inhibición mayores en todas las formulaciones micelares, lo que en la mayoría de los casos se tradujo como una disminución en su CMI. Sin embargo, las cepas más interesantes son las de *A. fumigatus*, ya que esta es la especie que más frecuentemente causa AI. Como ya se observó en el ensayo de microdilución, las CMI de las formulaciones micelares fueron menores que las de la materia prima. El ensayo de difusión respaldó los resultados de CMI al obtener halos de inhibición mayores.

Algunos autores han propuesto modelos para correlacionar los valores obtenidos de CMI con el tamaño de los halos de inhibición [278,279]. Mediante una regresión lineal establecieron una conexión entre la transformación logarítmica de los valores de CMI y el diámetro de los halos de inhibición. En este trabajo se hizo lo mismo con los resultados obtenidos en las cepas de *A. fumigatus*, ya que era la especie cuyo estudio tenía más interés. Se calcularon los logaritmos neperianos de los valores de CMI obtenidos con el método de microdilución y mediante una regresión lineal se correlacionaron con los diámetros de los halos de inhibición. El coeficiente de determinación obtenido fue $R^2 = 0,724$, valor muy similar al que obtuvieron los autores que desarrollaron estos modelos [278,279].

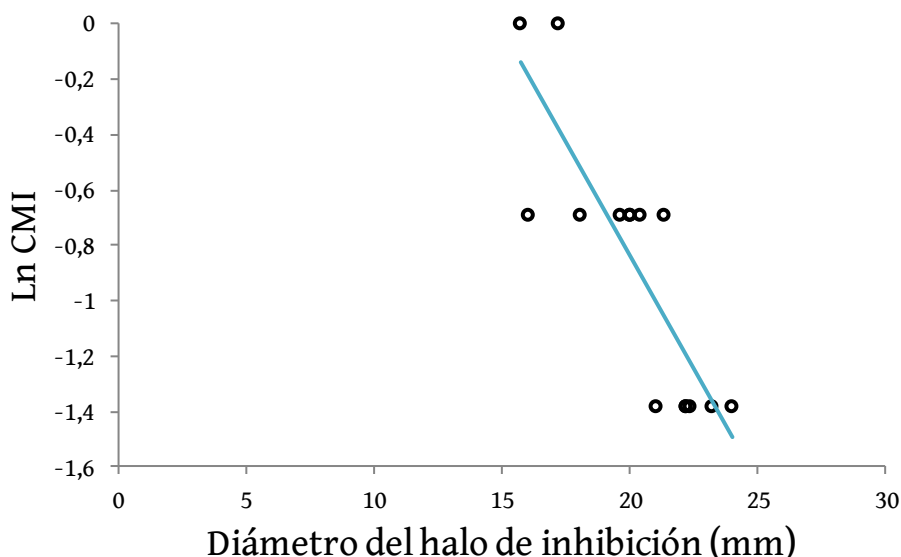


Figura 35: Gráfica de la correlación entre los logaritmos neperianos de las CMI y los diámetros de los halos de inhibición de los hongos del género *Aspergillus*. Ecuación de la recta de regresión: $\text{Ln CMI} = -0,165 \cdot \text{diámetro del halo} + 2,449$. Coeficiente de determinación: $R^2 = 0,724$.

En la Figura 36 aparecen representados los resultados de *Candida* spp.

En las *C. auris* (FMR 17034) y *C. tropicalis* (FMR 14603) no se observaron halos de inhibición con ninguna de las formulaciones, por lo que fueron consideradas cepas resistentes y no se tuvieron en cuenta para representar los resultados en la gráfica. Al contrastar estos resultados con el ensayo de microdilución pudo observarse que estas cepas presentaron las CMI más altas para todas las formulaciones, por lo que se concluyó que se trata de cepas resistentes.

Los halos de inhibición obtenidos con la formulación DS-1:3 fueron similares a los de la materia prima en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Se observó un ligero aumento del diámetro en *C. auris* ($26,27 \pm 1,80$ mm frente a $24,83 \pm 0,83$ mm) y una pequeña disminución en *C. krusei* ($28,77 \pm 1,75$ mm frente a $30,15 \pm 1,20$ mm). Igual que ocurría en *Aspergillus* spp., estos cambios en los halos de inhibición no supusieron ninguna diferencia en los valores de CMI de la materia prima y DS-1:3.

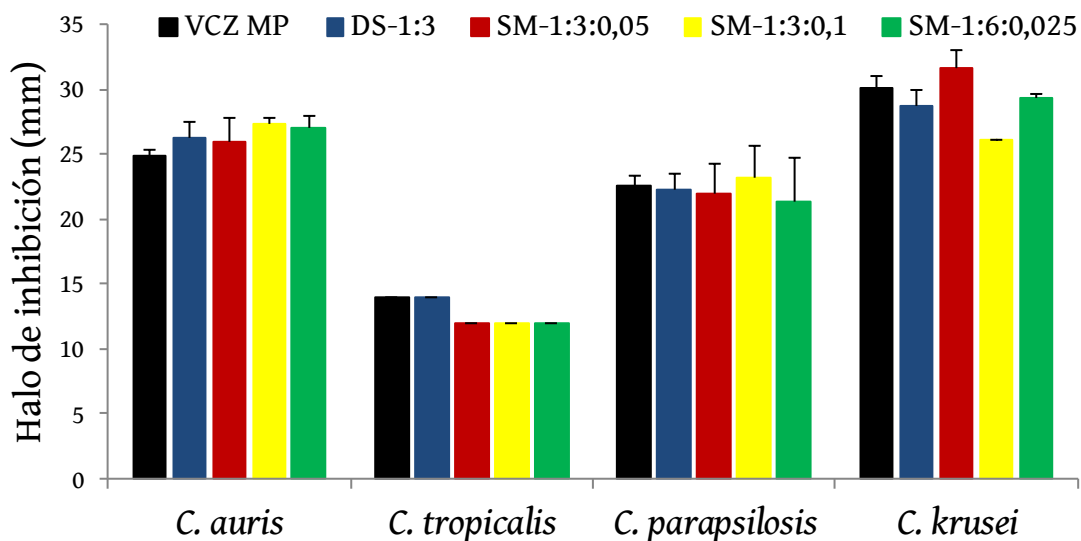


Figura 36: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión con hongos levaduriformes del género *Candida*. Resultados agrupados por especie, expresados como el valor medio (barras de colores) \pm DE (barras de error).

Todos los sistemas micelares obtuvieron halos de inhibición mayores que la materia prima en *C. auris*. En los ensayos con *C. parapsilosis* se obtuvieron resultados muy similares a la referencia y a DS-1:3. La única formulación que obtuvo un resultado mejor que la referencia con *C. krusei* fue SM-1:3:0,05 ($31,62 \pm 1,95$ mm). Este resultado es interesante, ya que el voriconazol está indicado para el tratamiento de infecciones producidas por *C. krusei*.

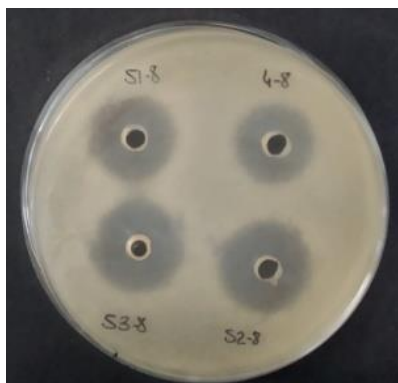


Figura 37: Fotografía de una placa de Petri con los resultados del ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión.

Discusión parcial

El voriconazol es el tratamiento de elección para AI, una infección fúngica sistémica causada por hongos filamentosos del género *Aspergillus* [280,281]. Por este motivo se realizaron ensayos de susceptibilidad *in vitro* en varias cepas de hongos de dicho género. Dado que *A. fumigatus* es la especie que más frecuentemente causa AI [10,282], se prestó especial atención a los resultados obtenidos con las cepas de esta especie. El voriconazol también está indicado para tratar infecciones fúngicas ocasionadas por hongos levaduriformes del género *Candida* [29], por lo tanto, se probaron las formulaciones también en este género. Sin embargo, no se ahondaría más en el estudio de estos hongos levaduriformes, ya que este trabajo se centró en los hongos filamentosos del género *Aspergillus*. El objetivo de este ensayo era comprobar si gracias a los sistemas micelares se conseguía una mejora en la actividad antifúngica del voriconazol. Para ello se determinaron las CMIs mediante el método de microdilución y se realizó un ensayo de difusión que permitió medir los halos de inhibición ocasionados por cada una de las formulaciones.

Las formulaciones utilizadas para realizar este ensayo fueron el voriconazol materia prima, la dispersión sólida SD-1:3 y los sistemas micelares SM-1:6:0,025, SM-1:3:0,05 y SM-1:3:0,1. Los sistemas micelares SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025 habían sido previamente seleccionados con los ensayos de disolución y caracterización. La formulación SM-1:3:0,1 fue escogida como representante de sistemas micelares con mayor proporción de tensoactivo, ya que en ambas formulaciones el voriconazol presentaba el mismo grado de cristalinidad y de las dos que se habían utilizado previamente, era la que contenía mayor cantidad de surfactante. Los resultados permitirían comprobar la influencia de la cantidad de tensoactivo

en la formación de micelas y en la actividad antifúngica. La dispersión sólida incluida en el ensayo fue SD-1:3 porque es la que presentaba el principio activo en estado más cristalino, de forma que las diferencias entre esta formulación y los sistemas micelares serían más fácilmente apreciables. Como en todos los ensayos, la materia prima fue utilizada como referencia.

Los ensayos realizados sobre *Aspergillus* spp. se llevaron a cabo en varias cepas de las especies *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. calidoustus*. Como ya se ha comentado, *A. fumigatus* es la especie que causa la gran mayoría de los casos de AI [5,282], por lo que los resultados de estas cepas serían más trascendentales y fueron los que tuvieron más peso en el presente trabajo. La AI también puede ser originada por *A. flavus* y *A. terreus* en menor medida [10], por lo que se incluyeron cepas de estas especies en el estudio. Por otro lado, algunas especies de hongos presentan resistencia intrínseca al voriconazol, que se define como la resistencia inherente de todos o de casi todos los aislados de una especie a un principio activo sin haber estado expuestos previamente a él. *A. calidoustus* está incluida en este grupo [134], por lo que se decidió incluir en este estudio dos cepas de dicha especie para comprobar si, mediante cambios en la formulación del voriconazol, se conseguía inhibir su crecimiento.

En ambas cepas de *A. calidoustus* se obtuvieron resultados que revelaron que su resistencia intrínseca al voriconazol no pudo ser superada mediante la formulación de sistemas micelares, sin importar las proporciones de vehículo o de surfactante. No hubo variación en la CMI de ninguna formulación, siendo en todos los casos valores muy altos. En el ensayo de difusión no se apreció halo de inhibición en ninguna ocasión.

En todas las cepas de *A. fumigatus* se consiguieron valores de CMI más bajos con las formulaciones micelares y halos de inhibición más grandes que con la materia prima y con SD-1:3. Estos resultados fueron prometedores, pues una mayor actividad antifúngica contra *A. fumigatus* supondría un tratamiento terapéutico más eficaz de la infección sistémica [283,284]. Las CMIs obtenidas con DS-1:3 tuvieron el mismo valor que las de la referencia en todas las cepas. Se observaron diferencias en los halos de inhibición de ambas formulaciones, presentando un diámetro menor los de SD-1:3. Probablemente esto sea debido a la recristalización del voriconazol durante el proceso de fabricación de la dispersión sólida, soportando los resultados de los ensayos de disolución y de caracterización. En cuanto a los sistemas micelares, todos mostraron los mismos valores de CMI entre ellos en todas las cepas. En cambio, se apreciaron pequeñas diferencias entre sus halos de inhibición. Los valores de CMI obtenidos con el método de microdilución son puntos de corte a partir de los cuales no

se detecta crecimiento fúngico. Se ensayan concentraciones de antifúngico fijas, marcadas previamente por un organismo competente y se toma como resultado la concentración del primer pocillo en el que no se ha detectado crecimiento, aunque el valor real puede ser una concentración intermedia entre ese punto y la concentración del primer pocillo en el que se detecta crecimiento. En cambio, en el ensayo de difusión no hay puntos de corte, puesto que alrededor del antifúngico se forma un halo en el que no se produce crecimiento del hongo y el resultado del ensayo es el diámetro de esta zona de inhibición. Esto explicó por qué hubo diferencias entre las medidas de los halos de inhibición de las diferentes formulaciones, aunque sus CMIs se mantuvieran iguales. En los ensayos con la cepa FMR 7738 de *A. fumigatus*, los tres sistemas micelares mostraron halos de inhibición iguales. Con la cepa FMR 10505, la formulación SM-1:3:0,05 obtuvo la menor zona de inhibición, con un diámetro de 21 mm, seguida por SM-1:6:0,025, con 23 mm de diámetro, y por último SM-1:3:0,1, con un diámetro de 24 mm. Sin embargo, todas ellas tuvieron un valor de CMI dado por el ensayo de microdilución de 0,25 µg/mL. En realidad, los tres sistemas micelares tuvieron un valor de CMI comprendido en el intervalo entre 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL ($0,25 \mu\text{g/mL} \geq \text{CMI} > 0,125 \mu\text{g/mL}$) y el diámetro de su halo de inhibición indicó hacia qué extremo tendía el valor real de CMI. La formulación SM-1:3:0,1 es la que detentó una menor CMI de las tres, puesto que fue la que obtuvo un halo de inhibición más grande, por lo que su valor real de CMI estaría más próximo a 0,125 µg/mL. Por el contrario, SM-1:3:0,05 sería la formulación con mayor valor de CMI real y se encontraría más cercano a 0,25 µg/mL, puesto que presentó un halo de inhibición más pequeño. En los ensayos con la cepa FMR 10522, la mayor zona de inhibición fue la producida por SM-1:6:0,025, seguida por SM-1:3:0,05 y por último SM-1:3:0,1.

Estas pequeñas variaciones comentadas entre las CMIs de los sistemas micelares no representaron grandes desigualdades en su efecto antifúngico, por lo que cantidad de tensoactivo presente en la formulación no fue determinante. Sin embargo, si se apreciaron diferencias más importantes con la materia prima y la dispersión sólida, cuyas CMIs fueron mayores. Estos resultados estaban respaldados por el ensayo de difusión, por lo que se concluyó que sí tiene influencia la presencia de tensoactivo. Al entrar en contacto las formulaciones con el agua, se formaron micelas que contenían las moléculas de voriconazol en su interior. Las micelas tienen la propiedad de facilitar el paso a través de las membranas biológicas de los productos que contienen, por tanto, la captación del voriconazol por parte de las células fúngicas se vio aumentada en los sistemas micelares, disminuyendo así su CMI [206]. Asimismo, las células fúngicas presentan bombas de eflujo que expulsan moléculas

tóxicas del interior celular [143,144]. Al penetrar en la célula, las moléculas de voriconazol estaban incluidas en el interior de las micelas, lo que evitó que fuesen reconocidas por estas bombas de eflujo y, por tanto, expulsadas antes de que pudiesen ejercer su acción [285]. Este es otro motivo por el que la CMI puede verse disminuida. H.R. Keldari *et al.* consiguieron reducir las CMIs del voriconazol en *A. fumigatus* mediante la formulación de nanopartículas lipídicas sólidas [68].

Esta misma explicación se aplicó a las diferencias entre las CMI del resto de cepas de *Aspergillus* spp., así como en los hongos levaduriformes del género *Candida*. Además de la entrada facilitada de las moléculas de fármaco en el interior de las células [286,287], estos hongos presentan también bombas de eflujo como mecanismos de defensa [145-147,288].

Ensayos *in vivo*

Farmacocinética

En la Figura 38 se representan los perfiles farmacocinéticos del voriconazol materia prima, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025.

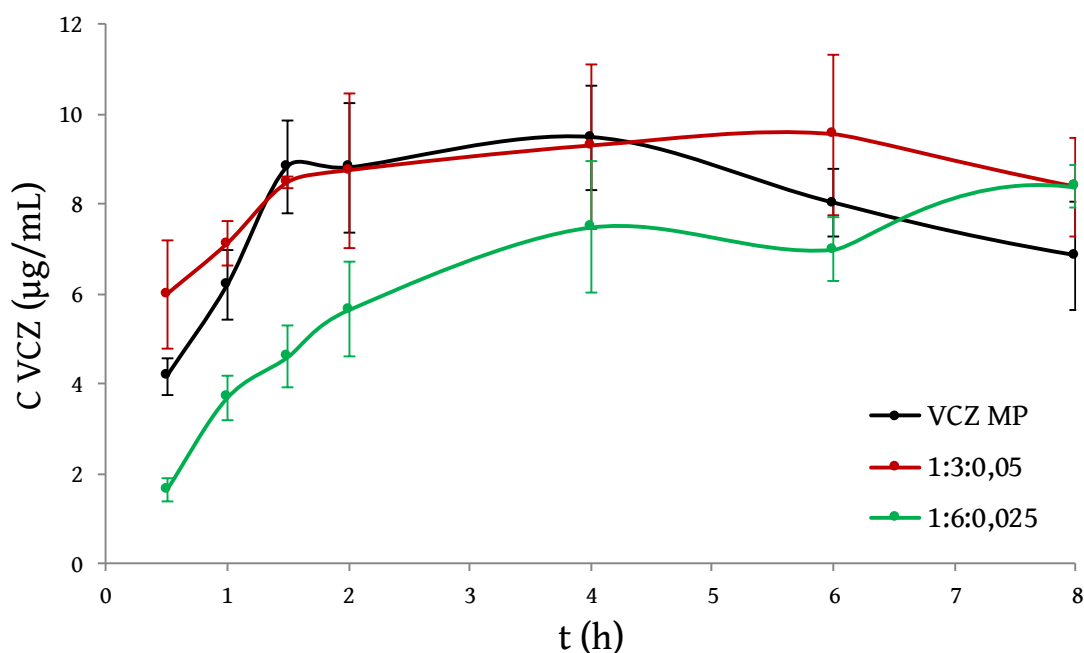


Figura 38: Gráficas de los perfiles farmacocinéticos de las formulaciones utilizadas en el ensayo *in vivo* de dosis única de 40 mg/kg con ratas Wistar.

Como referencia se tomó el voriconazol materia prima. En la Tabla 37 se muestran los principales parámetros farmacocinéticos en plasma.

En todos los casos la concentración de voriconazol en plasma 24 horas después de la administración de la dosis estuvo por debajo del límite de cuantificación, por lo que los resultados se designaron como cero.

Los valores de t_{max} fueron diferentes para cada una de las formulaciones (4, 6 y 8 horas para la materia prima, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025 respectivamente). Sin embargo, los valores de C_{max} fueron similares en todos los casos.

El voriconazol materia prima y SM-1:3:0,05 tuvieron perfiles semejantes durante las primeras 4 horas, aunque el sistema micelar mostró una concentración mayor transcurridas

6 horas, con la consecuente mejora en la biodisponibilidad con respecto a la referencia, tal como se reflejó en los valores de AUC_{0-24} .

Sin embargo, el hecho más notable fue la diferencia entre la curva de la formulación SM-1:6:0,025 y las otras formulaciones. Los valores de voriconazol en plasma fueron significativamente menores durante las 6 primeras horas, incrementándose a las 8 horas y alcanzando su C_{max} en este punto. A pesar de esto, el valor de AUC_{0-24} de la formulación con mayor cantidad de manitol - SM-1:6:0,025 ($116,39 \pm 16,15$ h· μ g/mL) - fue similar al dato del voriconazol materia prima ($117,35 \pm 23,52$ h· μ g/mL) y solamente una ligera mejora fue observada en la formulación SM-1:3:0,05 ($135,13 \pm 34,44$ h· μ g/mL).

	VCZ MP	SM-1:3:0,05	SM-1:6:0,025
AUC_{0-8} (h· μ g/mL)	$62,48 \pm 7,93$	$68,15 \pm 11,37$	$49,37 \pm 6,79$
AUC_{0-24} (h· μ g/mL)	$117,35 \pm 23,52$	$135,13 \pm 34,44$	$116,39 \pm 16,15$
t_{max} (h)	4	6	8
C_{max} (μ g/mL)	$9,48 \pm 1,16$	$9,54 \pm 1,79$	$8,38 \pm 0,48$
C_4 (μ g/mL)	$9,48 \pm 1,16$	$9,29 \pm 1,83$	$7,49 \pm 1,45$
$C_{0,5}$ (μ g/mL)	$4,17 \pm 0,41$	$5,96 \pm 1,19$	$1,64 \pm 0,27$

Tabla 37: Parámetros farmacocinéticos obtenidos en el ensayo *in vivo* de dosis única con ratas Wistar. AUC_{0-8} = área bajo la curva desde el momento de la administración de la dosis hasta las 8 horas del ensayo. AUC_{0-24} = área bajo la curva desde el momento de la administración de la dosis hasta las 24 horas del ensayo. t_{max} = tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de voriconazol obtenida en plasma. C_{max} = valor de la concentración máxima de voriconazol alcanzada en plasma. C_4 = valor de la concentración de voriconazol en plasma 4 horas después de la administración de la dosis. $C_{0,5}$ = valor de la concentración de voriconazol en plasma media hora después de la administración de la dosis.

Biodistribución

Dosis única

Las formulaciones utilizadas fueron las mismas que en el ensayo de farmacocinética: voriconazol materia prima, que se tomó como referencia, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025. Los niveles de voriconazol obtenidos en los diferentes órganos se expresaron como μ g de voriconazol por g de órgano. No se detectó presencia del fármaco en el cerebro en ninguna de las formulaciones. Las concentraciones en hígado, pulmones y riñones están representadas en la Figura 39.

No hubo cambios significativos en la concentración en los pulmones entre SM-1:6:0,025 y la materia prima ($1,92 \pm 0,35$ y $2,01 \pm 0,24$ $\mu\text{g/g}$ respectivamente), sin embargo, los resultados para SM-1:3:0,05 fueron más altos en este órgano ($4,78 \pm 1,69$ $\mu\text{g/g}$). Las diferencias entre las concentraciones en el hígado fueron significativas en todos los casos. La cantidad de voriconazol fue mucho más alta en las ratas tratadas con la materia prima ($12,78 \pm 1,21$ $\mu\text{g/g}$) en comparación con las dos formulaciones micelares; supuso el doble de concentración que con la formulación SM-1:3:0,05 ($5,29 \pm 0,74$ $\mu\text{g/g}$) y casi cinco veces superior que en el caso de SM-1:6:0,025 ($2,81 \pm 0,69$ $\mu\text{g/g}$). En cuanto a los riñones, la concentración alcanzada en la materia prima y en SM-1:3:0,05 fue similar ($4,98 \pm 0,54$ $\mu\text{g/g}$ y $5,36 \pm 0,27$ $\mu\text{g/g}$ respectivamente), mientras que los niveles con SM-1:6:0,025 fueron más bajos ($2,58 \pm 0,06$ $\mu\text{g/g}$).

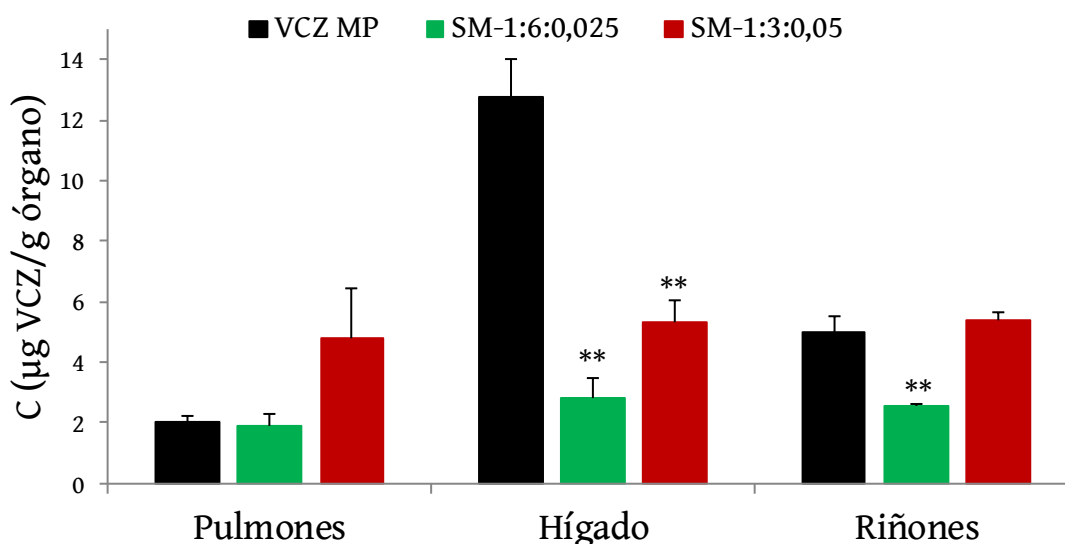


Figura 39: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución de dosis única 24 horas después de la administración de una dosis de 40 mg/kg a ratas Wistar. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 6$). ** = valor de $p < 0,01$ respecto a la referencia (materia prima).

	C_{pulmones} ($\mu\text{g/g}$)	$C_{\text{hígado}}$ ($\mu\text{g/g}$)	$C_{\text{riñones}}$ ($\mu\text{g/g}$)
VCZ MP	$2,01 \pm 0,24$	$12,78 \pm 1,21$	$4,98 \pm 0,54$
SM-1:6:0,025	$1,92 \pm 0,35$	$2,81 \pm 0,69$	$2,58 \pm 0,06$
SM-1:3:0,05	$4,78 \pm 1,69$	$5,29 \pm 0,74$	$5,36 \pm 0,27$

Tabla 38: Concentraciones obtenidas en los órganos en el ensayo de biodistribución de dosis única 24 horas después de la administración de una dosis de 40 mg/kg a ratas Wistar. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 6$). C_{pulmones} = concentración en los pulmones. $C_{\text{hígado}}$ = concentración en el hígado. $C_{\text{riñones}}$ = concentración en los riñones.

Dosis múltiple

Este ensayo se llevó a cabo con la formulación SM-1:3:0,5 y el voriconazol materia prima utilizado como referencia. Los resultados se expresaron de la misma forma que en la biodistribución con dosis única. La Figura 40 muestra la gráfica de los resultados de la biodistribución tras la administración de dos dosis. En la Figura 41 se representan los resultados tras la administración de diez dosis. La Tabla 39 recoge los valores de las concentraciones obtenidas.

	$C_{\text{cerebro}} (\mu\text{g/g})$	$C_{\text{pulmones}} (\mu\text{g/g})$	$C_{\text{hígado}} (\mu\text{g/g})$	$C_{\text{riñones}} (\mu\text{g/g})$
VCZ MP 2 dosis	$17,25 \pm 3,24$	$20,47 \pm 2,49$	$50,36 \pm 7,21$	$27,23 \pm 5,40$
SM-1:3:0,05 2 dosis	$33,67 \pm 4,76$	$28,06 \pm 3,78$	$48,06 \pm 2,57$	$28,66 \pm 1,06$
VCZ MP 10 dosis	$17,49 \pm 1,91$	$24,42 \pm 3,00$	$60,53 \pm 7,38$	$30,89 \pm 6,89$
SM-1:3:0,05 10 dosis	$31,84 \pm 3,29$	$31,47 \pm 0,86$	$48,32 \pm 8,99$	$34,55 \pm 3,75$

Tabla 39: Concentraciones obtenidas en los órganos en el ensayo de biodistribución de dosis múltiple 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 5$). C_{cerebro} = concentración en el cerebro. C_{pulmones} = concentración en los pulmones. $C_{\text{hígado}}$ = concentración en el hígado. $C_{\text{riñones}}$ = concentración en los riñones.

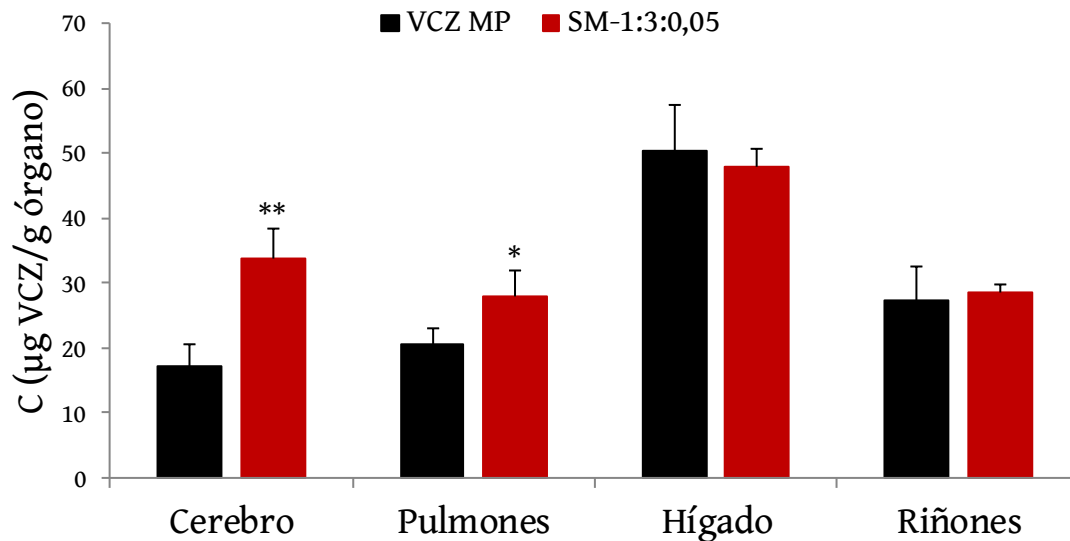


Figura 40: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución dosis múltiple tras la administración de dos dosis, 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada g de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 5$). * = valor de $p < 0,05$ respecto a la referencia (materia prima). ** = valor de $p < 0,01$ respecto a la referencia (materia prima).

La cantidad de fármaco que alcanzó el cerebro fue diferente para ambas formulaciones, siendo la formulación micelar SM-1:3:0,05 la que obtuvo niveles más altos. No hubo cambio entre los valores de la administración de dos dosis y la de diez dosis.

La concentración de voriconazol en los pulmones fue más alta con el sistema micelar tras la administración de dos dosis. Los niveles alcanzados tras diez dosis revelaron que el voriconazol se acumuló en este órgano, ya que en ambos casos la concentración hallada fue superior a la que había en los ratones que recibieron dos dosis de tratamiento. La cantidad de principio activo almacenada siguió siendo superior con la formulación micelar.

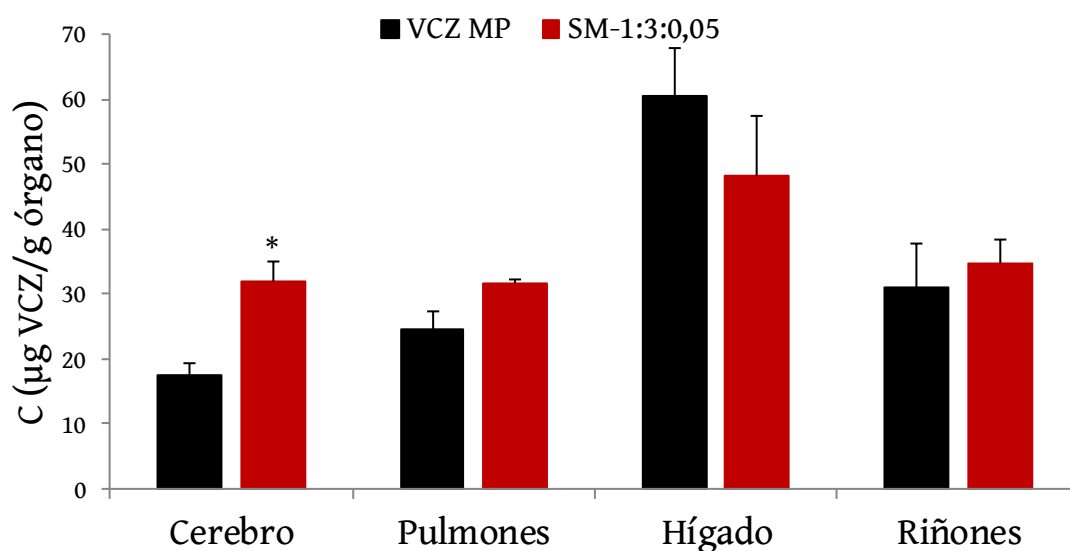


Figura 41: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución dosis múltiple tras la administración de diez dosis, 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en µg de voriconazol por cada g de órgano como la concentración media \pm DE (n = 5). * = valor de $p < 0,05$ respecto a la referencia (materia prima).

Los niveles de voriconazol en el hígado fueron similares en las dos formulaciones tras la administración de dos dosis. Sin embargo, transcurridos cinco días de tratamiento, la materia prima se acumuló en este órgano, mientras que con la formulación SM-1:3:0,05, los niveles de voriconazol se mantuvieron constantes. La acumulación y las altas concentraciones de voriconazol en el hígado pueden producir daño hepático. Se valoró visualmente el estado de los hígados. En la Figura 42 aparecen las fotos de un hígado de cada grupo (control, referencia y nueva formulación) tras la administración de dos dosis y en la Figura 43 aparecen las fotos de los hígados tras recibir diez dosis. Con la administración de dos dosis, los hígados de los ratones del grupo referencia tuvieron un aspecto sanguinolento, presentando un color rojo intenso. Los hígados de los ratones tratados con la formulación SM-1:3:0,05 fueron de un color ligeramente más oscuro que los del grupo control. Tras la

administración de diez dosis, las diferencias entre los hígados fueron más obvias. Los ratones del grupo tratado con la formulación SM-1:3:0,05 presentaron hígados similares a los del grupo control, entre los que no se apreciaron diferencias visuales. Los hígados de los ratones tratados con la materia prima tuvieron un color mucho más claro y presentaron una textura granulosa.

Los riñones de los ratones de ambos grupos presentaron niveles de voriconazol muy similares tras la administración de dos dosis de voriconazol. Sin embargo, tras diez dosis, la formulación SM-1:3:0,05 mostró niveles más altos, revelando una mayor acumulación en este órgano.

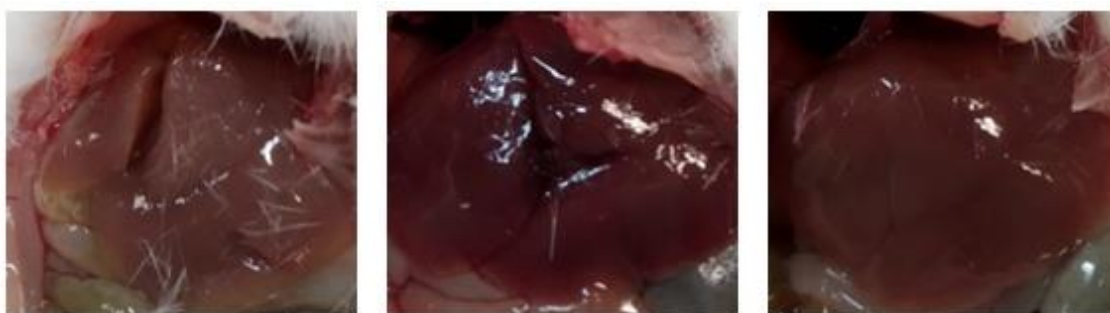


Figura 42: Fotografías de hígados de los ratones tras la administración de dos dosis. A la izquierda el hígado de un ratón del grupo control tratado con placebo, en el centro el hígado de un ratón del grupo referencia tratado con la materia prima y a la derecha el hígado de un ratón del grupo de la nueva formulación tratado con SM-1:3:0,05.



Figura 43: Fotografías de hígados de los ratones tras la administración de diez dosis. A la izquierda el hígado de un ratón del grupo control tratado con placebo, en el centro el hígado de un ratón del grupo referencia tratado con la materia prima y a la derecha el hígado de un ratón del grupo de la nueva formulación tratado con SM-1:3:0,05.

Discusión parcial

Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* de farmacocinética y biodistribución. El estudio de farmacocinética permitió conocer la evolución de la concentración del fármaco en sangre a

lo largo del tiempo. Con los estudios de biodistribución se pudo conocer la concentración de voriconazol en los distintos órganos y su acumulación en los mismos. Se estudiaron los sistemas micelares seleccionados anteriormente, SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025, y se utilizó el voriconazol materia prima como referencia.

Para la realización del estudio de farmacocinética se les administró a los animales una dosis única de 40 mg/kg por vía oral. Los perfiles farmacocinéticos de SM-1:3:0,05 y de la materia prima fueron similares durante las primeras 4 horas. A partir de ese punto la materia prima empezó a ser eliminada del organismo mientras que la formulación micelar se mantuvo hasta las 6 horas y es ahí cuando comenzó a disminuir su concentración. A pesar de revelar niveles semejantes durante las primeras 4 horas, la formulación SM-1:3:0,05 consiguió mantener concentraciones más altas que las de la referencia durante el resto del ensayo. Esto se tradujo en un valor superior de AUC_{0-24} , o lo que es lo mismo, una mayor biodisponibilidad. Resultados similares a los obtenidos con el voriconazol materia prima han sido publicados previamente por otros autores [141,232]. Por otro lado, la formulación SM-1:6:0,025 mostró niveles inferiores a los de la referencia durante las primeras 6 horas del ensayo presentando un incremento a las 8 horas. Este no era el resultado esperado, ya que los ensayos de disolución *in vitro* sugerían mayores concentraciones plasmáticas y una mejor biodisponibilidad. La presencia de grandes cantidades de manitol, un azúcar que se absorbe de forma lenta e incompleta, probablemente incrementó la presión osmótica en el intestino, atrayendo agua hacia el lumen, lo que resultó en una disminución en la absorción del fármaco [289,290]. Mediante los cálculos de los valores de AUC_{0-24} de todas las formulaciones se observó que, a pesar de las diferencias en los perfiles, la materia prima y SM-1:6:0,025 presentaron la misma biodisponibilidad y la formulación SM-1:3:0,05 mostró un incremento respecto a las anteriores. Las micelas tienen la propiedad de aumentar el tiempo de residencia de un principio activo en el organismo al prevenir su eliminación y protegerlo de la degradación y el metabolismo, factores que conllevan a una mayor biodisponibilidad [203,206]. Veloso, D.F.M.C. *et al.* [246] obtuvieron valores superiores de AUC_{0-24} de voriconazol administrado por vía intravenosa mediante la formulación de liposomas. Otros autores han utilizado las micelas como estrategia para aumentar la biodisponibilidad de diferentes fármacos [291-295].

Los mismos animales utilizados en el estudio de farmacocinética fueron sacrificados 24 horas después de la administración de la dosis única de 40 mg/kg para cuantificar los niveles de voriconazol en los diferentes órganos. La concentración de fármaco presente en un órgano ha sido relacionada con su efecto antifúngico local [129,296,297].

No se detectaron niveles de voriconazol en el cerebro. Esto no quiere decir que el principio activo no alcanzase el órgano, sino que, tras 24 horas, la cantidad que hubiera podido acceder al cerebro ya se había eliminado [298-300]. Serían necesarios más ensayos de biodistribución para comprobar si realmente el voriconazol penetró en el cerebro.

En la mayoría de los casos, los pulmones son la vía de entrada del hongo al organismo, siendo estos el órgano más afectado [301], por lo que es importante conseguir una eficacia alta en este nivel, ya que los microorganismos se acumulan ahí hasta que la infección se disemina. Si se consiguiesen alcanzar cantidades altas de fármaco en los pulmones, se facilitaría la eliminación de los hongos [13,302-304]. Las concentraciones de materia prima y de SM-1:6:0,025 en este órgano fueron muy similares, por lo que ambas formulaciones tendrían la misma eficacia en los pulmones en el tratamiento la infección. Los niveles superiores obtenidos con SM-1:3:0,05 sugirieron que el efecto local sería mayor con esta formulación [245,246]. Las micelas tienen la propiedad ampliar la liberación pulmonar de los principios activos, probablemente por la mayor presencia de macrófagos en este órgano [305]. Estudios previos con sistemas micelares de diferentes principios activos han mostrado modificaciones en la biodistribución con acumulación en el tejido pulmonar [306,307].

La concentración de voriconazol en el hígado es igualmente trascendental, ya que la reacción adversa más preocupante de este fármaco es la hepatotoxicidad que ocasiona [102,105]. No se conoce exactamente el mecanismo por el que se produce la toxicidad hepática, no obstante, se ha asociado al estrés oxidativo producido por la conjugación directa de los metabolitos de voriconazol con los hepatocitos, haciéndose estos disfuncionales [308]. También se ha relacionado con la alteración de las funciones mitocondriales que conllevan a una producción masiva de ROS [308-310]. La toxicidad ocasionada en el hígado ha sido ampliamente asociada a altos niveles séricos del principio activo por la facilidad de la toma y el análisis de la muestra [83,106,311,312] y ha sido demostrado que el daño hepático depende de la exposición al principio activo [79,313,314], por lo que la acumulación de voriconazol en este órgano podría acelerar el efecto hepatolesivo. La materia prima presentó niveles elevados de principio activo en el hígado. La cantidad acumulada se redujo a la mitad en la formulación SM-1:3:0,05 y a una cuarta parte en la formulación SM-1:6:0,025. Las formulaciones que presentaron menos cantidad de voriconazol en el hígado se podrían asociar a una menor incidencia de la toxicidad hepática, lo que podría permitir un aumento en el tiempo de muestreo para su monitorización, actualmente recomendada cada 2-3 días [93].

En los riñones la materia prima y SM-1:3:0,05 obtuvieron niveles semejantes de voriconazol, disminuyéndose con SM-1:6:0,025 la acumulación en este órgano. El efecto local renal es importante en el caso de todas las infecciones diseminadas, ya que, al filtrarse la sangre durante el proceso fisiológico normal, los microorganismos se acumulan en los riñones, infestando el órgano [315,316]. Al conseguir niveles altos de fármaco se facilitaría que se alcanzase la CMI y, por lo tanto, la eliminación de los hongos. A la vista de estos resultados, podría decirse que la materia prima y SM-1:3:0,05 tendrían el mismo efecto local, mientras que SM-1:6:0,025 no sería igual de efectivo a este nivel.

Como ha sido probado previamente y reportado por otros autores, la biodistribución de un fármaco puede ser modificada mediante el uso de sistemas micelares [203,305,317,318]. Teniendo en cuenta de las concentraciones alcanzadas en los órganos ensayados, se podría confirmar que la formulación más efectiva era SM-1:3:0,05, debido a los niveles superiores alcanzados en los pulmones, el órgano diana de la AI. El efecto hepatotóxico se vería reducido debido a la baja concentración de voriconazol en el hígado, mientras que se mantendría el mismo efecto terapéutico que la referencia en los riñones. Además, el valor más alto de AUC_{0-24} , y por tanto de biodisponibilidad, se consiguió con la formulación mencionada. Por estos motivos esta formulación fue la seleccionada para llevar a cabo los estudios de biodistribución con dosis múltiple.

En este ensayo los animales fueron sacrificados 4 horas después de la administración de la última dosis, lo que permitió conocer la biodistribución inmediata del fármaco al inicio del tratamiento (dos dosis) y tras la administración de múltiples dosis (diez dosis). Fue hallado voriconazol en el cerebro en ambos grupos de ratones. Los niveles fueron similares con dos y con diez dosis, lo que hizo pensar que el voriconazol era eliminado del cerebro en un tiempo inferior a 12 horas, ya que este es el intervalo de administración, no produciéndose una acumulación en este órgano a pesar de que se hubieran administrado dosis múltiples. Este resultado confirmó la hipótesis de que el principio activo sí alcanzó el cerebro en el ensayo de biodistribución de dosis única, pero fue eliminado antes de que se produjese el sacrificio de los animales, 24 horas después de la administración de la dosis, por lo que no se detectó voriconazol en el análisis. La formulación micelar obtuvo niveles considerablemente más altos. La aspergilosis cerebral tiene lugar cuando el patógeno alcanza el cerebro, lo que ocurre con cierta frecuencia, y presenta una mortalidad cercana al 100% [18]. Una pobre penetración de antifúngico en el cerebro conlleva un pronóstico adverso de la enfermedad [13,319]. Por ello, es determinante que el voriconazol alcance el cerebro y se consigan niveles elevados que

permitan inhibir el crecimiento fúngico [76,320]. Las elevadas concentraciones que se alcanzaron con la formulación SM-1:3:0,05 hicieron pensar en un pronóstico más optimista para el tratamiento de la aspergilosis cerebral.

En los pulmones también se encontraron concentraciones mayores de voriconazol con la formulación micelar, confirmando los resultados de dosis única. En este caso sí que se produjo una acumulación de fármaco a medida que se administraron dosis, tanto con la materia prima como con la formulación micelar. El efecto antifúngico conseguido por la formulación SM-1:3:0,05 en los pulmones, órgano diana de la AI, sería mayor que con la materia prima.

Los niveles hepáticos fueron muy similares durante el primer día. En la observación visual de los hígados, los órganos de los ratones tratados con ambas formulaciones presentaron un color más oscuro que los del grupo control. Esto podría ser debido a la respuesta inflamatoria producida por el voriconazol [308,310]. Los hígados del grupo referencia presentaron un color más intenso y aspecto sanguinolento, lo que hizo pensar que la inflamación fue superior. Tras la administración de diez dosis, el voriconazol comenzó a acumularse en el hígado de los ratones tratados con la materia prima, mientras que con la formulación micelar se mantuvieron los niveles prácticamente constantes. Las diferencias entre los hígados fueron más evidentes. Los del grupo de la formulación micelar fueron muy similares a los de los controles, un color ligeramente más claro, posiblemente producido por cierto daño hepático. No obstante, los ratones del grupo referencia presentaron hígados de un color muy claro y con gránulos en su interior, probablemente debido a la presencia de células inmunitarias [308].

Los riñones obtuvieron niveles muy similares en los dos grupos tras la administración de dos dosis. Sin embargo, la acumulación en este órgano fue ligeramente superior con la formulación micelar tras la administración de diez dosis, por lo que el efecto antifúngico sería superior.

Las mejoras en la farmacocinética y una biodistribución más selectiva a los órganos más afectados por la infección podrían incrementar la eficacia del tratamiento [246]. La formulación que presentó las características más adecuadas fue SM-1:3:0,05. Esta formulación micelar sería un buen candidato para llevar a cabo el tratamiento de la AI.

Discusión



La finalidad de este trabajo era el desarrollo de sistemas micelares de liberación rápida de voriconazol para un tratamiento de la AI más eficaz y seguro. Para ello se formularon múltiples candidatos y, mediante los ensayos realizados, se fueron descartando hasta seleccionar la formulación que presentó las características más adecuadas.

El voriconazol es el tratamiento de elección en AI [280], sin embargo, la mortalidad sigue siendo alta a pesar de la terapia [321,322] y el ratio de respuesta clínica al antifúngico ronda el 60% [14]. Este principio activo presenta baja solubilidad en agua, factor limitante en su eficacia [263,323]. Estos problemas pueden ser resueltos mediante el desarrollo de nuevas formulaciones como las dispersiones sólidas [82,324], una de las estrategias más utilizadas para incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de principios activos poco hidrosolubles [153,249,325,326]. Los sistemas micelares son un tipo de dispersión sólida compuestos por uno o varios principios activos, un vehículo y un surfactante o mezcla de surfactantes. Los tensoactivos aumentan la humectabilidad de la formulación y disminuyen la recristalización de los principios activos, lo que incrementa su velocidad de disolución [156,327]. Además, tienen la propiedad de formar micelas [328,329], que aportan ventajas como la mejora de la solubilidad y la velocidad de disolución de principios activos hidrófobos, el aumento de la biodisponibilidad, la modificación de la biodistribución y la atenuación de la toxicidad [203,204,330]. Por tanto, se decidió emplear este procedimiento para solventar la problemática asociada al voriconazol.

Se desarrollaron varios métodos analíticos para la cuantificación del voriconazol, que pueden clasificarse en dos tipos: métodos espectrofotométricos y método de HPLC. En los primeros se utilizó una adaptación matemática que, mediante la medida de la curvatura del espectro, permitió mejorar la selectividad y sensibilidad del método, la espectroscopía de segunda derivada [211,212]. Fueron utilizados para analizar las muestras de los ensayos *in vitro*, mientras que el método de HPLC se usó para el análisis de las muestras biológicas. Se realizó una validación de todos los métodos analíticos utilizados, validándose por separado los métodos espectrofotométricos con cada uno de los medios de disolución con los que se trabajó. Todos los métodos demostraron tener características adecuadas de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango y robustez.

Mediante el método de evaporación del solvente se elaboraron dispersiones sólidas y sistemas micelares con diferentes excipientes con los que se tenía experiencia previa. Los ensayos de disolución permitieron escoger los componentes más idóneos. Estos fueron manitol, utilizado como vehículo, y polisorbato 80, un tensoactivo no iónico. Mediante

nuevos ensayos de disolución se seleccionaron las proporciones de excipientes con las que se iba a trabajar.

Elegidos los candidatos, se realizó un estudio de disolución de todos ellos en medios con diferentes pHs para conocer sus curvas de disolución. Se estudiaron también los perfiles de la materia prima, la formulación recristalizada, las mezclas físicas y las dispersiones sólidas sin surfactante. En todos los casos la velocidad de disolución disminuyó a medida que aumentó el pH, fenómeno ya conocido [222]. Las mismas formulaciones fueron sometidas a los ensayos de SEM, difracción por rayos X y DSC para ser caracterizadas y conocer el estado físico del voriconazol dentro de cada una de ellas.

El voriconazol recristalizado exhibió perfiles de disolución lentos en todos los medios en comparación con la materia prima. Sus microfotografías mostraron cristales geométricos y el ensayo de rayos X reveló un elevado grado de cristalinidad. Sin embargo, su valor de entalpía de fusión no fue tan alto como cabría esperar.

Las mezclas físicas mostraron perfiles más rápidos que la materia prima. Este hecho se debió a que las partículas de voriconazol estaban adsorbidas en la superficie del manitol, lo que evitó que se aglomerasen al entrar en contacto con el medio de disolución aumentándose la superficie de contacto [331].

En las dispersiones sólidas, el voriconazol pudo sufrir cambios en su estructura durante el proceso de fabricación, pasando a un estado más amorfo [268]. Este hecho, unido a la mayor superficie de contacto de sus partículas por estar adsorbidas sobre el vehículo, se puso de manifiesto a través de perfiles de disolución más rápidos en la formulación DS-1:6. Sin embargo, las curvas de DS-1:3 fueron más lentas de lo esperado, llegando a caer por debajo de la de la materia prima en el medio con pH 6,8, lo que hizo pensar que el voriconazol pudo haber sufrido una cristalización durante el proceso de fabricación. Los resultados de los ensayos de caracterización confirmaron esta sospecha. Con la formulación DS-1:6 se obtuvieron los resultados esperados en el ensayo de DSC, una disminución de la temperatura de fusión y una entalpía también menor que la de la materia prima, corroborando la menor cristalinidad del voriconazol. La formulación DS-1:3 manifestó una temperatura de fusión menor que la materia prima, pero su valor de entalpía de fusión fue muy semejante al de la referencia. El proceso de cristalización implica una reordenación de las moléculas del material, cuya capacidad de movilidad puede verse facilitada por la presencia de un medio líquido [275,332]. El proceso de fabricación de DS-1:3 se realizó en dos etapas. En la primera, el principio activo se disolvió en etanol a concentración de saturación. Esta solución fue

adsorbida sobre el vehículo y el solvente fue eliminado por evaporación. En el segundo paso que se llevó a cabo, una segunda solución saturada fue adsorbida sobre las partículas de manitol con voriconazol obtenidas previamente. En ese momento el voriconazol pasó a estar en un estado supersaturado pudiendo producirse la cristalización [155,273], además, las moléculas de voriconazol adsorbidas previamente sobre el manitol podrían actuar como núcleos cristalinos [274]. Al estar en presencia de un medio líquido, las moléculas del principio activo ganaron movilidad, sufriendo una reordenación y dando lugar al crecimiento de los cristales [276,333].

Los sistemas micelares mostraron perfiles de disolución rápidos, sin grandes diferencias entre ellos. La presencia del tensoactivo en las formulaciones incrementó la humectabilidad de las partículas, lo que aceleró el proceso de disolución [164,327,334]. Las microfotografías de estas formulaciones evidenciaron diferentes morfologías superficiales en función de la cantidad de surfactante. A medida que aumentó la proporción de tensoactivo, las superficies de las partículas se mostraron primero rugosas, a continuación, con fibrillas de Tween 80 y, por último, recubiertas por una película fina y lisa. En el ensayo de DSC se alcanzaron temperaturas de fusión más bajas que en las demás formulaciones y los valores de entalpía dependieron, nuevamente, de la proporción de surfactante. Las formulaciones con más surfactante obtuvieron valores de entalpía más bajos. Valores bajos de temperatura y entalpía de fusión indican un estado más amorfo del principio activo [157,335]. Sin embargo, estos cambios en el estado físico del voriconazol entre los distintos sistemas micelares no fueron relevantes en sus velocidades de disolución, por lo que se seleccionaron las formulaciones con menor cantidad de tensoactivo de cada una de las proporciones de vehículo (SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025), ya que los surfactantes pueden dar lugar a irritación de la mucosa gástrica y cierta toxicidad a grandes dosis [336-338]. Los polisorbatos en general, y entre ellos el Tween 80, están considerados como tensoactivos seguros por su baja toxicidad y su grado de biodegradación [209,339]. También hay que destacar el hecho de que no existieron grandes diferencias entre los resultados de los ensayos de caracterización de los sistemas micelares, independientemente de la proporción de manitol, cosa que sí ocurría con las dispersiones sólidas. En DS-1:3 se producía una cristalización parcial del principio activo debido al doble paso de disolución del voriconazol y evaporación del solvente realizado durante el proceso de fabricación. Los sistemas micelares con esta proporción de vehículo también fueron elaborados en dos etapas y, a pesar de ello, no ocurrió la cristalización del principio activo. Esto se debió a que el surfactante previno dicha cristalización, dando lugar

así al voriconazol en estado amorfo. Es más, los tensoactivos mejoran tanto el perfil de disolución como la estabilidad física y química del principio activo y pueden incrementar la miscibilidad entre la sustancia activa y el vehículo reduciendo así la recristalización [155].

Se realizaron ensayos de sensibilidad *in vitro* para comprobar en qué grado afectaba la formulación a la CMI del voriconazol. Las pruebas se hicieron con hongos filamentosos del género *Aspergillus* y hongos levaduriformes del género *Candida*. Se utilizaron dos métodos para llevar a cabo el ensayo, el de microdilución y el de difusión. En todos los casos, las CMIs obtenidas con los sistemas micelares fueron iguales o menores que las de la materia prima. Al entrar en contacto los sistemas micelares con el medio acuoso, el Tween 80 formó micelas que contenían voriconazol en su interior (CMC = 0,0150 mM) [209]. Las micelas tienen la propiedad de atravesar las membranas biológicas fácilmente, por lo que su entrada en las células fúngicas se vio mejorada, incrementándose, por tanto, la captación del principio activo. Al penetrar una mayor cantidad de antifúngico en el interior celular, se produjo la inhibición del crecimiento con una menor concentración de fármaco en el medio. Este hecho se tradujo en valores de CMI más pequeños en los sistemas micelares que en la materia prima [340,341]. Otro factor que pudo ayudar en la disminución de las CMIs fue la evasión de los mecanismos de defensa de las células fúngicas ante elementos tóxicos. Estas células poseen bombas de eflujo, que son proteínas transmembrana encargadas de expeler diferentes moléculas al exterior, evitando así que se acumulen sustancias dañinas y alcancen niveles letales [143-145]. Las bombas se activan al reconocer el sustrato tóxico, que es expulsado [146-148]. En las nuevas formulaciones, al encontrarse el voriconazol encapsulado en el interior de las micelas, se evitaría su reconocimiento por las bombas de eflujo y, por tanto, permanecería en el interior de la célula posibilitándose la unión con su diana, la lanosterol 14 α -desmetilasa, e impidiendo el crecimiento fúngico [68,286,342]. La obtención valores de CMI más bajos es un resultado esperanzador, especialmente en todas las cepas de *A. fumigatus*, ya que esta especie es la principal causante de la AI [5,285].

Se determinaron los perfiles farmacocinéticos de las formulaciones SM-1:3:0,05 y SM-1:6:0,025, utilizando la materia prima como referencia, igual que anteriormente. Para ello, se trabajó con ratas a las que se les administró por vía oral una dosis única de 40 mg/kg [227,343] y se tomaron muestras de sangre en los tiempos fijados. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de la dosis [344] y se extrajeron sus cerebros, pulmones, hígados y riñones para analizar la concentración de voriconazol que contenían y así determinar la biodistribución tras una única dosis. Para evaluar la

biodistribución tras la administración de múltiples dosis se utilizaron ratones, a los que se les cambió el agua por zumo de pomelo diluido al 50% para ralentizar el metabolismo del voriconazol y obtener niveles detectables en los órganos [239,345-347]. A estos animales se les administraron por vía oral dosis de 30 mg/kg cada 12 horas [241], ya que es la posología empleada en los pacientes [77,348-350]. La mitad de los ratones de cada grupo se sacrificaron tras recibir dos dosis de tratamiento y el resto de los animales fueron sacrificados tras la administración de diez dosis. En este caso el sacrificio se llevó a cabo 4 horas después de la administración de la última dosis [235,245].

En los ensayos de disolución y caracterización los dos sistemas micelares utilizados para los estudios *in vivo* presentaron propiedades similares, tanto en los perfiles de disolución como en el grado de cristalinidad del voriconazol. Sin embargo, las diferencias entre sus perfiles farmacocinéticos fueron notables. La formulación SM-1:6:0,025 obtuvo su t_{max} a las 8 horas, mientras que el t_{max} de SM-1:3:0,05 fue 6 horas y el de la materia prima fue 4 horas. Los resultados de biodisponibilidad, expresados mediante los valores de AUC_{0-24} , también fueron diferentes entre ambos sistemas micelares. La formulación que presentó una mayor biodisponibilidad fue SM-1:3:0,05, que mostró concentraciones plasmáticas altas de voriconazol en los tiempos ensayados. La formulación SM-1:6:0,025, pese a la desigualdad con las otras curvas farmacocinéticas, finalmente obtuvo un valor de AUC_{0-24} semejante al de la materia prima e inferior al de SM-1:3:0,05. El manitol se absorbe de forma lenta e incompleta, por lo tanto, permanece en el intestino e incrementa la presión osmótica, atrayendo agua del organismo hacia el interior del lumen. Esto provocó un retraso en la absorción del voriconazol, generando la consecuente disminución de la biodisponibilidad [289,290,351]. Por esta razón, a medida que aumentó la cantidad de manitol presente en las formulaciones se incrementó el valor de t_{max} . En SM-1:3:0,05, el descenso en el AUC_{0-24} no fue demasiado drástico, ya que la cantidad de manitol contenida en la formulación era lo suficientemente pequeña, consiguiendo mejorar la biodisponibilidad frente a la materia prima. Sin embargo, con SM-1:6:0,025 esta reducción en la biodisponibilidad sí se hizo notable. También su t_{max} sufrió un retraso considerable por la elevada proporción de manitol. Debido a estos resultados se seleccionó la formulación SM-1:3:0,05 como candidata para continuar la investigación. Existen resultados de biodistribución con dosis única de la formulación SM-1:6:0,025 porque los animales utilizados para el ensayo fueron los mismos que en el de farmacocinética.

En la gran mayoría de los casos, la AI está ocasionada por la entrada de esporas del hongo al organismo mediante inhalación, siendo los pulmones el órgano más afectado [301,352,353]. Los microorganismos se acumulan en el tejido pulmonar, alcanzando concentraciones elevadas de UFCs y ocasionando daño, hasta que la infección se disemina [354,355]. Por lo tanto, es importante alcanzar concentraciones altas de voriconazol en los pulmones para conseguir una mayor eficacia antifúngica a este nivel y facilitar la eliminación de los hongos [13,129,245,302]. Durante el proceso fisiológico normal, la sangre pasa por los riñones para ser filtrada y eliminar así productos tóxicos [356-358]. Una vez la infección se ha diseminado, al pasar la sangre por los riñones, los hongos se acumulan en este órgano, infestándolo [359]. Cuanto mayor sea la concentración de voriconazol en los riñones, más se aumentará el efecto local y más fácil será acabar con los microorganismos. Con cierta frecuencia, los hongos alcanzan el cerebro produciéndose la aspergilosis cerebral [360-362]. Si esto ocurre lo más probable es que se produzca la muerte del paciente, ya que la tasa de mortalidad de la aspergilosis cerebral es cercana al 100% [18,319]. Si se consigue alcanzar niveles elevados de voriconazol en el cerebro, se facilitará la eliminación de los hongos y se aumentarán las probabilidades de supervivencia del paciente [76,320,363].

El voriconazol es un fármaco hepatotóxico, en el que ha sido demostrada una dependencia entre niveles plasmáticos y toxicidad [79,313,314]. Actualmente no se conoce exactamente el mecanismo por el que se produce el daño hepático, pero ha sido asociado a la disfunción de los hepatocitos por el estrés oxidativo ocasionado por la asociación directa del voriconazol con estas células [308]. La acumulación de grandes cantidades de voriconazol en el hígado podría incrementar las lesiones producidas en este órgano.

Por lo tanto, el resultado deseado en la biodistribución sería alcanzar niveles elevados de voriconazol en pulmones, riñones y cerebro y concentraciones bajas en el hígado. De esta forma, se conseguiría una mejor eficacia del tratamiento con una menor incidencia de efectos adversos.

En el ensayo de dosis única no se detectaron niveles de voriconazol en el cerebro. Sin embargo, en los ensayos de dosis múltiple sí se localizó. Las concentraciones obtenidas con la administración de dos y diez dosis fueron semejantes, por lo que se concluyó que el voriconazol fue eliminado del cerebro en menos de 12 horas, evitándose su acumulación. Esto también explicaba por qué no se halló principio activo en el ensayo de dosis única, ya que la muestra se tomó 24 horas después de la administración de la dosis, por lo que el voriconazol habría sido eliminado del órgano. Con la formulación SM-1:3:0,05 se obtuvieron niveles

considerablemente más altos que con la materia prima, lo que hizo pensar en un mejor pronóstico ante el tratamiento de una aspergilosis cerebral [364].

En los pulmones se obtuvieron concentraciones más altas con SM-1:3:0,05 que con la materia prima desde la primera dosis. Aunque ambas formulaciones se acumularon en el tejido pulmonar a medida que se fueron administrando dosis, en todos los casos los niveles de voriconazol fueron más altos con la formulación micelar, por lo que la eficacia sería mayor.

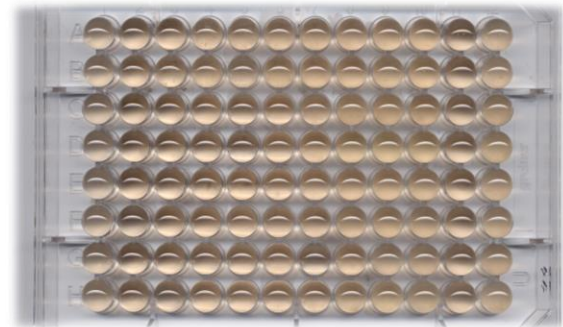
En todos los animales se detectó voriconazol en el hígado. Este principio activo sufre metabolismo hepático, por lo que habrá niveles en este órgano con todas las formulaciones hasta su completa eliminación del organismo [99,365]. Tras la administración de una dosis, la formulación que obtuvo menores niveles en el hígado fue SM-1:6:0,025, sin embargo, esta formulación ya había sido descartada por sus malos resultados de biodisponibilidad. SM-1:3:0,05 mostró también concentraciones menores que la materia prima, de aproximadamente la mitad. Aunque estas diferencias no fueron tan pronunciadas en los ensayos de dosis múltiple, se observó que, a lo largo del tiempo, apenas se produjo acumulación con los sistemas micelares en el hígado, lo que sí que ocurría con la materia prima. Además, se hizo un control visual de los hígados de los ratones y se observó que los de la materia prima parecían haber sufrido daño, pues presentaron un color demasiado claro y gránulos en su interior, probablemente debido a la presencia de células inmunitarias [308].

En los riñones no hubo grandes diferencias. Tras la administración de las primeras dosis, los niveles fueron prácticamente iguales con la materia prima y con SM-1:3:0,05. Después de haber administrado diez dosis se observó que las concentraciones de la formulación micelar fueron ligeramente superiores que las de la referencia, lo que hizo pensar que a lo largo del tiempo se acumularía en mayor medida con la nueva formulación, consiguiéndose una eficacia mayor.

Por lo tanto, se comprobó que la biodisponibilidad se puede mejorar mediante el uso de sistemas micelares. En este trabajo se alcanzaron valores mayores de AUC_{0-24} con la nueva formulación SM-1:3:0,05, lo cual, unido a las CMI's más bajas obtenidas con *A. fumigatus*, representó un incremento en el valor del parámetro AUC/CMI , índice que cuantifica la relación PK/PD y permite predecir el resultado clínico del tratamiento. El aumento en el valor de este ratio indica a una mayor eficacia terapéutica del tratamiento [366,367]. Además, las diferencias en la biodistribución hicieron pensar en mejoras en el efecto local obtenido a nivel cerebral, pulmonar y renal, no solo por las mayores concentraciones obtenidas, sino también porque, al presentar menores valores de CMI, la inhibición del crecimiento fúngico se vería

mejorada [129,368]. Asimismo, la toxicidad hepática sería menor con la formulación micelar, ya que se redujo la acumulación de voriconazol en el hígado [309].

Conclusiones



De la realización de este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Se desarrollaron, optimizaron y validaron dos tipos de métodos analíticos para cuantificar el voriconazol: HPLC y espectrofotometría de segunda derivada, validándose por separado los métodos espectrofotométricos con cada uno de los medios de disolución con los que se trabajó *in vitro*. El método de HPLC se utilizó para analizar las muestras biológicas.
2. Se elaboraron nuevas formulaciones de voriconazol de rápida disolución mediante la preparación de dispersiones sólidas y sistemas micelares, seleccionando manitol como vehículo hidrófilo y polisorbato 80 como agente formador de micelas.
3. Los ensayos de disolución permitieron seleccionar las proporciones óptimas de excipientes. Los perfiles obtenidos en medios con tres pHs diferentes aportaron información sobre el comportamiento de las formulaciones y sus velocidades de disolución en medios biorrelevantes.
4. El voriconazol se encontraba en un estado mayormente amorfo en los sistemas micelares desarrollados. La presencia del surfactante evitó la recristalización del principio activo durante el proceso de fabricación. En las formulaciones con mayor proporción de tensoactivo el voriconazol presentó menor grado de cristalinidad.
5. Los sistemas micelares obtuvieron valores más bajos de CMI que la materia prima en las cepas ensayadas de *Aspergillus fumigatus*. La formación de micelas facilitó la entrada del fármaco en el interior de las células fúngicas y evitó que el voriconazol fuera expulsado por las bombas de eflujo.
6. La formulación SM-1:3:0,05 mostró la mayor biodisponibilidad, y junto con la disminución de las CMIs en *A. fumigatus*, representó una mejora en la relación PK/PD, lo que permitió considerar una mayor eficacia del tratamiento terapéutico de la aspergilosis invasora.

7. Los estudios de biodistribución mostraron que con el sistema micelar seleccionado se obtenían concentraciones mayores de voriconazol en cerebro, pulmones y riñones que con la materia prima, resultado que hizo pensar en un efecto antifúngico mejorado en estos órganos.
8. La acumulación de voriconazol en el hígado se redujo con la nueva formulación micelar, resultado que se consideró prometedor para disminuir la hepatotoxicidad asociada a este antifúngico.

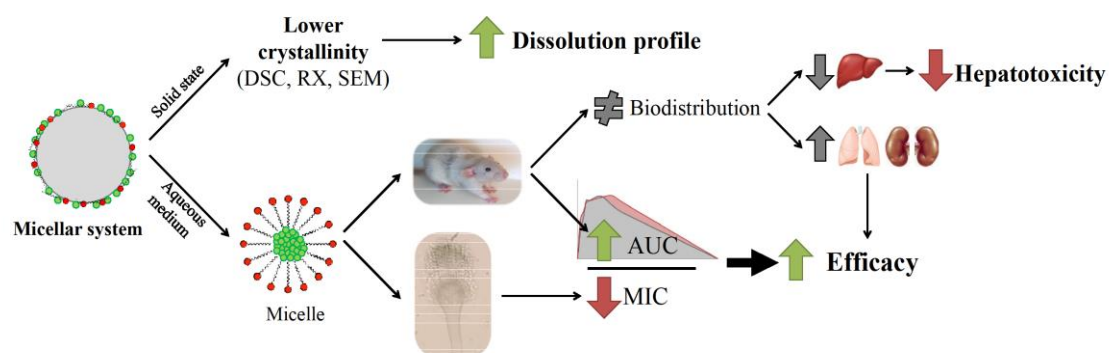
Publicación



Mejora de la relación farmacocinética/farmacodinamia en el tratamiento de la aspergilosis invasora con voriconazol. Reducción de la toxicidad del principio activo mediante la formulación de formas de liberación rápida.

Improvement of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole. Reduced drug toxicity through novel rapid release formulations.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 193 (2020) 111119





Improvement of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole. Reduced drug toxicity through novel rapid release formulations



Teresa Gallego-Arranz^a, Alba Pérez-Cantero^b, Carlos Torrado-Salmerón^a, Víctor Guarnizo-Herrero^a, Javier Capilla^b, Santiago Torrado-Durán^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain

^b Unit of Microbiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili and Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Voriconazole
Invasive aspergillosis
Micellar system
Dissolution
Hepatic toxicity
Pharmacokinetic
Biodistribution

ABSTRACT

Voriconazole (VCZ) is currently the first-line treatment for invasive aspergillosis, although the doses are limited by its poor solubility and high hepatic toxicity. The aim of this study was to develop a solid self-dispersing micellar system of VCZ to improve the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship and reduce hepatotoxicity. In this work, solid micellar systems of VCZ are formulated with different polysorbate 80 ratios using mannitol as a hydrophilic carrier. The novel micellar systems were characterized by scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), differential scanning calorimetry (DSC) and dissolution studies. Self-dispersing micellar systems reduced VCZ crystallinity, leading to an improvement in its dissolution rate. The *in vitro* susceptibility test also revealed that the most common microorganisms in invasive aspergillosis exhibited low minimum inhibitory concentration (MIC) values for micellar systems. Pharmacokinetic studies indicated an improvement in bioavailability for MS-1:3:0.05, and changes in its biodistribution to different organs. MS-1:3:0.05 showed an increased concentration in lungs and a significant decrease in VCZ accumulated in the liver.

1. Introduction

Aspergillosis is an opportunistic fungal infection caused by *Aspergillus* spp. which produces allergic and infectious diseases. The main species triggering this pathology in humans is *A. fumigatus*. The infection is usually acquired by inhalation and primarily affects the lung tissue. However, hematological dissemination may occur in immunocompromised patients – particularly neutropenic patients – leading to invasive aspergillosis (IA) which provokes clinical manifestations such as cough, dyspnea, chest pain, fever, skin lesions and neurological symptoms [1]. Voriconazole (VCZ) is currently the first-line treatment for IA; however the mortality associated to IA is still high despite this therapy [2] and the clinical response rate to VCZ is around 60% [3].

VCZ, (2*R*, 3*S*)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoro-4-pyrimidinyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-2 butanol, is a second-generation broad-spectrum triazole antifungal agent that disrupts ergosterol biosynthesis in the cell and affects the integrity and functionality of the membrane [4]. It is classified as BCS class II (Biopharmaceutics Classification System)

due to its low water solubility (0.7 mg/mL) and high permeability [5]. Its solubility limits its effectiveness, although this problem can be solved by new pharmaceutical formulations [6]. Solid dispersions (SDs) are among the most widespread strategies applied to improve the solubility and bioavailability of drugs with low water solubility [7]. The presence of surfactants above their critical micelle concentration (CMC) leads to the spontaneous formation of micelles containing the active pharmaceutical ingredient (API), thus increasing its solubility [8]. Several authors have developed micellar systems (MSs) by adding surfactants to SDs to improve drug solubility [8–10].

The area under the curve/minimum inhibitory concentration (AUC/MIC) ratio is an expression of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship, which is a way of relating drug exposure with antifungal efficacy against a microorganism [11]; this parameter therefore provides information about its clinical efficacy. The solubility, stability and bioavailability of hydrophobic drugs can be increased by formulating MSs, which produce higher AUC values. MSs also enhance permeability, enabling a greater uptake of drug-loaded micelles by cells and reducing their MICs [12,13]. Coupled with an increase in the AUC,

* Corresponding author.

E-mail address: torrado2@ucm.es (S. Torrado-Durán).

this would lead to a higher PK/PD value and hence improve the efficacy of the treatment.

VCZ is associated with adverse events including visual disturbance, hepatotoxicity and neurotoxic reactions such as confusion or encephalopathy. Hepatic toxicity is of particular concern, and can lead to the suspension of the treatment [11,14]. As MSs have been demonstrated to decrease toxicity and alter biodistribution [15,16], they could be used in formulations to reduce levels of VCZ in the liver and thus lower toxicity.

The objective of this work was to develop immediate release VCZ MSs with mannitol and Tween 80 to obtain a VCZ structure with a partially amorphous form of VCZ incorporated in a hydrophilic carrier for the treatment of IA. The MSs were evaluated based on physico-chemical properties and drug release patterns. Finally, pharmacokinetic and biodistribution studies allowed us to select a formulation with high efficacy and low toxicity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

VCZ (Normon, Madrid, Spain), Pearlitol® 200SD (Mannitol, Roquette®, France), Tween 80 (polysorbate 80 NF, Fagron®, Belgium). All other reagents were of pharmaceutical grade or higher.

2.2. Preparation of formulations

SD-1:6 was prepared by dissolving 50 mg of VCZ in 0.36 mL of ethanol and adsorbed on 300 mg of mannitol by manual agitation. The formulation was dried at 40 °C for 24 h. SD-1:3 was formulated by the same method but varying the proportion: 25 mg of VCZ were dissolved in 0.18 mL, adsorbed on the mannitol by manual agitation and dried at 40 °C for 24 h. MSs were obtained with the same procedure, but the corresponding amount of Tween 80 was mixed with the ethanol before dissolving the VCZ. The next steps were the same as for the production of SDs. Once dry, the SDs and MSs were passed through a 0.297 mm sieve. Physical mixtures (PMs) were obtained by mixing the corresponding quantity of VCZ and carrier. All formulations are summarized in Table 1.

The formulations were stored in a desiccator with silica gel, protected from light and moisture at below 25 °C. All formulations were used within a maximum period of one week.

2.3. Characterization of the formulations

2.3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were fixed on double-sided adhesive tape, dried under vacuum (5×10^{-5} mbar), coated with a graphite layer and sputtered with a thin gold-palladium layer. A turbomolecular pumped coater (Quorum Q150TE) and a sputter coater (Quorum Q150RS) were used to prepare the samples. The images were captured with a Jeol JSM-6400® scanning electron microscope operated at an acceleration voltage of

20 kV.

2.3.2. X-ray powder diffraction (XRPD)

The assay was performed with an X-ray diffractometer (Philips X'Pert-MPD, CAI Difracción Rayos X, Farmacia, UCM). Monochromatic CuK α radiation ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) was used to irradiate the samples. The diffraction profile was measured from 5° to 50° using a 2 θ step size of 0.04° and 1 s per step. The voltage and intensity were 30 kV and 30 mA, respectively.

2.3.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed with an automatic thermal analyzer system (Mettler Toledo TC 15, TA controller). Temperature was calibrated using Indium Calibration Reference Standard (transition point: 156.60 °C). Samples were placed in aluminum pans (containing the equivalent of 2 mg of VCZ in each formulation), sealed and heated from 25 °C to 225 °C at a rate of 10 °C/min under constant purging of dry nitrogen at 30 mL/min. An empty sealed aluminum pan was used as a reference.

2.3.4. In-vitro drug release

The *in vitro* release studies were performed using ERWEKA® DT80 USP apparatus II (paddle method) dissolution equipment. Experiments were done at 37.0 ± 0.5 °C, with a rotation speed of 50 rpm and 500 mL of dissolution medium. 0.1 M hydrochloric acid, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8 were used as dissolution media, selected according to FDA guidelines and previously used by Miletic et al. [17]. Each formulation was tested in quadruplicate, with an amount equivalent to 10 mg of VCZ. At set intervals, 5 mL samples were removed and the medium was replenished. The samples were then filtered through a 0.45 μm membrane filter (Acrodisc®, Ann Arbor, USA). The VCZ in the media was quantified by second-derivative ultraviolet spectrophotometry at 270.5 nm, applying the Savitzky-Golay algorithm using a V-730 UV-vis spectrophotometer (Jasco®, Madrid, Spain). Calibration curves were built for each medium, with coefficients of determination $r^2 > 0.999$, for a range of concentrations between 0.5 and 25.0 $\mu\text{g/mL}$. Calibration curve formulas for pH 4.5 and 6.8 were $y = 0.1737x + 0.0044$ (ng/mL) and $y = 0.1740x - 0.0178$ (ng/mL) respectively.

2.4. Antifungal susceptibility testing for the new formulations

2.4.1. Strains and inocula

A total of eight strains of *Aspergillus* spp. were obtained from Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. *A. calidoustus* ($n = 2$), *A. terreus* ($n = 1$), *A. flavus* ($n = 2$) and *A. fumigatus* ($n = 3$) were included in the study.

Inocula were obtained after culturing the strains on potato dextrose agar (PDA) at 35 °C until sporulation occurred. The plates were then flooded with saline solution and gently scraped. The fungal suspension was filtered twice through sterile gauze to remove hyphae and clumps of agar, and adjusted to the desired concentration by counting with a

Table 1

Preparation method and composition of the formulations.

Formulation	Preparation method	Voriconazole (mg)	Mannitol (mg)	Tween 80 (mg)
VCZ	–	1	–	–
PM-1:3	Physical mixture	1	3	–
PM-1:6	Physical mixture	1	6	–
SD-1:3	Solvent evaporation	1	3	–
SD-1:6	Solvent evaporation	1	6	–
MS-1:3:0.05	Solvent evaporation	1	3	0.05
MS-1:3:0.1	Solvent evaporation	1	3	0.1
MS-1:6:0.025	Solvent evaporation	1	6	0.025
MS-1:6:0.05	Solvent evaporation	1	6	0.05

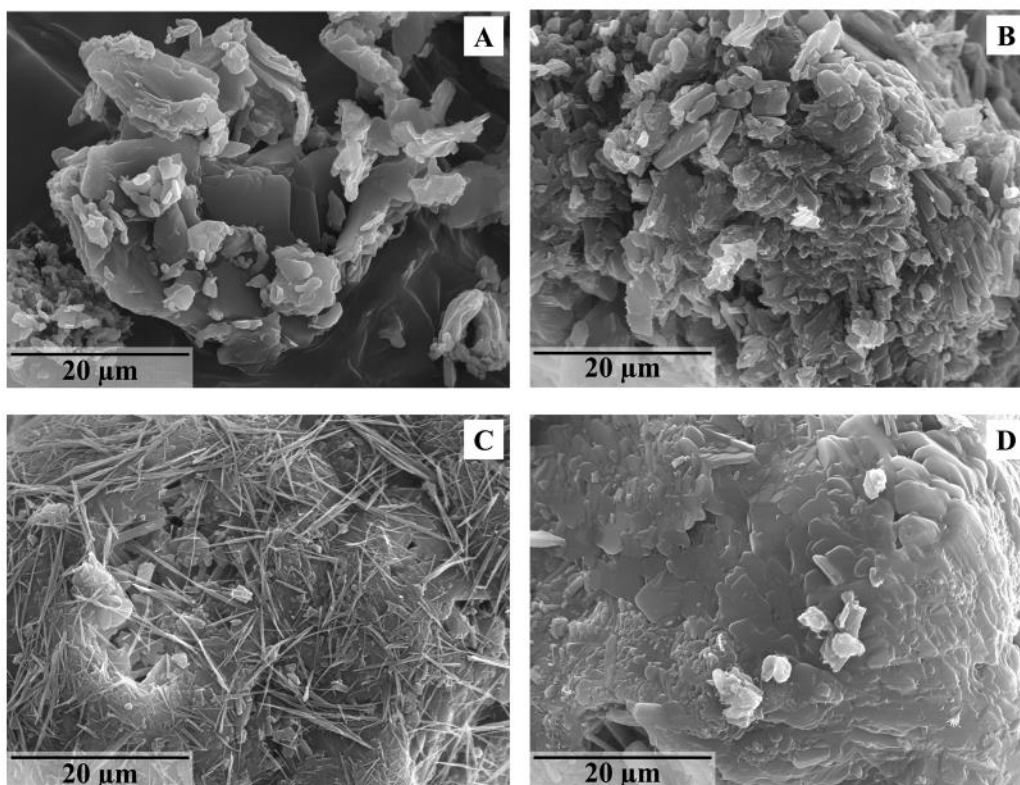


Fig. 1. Micrographs of VCZ raw material (A), MS-1:3:0.05 (B), MS-1:6:0.025 (C) and MS-1:6:0.05 (D). Photographs were taken at a magnification of 2000 \times .

hemocytometer. To verify the viability of the inocula, tenfold dilutions were placed in PDA to determine the colony forming units (CFUs).

2.4.2. Antifungal agents

VCZ raw material, SD-1:3, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 were dissolved in sterile distilled water and vortexed for 1 min at 2000 rpm to allow micelle formation. A two-fold dilution was prepared in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 culture medium (Merc, Germany) with concentrations of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and dispensed with a multichannel pipette into round-bottomed 96-well microdilution plates (100 μL per well). All solutions and dilutions were freshly prepared and used within three days [18].

2.4.3. Antifungal susceptibility testing

In order to determine antimicrobial activity, MICs of VCZ raw material, SD-1:3, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 were obtained by the broth microdilution method following the CLSI M38 3rd ed. document. Microplates were incubated at 35 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h and visually read with the aid of an inverted mirror. MICs were determined as the lowest concentration of test compound that produced no visible growth [4,19].

2.5. In vivo assay: pharmacokinetic study and biodistribution

Male Wistar rats (400–450 g) were used (Criffa S.A., Barcelona, Spain) in all experiments. The animals were housed under standard conditions with water and food *ad libitum*. All animal care procedures were supervised and approved by the Ethics Committee of the University of Alcalá de Henares, Madrid Region, PROEX 041/18 (27/4/2018). The rats were divided into three groups of six animals. The formulations tested were VRC raw material (taken as a reference), MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025. Each group received a single 40 mg/kg dose of VCZ by oral gavage [20] administered as suspensions of the formulations in a 0.75% carboxymethylcellulose sodium solution as a vehicle [9].

2.5.1. Sampling and analysis

A blood sample was collected from each animal in heparinized tubes at the following time points: 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 and 24 h. The samples were centrifuged at 7000 rpm for 15 min to recover plasma from the blood. The animals treated with VCZ raw material, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 were euthanized 24 h after dose administration, and the brain, liver, lungs and kidneys were removed. The organs were weighed and homogenized by adding the same weight of water. All samples were frozen and stored at -20°C until analysis. All analyses were carried out in less than a month.

To extract the VCZ, 200 μL of plasma were vortex-mixed with 500 μL of diethyl ether for 2 min. Nimodipine was used as an internal standard (IS). For the homogenates, 0.2 M of borate buffer (pH 9.0) was added to the samples and vortex-mixed with diethyl ether. The mixtures were centrifuged for 5 min at 4000 rpm and the supernatants were collected and evaporated at 40 $^{\circ}\text{C}$ under vacuum for 30 min (Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA). Solid residuals were redispersed with 400 μL of mobile phase and filtered (Millipore[®] filter, Millex-HV, hydrophilic PVDF 0.45 μm , Cork, Ireland). VCZ was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The method was an adaptation of previously published methods [21,22]. Each sample was analyzed using a Jasco liquid chromatograph (Jasco[®], Tokyo, Japan) equipped with a Waters[®] C18 column (4.6 \times 150 mm; 5 μm). The mobile phase consisted of a 60:40 mixture of methanol and 0.01 M sodium acetate buffer, pH 5.0, pumped at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 50 μL with a UV detection wavelength of 255 nm.

The calibration curve was built following the same extraction method using blank plasma mixed with standard solutions in a range of concentrations between 0.125 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The formula obtained was $y = 56152.01x - 11554.51$ ($r^2 > 0.997$).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the new formulations

3.1.1. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was used to verify the particle size, shape and surface morphology of the formulations. Fig. 1 shows the microphotographs of VCZ raw material (A), MS-1:3:0.05 (B), MS-1:6:0.025 (C) and MS-1:6:0.05 (D). Since this test was carried out on a large number of formulations, PMs, SDs and MS-1:3:0.1 are simply mentioned, and indicated as “data not shown”.

The particles of VCZ raw material (Fig. 1A) displayed irregular forms with both sharp and rounded edges and sizes varying from 10 to 100 μm . Mannitol (data not shown) presented round granules (100–150 μm) covered with a smooth layer. These characteristics give the mannitol good flux properties. Small needle-shaped particles (5–10 μm) were observed attached to the surface.

The PM formulations (data not shown), PM-1:3 and PM-1:6, presented globular particles (100–150 μm) covered with a smooth layer with needle-shaped particles on the surface, similar to those in the mannitol preparation. Small particles of VCZ were adhered to the surface of the mannitol particles. The presence of fluorine atoms in these adhered particles identified them as VCZ.

The SDs (data not shown), SD-1:3 and SD-1:6, were spherical and larger than the particles in the PMs (200–300 μm). They were coated with a rough layer with small pieces of VCZ adhered to the surface during the evaporation of the solvent. Minor amounts of needle-shaped particles were observed on the surface of the carrier.

The surface morphology of the formulations with surfactant, MS-1:3:0.05, MS-1:3:0.1, MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05, differed depending on the concentration of Tween 80. All formulations measured between 200 and 300 μm and presented irregular VCZ particles on the surface, which at first glance appeared to be amorphous or semi-crystalline. MS-1:3:0.05 (Fig. 1B) had a wrinkled surface with small VCZ particles both adsorbed and inside the mannitol granules. MS-1:3:0.1 (data not shown) and MS-1:6:0.025 (Fig. 1C) presented small acicular particles on the surface, which were attributed to the effect of the surfactant. The microphotograph of MS-1:6:0.05 (Fig. 1D) showed a Tween 80 film coating the granules. As the amount of surfactant in the formulations increased, it became more apparent in the microphotographs. The surface first became rougher, then fine needles appeared, and finally a film formed and coated the granules. The presence of surfactant on the surface increases the wettability of the particles and allows a faster dissolution of the formulations [23].

3.1.2. X-ray powder diffraction (XRPD)

This assay was performed to assess the crystallinity of the VCZ in the formulations. Fig. 2A shows the patterns of VCZ raw material, mannitol, PM-1:6, SD-1:6, MS-1:3:0.05, MS-1:3:0.1, MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05.

The diffractogram of VCZ raw material revealed several peaks at the following diffraction angles: 6.94°, 13.82°, 16.54°, 19.86°, 26.14° and 28.02° 2θ . Similar patterns have been reported by other authors [6,24]. These peaks were not very pronounced and had the intensity values of a semicrystalline substance. The XRPD pattern of mannitol identified it as a semicrystalline powder with several broad peaks with moderate intensities (17.1°, 18.62°, 20.14°, 21.06° and 23.22° 2θ). The diffractograms of PMs, PM-1:3 (data not shown) and PM-1:6, showed similar XRPD scans with diffraction peaks typical of VCZ and mannitol standards. VCZ peaks can be seen included in the mannitol peaks in the PM-1:6 curve. The decrease in VCZ crystallinity was attributed to a dilution effect. The fact that VCZ presented peaks at similar diffraction angles to mannitol may be due to the greater difficulty of observing low values of VCZ crystallinity by XRPD.

SD-1:3 (data not shown) and SD-1:6 exhibited intensity peaks at 17.3°, 18.74°, 21.22° and 23.38° 2θ corresponding to mannitol. SDs had

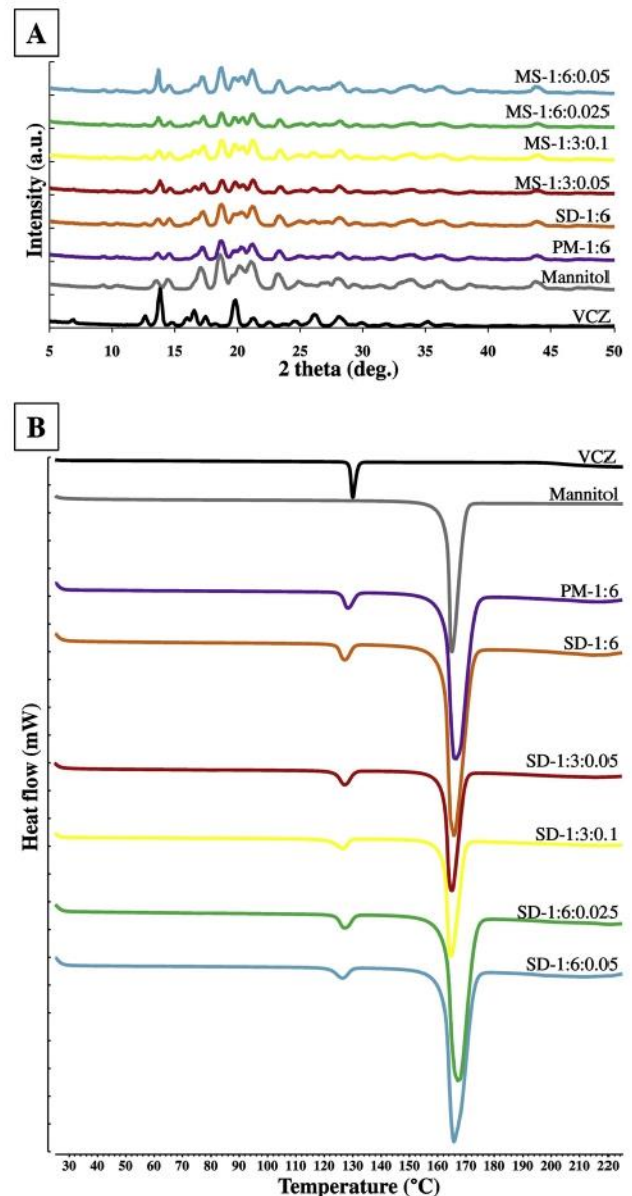


Fig. 2. XRPD patterns (A) and DSC thermograms (B) of VCZ raw material (black), mannitol (grey), PM-1:6 (purple), SD-1:6 (orange), MS-1:3:0.05 (red), MS-1:3:0.1 (yellow), MS-1:6:0.025 (green) and MS-1:6:0.05 (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

no VCZ intensity peaks, indicating that VCZ is incorporated in the mannitol carrier and has a lower crystallinity [25]. As expected, a greater intensity was observed in the mannitol peaks in SD-1:6 than in SD-1:3 as it was present in a higher proportion.

No intensity peaks were observed in the diffraction angles corresponding to VCZ in MS-1:3:0.05 and MS-1:3:0.1. The intensity of the carrier peaks increased with the proportion of polysorbate (MS-1:3:0.1). Similar results were obtained in the MSs with higher amounts of mannitol (MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05). The intensity of the mannitol peaks in MSs containing a larger proportion of surfactant was thus higher than in SD-1:6.

3.1.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC assays were performed to check melting temperatures, enthalpies and changes between formulations and obtain information on the physical state of the formulations. Fig. 2B shows the thermal curves

of VCZ raw material, mannitol, PM-1:6, SD-1:6, MS-1:3:0.05, MS-1:3:0.1, MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05.

VCZ raw material showed a melting peak with an enthalpy of 1341.09 J/g at 130 °C, in agreement with the melting temperatures reported previously [17,24]. The endothermic peak for mannitol occurred at 164.9 °C with an enthalpy of 3982.81 J/g, coinciding with the temperatures reported by other authors [26]. PM-1: 3 and PM-1: 6 showed similar VCZ melting peaks. PM-1:3 (data not shown) evidenced a slight decrease in the crystallinity of VCZ which translates into a lower melting temperature (128.79 °C). A similar melting temperature (128.24 °C) and enthalpy values were observed for PM-1:6.

SD-1:3 and SD-1:6 exhibited slight decreases in their VCZ melting temperatures, with values of 128.1 °C and 127.07 °C. VCZ crystallinity was also lower in both SDs, SD-1:3 (data not shown) and SD-1:6, by up to 78.48% for SD-1:6. A second endothermic peak appeared in all the thermograms at around 165 °C, which was attributed to mannitol.

The presence of surfactant caused lower VCZ melting temperatures in the MSs, with around 127 °C for MS-1:6:0.025 and MS-1:3:0.05. Similar values were observed when the amount of surfactant increased (126.54 °C and 126.5 °C for MS-1:3:0.1 and MS-1:6:0.05 respectively). The enthalpy of the VCZ melting peak was also lower in all cases (1084.35 mJ/mg for MS-1:6:0.025 and 1072.60 mJ/mg for MS-1:3:0.05). The lowest enthalpy values occurred with the highest concentrations of Tween 80, with reductions in VCZ crystallinity of 59.07% for MS-1:3:0.1 and 57.05% for MS-1:6:0.05. These effects were attributed to the presence of surfactant, which reduces VCZ crystallinity [9].

3.1.4. *In vitro* drug release

As the solubility of VCZ is pH-dependent, the dissolution test was performed in three different media: 0.1 M of hydrochloric acid simulating gastric medium, acetate buffer pH 4.5, and phosphate buffer pH 6.8. The dissolution profiles of the different VCZ formulations were tested in the same media by Miletic et al. [17].

The dissolution rate of VCZ raw material decreases as the pH increases. A rapid dissolution rate was observed in simulated gastric fluid in all the formulations, with releases of over 80% at 20 min. The dissolution profile of the VCZ raw material can be seen clearly due to the absence of other components, as this avoids the changes in dissolution produced by the various excipients in commercial formulations.

The PMs showed an improved dissolution rate as VCZ was adsorbed on the surface of the hydrophilic mannitol particles, thus preventing the VCZ particles from agglomerating, thereby increasing their surface area and favoring their wettability [27]. Both PMs, PM-1:3 (data not shown) and PM-1:6, presented similar profiles in the two intestinal media ($82.8 \pm 3.3\%$ and $75.3 \pm 2.8\%$ at 20 min for pH 4.5 (Fig. 3A), and $62.7 \pm 3.0\%$ and $71.6 \pm 3.0\%$ at 20 min for pH 6.8 (Fig. 3B) respectively), indicating that the significant amounts of a hydrophilic carrier such as mannitol in PMs did not influence the dissolution profile in gastric and intestinal media (only PM-1:6 is shown due to their similarity).

The importance of the VCZ:mannitol ratio was evident in the SDs without surfactant. At pH 4.5 and 6.8, SD-1:6 had a faster dissolution rate ($90.6 \pm 1.0\%$ and $71.6 \pm 3.5\%$ at 20 min for pH 4.5 and 6.8 respectively) than VCZ raw material. The SD-1:3 profile (data not shown) at pH 4.5 was slightly faster than VCZ; however, at pH 6.8 the dissolution profile was below VCZ. This supported the results of PRXD and DSC and suggested that VCZ had a higher crystallinity in a SD with low carrier ratios (SD-1:3), which could favor a process of hydrophobic agglomeration [28]. The greater presence of the hydrophilic transporter in SD-1:6 favored the incorporation of VCZ particles in the carrier, improved its wettability, and enhanced the dissolution rate of VCZ (see Fig. 3A and B).

The dissolution profiles increased in all cases when surfactant was added to the formulations. There were no differences between MSs profiles with a lower carrier proportion (MS-1:3:0.05 and MS-1:3:0.1), which at 10 min were $91.2 \pm 3.8\%$ and $94.0 \pm 1.8\%$ at pH 4.5 and

$75.9 \pm 5.0\%$ and $84.0 \pm 3.0\%$ at pH 6.8 respectively. The comparison of MS-1:3:0.05 and SD-1:3 revealed a significant increase in the dissolution profile in both media (see Fig. 3A and B). The DSC data showed a decline in the crystallinity of VCZ as the proportion of surfactant increased, causing faster dissolution. The presence of Tween 80 on the surface of the formulation may improve its wettability and favor the formation of micelles, which also increased VCZ dissolution [9].

The MSs with the highest proportion of carrier (MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05) had faster dissolution profiles at pH 4.5 and 6.8 (see Fig. 3A and B respectively). However, the presence of large amounts of surfactant (MS-1:6:0.05) did not modify the dissolution profile, so similar dissolution percentages were obtained at 10 min in MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05 at pH 4.5 ($95.6 \pm 0.6\%$ and $96.0 \pm 1.8\%$ respectively) and pH 6.8 ($81.1 \pm 5.5\%$ and $84.1 \pm 3.7\%$ respectively). After an initial period (5 min), the differences between the dissolution rates in all MSs (MS-1:3:0.05, MS-1:3:0.1, MS-1:6:0.025 and MS-1:6:0.05) were not significant in the three dissolution media, although the amount of surfactant could play a crucial role in the gastro-intestinal tract, since dissolution is followed by absorption, which is promoted by surfactants [27].

No degradation was observed at the different pHs in either the VCZ raw material or in any of the formulations at the end of the dissolution studies. The results of the PXRD, DSC and dissolution tests are promising for MSs. MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 achieved a reduction in API crystallinity and an increase in dissolution rate without having large amounts of surfactant in the formulations. Future stability studies will be required to assess the possible degradation of these MSs.

3.2. Antifungal susceptibility testing

This test was performed on the formulations that showed the most promising results in the characterization and dissolution studies, namely MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025. VCZ raw material and SD-1:3 were also tested to compare their MICs with the new formulations, and the MICs are shown in Table 2.

In all cases the results obtained with SD-1:3 were the same as with the VCZ raw material. The MSs had lower MIC values in all *A. fumigatus* strains, while no differences were observed for *A. calidoustus* (FMR 13556 and FMR 13557) or *A. terreus* (FMR 11823). Only MS-1:6:0.025 had a lower MIC value than the other formulations against strain FMR 8760 of *A. flavus*. The presence of surfactant in MSs with low (MS-1:3:0.05) and high (1:6:0.025) mannitol ratios produced a slight improvement in MICs compared to VCZ. These results suggest that the micelles promoted penetration into the fungal cells, thus reducing the antifungal concentration necessary to prevent their growth. Improvements in MICs thanks to the formulation of MSs have been reported previously [4].

3.3. *In vivo* assay

The formulations MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 were selected for *in vivo* studies due to their improved performance during the dissolution and antifungal susceptibility studies. VCZ raw material was taken as a reference.

3.3.1. Pharmacokinetic study

A pharmacokinetic study was done to determine the concentration of VCZ in plasma at various times after a single 40 mg/kg dose of VCZ by oral administration [29–31]. Fig. 4A shows the pharmacokinetic profiles of VCZ raw material, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025.

The main pharmacokinetic parameters in plasma are shown in Table 3. In all cases the plasma VCZ concentration 24 h after dose administration was below the limit of quantification, so the results were designated as zero. Values of t_{max} were different for each formulation at 4, 6 and 8 h for VCZ raw material, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025 respectively, with similar C_{max} values (9.48 ± 1.16 , 9.54 ± 1.79 , and

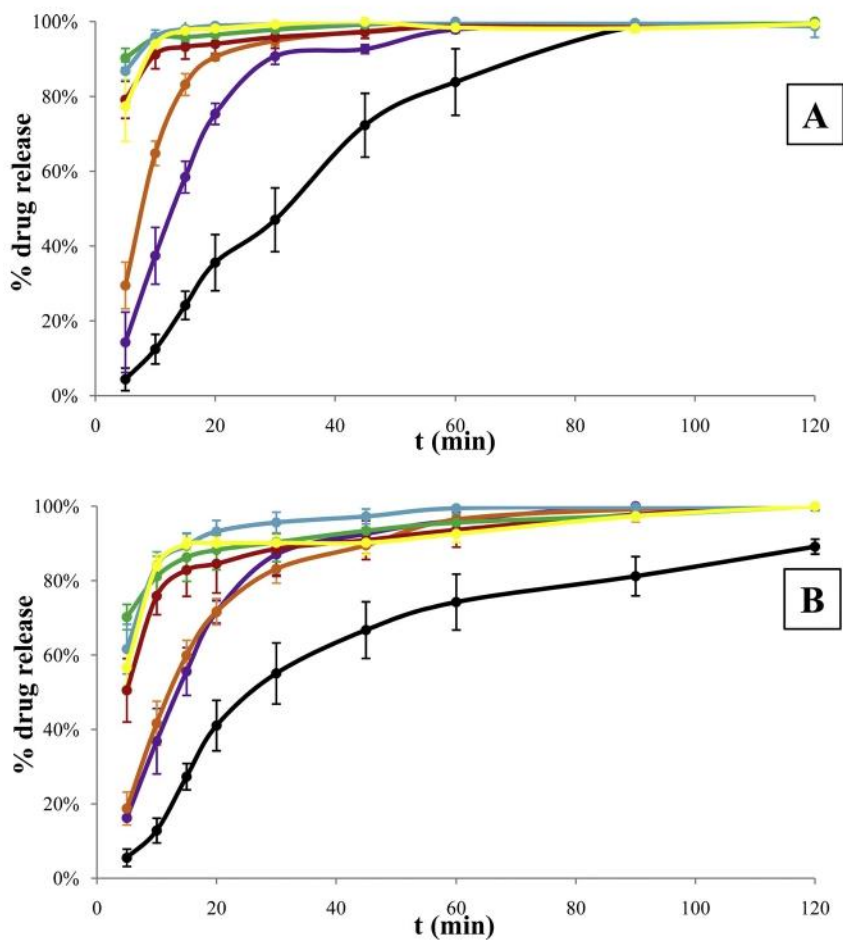


Fig. 3. *In vitro* dissolution profiles of VCZ raw material (black), PM-1:6 (purple), SD-1:6 (orange), MS-1:3:0.05 (red), MS-1:3:0.1 (yellow), MS-1:6:0.025 (green) and MS-1:6:0.05 (blue) at pH 4.5 (A) and pH 6.8 (B). The error bars indicate the SD of measurements ($n = 4$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2

MICs of VCZ raw material, SD-1:3, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025.

Strain	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	VCZ	SD-1:3:0	MS-1:3:0.05	MS-1:6:0.025
<i>Aspergillus calidoustus</i> (FMR 13556)	8	8	8	8
<i>Aspergillus calidoustus</i> (FMR 13557)	16	16	16	16
<i>Aspergillus terreus</i> (FMR 11823)	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Aspergillus flavus</i> (FMR 8760)	0.5	0.5	0.5	0.25
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 10522)	1	1	0.5	0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 10504)	0.5	0.5	0.25	0.25
<i>Aspergillus fumigatus</i> (FMR 7738)	0.5	0.5	0.25	0.25
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	0.5	0.5	0.25	0.25

$8.38 \pm 0.48 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectively). The VCZ and MS-1:3:0.05 profiles were similar during the first 4 h. MS-1:3:0.05 had higher concentrations after 6 h, implying that bioavailability had improved compared to the reference, as reflected in the values for AUC_{0-24} .

MS-1:6:0.025 had a different pharmacokinetic profile. Plasma VCZ concentrations were lower during the first 6 h, increased at 8 h and reached their C_{max} at this point. This was unexpected, since the *in vitro* results predicted high concentrations and an improvement in bioavailability. The presence of large amounts of mannitol – a non-absorbed sugar alcohol – most likely increased osmotic pressure in the intestine, drawing water into the lumen and accelerating transit time in the small intestine, resulting in lower absorption of the drug [32]. Despite this, the AUC_{0-24} value of the formulation with the highest amounts of mannitol – MS-1:6:0.025 ($116.39 \pm 16.15 \text{ h}\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$) – was similar to VCZ raw material ($117.35 \pm 23.52 \text{ h}\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.3.2. Biodistribution

VCZ levels were quantified in the brain, lungs, liver and kidneys 24 h after the administration of the single dose of VCZ raw material, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025. No VCZ was found in the brain in the analysis. Concentrations in the liver, lungs and kidneys are expressed as mg of VCZ per g of organ and shown in Fig. 4B.

There were no significant differences in the concentrations in lungs between MS-1:6:0.025 and VCZ (1.92 ± 0.35 and $2.01 \pm 0.24 \mu\text{g}/\text{g}$ respectively), suggesting that both formulations would be equally effective in lungs against an *Aspergillus* spp. infection. In contrast, the results for MS-1:3:0.05 were significantly higher in this organ ($4.78 \pm 1.69 \mu\text{g}/\text{g}$), so the local effect would be more pronounced with this formulation [33]. The MSs showed a higher concentration in lung tissue, possibly due to a greater accumulation of macrophages in this organ. Previous studies with MSs of amphotericin B showed a similar modification in biodistribution with accumulation in lung tissue [34].

Differences in VCZ concentrations in the liver were also observed for the formulations studied. The amount of VCZ was much higher in VCZ raw material ($12.78 \pm 1.21 \mu\text{g}/\text{g}$) than in either of the micellar formulations: over twice the concentration as in MS-1:3:0.05 ($5.29 \pm 0.74 \mu\text{g}/\text{g}$) and almost five times more than in MS-1:6:0.025 ($2.81 \pm 0.69 \mu\text{g}/\text{g}$). The low concentration of VCZ in the liver in these new formulations may decrease hepatotoxicity and allow more time for therapeutic drug monitoring, currently recommended for 2–3 days [35]. However, future toxicity studies are needed to confirm this reduced hepatotoxicity.

VCZ raw material and MS-1:3:0.05 showed similar levels ($4.98 \pm 0.54 \mu\text{g}/\text{g}$ and $5.36 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{g}$ respectively) in the kidneys, while the concentration was lower with MS-1:6:0.025 ($2.58 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{g}$). VCZ raw material and MS-1:3:0.05 would therefore have a similar local effect, while MS-1:6:0.025 would not be as

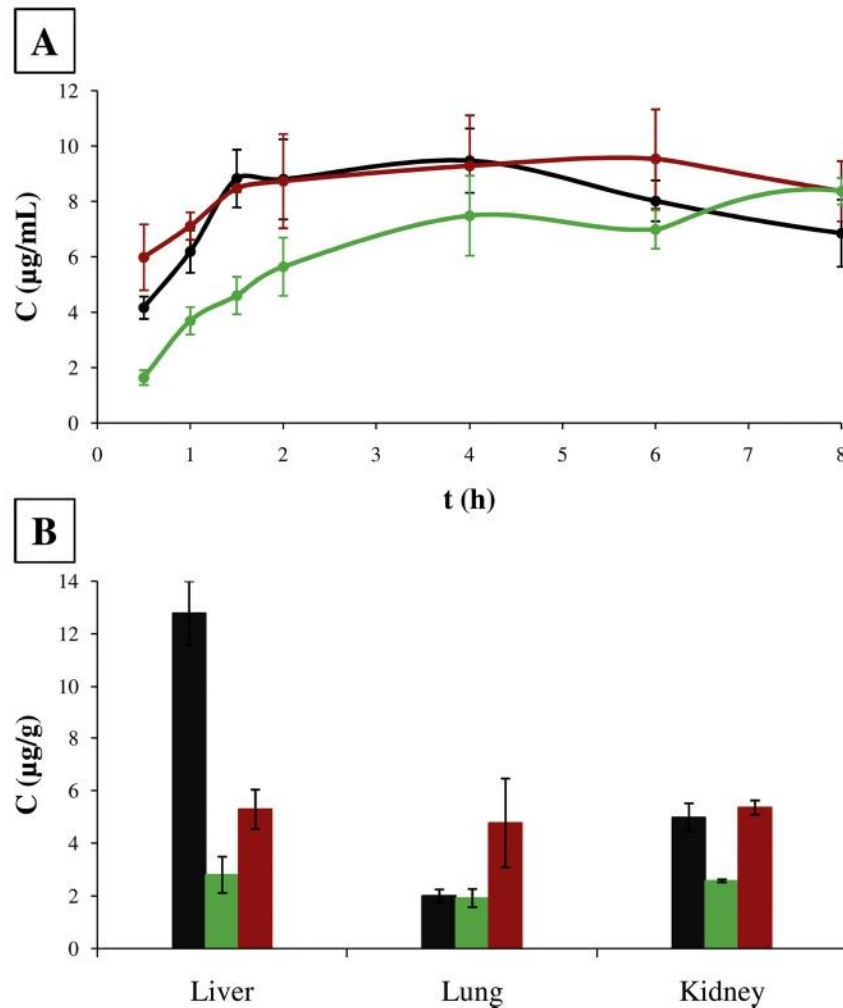


Fig. 4. *In vivo* pharmacokinetic profiles (A) and concentration of VCZ in liver, lungs and kidneys (B) of VCZ raw material (black), MS-1:3:0.05 (red) and MS-1:6:0.025 (green). The error bars indicate the SD of measurements ($n = 6$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

In vivo mean pharmacokinetic parameters \pm SD ($n = 6$) of VCZ raw material, MS-1:3:0.05 and MS-1:6:0.025. AUC_{0-24} h: plasma levels of VCZ versus time (0–24 h); t_{max} : time to reach C_{max} ; C_{max} : maximum plasma concentration; C_4 h: plasma concentration at 4 h; $C_{0.5}$ h: plasma concentration at 0.5 h.

	VCZ RM	MS-1:3:0,05	MS-1:6:0,025
AUC_{0-24} h (h μ g/mL)	117.35 \pm 23.52	135.13 \pm 34.44	116.39 \pm 16.15
t_{max} (h)	4	6	8
C_{max} (μ g/mL)	9.48 \pm 1.16	9.54 \pm 1.79	8.38 \pm 0.48
C_4 h (μ g/mL)	9.48 \pm 1.16	9.29 \pm 1.83	7.49 \pm 1.45
$C_{0.5}$ h (μ g/mL)	4.17 \pm 0.41	5.96 \pm 1.19	1.64 \pm 0.27

effective at this level.

Several studies have reported that the biodistribution of a drug can be altered by the use of MSs [15,16,36,37]. In view of the concentrations found in organs such as lungs, it can be confirmed that MS-1:3:0.05 is the most effective formulation for IA treatment. The hepatotoxic effect may also be reduced due to the low concentration of VCZ in the liver, while the same therapeutic effect as the VCZ raw material is maintained in the kidneys. The highest value of AUC_{0-24} – and therefore bioavailability – is achieved with MS-1:3:0.05, which also showed lower MIC values for *A. fumigatus*. These results represent an increase in the value of the AUC/MIC parameter and could indicate a more effective therapeutic treatment.

4. Conclusions

SDs and MSs of VCZ were developed to enhance its bioavailability and improve its biodistribution to different organs. SEM, PXRD and DSC studies confirmed that VCZ presented a partially amorphous structure in SDs and MSs. *In vitro* dissolution studies indicated that MSs had faster dissolution profiles than SDs. According to the antifungal susceptibility tests, the mannitol carrier of the SDs did not offer any improvements over the VCZ raw material, whereas the presence of the surfactant Tween 80 in the MSs led to a slight increase in MIC values in *Aspergillus spp.*

The pharmacokinetic study revealed good bioavailability in MS-1:3:0.05 compared to VCZ raw material. The biodistribution studies for this formulation found a significant decrease in the accumulation of VCZ in the liver and a greater concentration in the lung tissue, which may signify a substantial reduction in the hepatotoxicity associated to VCZ and an increase in the local effect at the pulmonary level. These findings highlight MS-1:3:0.05 as an excellent candidate for future studies to complement and confirm these results.

CRediT authorship contribution statement

Teresa Gallego-Arranz: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Alba Pérez-Cantero:**

Methodology, Validation, Investigation. **Carlos Torrado-Salmerón:** Validation, Investigation. **Víctor Guarnizo-Herrero:** Validation, Investigation. **Javier Capilla:** Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision. **Santiago Torrado-Durán:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Project administration.

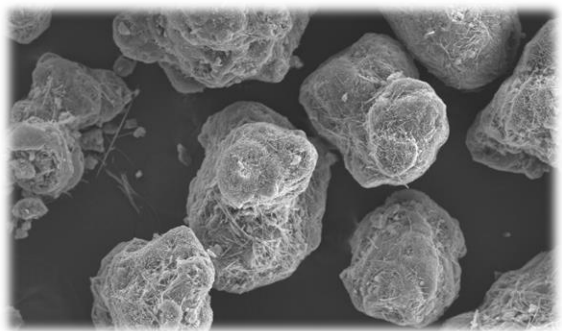
Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- J.D. Jenks, M. Hoenigl, Treatment of aspergillosis, *J. Fungi*. 4 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.3390/jof4030098>.
- T.F. Patterson, G.R. Thompson, D.W. Denning, J.A. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, M.H. Nguyen, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, T.J. Walsh, J.R. Wingard, J.A.H. Young, J.E. Bennett, Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.* 63 (2016) e1–e60, <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>.
- R. Harrington, E. Lee, H. Yang, J. Wei, A. Messali, N. Azie, E.Q. Wu, J. Spalding, Cost-effectiveness analysis of isavuconazole vs. voriconazole as first-line treatment for invasive Aspergillosis, *Adv. Ther.* 34 (2017) 207–220, <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0443-1>.
- H.R. Kelidari, R. Babaei, M. Nabili, T. Shokohi, M. Saeedi, S. Gholami, M. Moazeni, A. Nokhodchi, Improved delivery of voriconazole to *Aspergillus fumigatus* through solid lipid nanoparticles as an effective carrier, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 558 (2018) 338–342, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.08.082>.
- D. Levêque, Y. Nivoix, F. Jehl, R. Herbrecht, Clinical pharmacokinetics of voriconazole, *Int. J. Antimicrob. Agents* (2006), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.003>.
- P.I. Siafaka, N.Ü. Okur, M. Mone, S. Giannakopoulou, S. Er, E. Pavlidou, E. Karavas, D.N. Bikiaris, Two different approaches for oral administration of voriconazole loaded formulations: electrospun fibers versus β -cyclodextrin complexes, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.3390/ijms17030282>.
- S.V. Jermain, C. Brough, R.O. Williams, Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – an update, *Int. J. Pharm.* 535 (2018) 379–392, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.051>.
- S.P. Chaudhari, R.P. Dugar, Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 41 (2017) 68–77, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.010>.
- V. García-Herrero, C. Torrado, J.J. García-Rodríguez, A. López-Sánchez, S. Torrado, S. Torrado-Santiago, Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 529 (2017) 381–390, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.028>.
- P. Wang, X. Cao, Y. Chu, Ginkgolides-loaded soybean phospholipid-stabilized nano-suspension with improved storage stability and in vivo bioavailability, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 181 (2019) 910–917, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.050>.
- M.J. Dolton, A.J. McLachlan, Voriconazole pharmacokinetics and exposure-response relationships: assessing the links between exposure, efficacy and toxicity, *Int. J. Antimicrob. Agents* 44 (2014) 183–193, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.019>.
- M. Cagel, F.C. Tesan, E. Bernabeu, M.J. Salgueiro, M.B. Zubillaga, M.A. Moretton, D.A. Chiappetta, Polymeric mixed micelles as nanomedicines: achievements and perspectives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113 (2017) 211–228, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019>.
- A.A. Sultan, S.A. El-Gizawy, M.A. Osman, G.M. El Maghraby, Self dispersing mixed micelles forming systems for enhanced dissolution and intestinal permeability of hydrochlorothiazide, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 149 (2017) 206–216, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.028>.
- P. Haegler, L. Joerin, S. Krähenbühl, J. Bouitbir, Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents, *Toxicol. Sci.* 157 (2017) 183–195, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx029>.
- H. Liu, H. Xu, Y. Jiang, S. Hao, F. Gong, H. Mu, K. Liu, Preparation, characterization, in vivo pharmacokinetics, and biodistribution of polymeric micellar dimethoxycurcumin for tumor targeting, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 6395–6410, <https://doi.org/10.2147/IJN.S91961>.
- X. Hu, F.F. Yang, L.H. Quan, C.Y. Liu, X.M. Liu, C. Ehrhardt, Y.H. Liao, Pulmonary delivered polymeric micelles - pharmacokinetic evaluation and biodistribution studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88 (2014) 1064–1075, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.10.010>.
- T. Miletic, K. Kyriakos, A. Graovac, S. Ibric, Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: solubility, dissolution rate and chemical stability, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 122–131, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.084>.
- A. Espinel-Ingroff, D.J. Diekema, A. Fothergill, E. Johnson, T. Pelaez, M.A. Pfaller, M.G. Rinaldi, E. Canton, J. Turnidge, Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document), *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 3251–3257, <https://doi.org/10.1128/JCM.00536-10>.
- A. Espinel-Ingroff, A. Rezusta, E-test method for testing susceptibilities of society, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 2101–2107, <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2101>.
- B.V. de Araujo, C.F. da Silva, S.E. Haas, T. Dalla Costa, Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats, *Int. J. Antimicrob. Agents* 33 (2009) 154–159, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.020>.
- I. Lutsar, S. Roffey, P. Troke, Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of Guinea pigs and immunocompromised patients, *Clin. Infect. Dis.* 37 (2003) 728–732, <https://doi.org/10.1086/377131>.
- A. Pascual, V. Nieth, T. Calandra, J. Bille, S. Bolay, L.A. Decosterd, T. Buclin, P.A. Majcherzyk, D. Sanglard, O. Marchetti, Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 137–143, <https://doi.org/10.1128/AAC.00957-06>.
- B. Yang, L. Xu, Q. Wang, S. Li, Modulation of the wettability of excipients by surfactant and its impacts on the disintegration and release of tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (2016) 1945–1955, <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1185436>.
- N.A. Beinborn, H.L. Lirola, R.O. Williams, Effect of process variables on morphology and aerodynamic properties of voriconazole formulations produced by thin film freezing, *Int. J. Pharm.* 429 (2012) 46–57, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.010>.
- P.N. Kendre, P.D. Chaudhari, Effect of amphiphilic graft co-polymer-carrier on physical stability of bosentan nanocomposite: assessment of solubility, dissolution and bioavailability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126 (2018) 177–186, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.024>.
- M. Kumar, R. Bhatia, R.K. Rawal, Applications of various analytical techniques in quality control of pharmaceutical excipients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 157 (2018) 122–136, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.023>.
- A. García-Arieta, Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence, *Eur. J. Pharm. Sci.* 65 (2014) 89–97, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.004>.
- H. Yi, Y. Zhao, F. Rao, S. Song, Hydrophobic agglomeration of talc fines in aqueous suspensions, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 327–332, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.017>.
- K.V. Clemons, J.A. Schwartz, D.A. Stevens, Experimental central nervous system aspergillosis therapy: efficacy, drug levels and localization, immunohistopathology, and toxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012) 4439–4449, <https://doi.org/10.1128/AAC.06015-11>.
- J. Capilla, C. Serena, F.J. Pastor, M. Ortoneda, J. Guarro, Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 3976–3978, <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3976-3978.2003>.
- M. Sanchis, J. Guarro, D.A. Sutton, A.W. Fothergill, N. Wiederhold, J. Capilla, Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 84 (2016) 48–51, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.010>.
- K. Adkison, A. Wolstenholme, Y. Lou, Z. Zhang, A. Eld, T. Perger, H. Vangerow, K. Hayward, M. Shaefer, C. McCoig, Effect of sorbitol on the pharmacokinetic profile of lamivudine oral solution in adults: an open-label, randomized study, *Clin. Pharmacol. Ther.* 103 (2018) 402–408, <https://doi.org/10.1002/cpt.943>.
- D.F.M.C. Veloso, N.I.G.M. Benedetti, R.I. Avila, T.S.A. Bastos, T.C. Silva, M.R.R. Silva, A.C. Batista, M.C. Valadares, E.M. Lima, Intravenous delivery of a liposomal formulation of voriconazole improves drug pharmacokinetics, tissue distribution, and enhances antifungal activity, *Drug Deliv.* 25 (2018) 1585–1594, <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1492046>.
- A. López-Sánchez, A. Pérez-Cantero, C. Torrado-Salmerón, A. Martín-Vicente, V. García-Herrero, M.Á. González-Nicolás, A. Lázaro, A. Tejedor, S. Torrado-Santiago, J.J. García-Rodríguez, J. Capilla, S. Torrado, Efficacy, biodistribution, and nephrotoxicity of experimental amphotericin B-deoxycholate formulations for pulmonary aspergillosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1128/AAC.00489-18>.
- J. Smith, D. Andes, Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations, *Ther. Drug Monit.* 30 (2008) 167–172, <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318167d0e0>.
- S. Kaga, N.P. Truong, L. Esser, D. Senyschyn, A. Sanyal, R. Sanyal, J.F. Quinn, T.P. Davis, L.M. Kaminskas, M.R. Whittaker, Influence of size and shape on the biodistribution of nanoparticles prepared by polymerization-induced self-assembly, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 3963–3970, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00995>.
- X. Zhang, N. Liang, X. Gong, Y. Kawashima, F. Cui, S. Sun, Tumor-targeting micelles based on folic acid and α -tocopherol succinate conjugated hyaluronic acid for paclitaxel delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 177 (2019) 11–18, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.044>.

Material suplementario



Formulación	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)
VCZ MP	69,81 ± 2,17	89,76 ± 2,74	10	30	24,15 ± 3,28	72,32 ± 7,40	45	60	27,30 ± 2,89	66,71 ± 6,21	30	120
VCZ RC	29,32 ± 2,89	72,95 ± 3,07	30	90	18,69 ± 3,03	37,62 ± 3,47	90	> 120	8,96 ± 2,36	23,14 ± 4,49	120	> 120
MF-VCZ:Mnt 1:2	58,35 ± 8,25	99,42 ± 1,31	15	30								
MF-VCZ:Mnt 1:3	87,06 ± 2,13	98,09 ± 1,70	10	15	63,20 ± 4,07	93,58 ± 1,19	15	30	47,50 ± 4,95	89,23 ± 3,63	20	45
MF-VCZ:Mnt 1:6	90,22 ± 2,17	97,74 ± 1,02	10	15	58,45 ± 3,68	92,65 ± 1,04	15	30	55,58 ± 5,24	92,58 ± 1,37	15	30
MF-VCZ:Mnt 1:9	86,59 ± 2,29	98,92 ± 0,89	< 5	15								
MF-VCZ:Mdx 1:3	73,02 ± 2,20	95,88 ± 1,66	15	30								
MF-VCZ:Mdx 1:6	86,40 ± 3,58	97,72 ± 2,15	10	15								
MF-VCZ:Mdx 1:9	87,85 ± 2,42	99,65 ± 1,23	10	15								
MF-VCZ:L-HPC 1:3	39,26 ± 4,60	66,87 ± 3,79	30	90								
DS-VCZ:Mnt 1:2	75,28 ± 5,60	95,75 ± 5,38	10	20								
DS-VCZ:Mnt 1:3	83,26 ± 2,96	99,06 ± 0,00	10	20	43,12 ± 1,71	75,69 ± 3,02	20	60	36,06 ± 2,02	51,59 ± 3,30	45	> 120

Tabla 40: Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media ± DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.

Formulación	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)
DS-VCZ:Mnt 1:6	98,52 ± 1,71	97,95 ± 1,29	< 5	< 5	83,18 ± 2,51	97,44 ± 1,50	10	20	59,88 ± 3,52	89,52 ± 1,99	15	45
DS-VCZ:Mnt 1:9					92,30 ± 0,81	97,49 ± 2,26	< 5	10				
DS-VCZ:Mnt 1:12					96,79 ± 1,59	99,84 ± 1,40	< 5	10				
DS-VCZ:Mdx 1:2	62,01 ± 0,98	91,54 ± 0,78	15	45								
DS-VCZ:Mdx 1:3	70,38 ± 2,41	98,30 ± 1,00	< 5	30	45,39 ± 3,99	80,67 ± 3,82	20	60				
DS-VCZ:Mdx 1:6	85,56 ± 5,63	97,10 ± 0,85	10	15	73,74 ± 3,10	99,57 ± 0,62	10	20				
DS-VCZ:Mdx 1:9	87,20 ± 2,54	99,20 ± 0,91	< 5	15	77,42 ± 4,10	95,65 ± 2,44	10	20				
DS-VCZ:L-HPC 1:3	44,73 ± 3,98	83,65 ± 4,67	20	60								
DS-VCZ:L-HPC 1:6	42,14 ± 1,91	72,57 ± 0,94	20	90								
DS-VCZ:L-HPC 1:9	20,82 ± 2,73	42,66 ± 3,19	90	> 120								
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:3:0,025	79,68 ± 2,95	100,00 ± 0,87	< 5	20	60,66 ± 2,04	88,63 ± 4,57	15	45	48,97 ± 2,35	81,13 ± 4,02	20	60

Tabla 40 (continuación): Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media ± DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.

Formulación	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)
SM-VCZ:Mnt:Klph 1:3:0,025					44,17 ± 4,87	65,98 ± 4,11	30	90				
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:3:0,05	97,19 ± 2,63	98,87 ± 2,02	< 5	< 5	93,24 ± 2,80	97,20 ± 1,45	< 5	10	82,84 ± 6,11	90,89 ± 4,51	10	30
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:3:0,075					89,81 ± 0,58	94,40 ± 2,47	< 5	10				
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:3:0,1	97,52 ± 2,36	99,12 ± 0,33	< 5	< 5	97,58 ± 0,54	100,00 ± 0,14	< 5	< 5	89,72 ± 1,45	90,17 ± 2,75	< 5	15
SM-VCZ:Mnt:Klph 1:3:0,1					93,71 ± 3,05	98,69 ± 1,37	< 5	10				
SM-VCZ:Mnt:Lbr 1:3:0,1					94,53 ± 1,04	100,00 ± 0,81	< 5	10				
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:3:0,2					65,50 ± 2,68	88,49 ± 1,36	15	45	62,92 ± 2,60	76,24 ± 0,70	10	60
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:6:0,025	97,71 ± 0,89	99,19 ± 0,73	< 5	< 5	95,84 ± 1,29	99,22 ± 1,38	< 5	< 5	86,24 ± 5,23	93,40 ± 3,44	< 5	20
SM-VCZ:Mnt:Klph 1:6:0,025	97,71 ± 0,91	99,42 ± 1,02	< 5	< 5	95,51 ± 1,41	99,14 ± 1,11	< 5	< 5				
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:6:0,05	98,86 ± 0,66	99,87 ± 0,79	< 5	< 5	98,05 ± 2,80	99,63 ± 0,97	< 5	< 5	89,36 ± 2,99	97,25 ± 1,74	< 5	15

Tabla 40 (continuación): Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media ± DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.

Formulación	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)	%D 15 min (%)	%D 45 min (%)	tD 50% (min)	tD 85% (min)
SM-VCZ:Mnt:Tw 1:6:0,1					92,52 ± 2,39	97,35 ± 1,76	< 5	10				
SM-VCZ:Mnt:Klph 1:6:0,1	95,37 ± 2,60	99,94 ± 0,79	< 5	< 5	93,43 ± 3,34	97,67 ± 0,95	< 5	< 5				
SM-VCZ:Mnt:Lbr 1:6:0,1					91,45 ± 1,55	97,26 ± 0,87	10	15				
SM-VCZ:Mnt:Klph 1:9:0,1					97,54 ± 1,05	99,91 ± 0,44	< 5	< 5				
SM-VCZ:Mdx:Tw 1:6:0,1	83,84 ± 2,89	98,85 ± 1,78	< 5	20								
SM-VCZ:Mdx:Klph 1:6:0,025	92,62 ± 3,23	98,76 ± 0,66	< 5	10								
SM-VCZ:Mdx:Klph 1:6:0,05	94,37 ± 2,07	98,81 ± 0,56	< 5	10								
SM-VCZ:Mdx:Klph 1:6:0,075	94,92 ± 2,02	98,53 ± 0,90	< 5	10								
SM-VCZ:Mdx:Klph 1:6:0,1	95,71 ± 3,97	98,96 ± 2,14	10	15								

Tabla 40 (continuación): Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media ± DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.

Bibliografía



- [1] E.M. Carmona, A.H. Limper, **Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections**, *Clinics in Chest Medicine*. 38 (2017) 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.003>.
- [2] G. Shi En Tan, L. Yang Hsu; **Overview of Fungal Infections**, *Elsevier Reference Collection in Biomedical Sciences*. (2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98320-X>.
- [3] M. Riquelme, J. Aguirre, S. Bartnicki-García, G.H. Braus, M. Feldbrügge, U. Fleig, W. Hansberg, A. Herrera-Estrella, J. Kämper, U. Kück, R.R. Mouriño-Pérez, N. Takeshita, R. Fischer, **Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures**, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 82 (2018) 1–47. <https://doi.org/10.1128/membr.00068-17>.
- [4] J.-P. Latgé, A. Beauvais, G. Chamilos, **The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence**, *Annual Review of Microbiology*. 71 (2017) 99–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020406>.
- [5] E. Levetin, W.E. Horner, J.A. Scott, C. Barnes, S. Baxi, G.L. Chew, C. Grimes, K. Kennedy, D. Larenas-Linnemann, J.D. Miller, W. Phipatanakul, J.M. Portnoy, P.B. Williams, **Taxonomy of Allergenic Fungi**, *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 4 (2016) 375–385.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.10.012>.
- [6] A. Sánchez-sousa, M. E. Álvarez Álvarez, R. Cantón Moreno, F. Baquero Mochales, **Antifúngicos. Micosis superficiales y sistémicas. Tipos de antifúngicos**, *Farmacología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Formación continuada (2006) 171–198.
- [7] R. Rautemaa-Richardson, M.D. Richardson, **Systemic fungal infections**, *Medicine (United Kingdom)*. 45 (2017) 757–762. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.09.007>.
- [8] T.J. Walsh, D.M. Dixon, **Spectrum of Mycoses**, *Medical Microbiology*. (1996).
- [9] C. Veríssimo, **Fungal Infections**, *Environmental Mycology in Public Health: Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management*. (2015) 27–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411471-5.00003-X>.
- [10] C. Lass-Flörl, M. Cuenca-Estrella, **Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72 (2017) i5–i11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx028>.
- [11] C. Paulussen, J.E. Hallsworth, S. Álvarez-Pérez, W.C. Nierman, P.G. Hamill, D. Blain, H. Rediers, B. Lievens, **Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species**, *Microbial Biotechnology*. 10 (2017) 296–322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>.
- [12] V. Kabir, J. Maertens, D. Kuypers, **Fungal infections in solid organ transplantation: An update on diagnosis and treatment**, *Transplantation Reviews*. 33 (2019) 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2018.12.001>.
- [13] Y. Schmiedel, S. Zimmerli, **Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia***, *Swiss Medical Weekly*. 146 (2016) w14281. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14281>.
- [14] R. Harrington, E. Lee, H. Yang, J. Wei, A. Messali, N. Azie, E.Q. Wu, J. Spalding, **Cost-Effectiveness Analysis of Isavuconazole vs. Voriconazole as First-Line Treatment for Invasive Aspergillosis**, *Advances in Therapy*. 34 (2017) 207–220. <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0443-1>.
- [15] D.W. Denning, P. Ribaud, N. Milpied, D. Caillot, R. Herbrecht, E. Thiel, A. Haas, M. Ruhnke, H. Lode, **Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis**, *Clinical Infectious Diseases*. 34 (2002) 563–571. <https://doi.org/10.1086/324620>.

- [16] X.D. Tang, G.H. Li, **Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of Infectious Diseases Society of America**, *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*. 8 (2008) 161–166. <https://doi.org/10.1086/525258>.
- [17] M.B. Gotway, S.K. Dawn, E.M. Caoili, G.P. Reddy, P.A. Araoz, W.R. Webb, **The radiologic spectrum of pulmonary Aspergillus infections**, *Journal of Computer Assisted Tomography*. 26 (2002) 159–173. <https://doi.org/10.1097/00004728-200203000-00001>.
- [18] R.X. Wang, J.T. Zhang, Y. Chen, X.S. Huang, W.Q. Jia, S.Y. Yu, **Cerebral aspergillosis: a retrospective analysis of eight cases**, *International Journal of Neuroscience*. 127 (2017) 339–343. <https://doi.org/10.3109/00207454.2016.1155573>.
- [19] Y. Zhao, S. Park, P. Warn, R. Shrief, E. Harrison, D.S. Perlin, **Detection of aspergillus fumigatus in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification**, *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (2010) 1378–1383. <https://doi.org/10.1128/JCM.02214-09>.
- [20] A.B. Petersen, M.H. Rønne, T.O. Larsen, M.H. Clausen, **The chemistry of griseofulvin**, *Chemical Reviews*. 114 (2014) 12088–12107. <https://doi.org/10.1021/cr400368e>.
- [21] K. Rathinasamy, B. Jindal, J. Asthana, P. Singh, P. V. Balaji, D. Panda, **Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine**, *BMC Cancer*. 10 (2010) 6–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-213>.
- [22] D. Panda, K. Rathinasamy, M.K. Santra, L. Wilson, **Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: Implications for its possible use in the treatment of cancer**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 9878–9883. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501821102>.
- [23] L. De Carli, L. Larizza, **Griseofulvin**, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 195 (1988) 91–126. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90020-6).
- [24] J.A. Maertens, **History of the development of azole derivatives**, *Clinical Microbiology and Infection*. 10 (2004) 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>.
- [25] A.K. Gupta, E.A. Cooper, **Update in antifungal therapy of dermatophytosis**, *Mycopathologia*. 166 (2008) 353–367. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9109-0>.
- [26] S. Nami, A. Aghebati-Maleki, H. Morovati, L. Aghebati-Maleki, **Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases**, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 110 (2019) 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.009>.
- [27] J. Boros-Majewska, N. Salewska, E. Borowski, S. Milewski, S. Malic, X.Q. Wei, A.J. Hayes, M.J. Wilson, D.W. Williams, **Novel Nystatin A1 derivatives exhibiting low host cell toxicity and antifungal activity in an in vitro model of oral candidosis**, *Medical Microbiology and Immunology*. 203 (2014) 341–355. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0343-4>.
- [28] R. Semis, S. Kagan, I. Berdicevsky, I. Polacheck, E. Segal, **Mechanism of activity and toxicity of Nystatin-Intralipid**, *Medical Mycology*. 51 (2013) 422–431. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.731712>.
- [29] J. Mohr, M. Johnson, T. Cooper, J.S. Lewis, L. Ostrosky-Zeichner, **Current options in antifungal pharmacotherapy**, *Pharmacotherapy*. 28 (2008) 614–645. <https://doi.org/10.1592/phco.28.5.614>.
- [30] T. Kežutyte, T. Drevinskas, A. Maruška, R. Rimdeika, V. Briedis, **Study of tolnaftate release from fatty acids containing ointment and penetration into human skin ex vivo**, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 68 (2011) 965–973.
- [31] A.E. Czeizel, Z. Kazy, E. Puhó, **Tolnaftate spray treatment during pregnancy**, *Reproductive Toxicology*. 18 (2004) 443–444. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.02.008>.

- [32] T. Kežutyte, O. Kornyšova, A. Maruška, V. Briedis, **Assay of tolinaftate in human skin samples after in vitro penetration studies using high performance liquid chromatography**, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 67 (2010) 327–334.
- [33] M.M. AbouSamra, A.H. Salama, **Enhancement of the topical tolinaftate delivery for the treatment of tinea pedis via provesicular gel systems**, *Journal of Liposome Research*. 27 (2017) 324–334. <https://doi.org/10.1080/08982104.2016.1239634>.
- [34] A.M. Nicola, P. Albuquerque, H.C. Paes, L. Fernandes, F.F. Costa, E.S. Kioshima, A.K.R. Abadio, A.L. Bocca, M.S. Felipe, **Antifungal drugs: New insights in research & development**, *Pharmacology and Therapeutics*. 195 (2019) 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.008>.
- [35] N.S. RYDER, **The mechanism of action of terbinafine**, *Clinical and Experimental Dermatology*. 14 (1989) 98–100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1989.tb00900.x>.
- [36] E.B. Smith, **History of antifungals**, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 23 (1990) 776–778. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70286-Q](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70286-Q).
- [37] N.S. Ryder, H. Mieth, **Allylamine antifungal drugs.**, *Current Topics in Medical Mycology*. 4 (1992) 158–188. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2762-5_6.
- [38] N.S. RYDER, **Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition**, *British Journal of Dermatology*. (1992). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00001.x>.
- [39] X. Teng, Y. Wang, J. Gu, P. Shi, Z. Shen, L. Ye, **Antifungal agents: Design, synthesis, antifungal activity and molecular docking of phloroglucinol derivatives**, *Molecules*. 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23123116>.
- [40] J.E. Nett, D.R. Andes, **Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications**, *Infectious Disease Clinics of North America*. 30 (2016) 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>.
- [41] J.A. Kang, S. Kim, M. Park, H.J. Park, J.H. Kim, S. Park, J.R. Hwang, Y.C. Kim, Y. Jun Kim, Y. Cho, M. Sun Jin, S.G. Park, **Ciclopirox inhibits Hepatitis B Virus secretion by blocking capsid assembly**, *Nature Communications*. 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10200-5>.
- [42] A.K. Gupta, Y. Kohli, **In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity**, *British Journal of Dermatology*. 149 (2003) 296–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05418.x>.
- [43] I. An, M. Harman, I. Ibiloglu, **Topical Ciclopirox Olamine 1%: Revisiting a Unique Antifungal**, *Indian Dermatology Online Journal*. 10 (2017) 481–485. <https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ>.
- [44] A. Subissi, D. Monti, G. Togni, F. Mailland, **Ciclopirox: Recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent**, *Drugs*. 70 (2010) 2133–2152. <https://doi.org/10.2165/11538110-000000000-00000>.
- [45] A.K. Gupta, D.C.A. Lyons, **The rise and fall of oral ketoconazole**, *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. 19 (2015) 352–357. <https://doi.org/10.1177/1203475415574970>.
- [46] M.B. de Lima Barros, R. de Almeida Paes, A.O. Schubach, **Sporothrix schenckii and sporotrichosis**, *Clinical Microbiology Reviews*. 24 (2011) 354–633. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>.
- [47] J.B. Sterling, W.R. Heymann, **Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century - Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications**, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 43 (2000) 691–697. <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.107247>.

- [48] R.O. Costa, P.M. de Macedo, A. Carvalhal, A.R. Bernardes-Engemann, **Use of potassium iodide in Dermatology: updates on an old drug**, *Anais Brasileiros de Dermatologia*. (2013). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20132377>.
- [49] J. Nikodinovic, K.D. Barrow, J.A. Chuck, **High frequency transformation of the Amphotericin-producing bacterium *Streptomyces nodosus***, *Journal of Microbiological Methods*. 55 (2003) 273–277. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00160-X).
- [50] P. Caffrey, S. Lynch, E. Flood, S. Finnan, M. Oliynyk, **Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Deductions from analysis of polyketide synthase and late genes**, *Chemistry and Biology*. 8 (2001) 713–723. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00046-1).
- [51] P. Sweeney, C.D. Murphy, P. Caffrey, **Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production**, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (2016) 1285–1295. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7060-9>.
- [52] B. Zhang, Y.T. Zhou, S.X. Jiang, Y.H. Zhang, K. Huang, Z.Q. Liu, Y.G. Zheng, **Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Quantitative analysis of metabolism via LC-MS/MS based metabolomics for rational design**, *Microbial Cell Factories*. 19 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1290-y>.
- [53] B. Zhang, H.D. Zhang, Y.T. Zhou, K. Huang, Z.Q. Liu, Y.G. Zheng, **Improvement of amphotericin B production by a newly isolated *Streptomyces nodosus* mutant**, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 65 (2018) 188–194. <https://doi.org/10.1002/bab.1579>.
- [54] R. Donovan, W. Gold, J.F. Pagano, H.A. Stout, **Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies**, *Antibiotics Annual*. 3 (1955) 579–586.
- [55] E.T. Stiller, J. Vandeputte, J.L. Wachtel, **Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins**, *Antibiotics Annual*. 3 (1955) 587–591.
- [56] D. Tassel, M.A. Madoff, **Treatment of *Candida* Sepsis and *Cryptococcus* Meningitis With 5-Fluorocytosine: A New Antifungal Agent**, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 206 (1968) 830–832. <https://doi.org/10.1001/jama.1968.03150040042009>.
- [57] P. Francis, T.J. Walsh, **Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: New insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy**, *Clinical Infectious Diseases*. 15 (1992) 1003–1018. <https://doi.org/10.1093/clind/15.6.1003>.
- [58] M.Y. Wani, A. Ahmad, S. Kumar, A.J.F.N. Sobral, **Flucytosine analogues obtained through Biginelli reaction as efficient combinative antifungal agents**, *Microbial Pathogenesis*. 105 (2017) 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.006>.
- [59] M. Borgers, **Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives.**, *Reviews of Infectious Diseases*. 2 (1980) 520–534. <https://doi.org/10.1093/clinids/2.4.520>.
- [60] M. Negri, T.P. Salci, C.S. Shinobu-Mesquita, I.R.G. Capoci, T.I.E. Svidzinski, E.S. Kioshima, **Early state research on antifungal natural products**, *Molecules*. 19 (2014) 2925–2956. <https://doi.org/10.3390/molecules19032925>.
- [61] C.L. Terrell, **Antifungal agents. part ii. the azoles**, *Mayo Clinic Proceedings*. 74 (1999) 78–100. <https://doi.org/10.4065/74.1.78>.
- [62] L.R. Peyton, S. Gallagher, M. Hashemzadeh, **Triazole antifungals: A review**, *Drugs of Today*. 51 (2015) 705–718. <https://doi.org/10.1358/dot.2015.51.12.2421058>.
- [63] J.R. Azanza Perea, **Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología**, *Revista Iberoamericana de Micología*. 33 (2016) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.02.004>.
- [64] A. Patil, S. Majumdar, **Echinocandins in antifungal pharmacotherapy**, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 69 (2017) 1635–1660. <https://doi.org/10.1111/jphp.12780>.

- [65] J.A. Cortés L., J.A. Russi N., **Equinocandinas**, *Revista Chilena de Infectología*. 28 (2011) 529–536. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000700004>.
- [66] A.J. Sucher, E.B. Chahine, H.E. Balcer, **Echinocandins: The newest class of antifungals**, *Annals of Pharmacotherapy*. 43 (2009) 1647–1657. <https://doi.org/10.1345/aph.1M237>.
- [67] W.H. Xiong, R. Lane Brown, B. Reed, N.S. Burke, R.M. Duvoisin, C.W. Morgans, **Voriconazole, an antifungal triazol that causes visual side effects, is an inhibitor of TRPM1 and TRPM3 channels**, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 56 (2015) 1367–1373. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15270>.
- [68] H.R. Kelidari, R. Babaei, M. Nabili, T. Shokohi, M. Saeedi, S. Gholami, M. Moazeni, A. Nokhodchi, **Improved delivery of voriconazole to *Aspergillus fumigatus* through solid lipid nanoparticles as an effective carrier**, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 558 (2018) 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.08.082>.
- [69] T.Y. Hargrove, Z. Wawrzak, D.C. Lamb, F.P. Guengerich, G.I. Lepsheva, **Structure-functional characterization of cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs**, *Journal of Biological Chemistry*. 290 (2015) 23916–23934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677310>.
- [70] A. Pérez-Cantero, L. López-Fernández, J. Guarro, J. Capilla, **New insights into the Cyp51 contribution to azole resistance in *Aspergillus section Nigri***, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-19>.
- [71] J. Song, P. Zhai, Y. Zhang, C. Zhang, H. Sang, G. Han, N.P. Keller, L. Lu, **The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility**, *MBio*. 7 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01919-15>.
- [72] J.E. Parker, A.G.S. Warrilow, C.L. Price, J.G.L. Mullins, D.E. Kelly, S.L. Kelly, **Resistance to antifungals that target CYP51**, *Journal of Chemical Biology*. 7 (2014) 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>.
- [73] L.M. Podust, T.L. Poulos, M.R. Waterman, **Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (2001) 3068–3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.061562898>.
- [74] L. Xiao, V. Madison, A.S. Chau, D. Loebenberg, R.E. Palermo, P.M. McNicholas, **Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (2004) 568–574. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.568-574.2004>.
- [75] D. Levêque, Y. Nivoix, F. Jehl, R. Herbrecht, **Clinical pharmacokinetics of voriconazole**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 27 (2006) 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.003>.
- [76] C. Lass-Flörl, **Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: A comparative review**, *Drugs*. 71 (2011) 2405–2419. <https://doi.org/10.2165/11596540-000000000-00000>.
- [77] Agencia Europea del Medicamento, **Ficha técnica de VFEND (voriconazol)**. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/02212015/FT_02212015.html
- [78] K. Chen, X. Zhang, X. Ke, G. Du, K. Yang, S. Zhai, **Individualized medication of voriconazole: A practice guideline of the Division of therapeutic drug monitoring, Chinese pharmacological society**, *Therapeutic Drug Monitoring*. 40 (2018) 663–674. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000561>.

- [79] M.J. Dolton, A.J. McLachlan, **Voriconazole pharmacokinetics and exposure-response relationships: assessing the links between exposure, efficacy and toxicity**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44 (2014) 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.019>.
- [80] Y. Hicheri, G. Cook, C. Cordonnier, **Antifungal prophylaxis in haematology patients: The role of voriconazole**, *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (2012) 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03772.x>.
- [81] N.M. Mori, P. Patel, N.R. Sheth, L. V. Rathod, K.C. Ashara, **Fabrication and characterization of film-forming voriconazole transdermal spray for the treatment of fungal infection**, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 55 (2017) 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.01.001>.
- [82] P.I. Siafaka, N.Ü. Okur, M. Mone, S. Giannakopoulou, S. Er, E. Pavlidou, E. Karavas, D.N. Bikiaris, **Two different approaches for oral administration of voriconazole loaded formulations: Electrospun fibers versus β -cyclodextrin complexes**, *International Journal of Molecular Sciences*. 17 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17030282>.
- [83] M. Mikulska, A. Novelli, F. Aversa, S. Cesaro, F.G. de Rosa, C. Girmenia, A. Micozzi, M. Sanguinetti, C. Viscoli, **Voriconazole in clinical practice**, *Journal of Chemotherapy*. 24 (2012) 311–327. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000051>.
- [84] F. Qi, L. Zhu, N. Li, T. Ge, G. Xu, S. Liao, **Influence of different proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of voriconazole**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49 (2017) 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.025>.
- [85] V. Kalamkar, M. Joshi, V. Borkar, S. Srivastava, M. Kanyalkar, **Intermolecular interaction of voriconazole analogues with model membrane by DSC and NMR, and their antifungal activity using NMR based metabolic profiling**, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 21 (2013) 6753–6762. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.004>.
- [86] R. Theurillat, S. Zimmerli, W. Thormann, **Determination of voriconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53 (2010) 1313–1318. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.05.015>.
- [87] L. Purkins, N. Wood, D. Kleinermans, K. Greenhalgh, D. Nichols, **Effect of food on the pharmacokinetics of multiple-dose oral voriconazole**, *British Journal of Clinical Pharmacology, Supplement*. 56 (2003) 17–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01994.x>.
- [88] R.A. Parsley, L.A. Tell, R. Gehring, **Pharmacokinetics of a single dose of voriconazole administered orally with and without food to red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*)**, *American Journal of Veterinary Research*. (2017). <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.4.433>
- [89] U. Theuretzbacher, F. Ihle, H. Derendorf, **Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole**, *Clinical Pharmacokinetics*. 45 (2006) 649–663. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645070-00002>.
- [90] L.A. Jeu, F.J. Piacenti, A.G. Lyakhovetskiy, H.B. Fung, **Voriconazole**, *Clinical Therapeutics*. 5 (2003) 1321–1381. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80126-1](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80126-1).
- [91] I. Scholz, H. Oberwittler, K.D. Riedel, J. Burhenne, J. Weiss, W.E. Haefeli, G. Mikus, **Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 68 (2009) 906–915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03534.x>.
- [92] K. Matsumoto, K. Ikawa, K. Abematsu, N. Fukunaga, K. Nishida, T. Fukamizu, Y. Shimodozono, N. Morikawa, Y. Takeda, K. Yamada, **Correlation between voriconazole trough plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34 (2009) 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.008>.

- [93] J. Smith, D. Andes, **Therapeutic drug monitoring of antifungals: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations**, *Therapeutic Drug Monitoring*. 30 (2008) 167–172. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318167d0e0>.
- [94] G. Mikus, I.M. Scholz, J. Weiss, **Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole**, *Pharmacogenomics*. 12 (2011) 861–872. <https://doi.org/10.2217/pgs.11.18>.
- [95] J.R. Amsden, P.O. Gubbins, **Pharmacogenomics of triazole antifungal agents: implications for safety, tolerability and efficacy**, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 13 (2017) 1135–1146. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1391213>.
- [96] G. Wang, H.P. Lei, Z. Li, Z.R. Tan, D. Guo, L. Fan, Y. Chen, D.L. Hu, D. Wang, H.H. Zhou, **The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers**, *European Journal of Clinical Pharmacology*. 65 (2009) 281–285. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0574-7>.
- [97] K. Sugimoto, T. Uno, H. Yamazaki, T. Tateishi, **Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 65 (2008) 437–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03057.x>.
- [98] G. Xu, L. Zhu, T. Ge, S. Liao, N. Li, F. Qi, **Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of voriconazole against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. in children, adolescents and adults by Monte Carlo simulation**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 47 (2016) 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.016>.
- [99] R.G. Mihăilă, **Voriconazole and the liver**, *World Journal of Hepatology*. 7 (2015) 1828–1833. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i14.1828>.
- [100] R.S. Kadam, J.N. Van Den Anker, **Pediatric Clinical Pharmacology of Voriconazole: Role of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Pharmacotherapy**, *Clinical Pharmacokinetics*. 55 (2016) 1031–1043. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0379-2>.
- [101] A.N. Malani, L.E. Kerr, C.A. Kauffman, **Voriconazole: How to Use This Antifungal Agent and What to Expect**, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36 (2015) 786–795. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562903>.
- [102] Y. Suzuki, I. Tokimatsu, Y. Sato, K. Kawasaki, Y. Sato, T. Goto, K. Hashinaga, H. Itoh, K. Hiramatsu, J.I. Kadota, **Association of sustained high plasma trough concentration of voriconazole with the incidence of hepatotoxicity**, *Clinica Chimica Acta*. 424 (2013) 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.025>.
- [103] H. Elewa, E. El-Mekaty, A. El-Bardissy, M.H.H. Ensom, K.J. Wilby, **Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in the Management of Invasive Fungal Infections: A Critical Review**, *Clinical Pharmacokinetics*. 54 (2015) 1223–1235. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0297-8>.
- [104] J. Meletiadis, S. Chanock, T.J. Walsh, **Defining targets for investigating the pharmacogenomics adverse drug reactions to antifungal agents**, *Pharmacogenomics*. 9 (2008) 561–584. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.5.561>.
- [105] M.M. Chau, D.C.M. Kong, S.J. van Hal, K. Urbancic, J.A. Trubiano, M. Cassumbhoy, J. Wilkes, C.M. Cooper, J.A. Roberts, D.J.E. Marriott, L.J. Worth, **Consensus guidelines for optimising antifungal drug delivery and monitoring to avoid toxicity and improve outcomes in patients with haematological malignancy, 2014**, *Internal Medicine Journal*. 44 (2014) 1364–1388. <https://doi.org/10.1111/imj.12600>.
- [106] M.T. Levine, P.H. Chandrasekar, **Adverse effects of voriconazole: Over a decade of use**, *Clinical Transplantation*. 30 (2016) 1377–1386. <https://doi.org/10.1111/ctr.12834>.
- [107] R.B. Turner, J.L. Martello, A. Malhotra, **Worsening renal function in patients with baseline renal impairment treated with intravenous voriconazole: A systematic review**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46 (2015) 362–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.023>.

- [108] M. Yan, Z. feng Wu, D. Tang, F. Wang, Y. wen Xiao, P. Xu, B. kui Zhang, Y. ping Liu, D. xiong Xiang, H.L. Banh, **The impact of proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of voriconazole in vitro and in vivo**, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 108 (2018) 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.121>.
- [109] A. Pascual, T. Calandra, S. Bolay, T. Buclin, J. Bille, O. Marchetti, **Voriconazole Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Invasive Mycoses Improves Efficacy and Safety Outcomes**, *Clinical Infectious Diseases*. 46 (2008) 201–211. <https://doi.org/10.1086/524669>.
- [110] S. Homma, K.I. Takahashi, S. Nihei, F. Kato, S. Sugihara, S. Nunoda, **The successful management of respiratory complications with long-term, low-dose macrolide administration in pediatric heart transplant recipients**, *International Heart Journal*. 55 (2014) 560–563. <https://doi.org/10.1536/ihj.14-047>.
- [111] J.W.C. Alffenaar, K.C.M. Van Der Elst, D.R.A. Uges, J.G.W. Kosterink, S.M.G.J. Daenen, **Phenytoin-induced reduction of voriconazole serum concentration is not compensated by doubling the dosage**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 68 (2009) 462–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03464.x>.
- [112] L. Gerzenshtein, S.M. Patel, K.K. Scarsi, M.J. Postelnick, J.P. Flaherty, **Breakthrough Candida infections in patients receiving voriconazole**, *Annals of Pharmacotherapy*. 39 (2005) 1342–1345. <https://doi.org/10.1345/aph.1E627>.
- [113] I. Spriet, P. Meersseman, W. Meersseman, J. De Hoon, L. Willems, **Increasing the dose of voriconazole compensates for enzyme induction by phenytoin**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 69 (2010) 701–702. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03650.x>.
- [114] B. Damle, R. LaBadie, P. Crownover, P. Glue, **Pharmacokinetic interactions of efavirenz and voriconazole in healthy volunteers**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 65 (2008) 523–530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03085.x>.
- [115] P. Liu, G. Foster, K. Gandelman, R.R. LaBadie, M.J. Allison, M.J. Gutierrez, A. Sharma, **Steady-state pharmacokinetic and safety profiles of voriconazole and ritonavir in healthy male subjects**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (2007) 3617–3626. <https://doi.org/10.1128/AAC.00526-07>.
- [116] A.J. Romero, P. Le Pogamp, L.G. Nilsson, N. Wood, **Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients**, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 71 (2002) 226–234. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.121911>.
- [117] S.R. Katari, M. Magnone, R. Shapiro, M. Jordan, V. Scantlebury, C. Vivas, A. Gritsch, J. McCauley, T. Starzl, A.J. Demetris, P.S. Randhawa, **Clinical features of acute reversible tacrolimus (FK 506) nephrotoxicity in kidney transplant recipients**, *Clinical Transplantation*. 11 (1997) 237–242.
- [118] C.L. Osowski, S.P. Dix, L.S. Lin, R.E. Mullins, R.B. Geller, J.R. Wingard, **Evaluation of the drug interaction between intravenous high-dose fluconazole and cyclosporine or tacrolimus in bone marrow transplant patients**, *Transplantation*. 61 (1996) 1268–1272. <https://doi.org/10.1097/00007890-199604270-00026>.
- [119] T. Tateishi, Y. Krivoruk, Y.F. Ueng, A.J.J. Wood, F.P. Guengerich, M. Wood, **Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil N-dealkylation**, *Anesthesia and Analgesia*. 82 (1996) 167–172. <https://doi.org/10.1097/00000539-199601000-00031>.
- [120] A.E. Ibrahim, J. Feldman, A. Karim, E.D. Kharasch, **Simultaneous Assessment of Drug Interactions with Low- and High-Extraction Opioids**, *Anesthesiology*. 98 (2003) 853–861. <https://doi.org/10.1097/00000542-200304000-00011>.
- [121] L. Purkins, N. Wood, D. Kleinermans, D. Nichols, **Voriconazole potentiates warfarin-induced prothrombin time prolongation**, *British Journal of Clinical Pharmacology, Supplement*. 56 (2003) 24–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01995.x>.

- [122] J. Ahonen, K.T. Olkkola, P.J. Neuvonen, **Effect of itraconazole and terbinafine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam in healthy volunteers**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 40 (1995) 270–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1995.tb00001.x>.
- [123] L.L. Von Moltke, D.J. Greenblatt, J. Schmider, S.X. Duan, C.E. Wright, J.S. Harmatz, R.I. Shader, **Midazolam hydroxylation by human liver microsomes in vitro: Inhibition by fluoxetine, norfluoxetine, and by azole antifungal agents**, *Journal of Clinical Pharmacology*. 36 (1996) 783–791. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1996.tb04251.x>.
- [124] P. Blanche, A. Rigolet, B. Gombert, C. Ginsburg, D. Salmon, D. Sicard, **Ergotism related to a single dose of ergotamine tartrate in an AIDS patient treated with ritonavir**, *Postgraduate Medical Journal*. (1999). <https://doi.org/10.1136/pgmj.75.887.546>.
- [125] J.K. Aronson, **Voriconazole**, *Meyler's Side Effects of Drugs. The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. 16 (2016) 504–521 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01643-7>.
- [126] T. Wang, S. Chen, J. Sun, J. Cai, X. Cheng, H. Dong, X. Wang, J. Xing, W. Dong, H. Yao, Y. Dong, **Identification of factors influencing the pharmacokinetics of voriconazole and the optimization of dosage regimens based on Monte Carlo simulation in patients with invasive fungal infections**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69 (2014) 463–470. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt369>.
- [127] L. Chen, T. Wang, Y. Wang, Q. Yang, J. Xie, Y. Li, J. Lei, X. Wang, J. Xing, Y. Dong, H. Dong, **Optimization of voriconazole dosage regimen to improve the efficacy in patients with invasive fungal disease by pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis**, *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 30 (2016) 459–465. <https://doi.org/10.1111/fcp.12212>.
- [128] S. Gastine, T. Lehrnbecher, C. Müller, F. Farowski, P. Bader, J. Ullmann-Moskovits, O.A. Cornely, A.H. Groll, G. Hempel, **Pharmacokinetic modeling of voriconazole to develop an alternative dosing regimen in children**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.01194-17>.
- [129] T. Wang, T. Zhang, T. Meng, Y. Li, L. Chen, Q. Yang, H. Dong, J. Lei, L. Chen, Y. Dong, **A strategy for designing voriconazole dosage regimens to prevent invasive pulmonary aspergillosis based on a cellular pharmacokinetics/pharmacodynamics model**, *Journal of Translational Medicine*. 16 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1533-4>.
- [130] Q. xia Ren, X. gang Li, J. song Mu, J. feng Bi, C. hui Du, Y. hong Wang, H. Zhu, P. Lv, Q. guo Zhao, **Population Pharmacokinetics of Voriconazole and Optimization of Dosage Regimens Based on Monte Carlo Simulation in Patients With Liver Cirrhosis**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 108 (2019) 3923–3931. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.09.019>.
- [131] D. Andes, K. Marchillo, T. Stamstad, R. Conklin, **In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (2003) 3165–3169. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3165-3169.2003>.
- [132] K.M. Job, J. Olson, C. Stockmann, J.E. Constance, E.Y. Enioutina, J.E. Rower, M.W. Linakis, A.H. Balch, T. Yu, X. Liu, E.A. Thorell, C.M.T. Sherwin, **Pharmacodynamic studies of voriconazole: informing the clinical management of invasive fungal infections**, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 14 (2016) 731–746. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1207526>.
- [133] J. Berman, D.J. Krysan, **Drug resistance and tolerance in fungi**, *Nature Reviews Microbiology*. 18 (2020) 319–331. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.
- [134] A.R. Sharpe, K. Lagrou, J.F. Meis, A. Chowdhary, S.R. Lockhart, P.E. Verweij, **Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus***, *Medical Mycology*. 56 (2018) S83–S92. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx144>.

- [135] M. Mroczyńska, E. Kurzyk, M. Śliwka-Kaszyńska, U. Nawrot, M. Adamik, A. Brillowska-Dąbrowska, **The effect of posaconazole, itraconazole and voriconazole in the culture medium on *Aspergillus fumigatus* triazole resistance**, *Microorganisms*. 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020285>.
- [136] P.E. Verweij, S.J. Howard, W.J.G. Melchers, D.W. Denning, **Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints**, *Drug Resistance Updates*. 12 (2009) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.09.002>.
- [137] J.F. Meis, A. Chowdhary, J.L. Rhodes, M.C. Fisher, P.E. Verweij, **Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus***, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. (2016). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0460>.
- [138] A.G.S. Warrilow, J.E. Parker, C.L. Price, W.D. Nes, S.L. Kelly, D.E. Kelly, **In Vitro biochemical study of CYP51-mediated azole resistance in *Aspergillus fumigatus***, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59 (2015) 7771–7778. <https://doi.org/10.1128/AAC.01806-15>.
- [139] M. Liu, N. Zheng, D. Li, H. Zheng, L. Zhang, H. Ge, W. Liu, **Cyp51A-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Illustration by a new 3D Structural Model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein**, *Medical Mycology*. 54 (2016) 400–408. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv102>.
- [140] R. Gollapudy, S. Ajmani, S.A. Kulkarni, **Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14- α demethylase “A” with azole antifungals**, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 12 (2004) 2937–2950. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.034>.
- [141] E. Mavridou, R.J.M. Bruggemann, W.J.G. Melchers, P.E. Verweij, J.W. Mouton, **Impact of cyp51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (2010) 4758–4764. <https://doi.org/10.1128/AAC.00606-10>.
- [142] A. Pérez-Cantero, L. López-Fernández, J. Guarro, J. Capilla, **Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 55 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.011>.
- [143] R. Rajendran, E. Mowat, E. McCulloch, D.F. Lappin, B. Jones, S. Lang, J.B. Majithiya, P. Warn, C. Williams, G. Ramage, **Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (2011) 2092–2097. <https://doi.org/10.1128/AAC.01189-10>.
- [144] I. Meneau, A.T. Coste, D. Sanglard, **Identification of aspergillus fumigates multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance**, *Medical Mycology*. 54 (2016) 616–627. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw005>.
- [145] R. Prasad, K. Kapoor, **Multidrug resistance in yeast *Candida***, *International Review of Cytology*. 242 (2004) 215–248. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42005-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42005-1).
- [146] V.-K. Tran-Nguyen, R. Prasad, P. Falson, A. Boumendjel, **Modulators of the Efflux Pump Cdr1p of *Candida albicans*: Mechanisms of Action and Chemical Features**, *Current Medicinal Chemistry*. 24 (2017). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170523102244>.
- [147] S. Nim, L.G. Lobato, A. Moreno, V. Chaptal, M.K. Rawal, P. Falson, R. Prasad, **Atomic modelling and systematic mutagenesis identify residues in multiple drug binding sites that are essential for drug resistance in the major *Candida* transporter Cdr1**, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1858 (2016) 2858–2870. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.011>.
- [148] R. Prasad Dr, M.K. Rawal, **Efflux pump proteins in antifungal resistance**, *Frontiers in Pharmacology*. 5 AUG (2014) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00202>.
- [149] L. Alcazar-Fuoli, E. Mellado, **Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance**, *Frontiers in Microbiology*. 3 (2012) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00439>.

- [150] J.M. Rybak, W. Ge, N.P. Wiederhold, J.E. Parker, S.L. Kelly, P.D. Rogers, J.R. Fortwendel, **Mutations in hmg1, challenging the paradigm of clinical triazole resistance in aspergillus fumigatus**, *MBio*. (2019). <https://doi.org/10.1128/mBio.00437-19>.
- [151] D.S. Perlin, E. Shor, Y. Zhao, **Update on Antifungal Drug Resistance**, *Current Clinical Microbiology Reports*. 2 (2015) 84–95. <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0015-1>.
- [152] T. Vasconcelos, B. Sarmento, P. Costa, **Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs**, *Drug Discovery Today*. 12 (2007) 1068–1075. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.09.005>.
- [153] S. V. Jermain, C. Brough, R.O. Williams, **Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update**, *International Journal of Pharmaceutics*. 535 (2018) 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.051>.
- [154] C. Leuner, J. Dressman, **Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50 (2000) 47–60. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00076-X).
- [155] C.L.N. Vo, C. Park, B.J. Lee, **Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 85 (2013) 799–813. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.007>.
- [156] S.P. Chaudhari, R.P. Dugar, **Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs**, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 41 (2017) 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.010>.
- [157] R. Palmeiro-Roldán, C. Fonseca-Berzal, A. Gómez-Barrio, V.J. Arán, J.A. Escario, S. Torrado-Durán, S. Torrado-Santiago, **Development of novel benzimidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease**, *International Journal of Pharmaceutics*. 472 (2014) 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.015>.
- [158] D. Douroumis, A. Fahr, **Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs**, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*. (2013) 403–416. <https://doi.org/10.1002/9781118444726>.
- [159] K. Sekiguchi, N. Obi, **Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man**, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. (1961). <https://doi.org/10.1248/cpb.9.866>.
- [160] J.L. Kanig, **Properties of fused mannitol in compressed tablets**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53 (1964) 188–192. <https://doi.org/10.1002/jps.2600530217>.
- [161] K. Sekiguchi, N. Obi, Y. Ueda, **Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II.1-2 Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits**, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. (1964). <https://doi.org/10.1248/cpb.12.134>.
- [162] A.H. Goldberg, M. Gibaldi, J.L. Kanig, M. Mayersohn, **Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures IV: Chloramphenicol–urea system**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55 (1966) 581–583. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550610>.
- [163] W.L. Chiou, S. Riegelman, **Pharmaceutical applications of solid dispersion systems**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60 (1971) 1281–1302. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600902>.
- [164] B. Yang, C. Wei, F. Qian, S. Li, **Surface Wettability Modulated by Surfactant and Its Effects on the Drug Release and Absorption of Fenofibrate Solid Dispersions**, *AAPS PharmSciTech*. 20 (2019). <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1446-4>.
- [165] J.S. Choi, S.E. Lee, W.S. Jang, J.C. Byeon, J.S. Park, **Tadalafil solid dispersion formulations based on PVP/VA S-630: Improving oral bioavailability in rats**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 106 (2017) 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.065>.

- [166] D.P. Otto, A. Otto, M.M. De Villiers, **Experimental and mesoscale computational dynamics studies of the relationship between solubility and release of quercetin from PEG solid dispersions**, *International Journal of Pharmaceutics*. 456 (2013) 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.039>.
- [167] A. Ceballos, M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti, P. Mura, **Influence of formulation and process variables on in vitro release of theophylline from directly-compressed Eudragit matrix tablets**, *Farmaco*. 60 (2005) 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2005.07.002>.
- [168] N.V. Dhandapani, A.A. El-gied, **Solid dispersions of cefixime using β -cyclodextrin: Characterization and in vitro evaluation**, *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 10 (2016) 1523–1527.
- [169] N. Fan, Z. He, P. Ma, X. Wang, C. Li, J. Sun, Y. Sun, J. Li, **Impact of HPMC on inhibiting crystallization and improving permeability of curcumin amorphous solid dispersions**, *Carbohydrate Polymers*. 181 (2018) 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.004>.
- [170] E. Karavas, E. Georgarakis, D. Bikiaris, **Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 64 (2006) 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.12.013>.
- [171] E. Karavas, E. Georgarakis, M.P. Sigalas, K. Avgoustakis, D. Bikiaris, **Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 66 (2007) 334–347. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.020>.
- [172] N. Kohri, Y. Yamayoshi, H. Xin, K. Iseki, N. Sato, S. Todo, K. Miyazaki, **Improving the Oral Bioavailability of Albendazole in Rabbits by the Solid Dispersion Technique**, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51 (1999) 159–164. <https://doi.org/10.1211/0022357991772277>.
- [173] N. Passerini, B. Albertini, M.L. González-Rodríguez, C. Cavallari, L. Rodríguez, **Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15 (2002) 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00210-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00210-X).
- [174] A. Kalivoda, M. Fischbach, P. Kleinebudde, **Application of mixtures of polymeric carriers for dissolution enhancement of oxeglitazar using hot-melt extrusion**, *International Journal of Pharmaceutics*. 439 (2012) 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.013>.
- [175] J. Moes, S. Koolen, A. Huitema, J. Schellens, J. Beijnen, B. Nuijen, **Development of an oral solid dispersion formulation for use in low-dose metronomic chemotherapy of paclitaxel**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 83 (2013) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.016>.
- [176] R.H. Dave, H.H. Patel, E. Donahue, A.D. Patel, **To evaluate the change in release from solid dispersion using sodium lauryl sulfate and model drug sulfathiazole**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 39 (2013) 1562–1572. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.725731>.
- [177] P. Koh, J. Chuah, M. Talekar, A. Gorajana, S. Garg, **Formulation development and dissolution rate enhancement of efavirenz by solid dispersion systems**, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 75 (2013) 291–301. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.117434>.
- [178] M. Gómez-Burgaz, B. García-Ochoa, S. Torrado-Santiago, **Chitosan-carboxymethylcellulose interpolymer complexes for gastric-specific delivery of clarithromycin**, *International Journal of Pharmaceutics*. 359 (2008) 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.042>.
- [179] F. Cui, M. Yang, Y. Jiang, D. Cun, W. Lin, Y. Fan, Y. Kawashima, **Design of sustained-release nitrendipine microspheres having solid dispersion structure by quasi-emulsion solvent diffusion method**, *Journal of Controlled Release*. 91 (2003) 375–384. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00275-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00275-X).

- [180] T. Ohara, S. Kitamura, T. Kitagawa, K. Terada, **Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose**, *International Journal of Pharmaceutics*. 302 (2005) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.019>.
- [181] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, **Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications**, *International Journal of Pharmaceutics*. 420 (2011) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.032>.
- [182] T. Vasconcelos, S. Marques, J. das Neves, B. Sarmiento, **Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process**, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 100 (2016) 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.012>.
- [183] M. Zhang, H. Li, B. Lang, K. O'Donnell, H. Zhang, Z. Wang, Y. Dong, C. Wu, R.O. Williams, **Formulation and delivery of improved amorphous fenofibrate solid dispersions prepared by thin film freezing**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 82 (2012) 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.06.016>.
- [184] L.S. Taylor, G. Zografi, **Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions**, *Pharmaceutical Research*. 14 (1997) 1691–1698. <https://doi.org/10.1023/A:1012167410376>.
- [185] R. Kaushik, V. Budhwar, D. Kaushik, **An Overview on Recent Patents and Technologies on Solid Dispersion**, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 14 (2020). <https://doi.org/10.2174/1872211314666200117094406>.
- [186] A.G. Cid, A. Simonazzi, S.D. Palma, J.M. Bermúdez, **Solid dispersion technology as a strategy to improve the bioavailability of poorly soluble drugs**, *Therapeutic Delivery*. 10 (2019) 363–382. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0007>.
- [187] J. Breitenbach, **Melt extrusion: from process to drug delivery technology**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 54 (2002) 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00061-9).
- [188] H. He, R. Yang, X. Tang, **In vitro and in vivo evaluation of fenofibrate solid dispersion prepared by hot-melt extrusion**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 36 (2010) 681–687. <https://doi.org/10.3109/03639040903449720>.
- [189] B. Lang, J.W. McGinity, R.O. Williams, **Hot-melt extrusion-basic principles and pharmaceutical applications**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 40 (2014) 1133–1155. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.838577>.
- [190] M. Wilson, M.A. Williams, D.S. Jones, G.P. Andrews, **Hot-melt extrusion technology and pharmaceutical application**, *Therapeutic Delivery*. 3 (2012) 787–797. <https://doi.org/10.4155/tde.12.26>.
- [191] H. Patil, R. V. Tiwari, M.A. Repka, **Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation**, *AAPS PharmSciTech*. 17 (2016) 20–42. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0360-7>.
- [192] W. Roth, B. Setnik, M. Zietsch, A. Burst, J. Breitenbach, E. Sellers, D. Brennan, **Ethanol effects on drug release from Verapamil Meltrex®, an innovative melt extruded formulation**, *International Journal of Pharmaceutics*. 368 (2009) 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.052>.
- [193] P. Tran, Y.C. Pyo, D.H. Kim, S.E. Lee, J.K. Kim, J.S. Park, **Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs**, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030132>.

- [194] X.Y. Hu, H. Lou, M.J. Hageman, **Preparation of lapatinib ditosylate solid dispersions using solvent rotary evaporation and hot melt extrusion for solubility and dissolution enhancement**, *International Journal of Pharmaceutics*. 552 (2018) 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.062>.
- [195] H. Al-Obaidi, R.M. Kowalczyk, R. Kalgudi, M.G. Zariwala, **Griseofulvin solvate solid dispersions with synergistic effect against fungal biofilms**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 184 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110540>.
- [196] D.K. Mishra, V. Dhote, A. Bhargava, D.K. Jain, P.K. Mishra, **Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications**, *Drug Delivery and Translational Research*. 5 (2015) 552–565. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0256-9>.
- [197] R. Pisano, A. Arsiccio, L.C. Capozzi, B.L. Trout, **Achieving continuous manufacturing in lyophilization: Technologies and approaches**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 142 (2019) 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.027>.
- [198] N. Sun, X. Wei, B. Wu, J. Chen, Y. Lu, W. Wu, **Enhanced dissolution of silymarin/polyvinylpyrrolidone solid dispersion pellets prepared by a one-step fluid-bed coating technique**, *Powder Technology*. 182 (2008) 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.05.029>.
- [199] D. Blankschtein, A. Shiloach, N. Zoeller, **Thermodynamic theories of micellar and vesicular systems**, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2 (1997) 294–300. [https://doi.org/10.1016/s1359-0294\(97\)80038-6](https://doi.org/10.1016/s1359-0294(97)80038-6).
- [200] L. Magnus Bergström, **Second CMC in surfactant micellar systems**, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 22 (2016) 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.02.008>.
- [201] A.I. Rusanov, **Theory of surfactant diffusion in micellar systems with variable aggregation numbers**, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 551 (2018) 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.04.065>.
- [202] X. Zhang, N. Liang, X. Gong, Y. Kawashima, F. Cui, S. Sun, **Tumor-targeting micelles based on folic acid and α -tocopherol succinate conjugated hyaluronic acid for paclitaxel delivery**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 177 (2019) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.044>.
- [203] H. Liu, H. Xu, Y. Jiang, S. Hao, F. Gong, H. Mu, K. Liu, **Preparation, characterization, in vivo pharmacokinetics, and biodistribution of polymeric micellar dimethoxycurcumin for tumor targeting**, *International Journal of Nanomedicine*. 10 (2015) 6395–6410. <https://doi.org/10.2147/IJN.S91961>.
- [204] A.A. Sultan, S.A. El-Gizawy, M.A. Osman, G.M. El Maghraby, **Self dispersing mixed micelles forming systems for enhanced dissolution and intestinal permeability of hydrochlorothiazide**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 149 (2017) 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.028>.
- [205] C. Agbo, C. Umeyor, F. Kenechukwu, J. Ogbonna, S. Chime, C. Lovelyn, O. Agubata, K. Ofokansi, A. Attama, **Formulation design, in vitro characterizations and anti-malarial investigations of artemether and lumefantrine-entrapped solid lipid microparticles**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 42 (2016) 1708–1721. <https://doi.org/10.3109/03639045.2016.1171331>.
- [206] M. Cagel, F.C. Tesan, E. Bernabeu, M.J. Salgueiro, M.B. Zubillaga, M.A. Moretton, D.A. Chiappetta, **Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 113 (2017) 211–228. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019>.
- [207] USP, **U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 38 NF 33]**, Rockville, Md: United States Pharmacopoeial Convention. (2015).

- [208] D. Joseph, H. Lee, Y.S. Huh, Y.K. Han, **Cylindrical core-shell tween 80 micelle templated green synthesis of gold-silver hollow cubic nanostructures as efficient nanocatalysts**, *Materials and Design*. 160 (2018) 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.09.003>.
- [209] G. Kaur, S.K. Mehta, **Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications**, *International Journal of Pharmaceutics*. 529 (2017) 134–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>.
- [210] T. Tran, T. Rades, A. Müllertz, **Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine and Kolliphor® RH40 using experimental design**, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13 (2018) 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.09.006>.
- [211] C. Bosch Ojeda, F. Sanchez Rojas, **Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry**, *Analytica Chimica Acta*. 518 (2004) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.036>.
- [212] N.S. Abdullah, M.A. Hassan, R.O. Hassan, **Spectrophotometric determination of chlorthalidone in pharmaceutical formulations using different order derivative methods**, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S3426–S3433. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.02.002>.
- [213] E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, A.K. Singh, A.C. Peraro, **First-derivative ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical emulsions**, *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42 (2006) 91–98. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100010>.
- [214] N. Erk, **Quantitative analysis of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in nasal drops by differential-derivative spectrophotometric, zero-crossing first derivative UV spectrophotometric and absorbance ratio methods**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 23 (2000) 1023–1031. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00371-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00371-X).
- [215] N. Erk, **Rapid and simple methods for quantitative analysis of some antidepressant in pharmaceutical formulations by using first derivative spectrophotometry and HPLC**, *Farmaco*. 58 (2003) 1209–1216. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2003.07.008>.
- [216] S. Torrado, S. Torrado, R. Cadórniga, **Comparison of assay methods by second-derivative spectroscopy, colorimetry and fluorescence spectroscopy of salicylic acid in aspirin preparations with a high-performance liquid chromatographic method**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 12 (1994) 383–387. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)90015-9).
- [217] ICH, **ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology**, *International Conference on Harmonization*. (2005).
- [218] I. Lutsar, S. Roffey, P. Troke, **Voriconazole Concentrations in the Cerebrospinal Fluid and Brain Tissue of Guinea Pigs and Immunocompromised Patients**, *Clinical Infectious Diseases*. 37 (2003) 728–732. <https://doi.org/10.1086/377131>.
- [219] A. Pascual, V. Nieth, T. Calandra, J. Bille, S. Bolay, L.A. Decosterd, T. Buclin, P.A. Majcherczyk, D. Sanglard, O. Marchetti, **Variability of voriconazole plasma levels measured by new high-performance liquid chromatography and bioassay methods**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51 (2007) 137–143. <https://doi.org/10.1128/AAC.00957-06>.
- [220] J.A. Tolman, N.A. Nelson, Y.J. Son, S. Bosselmann, N.P. Wiederhold, J.I. Peters, J.T. McConville, R.O. Williams, **Characterization and pharmacokinetic analysis of aerosolized aqueous voriconazole solution**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72 (2009) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.014>.

- [221] V.P. Shah, L.J. Lesko, J. Fan, N. Fleischer, J. Handerson, H. Malinowski, M. Makary, L. Ouderkirk, S. Bay, P. Sathe, G.J.P. Singh, L. Iillman, Y. Tsong, R.I. Williams, **FDA guidance for industry 1 dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**, *Dissolution Technologies*. 4 (1997) 15–22. <https://doi.org/10.14227/DT040497P15>.
- [222] T. Miletic, K. Kyriakos, A. Graovac, S. Ibric, **Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability**, *Carbohydrate Polymers*. 98 (2013) 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.084>.
- [223] CLSI, **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**, *M38*. 3 (2017).
- [224] CLSI, **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**, *M27*. 4 (2017).
- [225] M. Siopi, E. Neroutsos, K. Zisaki, M. Gamaletsou, M. Pirounaki, P. Tsirigotis, N. Sipsas, A. Dokoumetzidis, E. Goussetis, L. Zerva, G. Valsami, J. Meletiadiis, **Bioassay for determining voriconazole serum levels in patients receiving combination therapy with echinocandins**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60 (2016) 632–636. <https://doi.org/10.1128/AAC.01688-15>.
- [226] M. Siopi, M. Gamaletsou, N. Sipsas, M. Pirounaki, M. Stamouli, L. Zerva, J. Meletiadiis, **Determination of voriconazole levels in serum of hematological patents with a microbiological assay**, *Acta Microbiologica Hellenica*. (2013). <https://doi.org/10.1128/AAC.00323-13>.
- [227] B.V. de Araujo, C.F. da Silva, S.E. Haas, T. Dalla Costa, **Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida sp.*-infected Wistar rats**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33 (2009) 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.020>.
- [228] B. V. Araujo, C.F. Silva, S.E. Haas, T. Dalla Costa, **Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47 (2008) 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.025>.
- [229] K. V. Clemons, J.A. Schwartz, D.A. Stevens, **Experimental central nervous system aspergillosis therapy: Efficacy, drug levels and localization, immunohistopathology, and toxicity**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (2012) 4439–4449. <https://doi.org/10.1128/AAC.06015-11>.
- [230] A.M. Sugar, X.P. Liu, **Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (2001) 601–604. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.601-604.2001>.
- [231] J. Capilla, C. Serena, F.J. Pastor, M. Ortoneda, J. Guarro, **Efficacy of Voriconazole in Treatment of Systemic Scedosporiosis in Neutropenic Mice**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (2003) 3976–3978. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3976-3978.2003>.
- [232] K. V. Clemons, D.A. Stevens, **Comparative Efficacies of Four Amphotericin B Formulations - Fungizone, Amphotec (Amphocil), AmBisome, and Abelcet - Against Systemic Murine Aspergillosis**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2004). <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.1047-1050.2004>.
- [233] A. Martin-Vicente, J. Guarro, G.M. González, C. Lass-Flörl, M. Lackner, J. Capilla, **Voriconazole MICs are predictive for the outcome of experimental disseminated scedosporiosis**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72 (2017) 1118–1122. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw532>.
- [234] M. Sanchis, J. Guarro, D.A. Sutton, A.W. Fothergill, N. Wiederhold, J. Capilla, **Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection**, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 84 (2016) 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.010>.

- [235] E. Calvo, F.J. Pastor, M.M. Rodríguez, I. Pujol, J. Guarro, **Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii***, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (2010) 4074–4077. <https://doi.org/10.1128/AAC.00172-10>.
- [236] M. Ohbuchi, K. Yoshinari, H. Kaneko, S. Matsumoto, A. Inoue, A. Kawamura, T. Usui, Y. Yamazoe, **Coordinated roles of pregnane x receptor and constitutive androstane receptor in autoinduction of voriconazole metabolism in mice**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (2013) 1332–1338. <https://doi.org/10.1128/AAC.01900-12>.
- [237] K. Takemoto, Y. Yamamoto, Y. Ueda, K. Kanazawa, K. Yoshida, Y. Niki, **Comparative study on the efficacy of liposomal amphotericin B and voriconazole in a murine pulmonary aspergillosis model**, *Chemotherapy*. 55 (2009) 105–113. <https://doi.org/10.1159/000194661>.
- [238] L.J. Langman, F. Boakye-Agyeman, **Measurement of voriconazole in serum and plasma**, *Clinical Biochemistry*. 40 (2007) 1378–1385. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.07.024>.
- [239] A.M. Sugar, X.-P. Liu, **Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse**, *Medical Mycology*. (2000). <https://doi.org/10.1080/714030944>.
- [240] J. Majithiya, A. Sharp, A. Parmar, D.W. Denning, P.A. Warn, **Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei***, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63 (2009) 161–166. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn431>.
- [241] A.F. Gazzoni, J. Capilla, E. Mayayo, J. Guarro, **Efficacy of intrathecal administration of liposomal amphotericin B combined with voriconazole in a murine model of cryptococcal meningitis**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39 (2012) 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.014>.
- [242] M.M. Rodríguez, F.J. Pastor, C. Serena, J. Guarro, **Efficacy of voriconazole in a murine model of invasive paecilomycosis**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35 (2010) 362–365. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.018>.
- [243] P. Navarro-Rodríguez, M. Guevara-Suarez, K. Paredes, A. Celis, J. Guarro, J. Capilla, **Lack of correlation of ECV and outcome in an in vivo murine model of systemic fusariosis**, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 92 (2018) 124–126. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.019>.
- [244] S. Hernandez, G.M. Gonzalez, D.I. McCarthy, A.L. Colombo, L.K. Najvar, R. Bocanegera, J.R. Graybill, **Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54 (2004) 477–480. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh335>.
- [245] P.J. Das, P. Paul, B. Mukherjee, B. Mazumder, L. Mondal, R. Baishya, M.C. Debnath, K.S. Dey, **Pulmonary Delivery of Voriconazole Loaded Nanoparticles Providing a Prolonged Drug Level in Lungs: A Promise for Treating Fungal Infection**, *Molecular Pharmaceutics*. 12 (2015) 2651–2664. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00064>.
- [246] D.F.M.C. Veloso, N.I.G.M. Benedetti, R.I. Avila, T.S.A. Bastos, T.C. Silva, M.R.R. Silva, A.C. Batista, M.C. Valadares, E.M. Lima, **Intravenous delivery of a liposomal formulation of voriconazole improves drug pharmacokinetics, tissue distribution, and enhances antifungal activity**, *Drug Delivery*. 25 (2018) 1585–1594. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1492046>.
- [247] A. García-Arieta, **Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 65 (2014) 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.004>.
- [248] R.M. Moosa, Y.E. Choonara, L.C. Du Toit, P. Kumar, L.K. Tomar, C. Tyagi, T.R. Carmichael, V. Pillay, **In vitro pharmaceutical characterization and statistical optimization of a novel topically applied instantly-soluble solid eye drop matrix**, *Pharmaceutical Development and Technology*. 20 (2015) 854–862. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.930488>.

- [249] A. Madgulkar, M. Bandivadekar, T. Shid, S. Rao, **Sugars as solid dispersion carrier to improve solubility and dissolution of the BCS class II drug: Clotrimazole**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 42 (2016) 28–38. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1024683>.
- [250] R. Berthelsen, R. Holm, J. Jacobsen, J. Kristensen, B. Abrahamsson, A. Müllertz, **Kolliphor surfactants affect solubilization and bioavailability of fenofibrate. Studies of in vitro digestion and absorption in rats**, *Molecular Pharmaceutics*. 12 (2015) 1062–1071. <https://doi.org/10.1021/mp500545k>.
- [251] R. Rashid, D.W. Kim, F.U. Din, O. Mustapha, A.M. Yousaf, J.H. Park, J.O. Kim, C.S. Yong, H.G. Choi, **Effect of hydroxypropylcellulose and Tween 80 on physicochemical properties and bioavailability of ezetimibe-loaded solid dispersion**, *Carbohydrate Polymers*. 130 (2015) 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.071>.
- [252] R. Rashid, D.W. Kim, A.M. Yousaf, O. Mustapha, F. Ud Din, J.H. Park, C.S. Yong, Y.K. Oh, Y.S. Youn, J.O. Kim, H.G. Choi, **Comparative study on solid self-nanoemulsifying drug delivery and solid dispersion system for enhanced solubility and bioavailability of ezetimibe**, *International Journal of Nanomedicine*. 10 (2015) 6147–6159. <https://doi.org/10.2147/IJN.S91216>.
- [253] L. Bai, Y. Chen, H. Yin, X. Sui, D. Wu, Y. Feng, **Insights into the stability of polytetrafluoroethylene aqueous dispersion: Role of surfactant**, *Journal of Molecular Liquids*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113662>.
- [254] J.J. García-Rodríguez, P.M. De La Torre-Iglesias, M.C. Vegas-Sánchez, S. Torrado-Durán, F. Bolás-Fernández, S. Torrado-Santiago, **Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity**, *International Journal of Pharmaceutics*. 403 (2011) 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.002>.
- [255] S. Alshehri, S.S. Imam, M.A. Altamimi, A. Hussain, F. Shakeel, E. Elzayat, K. Mohsin, M. Ibrahim, F. Alanazi, **Enhanced Dissolution of Luteolin by Solid Dispersion Prepared by Different Methods: Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity**, *ACS Omega*. (2020). <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04075>.
- [256] R.B. Chavan, A. Lodagekar, B. Yadav, N.R. Shastri, **Amorphous solid dispersion of nisoldipine by solvent evaporation technique: preparation, characterization, in vitro, in vivo evaluation, and scale up feasibility study**, *Drug Delivery and Translational Research*. (2020). <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00775-8>.
- [257] R. Pradhan, T.H. Tran, S.Y. Kim, K.B. Woo, Y.J. Choi, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, **Preparation and characterization of fast dissolving flurbiprofen and esomeprazole solid dispersion using spray drying technique**, *International Journal of Pharmaceutics*. 502 (2016) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.020>.
- [258] R. Chen, X. Wang, W. Liu, K. Zhang, Y. Li, Z. Wei, **A Comparative Study on Dissolution Enhancement of Acetaminophen by Cooling, Anti-solvent, and Solvent Evaporation Crystallization**, *AAPS PharmSciTech*. 18 (2017) 224–230. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0510-6>.
- [259] Z.H. Zheng, H. Bin Lan, Z.H. Su, H.X. Peng, J.T. Luo, G.X. Liang, P. Fan, **Single Source Thermal Evaporation of Two-dimensional Perovskite Thin Films for Photovoltaic Applications**, *Scientific Reports*. 9 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53609-0>.
- [260] V. García-Herrero, C. Torrado, J.J. García-Rodríguez, A. López-Sánchez, S. Torrado, S. Torrado-Santiago, **Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: In vitro and in vivo studies**, *International Journal of Pharmaceutics*. 529 (2017) 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.028>.
- [261] H.J. Jung, H.I. Ahn, J.Y. Park, M.J. Ho, D.R. Lee, H.R. Cho, J.S. Park, Y.S. Choi, M.J. Kang, **Improved oral absorption of tacrolimus by a solid dispersion with hypromellose and sodium lauryl sulfate**, *International Journal of Biological Macromolecules*. 83 (2016) 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.063>.

- [262] B. Yang, L. Xu, Q. Wang, S. Li, **Modulation of the wettability of excipients by surfactant and its impacts on the disintegration and release of tablets**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 42 (2016) 1945–1955. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1185436>.
- [263] N.A. Beinborn, H.L. Lirola, R.O. Williams, **Effect of process variables on morphology and aerodynamic properties of voriconazole formulations produced by thin film freezing**, *International Journal of Pharmaceutics*. 429 (2012) 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.010>.
- [264] P.N. Kendre, P.D. Chaudhari, **Effect of amphiphilic graft co-polymer-carrier on physical stability of bosentan nanocomposite: Assessment of solubility, dissolution and bioavailability**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 126 (2018) 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.024>.
- [265] P. Füredi, Z.E. Pápay, K. Kovács, B.D. Kiss, K. Ludányi, I. Antal, I. Klebovich, **Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 132 (2017) 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.047>.
- [266] J.J.M. Ramos, H.P. Diogo, **The slow relaxation dynamics in active pharmaceutical ingredients studied by DSC and TSDC: Voriconazole, miconazole and itraconazole**, *International Journal of Pharmaceutics*. 501 (2016) 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.057>.
- [267] M. Kumar, R. Bhatia, R.K. Rawal, **Applications of various analytical techniques in quality control of pharmaceutical excipients**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 157 (2018) 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.023>.
- [268] S. Dedroog, T. Pas, B. Vergauwen, C. Huygens, G. Van den Mooter, **Solid-state analysis of amorphous solid dispersions: Why DSC and XRPD may not be regarded as stand-alone techniques**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 178 (2020) 112937. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112937>.
- [269] S. Motallae, A. Taheri, A. Homayouni, **Preparation and characterization of solid dispersions of celecoxib obtained by spray-drying ethanolic suspensions containing PVP-K30 or isomalt**, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 46 (2018) 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.020>.
- [270] C.H. Chen, H.K. Wang, S.K. Wu, **A study on the crystallization behavior of amorphous Ti50Ni25Cu25 shape memory ribbon by X-ray diffraction measurement**, *Intermetallics*. 93 (2018) 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2017.10.019>.
- [271] P. Füredi, K. Kovács, K. Ludányi, I. Antal, I. Klebovich, **Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery**, *International Journal of Pharmaceutics*. 510 (2016) 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.027>.
- [272] C. Bhugra, M.J. Pikal, **Role of thermodynamic, molecular, and kinetic factors in crystallization from the amorphous state**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2008). <https://doi.org/10.1002/jps.21138>.
- [273] F. Artusio, R. Pisano, **Surface-induced crystallization of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: A review**, *International Journal of Pharmaceutics*. 547 (2018) 190–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.069>.
- [274] H. Miyanishi, T. Nemoto, M. Mizuno, H. Mimura, S. Kitamura, Y. Iwao, S. Noguchi, S. Itai, **Evaluation of crystallization behavior on the surface of nifedipine solid dispersion powder using inverse gas chromatography**, *Pharmaceutical Research*. 30 (2013) 502–511. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0896-0>.
- [275] S. Bhattacharya, R. Suryanarayanan, **Local mobility in amorphous pharmaceuticals - Characterization and implications on stability**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98 (2009) 2935–2953. <https://doi.org/10.1002/jps.21728>.

- [276] R. Abreu-Villela, M. Schönenberger, I. Caraballo, M. Kuentz, **Early stages of drug crystallization from amorphous solid dispersion via fractal analysis based on chemical imaging**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 133 (2018) 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.007>.
- [277] S. Baghel, H. Cathcart, N.J. O'Reilly, **Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 105 (2016) 2527–2544. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.008>.
- [278] I.A. Colosi, O. Faure, B. Dessaigne, C. Bourdon, B. Lebeau, H.A. Colosi, H. Pelloux, **Susceptibility of 100 filamentous fungi: Comparison of two diffusion methods, Neo-Sensitabs and E-test, for amphotericin B, caspofungin, itraconazole, voriconazole and posaconazole**, *Medical Mycology*. 50 (2012) 378–385. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.616543>.
- [279] A. Espinel-Ingroff, B. Arthington-Skaggs, N. Iqbal, D. Ellis, M.A. Pfaller, S. Messer, M. Rinaldi, A. Fothergill, D.L. Gibbs, A. Wang, **Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin**, *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (2007) 1811–1820. <https://doi.org/10.1128/JCM.00134-07>.
- [280] K.S. Gregg, C.A. Kauffman, **Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Clinical Aspects, and Treatment**, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36 (2015) 662–672. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562893>.
- [281] T.F. Patterson, G.R. Thompson, D.W. Denning, J.A. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, M.H. Nguyen, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, T.J. Walsh, J.R. Wingard, J.A.H. Young, J.E. Bennett, **Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America**, *Clinical Infectious Diseases*. 63 (2016) e1–e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>.
- [282] J. Pemán, M. Salavert, **Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora**, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30 (2012) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.004>.
- [283] D.R. Andes, M.A. Ghannoum, P.K. Mukherjee, L.L. Kovanda, Q. Lu, M.E. Jones, A.S. Henriksen, C. Lademacher, W.W. Hope, **Outcomes by MIC values for patients treated with isavuconazole or voriconazole for invasive aspergillosis in the phase 3 seCURE and vital trials**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63 (2019) 1–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01634-18>.
- [284] A. Forastiero, L. Bernal-Martínez, E. Mellado, E. Cendejas, A. Gomez-Lopez, **In vivo efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46 (2015) 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.007>.
- [285] B.C. Monk, A.A. Sagatova, P. Hosseini, Y.N. Ruma, R.K. Wilson, M. V. Keniya, **Fungal Lanosterol 14 α -demethylase: A target for next-generation antifungal design**, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1868 (2020) 140206. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.008>.
- [286] M.S. Qurt, İ. Esentürk, S. Birteksöz Tan, M.S. Erdal, A. Araman, S. Güngör, **Voriconazole and sertaconazole loaded colloidal nano-carriers for enhanced skin deposition and improved topical fungal treatment**, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 48 (2018) 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.09.020>.
- [287] G.N. El-Hadidy, H.K. Ibrahim, M.I. Mohamed, M.F. El-Milligi, **Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: Formulation and in vitro evaluation**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 38 (2012) 64–72. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.590731>.

- [288] M.S. Espuelas, P. Legrand, M.A. Campanero, M. Appel, M. Chéron, C. Gamazo, G. Barratt, J.M. Irache, **Polymeric carriers for amphotericin B: In vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52 (2003) 419–427. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg351>.
- [289] K. Adkison, A. Wolstenholme, Y. Lou, Z. Zhang, A. Eld, T. Perger, H. Vangerow, K. Hayward, M. Shaefer, C. McCoig, **Effect of Sorbitol on the Pharmacokinetic Profile of Lamivudine Oral Solution in Adults: An Open-Label, Randomized Study**, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 103 (2018) 402–408. <https://doi.org/10.1002/cpt.943>.
- [290] D. Adkin, S. Davis, R. Sparrow, P. Huckle, A. Phillips, I. Wilding, **The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit.**, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 39 (1995) 381–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1995.tb04466.x>.
- [291] P. Ding, H. Shen, J. Wang, J. Ju, **Improved oral bioavailability of magnolol by using a binary mixed micelle system**, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 46 (2018) 668–674. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468339>.
- [292] Q. Zhang, N.E. Polyakov, Y.S. Chistyachenko, M. V. Khvostov, T.S. Frolova, T.G. Tolstikova, A. V. Dushkin, W. Su, **Preparation of curcumin self-micelle solid dispersion with enhanced bioavailability and cytotoxic activity by mechanochemistry**, *Drug Delivery*. 25 (2018) 198–209. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1422298>.
- [293] Y.A. Choi, Y.H. Yoon, K. Choi, M. Kwon, S.H. Goo, J.S. Cha, M.K. Choi, H.S. Lee, I.S. Song, **Enhanced oral bioavailability of morin administered in mixed micelle formulation with PluronicF127 and Tween80 in rats**, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 38 (2015) 208–217. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00508>.
- [294] T. Yang, J. Feng, Q. Zhang, W. Wu, H. Mo, L. Huang, W. Zhang, **l-Carnitine conjugated chitosan-stearic acid polymeric micelles for improving the oral bioavailability of paclitaxel**, *Drug Delivery*. 27 (2020) 575–584. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748762>.
- [295] V. Piazzini, E. Landucci, M. Urru, A. Chiarugi, D.E. Pellegrini-Giampietro, A.R. Bilia, M.C. Bergonzi, **Enhanced dissolution, permeation and oral bioavailability of aripiprazole mixed micelles: In vitro and in vivo evaluation**, *International Journal of Pharmaceutics*. 583 (2020) 119361. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119361>.
- [296] P.A. Warn, A. Sharp, A. Parmar, J. Majithiya, D.W. Denning, W.W. Hope, **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel triazole, isavuconazole: Mathematical modeling, importance of tissue concentrations, and impact of immune status on antifungal effect**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 (2009) 3453–3461. <https://doi.org/10.1128/AAC.01601-08>.
- [297] A. Louie, M. Deziel, W. Liu, M.F. Drusano, T. Gumbo, G.L. Drusano, **Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: Importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (2005) 5058–5068. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5058-5068.2005>.
- [298] B.L. Sun, L. hua Wang, T. Yang, J. yi Sun, L. lei Mao, M. feng Yang, H. Yuan, R.A. Colvin, X. yi Yang, **Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases**, *Progress in Neurobiology*. 163–164 (2018) 118–143. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.08.007>.
- [299] J.M. Zolezzi, N.C. Inestrosa, **Brain metabolite clearance: impact on Alzheimer’s disease**, *Metabolic Brain Disease*. 29 (2014) 553–561. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9527-2>.
- [300] L. Dutta, B. Mukherjee, T. Chakraborty, M.K. Das, L. Mondal, S. Bhattacharya, R.H. Gaonkar, M.C. Debnath, **Lipid-based nanocarrier efficiently delivers highly water soluble drug across the blood-brain barrier into brain**, *Drug Delivery*. 25 (2018) 504–516. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1435749>.
- [301] P. Ramírez, J. Garnacho-Montero, **Invasive aspergillosis in critically ill patients**, *Revista Iberoamericana de Micología*. 35 (2018) 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.07.001>.

- [302] C. Kosmidis, D.W. Denning, **The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis**, *Thorax*. 70 (2015) 270–277. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206291>.
- [303] A. Espinel-ingroff, A. Rezusta, **E-Test Method for Testing Susceptibilities of**, *Society*. 40 (2002) 2101–2107. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2101>.
- [304] S.R. Baistrocchi, M.J. Lee, M. Lehoux, B. Ralph, B.D. Snarr, R. Robitaille, D.C. Sheppard, **Posaconazole-loaded leukocytes as a novel treatment strategy targeting invasive pulmonary aspergillosis**, *Journal of Infectious Diseases*. 215 (2017) 1734–1741. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw513>.
- [305] X. Hu, F.F. Yang, L.H. Quan, C.Y. Liu, X.M. Liu, C. Ehrhardt, Y.H. Liao, **Pulmonary delivered polymeric micelles - Pharmacokinetic evaluation and biodistribution studies**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 88 (2014) 1064–1075. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.10.010>.
- [306] A. López-Sánchez, A. Pérez-Cantero, C. Torrado-Salmerón, A. Martín-Vicente, V. García-Herrero, M.Á. González-Nicolás, A. Lázaro, A. Tejedor, S. Torrado-Santiago, J.J. García-Rodríguez, J. Capilla, S. Torradoa, **Efficacy, biodistribution, and nephrotoxicity of experimental amphotericin B-deoxycholate formulations for pulmonary aspergillosis**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62 (2018). <https://doi.org/10.1128/AAC.00489-18>.
- [307] K.K. Gill, S. Nazzal, A. Kaddoumi, **Paclitaxel loaded PEG5000-DSPE micelles as pulmonary delivery platform: Formulation characterization, tissue distribution, plasma pharmacokinetics, and toxicological evaluation**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 79 (2011) 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.04.017>.
- [308] S.L. Wu, T.Y. Wei, S.W. Lin, K.Y. Su, C.H. Kuo, **Metabolomics Investigation of Voriconazole-Induced Hepatotoxicity in Mice**, *Chemical Research in Toxicology*. 32 (2019) 1840–1849. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00176>.
- [309] P. Haegler, L. Joerin, S. Krähenbühl, J. Bouitbir, **Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents**, *Toxicological Sciences*. 157 (2017) 183–195. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx029>.
- [310] G. yuan Chen, H. hsuan Chiu, S. wen Lin, Y.J. Tseng, S. jeng Tsai, C. hua Kuo, **Development and application of a comparative fatty acid analysis method to investigate voriconazole-induced hepatotoxicity**, *Clinica Chimica Acta*. 438 (2015) 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.013>.
- [311] H. Jin, T. Wang, B.A. Falcione, K.M. Olsen, K. Chen, H. Tang, J. Hui, S. Zhai, **Trough concentration of voriconazole and its relationship with efficacy and safety: A systematic review and meta-analysis**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71 (2016) 1772–1785. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw045>.
- [312] Y. Wang, T. Wang, J. Xie, Q. Yang, X. Zheng, W. Dong, J. Xing, X. Wang, Y. Dong, **Risk Factors for Voriconazole-Associated Hepatotoxicity in Patients in the Intensive Care Unit**, *Pharmacotherapy*. 36 (2016) 757–765. <https://doi.org/10.1002/phar.1779>.
- [313] I. Kyriakidis, A. Tragiannidis, S. Munchen, A.H. Groll, **Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents**, *Expert Opinion on Drug Safety*. 16 (2017) 149–165. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1270264>.
- [314] J. Ruiz, M. Gordon, E. Villarreal, M. Peruccioni, M.R. Marqués, J.L. Poveda-Andrés, Á. Castellanos-Ortega, P. Ramirez, **Impact of voriconazole plasma concentrations on treatment response in critically ill patients**, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 44 (2019) 572–578. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12817>.
- [315] A.T. Turki, J. Rashidi-Alavijeh, J. Dürig, G. Gerken, P.M. Rath, O. Witzke, **Successful treatment of cerebral aspergillosis: Case report of a patient with T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL)**, *BMC Infectious Diseases*. 17 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2877-8>.

- [316] L. Thomas, C.R. Tracy, **Treatment of Fungal Urinary Tract Infection**, *Urologic Clinics of North America*. 42 (2015) 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2015.05.010>.
- [317] V. Kumar, V. Mundra, Y. Peng, Y. Wang, C. Tan, R.I. Mahato, **Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles containing miRNA and small-molecule drug in orthotopic pancreatic tumor-bearing mice**, *Theranostics*. 8 (2018) 4033–4049. <https://doi.org/10.7150/thno.24945>.
- [318] S. Kaga, N.P. Truong, L. Esser, D. Senyschyn, A. Sanyal, R. Sanyal, J.F. Quinn, T.P. Davis, L.M. Kaminskis, M.R. Whittaker, **Influence of Size and Shape on the Biodistribution of Nanoparticles Prepared by Polymerization-Induced Self-Assembly**, *Biomacromolecules*. 18 (2017) 3963–3970. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00995>.
- [319] S. Schwartz, M. Ruhnke, P. Ribaud, L. Corey, T. Driscoll, O.A. Cornely, U. Schuler, I. Lutsar, P. Troke, E. Thiel, **Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment**, *Blood*. 106 (2005) 2641–2645. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0733>.
- [320] A.H. Groll, N. Giri, V. Petraitis, R. Petraitiene, M. Candelario, J.S. Bacher, S.C. Piscitelli, T.J. Walsh, **Comparative Efficacy and Distribution of Lipid Formulations of Amphotericin B in Experimental Candida albicans Infection of the Central Nervous System**, *The Journal of Infectious Diseases*. 182 (2000) 274–282. <https://doi.org/10.1086/315643>.
- [321] K. Kato, M. Nagao, M. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Takakura, K. Fukuda, S. Ichiyama, **Oral administration and younger age decrease plasma concentrations of voriconazole in pediatric patients**, *Journal of Infection and Chemotherapy*. 22 (2016) 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.09.008>.
- [322] S.M. Rudramurthy, S. Seyedmousavi, M. Dhaliwal, A. Chakrabarti, J.F. Meis, J.W. Mouton, **Pharmacodynamics of voriconazole against wild-type and azole-resistant aspergillus flavus isolates in a nonneutropenic murine model of disseminated aspergillosis**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.01491-16>.
- [323] J.P. Maincent, L.K. Najvar, W.R. Kirkpatrick, S. Huang, T.F. Patterson, N.P. Wiederhold, J.I. Peters, R.O. Williams, **Modified release itraconazole amorphous solid dispersion to treat Aspergillus fumigatus: importance of the animal model selection**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. (2017). <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1236811>.
- [324] B. Lang, J.W. McGinity, R.O. Williams, **Dissolution enhancement of itraconazole by hot-melt extrusion alone and the combination of hot-melt extrusion and rapid freezing-effect of formulation and processing variables**, *Molecular Pharmaceutics*. 11 (2014) 186–196. <https://doi.org/10.1021/mp4003706>.
- [325] S. Deshmane, S. Deshmane, S. Shelke, K. Biyani, **Enhancement of solubility and bioavailability of ambrisentan by solid dispersion using Daucus carota as a drug carrier: formulation, characterization, in vitro, and in vivo study**, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 44 (2018) 1001–1011. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1428339>.
- [326] J.H. Park, H.K. Choi, **Enhancement of solubility and dissolution of cilostazol by solid dispersion technique**, *Archives of Pharmacal Research*. 38 (2015) 1336–1344. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0547-6>.
- [327] H. V. Ngo, P.H.L. Tran, B.J. Lee, T.T.D. Tran, **The roles of a surfactant in zein-HPMC blend solid dispersions for improving drug delivery**, *International Journal of Pharmaceutics*. 563 (2019) 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.009>.
- [328] S.M. Rajput, S. Kumar, V.K. Aswal, O.A. El Seoud, N.I. Malek, S.K. Kailasa, **Drug-Induced Micelle-to-Vesicle Transition of a Cationic Gemini Surfactant: Potential Applications in Drug Delivery**, *ChemPhysChem*. 19 (2018) 865–872. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701134>.

- [329] M. Fujimori, K. Kadota, Y. Tozuka, **Mixed Micelle System Produced by Interaction Between Transglycosylated Stevia and an Ionic Surfactant Improves Dissolution Profile of Mefenamic Acid**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 106 (2017) 1117–1123. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.12.024>.
- [330] T. Pan, C. Liu, X. Zeng, Q. Xin, M. Xu, Y. Deng, W. Dong, **Biotoxicity and bioavailability of hydrophobic organic compounds solubilized in nonionic surfactant micelle phase and cloud point system**, *Environmental Science and Pollution Research*. 24 (2017) 14795–14801. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9076-4>.
- [331] H. Al-Hamidi, W.M. Obeidat, A. Nokhodchi, **The dissolution enhancement of piroxicam in its physical mixtures and solid dispersion formulations using gluconolactone and glucosamine hydrochloride as potential carriers**, *Pharmaceutical Development and Technology*. 20 (2015) 74–83. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.871029>.
- [332] J.A. Baird, L.S. Taylor, **Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques**, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64 (2012) 396–421. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.07.009>.
- [333] B.C. Hancock, G. Zografi, **The Relationship Between the Glass Transition Temperature and the Water Content of Amorphous Pharmaceutical Solids**, *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. 11 (1994) 471–477. <https://doi.org/10.1023/A:1018941810744>.
- [334] B. Yang, L. Wu, J. Ke, L. Zhou, M. Chen, S. Li, X. Feng, **Effects of Polymer/Surfactant as Carriers on the Solubility and Dissolution of Fenofibrate Solid Dispersion**, *AAPS PharmSciTech*. 20 (2019). <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1273-z>.
- [335] J.E.K. Schawe, **Remarks regarding the determination of the initial crystallinity by temperature modulated DSC**, *Thermochimica Acta*. 657 (2017) 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2017.09.006>.
- [336] J.L. Delongueas, G.V. de Conchard, A. Beamonte, H. Bertheux, C. Spire, C. Maisonneuve, N. Becourt-Lhote, F. Goldfain-Blanc, N. Claude, **Assessment of Labrasol®/Labrafil®/Transcutol® (4/4/2, v/v/v) as a non-clinical vehicle for poorly water-soluble compounds after 4-week oral toxicity study in Wistar rats**, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 57 (2010) 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.03.008>.
- [337] R.M. Aparicio, M.J. García-Celma, M. Pilar Vinardell, M. Mitjans, **In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39 (2005) 1063–1067. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.06.013>.
- [338] K.A. Hamid, H. Katsumi, T. Sakane, A. Yamamoto, **The effects of common solubilizing agents on the intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats**, *International Journal of Pharmaceutics*. 379 (2009) 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.018>.
- [339] K. Szymczyk, A. Taraba, **Properties of aqueous solutions of nonionic surfactants, Triton X-114 and Tween 80, at temperatures from 293 to 318 K: Spectroscopic and ultrasonic studies**, *Chemical Physics*. 483–484 (2017) 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2016.11.015>.
- [340] M. Milani, S. Roya, H. Hamed, Z. Amir, A. Abolfazl, **Synthesis and evaluation of polymeric micelle containing piperacillin/tazobactam for enhanced antibacterial activity**, *Drug Delivery*. 26 (2019) 1292–1299. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1693708>.
- [341] S. Naik, M. Chougule, B. Padhi, A. Misra, **Development of Novel Lyophilized Mixed Micelle Amphotericin B Formulation for Treatment of Systemic Fungal Infection**, *Current Drug Delivery*. 2 (2005) 177–184. <https://doi.org/10.2174/1567201053586056>.
- [342] A.B. Pillai, J. V. Nair, N.K. Gupta, S. Gupta, **Microemulsion-loaded hydrogel formulation of butenafine hydrochloride for improved topical delivery**, *Archives of Dermatological Research*. 307 (2015) 625–633. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1573-z>.

- [343] B.V. De Araujo, C.F. Da Silva, T.D. Costa, **An alternative approach to determine oral bioavailability of drugs that follow michaelis-menten elimination: A case study with voriconazole**, *Pharmacology*. 86 (2010) 163–167. <https://doi.org/10.1159/000317066>.
- [344] Y. Kline, K. V. Clemons, L. Woods, D.A. Stevens, L.A. Tell, **Pharmacokinetics of voriconazole in adult mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)**, *Medical Mycology*. 49 (2011) 500–512. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.542553>.
- [345] J.R. Graybill, L.K. Najvar, G.M. Gonzalez, S. Hernandez, R. Bocanegra, **Improving the mouse model for studing the efficacy of voriconazole**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51 (2003) 1373–1376. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg261>.
- [346] P.A. Warn, A. Sharp, J. Mosquera, J. Spickermann, A. Schmitt-Hoffmann, M. Heep, D.W. Denning, **Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus***, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58 (2006) 1198–1207. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl396>.
- [347] M.M. Rodríguez, E. Calvo, C. Serena, M. Mariné, F.J. Pastor, J. Guarro, **Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans***, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53 (2009) 2153–2155. <https://doi.org/10.1128/AAC.01477-08>.
- [348] E. Cabral-Galeano, I. Ruiz-Camps, O. Len-Abad, L. Pou-Clavé, R. Sordé-Masip, Y. Meije-Castillo, A. Blanco-Grau, P. Barba-Suñol, V. Monforte-Torres, A. Román-Broto, A. Pahissa-Berga, J. Gavalda-Santapau, **Clinical usefulness of therapeutic drug monitoring of voriconazole in a university hospital**, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33 (2015) 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.005>.
- [349] A.J. Ullmann, J.M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, D.W. Denning, A.H. Groll, K. Lagrou, C. Lass-Flörl, R.E. Lewis, P. Munoz, P.E. Verweij, A. Warris, F. Ader, M. Akova, M.C. Arendrup, R.A. Barnes, C. Beigelman-Aubry, S. Blot, E. Bouza, R.J.M. Brüggemann, D. Buchheidt, J. Cadranel, E. Castagnola, A. Chakrabarti, M. Cuenca-Estrella, G. Dimopoulos, J. Fortun, J.P. Gangneux, J. Garbino, W.J. Heinz, R. Herbrecht, C.P. Heussel, C.C. Kibbler, N. Klimko, B.J. Kullberg, C. Lange, T. Lehrnbecher, J. Löffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, J.F. Meis, L. Pagano, P. Ribaud, M. Richardson, E. Roilides, M. Ruhnke, M. Sanguinetti, D.C. Sheppard, J. Sinkó, A. Skiada, M.J.G.T. Vehreschild, C. Viscoli, O.A. Cornely, **Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline**, *Clinical Microbiology and Infection*. 24 (2018) e1–e38. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002>.
- [350] B. Moriyama, A.O. Obeng, J. Barbarino, S.R. Penzak, S.A. Henning, S.A. Scott, J.A.G. Agúndez, J.R. Wingard, H.L. McLeod, T.E. Klein, S.J. Cross, K.E. Caudle, T.J. Walsh, **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy**, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. (2017). <https://doi.org/10.1002/cpt.583>.
- [351] C. Ekmekcioglu, **A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems**, *Food Chemistry*. 76 (2002) 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00291-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00291-6).
- [352] S. Blot, J. Rello, D. Koulenti, **Diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients: Putting the puzzle together**, *Current Opinion in Critical Care*. 25 (2019) 430–437. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000637>.
- [353] C. Shao, J. Qu, L. He, Y. Zhang, J. Wang, Y. Wang, H. Zhou, X. Liu, **Transient overexpression of γ interferon promotes *Aspergillus* clearance in invasive pulmonary aspergillosis**, *Clinical and Experimental Immunology*. 142 (2005) 233–241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02828.x>.
- [354] J.J. Tudesq, O. Peyrony, V. Lemiale, E. Azoulay, **Invasive Pulmonary Aspergillosis in Nonimmunocompromised Hosts**, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 40 (2019) 540–547. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696968>.

- [355] J. Cadena, G.R. Thompson, T.F. Patterson, **Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management**, *Infectious Disease Clinics of North America*. 30 (2016) 125–142. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.015>.
- [356] R.P. Scott, S.E. Quaggin, **The cell biology of renal filtration**, *Journal of Cell Biology*. 209 (2015) 199–210. <https://doi.org/10.1083/jcb.201410017>.
- [357] P. B. Persson, **Physiological Regulation of Renal Blood Flow and Glomerular Filtration Rate by the Endothelium and Smooth Muscle**, *Blood purification*. 15 (1997) 219–227. <https://doi.org/10.1159/000170339>.
- [358] D.E. Kohan, E.W. Inscho, D. Wesson, D.M. Pollock, **Physiology of endothelin and the kidney**, *Comprehensive Physiology*. 1 (2011) 883–919. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100039>.
- [359] J.C. Bowman, G.K. Abruzzo, J.W. Anderson, A.M. Flattery, C.J. Gill, V.B. Pikounis, D.M. Schmatz, A. Liberator, C.M. Douglas, **Quantitative PCR assay to measure Aspergillus fumigatus burden in a murine model of disseminated aspergillosis: Demonstration of efficacy of caspofungin acetate**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (2001) 3474–3481. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3474-3481.2001>.
- [360] J.R. Ellenbogen, M. Waqar, R.P.D. Cooke, M. Javadpour, **Management of granulomatous cerebral aspergillosis in immunocompetent adult patients: a review**, *British Journal of Neurosurgery*. 30 (2016) 280–285. <https://doi.org/10.3109/02688697.2016.1139046>.
- [361] S. Imbert, J.Y. Brossas, M. Palous, I. Joly, I. Meyer, A. Fekkar, **Performance of Aspergillus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of cerebral aspergillosis**, *Clinical Microbiology and Infection*. 23 (2017) 889.e1–889.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.012>.
- [362] M.E. Henry, N.R. Bolo, C.S. Zuo, R.A. Villafuerte, K. Cayetano, P. Glue, B.D. Damle, E. Andrews, T.L. Lauriat, N.S. Rana, J.H. Churchill, P.F. Renshaw, **Quantification of brain voriconazole levels in healthy adults using fluorine magnetic resonance spectroscopy**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (2013) 5271–5276. <https://doi.org/10.1128/AAC.00394-13>.
- [363] S. Schwartz, E. Thiel, **Cerebral aspergillosis: Tissue penetration is the key**, *Medical Mycology*. 47 (2009) 387–393. <https://doi.org/10.1080/13693780802537953>.
- [364] T. Elter, M. Sieniawski, A. Gossmann, C. Wickenhauser, U. Schröder, H. Seifert, J. Kuchta, J. Burhenne, K.D. Riedel, G. Fätkenheuer, O.A. Cornely, **Voriconazole brain tissue levels in rhinocerebral aspergillosis in a successfully treated young woman**, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28 (2006) 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.04.006>.
- [365] J. Schulz, F. Kluwe, G. Mikus, R. Michelet, C. Kloft, **Novel insights into the complex pharmacokinetics of voriconazole: a review of its metabolism**, *Drug Metabolism Reviews*. 51 (2019) 247–265. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1632888>.
- [366] T. Wang, J. Xie, Y. Wang, X. Zheng, J. Lei, X. Wang, H. Dong, Q. Yang, L. Chen, J. Xing, Y. Dong, **Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral voriconazole in patients with invasive fungal infections**, *Pharmacotherapy*. 35 (2015) 797–804. <https://doi.org/10.1002/phar.1631>.
- [367] R. Al-Saigh, A. Elefanti, A. Velegraki, L. Zerva, J. Meletiadis, **In vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of voriconazole activity against Aspergillus species in a new in vitro dynamic model**, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56 (2012) 5321–5327. <https://doi.org/10.1128/AAC.00549-12>.
- [368] W.W. Hope, G.L. Drusano, **Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: Bridging from the bench to bedside**, *Clinical Microbiology and Infection*. 15 (2009) 602–612. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02913.x>

Índice de figuras

Figura 1: Enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (CYP51 o Erg11p) del citocromo P450 fúngico con voriconazol unido al grupo hemo (imagen de la izquierda). Voriconazol unido a su diana, el grupo hemo de la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa (imagen de la derecha). Imágenes obtenidas con el programa informático PyMOL.....	37
Figura 2: Esquema de las microplacas utilizadas en el ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i>	83
Figura 3: Esquema del ensayo de biodistribución en dosis múltiple en ratones inmunosuprimidos....	87
Figura 4: Espectro del barrido UV de voriconazol de 250 nm a 280nm.	91
Figura 5: Transformación mediante el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada del espectro UV del voriconazol de 250 nm a 280nm.....	91
Figura 6: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	93
Figura 7: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	93
Figura 8: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	95
Figura 9: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	99
Figura 10: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	99
Figura 11: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	101
Figura 12: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	105
Figura 13: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	105
Figura 14: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	107
Figura 15: Cromatograma de HPLC de una muestra de plasma blanco con voriconazol (tiempo de retención 5,197 min) y con nimodipino (tiempo de retención 10,040 min) utilizada para elaborar una recta de calibrado.....	110
Figura 16: Gráficas de las rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	111

Figura 17: Gráfica de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	112
Figura 18: Gráfica obtenida por ANOVA que representa la absorbancia obtenida y la absorbancia pronosticada en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	113
Figura 19: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el vehículo.....	119
Figura 20: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el vehículo.....	119
Figura 21: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar el tensoactivo.	120
Figura 22: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones utilizadas para seleccionar la proporción de tensoactivo.....	121
Figura 23: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.....	122
Figura 24: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.....	122
Figura 25: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 6,8 de las formulaciones con mayor proporción de vehículo.....	123
Figura 26: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 1,2 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.....	124
Figura 27: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 4,5 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.....	125
Figura 28: Gráfica de los perfiles de disolución en el medio a pH 6,8 de las formulaciones con menor proporción de vehículo.....	125
Figura 29: Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados para estudiar los perfiles de las formulaciones seleccionadas en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media \pm DE (n = 4). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo.	126
Figura 30: Resultado del análisis EDS. Se muestra la microfotografía de la formulación sometida al análisis y los elementos presentes en el punto señalado.	132
Figura 31: Difractogramas de las formulaciones seleccionadas.	137
Figura 32: Termogramas obtenidos en el análisis por DSC de las formulaciones seleccionadas.	139
Figura 33: Fotografía de una microplaca con los resultados del ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> por el método de microdilución.	145
Figura 34: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> por el método de difusión con hongos filamentosos del género <i>Aspergillus</i> . Resultados agrupados por especie, expresados como el valor medio (barras de colores) \pm DE (barras de error).....	147

- Figura 36: Gráfica de la correlación entre los logaritmos neperianos de las CMI y los diámetros de los halos de inhibición de los hongos del género *Aspergillus*. Ecuación de la recta de regresión: $\ln CMI = -0,165 \cdot \text{diámetro del halo} + 2,449$. Coeficiente de determinación: $R^2 = 0,724$ 148
- Figura 35: Fotografía de una placa de Petri con los resultados del ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión..... 150
- Figura 37: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad *in vitro* por el método de difusión con hongos levaduriformes del género *Candida*. Resultados agrupados por especie, expresados como el valor medio (barras de colores) \pm DE (barras de error)..... 149
- Figura 38: Gráficas de los perfiles farmacocinéticos de las formulaciones utilizadas en el ensayo *in vivo* de dosis única de 40 mg/kg con ratas Wistar. 154
- Figura 39: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución de dosis única 24 horas después de la administración de una dosis de 40 mg/kg a ratas Wistar. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE (n = 6). ** = valor de $p < 0,01$ respecto a la referencia (materia prima). 156
- Figura 40: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución dosis múltiple tras la administración de dos dosis, 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada g de órgano como la concentración media \pm DE (n = 5). * = valor de $p < 0,05$ respecto a la referencia (materia prima). ** = valor de $p < 0,01$ respecto a la referencia (materia prima)..... 157
- Figura 41: Gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución dosis múltiple tras la administración de diez dosis, 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada g de órgano como la concentración media \pm DE (n = 5). * = valor de $p < 0,05$ respecto a la referencia (materia prima)..... 158
- Figura 42: Fotografías de hígados de los ratones tras la administración de dos dosis. A la izquierda el hígado de un ratón del grupo control tratado con placebo, en el centro el hígado de un ratón del grupo referencia tratado con la materia prima y a la derecha el hígado de un ratón del grupo de la nueva formulación tratado con SM-1:3:0,05..... 159
- Figura 43: Fotografías de hígados de los ratones tras la administración de diez dosis. A la izquierda el hígado de un ratón del grupo control tratado con placebo, en el centro el hígado de un ratón del grupo referencia tratado con la materia prima y a la derecha el hígado de un ratón del grupo de la nueva formulación tratado con SM-1:3:0,05..... 159

Índice de tablas

Tabla 1: Posología de las formulaciones comercializadas de voriconazol.....	44
Tabla 2: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.....	92
Tabla 3: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	94
Tabla 4: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	94
Tabla 5: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	94
Tabla 6: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	95
Tabla 7: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	96
Tabla 8: Resultados obtenidos los días 1 y 2 por el primer y el segundo analista en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	96
Tabla 9: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 1,2.	97
Tabla 10: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.....	98
Tabla 11: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	100
Tabla 12: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	100
Tabla 13: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	100
Tabla 14: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	101
Tabla 15: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	102
Tabla 16: Resultados obtenidos los días 1 y 2 por el primer y el segundo analista en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	102
Tabla 17: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 4,5.	103

Tabla 18: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.....	104
Tabla 19: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	106
Tabla 20: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	106
Tabla 21: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	106
Tabla 22: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	107
Tabla 23: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	108
Tabla 24: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la precisión intermedia del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	108
Tabla 25: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras conservadas a 25°C y a 4°C utilizadas para evaluar la robustez del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada en medio a pH 6,8.	109
Tabla 26: Rectas de calibrado construidas para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	111
Tabla 27: Análisis de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	112
Tabla 28: Estadísticas de la recta media de regresión obtenida en la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	112
Tabla 29: Análisis de la varianza de los datos utilizados para la validación de la linealidad del método analítico de HPLC.	113
Tabla 30: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método analítico de HPLC.	113
Tabla 31: Resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas para evaluar la repetibilidad del método analítico de HPLC.	114
Tabla 32: Resultados obtenidos en el análisis de la muestra utilizada para evaluar la robustez del método analítico de HPLC.	115
Tabla 33: Microfotografías obtenidas por SEM de las formulaciones ensayadas.	133
Tabla 34: Resultados del análisis por DSC de las formulaciones seleccionadas.	141
Tabla 35: Valores de CMIs obtenidas en el ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> por el método de microdilución realizado en hongos filamentosos del género <i>Aspergillus</i>	145
Tabla 36: Valores de CMIs obtenidas en el ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> por el método de microdilución realizado en hongos levaduriformes del género <i>Candida</i>	146
Tabla 37: Parámetros farmacocinéticos obtenidos en el ensayo <i>in vivo</i> de dosis única con ratas Wistar. AUC_{0-8} = área bajo la curva desde el momento de la administración de la dosis hasta las 8 horas del ensayo.	

AUC₀₋₂₄ = área bajo la curva desde el momento de la administración de la dosis hasta las 24 horas del ensayo. t_{max} = tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de voriconazol obtenida en plasma. C_{max} = valor de la concentración máxima de voriconazol alcanzada en plasma. C_4 = valor de la concentración de voriconazol en plasma 4 horas después de la administración de la dosis. $C_{0,5}$ = valor de la concentración de voriconazol en plasma media hora después de la administración de la dosis. 155

Tabla 38: Concentraciones obtenidas en los órganos en el ensayo de biodistribución de dosis única 24 horas después de la administración de una dosis de 40 mg/kg a ratas Wistar. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 6$). $C_{pulmones}$ = concentración en los pulmones. C_{higado} = concentración en el hígado. $C_{riñones}$ = concentración en los riñones. 156

Tabla 39: Concentraciones obtenidas en los órganos en el ensayo de biodistribución de dosis múltiple 4 horas después de la administración de la última dosis de 30 mg/kg a ratones OF-1 inmunosuprimidos. Resultados expresados en μg de voriconazol por cada gramo de órgano como la concentración media \pm DE ($n = 5$). $C_{cerebro}$ = concentración en el cerebro. $C_{pulmones}$ = concentración en los pulmones. C_{higado} = concentración en el hígado. $C_{riñones}$ = concentración en los riñones. 157

Tabla 40: Datos obtenidos en los ensayos de disolución realizados en los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los datos se muestran como la media \pm DE ($n = 4$). %D 15 min = porcentaje de disolución a los 15 minutos del ensayo. %D 45 min = porcentaje de disolución a los 45 minutos del ensayo. tD 50% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 50% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. tD 85% = tiempo que tarda en alcanzarse la disolución del 85% del voriconazol contenido en las formulaciones utilizadas para llevar a cabo el ensayo. 193

