



Desarrollo de Formulaciones de Liposomas en
Micropartículas (LEMs) conteniendo Succinato de
Sumatriptán para su Administración Tópica

Sheila
Villasmil
Sánchez

2010



Desarrollo de Formulaciones de Liposomas en Micropartículas (LEMs) Conteniendo Succinato de Sumatriptán para su Administración Tópica

Tesis Doctoral
Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Sevilla

Sheila Villasmil Sánchez
2010

1. Introducción.....	1
1.1 Migraña.....	3
1.1.1 Concepto y epidemiología.....	3
1.1.2 Fisiopatología.....	4
1.1.3 Clasificación.....	8
1.1.3.1 Migraña sin aura.....	9
1.1.3.2 Migraña con aura.....	9
1.1.4 Antimigrañosos.....	10
1.1.4.1 Analgésicos.....	11
1.1.4.2 Derivados ergóticos.....	12
1.1.4.3 Triptanes.....	14
1.2 Sumatriptán.....	15
1.2.1 Historia.....	15
1.2.2 Estructura química.....	16
1.2.3 Propiedades fisicoquímicas.....	17
1.2.4 Mecanismo de acción.....	17
1.2.5 Farmacocinética.....	17
1.2.5.1 Absorción.....	17
1.2.5.2 Distribución.....	18
1.2.5.3 Eliminación.....	18
1.2.6. Formas farmacéuticas.....	18
1.2.7 Efectos adversos.....	19
1.3 Piel.....	20
1.3.1 Anatomía y composición química.....	20
1.3.2 Estructura.....	20
1.3.2.1 Epidermis.....	20
1.3.2.1.1 Proceso de queratinización.....	22
1.3.2.2 Unión dermoepidérmica.....	23
1.3.2.3 Dermis.....	24
1.3.2.2 Hipodermis.....	24
1.3.3 Circulación sanguínea de la piel.....	25
1.3.4 Apéndices cutáneos.....	26
1.3.4.1 Manto hidrolipídico.....	28
1.3.5 Funciones de la piel.....	28
1.4 Transporte de fármacos a través de la piel.....	29
1.4.1 Reglas generales que gobiernan la penetración de un fármaco a través de la piel.....	31
1.4.2 Células de difusión.....	32
1.4.3 Métodos para mejorar la permeación.....	34
1.5 Liposomas.....	35
1.5.1 Clasificación.....	36
1.5.2 Materiales formadores de vesículas.....	37
1.5.2.1 Fosfolípidos.....	38
1.5.2.2 Colesterol.....	39
1.5.3 Métodos de preparación.....	40
1.5.3.1 Método de Bangham.....	40
1.5.3.2 Método de congelación y calentamiento de MLVs.....	41
1.5.3.3 Método de extrusión.....	42

1.5.3.4 Método de eliminación del tensioactivo.....	42
1.5.3.5 Método de evaporación en fase reversa.....	43
1.5.4 Aplicación de los liposomas vía tópica.....	43
1.6 Microencapsulación de liposomas.....	46
1.6.1 Sistemas lipídicos – poliméricos.....	48
1.6.2 Materiales empleados en la microencapsulación.....	50
1.6.3 Gelificación iónica.....	51
1.7 Objetivos.....	53
2. Materiales y Métodos.....	55
2.1 Materiales.....	57
2.2 Cuantificación de succinato de sumatriptán.....	60
2.3 Estudio de preformulación de las moléculas.....	62
2.3.1 Análisis morfológico de succinato de sumatriptán.....	62
2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de platina caliente.....	63
2.3.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	63
2.3.2.2 Termomicroscopía (HSM).....	64
2.3.3 Coeficiente de reparto y pH del succinato de sumatriptán...	65
2.4 Preparación de liposomas.....	67
2.4.1 Método de Bangham.....	68
2.4.2 Método de congelación y calentamiento (FATMLV).....	69
2.4.3 Evaporación de fase reversa (REV).....	69
2.5 Caracterización de las formulaciones de liposomas.....	71
2.5.1 Análisis dimensional.....	71
2.5.2 Potencial zeta.....	72
2.5.3 Análisis morfológico.....	73
2.5.3.1 Microscopía óptica.....	73
2.5.3.2 Microscopía de barrido láser confocal....	74
2.5.4 Eficacia de encapsulación.....	75
2.5.5 Ensayos de liberación.....	77
2.5.6 Ensayos de permeación.....	79
2.5.7 Análisis térmico de las formulaciones.....	81
2.5.8 Resonancia magnética nuclear de fósforo (P-NMR).....	82
2.6 Preparación de los LEMs.....	85
2.6.1 Preparación de micropartículas de alginato con solución de sumatriptán.....	86
2.6.2 Preparación de LEMs con alginato sódico.....	87
2.6.3 Preparación de micropartículas y de LEMs con mezclas de alginato / polímeros.....	88
2.6.3.1 Micropartículas y LEMs de alginato / Gantrez®.....	88
2.6.3.2 Micropartículas y LEMs de alginato / quitosano.....	89
2.7 Caracterización de los LEMs.....	90
2.7.1 Análisis dimensional.....	90
2.7.2 Eficacia de encapsulación.....	92
2.7.3 Estudios de permeación de las micropartículas y de los LEMs.....	92
2.7.4 Integridad de los liposomas encapsulados.....	94
2.7.5 Morfología de los LEMs.....	97

2.7.6 Difracción de rayos X.....	97
3. Resultados.....	99
3.1 Caracterización de sumatriptán.....	101
3.1.1 Cuantificación de succinato de sumatriptán.....	101
3.1.2 Morfología.....	102
3.1.3 Análisis térmico.....	102
3.1.4 Coeficiente de reparto y pH.....	105
3.2 Análisis térmico de los componentes de las formulaciones.....	106
3.3 Caracterización de las formulaciones.....	113
3.3.1 Eficacia de encapsulación.....	114
3.3.2 Tamaño de las vesículas e índice de polidispersión.....	129
3.3.3 Potencial zeta.....	130
3.3.4 Análisis térmico de las formulaciones.....	138
3.3.5 Estudios de liberación “in vitro”.....	142
3.3.6 Estudios de permeación “in vitro”.....	147
3.4 Caracterización de los LEMs.....	153
3.4.1 Análisis dimensional	154
3.4.2 Eficacia de encapsulación.....	157
3.5 Estudios de permeación “in vitro” de las MP y de los LEMs.....	165
3.6 Estudio de integridad de los liposomas encapsulados.....	168
3.7 Análisis térmico de los LEMs.....	172
4. CONCLUSIONES.....	181
5. BIBLIOGRAFÍA.....	187

Tabla 1: Cantidades (mg) de los lípidos utilizados en la elaboración de los liposomas. PC: fosfatidilcolina; CH: colesterol; EA: estearilamina; DCP: dicetilfosfato.....	68
Tabla 2. Métodos utilizados para elaborar cada lote de liposomas.....	70
Tabla 3. Parámetros de funcionamiento del CLSM.....	75
Tabla 4: Dispersiones liposomales y combinación dispersión liposomal – gel de Carbopol®/gel de carboximetilcelulosa sódica con sus respectivas proporciones sometidas al ensayo de permeación.....	80
Tabla 5: Descripción de las soluciones poliméricas utilizadas en la elaboración de los diferentes lotes y el producto encapsulado. Los lotes C, D, E, F, G, H, I, J, K y L, constituidos por mezclas de alginato / polímero contienen un volumen de 76 mL de dispersión de alginato al 3%. Los mililitros entre paréntesis corresponden al volumen empleado de cada solución polimérica.....	86
Tabla 6: Soluciones utilizadas para romper las micropartículas y/o LEMs según y/o LEMs y lotes utilizados para determinar EE.....	93
Tabla 7. Parámetros obtenidos de los termogramas correspondientes a las muestras analizadas. SU: succinato de sumatriptán; PC: fosfatidilcolina; EA: estearilamina; DCP: dicetilfosfato; CH: colesterol; Endot.: efecto endotérmico.....	107
Tabla 8. Valores medios de EE (eficacia de encapsulación), tamaño vesicular, IP (índice de polidispersión) y potencial zeta de los lotes elaborados. La composición lipídica de los lotes L1 a L8, se encuentra descrita en la tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos.....	115
Tabla 9. Valores del cambio químico isotrópico o anisotrópico medidos por ³¹ P-NMR, para las muestras de liposomas preparados por el método REV lote L1 y lote L4 (Composición en tabla 1, apartado 2.4 de Materiales y Métodos). Los valores de sigma se corresponden con el orden de aparición de la señal de izquierda a derecha. Sólo se muestran los valores sigmas de las señales más importantes.....	121
Tabla 10. Valores del cambio químico isotrópico o anisotrópico medidos por ³¹ P-NMR, para las muestras de liposomas preparados por el método TLE L1 y L4 (composición en tabla 1, apartado 2.4 de Materiales y Métodos). Los valores de sigma se corresponden con el orden de aparición de la señal de izquierda a derecha. Sólo se muestran los valores de las señales más importantes.....	126
Tabla 11. Prueba de Scheffé aplicada a los valores de potencial zeta respecto a los tres métodos de preparación, comparándolos por pares. Las diferencias significativas ocurren si $p \leq 0.05$. (*) Indica las diferencias significativas.....	133

Tabla 12. Resultado de las temperaturas de fusión y entalpías correspondientes a las formulaciones TLE y REV, lote 1. Con sumatriptán y sin sumatriptán (lote blanco).....	138
Tabla 13. Datos obtenidos del ajuste cinético de los perfiles de liberación de succinato de sumatriptán desde las diferentes formulaciones, usando el parámetro coeficiente de correlación r . Modelos: Higuchi r_h y K_h ; cinética de cero orden r_0 y K_0 ; cinética de primer orden r_1 y K_1	144
Tabla 14. Valores obtenidos de porcentaje de permeación, coeficiente de permeabilidad (P) y flujo en estado estacionario (Jss) para cada lote ensayado.....	150
Tabla 15. Resultados del tamaño de partícula y eficacia de encapsulación (EE) de los diferentes lotes de micropartículas MP y LEMs elaborados. La letra I denota adición del polímero de recubrimiento en la fase intermedia del proceso de fabricación. La letra F adición del polímero en la etapa final. SD: sin determinar.....	154
Tabla 16. Valores obtenidos de porcentaje de permeación, de coeficiente de permeabilidad (P) y flujo en el estado estable (Jss) para las MP y LEMs sometidas al estudio. Este ensayo se llevó a cabo hidratando las muestras con agua destilada y durante un tiempo de 48 horas.....	166
Tabla 17. Valores obtenidos de porcentaje de permeación, de coeficiente de permeabilidad (P) y flujo en el estado estable (Jss) para las MP y LEMs sometidas al estudio. Este ensayo se llevó a cabo tratando las muestras con solución de cloruro de sodio al 0.9% p/v, y durante un tiempo de 48 horas.....	167

Figura 1. Representación de escotomas según Lashley. Los números indican el tiempo en minutos y las cruces representan el centro de visión...	6
Figura 2. Corte transversal del cerebro.....	7
Figura 3. Principales mecanismos implicados en la generación de un ataque de migraña.....	8
Figura 4. Estructura química del succinato de sumatriptán y de serotonina (5-HT).....	16
Figura 5. Estructura de la piel.....	25
Figura 6. Célula de difusión vertical.....	33
Figura 7. Métodos para mejorar la terapia transdérmica.....	35
Figura 8. Clasificación de los liposomas en función del tamaño y número de bicapas.....	37
Figura 9. Representaciones de la estructura de un fosfolípido.....	38
Figura 10. Lípidos formadores de vesículas. Características.....	39
Figura 11. Liposoma multilaminar.....	44
Figura 12. Mecanismos de acción de los liposomas convencionales.....	46
Figura 13. Descripción de los polímeros empleados en la elaboración de los LEMs.....	51
Figura 14. Representación de las señales de un espectro de ³¹ P NMR para un sistema micelar y para un liposoma.....	84
Figura 15. Esquema del proceso de obtención de las micropartículas de alginato/Gantrez®, utilizando Gantrez® en la fase intermedia del proceso ó al final del mismo. Lotes C, D, E y F.....	89
Figura 16. Esquema del proceso de obtención de las micropartículas y de las LEMs de alginato/quitosano, utilizando el quitosano en la fase intermedia del proceso ó al final del mismo. Lotes G, H, I, J, K, L.....	91
Figura 17. Esquema del ensayo de integridad de los LEMs.....	96
Figura 18. Espectro de absorción del patrón de succinato de sumatriptán. (concentración: 1 mg/mL).....	101

Figura 19. Microfotografía de succinato de sumatriptán. Voltaje: 15.0 kV...	102
Figura 20. Termograma por DSC correspondiente a la muestra de succinato de sumatriptán.....	103
Figura 21. Secuencia de microfotografías por HSM. (a) Cristales a 25°C, (b) Inicio del proceso de fusión a 163°C, (c) Fusión de succinato de sumatriptán a 167°C.....	104
Figura 22. Comportamiento de succinato de sumatriptán bajo la influencia del pH.....	105
Figura 23. Termograma correspondiente al comportamiento térmico del fármaco (SUMAT) y de los lípidos formadores de película. Fosfatidilcolina (PC), colesterol (CH), dicetilfosfato (DCP), estearilamina (EA).....	107
Figura 24. Termograma correspondiente al sumatriptán, colesterol (CH) y su mezcla física en proporciones 1:1 (CH/SUMAT).....	109
Figura 25. Termograma correspondiente al sumatriptán, dicetilfosfato (DCP) y su mezcla física en proporciones 1:1 (DCP/SUMAT).....	109
Figura 26. Termograma correspondiente al sumatriptán, estearilamina (EA), y su mezcla física en proporciones 1:1 (EA/SUMAT).....	110
Figura 27. Secuencia de microfotografías obtenidas por HSM de la mezcla física EA/SUMAT: (a) 74 °C; (b) 116 °C; (c) 163 °C; (d) 165 °C.....	111
Figura 28. Termograma correspondiente a sumatriptán, fosfatidilcolina (PC) y a su mezcla física en proporción 1:1.....	112
Figura 29. Secuencia de microfotografías por HSM de la MF PC – SUMAT: (a) MF a 115°C, (b) MF a 117°C, (c) a 126°C, (d) a 135°C...	113
Figura 30. Representación esquemática de la inclinación de la bicapa inducida electrostáticamente en presencia de cabezas de grupo cargadas.	116
Figura 31. Imagen obtenida por fluorescencia en el microscopio confocal. Izquierda: formulación: REV 50:40:10EA utilizando como marcador fluorescente rodamina. Puede apreciarse el halo del colorante en la bicapa, lo que indica que se trata de LUV. Derecha: formulación: REV 50:40:10DCP, donde se puede apreciar, además del halo del colorante en la bicapa, la presencia de una gran cantidad de aglomerados... ..	118

Figura 32. Espectros obtenidos por ³¹ P-NMR de los liposomas preparados con el método REV. Panel de la izquierda con temperatura de 303 °K (30 °C) y panel de la derecha 338 °K (65 °C). A: REV neutro; B y C: REV positivo blanco; D y E: REV positivo sumatriptán; F y G: REV negativo blanco; H e I: REV negativo sumatriptán.....	120
Figura 33. Imagen obtenida por fluorescencia (izquierda) y por transmisión (derecha) en el microscopio confocal. Formulación: TLE 50:40:10 EA utilizando como marcador fluorescente rodamina.....	124
Figura 34. Imagen obtenida por fluorescencia en el microscopio confocal. Formulación: TLE 50:40:10DCP sin sumatriptán, utilizando como marcador fluorescente rodamina.....	124
Figura 35. Espectros obtenidos por ³¹ P-NMR de los liposomas preparados con el método TLE. Panel de la izquierda con temperatura de 303 °K (30 °C) y panel de la derecha 338 °K (65 °C). A y B: TLE neutro; C y D: TLE positivo blanco; E y F: TLE positivo sumatriptán; G y H: TLE negativo blanco; I y J: TLE negativo sumatriptán.....	128
Figura 36. Comparación de valores del potencial zeta (mV) en función de la cantidad de estearilamina (EA) en las formulaciones, para los tres métodos de elaboración empleados. Cada dato corresponde al promedio de 5 mediciones.....	131
Figura 37. Influencia de la concentración de EA sobre los parámetros potencial zeta y eficacia de encapsulación (EE), usando el método de elaboración REV.....	132
Figura 38. Comparación de valores del potencial zeta (mV) obtenidas en formulaciones con y sin sumatriptán (blanco). EA como agente inductor de carga (A: método TLE; B: método REV; C: método FAT). Cada dato corresponde al promedio de 5 mediciones.....	136
Figura 39. Comparación de valores del potencial zeta (mV) obtenidas en formulaciones con y sin sumatriptán (blanco). DCP como agente inductor de carga (A: método TLE; B: método REV; C: método FAT). Cada dato corresponde al promedio de 5 mediciones.....	137
Figura 40. Termograma correspondiente al lote 1 de liposomas elaborados por el método TLE. LIP-HEP: Mezcla física de los lípidos (PC:CH:EA) con buffer HEPES (a); TLEB: liposomas sin sumatriptán (b); TLESU: Liposomas con sumatriptán (c).	139
Figura 41. Termograma correspondiente a la mezcla física de PC:CH:EA con el fármaco en iguales proporciones.....	140

Figura 42. Termogramas correspondientes al lote 1 de liposomas elaborados por el método REV. REVSU: liposomas con sumatriptán (a); LIP-HEP: mezcla física de los lípidos (PC:CH:EA) con buffer HEPES (b); REVB: liposomas sin sumatriptán (c).....	141
Figura 43. Termograma correspondiente al buffer HEPES utilizado como fase acuosa para la elaboración de los liposomas.....	142
Figura 44. Perfiles de liberación del sumatriptán en liposomas con carga positiva. L1, L2 y L3 corresponden a las composiciones lipídicas según tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos. Control: solución de sumatriptán al 0.67% p/v.....	143
Figura 45. Comparación entre los perfiles de los ensayos de liberación y los ensayos para determinar la EE de sumatriptán en liposomas con carga positiva L1. (Tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos).....	146
Figura 46. Comparación entre los perfiles de los ensayos de liberación y los ensayos para determinar la EE de sumatriptán en liposomas con carga positiva L2. (Tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos).....	146
Figura 47. Comparación entre los perfiles de los ensayos de liberación y los ensayos para determinar la EE de sumatriptán en liposomas con carga positiva L3. (Tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos).....	147
Figura 48. Perfiles de permeación de los diferentes lotes evaluados durante 48 horas. CMC: carboximetilcelulosa sódica.....	148
Figura 49. Representación de las cantidades de fármaco permeadas por unidad de área de los diferentes lotes evaluados durante las primeras 8 horas en mg de succinato de sumatriptán permeados por cm ² . Gel de CMC corresponde al gel de carboximetilcelulosa sódica. Soluc. Sumat: solución de sumatriptán.....	149
Figura 50. A) Diámetro medio de las MP (-) y los LEMs (-) de alginato, lotes A y B respectivamente. B) Diámetro medio de las MP (-) y los LEMs de alginato – quitosano (-) lotes K y L respectivamente. C) Diámetro medio de las MP (-) y los LEMs (-) de alginato – quitosano en el intermedio, lotes G y H, respectivamente. D) Diámetro medio de las MP (-) y los LEMs (-) de alginato – Gantrez [®] lotes E y F, respectivamente.....	155
Figura 51. Microfotografía correspondiente al lote G de MP alginato-quitosano intermedio. Magnificación 405x.....	157

Figura 52. Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido. A) MP de alginato, magnificación 1750x; B) LEMs de alginato, magnificación 2703x. Las imágenes de la derecha en la figura A corresponden a una ampliación de los poros. Las imágenes de la derecha de la imagen B corresponden a una ampliación de las zonas con presencia de formaciones globulares de distintos tamaños.....	159
Figura 53. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de los lotes K y L. A) MP de alginato/quitosano (K) magnificación 1185x; B) LEMs alginato/quitosano (L) magnificación 1276x.....	162
Figura 54. Imágenes de los lotes E y F. A) LEMs de alginato/Gantrez [®] , lote F, magnificación 1178x SEM; B) MP alginato/Gantrez [®] , lote E, magnificación 500x Cryo SEM; C) MP alginato/Gantrez [®] , lote E, 500x Cryo SEM.....	164
Figura 55. Microfotografía obtenida por Cryo SEM de las LEMs de alginato/quitosano, lote L. Magnificación 500x.....	165
Figura 56. Cantidad de calceína recuperada al disgregar los LEMs y tras romper los liposomas con Tritón [®] X-100. Sob. LEM B indica primer sobrenadante del lote B, Sob. LEM L corresponde al primer sobrenadante del lote L, Sob. Resusp B segundo sobrenadante lote B, Sob. Resusp L segundo sobrenadante correspondiente al lote L, y Lipos Tritón [®] indican liposomas tratados con Tritón [®] X-100 para ambos lotes.....	170
Figura 57. Imagen obtenida a los 120 minutos del ensayo de integridad de liposomas. Lip. Alg: indica calceína en liposomas de alginato tratados con Tritón [®] . Alg: corresponde al sobrenadante de la muestra. Lip. CH: indica liposomas de alginato/quitosano tratados con Tritón [®] . CH: corresponde al sobrenadante.....	171
Figura 58. Termogramas de los polímeros individualmente y de su mezcla física binaria. ALG-GA se corresponde con la mezcla física alginato/Gantrez [®] y ALG-QUIT a la mezcla física alginato/quitosano.....	173
Figura 59. Termogramas correspondientes al fármaco (sumatriptán), y las mezclas de alginato/sumatriptán (ALG-SU), quitosano/sumatriptán (QUIT-SU) y Gantrez [®] /sumatriptán (GASU).....	174
Figura 60. Termogramas correspondientes a las formulaciones de MP (A) y LEMs (B) del alginato, alginato/quitosano intermedio (G y H) y alginato/quitosano 10 mL final (K y L).....	176

Figura 61. Termogramas correspondientes a las MP y LEMs de alginato (A y B), alginato/Gantrez [®] intermedio (C y D) y alginato/Gantrez [®] final (E y F).....	176
Figura 62. Difractograma del succinato de sumatriptán polvo.....	177
Figura 63. Difractograma de los lotes de MP y LEMs. A: MP de alginato; B: LEMs de alginato; E: MP de alginato/Gantrez [®] ; F: LEMs de alginato/Gantrez [®] ; K: MP de alginato/quitosano; LEMs alginato/quitosano. Los lotes de MP y LEMs con polímeros de recubrimiento corresponden a los preparados adicionando el polímero al final del proceso (tabla 17).....	178
Figura 64. Difractograma de una solución de sumatriptán al 0.67% p/v liofilizada.....	179

1.1 MIGRAÑA

1.1.1 Concepto y epidemiología

La migraña o jaqueca es un síndrome de prevalencia familiar caracterizado por la aparición de ataques o crisis recurrentes de dolores de cabeza, muy variables en intensidad, frecuencia y duración. Suele ser unilateral, asociada a fotofobia y sonofobia, con náuseas y / o vómitos y con una importante exacerbación ante movimientos cefálicos o esfuerzos.

Se clasifica dentro de las cefaleas primarias, es decir, no tiene su origen en una lesión estructural. Constituye una enfermedad crónica, debilitante, que, según datos correspondientes al año 2007, afecta aproximadamente de un 10 a un 11% de la población adulta a nivel mundial (Stovner y cols., 2007; Jensen y Stovner, 2008), lo que traducido en cifras corresponde a más de 736 millones de personas (www.prb.org/datafinder/geography, 2007). Se estima que el 17% de las mujeres y el 6% de los hombres padecen migraña, e incluso estas cifras se están incrementando en estos últimos años (Nazábal y cols., 2008).

Además, este síndrome neurológico predomina en las etapas más productivas de la vida del individuo, causando un enorme impacto sobre la sociedad, ya que genera importantes costes tanto directos como indirectos (Stovner y cols., 2006). Los costes directos incluyen consultas médicas, visitas a urgencias, medicamentos, etc., mientras que los costes indirectos se derivan de los efectos resultantes de la migraña sobre la productividad del individuo en el ámbito laboral ocasionados por bajo rendimiento o absentismo laboral, así como en el trabajo del hogar y otras actividades. De hecho, una medición realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugiere que un día con migraña severa causa una incapacidad similar a un día con tetraplejía.

Desafortunadamente, los trastornos ocasionados por el dolor de cabeza han sido universalmente desestimados, infradiagnosticados e infratratados. Con la idea de manejar con mayor eficacia el problema de las cefaleas y entender con más claridad el alcance y la escala de la carga relacionada con los mismos, incluyendo a la migraña como uno de los más importantes, la OMS junto con la Alianza Mundial de Cefalea

(WHA), la Sociedad Internacional de Cefalea (IHS) y la Federación Europea del dolor de cabeza (EHF) crearon en el año 2004 el “*Lifting The Burden: The Global Campaign to Reduce the Burden of Headache Worldwide*” (Saverio y cols., 2008; www.l-t-b.org/, 2009).

Como se comentaba anteriormente, esta patología es más frecuente en las mujeres; además, más de la mitad de los pacientes presentan antecedentes familiares directos de migraña. Aparece en la infancia o adolescencia, de modo que aproximadamente el 80% de los pacientes sufren su primer episodio álgico antes de cumplir los treinta años y menos del 3% de los mismos presenta su primer ataque de migraña después de los cincuenta años (Lipton y Bigal, 2005).

Asimismo, se ha observado que la frecuencia de aparición de las crisis oscila entre un episodio cada varios meses y cuatro episodios al mes (Farreras y cols., 2000).

1.1.2 Fisiopatología

Existen evidencias de que el origen de la migraña tiene un componente genético; de hecho, se ha comprobado que los parientes de primer grado de personas que padecen migraña sin aura tienen un riesgo 1.9 veces mayor de padecerla, mientras que en la migraña con aura, el riesgo es 4 veces mayor que el de una persona sin antecedentes familiares. Se ha concluido que tanto factores genéticos como ambientales son importantes en el desarrollo de la migraña. Avances recientes desarrollados en el campo de la Genética sugieren la implicación de los canales de calcio en la patogenia de la migraña, y se cree que ésta tiene una naturaleza poligénica compleja. A pesar de estos hallazgos, actualmente la etiología de esta enfermedad es desconocida (Pascual y Castro, 1998; Ducros y cols., 2002; Bidaud y cols., 2006; Gargus, 2006; Colson y cols., 2007).

Antes de adentrarnos en la fisiopatología de la migraña, se describen algunos conceptos relacionados con las diferentes fases del ataque álgico, con el fin de facilitar posteriormente su comprensión.

Pródromos. Son los síntomas que experimenta el paciente migrañoso el día previo al aura o al dolor; entre ellos, se puede citar: avidez por los alimentos dulces, especialmente el chocolate, bostezos, retención

hídrica excesiva o cambios de humor. La naturaleza de los mismos ha llevado a proponer su origen hipotalámico (Edvinsson y Uddman, 2005; Deshmukh, 2006).

Aura. Se ha demostrado que hasta un tercio de los pacientes migrañosos experimentan síntomas neurológicos focales, que preceden al proceso de la cefalea. Según la *International Headache Society* (IHS), el aura consiste en la aparición de, al menos, uno de los siguientes síntomas (www.i-h-s.org/, 2004):

- Síntomas visuales completamente reversibles, con signos que aparecen (luzes, manchas o líneas parpadeantes), que desaparecen (pérdida de la visión), o ambas.
- Síntomas sensitivos completamente reversibles con signos positivos (hormigueo, pinchazos), negativos (entumecimiento, adormecimiento) o ambos.
- Trastorno disfásico del habla completamente reversible, es decir, incapacidad de expresarse correctamente, afectando también a la comprensión.

En más del 90 % de los ataques de migraña con aura, los síntomas focales se corresponden con la esfera visual, encontrándose una aparente hipoperfusión cerebral durante la fase de aura en el hemisferio sintomático (Striessnig, 2005). Sin embargo, aún no está claro si dicha hipoperfusión puede estar causada por una isquemia que justifique la aparición de los síntomas focales (Sugahara, 2004).

Dentro de estos síntomas visuales se encuentran los escotomas, que no son más que zonas de ceguera parcial, que comienzan en un punto y se van extendiendo en un hemicampo visual.

En 1941, Lashley, un neurólogo que presentaba migraña con aura visual, determinó a partir de la progresión de su escotoma, que el córtex visual estaba siendo dañado por algún proceso que avanzaba a un ritmo aproximado de 3 mm / minuto (Dewsbury, 2002). En la figura 1 se representan cuatro escotomas, que van evolucionando con el tiempo.



Figura 1. Representación de escotomas según Lashley. Los números indican el tiempo en minutos y las cruces representan el centro de visión (Fuente: www.migraine-aura.org/EN/Karl_Lashley.html, 2007).

Posteriormente, se describió el fenómeno de “depresión cortical propagada” en animales de experimentación. El fenómeno de la depresión propagada consiste en una onda de actividad eléctrica cortical reducida, iniciada a raíz de una despolarización local, que avanza a una velocidad muy similar a la calculada por Lashley para el aura.

A partir de esta observación, se ha relacionado el aura migrañosa con el fenómeno de depresión cortical propagada. Sin embargo, no existe una confirmación absoluta de la existencia del fenómeno de la depresión propagada en el córtex cerebral humano (Pascual, 1998; Yavich e Ylinen, 2005).

Por otra parte, se ha observado que la activación del córtex, al estimular los núcleos del rafe, puede indirectamente alterar la respuesta al dolor (Goadsby y cols., 2009); así, una condición necesaria para la puesta en marcha de un ataque de migraña parece ser la activación de los núcleos del rafe y del *locus coeruleus* (Figura 2) (Tassorelli y Shirley, 1995; Sugahara, 2004; Shields y Goadsby, 2005).

Como es bien conocido, el *locus coeruleus* es el origen de la inervación adrenérgica cerebral, mientras que los núcleos del rafe lo son de la serotonérgica.

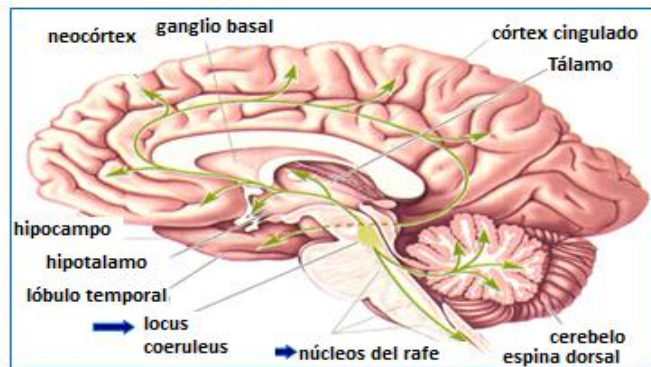


Figura 2. Corte transversal del cerebro (Fuente: www.sofiatopia.org/equiaeon/ibrain8.jpg, 2008).

Cefalea. Constituye el síntoma principal de la migraña y su origen no se conoce con certeza. Existen diversas propuestas basadas en cierta evidencia clínica y estudios de imagen que tratan de explicarlo. Así, se ha descrito su origen en la depresión cortical propagada, en la activación periférica de los nervios sensoriales, en la activación del sistema trigémino vascular y otros (Filippi y Rocca, 2008; Olesen y cols., 2009; Charles, 2009).

El origen del dolor como consecuencia de la activación del sistema trigémino vascular, parece explicar de forma muy precisa su desarrollo. Aunque no se conoce la vía de activación de dicho sistema, parece ser que los núcleos del tronco del encéfalo *locus coeruleus* y núcleos del rafe, puedan ser los responsables de este fenómeno. Sea como fuere, la activación del sistema trigémino vascular daría lugar a la liberación de péptidos como el PRGC, lo que ocasionaría una inflamación vascular y la liberación de sustancias como el péptido vasoactivo intestinal (VIP), dando lugar a una vasodilatación de las arterias craneales extracerebrales (Pascual y Castro, 1998; Farreras y cols., 2000; Just y cols., 2006; Porth, 2006; Goadsby, 2007; Tepper y Spears, 2009).

Respecto a la relación del sistema serotoninérgico con la migraña, se ha observado que la serotonina (5-HT) puede abortar los ataques de migraña, aunque sus efectos adversos importantes impiden utilizarla como tratamiento. Además, numerosos autores han demostrado que en los pacientes con migraña existe una alteración del metabolismo de la

5-HT, debido a que la serotonina se encuentra disminuida entre un ataque y otro, y se eleva durante el ataque, posiblemente como respuesta de defensa (Nagata y cols., 2007). Los receptores serotoninérgicos que se encuentran relacionados con el control del dolor migrañoso son el 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{1F} (Arulmozhi y cols., 2005).

Una vez conocidas las tres etapas fundamentales del ataque migrañoso, en la figura 3 se recoge una representación esquemática de todos los mecanismos cerebrales implicados en la fisiopatología de la migraña.

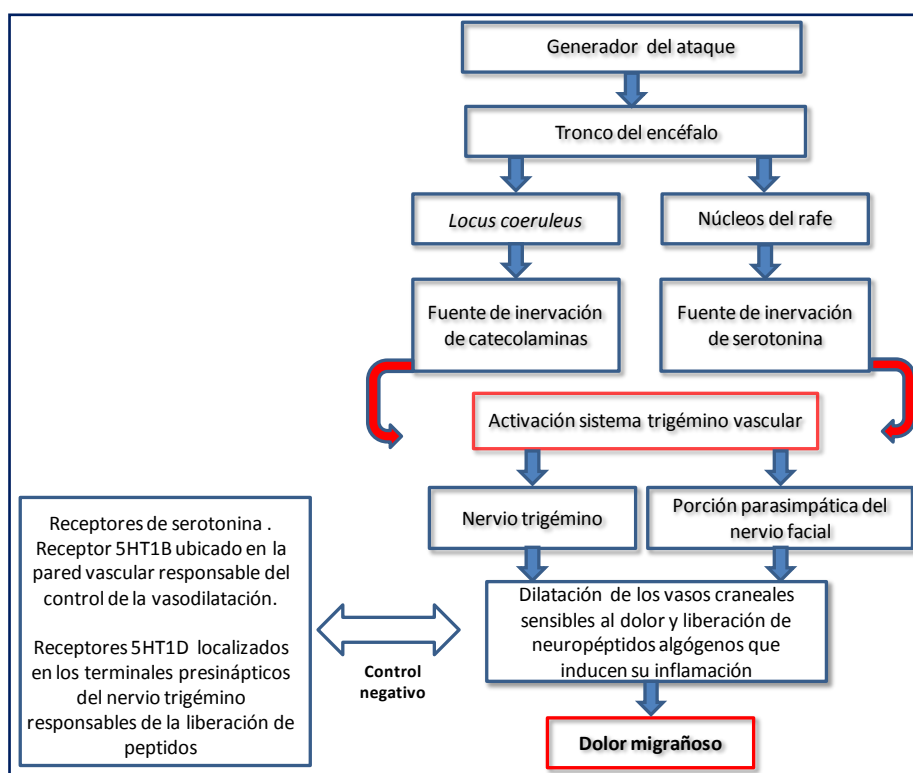


Figura 3. Principales mecanismos implicados en la generación de un ataque de migraña.

1.1.3 Clasificación

La cefalea migrañosa se manifiesta con diferente sintomatología de un paciente a otro, es decir, no todos los dolores de cabeza son iguales,

por lo que en la práctica clínica se han presentado divergencias a la hora de establecer el diagnóstico de esta enfermedad. Por tanto en primer lugar, hay que distinguirla de otros tipos de cefaleas no migrañosas, para seguidamente realizar un diagnóstico diferencial que permita incluirla de forma acertada como un tipo específico de migraña. Con la finalidad de unificar el criterio diagnóstico de migraña por parte de los facultativos, la Sociedad Internacional de Cefalea (IHS) ha clasificado a esta patología en distintos subgrupos, de acuerdo a la sintomatología que la acompaña, y a factores hereditarios relacionados con su manifestación, conduciendo a un abordaje terapéutico adecuado de la enfermedad y cumplir de ese modo con su principal objetivo (www.cefaleas.sen.es/profesionales/recomendaciones2006.htm, 2006):

1.1.3.1 Migraña sin aura

Se trata de un trastorno recurrente idiopático que puede durar entre cuatro horas y tres días. Presenta las siguientes características:

- El dolor tiene carácter pulsátil.
- Su localización es unilateral.
- Intensidad del dolor de moderada a grave.
- Se agrava por la actividad física rutinaria (caminar o subir escaleras), lo que se conoce como signo de traqueteo.
- Durante el dolor se asocia, al menos, uno de los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, fotofobia, sonofobia y, en ocasiones, osmofobia.

Muchos pacientes experimentan el día previo al dolor los denominados pródromos que, como se ha descrito en el apartado anterior, se manifiestan con cambios de humor, bostezos, retención de líquidos o avidez por determinados alimentos (Farreras y cols., 2000; Hilla, 2009).

1.1.3.2 Migraña con aura

Se trata de un trastorno recurrente idiopático que se manifiesta por una crisis de cefalea, acompañada de síntomas neurológicos originados en la corteza o el tronco cerebral. En general, estos síntomas neurológicos

se desarrollan gradualmente durante 5 - 20 minutos, con una duración media inferior a 60 minutos, y se relacionan con el fenómeno de depresión cortical propagada, que es una despolarización extendida de las neuronas corticales, la cual se cree que es la base del aura o pródromos asociados al inicio de la migraña. Durante esta depresión, la función cortical se encuentra interrumpida como consecuencia de la despolarización neuronal y elevación del potasio extracelular. Se piensa que estos cambios corticales son la causa de las alteraciones sensoriales o motoras que frecuentemente preceden al ataque de migraña (Arulmozhi y cols., 2005).

El aura se produce por una disfunción focal de la corteza cerebral, generalmente de la corteza occipital. Esto explica que el aura más frecuente sea visual. Sin embargo, si dicha disfunción cerebral progresa hacia adelante, puede afectar a zonas del cerebro que integran la sensibilidad o el lenguaje, manifestándose como auras sensitivas (al paciente se le duerme la mano, un lado de la boca, etc.) y del lenguaje (el paciente no puede decir lo que piensa o confunde las palabras). Dicha disfunción dura unos pocos minutos (rara vez más de treinta) y desaparece sin dejar secuelas.

La cefalea, náuseas e hipersensibilidad a estímulos ambientales (fotofobia, sonofobia y osmofobia) aparecen normalmente tras los síntomas neurológicos del aura, de forma inmediata o tras un intervalo breve de tiempo, en general, inferior a una hora, aunque a veces pueden empezar antes o de forma simultánea al aura.

La cefalea en la migraña con aura posee las mismas características observadas en la migraña sin aura.

En este grupo, a su vez, se distinguen diferentes posibilidades: migraña con aura típica, aura típica con cefalea no migrañosa, aura típica sin cefalea, migraña hemipléjica familiar, migraña hemipléjica esporádica y migraña de tipo basilar (www.cefaleas.sen.es/profesionales/recomendaciones2006.htm, 2006).

1.1.4 Antimigrañosos

Hoy día no se dispone de ningún tratamiento farmacológico capaz de erradicar totalmente y de manera definitiva los ataques migrañosos. El

objetivo del tratamiento de la migraña es conseguir un rápido alivio del dolor y reducir su severidad y frecuencia. Alcanzar este objetivo es posible:

- Si se logra eliminar efectivamente la sintomatología incapacitante del ataque de migraña, que incluye dolor, fotofobia, fonofobia, alteraciones gastrointestinales y síntomas neurológicos.
- Mediante el uso de un tratamiento farmacológico preventivo.
- Aplicando estrategias no farmacológicas para evitar los desencadenantes del ataque; entre los que se destacan: disminución del estrés, seguir una dieta adecuada, evitar ciertos medicamentos y cambios ambientales, etc.

El tratamiento farmacológico preventivo está indicado cuando los ataques son frecuentes, más de cuatro a ocho por mes, e incapacitantes, cuando el aura es prolongada y la respuesta a la terapia aguda es muy escasa (Ramadan y Buchanan, 2006). Entre los fármacos usados con este fin se encuentran antidepresivos, anticonvulsivantes, inhibidores de la recaptación de serotonina, bloqueantes de los canales de calcio y beta-bloqueantes.

Por otra parte, los fármacos utilizados para el tratamiento de la crisis de migraña pueden ser no específicos, específicos y coadyuvantes. Los no específicos incluyen los analgésicos y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Los específicos comprenden los fármacos ergóticos y los agonistas de los receptores 5HT_{1B/D}, comúnmente conocidos como “triptanes” y los medicamentos coadyuvantes son fundamentalmente antieméticos procinéticos (domperidona, metoclopramida), necesarios en pacientes con náuseas y vómitos patentes.

1.1.4.1 Analgésicos

Los AINES están indicados en crisis de migraña calificadas como leves a moderadas. Es recomendable utilizarlos con un fármaco antiemético procinético y de forma precoz, ya que los AINES son ineficaces en el período de mayor intensidad del dolor. Asimismo, pueden combinarse

tanto con ergóticos como con triptanes (Limmroth y cols., 2000). Los AINES con eficacia clínica plenamente demostrada son el ácido acetilsalicílico (Gedye, 2001; Fiebich y cols., 2006), el naproxeno sódico (Graud y cols., 2004) y el ibuprofeno.

Paracetamol es recomendado en dosis de 1000 mg, en crisis de intensidad leve a moderada, especialmente si se administra al inicio de la misma y durante el embarazo (Chang y Rapoport, 2009).

1.1.4.2 Derivados ergóticos

Ergotamina (E) y dihidroergotamina (DHE) poseen formas estructurales similares a los neurotransmisores de los sistemas adrenérgico, dopaminérgico y, particularmente, serotoninérgico. El tartrato de ergotamina (ET) fue el primer alcaloide del cornezuelo del centeno en ser aislado y utilizado en el tratamiento de la migraña. Debido a sus potentes propiedades vasoconstrictoras, se refuerza la teoría del origen vascular de la migraña. La DHE fue sintetizada por reducción de un enlace insaturado de la ergotamina en 1943, y fue usada por primera vez como antimigrañoso en 1945, demostrando tener efectos vasoconstrictores y eméticos más reducidos. La eficacia antimigrañosa de estos compuestos se debe a su actividad agonista sobre los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{1F} (Silberstein y Hargreaves, 2000). Su acción sobre los receptores 5-HT_{1B}, localizados fundamentalmente en las arterias intracraneales extracerebrales, genera una vasoconstricción sobre los vasos sanguíneos meníngeos. Al ser agonistas de los receptores 5-HT_{1D}, bloquean la liberación de neuropéptidos vasoactivos (PRGC), previniendo así la extravasación plasmática en la duramadre y la vasodilatación en las arterias meníngeas (Mathew, 1997). Parece que los receptores 5-HT_{1F}, al ser estimulados, inhiben la extravasación proteica por estimulación del ganglio trigeminal (De Vries y cols., 1999).

Sus efectos adversos se deben a su actividad agonista sobre los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₇, alfaadrenérgicos y sobre los receptores D₂ de la dopamina. Los más frecuentes son las náuseas y los vómitos, ya de por sí habituales en las crisis de migraña, y se producen por el efecto directo de la ergotamina sobre los receptores dopaminérgicos del tronco del encéfalo. Los efectos más graves que

pueden aparecer están relacionados con el sistema cardiovascular: hipertensión arterial, angina de pecho, infarto de miocardio e isquemia de miembros inferiores (Pascual, 2001; Shimony y cols., 2006).

En lo referente a las características farmacocinéticas, los compuestos ergóticos tienen una biodisponibilidad oral muy baja, ya que un 90% de la dosis administrada sufre metabolismo de primer paso hepático. Sin embargo, algunos de los metabolitos de la E y de la DHE tienen una actividad biológica similar a la de sus fármacos de origen, alcanzando concentraciones plasmáticas que pueden ser varias veces superiores a las de los principios activos de los que provienen.

La absorción por vía oral del ET muestra una amplia variabilidad. En algunos estudios se ha indicado que puede llegar a alcanzar un 60% (www.sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo, 2007), mientras que otros han hallado valores de sólo un 1% (Silberstein y cols., 2000; Tfelt-Hansen y cols., 2000). El porcentaje absorbido por vía rectal es del 1 – 2%, y por vía intramuscular del 47%. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan aproximadamente una hora después de la administración oral o rectal, siendo su biodisponibilidad muy baja para ambas vías, debido probablemente a su metabolismo de primer paso hepático, como se comentó anteriormente (Dahlof y Goadsby., 2000).

La DHE presenta una biodisponibilidad oral muy baja (< 1 %), debido a que no se absorbe completamente a través de la mucosa gastrointestinal y a su elevado metabolismo de primer paso hepático. Su biodisponibilidad tras la administración intramuscular es del 100% y por vía nasal del 40%. Los máximos niveles plasmáticos tras la administración intravenosa se alcanzan a los 2 minutos; por vía intramuscular, a los 24 minutos, y por vía nasal, de 30 a 60 minutos. Su metabolismo hepático es rápido y extenso y su principal vía de eliminación son las heces (Silberstein y Hargreaves, 2000).

Se ha sugerido que el efecto terapéutico de estos fármacos se debe en gran parte a sus metabolitos activos. Además, E y DHE se unen fuertemente a los tejidos, lo cual podría explicar la persistencia de sus efectos biológicos aún después de que el fármaco o sus metabolitos no se detecten en plasma (Silberstein y McCrory, 2003).

Debido a que estos fármacos inducen una vasoconstricción no selectiva, más intensa y duradera que la de los triptanes, y a su baja biodisponibilidad, se ha llegado a la conclusión de que los compuestos ergóticos no están recomendados en los pacientes *de novo*, para los cuales se prefieren los triptanes (Ramadan y Buchanan, 2006).

1.1.4.3 Triptanes

Estos fármacos se pueden considerar como realmente selectivos para el tratamiento sintomático global de las crisis de migraña y han sido desarrollados en los últimos años a raíz del mejor conocimiento de la fisiopatología del dolor migrañoso (Jamieson, 2002; Shields y Goadsby, 2006). Estos triptanes son derivados de la 5-hidroxitriptamina y su actividad agonista es altamente selectiva y potente. Sus efectos antimigrañosos se explican en base a tres acciones farmacológicas (Ferrari, 1998):

- Inhibición de la inflamación neurogénica dural, por estimulación de los receptores 5-HT_{1D} sobre las fibras trigeminales, inhibiendo la liberación del PRGC y de esta manera, la vasodilatación dural (senos venosos en la duramadre); por otro lado, inhiben la liberación de la sustancia P y la neuroquinina A, para bloquear la extravasación plasmática.
- Vasoconstricción de los vasos craneales extracerebrales, vía estimulación de los receptores vasculares 5-HT_{1B}.
- Atenuación directa de la excitabilidad de las células en el núcleo trigeminal, vía estimulación de los receptores 5-HT_{1B/1D}, dentro del tallo cerebral.

Actualmente, existen siete triptanes disponibles, y son en orden de aprobación por la *Food and Drug Administration* (FDA): sumatriptán, zolmitriptán, naratriptán, rizatriptán, almotriptán, frovatriptán y eletriptán. Entre ellos presentan diferencias farmacocinéticas, reflejadas en el comienzo de acción, biodisponibilidad, eficacia, efectos secundarios, etc.

Cada paciente parece reaccionar mejor a un triptán que a otro, debido precisamente al diferente perfil farmacocinético de estos fármacos.

Todos ellos son altamente efectivos en el tratamiento de la migraña y son los únicos que actúan sobre los síntomas asociados a la misma, por lo que deben ser considerados como principios activos de primera elección en el tratamiento de esta patología (Nazábal y cols., 2008; Chang y Rapoport, 2009).

El primero en ser desarrollado y, por ende, el más utilizado en la terapia antimigrañosa ha sido sumatriptán. Por esta razón, y por ser eficaz en un alto porcentaje de pacientes migrañosos, se ha escogido para realizar el trabajo de investigación que se presenta y será el único triptán descrito en esta memoria.

1.2 SUMATRIPTÁN

1.2.1 Historia

La historia de sumatriptán comienza en 1972, cuando el Dr. Patrick Humphrey y su equipo de investigación iniciaron un proyecto dirigido a identificar nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento de la migraña (Humphrey y Feniuk, 1991). Desde 1938, Harold Wolff demostró que el dolor de la migraña era ocasionado por una vasodilatación cerebral; de ahí la eficacia de la ergotamina y la dihidroergotamina. Sin embargo, a causa de los fuertes efectos adversos de estos agentes, surgió la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas, desarrollando así vasoconstrictores selectivos de la circulación extracraneal (Unger, 2006).

Posteriormente, en los años ochenta se demostró que el efecto sintomático de la serotonina era mediado por un receptor perteneciente a la familia 5-HT₁. Por esta razón, Humphrey y su equipo decidieron centrarse en la identificación de los receptores 5-HT en la vasculatura de la carótida (Boer y cols., 1990) y en la síntesis de numerosos derivados de la triptamina que no tuvieron el efecto deseado, hasta que en marzo de 1984 se sintetizó sumatriptán (Peroutka, 1990; Pascual, 1994; Limmroth y cols., 1996).

Se han descubierto al menos siete subtipos de receptores 5-HT (5-HT₁ hasta 5-HT₇). A su vez, la familia de receptores 5-HT₁ comprende cinco receptores diferentes: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} (Hopwood y Stamford, 2001; Goadsby y Classey, 2003). Datos

inmunohistológicos indican que en el sistema trigémino vascular humano, los receptores 5-HT_{1B} predominan en las arterias meníngeas, mientras que los receptores 5-HT_{1D} se han encontrado en las terminaciones del nervio trigeminal (Ferrari y Saxena, 1992).

La estimulación de los receptores 5-HT_{1B} resulta en una vasoconstricción selectiva de los vasos craneales, mientras que la activación de los receptores 5-HT_{1D} inhibe directamente la liberación de neuropéptidos proinflamatorios (Deleu y Hanssens, 2000). El sumatriptán posee una elevada afinidad por ambos tipos de receptores.

1.2.2 Estructura química

Su nombre químico es 3-[2-(dimetilamino) etil]-N-metilindol-5-metanosulfonamida y su fórmula molecular es: C₁₄H₂₁N₃O₂S (Martindale, 2009) C = 56.92%; H = 7.17%; N = 14.22%; O = 10.83%; S = 10.85% (The Merck Index, 2001).

Sumatriptán se presenta como succinato de sumatriptán, que es el 3-[2-(dimetilamino) etil]-N-metilindol-5-metanosulfonamida succinato y su fórmula molecular es: C₁₄H₂₁N₃O₂S·C₄H₆O₄, siendo su peso molecular de 413.5 (Sheftell y cols., 2004).

En la figura 4 se muestra la estructura química de serotonina y de sumatriptán, observándose la gran semejanza entre ambos compuestos.

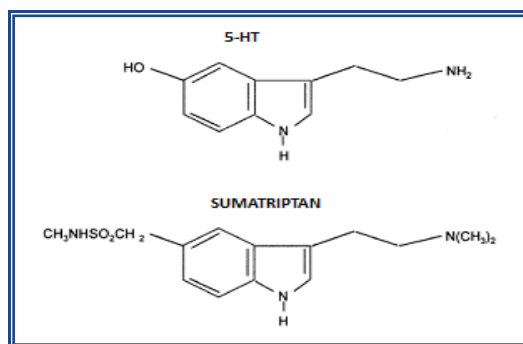


Figura 4. Estructura química de succinato de sumatriptán y de serotonina (5-HT).
Fuente: Durham y Russo, 2002.

1.2.3 Propiedades fisicoquímicas

Sumatriptán y el resto de los triptanes son derivados del indol, con radicales de sustitución en las posiciones 3 y 5.

Este fármaco se encuentra disponible como succinato de sumatriptán, el cual contiene, por cada 69.99 mg, aproximadamente 50 mg de sumatriptán. Es un polvo blanco o casi blanco, muy soluble en agua, prácticamente insoluble en diclorometano y bastante soluble en metanol. Una solución acuosa al 1% tiene un pH comprendido entre 4.5 y 5.3, y presenta problemas de fotosensibilidad (Martindale, 2009).

1.2.4 Mecanismo de acción

Como se ha indicado anteriormente, su estructura química es similar a la de serotonina, y muestra una clara actividad agonista sobre los receptores 5-HT₁. Al actuar sobre los receptores 5-HT_{1B}, produce una acción vasoconstrictora del territorio arterial carotídeo que afecta al árbol arterial meníngeo, la arteria cerebral media y la arteria basilar. Por otra parte, la acción sobre los receptores 5-HT_{1D} situados en las terminaciones sensoriales del trigémino, inhibe la liberación de mediadores químicos de carácter peptídico con poder vasodilatador y edematógeno, reduciendo así la denominada inflamación estéril.

Este último receptor ejerce una acción importante sobre los núcleos troncoencefálicos responsables del control central del dolor y de los síntomas digestivos de la migraña (Durham y Russo, 2002; Flórez, 2004).

1.2.5 Farmacocinética

1.2.5.1 Absorción

Por vía oral, sumatriptán se administra en dosis de 100 mg, lográndose el alivio sintomático del dolor a las dos horas aproximadamente. Parece ser que su absorción tiene lugar a nivel intestinal, presentando una biodisponibilidad baja, en torno a un 14%, ya que sufre metabolismo de primer paso hepático. Alcanza la concentración plasmática máxima (54 ng/mL) a las 2.5 horas. Los alimentos no afectan la biodisponibilidad oral de sumatriptán, pero prolongan el tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima (Duquesnoy y cols., 1998).

Por vía nasal, este fármaco se absorbe rápidamente y tiene un inicio de acción mucho más rápido que por vía oral. Sin embargo, su biodisponibilidad también es baja, entre un 15 a un 17%, debido al metabolismo presistémico. La concentración plasmática máxima (13 ng/mL) se alcanza entre 1–1.5 horas tras la administración de una dosis de 20 mg (Asgharnejad y DeBussey, 1997; Tfelt-Hansen y cols., 2000; Wadell y cols., 2003; <https://sinaem4.agemed.es>, 2007).

Por vía subcutánea, su biodisponibilidad es de aproximadamente un 97%. La dosis usual por esta vía es de 6 mg y la concentración plasmática máxima (72 ng/mL) se alcanza entre 5 y 20 minutos tras su administración (Oldman y cols., 2002; Wendt y cols., 2006).

1.2.5.2 Distribución

Sumatriptán posee un volumen de distribución de 170 litros. Se une a las proteínas plasmáticas en un 14 a 21%. No parece cruzar la barrera hematoencefálica, lo cual puede atribuirse a su baja lipofilia. Pequeñas cantidades de sumatriptán atraviesan la placenta por transporte pasivo, y se ha encontrado sumatriptán en la leche de humanos y en animales.

1.2.5.3 Eliminación

Sumatriptán tiene una semivida de eliminación de 1.5 a 2 horas. Se metaboliza principalmente en el hígado, siendo la enzima hepática responsable de su metabolismo la monoamino oxidasa A. El principal metabolito de este fármaco es un análogo del ácido indol acético, el cual es inactivo y presenta una semivida de eliminación similar a la de su molécula original. El sumatriptán es prácticamente metabolizado y de esa forma se elimina fundamentalmente en orina (Scott, 1994; Tepper y Rapoport, 1999; Sheftell y cols., 2004; Martindale, 2009).

1.2.6 Formas farmacéuticas

Succinato de sumatriptán se presenta bajo la forma de inyección subcutánea con una dosis de 6 mg, comprimidos de 50 mg y 100 mg, vía oral, *spray* nasal en dosis de 10 y 20 mg y supositorios de 25 mg (Catálogo de Medicamentos, 2009a). La formulación subcutánea es la que posee el efecto más rápido y potente. De hecho, la respuesta se alcanza antes de las dos horas (Catálogo de Medicamentos, 2009b).

Por las vías oral, nasal y rectal, el efecto se logra aproximadamente a las 2 horas. Todas sus formas de administración alivian completamente los síntomas del dolor migrañoso, náuseas y foto / fonofobia (Tepper y Rapoport, 1999), siendo el sumatriptán administrado por vía oral el que presenta el índice de respuesta más alto de todos los antimigrañosos (50 - 75%) (Catálogo de Medicamentos, 2009b).

Recientemente, en Estados Unidos e Inglaterra se ha introducido en el mercado el sumatriptán como comprimidos de liberación rápida, y en Norte América también está disponible en combinación con naproxeno sódico como comprimidos bicapa de liberación rápida (85 mg de sumatriptán en la capa más externa y 500 mg de naproxeno en la interna). Ambos productos parecen tener mayor eficacia en pacientes que presentan una respuesta débil respecto al sumatriptán administrado de forma individual (Brandes y cols., 2007; Cleves y Tepper, 2008).

1.2.7 Efectos adversos

Raramente pueden aparecer trastornos cardíacos graves, como vasoespasmo coronario, isquemia miocárdica transitoria, arritmias auriculares y ventriculares e infarto de miocardio. La mayoría de estos efectos se han observado en pacientes con factores de riesgo de arteriopatías (Choppin y O'Connor, 1996; Arulmozhi y cols., 2005).

Por vía oral, se han observado efectos menores como: parestesia, astenia, fatiga, rubor y sensación de presión, estrechez o dolor en el tórax, somnolencia, mareo, náuseas y sudoración (Ferrari y cols., 2001).

Por vía subcutánea, algunos pacientes sufren dolor, escozor o ardor leve y transitorio en el lugar de la inyección (Baezner y cols., 1999; Wendt y cols., 2006).

Por vía intranasal, los pacientes experimentan un sabor desagradable (Rothner y cols., 2000; Meredith y cols., 2003).

Sumatriptán está contraindicado en pacientes con historial de ictus (accidente cerebro vascular), cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, epilepsia y otros estados convulsivos. No debe usarse durante el embarazo, lactancia, ni en niños menores de 18 años (Goodman & Gilman, 2003; Catálogo de Medicamentos, 2009b).

1.3 PIEL

La piel es el órgano más extenso y accesible del cuerpo humano. Entre sus funciones se encuentra la protección del medio interno frente a determinadas agresiones externas, así como la regulación de la temperatura corporal, el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y la captación de señales sensitivas. Una característica muy interesante de la piel es que actúa como una “barrera” atípica, ya que permite el paso de ciertas sustancias exógenas al interior del organismo. Esta propiedad ha sido la base de un sinnúmero de investigaciones enfocadas hacia la posibilidad de conseguir el paso de fármacos a través de ella, en las que se ha concluido su utilidad para la administración de medicamentos, con el objeto de lograr efectos locales o sistémicos (Rodríguez y Trujillo, 2008), siendo su estructura y composición factores determinantes en este sentido.

1.3.1 Anatomía y composición química

Un individuo de peso y estatura medios está cubierto de 1.85 m² de piel, con un peso de alrededor de 4 kg, tiene un volumen de 4000 cm³, y mide 2.2 mm de espesor. La piel contiene 70% de agua, minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos, como glucosa; lípidos, en especial colesterol; y proteínas, como colágeno y queratina.

1.3.2 Estructura

La piel está constituida por tres capas superpuestas: epidermis, dermis e hipodermis (figura 5).

1.3.2.1 Epidermis

Es un epitelio plano, estratificado, queratinizado, con un espesor medio de aproximadamente 100 µm. La epidermis se encuentra en constante renovación por pérdida o descamación de sus células más superficiales, llamadas corneocitos, y está constituida del interior hacia la superficie, por cinco estratos:

- Basal o germinativo: conformado por los queratinocitos (células cilíndricas basófilas), que sintetizan la queratina y representan el 80% del total de las células epidérmicas. En este estrato se

inicia la construcción y renovación de la epidermis mediante divisiones celulares sucesivas de los queratinocitos, que sufren transformaciones a través de los diferentes estratos hasta formar los corneocitos de la capa córnea.

Los queratinocitos están unidos entre sí por desmosomas, y a la membrana basal por hemidesmosomas. Además, en cada cinco a diez queratinocitos se intercalan células dendríticas (13% de melanocitos y 4% de células de Langerhans) y no dendríticas (células de Merkel).

Los melanocitos contienen melanosomas y en su interior, melanina, que transfieren a las células vecinas. La célula de Langerhans es una célula presentadora de antígenos y pertenece al sistema de macrófagos - mononucleares. La célula de Merkel forma parte del sistema endocrino difuso; funcionando como mecanoreceptor y teniendo relación con terminaciones nerviosas sensitivas.

- Espinoso o de Malpighi: compuesto por varias capas de células poliédricas unidas entre sí por puentes intercelulares o desmosomas. En su interior existen tonofilamentos, que son indispensables para la diferenciación de queratinocitos de la capa germinativa a la capa córnea (queratinización) y forman parte integral de los desmosomas, hemidesmosomas y la membrana basal.
- Granuloso: consta de células con granulaciones de queratohialina (precursor de la queratina).
- Córneo: es la capa más superficial de la epidermis. Está formado por tres capas:
 - Estrato lúcido: presente sólo en las palmas de las manos y plantas de los pies. Ubicado justamente encima de la capa granulosa.
 - Estrato compacto: las células se encuentran íntimamente "soldadas" formando una masa compacta. Es la córnea propiamente dicha.

- Estrato descamativo: las células pierden su cohesión con las células vecinas y se liberan al exterior (Peyrefitte, 1995; Arenas, 2005).

La capa córnea tiene unas propiedades y una composición bioquímica totalmente diferente a las de las capas subyacentes de la epidermis. Las células que la componen (corneocitos) representan la última fase de la queratinización. Estas células están desprovistas de núcleo y están formadas casi exclusivamente por queratina, siendo consideradas células muertas. Contienen, sin embargo, enzimas que participan en los procesos de metabolización. Además, es rica en sustancias higroscópicas que aseguran la fijación del agua.

Los corneocitos se organizan de un modo muy esquemático, asemejándose a una pared de ladrillo. El cemento que los une es de naturaleza lipídica y está constituido por una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, de colesterol y de ceramidas.

La eliminación de las capas más superficiales del estrato córneo provoca un extraordinario aumento de la permeabilidad al agua y a otros compuestos. Este hecho se explica en base a su estructura de pared (Elías y cols., 1987; Martini, 2005; Bouwstra y Ponec, 2006).

1.3.2.1.1 Proceso de queratinización

El proceso de queratinización comprende dos fenómenos simultáneos: una migración vertical y una diferenciación de las células. Dura alrededor de cuatro semanas, dos de las cuales son necesarias para la migración de las células de la capa basal a la capa córnea. Esto se conoce como “*turn-over*” epidérmico.

Las queratinas son proteínas fibrosas helicoidales formadas por cadenas de aminoácidos ricos en azufre, cistina y cisteína (Martini, 2005). Se generan a partir de los tonofilamentos del estrato espinoso y pueden ser de dos tipos: blanda y dura. Si los queratinocitos producen filagrina, se origina la blanda. La filagrina es una glicoproteína ligadora, cuyo nombre hace referencia a su capacidad de agregar filamentos. Por el contrario, la queratina dura se forma en ausencia de filagrina. Así, los

tonofilamentos se adosan regularmente lado a lado, formando puentes disulfuros entre ellos, que transforman el producto final en un material rígido, presente en uñas y pelos.

Cuando los queratinocitos llegan a los niveles epidérmicos superiores liberan los cuerpos de Odland, elementos formados por lípidos y lipasas inactivas, que son segregados a los espacios intersticiales, promoviendo la cohesión de la epidermis y contribuyendo a formar una barrera contra la pérdida de agua. Finalmente, para que se produzca la descamación es necesario que se activen las lipasas inactivas que hidrolizan el colesterol depositado en los espacios intersticiales, proveniente, al igual que las lipasas, de los cuerpos de Odland (Zappi y Zappi, 2007).

La epidermis no se halla irrigada por vasos sanguíneos; sin embargo, es bañada por un líquido (linfa intercelular) que proviene de los vasos dérmicos que le aporta los nutrientes necesarios para su metabolismo celular.

1.3.2.2 Unión dermoepidérmica

Se trata esta de la zona de la membrana basal que separa la epidermis de la dermis, física y funcionalmente. Su principal función es el anclaje de la epidermis a la dermis y proporcionar resistencia frente a fuerzas externas. Asimismo, dirige la organización del citoesqueleto en las células basales y sirve de barrera semipermeable.

Sus estructuras proceden de los queratinocitos basales y, en menor medida, de los fibroblastos dérmicos. Esta unión constituida por colágeno, proteoglicanos (heparán-sulfato) y glicoproteínas no colagénicas, fundamentalmente laminina y fibronectina, moléculas importantes en promover la adhesión entre las células epidérmicas y la lámina densa. La membrana basal funciona como una barrera y filtro que limita el paso de moléculas con un peso molecular superior a 40 kDa (Fernández, 2002).

1.3.2.3 Dermis

La dermis constituye el sostén de la epidermis y es un grueso estrato compuesto de tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios y anexos cutáneos. En ella pueden encontrarse tres clases de fibras proteínicas: colágeno, componente fibroso principal, constituido por escleroproteínas, que discurren paralelas a la superficie cutánea; reticulina, que conforma las fibras reticulares, y está compuesta por un tipo de colágeno, que forma una malla alrededor de los vasos y los adipocitos; y por último, la elastina, que genera las fibras elásticas, las cuales son menos abundantes (Camacho, 1987).

Estas fibras se encuentran en la sustancia fundamental cuyo componente principal son los mucopolisacáridos (glucosaminoglicanos). Estos son macromoléculas constituidas por dos unidades diferentes de sacáridos que se alternan regularmente, como el ácido hialurónico, condroitín sulfato y dermatán-sulfato, que son capaces de retener grandes cantidades de agua (Wilkinson y Moore, 1990; Foraster, 1996). Además, en la dermis encontramos varios tipos de células: fibroblastos (que sintetizan las diversas fibras proteínicas, sustancia fundamental y colagenasa), mastocitos, polimorfonucleares, eosinófilos y plasmocitos.

La dermis se encuentra vascularizada por un plexo superficial y otro más profundo, comunicados entre sí, existiendo asimismo una red paralela de vasos linfáticos. Se ha dividido, arbitrariamente, en dos regiones: la dermis papilar y la dermis reticular. La dermis papilar es la más próxima a la unión dermoepidérmica, y la reticular es la más profunda, representando el 80% del espesor total.

1.3.2.4 Hipodermis

La hipodermis está constituida fundamentalmente por tejido adiposo de espesor variable según la localización. Este tejido celular subcutáneo está formado por lóbulos de adipocitos, que son células esféricas con núcleo periférico y citoplasma lleno de lípidos (triglicéridos), que sirven como reserva energética y aislantes de calor; dichos lóbulos están separados por tabiques de tejido conectivo (Arenas, 2005).

Los adipocitos participan en el metabolismo lipídico, ya que la mayoría de los ácidos grasos procedentes de triglicéridos alimentarios, son

transferidos directamente a través de la membrana plasmática a la célula adiposa, donde se combinan con glicerol y son almacenados como triglicéridos (lipogénesis).

Por otro lado, en el interior del adipocito, también puede ocurrir la hidrólisis de los triacilgliceroles en ácidos grasos libres y glicerol gracias a una triglicérido lipasa hormonosensible fosforilada, enzima controlada por la insulina y las catecolaminas. Este tejido adiposo también proporciona protección mecánica al organismo y participan en la termorregulación (Martini, 2005).

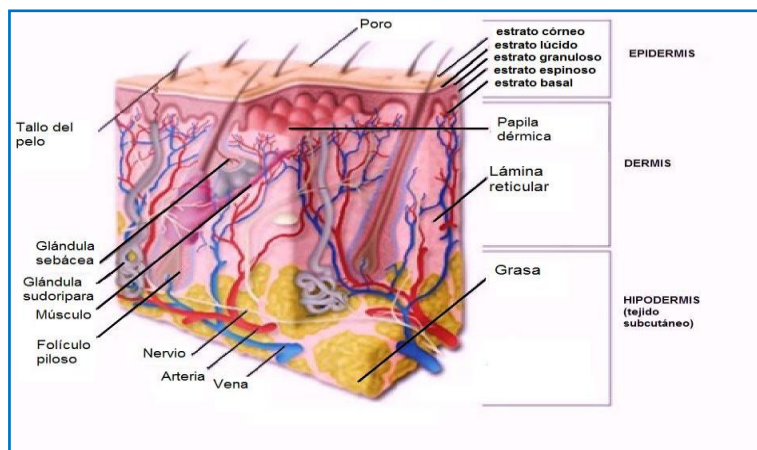


Figura 5. Estructura de la piel

(<http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/2008/09/dermoc cosmetica/anatomia/02.html>, 2009).

1.3.3 Circulación sanguínea de la piel

La irrigación sanguínea de la piel se realiza a través de una densa trama vascular que procede de la red de arterias y venas que posee el tejido muscular. Arteriolas y vénulas forman un plexo en la hipodermis, a partir del cual se irrigan los lóbulos que forman el tejido adiposo subcutáneo. De este plexo hipodérmico - horizontal y, por tanto, paralelo a la superficie cutánea, ascienden arteriolas y vénulas cutáneas, que se dirigen primero a la dermis reticular, a los folículos pilosebáceos y a las glándulas sudoríparas, para finalizar en la dermis papilar. A nivel de las

papilas dérmicas se encuentra un segundo plexo de arteriolas y vénulas, paralelo a la superficie cutánea, que se sitúa en la zona subpapilar.

En todos los niveles del tejido conjuntivo se encuentran conexiones entre arterias y venas, bien a través de capilares o bien por anastomosis arteriovenosas; de este modo, las arterias drenan a las venas, que finalmente desembocan en las ramas gruesas de las venas musculares (Pons y Parra, 1995).

Una óptima circulación sanguínea asegura la oxigenación y la nutrición de las diferentes capas celulares de la piel y juega un papel fundamental en la termorregulación. Además, la vascularización de la dermis interviene de modo importante en los procesos de absorción transcutánea (Odland, 1991).

1.3.4 Apéndices cutáneos

Los apéndices cutáneos son invaginaciones profundas en la dermis. Comprenden las glándulas sudoríparas, que pueden ser ecrinas y apocrinas y los folículos pilosebáceos. Estas estructuras realizan importantes funciones en cuanto a la protección y homeostasis de la piel.

- Glándulas sudoríparas ecrinas: son los apéndices cutáneos más numerosos y se encuentran en casi toda la superficie corporal. Tienen un conducto cilíndrico en espiral, formado por células epidérmicas que se extienden desde su apertura visible en la epidermis, hasta la profundidad de la dermis, donde el conducto toma la forma de espiral y se enrolla en una bola. El conducto enmarañado es secretor y elabora el sudor inodoro, que tiene un pH entre 4.5 y 5.5. Dicha secreción, que tiende a la neutralidad a medida que aumenta la sudoración, asciende por el conducto para ser liberado en la superficie de la piel, parece que en pequeñas ráfagas, sugiriendo una acción peristáltica por los conductos.

Aparentemente, el conducto de la glándula tiene capacidad para modificar el sudor cuando fluye en sentido ascendente, eliminando sales o agua. Así la composición del sudor es

variable aunque consta de algunos pequeños iones, urea, aminoácidos, pequeñas cantidades de sacáridos y, posiblemente, algunos lípidos (Wilkinson y Moore, 1990).

Estas glándulas participan en el control de la temperatura corporal (termólisis), ya que al aumentar esta temperatura a causa de estímulos como la temperatura ambiente, luz ultravioleta, fiebre, entre otros, la glándula responde produciendo la sudoración, y la evaporación del sudor produce un efecto de enfriamiento.

Por otro lado, estas glándulas son responsables de la denominada sudoración “psíquica”, en respuesta a estímulos como el estrés emocional, la cual se localiza generalmente en la frente, las palmas de las manos y la planta de los pies; este tipo de sudoración no se acompaña de vasodilatación cutánea.

El sudor ecrino es uno de los componentes de la capa hidrolipídica. Interviene directamente, por tanto, en el papel que tiene esta capa superficial, como: mantenimiento del pH, funciones inmunológicas por la presencia de interleukinas y de inmunoglobulinas, hidratación cutánea por la presencia de ácido láctico y de urea, etc. (Martini, 2005).

- Glándulas sudoríparas apocrinas: desembocan en un folículo piloso y se localizan en axilas, areolas mamarias y región anogenital. Son glándulas tubulares que secretan un sudor abundante bajo la influencia de una temperatura elevada o de una afluencia importante de adrenalina. El sudor que produce es ligeramente amarillento. Los gérmenes de la superficie cutánea lo desintegran originando el olor característico de cada persona, que deriva de la formación de ácidos grasos de cadena corta como caprílico, cáprico, valeriano, etc. (Martini, 2005).
- Folículos pilosebáceos: la unidad pilosebácea es una unidad funcional, integrada por el pelo, la glándula sebácea, el músculo piloerector y, en algunas regiones, glándulas sudoríparas apocrinas.

- **Folículo piloso:** los folículos pilosos son invaginaciones tubulares de la epidermis. En el folículo piloso se origina el pelo por queratinización de células formadas dentro de la matriz, en la base del folículo, que se conoce como bulbo. El folículo recibe las secreciones de las glándulas apocrinas y de las glándulas sebáceas, que lubrican al pelo gracias al sebo que secretan.
- **Glándulas sebáceas:** secretan el sebo, que constituye la mayoría de la secreción lipídica que cubre la piel y el cabello. Se presentan en la mayor parte del cuerpo y están normalmente asociadas con los folículos pilosos. Las concentraciones más altas se encuentran en el cuero cabelludo, cara y zona superior del pecho y hombros. No existen en plantas y palmas.

Estas glándulas son *holocrinas*, es decir, pasan por una etapa de desarrollo y maduración, durante la cual acumulan lípido, llegando a alcanzar varias veces su tamaño original, desintegrándose completamente a continuación, y descargando su contenido en el orificio de salida de la glándula. La actividad de estas glándulas se encuentra bajo control hormonal y es estimulada por andrógenos (Wilkinson y Moore, 1990).

1.3.4.1 Manto hidrolipídico

La superficie de la piel normalmente se encuentra cubierta por una emulsión epicutánea, denominada también *manto hidrolipídico*, la cual se forma a partir de las secreciones sebáceas y sudoríparas. La emulsión epicutánea que recubre el estrato córneo coadyuva al mantenimiento de su función de barrera.

1.3.5 Funciones de la piel

La principal función de la piel es proteger al individuo de las agresiones del medio ambiente. La piel es la encargada de recibir los estímulos del exterior a través de las terminaciones nerviosas periféricas que se sitúan en ella, y de allí se dirigen al sistema nervioso central (SNC), que genera una respuesta.

En la piel existe un gran número de nervios sensoriales que le permiten actuar como receptor de muy diversos estímulos somatosensoriales: dolor, temperatura (termoregulación), discriminación de dos puntos separados, presión, vibración, tacto y prurito. Además, en ella se producen los pigmentos de la piel, que protegen de la radiación UV (Pons y Parra, 1995).

Su función protectora se consigue gracias a que actúa como barrera, siendo impermeable a la penetración de muchos compuestos químicos orgánicos e inorgánicos. Esta función es llevada a cabo por la capa córnea, gracias a su naturaleza y estructura.

Sin embargo, en ciertos casos, la piel permite la entrada de sustancias, como fármacos, que pueden penetrar a través de la capa córnea e incluso llegar al torrente circulatorio sistémico (Arenas, 2005; Martini, 2005).

1.4 TRANSPORTE DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL

Se ha demostrado que la piel permite el paso de ciertas moléculas desde su superficie, atravesando el estrato córneo bajo la influencia de un gradiente de concentración, y su subsiguiente difusión a través del estrato córneo, epidermis viable y dermis, para alcanzar finalmente el torrente circulatorio. A este proceso se le conoce como absorción percutánea y tiene las ventajas de evitar el efecto de primer paso hepático, la degradación enzimática a nivel gastrointestinal, alcanzar niveles plasmáticos más constantes, y evitar el dolor propio de una administración intramuscular o subcutánea, resultando así en una vía más confortable para el paciente (Weber, 1986; Lauretti y cols, 2002; Burkman, 2007; El-Laithy, 2009).

Cuando el medicamento se deposita sobre la piel, entra en contacto con el manto hidrolipídico. Una vez que se incorpora a esta capa superficial puede penetrar hacia capas más profundas, ya sea difundiendo a través del estrato córneo (vía transepidérmica) o a través de los folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas (vía transapendicular).

La vía transepidérmica es la más importante y los fármacos que penetren a través de ella pueden seguir dos vías de entrada: la intracelular o transcelular a través de los queratinocitos y la vía

intercelular a través de los intersticios celulares (Betlloch y Silvestre, 2002). Una vez que la molécula permea a través de los diferentes estratos de la piel, llega a los capilares sanguíneos debiendo alcanzar concentraciones plasmáticas efectivas que le permitan ejercer un efecto terapéutico a nivel sistémico.

La absorción ocurre por difusión pasiva siguiendo la primera “ley de Fick”, la cual indica que la transferencia o flujo (J) de la sustancia que difunde por unidad de área de una sección (x) es proporcional al gradiente de concentración medido normal a la sección (ΔC), y se expresa como sigue:

$$J = -D \left[\frac{\Delta C}{\Delta x} \right]$$

El signo negativo indica que el sentido del flujo se produce de la mayor concentración a la menor concentración, es decir, se crea un gradiente negativo. D es el coeficiente de difusión. Esta ecuación describe la difusión en estado estable o estado estacionario.

La segunda ley de Fick describe la difusión de compuestos en estado no estacionario y se expresa como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Siendo D independiente de la concentración y la dirección, y considerando la difusión unidireccional como la situación experimental más usual. Esta ecuación diferencial de difusión establece que la velocidad de difusión (dC/dt) es proporcional a la diferencia de concentración que se establece dentro del campo difusivo en la dirección x (Hadgraft y Guy, 2003; Jiménez y cols., 2003; Barry, 2004a).

1.4.1 Reglas generales que gobiernan la penetración de un fármaco a través de la piel

La vía intercelular parece ser el camino difusional predominante, para la mayoría de las moléculas que deben atravesar el estrato córneo; así la sustancia permeante debe difundir a través de la matriz lipídica intercelular, por lo que la difusión de las moléculas de carácter lipófilo a través del estrato córneo se ve favorecida. Sin embargo, la sustancia permeante tiene que atravesar, secuencial y repetidamente, un número de dominios lipofílicos e hidrofílicos (Moser y cols., 2001).

En general, la difusión pasiva de los fármacos a través de la piel está condicionada, teniendo en cuenta que (Potts y Guy, 1992; Brown y Langer, 1998; Hadgraft y Guy, 2003):

- La penetración de las moléculas polares o hidrofílicas pequeñas es controlada por el estrato córneo.
- Las moléculas hidrofóbicas están controladas por el grado de partición que tengan entre el estrato córneo y la epidermis.
- El coeficiente de partición octanol / agua de la molécula es muy importante, especialmente para moléculas de polaridad intermedia, debido a la naturaleza de la piel y al trayecto de la difusión, de manera que su incremento favorece la permeación: un $K_{oct/w}$ de ~ 2 se puede considerar ideal.
- El peso molecular es inversamente proporcional al coeficiente de permeación.
- Una molécula no ionizada se reparte mejor dentro de la membrana lipofílica, por lo que se debe tener en cuenta el pH de la superficie de la piel, que está en torno a 4 – 5 unidades y su buena capacidad buffer, lo cual podría cambiar el estado de ionización de la molécula con el que se encuentra en el vehículo que la contiene.
- La oclusión de la piel facilita la hidratación del estrato córneo, lo que incrementa la penetración y permeación.

- La penetración y difusión a través de la piel aumenta considerablemente cuando existe daño del estrato córneo.

Cuando se administra un medicamento por vía transdérmica, es muy importante evaluar previamente la absorción de la molécula activa. Inicialmente, la permeación del fármaco a través de piel en condiciones “ex vivo” puede utilizarse para predecir la absorción percutánea en humanos.

Con el fin de estimar la tasa de absorción o paso a través de la piel, se utilizan diferentes métodos como: células de difusión, espectroscopía de reflectancia total atenuada de Fourier en el infrarrojo (ATR – FTIR) y técnica del “*tape stripping*” o exfoliación del estrato córneo con cinta adhesiva lo que permite medir la concentración del activo dentro del estrato córneo. De todos ellos el más ampliamente utilizado es el método de las células de difusión (Moser y cols., 2001; Jain y cols., 2005; Russeau y cols., 2009).

1.4.2 Células de difusión

Estas células han sido diseñadas para estudiar el flujo en estado estacionario y deducir parámetros de permeación como el coeficiente de partición, el coeficiente de difusión y el tiempo de retardo.

Están constituidas por un compartimento donador y un compartimento receptor separados por una membrana limitante (Figura 6). En el compartimento donador se coloca la sustancia penetrante y en el receptor una solución acuosa con agitación continua. Esta solución correspondería a la sangre o a los líquidos intersticiales, y debería mantener condiciones sink¹. En el caso de usar compuestos muy lipófilos se pueden presentar problemas para el reparto desde la membrana hasta la fase receptora acuosa, por lo que algunos autores recurren a la adición de codisolventes (Stott y cols., 1998; Touitou y cols., 2000; Fang y cols., 2001; Venter y cols., 2001; Barry, 2004b).

¹ Se dice que existen “condiciones sink” cuando el volumen del medio de disolución es de cinco a diez veces mayor que el volumen requerido para hacer una solución saturada.

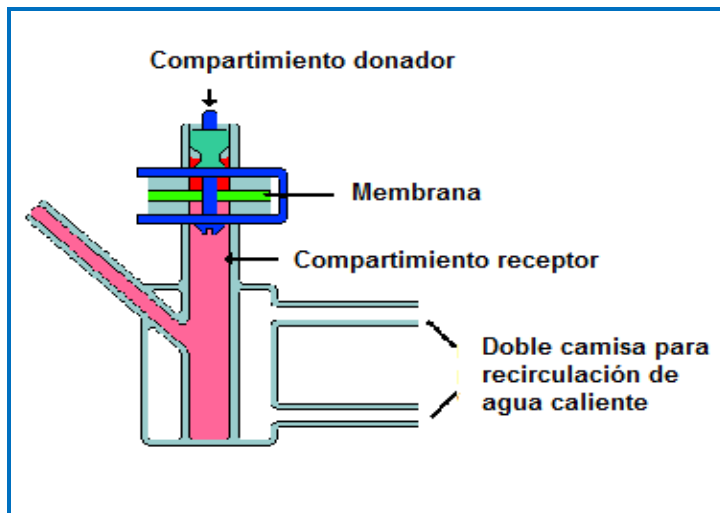


Figura 6. Célula de difusión vertical. Fuente: www.permegear.com/franz08.gif, 2009.

La membrana que separa ambos compartimentos puede ser de origen natural o sintético. Usar piel humana es lo ideal; sin embargo, su disponibilidad es limitada, lo que ha llevado a emplear otro tipo de membranas, como la piel de cerdo cuyas propiedades bioquímicas e histológicas son similares a la piel humana (Barbero y Frasc, 2009), piel de rata (Maestrelli y cols., 2005; López-Pinto y cols., 2005), de conejos, piel artificial (dermis y epidermis reconstruida) y membranas sintéticas, como membranas de acetato de celulosa y membranas con mezcla de acetato y nitrato de celulosa (Maestrelli y cols., 2006). El uso de las membranas sintéticas permite resolver algunos de los problemas que se presentan con la piel humana o animal, como los procesos de conservación, pre tratamiento, accesibilidad y costes (Huong y cols., 2009).

La velocidad de permeación del fármaco desde el compartimento donador, a través de la membrana, al compartimento receptor es determinada midiendo o cuantificando la cantidad de sustancia que permea en función del tiempo, valiéndose para ello de métodos analíticos adecuados, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La piel constituye una de las vías de administración especiales para activos que poseen semividas biológicas cortas y estrechos índices

terapéuticos; sin embargo, también deben poseer ciertas características fisicoquímicas, como un adecuado coeficiente de partición octanol / agua, buena solubilidad en aceite y agua, bajo peso molecular, etc., para poder atravesarla (Naik y cols., 2000). Pocos principios activos tienen estas características requeridas para penetrar y permear suficientemente alcanzando concentraciones plasmáticas terapéuticas.

1.4.3 Métodos para mejorar la permeación

Con la finalidad de mejorar la absorción transdérmica de fármacos, se han desarrollado diversos mecanismos físicos y químicos (figura 7), con los que se consigue disminuir temporalmente la impermeabilidad de la piel. Todos ellos deben tener como característica común el ser farmacológicamente inertes, no tóxicos, no irritantes, compatibles con el principio activo y excipientes y no producir pérdida de materiales endógenos (Sinha y Maninder, 2000; Thong, 2007; Badran y cols., 2009; Lanke y cols., 2009).

Diversas investigaciones han demostrado que succinato de sumatriptán permea a través de la piel por difusión pasiva. Sin embargo, la cantidad que permea no es suficiente para alcanzar niveles plasmáticos terapéuticos, probablemente debido a su carácter hidrofílico, por lo que se ha hecho necesario emplear mejoradores químicos (Femenía-Font y cols., 2005), iontoforesis, así como la combinación de estas estrategias con el fin de mejorar su penetración (Femenía-Font y cols., 2006a; Patel y cols., 2007; Balaguer y cols., 2008; Pierce y cols., 2009). Estas investigaciones han arrojado resultados favorables para la posible utilización del sumatriptán vía transdérmica, especialmente cuando se usan combinaciones con los aceleradores de la penetración.

Teniendo en cuenta la baja biodisponibilidad del sumatriptán al ser administrado por vía oral y nasal, así como los inconvenientes de su administración parenteral, y en vista de los resultados presentados en las investigaciones sobre su administración transdérmica, la formulación de liposomas de sumatriptán probablemente ofrezca un mayor incremento de la permeación del fármaco, con la consiguiente elevación de sus niveles plasmáticos, pudiendo acercarse a los conseguidos por vía subcutánea.

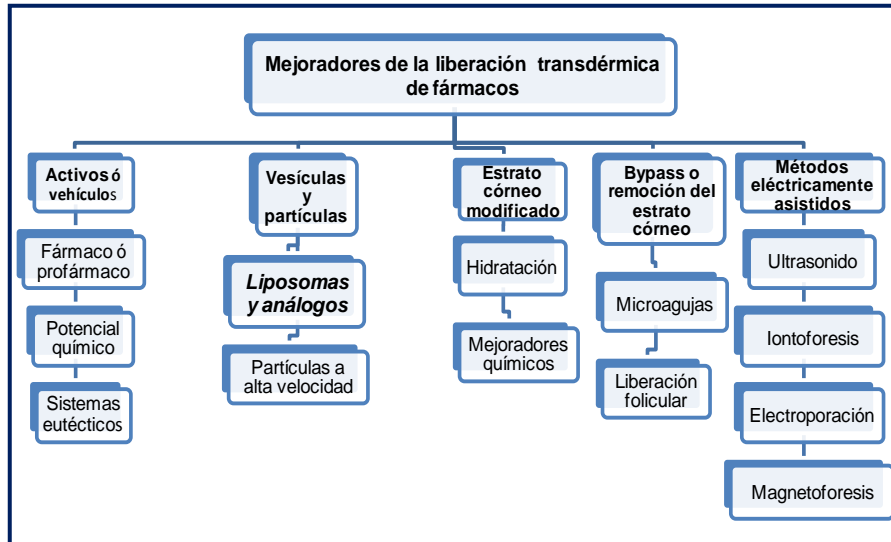


Figura 7. Métodos para mejorar la terapia transdérmica. Fuente: Modificado de Barry, 2006.

1.5 LIPOSOMAS

Se pueden definir como vesículas esféricas que contienen una o varias bicapas concéntricas de fosfolípidos, que encierran un número igual de compartimentos acuosos. Los fosfolípidos son los componentes básicos de las membranas celulares humanas. Tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso. Esta propiedad de los fosfolípidos se debe a que son moléculas anfipáticas, es decir, poseen un extremo polar o hidrofílico que se orienta hacia la fase acuosa y un extremo no polar o hidrofóbico que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa (Ball, 1995).

Los liposomas fueron descritos por primera vez en 1965 y se utilizaron inicialmente como modelos en el estudio de las membranas biológicas. Fue Alex Bangham (Bangham y cols., 1965; Bangham y cols., 1974; Bangham, 1993) quien descubrió cómo determinadas moléculas susceptibles de formar membranas, como los fosfolípidos, interactúan con el agua para formar estructuras aisladas, que hoy en día llamamos liposomas (Lasic y cols., 1998).

Los liposomas se comenzaron a emplear con fines cosméticos en la década de los 80, cuando la casa *Dior* sacó al mercado un producto antienvjecimiento. Posteriormente, a finales de esta década y comienzo de los 90, la industria farmacéutica comenzó a comercializar productos a base de liposomas, como el tensioactivo pulmonar sintético Alveofact[®], Epi-Pevaryl[®] que contiene econazol para uso tópico y Doxil[®] inyectable que contiene doxorubicina para el tratamiento del cáncer, entre otros (Müller y cols., 2000).

Estructuralmente, las colas hidrofóbicas de los lípidos forman las bicapas y los grupos polares de los lípidos se orientan hacia la cavidad acuosa interna y hacia la solución extravascular (Edwards y Baeumner, 2006). Así, los liposomas pueden contener una (unilaminar) o más bicapas (multilaminar) y el principal lípido constituyente de las bicapas habitualmente es la fosfatidilcolina (Lautenschläger, 2001).

1.5.1 **Clasificación**

En función de su tamaño y número de bicapas, los liposomas se clasifican en tres categorías:

- Vesículas multilaminar (“*multilamellar vesicles*”, MLVs)
- Vesículas unilaminar pequeñas (“*small unilamellar vesicles*”, SUVs)
- Vesículas unilaminar grandes (“*large unilamellar vesicles*”, LUVs)

En la figura 8 se pueden apreciar las características más importantes de cada uno de ellos.

En cuanto a las vesículas multilaminar, existen diversos mecanismos que permiten aumentar su capacidad de carga: el uso de especies formadoras cargadas (fosfolípidos o lípidos con carga estructural neta o polietilenglicoles de distintos pesos moleculares, entre otros) aumenta la repulsión entre las distintas bicapas e incrementa, por tanto, el volumen interno del liposoma (Hathout y cols., 2007). La adición de determinados esteroides a la formulación, como colesterol, incrementa la eficacia de encapsulación del sistema debido a la alteración de las propiedades de membrana del liposoma.

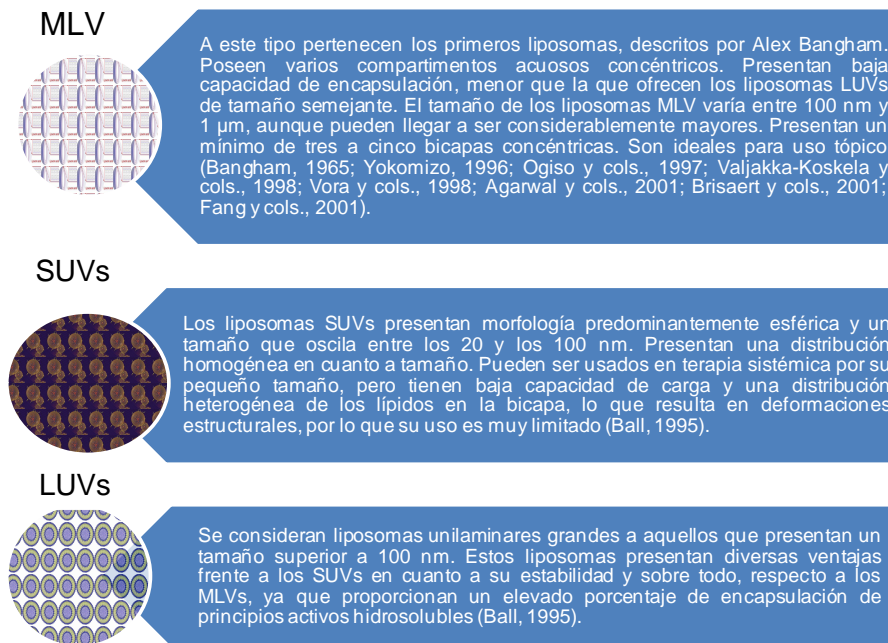


Figura 8. Clasificación de los liposomas en función del tamaño y número de bicapas.

La adición de determinadas cantidades de etanol a la formulación produce así mismo un aumento en la eficacia de encapsulación de las vesículas (Dayan y Touitou, 2000), dando lugar a la formación de estructuras similares a los liposomas denominados etosomas (Touitou y cols., 2000; López-Pinto y cols., 2005; Mura y cols., 2007).

1.5.2 Materiales formadores de vesículas

Los liposomas pueden elaborarse a partir de una gran variedad de lípidos simples y de mezclas de éstos. Por regla general, estos sistemas se elaboran utilizando distintos fosfolípidos como agentes principales y añadiendo cantidades variables de colesterol a la formulación, con la finalidad de aumentar la estabilidad del fármaco en la vesícula, y de mejorar la eficacia de encapsulación, ya que el colesterol disminuye la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en el interior de las bicapas (Betageri y Parsons, 1992; Fang y cols., 2001).

1.5.2.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son compuestos de carácter anfipático. Constan de una molécula lipídica compleja, con uno de sus grupos hidroxilos esterificado con el ácido fosfórico, lo que constituye la cabeza polar del fosfolípido, mientras que los otros dos grupos hidroxilos se encuentran esterificados con sendos ácidos grasos, constituyendo ésta la región hidrofóbica de la molécula. Los compuestos resultantes poseen un átomo de carbono asimétrico. Existen tres tipos fundamentales de fosfolípidos: glicerofosfolípidos, esfingolípidos y glucoesfingolípidos, además de sus correspondientes productos de hidrólisis. El más comúnmente utilizado de todos los fosfolípidos en la elaboración de liposomas es la fosfatidilcolina (PC) (Figura 9), que es un compuesto de carácter anfipático en el que una molécula de glicerol esterifica un par de cadenas hidrocarbonadas y una molécula de fosfocolina (Mathews y Van Holde, 1998).

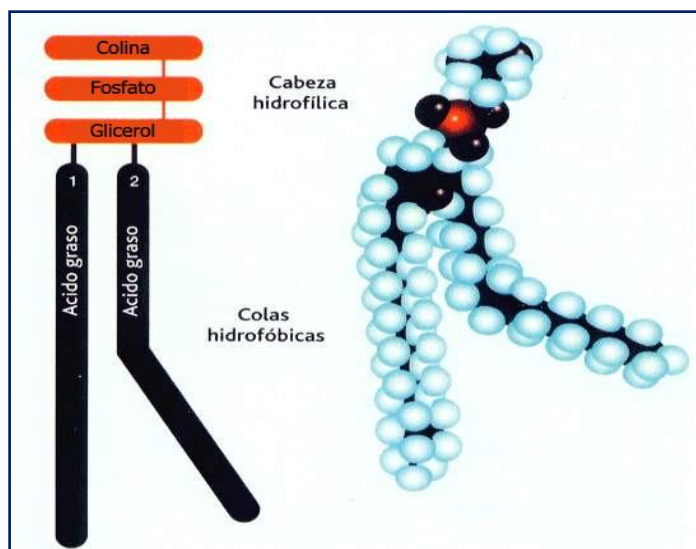


Figura 9. Dos representaciones de la estructura de un fosfolípido. Los grupos colina, fosfato y glicerol forman la cabeza hidrofílica y en conjunto se conocen como fosfatidilcolina. Esta cabeza está unida a los ácidos grasos mediante dos átomos de carbono 1 y 2 (Fuente: www.tcb.cl, 2008).

Además de la fosfatidilcolina, existen otros lípidos que se utilizan como formadores de las vesículas liposomales. Algunos de ellos y sus características se describen de forma general en la figura 10.

Lípidos formadores de vesículas		
<i>Fosfatidilcolina</i>	<i>Otros lípidos</i>	<i>Lípidos iónicos</i>
<p>Lecitina, puede obtenerse a partir de fuentes tanto naturales como por síntesis química. Se utiliza como fosfolípido principal en la composición de los liposomas, para la mayoría de sus aplicaciones debido, a su bajo coste de producción, a su carga neutra y comportamiento químicamente inerte. La lecitina natural es una mezcla de diferentes fosfatidilcolinas, cada una de las cuales presenta una cadena, longitud y número de insaturaciones característicos. La molécula de PC es insoluble en agua, y su comportamiento en medio acuoso está encaminado a minimizar las fuerzas repulsivas que se generan entre la fase acuosa predominante y las largas cadenas hidrocarbonadas del ácido graso, de carácter netamente hidrofóbico (Lasic y cols., 1998). Estas interacciones son completamente eliminadas gracias a la disposición que las moléculas adoptan en el medio, formando estructuras vesiculares cerradas (Cullis y Hope, 1985).</p>	<p>Existen otros tipos de lípidos que pueden ser incluidos, bien como componentes mayoritarios en las formulaciones o como componentes auxiliares para modificar las propiedades de las membranas de las vesículas. Entre otras cabe citar: fosfatidilamina (lípidos insaturado del tipo de las cefalinas), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), fosfolípido sintético saturado, dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) fosfolípido sintético saturado, diesteroil fosfatidilcolina (DSPC), menos permeable a la fase acuosa que la PC. Estos fosfolípidos, de gran pureza, han demostrado ser relativamente inocuos y atóxicos (Betageri y cols., 1993).</p>	<p>Dotan a las vesículas de carga positiva o negativa para favorecer la adsorción y endocitosis celular, así como para mejorar la capacidad de encapsulación del componente acuoso entre las bicapas, las cuales tienden a separarse como consecuencia de la repulsión entre los grupos polares cargados con el mismo signo (Cerezo, 1993). Así mismo, la presencia de lípidos cargados en la composición reduce los fenómenos de agregación que ocurren tras la formación de los liposomas MLVs. Entre ellos se encuentra estearilamina (EA), que permite la obtención de liposomas con cargas positivas, y fosfolípidos como fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) y dihexadecilfosfato (DHP) utilizados para elaborar liposomas con carga negativa (Betageri y cols., 1993).</p>

Figura 10. Lípidos formadores de vesículas. Características.

1.5.2.2 Colesterol

Es un alcohol que contiene el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (esteroide), ampliamente distribuido en el organismo animal. Es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos (Reilly, 1999). Como es bien sabido, el colesterol añadido a la formulación de liposomas modifica la fluidez de la membrana y en consecuencia,

modula la capacidad de encapsulación y estabilidad física de las vesículas (Cerezo, 1993; López-Pinto y cols., 2005).

La molécula de colesterol se ubica en el interior de la membrana de acuerdo con sus características anfipáticas, de manera que el grupo hidroxilo se orienta hacia la fase exterior acuosa, y la cadena alifática se encuentra alineada en paralelo con las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos constituyentes (Coderch y cols., 2000). Por sí mismas, las moléculas de colesterol no son capaces de formar estructuras vesiculares cerradas, pero son susceptibles de ser incorporadas a la composición de los liposomas, produciendo en éstos diferentes alteraciones en sus propiedades.

A bajas concentraciones, el colesterol reduce la permeabilidad de la bicapa lipídica, disminuyendo la libertad de movimiento de las moléculas de fosfolípidos y aumentando así el grado de empaquetamiento de la bicapa. En cambio, cuando la concentración de colesterol es superior al 30%, se introducen importantes cambios en las propiedades de transición del fosfolípido de membrana, pudiéndose llegar a una aparente desaparición de ésta. Se conoce que cada fosfolípido tiene una temperatura de transición de fase característica, que es propia de cada molécula y que puede variar considerablemente cuando se producen interacciones entre las cadenas de los ácidos grasos y otros componentes presentes en la formulación (Lasic y cols., 1998).

1.5.3 Métodos de preparación

1.5.3.1 Método de Bangham

Mediante este método se obtienen las vesículas multilaminares por hidratación de una fina película de lípidos. Dicha película es hidratada con un medio acuoso a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase de los lípidos. El fármaco a encapsular se incluye, bien en el medio acuoso de hidratación (fármacos hidrofílicos) o bien en la fina película lipídica (fármacos lipófilos), que se obtiene tras la disolución del lípido en un disolvente orgánico apropiado y posterior rotaevaporación del mismo en un matraz de fondo redondo (Gruner y cols., 1985; Sharma y Sharma, 1997).

En caso de utilizar una mezcla de distintos lípidos, los componentes deben ser disueltos en el disolvente orgánico previamente a su evaporación.

En condiciones normales, se debe trabajar siempre a temperaturas superiores a la temperatura crítica o temperatura de transición de fase (T_c) del lípido en cuestión o en caso de tratarse de una mezcla de lípidos, por encima de la T_c más alta ya que, de lo contrario, la estructura de los fosfolípidos de membrana permanecerían en estado cristalino, con lo que la bicapa no presentaría las características de rigidez e impermeabilidad necesarias para la encapsulación eficaz de los diferentes principios activos.

Las vesículas resultantes de este proceso son muy heterogéneas en cuanto a tamaño y número de láminas. La realización de ciclos de vortex da lugar a una reducción del tamaño medio de las partículas (Olsen y cols., 1979; Rosoff, 1998). Así mismo, la preparación puede ser sometida a sucesivos ciclos de extrusión a través de membranas de policarbonato con diámetro de poro decreciente, con objeto de obtener una preparación de tamaño y características más homogéneas (Rosoff, 1998).

Dado el mayor contenido en lípidos formadores de las vesículas MLVs, estos sistemas son óptimos para la inclusión de principios activos liposolubles (Maestrelli y cols., 2006).

1.5.3.2 Método de congelación y calentamiento de MLVs (*Frozen And Thawed Multilamellar Vesicles, FAT*)

Este método se basa en la elaboración de liposomas a partir de vesículas preformadas, las cuales son sometidas a ciclos de congelación – descongelación, por inmersión en nitrógeno líquido durante minutos y descongelación posterior en un baño termostatzado por el mismo tiempo. Este proceso se repite un determinado número de veces (Pick, 1981; Ueno y Sriwongsitanont, 2005).

Durante la etapa de congelación, la bicapa lipídica seca o deshidratada entra en contacto con el fármaco a encapsular. Posteriormente, al descongelar la muestra, las posibilidades para atrapar sus moléculas

son mucho mayores. Con este método se consigue una alta eficacia de encapsulación, como demuestran algunos autores (Lasch y cols., 2003).

1.5.3.3 Método de extrusión

El tamaño de las vesículas MLV puede ser reducido mediante un proceso de extrusión en condiciones de altas presiones a través de una “*French Press*” (Barenholz y cols., 1979; Hamilton y Guo, 1984; Rosoff, 1998; Lasic y cols., 1998). Un único ciclo de extrusión a 20000 psi da lugar a una preparación heterogénea con una población de SUVs de aproximadamente el 60% del total. Tras la realización de 5 ciclos de extrusión como el anteriormente descrito, es posible obtener hasta un 95% de SUVs (Hamilton y Guo, 1984). Múltiples ciclos de extrusión a alta presión originan poblaciones homogéneas de SUVs tanto en número de láminas como en tamaño.

1.5.3.4 Método de eliminación del tensioactivo

La eliminación del tensioactivo en preparaciones fosfolípido / tensioactivo implica la aparición de micelas durante el proceso de formación de los liposomas unilaminares (Gerritsen y cols., 1978). El tensioactivo puede ser eliminado por diálisis (Kagawa y Racker, 1971; Milsmann y cols., 1978; Rhoeden y Goldin, 1979; Zumbuehl y Weder, 1981) o mediante filtración en gel (Brunner y cols., 1976). Estos procedimientos están basados en la elevada solubilidad de los monómeros del emulgente en solución acuosa, que viene determinada por la concentración micelar crítica (CMC) del tensioactivo. Agentes con una CMC relativamente alta pueden eliminarse fácilmente, mientras que aquellos con CMC bajas son más difíciles de eliminar.

La diálisis del tensioactivo fue introducida por Kagawa y Racker (1971) con objeto de fijar proteínas de membrana de bicapas artificiales. Existen modificaciones de esta técnica, como la célula de diálisis “*flow-through*” que permite controlar la velocidad de eliminación del tensioactivo (Milsmann y cols., 1978; Zumbuehl y Weder, 1981).

Este método presenta dos importantes inconvenientes. En primer lugar, el tensioactivo no puede ser eliminado completamente de la muestra. Se ha relacionado la presencia de residuos de estas sustancias con la alteración de las propiedades físicas de las vesículas (Kramer y

Hasselbach, 1981). En segundo lugar, al menos mediante la técnica de diálisis, la encapsulación de compuestos de bajo peso molecular se ve impedida debido a que la eliminación de tensioactivo es anterior a la formación de las vesículas.

1.5.3.5 Método de evaporación en fase reversa

El procedimiento está basado en la formación de “micelas invertidas”, es decir, gotas de agua pequeñas estabilizadas por una monocapa de fosfolípidos que se encuentran dispersas en un exceso de disolvente orgánico. Las micelas invertidas se forman por sonicación de una mezcla de un medio acuoso, que contiene las moléculas solubles en agua para ser encapsuladas, con una fase orgánica en la cual las moléculas anfifílicas del fosfolípido han sido solubilizadas. A continuación, tiene lugar la eliminación lenta del disolvente orgánico en un rotavapor, produciéndose la transformación de las micelas invertidas en un gel viscoso, siendo éste el punto crítico del procedimiento: el gel colapsa y algunas de las micelas invertidas se desintegran. El exceso del fosfolípido resultante contribuye a la formación de una bicapa completa alrededor de las micelas restantes, lo cual resulta en la formación de vesículas o liposomas REVs.

Los REVs son principalmente unilaminares, aunque algunas vesículas en cada preparación pueden resultar con varias bicapas concéntricas constituyendo así vesículas oligolaminares (Lasch y cols., 2003).

1.5.4 Aplicación de los liposomas vía tópica

Los liposomas pueden incorporar esencialmente cualquier tipo de fármaco, tanto en el compartimiento acuoso de la vesícula como en la región hidrofóbica de las bicapas lipídicas (Blume y Cevc, 1990).

En la figura 11 se muestra una estructura que corresponde a un liposoma multilaminar. Como puede apreciarse, los principios activos hidrofóbicos, marcados en color verde, se insertan entre los fosfolípidos que forman la bicapa del liposoma, mientras que los compuestos solubles en agua, de color violeta, quedan atrapados en el espacio acuoso entre las bicapas.

Los liposomas son ampliamente utilizados en el campo farmacéutico como sistemas de liberación de fármacos, debido a su versatilidad y eficacia terapéutica. Son administrados por diferentes vías como la parenteral y la tópica.

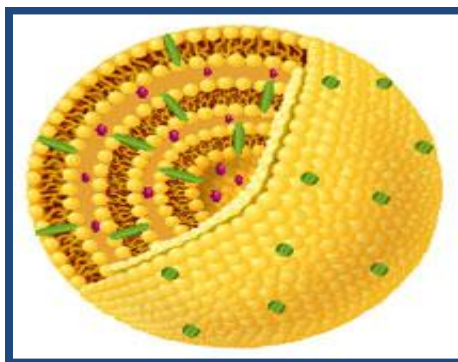


Figura 11. Liposoma multilaminar (www.encapsula.com/company.html, 2007).

La vía tópica está resultando muy interesante porque mejora la liberación transdérmica de principios activos con actividad sistémica, proporcionando así una vía no invasiva alternativa a la vía oral y parenteral (Maestrelli y cols., 2006).

Fue en el año 1980, cuando Mezei y Gulasekharan, introdujeron el uso de los liposomas por vía tópica, usando como fármaco modelo la triamcinolona (Mezei y Gulasekharan, 1980). Desde entonces, se han desarrollado innumerables formulaciones liposomales para ser administradas por esta vía, en las que, buscando mejorar la eficacia y estabilidad del preparado, se han introducido modificaciones dando origen a sistemas con morfología similar a la de los liposomas convencionales (constituidos fundamentalmente por fosfatidilcolina) pero con diferentes composiciones, funciones y denominaciones, que dependen de su composición. Así surgieron los transfersomas, que son vesículas constituidas por fosfatidilcolina y un surfactante, que las hace deformables facilitando su entrada en la piel (Qiu y cols., 2008), niosomas, compuestos por tensioactivos iónicos con colesterol, lo que les proporciona mayor estabilidad (Vyas y cols., 2005), etosomas, los

cuales contienen además de fosfolípidos, etanol para mejorar la elasticidad (Touitou y cols., 2000; López – Pinto y cols., 2005), etc.

De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, estos sistemas pueden actuar siguiendo diferentes mecanismos (El-Maghraby y Williams, 2009):

- Formando un reservorio en la piel, reduciendo la cantidad de fármaco que pasa a la circulación sistémica, minimizando así los efectos adversos.
- Liberando el fármaco en o a través de los apéndices cutáneos.
- Mejorando la liberación transdérmica del fármaco, incrementando sus concentraciones plasmáticas.

Existe cierta controversia en cuanto a la acción de los liposomas convencionales como portadores de principios activos a nivel dérmico y transdérmico (Honeywell-Neguyen y cols., 2005). Sin embargo, diversos autores han documentado la presencia de estas vesículas o su contenido en las capas más profundas del estrato córneo e incluso en la dermis (Foldvari y cols., 1990; Kneep y cols., 1990; Bonina y cols., 1995; Sentjurc y cols., 1999; Fang y cols., 2001; Maestrelli y cols., 2005). En la figura 12 se reseñan las posibilidades de actuación de los liposomas, que les permiten atravesar la piel (Bouwstra y cols., 2003; Elsayed y cols., 2007) y facilitar la acción del fármaco.

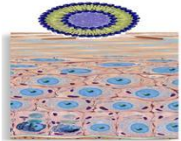
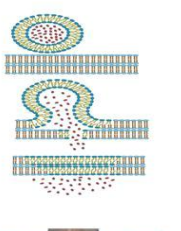
	<p>Penetración de la vesícula intacta</p>	<p>Se han detectado liposomas en la dermis por microscopía electrónica. Pueden penetrar la epidermis con el fármaco encapsulado incluso los MLV</p>
	<p>Mejoradores de la penetración</p>	<p>Por adherencia sobre la superficie de la piel y subsecuente desestabilización y fusión. Ocasionalmente así, perturbaciones en la estructura lipídica del estrato córneo y deterioran su función de barrera.</p>
	<p>Penetración a través de los apéndices</p>	<p>Pueden pasar a través de los apéndices cutáneos y también ejercer acción local. Parece que esta ruta no es importante para la liberación transdérmica a partir de liposomas.</p>

Figura 12. Mecanismos de acción de los liposomas convencionales.

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, nos planteamos en el presente trabajo de investigación, formular liposomas para encapsular succinato de sumatriptán, con el fin de mejorar su penetración vía transdérmica, utilizando para ello fosfolípidos de origen natural, específicamente fosfatidilcolina de yema de huevo, con ciertos aditivos ampliamente utilizados que mejoran su capacidad de carga y estabilidad.

Sin embargo, como es bien sabido, los liposomas, especialmente aquellos constituidos por lípidos de origen natural, tienden a presentar problemas de inestabilidad. Con el fin de solventar estos problemas hemos elaborado sistemas de liposomas microencapsulados, o micropartículas portadoras de liposomas (LEMs).

1.6 MICROENCAPSULACIÓN DE LIPOSOMAS

La introducción de un gran número de nuevos materiales surgidos tanto en el área de la industria farmacéutica, como en otras áreas, como es el caso de la ciencia de los polímeros, y especialmente los polímeros naturales, han brindado herramientas para crear formas farmacéuticas

novedosas que están siendo claves para alcanzar el objetivo de una terapia racional, donde los principios activos se utilicen en cantidades muy pequeñas, alcancen niveles plasmáticos eficaces y se mantengan durante un período de tiempo prolongado, llegando al sitio de acción específico para el principio activo en cuestión y con el mínimo número de efectos adversos o sin ellos.

La microencapsulación es un proceso de recubrimiento de moléculas con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. La microencapsulación de fármacos surgió en la década de los 50, cuando la compañía farmacéutica, *Smith Kline & French*, introdujo esta tecnología con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de fármacos. Precisamente con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica, fue microencapsulado el ácido acetilsalicílico, el cual aparece citado en la bibliografía como uno de los primeros fármacos microencapsulados (Nokhodchi y Farid, 1992; Yang y cols., 2001).

El producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”, sistemas que se diferencian básicamente en su morfología y estructura interna, presentando como característica común su tamaño de partícula.

En general, las micropartículas están formadas por una estructura polimérica y la materia activa, la cual se libera bien por rotura de la partícula, o por permeabilidad de la misma.

Existe una gran variedad de polímeros usados en microencapsulación, que se clasifican en naturales, semisintéticos y sintéticos.

Los naturales son principalmente de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; destacando el alginato, el dextrano y el quitosano.

Los semisintéticos engloban los derivados celulósicos, y los sintéticos más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres.

Existen distintos métodos que permiten obtener micropartículas, entre los que encontramos: coacervación o separación de fases, polimerización interfacial, extracción / evaporación del disolvente,

atomización y atomización / congelación, y la gelificación iónica, entre otros (Remuñán y Alonso., 1997).

A pesar de que se han empleado más de 30 años en investigación con estos sistemas poliméricos, el número de formulaciones de este tipo es realmente escaso. Esto se debe a dos razones fundamentales: la posible citotoxicidad de los polímeros y la falta de un método de producción a gran escala.

1.6.1 Sistemas lipídicos – poliméricos

Con el fin de solventar estos inconvenientes y el de la inestabilidad propia de los sistemas lipídicos, desde los años 80 y principios de la década de los 90, varios grupos de investigación se han centrado en la búsqueda de nuevos sistemas de liberación, combinando los sistemas basados en lípidos con los sistemas basados en polímeros, integrando así sus ventajas y evitando sus desventajas. De este modo han surgido diferentes sistemas que se recogen a continuación (Müller y cols., 2000; Feng y cols., 2004):

- **Nanopartículas lipídicas sólidas.** Se elaboran a partir de lípidos sólidos (triglicéridos), que se funden para disolver el principio activo, y que posteriormente se mezclan con un tensioactivo y se dejan enfriar para que ocurra la recristalización del lípido (Mühlen y cols., 1998; Mehnert y Mäder, 2001). Dentro de este grupo se encuentran:
 - a) Nanopellets lipídicos, formados por la dispersión de un lípido fundido en una solución de un tensioactivo por sonicación o una elevada velocidad de mezclado. Un ejemplo de este tipo de productos es Mucosolvan® en cápsulas para liberación retardada (Mehnert y Mäder, 2001).
 - b) Lipoesferas, que son micropartículas con diámetro entre 0.2 y 500 µm, compuestas por una matriz hidrofóbica grasa (triglicéridos) sólida, donde los compuestos activos se encuentran dispersos o disueltos. Contienen una monocapa de fosfolípidos embebidos sobre la superficie de las partículas. Han sido usados para la liberación

controlada de antineoplásicos, antiinflamatorios, antibióticos, vasodilatadores y anestésicos locales (Domb, 1995; Cortesi y cols., 2002).

- **Liposomas microencapsulados (LEMs).** Son sistemas de liberación controlada en los cuales se encapsulan liposomas dentro de microcápsulas o microsferas. La microcápsula provee al liposoma de una matriz polimérica que le protege y a su vez parte de los lípidos del liposoma se ubican sobre esa matriz para proporcionar biocompatibilidad. Con este sistema se consigue mejorar la eficiencia de encapsulación de la sustancia activa, comparándola con los liposomas o micropartículas por separado (Dai y cols., 2006).

Hacia 1990, se reveló la elaboración de sistemas en los que los liposomas cargados de activo, eran encapsulados en una matriz polimérica para originar microcápsulas. Estos sistemas eran capaces de liberar la sustancia activa constantemente durante un periodo de tiempo, o en discretos pulsos y pueden contener sustancias biológicamente activas, hormonas, enzimas, material genético, vacunas, etc. (Wheatley y cols., 1990).

El método de fabricación de estos sistemas incluye dos etapas:

- 1) Elaboración de los liposomas, generalmente, por los métodos TLE o REV conteniendo el principio activo.
- 2) Inclusión de los liposomas y el principio activo no atrapado dentro de un polímero, generalmente polisacárido.

En general, los lípidos usados para la elaboración de los liposomas son fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina de yema de huevo, colesterol, lecitina de soja, la dipalmitoilfosfatidilcolina, etc., y como polímeros, alginato sódico, dextrano, quitosano, etc. (Machluf y cols., 1996; Stenekes y cols., 2001; Dai y cols., 2005).

En el presente trabajo elaboramos microsferas cargadas con liposomas en los que se ha encapsulado succinato de sumatriptán, con la finalidad de mejorar la eficiencia de encapsulación y estabilidad de

dichos liposomas, aunque no con fines de ejercer una liberación prolongada del principio activo.

1.6.2 Materiales empleados en la microencapsulación

Los polímeros utilizados para microencapsular los liposomas de sumatriptán han sido fundamentalmente alginato sódico y quitosano. En la figura 13 se encuentra una breve descripción de dichos polímeros. Además de estos polímeros, también se ha utilizado Gantrez[®] MS 955, polímero que pertenece a la familia de copolímeros sintéticos del metil vinil éter anhídrido maleico (PMVE/MA). Todos estos polímeros se han usado con distintos fines en el área farmacéutica (Arbós y cols., 2002; Cerchiara y cols., 2005).

Los polímeros de la familia del Gantrez[®] se clasifican de acuerdo a su forma física, solubilidad, poder viscosizante y bioadhesivo, en: <http://abstracts.aapspharmaceutica.com/>

- Gantrez[®] AN Serie anhidra
- Gantrez[®] S Serie ácida
- Gantrez[®] MS Serie sal sódica-cálcica
- Gantrez[®] ES Serie éster

Gantrez[®] MS se presenta como un polvo blanco. Los copolímeros son ligeramente solubles en agua, el pH de sus soluciones acuosas está entre 5.5 y 7.0. Colorean de ámbar las soluciones que poseen elevada viscosidad. Este producto no se encuentra en la USP o en la lista de excipientes del Formulario Nacional, pero sí está aceptado por la FDA. Es biocompatible, y tiene propiedades adhesivas, suspensoras, viscosizantes, gelificantes, etc. (<http://online1.ispcorp.com/>).

POLÍMEROS	
ALGINATO	QUITOSANO
<p>Es un copolímero binario lineal constituido por el ácido β-D- manurónico (M) y el ácido α-L- gulurónico (G). Se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4). La cantidad relativa de cada uno de estos polímeros varía según la fuente de donde provenga el alginato y le dará diferentes propiedades físico-químicas. La principal fuente de origen de los alginatos son las algas pardas. Las aplicaciones del alginato en la industria farmacéutica se basan en sus propiedades gelificantes, viscosizantes y estabilizadoras. Las soluciones de alginato a concentraciones tan bajas como 0.25% a 0.5%, estabilizan emulsiones, suspensiones y espumas, mientras que a concentraciones mayores y en presencia de ciertos iones, cationes bivalentes y polivalentes, gelifican, dando origen a hidrogeles, irreversibles al calentarlos y de consistencia variable en función de los pesos moleculares de los polisacáridos componentes. El calcio es el ión más utilizado con este fin, debido a que sus sales son económicas y no tóxicas (Grant y cols., 1973; Draget y Taylor, 2009).</p>	<p>Es un polisacárido, similar en estructura a la celulosa. Ambos están constituidos por enlaces lineares β- (1- 4) de monosacáridos.</p> <p>El quitosano es una amina primaria y su monómero es 2-amino- 2 – deoxy– β – D – glucosa, combinado con enlaces glicosídicos. Los grupos amino primarios proporcionan propiedades especiales al quitosano que lo hacen muy útil en aplicaciones farmacéuticas (hidrogeles, películas, etc.).</p> <p>Se obtiene por la deacetilación de la quitina [β (1-4)- 2 – acetamido – 2 – desoxi- D- glucosa], un polisacárido natural biocompatible y abundantemente disponible en crustáceos marinos. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio obteniendo un producto soluble en ácidos orgánicos y lo denominó quitina modificada. El quitosano comercial tiene un rango de peso molecular entre 3800 y 20000 daltons y es 66% a 95% deacetilado, siendo un polisacárido catiónico en pH neutro ó básico, conteniendo grupos amino libres, de ahí su insolubilidad en agua.</p> <p>En pH ácido los grupos amino pueden experimentar protonación, haciéndolo soluble en agua (Velásquez, 2003; Agnihotri y cols., 2004; Rinaudo, 2006).</p>

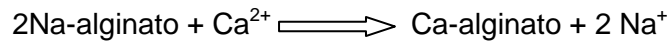
Figura 13. Descripción de los polímeros empleados en la elaboración de los LEMs.

1.6.3 Gelificación iónica.

El método de elaboración escogido para obtener los LEMs es la gelificación iónica, método originalmente usado para elaborar microsferas, como se mencionó previamente en esta memoria.

En esta técnica, la formación de la cubierta de las microsferas tiene lugar por una reacción de gelificación iónica entre un polisacárido y un

ión de carga opuesta. Generalmente se recurre a la gelificación de alginato sódico (polianión) con cloruro cálcico (catión). El método consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, sobre una solución acuosa de CaCl_2 que se encuentra sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar en contacto la gota de alginato sódico con el Ca^{2+} , se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana “transitoria” de alginato cálcico que es insoluble en agua, pero permeable. La reacción que tiene lugar es:



A continuación se puede obtener una cubierta “definitiva” por adición de una solución de un polication del tipo polilisina o poliarginina, que reemplaza a los iones de calcio de la superficie de las cápsulas, produciendo la reticulación de la misma. Las microesferas obtenidas son aisladas por procedimientos como: lavado, filtración, centrifugación (Remuñán y Alonso, 1997).

2.1 MATERIALES

Los productos utilizados en la elaboración de los liposomas fueron los siguientes:

- **Succinato de sumatriptán:** su nombre químico es {3- [2- (dimetilamino) – etil] – N – metil – 1H – indol – 5 – metano sulfonamida} succinato. El producto ha sido donado gentilmente por Glaxo Smith Kline (Inglaterra). Se presenta como un polvo blanquecino, con fórmula molecular $C_{14}H_{21}N_3O_2S.C_4H_6O_4$ y con un peso molecular de 413.5 g/mol. Su solubilidad en agua es de 140 g/L. Su pH en solución acuosa es de 4.7 unidades.
- **Cloroformo:** triclorometano estabilizado con etanol. Fórmula empírica: $CHCl_3$ (Panreac Química, Barcelona, España).
- **Colesterol (CH):** se presenta como polvo blanco con fórmula empírica $C_{27}H_{46}O$ y nombre químico 3- β – hidroxil – 5 - colesteno, con un peso molecular de 386.67 g/mol y con un punto de fusión de 148.5 °C. Se conserva a temperatura ambiente (Sigma - Aldrich - Barcelona, España).
- **Dicetilfosfato (DCP):** también denominado dihexadecilfosfato, es un polvo blanco o casi blanco, con fórmula molecular $[CH_3(CH_2)_{15}O]_2P(O)OH$, y con un peso molecular de 546.85 g/mol. Es soluble en cloroformo, con el que forma una solución amarilla. Se debe conservar a una temperatura de – 20 °C (Sigma - Aldrich - Barcelona, España).
- **Estearilamina (EA):** octadecilamina. Su fórmula empírica es $C_{18}H_{39}N$ y su peso molecular es de 269.52 g/mol. Se trata de un polvo blanco, insoluble en agua, que se conserva a temperatura ambiente (Fluka-Biochemika, Switzerland).
- **Éter:** éter dietílico estabilizado con BHT. Fórmula empírica: $C_2H_5OC_2H_5$. (Panreac Química, Barcelona, España).
- **Fosfatidilcolina (PC):** (L- α -Fosfatidilcolina) Su nombre químico es 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina. Se trata de un extracto orgánico de la yema de huevo, que contiene aproximadamente

el 60% de PC; el 40% restante está constituido mayoritariamente por fosfatidiletanolamina con cantidades menores de otros fosfolípidos. Se conserva a temperatura de 4 °C (Sigma-BioChemika, Alemania).

- **Tampón HEPES:** se prepara a un pH de 5.5 con una concentración 10 mM de 2- [4 – (2- hidroxietil) – 1 – piperacini] ácido etenosulfónico, de fórmula molecular $C_8H_{18}N_2O_4S$ y peso molecular 238.30 g/mol (Panreac Química, Barcelona).
- Los productos utilizados en la elaboración de los liposomas en micropartículas (LEMs) fueron los siguientes:
- **Acetato de etilo:** de fórmula empírica $CH_3COOC_2H_5$ y con un peso molecular de 88.10 g/mol (Panreac, Barcelona).
- **Acido acético glacial:** líquido límpido, incoloro, con un olor picante característico, de fórmula empírica CH_3COOH . Peso molecular: 60.05 g/mol (Panreac, Barcelona).
- **Agua Milli-Q®:** (Milli-Q® Advantage, Millipore).
- **Alginato sódico:** polvo blanco o amarillo parduzco. Ligeramente soluble en agua con la que forma una solución coloidal viscosa (Panreac, Barcelona).
- **Carbonato cálcico:** polvo fino blanco compacto, de peso molecular: 100.09 g/mol (Acofarma, Barcelona).
- **Quitosano:** (Fluka, BioChemika, Japón).
- **Cloruro de sodio:** cristales translúcidos blancos. Muy soluble en agua, de peso molecular 58.44 g/mol (Acofarma, Barcelona).
- **Diclorometano:** estabilizado con amileno. De fórmula empírica CH_2Cl_2 y peso molecular de 84.93 g/mol (Panreac, Barcelona).
- **Gantrez® MS-955:** (ISP, Technology Inc.) copolímeros sintéticos del metil vinil éter anhídrido maleico (PMVE/MA). Polvo blanco, dispersable en agua. Polímero aniónico bioadhesivo, viscosizante y agente filmógeno.

- **Miristato de isopropilo:** líquido claro poco viscoso, constituido por ésteres de ácidos grasos saturados de elevado peso molecular (especialmente ácido mirístico) con el 2 - propanol. Su fórmula empírica es $C_{17}H_{34}O_2$ (Acofarma, Barcelona).
- **Span[®] 80:** (monooleato de sorbitano) Líquido ambarino con una viscosidad de 1000 cps. Soluble en la mayoría de los aceites minerales o vegetales. Dispersable en agua (Acofarma, Barcelona).
- Otros:
- **Acetonitrilo (ACN):** de fórmula empírica CH_3CN y peso molecular 41.05 g/mol. Calidad HPLC (Panreac, Barcelona).
- **Calceína: Fluoresceína,** de fórmula empírica $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ y peso molecular 622.53 g/mol. Se presenta como polvo granular, de color rojo anaranjado, inodoro e higroscópico. Es soluble en agua (Sigma Aldrich, Alemania).
- **Carbopol[®] 940:** polímero del ácido acrílico de elevado peso molecular. Polvo blanco fino higroscópico. Se utilizó como gel al 0.5% (Acofarma, Barcelona).
- **Carboximetilcelulosa sódica:** polvo blanco o casi blanco que se dispersa fácilmente en agua. Higroscópico. La viscosidad de una solución acuosa al 2% aproximadamente es de 1000 mPas. Se utilizó un gel al 1.5% (Acofarma, Barcelona).
- **Edetato disódico (EDTA):** polvo blanco cristalino de fórmula empírica $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, con un peso molecular de 372.2 g/mol y con una solubilidad en agua de 1:500 (Acofarma, Barcelona).
- **Fosfato monobásico de potasio:** se presenta en forma de cristales incoloros, inodoros, completamente solubles en agua. Se usa en soluciones amortiguadoras. Su peso molecular es 136.09 g/mol (Panreac, Barcelona).
- **Hidróxido de sodio:** perlas blancas duras y quebradizas, muy higroscópico. Agente alcalinizante, muy soluble en agua. Su peso molecular es de 40 g/mol (Panreac, Barcelona).

- **Tiocianato amónico:** cristales blancos, de olor característico. Soluble en agua, con un peso molecular de 76.12 g/mol (Panreac, Barcelona).
- **Tripolifosfato de sodio pentabásico:** gránulos de color blanco. Soluble en agua, de fórmula empírica $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. Peso molecular de 367.86 g/mol (Sigma - Aldrich, Alemania).
- **Tritón X-100®:** tensioactivo no-iónico de fórmula molecular 4-(1,1,3,3-Tetrametil butil)ciclohexil-polietilenglicol (Fluka, Sigma - Aldrich, Alemania).

2.2 CUANTIFICACIÓN DE SUCCINATO DE SUMATRIPTÁN

La cromatografía se ha convertido en el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí, además de permitir realizar una identificación cualitativa (tiempo de retención) y una determinación cuantitativa (áreas de los picos) de las especies separadas (Skoog y cols., 2001a).

Para cuantificar de forma precisa el fármaco, succinato de sumatriptán, el método analítico de elección fue la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Femenía-Font y cols., 2005).

La determinación del fármaco, se llevó a cabo mediante la aplicación de HPLC de fase reversa (Badwe y cols., 1997).

El cromatógrafo utilizado (*Hitachi HPLC system manager*) se compone de:

- Bomba isocrática L-7100.
- Inyector automático de muestras L-7200.
- Detector espectrofotométrico L-7455 UV-Vis de λ variable e interfase D-7000.
- Horno Elite LaChrom Hitachi L-2350.

El equipo se encuentra conectado a un ordenador, con el programa HSM-Sys I para procesar los resultados.

El sistema cromatográfico utilizado para la técnica analítica a desarrollar se encuentra constituido por una columna de acero inoxidable (*Waters Spherisorb*[®]) de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro, rellena con partículas de silicagel enlazadas con partículas de octadecilsilano de 5 µm de diámetro.

Para llevar a cabo la cuantificación de succinato de sumatriptán se seleccionó la longitud de onda para la que se observa el máximo de absorbancia, 227 nm. La fase móvil elegida fue una solución de tampón fosfato : acetonitrilo en una proporción 50:50 v/v y ajustado a un pH de 6 unidades. El tampón fosfato se preparó a partir de una solución de fosfato monobásico de potasio 0.05 M, mezclada con una solución de hidróxido de sodio 0.05 M, con el fin de ajustar el pH a 6 (Shisart y cols., 1998). La velocidad de flujo se fijó en 1 mL/min y la temperatura a 25 °C.

Una vez ajustada la técnica cromatográfica, se realizó una recta de calibrado para determinar la linealidad del método, utilizando el área de los picos que proporcionaron las diferentes concentraciones de succinato de sumatriptán utilizadas.

Para preparar las soluciones de diferentes concentraciones de sumatriptán se partió de una disolución madre del principio activo de 50 mg en 50 mL de agua purificada (1 mg/mL). Posteriormente, se diluye convenientemente hasta alcanzar el rango de concentración de soluciones entre 0.050 mg/mL a 0.150 mg/mL. De cada solución se inyectaron 10 µL por triplicado y las áreas de los picos obtenidas se utilizaron para construir la curva.

La determinación del fármaco en algunos apartados de la memoria, como en los ensayos de permeación de los liposomas y las cuantificaciones realizadas a las micropartículas, se llevó a cabo utilizando un estándar secundario (10 mg/mL) como referencia. Esto fue debido a que el succinato de sumatriptán suministrado vino envasado en viales de 500 mg, los cuales poseían distinta potencia. Por ello se hizo necesario controlar en cada medición, la cantidad de partida.

La ecuación empleada en este caso, fue la siguiente:

$$C_m = \frac{C_p \cdot A_m}{A_p}$$

donde, C_m = concentración de la muestra (mg/mL)

C_p = concentración del patrón (mg/mL)

A_m = área cromatográfica de la muestra

A_p = área cromatográfica del patrón

2.3 ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN DE LAS MOLÉCULAS

En este apartado se emplearon técnicas que permitirán caracterizar al fármaco desde un punto de vista morfológico y estructural. De igual manera, las técnicas calorimétricas conducirán a la determinación de la identidad y pureza de los productos utilizados, así como la posible presencia de incompatibilidades fisicoquímicas entre ellos.

2.3.1 Análisis morfológico de succinato de sumatriptán

Para estudiar las características morfológicas del fármaco se utilizó la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), que permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, aportando información morfológica de los mismos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico *Philips XL-30* que posee un detector de electrones secundarios mediante el cual fue posible observar la superficie de las muestras.

Las muestras analizadas se sometieron a deshidratación en presencia de vacío, recubriéndose a continuación con oro (*sputtering*), utilizando para ello una cámara Edwards, con el objetivo de transformarlas en superficies conductoras. Las condiciones de trabajo y el procedimiento operativo seguido fue el utilizado para analizar muestras no conductoras, siendo el voltaje de aceleración de 15 kV.

2.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Microscopía de Platina Caliente (HSM)

2.3.2.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Es una técnica térmica en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a la muestra y a un material de referencia en función de la temperatura de la muestra, cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado.

Normalmente, el programa de temperatura implica el calentamiento de la muestra y del material de referencia, de tal manera que ésta aumenta linealmente con el tiempo. Dicho proceso proporciona un termograma, con una curva de energía de entrada *versus* temperatura, representando así los cambios que sufre la muestra (Skoog y cols., 2001b; Skoog y cols., 2001c).

Mediante el adecuado estudio de los termogramas, es posible caracterizar el comportamiento térmico de la materia en cuanto a procesos de cristalización, fusión, oxidación, formación de microcristales y transiciones vítreas, entre otros. Los picos generados son el resultado tanto de cambios físicos como de reacciones químicas inducidas por los cambios de temperatura en la muestra (Clas y cols., 1999; Verdonk y cols., 1999), dando lugar a procesos endotérmicos en el caso de fusión, transición de fase, transición vítrea, evaporación, etc., o exotérmicos, cuando se produce cristalización, descomposición, oxidación, polimerización, etc.

Las áreas pico de los termogramas dependen fundamentalmente de la masa de la muestra y de la entalpía del proceso que haya tenido lugar. En nuestro estudio, se evaluó el comportamiento térmico del fármaco.

En cuanto a los componentes de los liposomas, se evaluaron los lípidos formadores de la vesícula y mezclas físicas binarias fármaco - lípido. Así, es posible determinar la presencia de posibles interacciones entre ellos (Zhao y cols., 2007; Flaten y cols., 2007).

Con relación a los componentes de las micropartículas y de los LEMs, se evaluó el comportamiento térmico de cada uno de los polímeros, así

como también de mezclas físicas binarias entre los polímeros y mezclas físicas binarias fármaco / polímero (Honary y cols., 2009).

El equipo que se utilizó fue un DSC 131 (*Setaram DSC 131, 2000*). Este equipo posee en una única estructura el horno-transductor (transformador de energía), el sistema de enfriamiento y el controlador del microprocesador. Estos elementos se encuentran conectados a un ordenador. El circuito de gas (nitrógeno) impide la oxidación del crisol y de la muestra, así como del transductor cuando la temperatura es superior a 500 °C.

Las muestras en estudio se encapsularon en portamuestras de aluminio de 40 µL de capacidad, las cuales se perforaron y se sometieron a un barrido con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min, en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 400 °C.

El peso utilizado de cada muestra estuvo comprendido entre 5 y 8 mg. Las mezclas físicas binarias se prepararon en proporción 1:1, al ser ésta la más apropiada al aumentar la posibilidad de que se detecte una posible interacción física o química (Holgado y cols., 1995).

2.3.2.2 Termomicroscopía (HSM)

Esta técnica, conocida también como microscopía de platina caliente, permite obtener información tras la visualización de las muestras, de puntos de fusión precisos si se controlan adecuadamente los intervalos de calentamiento y, además, permite observar el comportamiento de los cristales (Vera y cols., 1991; Mohamad y cols., 1997).

Este método es el más importante desde el punto de vista de los análisis termo-ópticos, donde los cambios morfológicos y estructurales de las sustancias son medidos como una función de la temperatura. Así, la observación de un parámetro característico de la sustancia a una determinada temperatura conduce a la identificación y caracterización de la misma (Wiedemann y Casagrande, 1998).

Además, las interacciones fármaco – excipiente pueden estudiarse por simple mezcla de los cristales del fármaco y excipiente, calentando y enfriando alternativamente en platina caliente. La observación de la zona de fusión en la superficie de contacto interfacial permite detectar

eutécticos, compuestos de adición y otras incompatibilidades (Ford y Timmins, 1989).

La observación microscópica del proceso de fusión de las muestras se realizó mediante una platina caliente (*Mettler FP82 HT*), acoplada a un microscopio *Olympus, BH-2* (objetivo 10x) con un dispositivo de registro fotográfico digital. La regulación de la velocidad de calentamiento se realizó mediante una unidad de control (*Mettler FP80 HT*). La temperatura inicial y final de programación fue variable dependiendo de la muestra y de la información del comportamiento térmico obtenida en los termogramas de la misma por DSC. La velocidad de calentamiento utilizada fue de 10 °C / min.

El estudio se aplicó al fármaco, a cada uno de los componentes de los liposomas y a sus mezclas binarias. Para llevar a cabo el estudio, se colocó una pequeña cantidad de muestra entre un porta y un cubreobjetos, introduciéndose ambos en la platina. Posteriormente, se somete el sistema a un ciclo de temperaturas previamente establecido, donde el aporte calorífico se realizó de forma gradual.

2.3.3 Coeficiente de reparto y pH del succinato de sumatriptán

La lipofilia es una propiedad fisicoquímica que juega un papel relevante en la actividad farmacológica de una determinada sustancia. Es un importante indicador de transporte y permeación a través de las membranas biológicas.

En sustancias neutras (no cargadas), esta propiedad se expresa normalmente por el logaritmo de su coeficiente de partición octanol – agua ($\log P$) y no es más que la tendencia de la sustancia a disolverse en una fase acuosa u oleosa cuando se adiciona a un sistema bifásico, constituido por agua y un solvente orgánico.

En el caso de sustancias ionizables, se expresa como el logaritmo del coeficiente de distribución ($\log D^{\text{pH}}$), que tiene en cuenta todas las formas de la sustancia que puedan estar presentes a un determinado valor de pH, es decir, las especies ionizadas y las no-ionizadas (Benhaim y Grushka, 2008). Esto es de gran importancia en el caso de sales orgánicas, que normalmente sufren una ionización parcial.

Ambos coeficientes vienen dados como la relación de las concentraciones del compuesto en ambas fases en estado de equilibrio. A título ilustrativo, se presentan las ecuaciones que describen a ambos coeficientes:

$$P_{O/W} = \frac{[octanol]}{[agua]}$$

$$D = \frac{[Coctanol]}{[c^{(+)}\text{ agua}] + [c^{(-)}\text{ agua}] + [C\text{ agua}]}$$

Así, un valor menor de cero para el log P sería indicativo de que el compuesto tiene elevada afinidad por la fase acuosa (hidrofilica); en cambio, cuando su valor es cero el compuesto tiene igual afinidad por ambas fases y cuando el valor es positivo denota mayor concentración en la fase lipídica. En cuanto al log D^{pH} , los valores negativos son propios de sustancias con carácter predominantemente hidrófilo (Ashford, 2004; www.acdlabs.com/phys_chem_lab/physichemsuite/).

Para determinar el coeficiente de partición, clásicamente se han utilizado dos métodos (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Testing-Methods/ANNEXV/A08web1992.pdf>; Griffin y cols., 1999):

- a. Método del matraz de agitación
- b. Método cromatográfico por HPLC

El método del matraz de agitación ha sido el más ampliamente utilizado y se considera el más preciso; sin embargo, debe ser aplicado con mucha rigurosidad, pues ligeros cambios en temperatura, tiempo y fuerza de agitación ocasionan variaciones importantes en los resultados obtenidos. La ventaja que ofrece el método por HPLC es que se requieren pequeñas cantidades de muestra y es mucho más rápido que el método anterior. Los coeficientes de reparto o distribución se determinan por el tiempo de retención del analito en la columna (González y cols., 1995).

Además de estos métodos, existen aplicaciones por modelaje computacional que permiten predecir los coeficientes de reparto y de

distribución con resultados bastante comparables a aquellos obtenidos con los métodos anteriormente descritos, constituyendo así un método predictivo (Benfenati y cols., 2003).

Para predecir la lipofilia, uno de los programas utilizados es el ACD/PhysChem, que contiene el ACD/LogP y el ACD/LogD (pH-dependiente). Este usa un algoritmo para calcular el log P de un compuesto a partir de la suma de los valores que poseen los fragmentos (uno o más átomos enlazados covalentemente a otros dentro de la molécula) individuales de su molécula (Österberg y Norinder, 2001; www.acdlabs.com/phys_chem_lab/).

En el presente trabajo de investigación se utilizó el LogPo/w y el LogD al pH de 5.5 obtenido a través del software ACD/LogD.

Por otra parte, el pH de succinato de sumatriptán fue determinado sobre una solución del fármaco en agua destilada al 10% p/v, en un pH-metro *Crison® basic*.

2.4. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Los liposomas se elaboraron utilizando distintas técnicas de preparación con el fin de seleccionar aquella que ofreciera una encapsulación más elevada del principio activo y mejores características físicas de los mismos.

Para formularlos, se seleccionaron los lípidos CH y PC como formadores de la película, y los lípidos estearilamina (+) y dicetilfosfato (-) que actúan como inductores de carga (Sinico y cols., 2005). Así, se utilizaron mezclas de CH y PC, mezclas de CH, PC y DCP (que se encuentra cargado negativamente), y mezclas de CH, PC y EA (que presenta carga positiva). Basándonos en experiencias previas realizadas por nuestro grupo de investigación, las cantidades utilizadas para cada uno de los lotes elaborados se recogen en la tabla 1.

	PC	CH	EA	DCP
1	50	40	10	
2	50	40	20	
3	50	40	30	
4	50	40		10
5	50	40		12,5
6	50	40		15
7	50	40		20
8	50	40		30

Tabla 1. Cantidades (mg) de los lípidos utilizados en la elaboración de los liposomas.
PC: fosfatidilcolina; CH: colesterol; EA: estearilamina; DCP: dicetilfosfato.

Los métodos utilizados para elaborar los liposomas han sido: evaporación en capa fina o Bangham (TLE), congelación y calentamiento (FAT) y evaporación en fase reversa (REV), descritos previamente en esta memoria. A continuación, se describirán de un modo más preciso las técnicas utilizadas.

2.4.1 Método Bangham

Esta técnica consiste en formar, en primer lugar, una película desecada, constituida por los materiales lipídicos. Para ello, en el interior de un matraz de fondo redondo, se pesa directamente la mezcla lipídica, usando una balanza analítica de precisión *Explorer® Pro*, en concentraciones variables según el lote y disolviéndola a continuación en 10 mL de cloroformo.

La solución orgánica obtenida se lleva a un baño termostático a 58 °C y se procede a evaporarla bajo presión reducida en un rotavapor (*Büchi, R – 210*) hasta la obtención de una fina película. Es importante mantener el baño termostático a una temperatura superior a la

temperatura de transición de fases de los lípidos presentes, siendo de 25 °C para PC (Bangham, 1968; Quesada y cols., 2005) y casi 37 °C para CH (Bach y cols., 1995); de ahí que se seleccione como temperatura de calentamiento 58°C. La película obtenida se mantuvo en reposo y en condiciones de vacío durante un periodo de 20 minutos con el fin de eliminar cualquier traza de disolvente orgánico que pudiera existir en la muestra.

A continuación, dicha película se hidrata con 10 mL de una solución tampón HEPES 10 mM ajustado a pH 5.5 – 5.6 en la que ha sido disuelta previamente la cantidad de succinato de sumatriptán (66.6 mg).

La película hidratada se somete a cinco ciclos de agitación en vortex durante un tiempo de dos minutos cada ciclo, intercalados con cinco minutos en baño caliente a 58 °C, hasta la obtención de un preparado de color blanco opalescente en el que se encuentran dispersos los liposomas MLV. La dispersión coloidal así obtenida debe conservarse en el frigorífico a 4 °C, aproximadamente.

2.4.2 Método de congelación y calentamiento (FATMLV)

El procedimiento a seguir es idéntico al de TLE hasta la obtención de la dispersión de liposomas MLV. Seguidamente, la preparación se congela durante un minuto en nitrógeno líquido y se calienta en baño termostatzado a 58 °C durante cinco minutos, procedimiento que se repite nueve veces. Este ciclo de congelación – calentamiento, se piensa que favorece el incremento del volumen de fase acuosa atrapado, sin variar el tamaño de la vesícula (Abraham y cols., 2005) y por tanto, aumenta la encapsulación del fármaco disuelto en la fase acuosa. También en este caso el preparado se conserva en el frigorífico a una temperatura de 4 °C.

2.4.3 Evaporación en fase reversa (REV)

A diferencia de los anteriores, este método no requiere la formación de la película lipídica. En primer lugar, en un matraz de fondo redondo se pesa directamente la mezcla lipídica en las mismas proporciones a las utilizadas en los métodos anteriores. A continuación, los lípidos se disuelven en 10 mL de una mezcla de cloroformo / éter (8:4). Tras varias experiencias se ha determinado que esta proporción es la ideal

para lograr la absoluta disolución de los lípidos. A esta solución se adicionan 10 mL de tampón HEPES 10 mM en la que se ha disuelto previamente el fármaco (66.6 mg). La mezcla se somete a un proceso de sonicación utilizando un baño de ultrasonidos (*Raypa® UCI-200*) durante 15 minutos, con una potencia de 350 W durante 10 minutos y de 700 W durante 5 minutos, hasta obtener una emulsión de color blanco y aspecto lechoso. Seguidamente, se procede a la evaporación del disolvente orgánico, en baño termostático a 58 °C, a presión reducida en el rotavapor, observándose un cambio fisicoquímico en el preparado, pasando por los siguientes estados: emulsión – gel – dispersión coloidal (cambio de fase sol – gel –sol). En este momento se somete a un ciclo de vortex, durante 5 minutos y se conserva igualmente a 4°C.

En la tabla 2 se recogen los métodos utilizados para la preparación de los diferentes lotes elaborados.

MÉTODO	SU	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8
TLE	S	+	+	+	+	+	+	+	+
TLE	B	+	+	+	+	+	+	+	+
REV	S	+	+	+	+	+	+	+	+
REV	B	+	+	+	+	+	+	+	+
FAT	S	+	+	+	+	+	+	+	+
FAT	B	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 2. Métodos utilizados para elaborar cada lote de liposomas. El símbolo (+) indica que el lote ha sido preparado por el correspondiente método. La abreviación SU corresponde a sumatriptán y las letras S y B indican la presencia (S) o no (B) del mismo en el lote, de manera que la letra B corresponde al lote blanco. La composición de cada lote se describió en la tabla 1.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE LIPOSOMAS

2.5.1 Análisis dimensional

El tamaño de las vesículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica analiza la intensidad de la luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, la cual está relacionada con el tamaño y la forma de las partículas.

Esta técnica, también denominada *Dynamic Light Scattering*, permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas suspendidas y su índice de polidispersión, el cual es indicativo de la distribución de tamaños presentada por la muestra.

El equipo utilizado fue un *Zeta Master (Malvern Instruments)*, que mide la difusión de un haz de luz a través de un sistema disperso, que en nuestro caso, es la dispersión de los liposomas. El aparato emite luz láser a una longitud de onda de 633 nm y a una potencia de 5 mW en modo monocromático. El haz incide sobre la muestra introducida en una cubeta de plástico y la intensidad de luz láser dispersada por las muestras es detectada por un fotomultiplicador a un ángulo de 90° y dirigida a un correlador óptico digital que caracterizará la intensidad de la señal traduciéndola como tamaño de partícula (Puzi y cols., 1999; Foerter-Barth y Teipel, 2000; Manual de Aplicación Zeta Master). Esta técnica resulta muy útil para medir partículas de un diámetro entre 1 nm y 5 µm en muy poco tiempo.

Las mediciones se realizaron a una temperatura de 25 °C. Previamente, las muestras de liposomas fueron diluidas con el fin de poder eliminar posibles alteraciones debidas a la aglomeración de las partículas, lo que se conoce como el fenómeno de multidispersión.

Las muestras fueron medidas por triplicado y la acumulación de los datos en cada una fue obtenida realizando cinco medidas. Finalmente, estas medidas fueron analizadas por el método matemático CONTIN, que es un algoritmo cuadrático (Manual de aplicación Zeta Master).

El índice de polidispersión (IP) es un parámetro que hace referencia a la homogeneidad / heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. Representa una medida de la diferencia del tamaño que suele tener la mayoría de los liposomas analizados en función de su diámetro medio.

En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población de liposomas analizada y, por tanto, más heterogéneas serán las vesículas. Así, un valor elevado de IP (0.8 - 1) es indicativo de una muestra heterogénea, mientras que un valor bajo de IP (< 0.2) indicará una elevada homogeneidad de las vesículas en cuanto a sus dimensiones.

Para obtener ambos parámetros se realizaron cinco repeticiones y se calculó la media por el método CONTIN.

2.5.2 Potencial zeta

Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de la dispersión coloidal, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células.

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella. El potencial zeta expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las partículas.

El método de medida se basa en la producción de dos haces coherentes procedentes de una fuente láser de helio – neón de baja potencia, los cuales se cruzan en la celda de medida donde se coloca una dispersión de partículas (5 nm – 5.000 nm o más), originándose una serie de franjas de interferencias.

Las partículas, cuyos movimientos a través de las franjas se fuerzan mediante la aplicación de un campo eléctrico, dispersan la luz con una intensidad que varía según una frecuencia, que es dependiente de su velocidad.

La luz dispersada se recoge en un fotomultiplicador y se analiza para dar un espectro de frecuencias, a partir del cual se calcula la distribución de la movilidad de las partículas. Los resultados se representan en una gráfica que muestra el espectro completo del potencial zeta o de la movilidad electroforética de todas las partículas en la muestra (Manual de Aplicación Zeta Master).

Para efectuar la medida del potencial zeta en los liposomas, se introdujo con una jeringa una alícuota diluida de liposomas de 3 mL en el equipo *Zeta Master* (Manual de Aplicación Zeta Master).

La dispersión de liposomas atraviesa una serie de canalículos hasta el interior de una célula fotoeléctrica en donde se soporta una diferencia de potencial. Allí, los liposomas migran hasta el electrodo de carga opuesta. La velocidad de migración del liposoma se calcula en función de la variación de la frecuencia de la luz de un rayo láser que difracta al chocar con los liposomas en movimiento por el campo eléctrico (movilidad electroforética).

Todos los cálculos se realizaron por quintuplicado, calculándose la media de todos los resultados.

2.5.3 Análisis morfológico

2.5.3.1 Microscopía óptica

Las muestras obtenidas se observaron utilizando un microscopio óptico, *Olympus BH-2* y se fotografiaron con una cámara *Olympus Comedia C-5060* de 5.1 megapixels.

Para ello, se colocó una gota de la dispersión de los liposomas obtenidos por las diferentes técnicas en un portaobjetos y se procedió a observarlos con el objetivo de 40x, regulando la intensidad de la luz, la potencia de aumento del objetivo y la distancia del objetivo a la muestra. En este punto fue posible la realización de algunas fotografías de las imágenes reproducidas por el microscopio. Posteriormente se observaron con el objetivo 10x.

Este tipo de análisis morfológico ha sido útil para verificar la formación de los liposomas e identificar su estructura.

2.5.3.2 Microscopía de Barrido Láser Confocal (CLSM)

El microscopio confocal de barrido se basa en la obtención de imágenes utilizando el fenómeno de fluorescencia. La fluorescencia es un fenómeno físico que resulta de la interacción de los electrones de las últimas capas atómicas con la radiación electromagnética (luz). Cuando una luz (fotón) de determinada longitud de onda, característica de cada sustancia fluorescente, incide sobre dicha sustancia, los electrones de las capas más externas se excitan, absorben energía y saltan a niveles superiores. Posteriormente sufren una reacomodación en dichos niveles con una pérdida leve de energía y vuelven al estado inicial de reposo devolviendo casi toda la energía absorbida en forma de otro fotón de menor energía (y por tanto otro color) que el absorbido.

Con la utilización de filtros particulares se puede separar completamente la radiación utilizada para excitar la señal de fluorescencia, de la fluorescencia emitida por las moléculas. El confocal permite capturar planos ópticos de la muestra de forma que luego se pueda hacer una reconstrucción tridimensional de ésta (www.cnb.csic.es/fotonica/Diferencias.htm).

Para poder observar la morfología de los liposomas de sumatriptán obtenidos por diferentes métodos y con diferente carga, se marca la muestra con una molécula fluorescente (rodamina) que se comporta como una luz microscópica. Para ello, durante el proceso de elaboración de los liposomas, la rodamina fue disuelta en la fase acuosa. Para estudiar la muestra, la dispersión de liposomas obtenida se diluyó en una proporción de 1 gota de muestra en 25 gotas de agua purificada. El preparado resultante se coloca en un portaobjetos, se cubre con el cubreobjetos y se sella con laca para minimizar así el movimiento de las vesículas en el medio acuoso y facilitar, por tanto, su observación. Finalmente, se llevó al microscopio para ser examinado en los tres planos espaciales X, Y y Z.

El equipo CLSM utilizado para estudiar la morfología de los sistemas vesiculares fue una unidad *Leica TCS SP* equipada con láser Kriptón – Argón – Helio / Neon montada sobre un microscopio invertido *Leica DM IRE 2* utilizando objetivos en seco HC PL Fluotar Leica Lens con magnificaciones de 10 y 20x, así como un objetivo de inmersión HCX

PLAN APO Leica Lens (0,85 *multi - inmersión objective*) que proporciona una magnificación óptica de 63x. Para lograr la excitación de la sonda fluorescente se utilizó en todos los casos la línea emisión de 488 nm, mientras que la de fluorescencia se detectó sobre los 520 nm.

Las imágenes se obtuvieron utilizando los canales de fluorescencia y de luz transmitida. La magnificación óptica del equipo puede ser ampliada mediante un zoom electrónico, que fue utilizado cuando el tamaño de la muestra así lo aconsejaba. El zoom electrónico rinde magnificaciones de hasta 32x sobre la máxima magnificación óptica.

En la tabla 3 se recogen los parámetros de funcionamiento más importantes que se utilizaron en la operación del CLSM.

MODO DE OPERACIÓN	
Índice de magnificación	20, 40 y 63x
Ganancia	400-600
Modo de escáner	xyz
Línea de emisión	488 nm
Patrón de escáner	Bidireccional
Canal de luz transmitida	Activo

Tabla 3. Parámetros de funcionamiento del CLSM.

2.5.4 Eficacia de encapsulación

Este parámetro se determinó mediante diálisis dinámica, técnica muy utilizada para realizar ensayos de liberación en sistemas nanoparticulares, como nanopartículas y liposomas (Leo y cols., 1999).

Esta técnica permite, además, calcular indirectamente la cantidad de fármaco atrapada dentro de los liposomas elaborados, valorando la cantidad de sumatriptán no atrapado que difunde al exterior (López

Pinto y cols., 2005; Maestrelli y cols., 2005). Para ello, es necesario realizar el ensayo en frío, con el fin de que las vesículas se vuelvan rígidas y evitar así que se libere el principio activo de su interior.

El procedimiento seguido se resume a continuación. Se introduce una membrana tubular de acetato de celulosa (*Spectra / Por*[®], MW cut off 12.000, Spectrum, Canada) de una longitud aproximada de 6 cm en una solución tampón HEPES 10 mM, pH 5.5, durante veinte minutos para facilitar su hidratación. La membrana hidratada se cierra con una pinza por uno de los extremos y dentro de la cavidad formada se introducen 3 mL de la muestra a analizar. Finalmente, se pinza el otro extremo para evitar la salida de la muestra al exterior de la bolsa.

Este sistema se introduce en un vaso de precipitado que contiene el medio receptor (150 mL de tampón HEPES 10 mM pH 5.5) y es sometido a agitación magnética. Todo el proceso se realiza en frío (temperatura de 4 – 8 °C) y los vasos de precipitado se cubren con papel de aluminio para evitar exposición a la luz, ya que el sumatriptán es fotosensible.

Esta técnica se llevó a cabo extrayendo alícuotas (3 mL) del líquido receptor a intervalos de tiempo preestablecidos, durante un periodo de tres horas, iniciando con tomas cada quince minutos para la primera hora y media, y de treinta minutos, la siguiente. Cada extracción de alícuotas de la solución (3 mL) se ha reemplazado con 3 mL de solución tampón HEPES, con el fin de mantener siempre el mismo volumen del medio en 150 mL.

El proceso de diálisis se da por finalizado cuando en dos medidas consecutivas aparecen los mismos valores de concentración de sumatriptán.

A continuación, la cantidad de fármaco no incorporado a las vesículas se determina mediante HPLC (metodología apartado 2.2 del presente capítulo). Finalmente, se calculó el porcentaje de eficacia de encapsulación utilizando la siguiente ecuación (Maestrelli y cols., 2009):

$$\%EE = \frac{[C \text{ total. fármaco}] - [C \text{ fármaco difundido}]}{[C \text{ total. fármaco}]} \times 100$$

Es necesario hacer mención al hecho de que la eficacia de encapsulación también fue determinada por otras dos técnicas alternativas:

- Filtración en columna: en este método se trabajó con cartuchos de silicagel C18, denominados Sep-Pak[®], a través de los cuales se hace pasar la dispersión liposomal. Se parte del principio de que el fármaco no encapsulado quedará retenido en la columna, y posteriormente se eluye con un disolvente apropiado (Bellot y cols., 2001).
- Ultracentrifugación: el método consiste en ultracentrifugar la dispersión liposomal a una velocidad apropiada (40000 r.p.m), durante un tiempo y temperatura adecuados. Se trabajó con una ultracentrífuga *Beckman Coulter Optima[®]* (Chimanuka y cols., 2002; Fang y cols., 2008).

Sin embargo, con estas dos últimas técnicas no conseguimos obtener resultados reproducibles de un lote a otro, utilizando el mismo método de elaboración e igual composición, razón por la que se trabajó con la diálisis dinámica.

2.5.5 Ensayos de liberación

Para determinar la liberación de succinato de sumatriptán en los liposomas se ha empleado el método de diálisis siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

Se corta una membrana de acetato de celulosa (*Spectra / Por[®]*, MW cut off 12.000, Spectrum, Canada) con una longitud aproximada de 6 cm y se sumerge en una solución tampón HEPES 10 mM, pH 5.5, durante veinte minutos para conseguir su hidratación.

Posteriormente, se introducen 3 mL de la dispersión liposomal, equivalentes a 20 mg de sumatriptán, en el interior de la membrana,

previamente sellada en uno de sus extremos con una pinza adecuada; a continuación, se pinza el extremo libre y se introduce en un vaso de precipitado de 250 mL, que contiene 150 mL de buffer HEPES como medio de liberación. Este sistema es sometido a agitación magnética en placa térmica (*placa Multimatic* – 9N, potencia 650 W) a una temperatura de 37 ± 0.2 °C. El tiempo de duración del ensayo fue establecido en tres horas, durante las cuales y a intervalos de tiempo prefijados se retiraron alícuotas de 3 mL del medio de liberación, que fueron reemplazadas con 3 mL de medio fresco para mantener el volumen inicial (Betageri y Parsons, 1992; Nounou y cols., 2006).

Posteriormente, se cuantificó por HPLC el contenido de sumatriptán en cada una de las alícuotas extraídas (metodología apartado 2.2 del presente capítulo). Para este ensayo se prepararon tres réplicas de cada muestra.

Finalmente para cada lote se representó gráficamente el porcentaje de liberación frente al tiempo y a partir de la recta, se realizó un ajuste cinético de los resultados, tomando para todos los casos seis puntos de las gráficas ($n = 6$), encontrándose los dos últimos siempre en fase asintótica. Los modelos matemáticos aplicados fueron los siguientes (Fuertes-Criado, 2005; Nounou y cols., 2006; Sezer y Akbuga, 2007; Sun y cols., 2008; Claro y cols., 2009):

- ✓ Cinética de orden cero: establece la existencia de una relación lineal entre la fracción liberada y el tiempo.

$Q = K_0 \times t$, donde Q es la cantidad de fármaco liberado; K_0 es la constante de velocidad de orden cero y t el tiempo de liberación.

- ✓ Cinética de primer orden: la liberación depende directamente de la concentración del fármaco.

$$\ln Q = \ln Q_0 - K_1 \times t$$

- ✓ Método de Higuchi: en el que la cantidad de fármaco liberado es una función lineal de la raíz cuadrada del tiempo.

$Q = K_H \times t^{1/2}$, donde Q es la cantidad de fármaco liberado; K es la constante de velocidad de Higuchi y t el tiempo de liberación.

2.5.6 Ensayos de permeación

Los estudios de permeación de succinato de sumatriptán se llevaron a cabo utilizando células de difusión de Franz (*Vidrafoc, Barcelona*), con un área efectiva de difusión de 2.54 cm^2 y el compartimiento receptor con capacidad para un volumen de 14.5 mL. Como membrana limitante se utilizaron membranas de nitrato de celulosa (*Millipore® 0.1 μm*) impregnadas en alcohol laurílico, con la finalidad de aportarles carácter lipofílico y de ese modo simular la barrera del estrato córneo (Mura y cols., 2007; Maestrelli y cols., 2009).

Las formulaciones escogidas para realizar este estudio de permeación fueron los liposomas con carga positiva (estearilamina), elaborados por las técnicas TLE y REV.

Como el destino de nuestras formulaciones era su aplicación por vía tópica, se elaboró un gel de Carbopol® al 0.5 % p/v, y un gel de carboximetilcelulosa sódica al 1.5 % p/v, para incorporar en cada uno de ellos las formulaciones en estudio con el fin de evaluar su permeación y, de acuerdo a los resultados obtenidos, establecer la posibilidad de utilizar o no, uno de estos sistemas como vehículo para los liposomas de sumatriptán. En la tabla 4 se describe la composición de las formulaciones ensayadas.

Con el fin de poder comparar los resultados que se obtuvieran con las formulaciones anteriormente descritas, fue preparada una solución de succinato de sumatriptán al 0.67% p/v y sometida al mismo ensayo, tanto individualmente como incorporada a cada uno de los geles en una proporción 50:50, manteniendo la misma concentración de fármaco contenida en las muestras de liposomas ensayadas.

Liposomas	Base	Proporción
L1TLES	–	–
L1REVS	–	–
L1TLES	Gel Carbopol®	50:50
L1TLES	Gel Carboximetilcelulosa	50:50
L1REVS	Gel Carbopol®	50:50
L1REVS	Gel Carboximetilcelulosa	50:50

Tabla 4. Dispersiones liposomales y combinación dispersión liposomal – gel de Carbopol® / gel de carboximetilcelulosa sódica con sus respectivas proporciones sometidas al ensayo de permeación, siendo L1 el lote 1 (corresponde a la composición lipídica).

El procedimiento utilizado se describe a continuación: se llenó el compartimiento receptor de la célula de Franz con buffer Sorensen ajustado a pH 7.4; al compartimiento donador se añadieron 0.30 g (correspondientes aproximadamente a 2 mg de succinato de sumatriptán) de dispersión liposomal o 0.30 g de gel conteniendo 0.30 g de dispersión liposomal.

El tiempo de duración del ensayo fue de 48 horas, durante las cuales se extrajeron alícuotas de 1 mL del compartimiento receptor a intervalos de tiempo predeterminados. La extracción de cada alícuota se realizó con sumo cuidado para no generar burbujas y fue reemplazada con 1 mL de buffer fresco con el fin de mantener las condiciones *sink*.

El ensayo se realizó a 37 ± 1 °C, bajo agitación en placa térmica (*Multimatic* – 9N, potencia 650 W) y por triplicado. Finalmente, las alícuotas fueron cuantificadas por HPLC y se realizaron los cálculos correspondientes.

El coeficiente de permeación P fue calculado usando la siguiente ecuación (Ceschel y cols., 2002; Sutariya y cols., 2005; Zhang y cols., 2009):

$$P = \frac{dQ/dt}{A \cdot Cd}$$

Donde, dQ/dt es la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana por unidad de tiempo (masa / tiempo).

A es la superficie disponible de difusión (cm^2) y

Cd es la concentración del agente penetrante en el compartimiento donador (mg/cm^3).

El flujo en estado estacionario se obtuvo al representar la cantidad acumulada del fármaco en el compartimiento receptor por unidad de superficie ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$), respecto al tiempo. La parte lineal del gráfico ha sido tomada como el flujo en estado de equilibrio. La ecuación utilizada para el cálculo del flujo en estado estacionario J_{ss} , es la siguiente:

$$J_{ss} = P \cdot Cd$$

Donde, P es el coeficiente de permeación (cm/h) y

Cd concentración del fármaco en el compartimiento donador (mg/cm^3).

2.5.7 Análisis térmico de las formulaciones

Se aplicó este estudio a los liposomas cargados positivamente obtenidos por las técnicas TLE y REV siguiendo la misma metodología descrita previamente (apartado 2.3.2.1 del presente capítulo).

En este ensayo, con la finalidad de eliminar el efecto del buffer o fase acuosa de los liposomas en el termograma resultante, se empleó en el

porta muestras de referencia buffer HEPES con un peso aproximado al de la muestra objeto de estudio.

La finalidad de este ensayo fue comprobar si el fármaco sufre algún proceso de recristalización o descomposición que implique la aparición de cambios estructurales que puedan afectar a su difusión a través de las membranas. Igualmente, se pretende analizar la existencia de cambios en la entalpía de fusión del fármaco, todo ello con el objeto de poder explicar, entre otros aspectos, la imposibilidad de obtener liposomas de sumatriptán sin carga.

De igual modo, se aplicó este análisis a las formulaciones de micropartículas y de LEMs utilizadas para encapsular al succinato de sumatriptán y a los liposomas, respectivamente.

2.5.8 Resonancia magnética nuclear de fósforo (P-NMR)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las metodologías más versátiles disponibles hoy en día para el estudio de la estructura y dinámica molecular. Esta metodología es un tipo de espectroscopía de absorción en el intervalo de radiofrecuencias 10^6 - 10^{10} Hz, la cual permite estudiar las transiciones entre los distintos estados de spin de ciertos núcleos situados en campos magnéticos.

Dado que la principal función de los lípidos en los liposomas es proporcionarles una estructura de bicapa semipermeable, es importante conocer qué tipo de estructura está presente en el sistema liposomal, ya que los lípidos hidratados tienen la propiedad de adoptar otras configuraciones, como la de fase hexagonal H_I y H_{II} (estructuras cilíndricas elongadas), micelar y otras, en las que la estructura presente puede ser cúbica o rómbica (Cullis y de Kruijff, 1979; Nieva y cols., 1995; Fa y cols., 2006).

El tipo de estructura de fase presente influirá directamente sobre el comportamiento de los liposomas. Con la ^{31}P NMR se consigue información acerca del orden local de las dispersiones de fosfolípidos y sobre la movilidad de la cabeza de grupo polar de la membrana lipídica, donde se localiza el átomo de fósforo. Además, permite conocer las transiciones de fase de los sistemas liposomales como la fase α líquido cristalina o la fase β gel (Timoszyk y cols., 2004; Fa y cols., 2006).

Toda esta información resulta muy útil para determinar el tipo de estructura de la bicapa del liposoma, su conformación y las interacciones de los fosfolípidos en la membrana (Sulkowski y cols., 2005).

El fósforo del lípido exhibe un gran cambio químico anisotrópico, que a su vez depende de la estructura de fase característica de los lípidos. La anisotropía o cambio químico anisotrópico resultante origina entonces un espectro característico, cuya forma y anchura dependen del movimiento o la orientación de la molécula del fosfolípido relativa al campo magnético aplicado, el cual a su vez está relacionado con la fase lipídica existente (Seelig, 1978; Dubinnyi y cols., 2006).

En la figura 14 se observan las señales obtenidas de una micela y de un liposoma. Un espectro típico de la conformación de bicapa, resulta en una línea amplia con un hombro de campo bajo y un alto pico de campo. En la fase hexagonal H_{II} el espectro resulta con una asimetría inversa al de bicapa, mientras que las configuraciones de los lípidos en fases rómbicas, cúbicas o en micelas invertidas presentan un espectro simétrico (Cullis y de Kruijff, 1979).

La nomenclatura que representa las conformaciones de los lípidos más ampliamente utilizada, es la propuesta por Luzzati (Nieva y cols., 1995), que se compone de una letra y un subíndice. En primer lugar, el tipo de orden de largo alcance se indica con una letra mayúscula: *L* significa unidimensional (lamelar), *H* bidimensional (hexagonal), *P* bidimensional oblicua, *Q* tridimensional cúbica y *C* tridimensional cristalina. La conformación de las cadenas hidrocarbonadas se indica mediante un subíndice formado por una letra griega: α se refiere a cadenas acíclicas desordenadas (fluido), β ordenadas (gel) y β' ordenadas inclinadas.

Además, la organización lipídica puede ser de tipo I, topología de fase aceite en agua, cuando los elementos estructurales (lamelar, hexagonal, etc.) están rellenos con las cadenas acíclicas del lípido (interior hidrofóbico), o de tipo II (invertidas) agua en aceite, cuando el disolvente acuoso está rodeado por una matriz hidrofóbica (interior hidrofílico).

Las estructuras lipídicas de mayor relevancia biológica son las estructuras lamelares, hexagonales y cúbicas (Seddon y Templer, 1995).

Los espectros de ^{31}P NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 202 MHz con una sonda QNP de detección directa para el ^{31}P operando a una temperatura de 303 °K y 338 °K, con un *delay* de relajación: $d1 = 600$ milisegundos, pulso de 90° y el número de puntos para la adquisición: 8k. Número de acumulaciones (scans): 10 k. Los valores del cambio químico están expresados en partes por millón (ppm).

Las muestras fueron preparadas mediante el método de evaporación en capa fina (TLE) descrito previamente (apartado 2.4.1 del presente capítulo), y el método de evaporación en fase reversa (apartado 2.4.3 del presente capítulo). En ambos casos, la fase acuosa estuvo compuesta por 0.5 mL de agua deuterada y 9.5 mL del buffer HEPES.

Se evaluaron liposomas neutros y cargados positiva y negativamente, usando la proporción lipídica 50:40:10 (PC:CH:especie cargada). Para este experimento, se elaboraron los lotes con y sin fármaco (lote blanco).

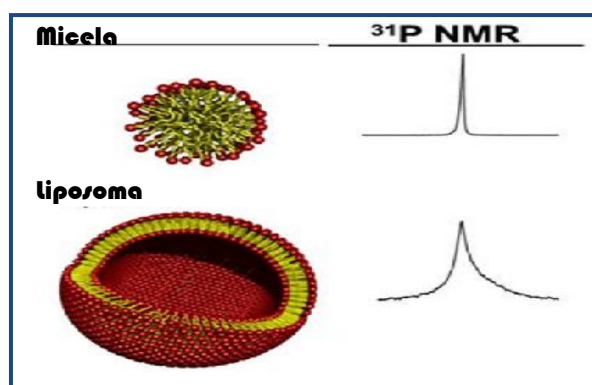


Figura 14. Representación de las señales de un espectro de ^{31}P NMR para un sistema micelar y para un liposoma.

2.6 PREPARACIÓN DE LOS LEMs

Los LEMs se elaboraron mediante la técnica de gelificación iónica, como se comentó anteriormente en esta memoria, técnica que ha sido utilizada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación (Salas, 2009).

Los LEMs han sido preparados partiendo de alginato sódico (Igari y cols., 1990), como polímero hidrófilo para la formación de la micropartícula, y adicionando otros polímeros en distintas etapas del proceso de elaboración, con el fin de obtener varias formulaciones y poder escoger aquella que presentara la mejor eficacia de encapsulación.

Estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación y otros, han demostrado que las micropartículas de alginato presentan una elevada porosidad cuando se preparan por la técnica de gelificación iónica, y otros inconvenientes adicionales (González-Rodríguez y cols., 2002; Rajinikanth y cols., 2003; Matricardi y cols., 2008), que hacen que sea necesario el empleo de otros polímeros junto con el alginato, para mejorar parámetros como la eficacia de encapsulación de principios activos hidrosolubles.

En este trabajo se han elaborado lotes de LEMs en paralelo con lotes de micropartículas conteniendo la solución del sumatriptán, con la intención de establecer comparaciones de los resultados obtenidos, así como también lotes sin fármaco o lotes blancos.

En la tabla 5 se detallan los lotes elaborados de las micropartículas con solución y conteniendo liposomas (LEM) junto con las soluciones poliméricas escogidas.

LOTE	POLÍMERO	CONCENTRACIÓN y VOLUMEN	PRODUCTO ENCAPSULADO
A	Alginato	3% (86mL)	Solución de sumatriptán
B	Alginato	3% (86 mL)	Liposomas
C	Gantrez® Intermedio	4% (10 mL)	Solución de sumatriptán
D	Gantrez® Intermedio	4% (10 mL)	Liposomas
E	Gantrez® Final	4% (10 mL)	Solución de sumatriptán
F	Gantrez® Final	4% (10 mL)	Liposomas
G	Quitosano Intermedio	0,1% (10 mL)	Solución de sumatriptán
H	Quitosano Intermedio	0,1% (10 mL)	Liposomas
I	Quitosano Final	0,1% (20 mL)	Solución de sumatriptán
J	Quitosano Final	0,1% (20 mL)	Liposomas
K	Quitosano Final	0,1% (10 mL)	Solución de sumatriptán
L	Quitosano Final	0,1% (10 mL)	Liposomas

Tabla 5. Descripción de las soluciones poliméricas utilizadas en la elaboración de los diferentes lotes y el producto encapsulado. Los lotes C, D, E, F, G, H, I, J, K y L, constituidos por mezclas de alginato / polímero contienen un volumen de 76 mL de dispersión de alginato al 3%. Los mililitros entre paréntesis corresponden al volumen empleado de cada solución polimérica.

2.6.1 Preparación de micropartículas de alginato con solución de sumatriptán

En primer lugar, se preparó una dispersión acuosa (100 mL) de alginato sódico al 3% p/v. De esta dispersión se tomaron 86 mL y se mezclaron con 14 mL de solución de sumatriptán al 0.95% p/v en HEPES (pH 5.5 – 5.6), agitando en placa *Multimatic – 9N*, potencia 650 W, a velocidad media hasta su completa homogeneización. A continuación, se agregan

gradualmente, manteniendo la agitación, 5 mL de carbonato cálcico micronizado al 5% p/v, como medio donador de iones de calcio, y se continúa con la agitación durante 20 minutos (Ribeiro y cols., 2005; Silva y cols., 2006b).

Paralelamente, se prepara la fase orgánica, constituida por 70 mL de miristato de isopropilo, 30 mL de diclorometano y 3 mL de Span[®] 80, agitando en un homogeneizador *Eurostar Ika[®]*, iniciando a una velocidad entre 200 y 400 r.p.m, para no generar burbujas, hasta alcanzar una velocidad de 1300 r.p.m.

A continuación, se añade mediante goteo la fase polimérica a la fase orgánica a 1300 r.p.m. y se dejan reaccionar durante 20 minutos con el fin de favorecer la formación de la emulsión A/O.

Seguidamente, se adicionan a la emulsión 20 mL de miristato de isopropilo en el que previamente han sido disueltos 500 µL de ácido acético glacial, para iniciar así la reacción de gelificación iónica. La agitación continuó durante 40 minutos. En esta etapa tiene lugar la gelificación de las gotículas formadoras de la fase interna de la emulsión, debido a la liberación del ión calcio, que se solubiliza parcialmente en el medio ácido que proporciona el ácido acético glacial (Poncelet y cols., 1999; Silva y cols., 2006a; Shishu y cols., 2007).

Las gotículas así formadas se separan de la fase continua con ayuda de 50 mL de acetato de etilo, decantándose el exceso de éste. El preparado obtenido se centrifuga (*Centrifuga eppendorf[®] 5804 R*) a 9500 r.p.m. durante 5 minutos para completar la separación.

Finalmente, las micropartículas obtenidas son lavadas con 100 a 125 mL de acetato de etilo. Se elimina el exceso de disolvente y a continuación las micropartículas se liofilizan en un *liofilizador Telstar[®] Cryodos*, previa congelación en nitrógeno líquido durante 40 minutos.

2.6.2 Preparación de LEMs con alginato sódico

El procedimiento es similar al descrito para las micropartículas de alginato / solución sumatriptán, con la diferencia de que se sustituyeron los 14 mL de solución de sumatriptán por 14 mL de liposomas REV 50:40:10 con carga positiva. Así, inicialmente, se preparó la solución de

alginato sódico al 3%, de la cual 86 mL se mezclaron con los liposomas REV agitando en una placa *Multimatic 9N*. Seguidamente se añadieron 5 mL de una suspensión de carbonato cálcico micronizado al 5% p/v; de este modo, los liposomas quedan recubiertos por el alginato.

Posteriormente se continuó con el protocolo de elaboración; es decir, con la preparación de la fase orgánica, formación de la emulsión A/O, gelificación iónica, lavado y liofilización de las micropartículas obtenidas.

2.6.3 Preparación de micropartículas y de LEMs con mezclas de alginato / polímeros

Para la elaboración de estos sistemas se siguió el mismo procedimiento descrito en los apartados 2.6.1 y 2.6.2 del presente capítulo, con la variante de medir un volumen de 76 mL de solución de alginato sódico al 3% p/v, con la finalidad de mantener el volumen de fase acuosa en 100 mL.

Además, la adición de los polímeros se realizó en dos etapas diferentes del proceso de elaboración: se añadieron en una etapa intermedia, actuando como polímeros aditivos, y al final del proceso, como polímeros de recubrimiento. Dependiendo de la etapa en que se adicionen, se obtendrán variaciones en el producto obtenido en cuanto a tamaños, encapsulación, liberación, etc. (Ribeiro y cols., 2005; Silva y cols., 2006b; Rokhade y cols., 2007).

2.6.3.1 Micropartículas y LEMs de alginato / Gantrez®

En la figura 15 se resume el proceso de obtención de la micropartículas de succinato de sumatriptán utilizando Gantrez®, bien en la etapa intermedia del proceso o bien en la etapa final del mismo, con sus respectivas condiciones.

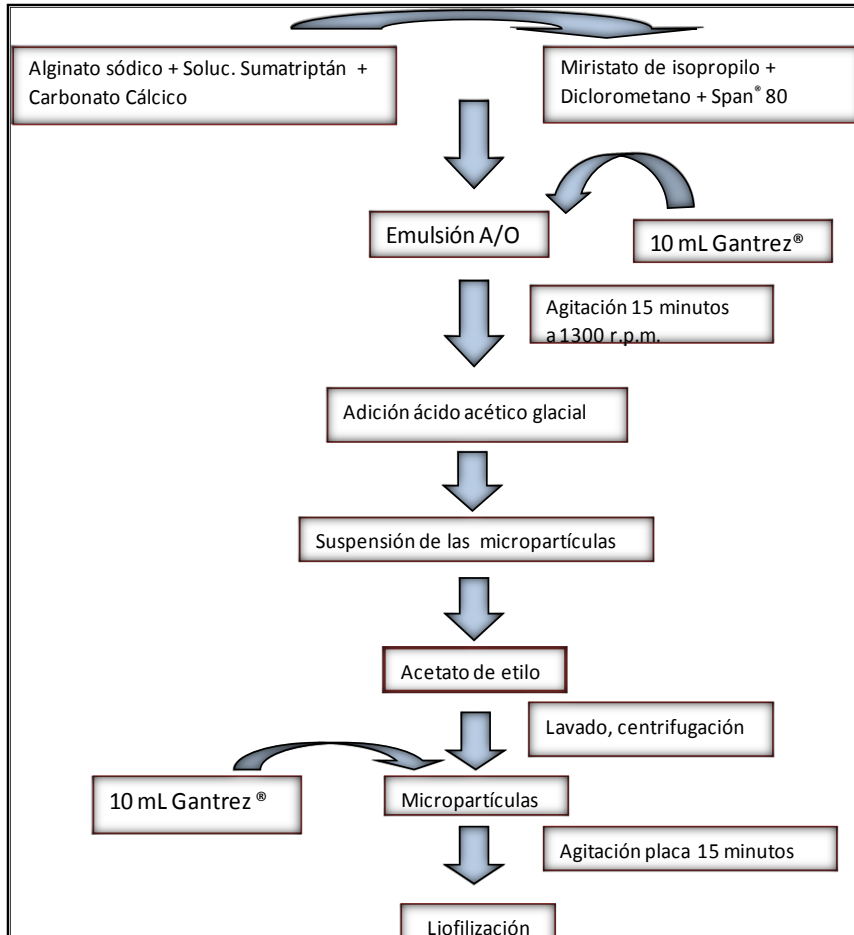


Figura 15. Esquema del proceso de obtención de las micropartículas de alginato / Gantrez®, utilizando Gantrez® en la fase intermedia del proceso o al final del mismo. Lotes C, D, E y F (tabla 5).

2.6.3.2 Micropartículas y LEMs de alginato / quitosano

Para la obtención de estas formulaciones, se ha utilizado el quitosano a una concentración del 0.1% p/v, documentada por otros autores con el mismo método de preparación (Silva y cols., 2006a), añadiéndolo igual que en el caso anterior, en la etapa intermedia o al final del proceso (Anal y Stevens, 2005).

La solución del quitosano se preparó disolviendo 0.1 g de quitosano en solución de ácido acético glacial / agua destilada hasta un volumen de 100 mL (pH 3) con agitación en placa Multimatic – 9N durante 30 minutos.

Para la obtención de estas formulaciones se aprovecha la interacción electrostática entre la carga negativa de los grupos carboxilos del alginato y la carga positiva de los grupos aminos del quitosano, formándose así un complejo polielectrolítico que reduce la porosidad e incrementa la estabilidad de las micropartículas de alginato (Silva y cols., 2006b).

Cuando se añadió el quitosano al final del proceso, se tomaron dos volúmenes de la solución de quitosano al 0,1%, siendo éstos 10 mL para los lotes K y L, y 20 mL para los lotes I y J (tabla 5). En la figura 16 se recoge un esquema del proceso de preparación de estas formulaciones.

2.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS LEMs

2.7.1 Análisis dimensional

El tamaño de las partículas fue medido por difracción de rayos láser. Esta técnica opera a través de la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de la luz.

Como es bien conocido, las partículas dispersan la luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. De forma muy simple, se puede decir que las partículas pequeñas dispersan la luz a ángulos bastante abiertos, mientras que las partículas de mayor tamaño dispersan la luz a ángulos más cerrados.

El equipo utilizado para realizar estas mediciones ha sido el analizador de tamaños de partículas *HORIBA Partica LA-950V2*, con un diseño óptico optimizado con un sistema detector de 87 elementos logarítmicos y cuya fuente de luz emite longitudes de onda más cortas proporcionando un rango de medidas más amplio, con mayor precisión y resolución.

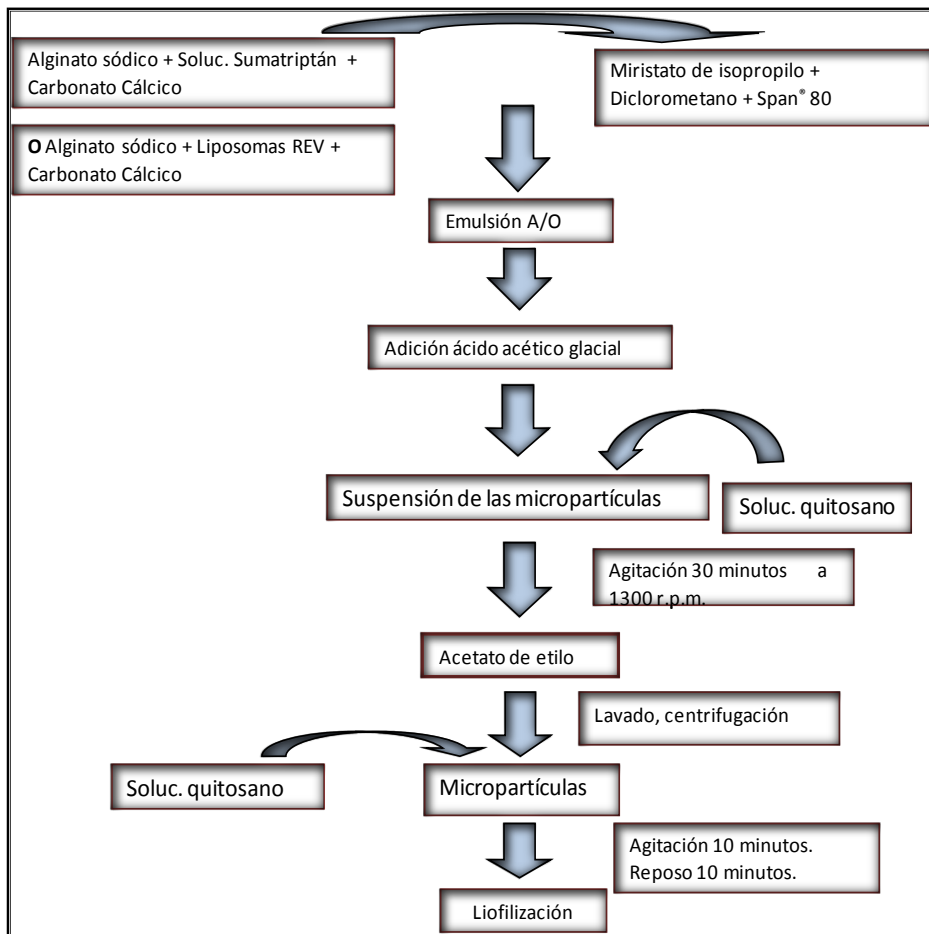


Figura 16. Esquema del proceso de obtención de las micropartículas y de las LEMs de alginato / quitosano, utilizando el quitosano en la fase intermedia del proceso o al final del mismo. Lotes G, H, I, J, K y L (tabla 5)

Las muestras fueron preparadas pesando una pequeña cantidad de micropartículas o de LEMs (aproximadamente 3 mg), dispersándolas a continuación con agitación en 10 mL de agua purificada, hasta su completa hidratación (30 minutos). El índice de refracción utilizado para la medida fue 1.59, correspondiente al alginato.

2.7.2 Eficacia de encapsulación

Para cuantificar el succinato de sumatriptán encapsulado en las micropartículas, fue necesario destruir la micropartícula; para ello, se utilizaron soluciones como el trifosfato sódico pentabásico (TPP) al 1% p/v y una solución de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.1 M.

En el caso de los LEMs, además, fue necesaria la destrucción de los liposomas cargados de fármaco, para lo cual se trataron con solución del tensioactivo Tritón[®] X-100 al 3%. Finalmente, la cuantificación de las muestras obtenidas de cada lote fue realizada por HPLC, siguiendo el método descrito en el apartado 2.2 del presente capítulo. En la tabla 6 se describe el procedimiento para preparar las muestras de cada lote a ser evaluado en cuanto a su eficacia de encapsulación.

2.7.3 Estudios de permeación de las micropartículas y de los LEMs

El ensayo de permeación de las micropartículas y de los LEMs se llevó a cabo utilizando células de difusión de Franz (*Vidrafoc, Barcelona*).

El procedimiento ha sido similar al utilizado para las formulaciones de liposomas (apartado 2.5.6 de este capítulo), utilizando membranas de nitrato de celulosa (*Millipore[®] 0.1 μm*) impregnadas en alcohol laurílico, y la solución Sorensen ajustada a pH 7.4 como medio receptor.

La extracción de las alícuotas del medio receptor se hizo a iguales intervalos de tiempo.

Las muestras se trataron de dos modos distintos:

1. Se pesaron aproximadamente 100 mg de micropartículas o LEMs, según el caso, y se depositaron cuidadosamente sobre la membrana de nitrato de celulosa, de modo que quedaran uniformemente dispersas en su superficie. Posteriormente, se añadieron 5 mL de agua destilada al compartimiento donador para humectar las muestras.

LOTES	RUPTURA MICROPARTICULAS	CONDICIONES	RUPTURA LEMs	CONDICIONES
A y B (Salas, S., 2009)	Solución de TPP al 1 %; pH 6.6 (ajustado con ácido acético glacial)	100 mg de MP + 5 mL de TPP 1 % p/v, agitación en placa 30 minutos. Enrasar con agua destilada a 25 mL y cuantificar por HPLC	Solución TPP al 1 % pH 6.6 (ajustado con ácido acético glacial) Solución Tritón® X-100 al 3%	100 mg de LEMs + 5 mL de TPP 1 % p/v, agitación en placa 15 minutos + 5 mL de Tritón® X-100 continuar agitación durante 15 minutos. Enrasar a 25 mL. Cuantificar por HPLC
C, D, E y F (Salas, S., 2009)	Solución TPP al 1 % pH 6.6 (ajustado con ácido acético glacial)	100 mg de MP + 5 mL TPP 1 % p/v agitar en placa 30 minutos. Enrasar con agua destilada a 25 mL. Centrifugar a 7000 r.p.m. × 15 minutos. Cuantificar por HPLC.	Solución TPP al 1 % pH 6.6 (ajustado con ácido acético glacial) Solución Tritón® X-100 al 3%	100 mg de LEMs + 5 mL de TPP 1% p/v agitación en placa 15 minutos + 5 mL de Tritón® X-100 y continuar agitación durante 15 minutos. Enrasar a 25 mL. Centrifugar 7000 r.p.m. × 15 minutos. Cuantificar por HPLC
G, H, I, J, K y L (Machluf, M., 1996)	Solución de EDTA 0.1 M en buffer fosfato a pH 6	100 mg de MP + 10 mL de EDTA 0.1 M agitando 2 horas en placa. Enrasar a 25 mL con buffer. Centrifugar a 7000 r.p.m. × 15 minutos. Cuantificar por HPLC.	Solución de EDTA 0.1 M en buffer fosfato a pH 6 Solución Tritón® X-100 al 3%	100 mg de LEMs + 10 mL de EDTA 0,1 M agitando 1.5 horas en placa + 5 mL de Tritón® X-100 continuar agitación durante 30 minutos. Enrasar a 25 mL con buffer. Sonicar y centrifugar a 7000 r.p.m. × 10 minutos. Cuantificar por HPLC.

Tabla 6. Soluciones utilizadas para destruir las micropartículas y / o LEMs y lotes utilizados para determinar EE. Los lotes G, H, I, J, K y L, se sonicaron en tres tiempos diferentes 15, 30 y 60 minutos.

- Se pesaron aproximadamente 100 mg de micropartículas o LEMs, según el caso, y se depositaron cuidadosamente sobre la membrana de nitrato de celulosa, de modo que quedaran uniformemente dispersas en su superficie. Posteriormente, se añadieron 5 mL de NaCl al 0.9% p/v al compartimiento donador con la finalidad de causar la ruptura o destrucción de las micropartículas y LEMs.

La razón por la que se han tratado las muestras de dos modos distintos, ha sido la necesidad de conseguir una liberación relativamente rápida del fármaco desde los liposomas encapsulados en las micropartículas.

Es importante destacar que en esta investigación el uso de estos sistemas (LEMs) no se aplica para lograr una liberación prolongada del fármaco, sino como mecanismo para mejorar la estabilidad de los liposomas y aumentar su eficacia de encapsulación.

Debido a lo anteriormente expuesto, surgió la necesidad de conseguir la destrucción de las micropartículas y favorecer la liberación de los liposomas.

Así, según la bibliografía consultada, encontramos que el cloruro de sodio (NaCl) ocasiona la disgregación de las micropartículas de alginato por un intercambio iónico entre Na^+ y Ca^{++} , que tiene como resultado la liberación del fármaco hidrosoluble (Tu y cols., 2005). Al mismo tiempo, de acuerdo con Martínez y cols. (2004), en los lotes recubiertos con quitosano, este polímero reacciona con los iones cloruro (Cl^-) por interacción iónica, que desestabiliza sus redes permitiendo la salida del material encapsulado.

Este ensayo se realizó por un tiempo de 48 horas y al final del ensayo, las alícuotas fueron cuantificadas por HPLC. Los resultados obtenidos nos permitieron conocer los porcentajes de permeación y el flujo de fármaco a través de la membrana con respecto al tiempo. A partir de los perfiles obtenidos, se calcularon el coeficiente de permeación (P) y el flujo en estado estacionario (J_{ss}) utilizando las mismas expresiones que quedan recogidas en el apartado correspondiente al estudio de permeación de los liposomas.

2.7.4 Integridad de los liposomas encapsulados

Con el fin de verificar la presencia de los liposomas dentro de las micropartículas se realizó el ensayo de liberación *in vitro* de calceína desde los liposomas microencapsulados.

La calceína se usa normalmente como marcador fluorescente del compartimiento acuoso de los liposomas, ya que permite conocer la integridad de los mismos, midiendo la intensidad de su fluorescencia. La

calceína tiene la propiedad de autoextinguirse. Esta propiedad está dada por el hecho de que la calceína, a concentraciones alrededor de 2 μM , mantiene una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y su concentración, siempre que sea menor de 20 mM, ya que su incremento aumenta las interacciones entre sus moléculas y conduce a una extinción de la fluorescencia. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede medir la intensidad de fluorescencia tanto en la dispersión liposomal, donde se encuentran los liposomas intactos, como después de romperlos.

Así, si existen diferencias se comprobaría que realmente se logró la encapsulación del marcador en el interior del liposoma, lo que implica que, efectivamente, los liposomas se mantuvieron intactos en el interior de las micropartículas.

De este modo, se prepararon liposomas conteniendo calceína a una concentración adecuada que permita medir su fluorescencia, de modo que al realizar el ajuste lineal con su concentración, se obtenga tanto la cantidad de calceína libre, como la cantidad de calceína encapsulada dentro de los liposomas. En este último caso es necesaria la destrucción de los liposomas por acción del Tritón[®]. La concentración de calceína en el interior de los liposomas debe ser mayor que su concentración en el medio de dispersión, por lo que la intensidad de fluorescencia será menor al analizar los liposomas destruidos con Tritón[®] (Feng y cols., 2004).

El procedimiento a seguir viene recogido en la figura 17. En primer lugar, se prepararon los lotes de LEMs con liposomas cargados de calceína a una concentración 1.5 μM . Una cantidad determinada de LEMs se colocó en tubos eppendorf y se hidrató con 1 mL de buffer HEPES a pH 5.5. Se llevaron a agitación (*placa Unitronic[®] OR Selecta*) a 100 r.p.m. / minuto y a 37 °C durante cuatro horas, tomando muestras (en eppendorf) cada 30 minutos. Las muestras fueron sometidas a centrifugación (*centrífuga eppendorf[®] 5804 R*) a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante fue retirado, reemplazado con 1 mL de buffer fresco y analizado en un espectrofotómetro de fluorescencia (*Hitachi F-2500 FL spectrophotometer on COM2*) con el programa FL - Solutions.

El sedimento fue rehidratado con ayuda de vortex durante 2 minutos y el nuevo sobrenadante fue analizado en el espectrofotómetro. Estas dos mediciones han sido realizadas con la finalidad de determinar la cantidad exacta de calceína libre. Finalmente, el sedimento se trató con Tritón® X-100 al 2% bajo agitación en placa *Multimatic® 9N* a 60 °C y durante una hora, con el fin de destruir a los liposomas y de ese modo cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de calceína encapsulada.

Estas medidas han sido efectuadas con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 516 nm, correspondientes a la fluorescencia de la calceína (Feng y cols., 2004). Todas las muestras analizadas fueron llevadas a igual volumen antes de realizar la medición de fluorescencia.

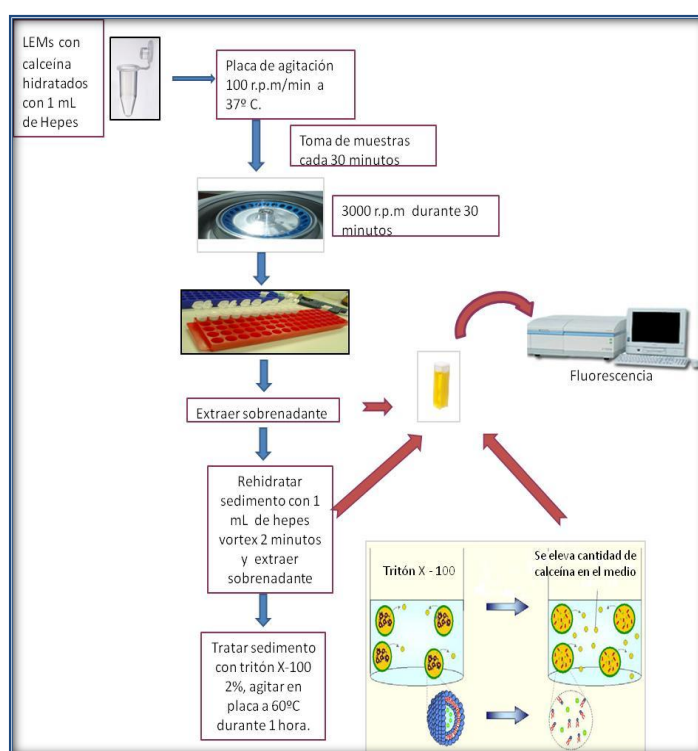


Figura 17. Esquema del ensayo de integridad de los LEMs.

Para conocer la cantidad de calceína en cada muestra se realizó una curva de calibración con concentraciones de calceína comprendidas entre 1.5 µg/mL y 6 µg/mL.

2.7.5. Morfología de los LEMs

El estudio de las características morfológicas de las distintas formulaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Phillips XL-30, que posee un detector de electrones secundarios mediante el cual fue posible observar la superficie de las muestras.

Las muestras analizadas se sometieron a deshidratación en presencia de vacío y posteriormente fueron recubiertas con oro (*sputtering*) utilizando una cámara Edwards, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

Las condiciones de trabajo y el procedimiento operativo seguido fue el utilizado para analizar muestras no conductoras, siendo el voltaje de aceleración de 15 kV.

Además del microscopio de barrido convencional, se utilizó otro denominado VPSEM (*Variable Presion Scanning Electron Microscope*) o CryoSEM, que incorpora un dispositivo de presión variable y que permite introducir las muestras en estado húmedo. El modelo utilizado (*Hitachi S-3500N*) permitió trabajar a una presión de 50 Pa, sin control de la humedad relativa. Las muestras fueron examinadas sin metalizar con un detector ESED (*Enviromental Secondary Electron Detector*). La temperatura de trabajo fue de -15 °C y una tensión de aceleración de 15 kV.

2.7.6. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica a través de la cual se manifiesta la interacción fundamental de los rayos X con los cristales (materia ordenada).

Está basada en el efecto fotoeléctrico, cuyo fundamento reside en los fenómenos que se producen cuando la radiación incide sobre la materia. El primer fenómeno que se observa es que la radiación

incidente es parcialmente atenuada por el material irradiado, es decir, que sólo una fracción de la intensidad de la radiación la atraviesa sin que se produzcan cambios en su energía o longitud de onda. La medida de la intensidad transmitida es la base de las técnicas de rayos X.

Este análisis se aplicó a muestras de micropartículas y de liposomas encapsulados en micropartículas (LEMs) de alginato y de alginato recubierto con quitosano o Gantrez[®]. El equipo utilizado ha sido un difractómetro BRUKER θ : 20 (modelo D 8 Advance), específico para análisis de muestras pulverulentas, de anticátodo de cobre, monocromador en el haz difractado y detector de centelleo, entre otros. Los difractogramas obtenidos permiten analizar las distintas fases cristalinas presentes en la muestra de forma cualitativa y cuantitativa, así como también realizar estudios estructurales de la misma.

Las medidas se han realizado con ángulo θ de 3 a 70° con un incremento de paso de 0.003°. Tiempo por paso: 1 segundo, potencia 40 kV y potencia del tubo de 30 mA, con rendija variable de 12 mm. Todas las medidas se han realizado a 25 °C. Este ensayo permitió establecer la estructura del fármaco en las formulaciones ensayadas, con respecto a si se trata de una estructura cristalina o polimórfica (<http://institucional.us.es/labrayx/>).

3.1 CARACTERIZACIÓN DE SUMATRIPTÁN

3.1.1 Cuantificación de succinato de sumatriptán

El método cromatográfico seguido para cuantificar el SU se desarrolló siguiendo la metodología indicada en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos.

La longitud de onda de máxima absorción fue de 227 nm. El pico indicativo del fármaco presentó un tiempo de retención de 5.60 min (SD = 0.025).

El grado de linealidad de la respuesta del detector UV en el método cromatográfico desarrollado fue analizado para el intervalo de concentraciones de fármaco comprendido entre 0.05 mg/mL y 0.150 mg/mL, quedando definido por un coeficiente de correlación r de 0.9998 ($n=15$).

Según la recta de calibrado y el coeficiente de correlación, podemos concluir que el método es lineal para el intervalo de concentraciones estudiado de manera que nos proporcionara resultados fiables.

Igualmente, como se mencionó en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos, para cuantificar al fármaco en algunos de los ensayos realizados fue necesario partir de un patrón. En la figura 18 se puede observar la imagen del cromatograma originado por uno de estos patrones.

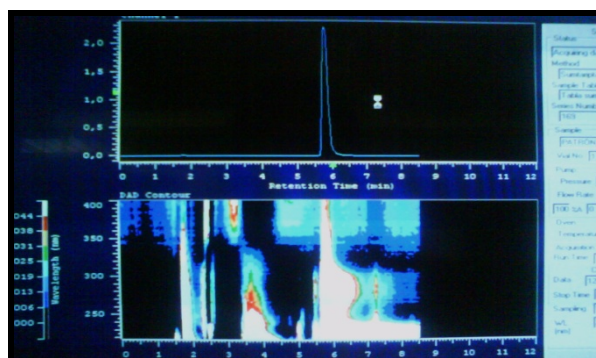


Figura 18. Espectro de absorción del patrón de succinato de sumatriptán (concentración: 1 mg/mL).

3.1.2 Morfología

Este apartado se centra en el estudio de la forma y tamaño aproximado de las partículas de succinato de sumatriptán mediante el empleo de la Microscopía Electrónica de Barrido. La finalidad del estudio fue caracterizar el fármaco desde el punto de vista morfológico con el fin de facilitar la identificación en caso de precipitación en las formulaciones vesiculares.

En la figura 19 se muestra una microfotografía del fármaco. Como puede apreciarse, las partículas son cristalinas, tienen un aspecto alargado o elongado, con tendencia a la aglomeración y con tamaños inferiores a 20 μm .

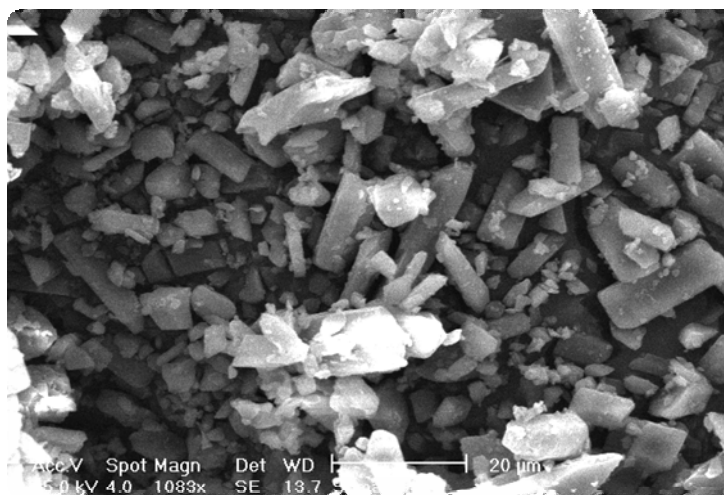


Figura 19. Microfotografía de succinato de sumatriptán. Voltaje: 15.0 kV.

3.1.3 Análisis térmico

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.2.1 de Materiales y Métodos, en la figura 20 se recoge el termograma, correspondiente a una muestra de sumatriptán, obtenido por DSC. Como puede apreciarse, se registra una primera endoterma, asignable a la fusión del fármaco, caracterizada por una temperatura de pico (T_p) de 169.69 °C y una entalpía de fusión de 96.29 J/g.

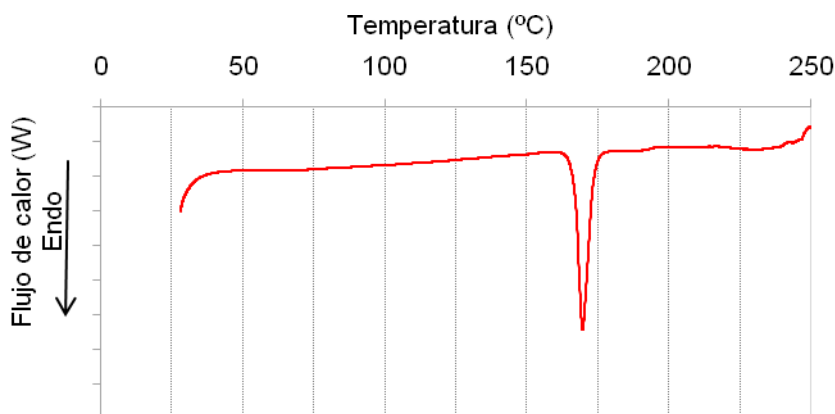


Figura 20. Termograma obtenido por DSC correspondiente a la muestra de succinato de sumatriptán.

Como técnica complementaria a la anterior, se empleó la microscopía de platina caliente.

Las observaciones realizadas mediante termomicroscopía corroboraron los resultados obtenidos por DSC. Así, en la figura 21 se pueden observar las imágenes correspondientes a los cambios que sufren las partículas de succinato de sumatriptán cuando se incrementa la temperatura. En la figura 21a, se muestran las partículas de fármaco a temperatura ambiente. Se aprecian partículas de fármaco de forma irregular, con la presencia de algunos aglomerados, y que al ser observados con luz polarizada muestran un aspecto brillante indicativo de la cristalinidad del succinato de sumatriptán. Cuando se incrementa la temperatura hasta 163 °C (figura 21b), los cristales sufren una primera modificación, indicativa del comienzo del proceso de fusión que se pone de manifiesto por la aparición de partículas con bordes redondeados y primeras gotitas de fundido. Este proceso continúa hasta la fusión total de las partículas (figura 21 c) observándose finalmente vesículas de fundido.

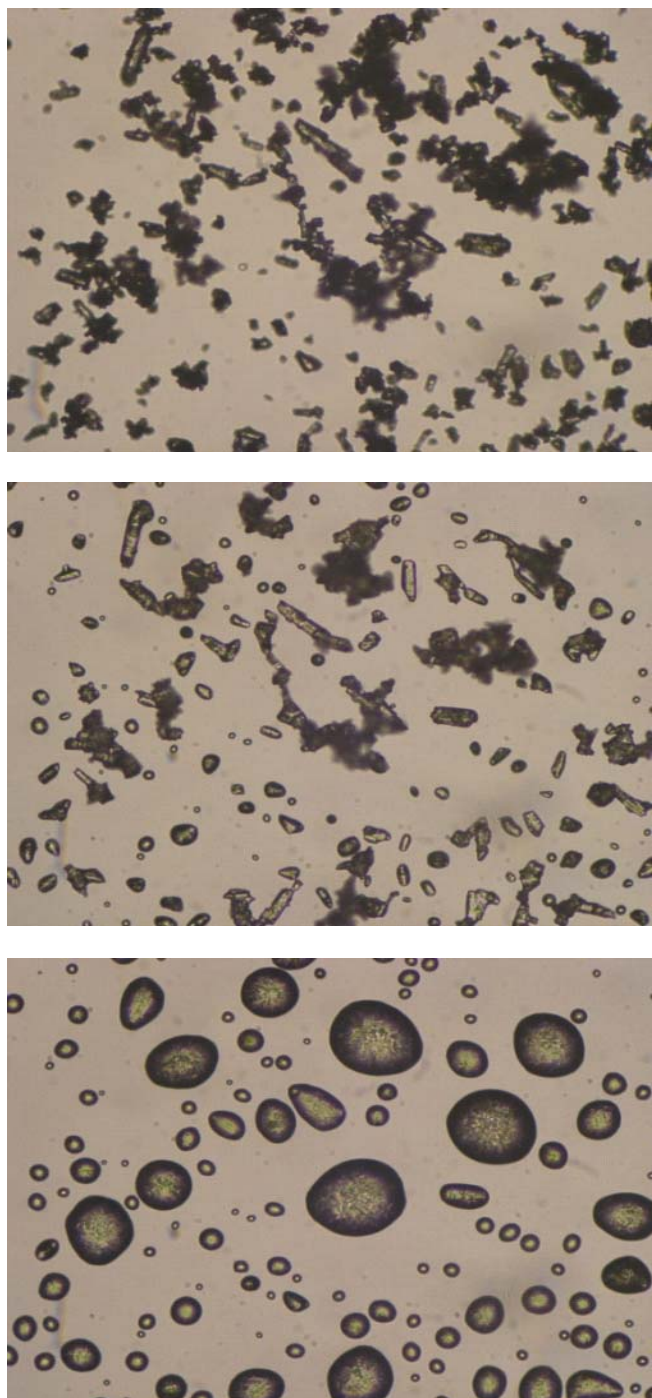


Figura 21. Secuencia de microfotografías por HSM. (a) Cristales de sumatriptán a 25 °C, (b) Inicio del proceso de fusión a 163 °C, (c) Fusión de succinato de sumatriptán a 167 °C.

3.1.4 Coeficiente de reparto y pH

Los coeficientes de reparto y de distribución se han calculado utilizando el programa informático ACD/PhysChem, utilizando la estructura molecular del succinato de sumatriptán. A través de ésta, el programa determina ambos coeficientes. Se obtuvo

un valor de $\text{Log P} = 0.67$, valor que se encuentra muy cercano al publicado en otros estudios de investigación, de 0.65 (Balaguer y cols., 2008). En cambio, el Log D para un pH de 5.5 resultó ser de -2.38. Ya sabemos que cuando el valor del Log P es menor de 0, se trata de una sustancia polar poco liposoluble (Ashford, 2004). Igualmente, valores de Log D negativos son indicativos de un mayor carácter hidrófilo de la molécula (www.acdlabs.com/phys_chem_lab/physichemsuite/). Ambos resultados indican el carácter hidrófilo del succinato de sumatriptán.

Para conocer la ionización del fármaco a pH de 5.5 – 5.6 correspondiente al pH de la fase acuosa de los liposomas, se hizo una representación gráfica del valor del Log D frente al pH, obteniendo una curva que demuestra que a valores inferiores a pH 9, el fármaco se encuentra protonado, a pH 9 está en su forma neutra y a pH mayor de 9 se carga negativamente (figura 22). En los liposomas, por tanto, el sumatriptán se encontrará mayoritariamente protonado.

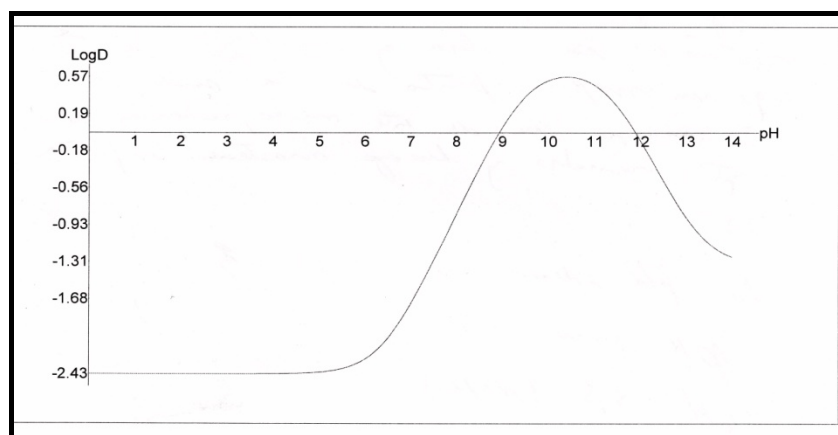


Figura 22. Comportamiento de succinato de sumatriptán bajo la influencia del pH.

El pH del succinato de sumatriptán fue determinado sobre una solución del fármaco en agua destilada al 10%, en un pH-metro *Crisón® Basic* a 23 °C y bajo agitación, resultando ser de 4.58. Este resultado se corresponde con los valores recogidos en la bibliografía consultada (Martindale, 2009; USP 31). De igual manera, fue determinado el pH para la solución de sumatriptán en buffer HEPES, resultando en un valor de 4.74.

Los datos de solubilidad y de pKa de sumatriptán han sido obtenidos de las referencias bibliográficas consultadas, siendo su solubilidad en agua de 0.14 mg/mL. En cuanto a su pKa, presenta tres valores de acuerdo a los grupos funcionales que lo conforman: 9.63 para el grupo amino, > 12 para el grupo sulfonamida y de 4.21 para el grupo succinato ([www.gsk.ca/english/docs-pdf/Imitrex PM 20090408 EN.pdf](http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/Imitrex_PM_20090408_EN.pdf), 2009).

3.2 ANÁLISIS TÉRMICO DE LOS COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES

Dada la naturaleza iónica del fármaco en estudio, a la hora de planificar la composición cuali y cuantitativa de los liposomas, se hizo necesario incluir agentes que alteraran la carga neta de las vesículas (EA y DCP), con el fin de poner de manifiesto la influencia de la ionización del fármaco sobre su encapsulación. Además, se ha utilizado CH para modificar las propiedades de rigidez de la membrana. Por tanto, además de la PC, utilizada en la elaboración de los liposomas, tenemos que poner de manifiesto la influencia que pueden ejercer estos tres componentes adicionales a la hora de estudiar la formación de los mismos.

Por tanto, se hace necesario comenzar el estudio térmico por la caracterización de los componentes de forma individualizada; aunque los datos referentes al fármaco puro se comentaron en un apartado anterior se incluyen de nuevo con el fin de facilitar la comparación de resultados.

En la figura 23 se recogen los termogramas de las diferentes materias primas empleadas en la elaboración de los liposomas y en la tabla 7, los principales parámetros térmicos de dichos termogramas.

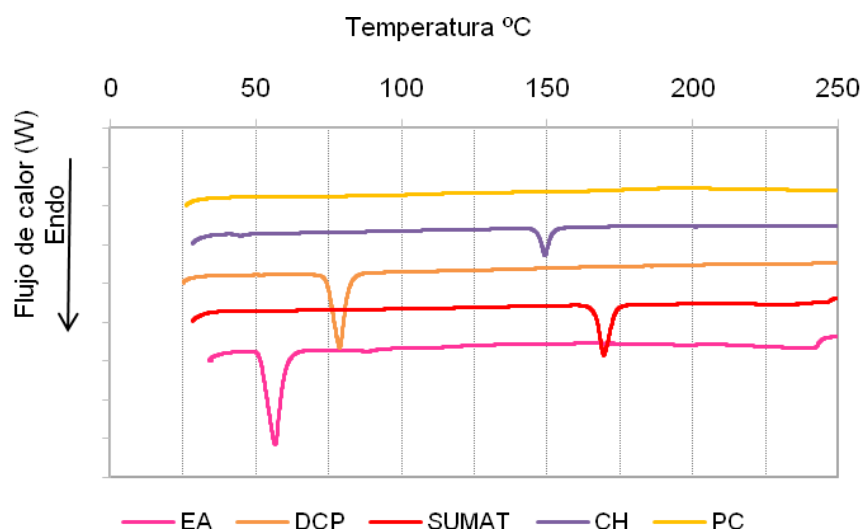


Figura 23. Termograma correspondiente al comportamiento térmico del fármaco (SUMAT) y de los lípidos formadores de película. Fosfatidilcolina (PC), colesterol (CH), dicetilfosfato (DCP), estearilamina (EA).

PARÁMETROS	SU	PC	EA	DCP	CH
Temperatura de inicio de pico (°C)	166.55	-	51.30	74.17	146.77
Temperatura de pico (°C)	169.69	-	56.72	78.90	149.41
Entalpía J/g	96.29	-	218.45	182.16	53.29
Efecto	Endot.	-	Endot.	Endot.	Endot.

Tabla 7. Parámetros obtenidos de los termogramas correspondiente a las muestras analizadas. SU: succinato de sumatriptán; PC: fosfatidilcolina; EA: estearilamina;

DCP: dicetilfosfato; CH: colesterol. Endot: efecto endotérmico.

Se pueden diferenciar dos tipos de comportamiento. Mientras que el sumatriptán, EA, DCP y CH, presentan un agudo efecto endotérmico que podemos asignar a su fusión, la PC no muestra ningún efecto térmico en el intervalo de temperaturas estudiado.

Los estudios mediante HSM de las muestras, nos permitieron confirmar que los agudos efectos endotérmicos registrados en los termogramas, se correspondían efectivamente con los procesos de fusión de las sustancias. En el caso de la PC, el examen termomicroscópico mostró que se trata de un producto semisólido que tras su calentamiento va sufriendo un proceso gradual de reblandecimiento y fluidificación. Se trata, sin duda, de un proceso de carácter endotérmico, pero dado que transcurre en un amplio intervalo de temperaturas, el intercambio energético producido en dicho proceso no es detectado por el equipo de DSC y por tanto, no se registra ningún efecto endotérmico en el termograma.

Con el fin de poner de manifiesto la interacción de los diferentes componentes, se realizaron los termogramas de las correspondientes mezclas físicas binarias con sumatriptán en proporciones 1:1 en peso. En esta ocasión encontramos tres tipos de comportamiento.

En primer lugar, las mezclas físicas con CH y DCP mostraron termogramas coincidentes con la superposición de los termogramas de los productos aislados, registrándose únicamente leves desplazamientos en las temperaturas de los picos, (figuras 24 y 25 respectivamente). Estos resultados se pueden interpretar como una ausencia de interacción entre los componentes.

En el caso de la mezcla física EA-SU (figura 26), el termograma mostró además de un leve desplazamiento de los picos, el desdoblamiento de la endoterma de fusión del fármaco y además, la aparición de un nuevo efecto endotérmico sobre los 115 °C, que no se registraba en los componentes aislados.

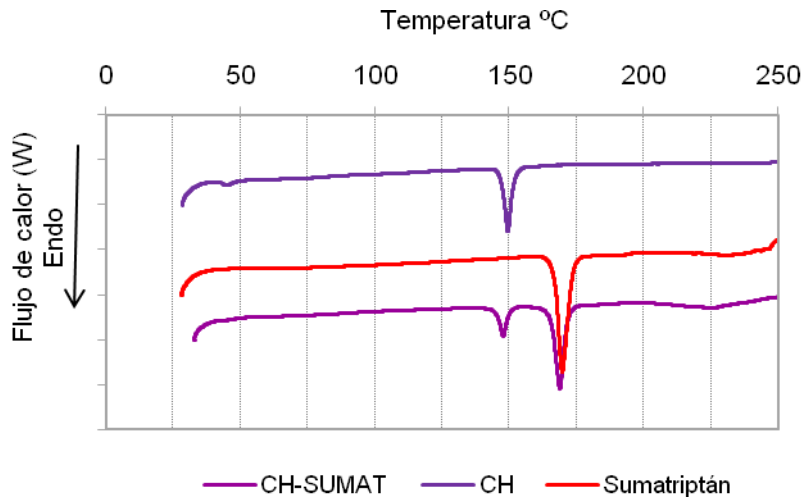


Figura 24. Termograma correspondiente al sumatriptán, colesterol (CH) y su mezcla física en proporciones 1:1 (CH/SUMAT).

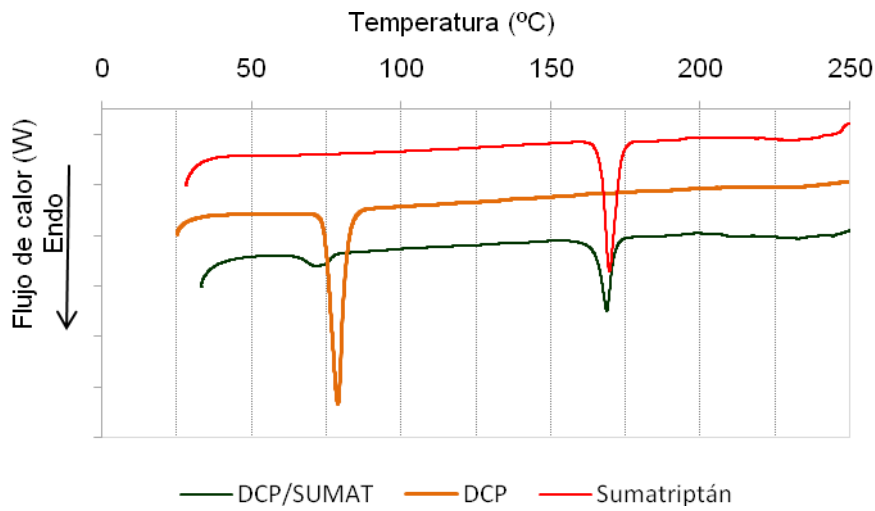


Figura 25. Termograma correspondiente al sumatriptán, Dicetilfosfato (DCP) y su mezcla física en proporciones 1:1 (DCP/SUMAT).

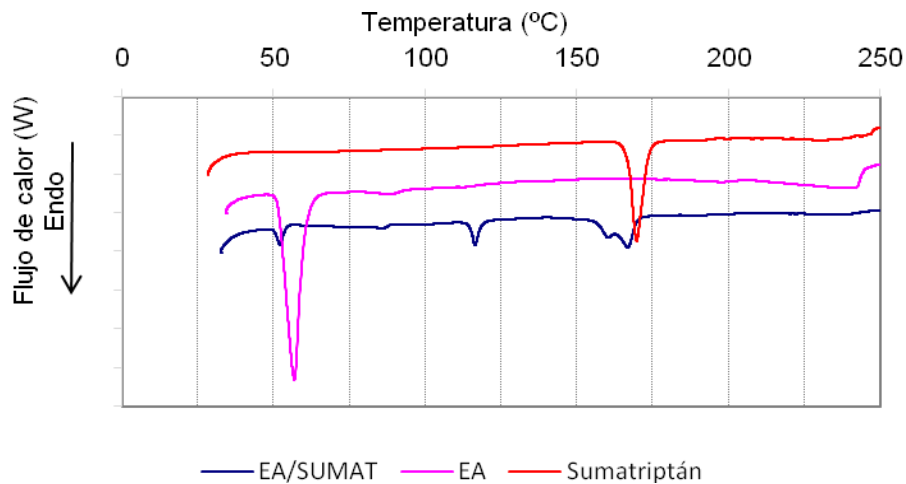


Figura 26. Termograma correspondiente al sumatriptán, estearilamina (EA), y su mezcla física en proporciones 1:1 (EA/SUMAT).

El estudio termomicroscópico de este sistema (figura 27) puso en evidencia que los tres efectos endotérmicos registrados en el termograma de la mezcla física EA-SUMAT se correspondían con procesos de fusión, y permiten explicar en cierta medida los resultados obtenidos por DSC. Así, la secuencia temporal del proceso de calentamiento nos llevaría inicialmente a la fusión del componente de menor punto de fusión, es decir, la EA (figura 27a); este efecto origina en el termograma el primer efecto endotérmico. A medida que continuamos el proceso de calentamiento, se produce una interacción entre el producto fundido y las partículas de sumatriptán en estado sólido. Esta interacción origina un segundo efecto de fusión sobre los 115°C, detectado visualmente (figura 27b) y que en el termograma aparece como un pico endotérmico. Por último, cabe esperar que alcanzada la temperatura de fusión del fármaco se produzca su proceso de fusión. Dado que en el medio existe una cierta cantidad de producto fundido, éste puede interactuar con el resto de sumatriptán, modificando en cierta medida su fusión y por tanto, originando un efecto endotérmico en el termograma con un doble pico.

Podemos concluir de este estudio térmico que entre el sumatriptán y el EA existe una interacción durante su proceso de calentamiento conjunto, que se debe tener en cuenta a la hora de la obtención de liposomas que incluyan en su composición EA.

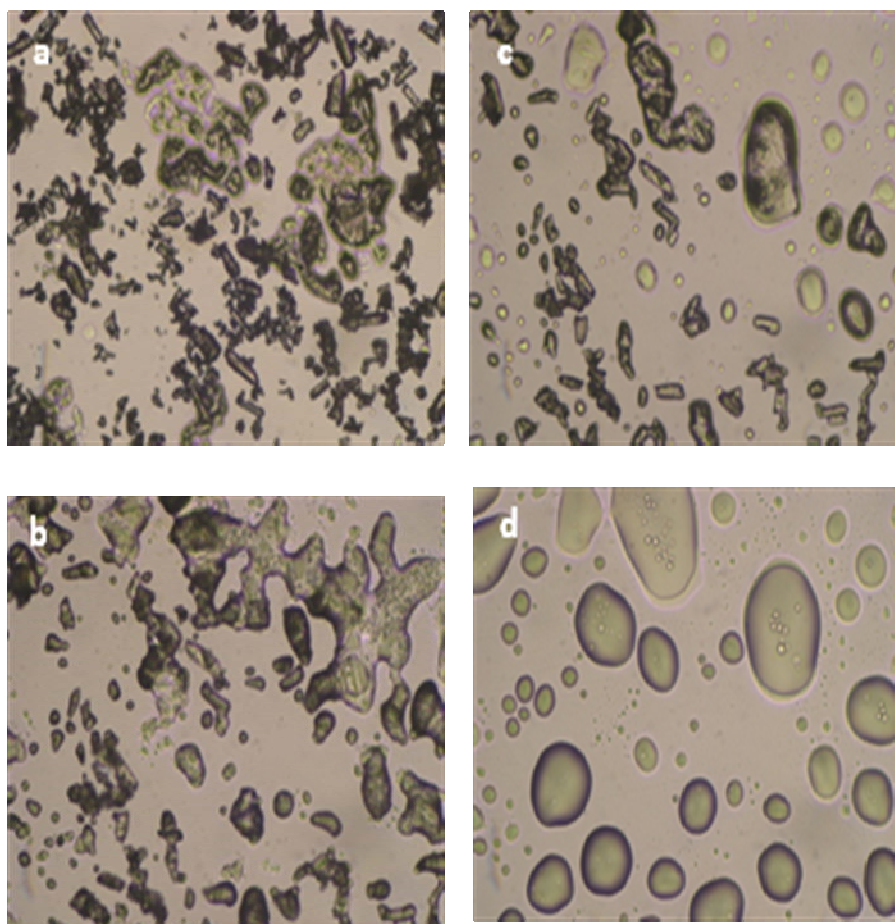


Figura 27. Secuencia de microfotografías obtenidas por HSM de la mezcla física EA/SUMAT: (a) 74 °C; (b) a 116 °C; (c) 163 °C; (d) 165 °C.

Por último y para finalizar, en el termograma de la mezcla física PC-SUMAT, no se registró ningún tipo de efecto térmico, es decir, el equipo no detectaba efecto de fusión alguno correspondiente al fármaco (figura 28).

El estudio por HSM justificó estos resultados. Así, en la figura 29 se recoge el comportamiento térmico de la mezcla física PC-SUMAT, donde se pone de manifiesto que la PC ejerce una interacción sobre el sumatriptán en estado sólido de tal forma que se produce una disolución gradual de las partículas de fármaco en la PC. Este proceso transcurre en un amplio intervalo de temperaturas de tal forma que cuando se alcanza la temperatura de fusión del fármaco a los 167 °C, no existen partículas sólidas de fármaco que puedan fundir y por tanto, en el termograma no se registra su endoterma de fusión. Este proceso de disolución transcurre como hemos dicho en un amplio intervalo de temperaturas y con un débil intercambio energético, por lo que no es registrado por el equipo de DSC. La propiedad de algunas sustancias de naturaleza anfipática para disolver partículas de principios activos, cuando ambos se encuentran formando un sistema de dispersión sólida ha sido demostrada en anteriores trabajos por nuestro grupo de investigación (Ginés y cols., 1993; Ginés y cols., 1995; Mura y cols., 1998).

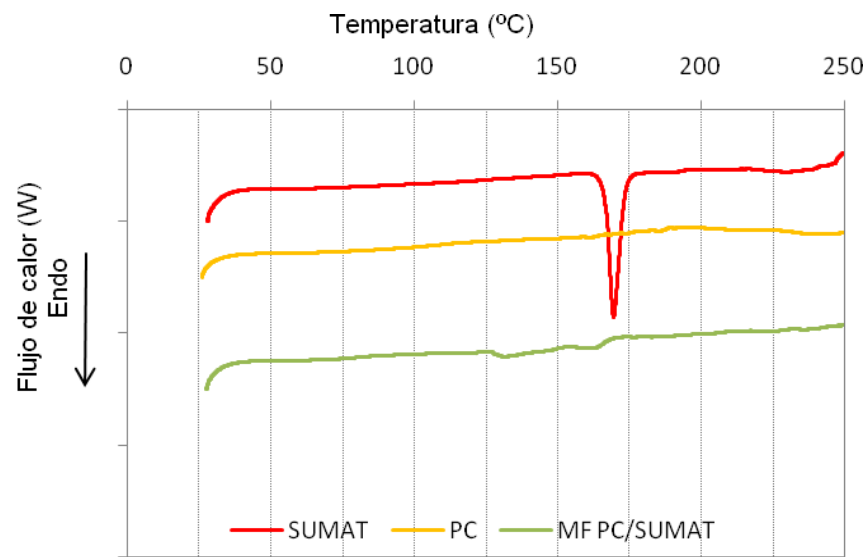


Figura 28. Termograma correspondiente a sumatriptán, fosfatidilcolina (PC) y a su mezcla física (1:1).

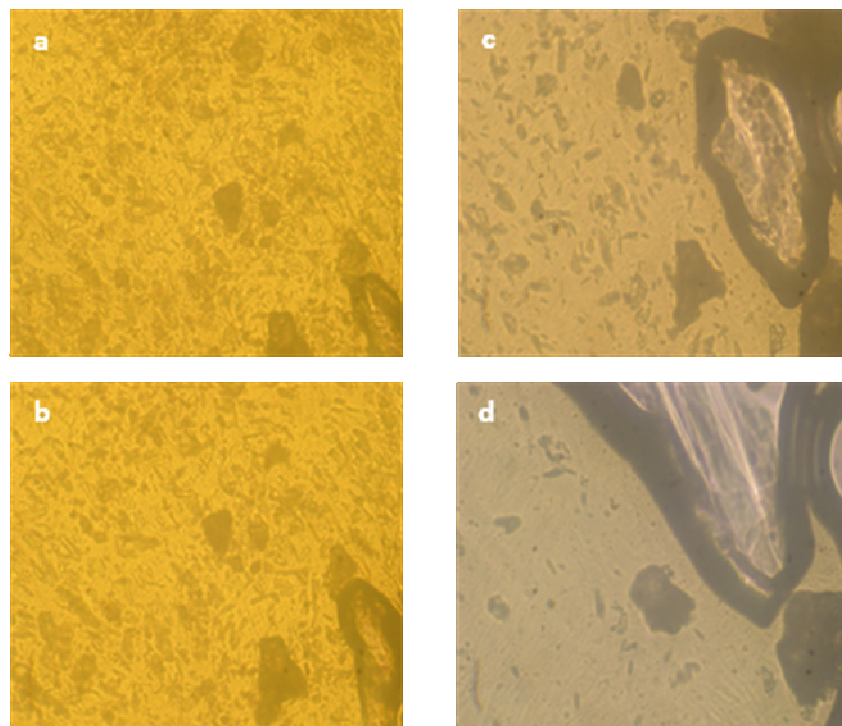


Figura 29. Secuencia de microfotografías por HSM de la mezcla física PC-SUMAT: (a) MF a 115 °C, (b) a 117°C, (c) a 126 °C, (d) a 135 °C.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES

La idea inicial del presente estudio fue elaborar liposomas neutros y liposomas con carga positiva y negativa de succinato de sumatriptán, para establecer comparaciones entre ellos y demostrar la influencia de la ionización del fármaco sobre su

encapsulación. Sin embargo, no fue posible la obtención de los liposomas sin carga. Este resultado podría justificarse en base a la interacción del sumatriptán con la PC, que afecta la integridad de la membrana lipídica. Este fenómeno provocaría una modificación en la fluidez de la bicapa, generando una alteración en el empaquetamiento de los lípidos, que impide la formación de las vesículas, como también han demostrado Socacin y cols. (2007).

Debido a lo anteriormente expuesto, los liposomas se han formulado adicionando agentes de carga, para proporcionar una mayor estabilidad a las vesículas (Manosroi y cols., 2002; Manosroi y cols., 2004). Así se obtuvieron liposomas de sumatriptán con carga positiva o negativa.

Una vez dilucidado el comportamiento térmico de los lípidos formadores de las vesículas y del fármaco en cuestión, se procedió a la caracterización de las formulaciones de liposomas, que han sido elaboradas por diferentes métodos y cuya composición se recoge en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos.

Los lotes obtenidos han sido evaluados en cuanto a eficacia de encapsulación, tamaño de las vesículas, índice de polidispersión y potencial zeta, cuyos resultados se registran en la tabla 8. Como puede apreciarse, todos estos resultados varían en función del método de elaboración así como del agente inductor de carga. A continuación se analizará de forma global dicha influencia sobre las diferentes respuestas.

3.3.1. Eficacia de encapsulación

El primer parámetro evaluado fue la capacidad de los liposomas para encapsular el fármaco, en función del agente portador de carga y de la técnica de elaboración. De forma global, se pudo observar que los liposomas cargados positivamente presentaron el mayor porcentaje de encapsulación, siendo más favorable para aquellos elaborados con el método REV y con la menor concentración del agente inductor de carga (tabla 8). Esta relación inversa entre la eficacia de atrapamiento y la concentración del agente inductor de carga puede explicarse en base a las repulsiones electrostáticas existentes entre las cargas positivas de sumatriptán ionizado y la EA a concentraciones superiores a 3.71 mM, equivalente a 10 mg del lípido. Como defienden algunos autores, ello puede deberse a que el aumento de las cargas positivas del lípido ocasiona una inclinación de la bicapa por interacción electrostática y un cambio en su empaquetamiento (Pavelic y cols., 2005; Sezer y cols., 2007). Así, se observa que a bajas concentraciones de EA, el empaquetamiento de la bicapa mantiene un cierto orden, lo cual facilita la encapsulación del sumatriptán, debido a que la cantidad de cargas es

Lotes	Tamaño (nm)	IP	Potencial zeta	EE (%)
L1TLE	408.6 ± 279.1	0.56 ± 0.01	35.40 ± 1.23	53.68 ± 9.09
L2TLE	311.4 ± 154.6	0.25 ± 0.09	26.26 ± 1.11	43.05 ± 1.19
L3TLE	348.7 ± 100.3	0.28 ± 0.24	37.90 ± 3.67	39.16 ± 3.53
L4TLE	812.4 ± 115.4	1.00 ± 0.00	-72.00 ± 0.90	12.83 ± 1.26
L5TLE	731.9 ± 15.3	1.00 ± 0.00	-61.30 ± 0.70	29.79 ± 7.25
L6TLE	635.9 ± 13.6	0.82 ± 0.103	-59.8 ± 0.90	41.87 ± 2.76
L7TLE	617.8 ± 29.9	0.63 ± 0.23	-68.40 ± 1.30	27.90 ± 0.62
L8TLE	549.2 ± 10.3	0.37 ± 0.09	-68.10 ± 0.40	32.54 ± 0.66
L1REV	313.5 ± 97.8	0.30 ± 0.15	24.42 ± 2.33	60.10 ± 5.55
L2REV	376.5 ± 160.7	0.18 ± 0.17	31.27 ± 0.35	56.67 ± 0.48
L3REV	603.7 ± 180.5	0.34 ± 0.31	33.24 ± 0.70	54.27 ± 10.33
L4REV	671.5 ± 3.20	0.80 ± 0.04	-70.10 ± 0.90	29.11 ± 3.14
L5REV	613.9 ± 19.7	0.70 ± 0.16	-67.30 ± 0.40	35.25 ± 2.36
L6REV	649.8 ± 6.18	0.95 ± 0.04	-73.00 ± 0.70	34.52 ± 2.50
L7REV	672.5 ± 13.1	1.00 ± 0.00	-77.60 ± 0.60	49.81 ± 1.34
L8REV	860.6 ± 54.7	1.00 ± 0.00	-78.50 ± 0.80	54.56 ± 1.88
L1FAT	360.0 ± 220.3	0.48 ± 0.12	46.30 ± 1.26	19.37 ± 5.64
L2FAT	351.1 ± 121.8	0.31 ± 0.15	40.70 ± 0.56	52.78 ± 4.31
L3FAT	317.1 ± 232.8	0.26 ± 0.14	56.70 ± 15.44	50.00 ± 3.53
L4FAT	531.8 ± 41.7	0.375 ± 0.13	-63.70 ± 0.70	35.29 ± 11.08
L5FAT	521.5 ± 19.7	0.37 ± 0.11	-63.00 ± 0.60	28.07 ± 10.69
L6FAT	599.0 ± 7.6	0.67 ± 0.09	-71.50 ± 0.80	37.57 ± 8.29
L7FAT	445.1 ± 23.0	0.19 ± 0.05	-68.70 ± 0.80	29.14 ± 2.39
L8FAT	505.1 ± 17.6	0.26 ± 0.05	-67.80 ± 0.70	29.66 ± 0.69

Tabla 8. Valores medios de EE (eficacia de encapsulación), tamaño vesicular, IP (índice de polidispersión) y potencial zeta de los lotes elaborados. La composición lipídica de los lotes L1 a L8, se encuentra descrita en la tabla 1 del apartado 2.4 de Materiales y Métodos.

baja (figura 30A), mientras que un aumento en la cantidad del lípido cargado, como indican Mohammed y cols. (2004), ocasiona una repulsión entre las cabezas polares cargadas en la bicapa, lo cual conlleva a que se incline o se dirija hacia un lado, mientras que las colas hidrocarbonadas de los lípidos se mantienen unidas por las fuerzas de van der Waals, lo que minimiza el cambio en el empaquetamiento de la bicapa (figura 30B), permitiendo la incorporación de sumatriptán, pero en menor proporción.

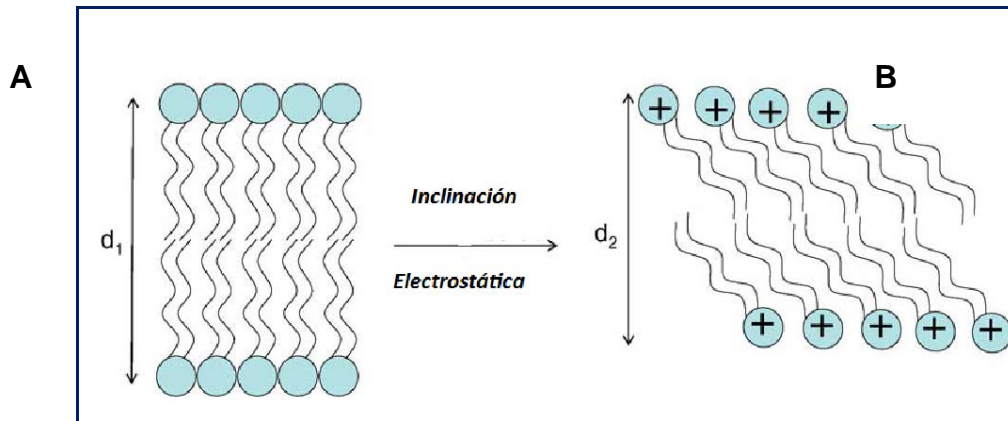


Figura 30. Representación esquemática de la inclinación de la bicapa inducida electrostáticamente en presencia de cabezas de grupo cargadas (Mohammed y cols., 2004).

Por el contrario, la menor eficacia de encapsulación se ha observado en los liposomas con carga negativa, siendo los valores más bajos para la menor concentración de DCP. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que sumatriptán, a pH 5.5, se encuentra parcialmente protonado, ocurriendo una atracción electrostática entre el fármaco y el DCP. Así, cuanto más elevada sea la concentración de DCP, mayor eficacia de encapsulación se consigue. Sin embargo, los liposomas con carga negativa han presentado eficacias más bajas que los liposomas cargados positivamente. Esto ocurre porque la retención del sumatriptán depende directamente de su ionización, si bien es cierto que también existe una afinidad entre éste y la bicapa fosfolipídica, produciéndose interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, con las colas de los lípidos, que contribuyen a su encapsulación; ya en otros estudios se ha señalado la posibilidad de coexistencia de ambos tipos de interacciones (Law y cols., 2001).

Con el fin de confirmar estos resultados y analizar la influencia del agente inductor de carga sobre la EE del sumatriptán, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), que mostró diferencias significativas para todos los pares ($p < 0.05$). Este incremento en la EE de los liposomas con carga positiva ocurre porque la EA puede afectar características específicas en la membrana bicapa como su permeabilidad, densidad de carga eléctrica (Kotynska y Figaszewsky, 2007), y empaquetamiento, como se mencionó previamente. Por otro lado, el ANOVA reveló que no existen diferencias significativas en el porcentaje de encapsulación del fármaco, con respecto a la concentración del agente inductor de carga ($F: 0.76$; $p: 0.56$).

En lo que respecta al método de elaboración, el método REV fue el que presentó los porcentajes más altos de encapsulación, tanto para los liposomas con carga positiva como para los cargados negativamente. Este hecho está directamente relacionado con su estructura unilaminar, ya que se ha establecido previamente que los liposomas unilaminares poseen un único espacio acuoso, lo cual favorece la encapsulación, especialmente de sustancias hidrosolubles (Taylor y cols., 1990), como ocurre con succinato de sumatriptán.

En cambio, las técnicas TLE y FAT se caracterizan por la formación de vesículas multilaminares (MLV) con un volumen de encapsulación limitado (Lasic y cols., 1998;

Abraham y cols., 2005). A pesar de ello, el ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto al método de elaboración (F: 2.56; p : 0.10).

Para confirmar el tipo de estructura presente en estos liposomas, se ha llevado a cabo un estudio utilizando la microscopía confocal y analizando liposomas marcados con rodamina, marcador que tiene especial afinidad por los lípidos, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.5.3.2 de Materiales y Métodos. En la figura 31 se recoge una microfotografía de liposomas positivos y negativos REV 50 : 40: 10 (PC : CH : EA o DCP). Las imágenes nos muestran liposomas LUV (*Large Unilamellar Vesicles*), con el marcador localizado fundamentalmente en la bicapa. Este clase de liposomas presentan muy buena eficacia de encapsulación por sí mismos (Mathews y Van Holde, 1998), como se observa en la tabla 8. En el caso de los liposomas negativos se aprecia, por una parte, el aumento de tamaño de las vesículas (el valor de las medias es prácticamente el doble), además de la presencia de una gran cantidad de aglomerados, que pueden desestabilizar al sistema, afectando así la eficacia de encapsulación del fármaco.

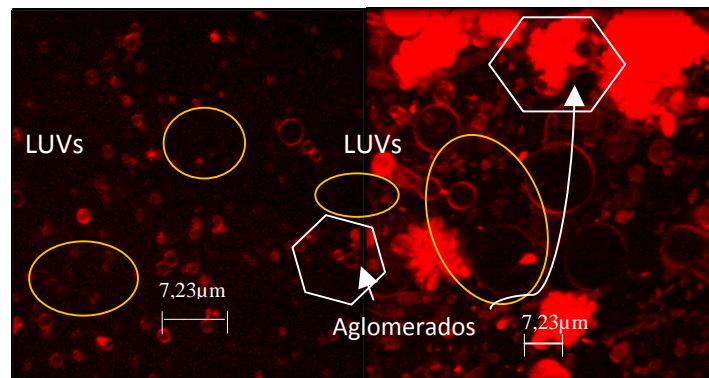


Figura 31. Imagen obtenida por fluorescencia en el microscopio confocal. Izquierda: formulación: REV 50:40:10EA utilizando como marcador fluorescente rodamina. Puede apreciarse el halo del colorante en la bicapa, lo que indica que se trata de LUV. Derecha: formulación: REV 50:40:10DCP, donde se puede apreciar, además del halo del colorante en la bicapa, la presencia de una gran cantidad de aglomerados.

Además de aplicar la microscopía confocal para verificar la morfología de los liposomas obtenidos, en este trabajo se ha utilizado la **resonancia magnética nuclear de fósforo 31** (^{31}P – NMR), con la idea de profundizar en la estructura de estos liposomas y tratar de establecer la conformación que presentan los lípidos en la membrana del liposoma, la cual, a su vez, puede influir directamente sobre los resultados obtenidos.

Parece que sumatriptán proporciona estabilidad al sistema en los liposomas REV positivos, lo cual puede apreciarse al comparar los espectros de los liposomas placebo y de los liposomas con sumatriptán.

Así, en los espectros obtenidos de estos liposomas (L1), observamos que en el lote blanco (Figura 32B) aparecen dos señales bien definidas: el primer pico a la izquierda muestra claramente una señal isotrópica a σ -0.77 ppm; el pico de la derecha se

corresponde con una señal anisotrópica a σ -16.99 ppm (tabla 9), propia de la conformación de bicapa, de acuerdo con Sulkowski y cols. (2005).

En cuanto a la señal isotrópica, ésta puede corresponder a la presencia de una fase cúbica o micelar (Fenske y cols., 1995; Nieva y cols., 1995; Lewis y Mc Elhaney, 2000) o a la existencia de aglomerados (Cullis y de Kruijff, 1979). El espectro realizado a 65 °C muestra las mismas señales que a 30 °C, solamente que más pronunciadas, como era de esperar (Gutiérrez y cols., 2003). En cuanto al valor de cambio químico de ambos picos, se mantiene sin variación, con lo cual se puede afirmar que no hay modificaciones conformacionales del sistema a causa del aumento de la temperatura.

Por otra parte, el espectro de los liposomas REV neutros sin sumatriptán presenta una conformación de bicapa (figura 32A), por lo que se sospecha que la presencia de dos señales en el espectro de los liposomas con carga positiva, estará causada por la estearilamina, único componente que diferencia a las formulaciones neutras de las positivas. Previamente se ha observado que en sistemas liposomales con determinadas concentraciones de EA, se produce la aparición de una señal isotrópica (López-García y cols., 1993). Diversos autores han publicado como resultado de sus investigaciones la tendencia de los liposomas compuestos por PC a adoptar la conformación de bicapa (Cullis y de Kruijff, 1979; Hope y cols., 1986). Por otra parte, el colesterol también forma parte de la membrana del liposoma, pero en este caso no afecta la conformación de bicapa, aunque se ha observado que este lípido favorece la aparición de la fase hexagonal. Sin embargo, hay estudios que defienden la presencia de bicapa en sistemas de PC y CH (Cullis y de Kruijff, 1979).

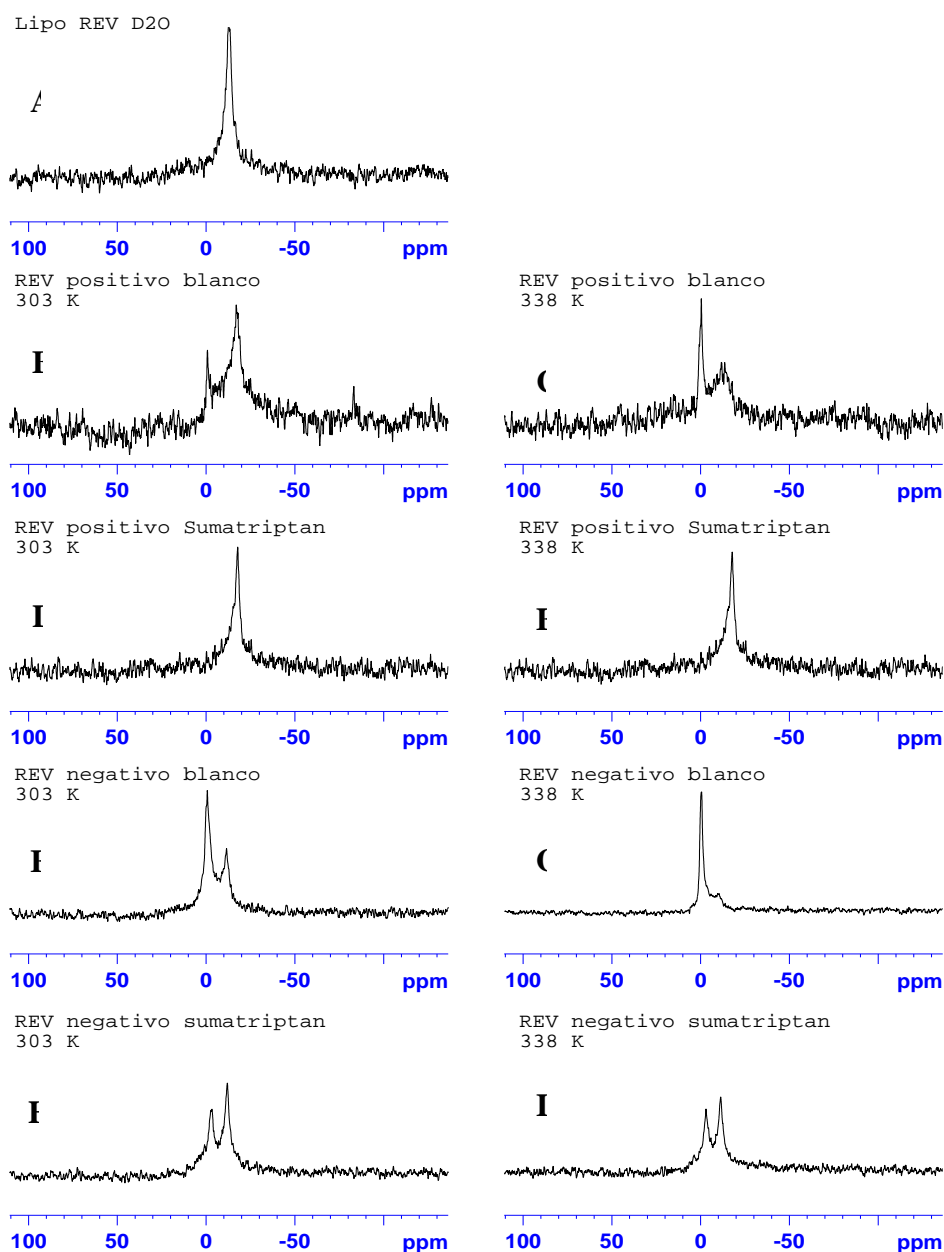


Figura 32. Espectros obtenidos por ^{31}P -NMR de los liposomas preparados con el método REV. Panel de la izquierda con temperatura de 303 °K (30 °C) y panel de la derecha 338 °K (65 °C). A: REV neutro blanco; B y C: REV positivo blanco; D y E: REV positivo sumatriptán; F y G: REV negativo blanco; H e I: REV negativo sumatriptán.

MUESTRA	CÓDIGO	TEMPERATURA (°C)	σ_1 (ppm)	σ_2 (ppm)
REV neutro	A	30	-12.65	
REV positivo blanco	B	30	-0.77	-16.99
REV positivo blanco	C	65	-0.77	-16.99
REV positivo sumatriptán	D	30	-17.79	
REV positivo sumatriptán	E	65	-17.79	
REV negativo blanco	F	30	-0.69	-11.52
REV negativo blanco	G	65	-0.56	-9.66
REV negativo sumatriptán	H	30	-3.29	-11.97
REV negativo sumatriptán	I	65	-3.03	-11.31

Tabla 9. Valores del cambio químico isotrópico o anisotrópico medidos por ^{31}P -NMR, para las muestras de liposomas preparados por el método REV lote L1 y lote L4 (Composición en tabla 1, apartado 2.4 de Materiales y Métodos). Los valores de sigma se corresponden con el orden de aparición de la señal de izquierda a derecha. Sólo se muestran los valores sigmas de las señales más importantes.

Al añadir el succinato de sumatriptán, se ha producido un cambio en la dinámica de la membrana, pues se observa un único pico cuya forma de línea se corresponde a la conformación lamelar o de bicapa (figura 32D). Además, el pico es más estrecho, lo que sugiere que los lípidos se encuentran en fase líquido-cristalina, donde el movimiento de la cabeza del grupo fosfato es rápido y simétrico, cerca del eje de reorientación, es decir, representa la conformación de bicapa ideal (Lewis y Mc Elhaney, 2000; Cieslik – Boczula y Koll, 2009). Analizando el valor de σ del pico correspondiente a la conformación de bicapa en los liposomas blancos, a partir de la tabla 9 y comparándolo con el pico del espectro de los liposomas con sumatriptán, siendo -16.99 ppm y -17.79 ppm, respectivamente, se podría afirmar que el sumatriptán está interactuando con la membrana y ha causado la desaparición de la señal isotrópica, por lo que se localiza repartido entre la membrana y el compartimiento acuoso del liposoma, en el cual se encuentra mayoritariamente, pues la señal de bicapa procede de un único pico bien definido (Witoonsaridslip y cols., 2010). Este resultado no es tan sorprendente, ya que su carácter anfipático hace que tenga afinidad por los lípidos de la bicapa. En los espectros obtenidos al aumentar la temperatura a 65 °C no se observan cambios, ni en la forma de la línea ni en los valores del cambio químico del pico.

En los liposomas REV negativos blancos (figura 32F) también se observa la coexistencia de fases, como en los positivos blancos, con las señales isotrópica y de conformación de bicapa (Sulkowski y cols., 2005). Sin embargo, al aumentar la temperatura, se aprecia la casi total desaparición del pico de la derecha correspondiente a la conformación en bicapa (figura 29G), probablemente debido a que esta señal era generada por fosfatidilcolina libre, que favorece la conformación en bicapa (Hope y cols., 1986) y que se ha degradado al exceder su temperatura de fusión (T_m). La señal isotrópica se hace más pronunciada, debido a que la elevación de la temperatura conlleva al aumento en la fluidez de la bicapa (Lewis y Mc Elhaney, 2000; Kleinschmidt y Tamm, 2002).

Por otra parte, los liposomas REV negativos con sumatriptán, a 30 °C, muestran en el espectro una forma de línea con dos señales (figura 32H): el primer pico, y de acuerdo con otros autores, corresponde a una conformación hexagonal H_{II} (Fenske y cols., 1995); en cambio al observar el segundo pico se encuentra una forma de línea relativa a un comportamiento anisotrópico de bicapa, que es similar al encontrado en los liposomas blancos. Comparando los espectros obtenidos con los liposomas blancos y con sumatriptán a 30 °C, lo más notable es el cambio conformacional de isotrópico a hexagonal H_{II} . En este caso, y al observar la figura 28, podemos notar cómo existen restos lipídicos y aglomerados en el sistema, que pueden ser los causantes de cambio de la señal isotrópica a H_{II} , debido al colesterol libre que tiende a adoptar esta conformación, o al DCP. Por otro lado, el sumatriptán podría haber interactuado con la membrana para provocar el cambio de señal isotrópica a hexagonal. Estos cambios conformacionales ya han sido observados, y son provocados por especies lipídicas en conformación isotrópica, pero con tendencia a conformación de bicapa y hexagonal,

que aparecen al interactuar con determinados compuestos, como defienden en sus trabajos Gutiérrez y cols. (2003), por lo que se puede establecer su ubicación entre la membrana y el compartimiento acuoso del liposoma, explicándose por la señal anisotrópica o de bicapa (Witoonsaridslip y cols., 2010). Con el incremento de la temperatura (65 °C), no se aprecian diferencias significativas en la forma del espectro ni en el cambio químico, por lo que no hay modificación conformacional evidente. Quizás, la interacción electrostática existente entre el grupo positivo del sumatriptán y el negativo del DCP, hasta cierto punto favorezca su integración en el liposoma, pero en detrimento de la estabilidad estructural del sistema, lo cual explicaría la menor EE en este tipo de liposoma con respecto al que posee carga positiva, aunque inicialmente se pudo pensar lo contrario, pues la presencia de las cargas positivas de sumatriptán y la estearilamina se supone que alterarían al sistema por su efecto repulsivo. Según los resultados del espectro, al ubicarse el fármaco mayoritariamente en el compartimiento acuoso de los liposomas, la repulsión electrostática no afectará en gran medida a la estabilidad del sistema.

A continuación, se discutió acerca de la influencia del método de preparación de los liposomas sobre la encapsulación del fármaco. En primer lugar, y como se demuestra por confocalidad, se observan diferencias entre los tres tipos de formulaciones (TLE, REV y FAT). En la figura 33 se recoge una imagen de los liposomas con carga positiva preparados por el método TLE y usando como proporción lipídica 50:40:10 (PC:CH:EA). En este caso, se aprecia cómo la rodamina (afín por los lípidos) ha coloreado toda la estructura, lo que indica su conformación multilaminar (MLV), acorde con los resultados obtenidos por otros autores (Lasic y cols., 1998; Koynova y cols., 2007). Respecto a los liposomas negativos (figura 34), se observa el mismo efecto que en el caso de los REV, es decir, con la presencia de una gran cantidad de aglomerados y puntos coloreados que podrían tratarse de lípidos libres.

El estudio de ^{31}P – NMR también se ha aplicado a los liposomas obtenidos por TLE, con el fin de esclarecer posibles cambios conformacionales en la estructura vesicular. En primer lugar, los liposomas neutros y sin sumatriptán muestran, como cabría esperar, conformación de bicapa (figura 35A), debida principalmente a la PC, como se mencionó anteriormente.

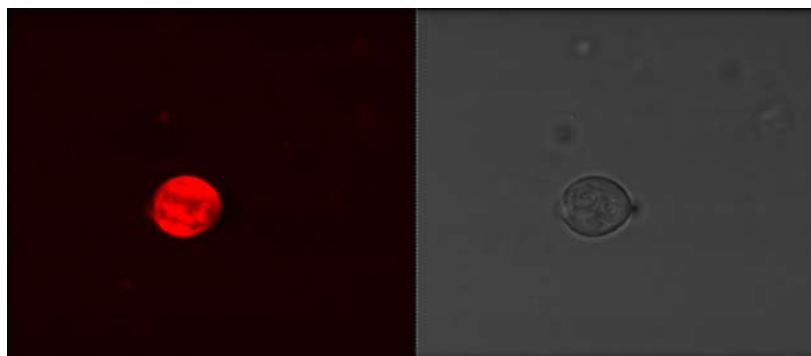


Figura 33. Imagen obtenida por fluorescencia (izquierda) y por transmisión (derecha) en el microscopio confocal. Formulación: TLE 50:40:10 EA utilizando como marcador fluorescente rodamina.

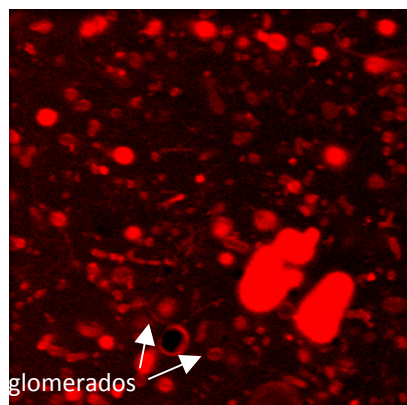


Figura 34. Imagen obtenida por fluorescencia en el microscopio confocal. Formulación: TLE 50:40:10 DCP sin sumatriptán, utilizando como marcador fluorescente rodamina.

En cuanto a los liposomas con carga positiva obtenidos por el método TLE, a 30 °C y sin sumatriptán (figura 35C), se presenta una forma de línea característica de la conformación lamelar o de bicapa con un hombro de campo bajo y un pico de campo alto (Cullis y de Kruijff, 1979). Sobre el pico, y en su lado izquierdo, aparecen tres señales muy pequeñas, que se deben a la coexistencia de fases. Una de ellas parece corresponder a una fase hexagonal H_{II} y las dos restantes a una conformación de bicapa, provenientes de otro ambiente químico, lo que puede deberse a la composición lipídica, ya que la presencia de mezclas lipídicas, por ejemplo lípidos catiónicos con lípidos neutros o sin carga, resulta en la coexistencia de fases que puede hacerse más evidente con el incremento de la temperatura (López-García y cols., 1993; Fenske y cols., 1995; Lewis y Mc Elhaney, 2000). Las señales generadas por la coexistencia de fases se deben a que dos grupos de átomos de fósforo de la PC, están siendo afectados de diferente manera, lo cual ocasiona variaciones en su densidad electrónica, causando la modificación del espectro. Así, puede ocurrir que los átomos de fósforo que se encuentran localizados de cara al compartimiento acuoso del liposoma y aquellos que se encuentran en la superficie del mismo, sean influenciados por la EA de diferente manera; otra causa podría ser que la EA genere una pequeña transformación de fase en la bicapa ocurriendo una transición de liposomas a micelas, causando la aparición de las distintas señales en el espectro; este fenómeno ha sido observado en moléculas como el diclofenac (Lopes y cols., 2004). Al aumentar la temperatura a 65 °C, se observa que los picos pequeños se hacen más pronunciados, como era de esperar y, además, el espectro se estrecha como consecuencia del incremento de la movilidad del grupo fosfato del lípido (Gutiérrez y cols., 2003).

La presencia de sumatriptán parece estabilizar al sistema (figura 35E), como ocurrió con los liposomas positivos REV, pues en el espectro se observa cómo desaparecen los pequeños picos presentes en el espectro de los liposomas blancos, originando únicamente la conformación de bicapa con un pico estrecho, que proporciona estabilidad, como ya se ha descrito anteriormente (Lewis y Mc Elhaney, 2000; Cieslik – Boczula y Koll, 2009). En cuanto a la temperatura, se observa que la forma de línea del espectro es prácticamente igual a 30 °C y a 65 °C, produciéndose únicamente un estrechamiento del espectro a 65 °C.

Se puede decir, al comparar con los liposomas blancos, que sumatriptán interactúa quizás con aquellos lípidos responsables de las pequeñas señales causantes de la coexistencia de fases, lo que se evidencia por las diferencias en el valor del cambio químico σ , que pasa de -16.42 ppm en los blancos a -17.81 ppm a 30 °C en los liposomas con sumatriptán y cuyo comportamiento se mantiene al aumentar la temperatura a 65 °C (-15.24 ppm para los blancos y -16.84 ppm para los que llevan sumatriptán), como se recoge en la tabla 10. Aunque no es una variación muy grande, es indicativa de la presencia del fármaco en la membrana, por lo que se podría decir que el sumatriptán se encuentra ubicado, al igual que ocurriera en los REV positivos, en esta región (Witoonsaridslip y cols., 2010). A diferencia de éstos, al ser los liposomas multilaminares, el contacto del fármaco con la bicapa es mayor, pues éste estaría repartido en los diferentes espacios acuosos que conforman este tipo de estructura. Esta sería la razón de su menor EE con respecto a los liposomas positivos preparados con el método REV.

MUESTRA	CÓDIGO	TEMPERATURA (°C)	σ_1 (ppm)	σ_2 (ppm)	σ_3 (ppm)
TLE neutro	A	30	-12.71		
TLE neutro	B	65	-12.14		
TLE positivo blanco	C	30	-16.42	ND	ND
TLE positivo blanco	D	65	-15.24	ND	ND
TLE positivo sumatriptán	E	30	-17.81		
TLE positivo sumatriptán	F	65	-16.84		
TLE negativo blanco	G	30	0	-2.53	-11.34
TLE negativo blanco	H	65	0.36	-2.53	-11.34
TLE negativo sumatriptán	I	30	0	-2.67	-11.51
TLE negativo sumatriptán	J	65		-2.73	-11.08

Tabla 10. Valores del cambio químico isotrópico o anisotrópico medidos por ^{31}P -NMR, para las muestras de liposomas preparados por el método TLE L1 y L4 (composición en tabla 1, apartado 2.4 de Materiales y Métodos).

Los valores de sigma se corresponden con el orden de aparición de la señal de izquierda a derecha. Sólo se muestran los valores de las señales más importantes.

Al modificar la carga de los liposomas TLE sin sumatriptán a 30 °C, la forma de línea se presenta como una superposición de componentes con varios picos (Lewis y McElhaney, 2000), como se muestra en la figura 35G. El espectro es indicativo de la presencia de tres fases, dos de las cuales resultan de la superposición de dos señales diferentes en el pico más bajo y que se corresponden con una fase isotrópica a 0 ppm causada por la presencia de aglomerados, que han sido observados en la microfotografía obtenida por microscopía confocal (figura 34) (Cullis y de Kruijff, 1979), siendo la otra señal propia de una fase hexagonal a -2.53 ppm. En el pico más alto a la derecha, se observa la conformación de bicapa con un σ de -11.34 ppm. A 65 °C se presenta un aumento de las señales isotrópica y hexagonal en detrimento de la conformación de bicapa (Lewis y Mc Elhaney, 2000; Kleinschmidt y Tamm, 2002). En lo referente a los liposomas negativos cargados con sumatriptán (figura 35I), el espectro presenta ligeros cambios con respecto a los liposomas blancos. También tiene lugar la superposición de picos, con una señal isotrópica más pronunciada a 0 ppm en el pico de campo bajo, y se mantiene la señal de la conformación de bicapa en el pico de campo alto. Los valores del cambio químico σ a 30 °C de la señal para bicapa son de -11.34 ppm para los blancos y de -11.51 ppm para los que tienen

1. El análisis térmico realizado a los componentes de los liposomas denota la existencia de una interacción entre sumatriptán y fosfatidilcolina, ya que el fármaco se disuelve en el fosfolípido fundido a una temperatura inferior a 40 °C. Dicha interacción ha imposibilitado la encapsulación del fármaco en liposomas formulados sin adicionar agentes inductores de carga, como estearilamina y dihexadecilfosfato.
2. En cuanto a la eficacia de encapsulación del fármaco, los mejores resultados se obtuvieron al elaborar los liposomas con carga positiva, utilizando el método REV y con la menor concentración del agente inductor de carga, estearilamina. El agente inductor de la carga en las vesículas fue el único factor que mostró diferencias estadísticamente significativas en la respuesta evaluada.
3. El análisis cualitativo de los espectros obtenidos por ³¹P-NMR de las formulaciones TLE y REV, tanto con carga positiva como negativa, permite afirmar que los liposomas que contienen estearilamina como agente inductor de carga resultan más estables. Esta estabilidad se ve incrementada con la presencia del fármaco en la formulación, ya que es capaz de interactuar positivamente con los lípidos de la bicapa, quedando así establecida su ubicación tanto en el compartimento acuoso como en la bicapa del liposoma.
4. En cuanto al potencial zeta de los liposomas con carga positiva, se ha encontrado que tanto el método de elaboración como la presencia del fármaco son las variables que influyen significativamente sobre este parámetro, presentando los REV un potencial zeta en torno a 30 mV, lo cual se traduce en una mayor estabilidad del sistema.
5. El método de elaboración empleado y la estructura del liposoma no influyen sobre la liberación del fármaco, lo cual se evidencia por la superposición de las curvas obtenidas en los correspondientes perfiles. Asimismo, la difusión es el mecanismo principal de liberación del sumatriptán desde el interior del liposoma.
6. Los liposomas REV y TLE cargados positivamente constituyen una formulación interesante para la aplicación tópica del sumatriptán, lo cual se evidencia por los resultados obtenidos en los estudios de permeación "in vitro" de dichas formulaciones. La propiedad como mejoradores de permeación de los liposomas queda demostrada al

comparar los porcentajes de permeación de la solución de sumatriptán con las formulaciones liposomales.

7. Las micropartículas y LEMs elaboradas por el método de gelificación iónica utilizando alginato como polímero matricial y quitosano como polímero de recubrimiento, añadido al final del proceso de fabricación, resultaron ser formulaciones adecuadas para encapsular el succinato de sumatriptán y los liposomas conteniendo dicho fármaco, lo que ha sido demostrado en base a los resultados correspondientes a tamaño de partícula, índice de polidispersión y eficacia de encapsulación.

8. Respecto a los estudios de permeación de los liposomas microencapsulados, hay que destacar que la utilización de cloruro de sodio como solución iónica desestabilizadora de la estructura matricial de la micropartícula ha permitido mejorar notablemente la permeación del succinato de sumatriptán a través de membrana artificial. Además, la propiedad bioadhesiva de quitosano y la presencia de fosfatidilcolina en las formulaciones de LEMs, han influido positivamente en los resultados de permeación obtenidos.

9. La elaboración de micromatrices de alginato ha resultado ser el proceso más apropiado para encapsular liposomas del fármaco, ya que con estas formulaciones se ha preservado la integridad de la vesícula, aportando una mayor estabilidad y eficacias de atrapamiento del fármaco.