

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO GALENICO DE UN GEL DE
ALFA-TOCOFEROL Y SU ACCION EN
PATOLOGIAS DEGENERATIVAS

Memoria presentada por Da Josefina
Vigo Baturone para optar al grado de
Licenciada en Farmacia. Sevilla 1990.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

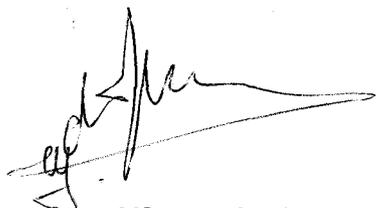
Memoria presentada por
D^a Josefina Vigo Baturone para optar
al grado de Licenciada en Farmacia



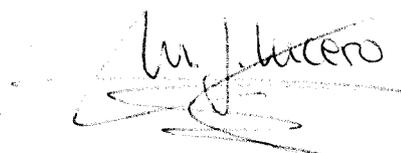
Fdo.: Josefina Vigo Baturone

V^o B^o

Los Directores de la Tesis de Licenciatura



Prof^a. M^a J. León Wasmer



Prof^a. M^a J. Lucero Muñoz



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

CATEDRA DE FARMACIA GALENICA

Núcleo Universitario de REINA MERCEDES

c/. Sor Gregoria de Santa Teresa, s/n.

Teléfono (95) 462 74 00

41012-SEVILLA

ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Farmacia y -- Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la Tesis de Licenciatura elaborada por la Lcda. en Farmacia D^a Josefina - Vigo Baturone ha sido dirigida por las Profas. Dras. León Wasmer y Lucero Muñoz, habiéndose realizado en la Cátedra de Farmacia Galénica de este Departamento cumpliendo con todas las normativas vigentes.

Para que conste y surta los efectos -- oportunos firma el presente en Sevilla, a veinticinco de Octubre de mil novecientos noventa.



À MIS PADRES Y HERMANOS.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las Dras. M.J. León y M.J. Lucero por permitirme realizar este trabajo - bajo su dirección, por sus enseñanzas, estímulo, dedicación y paciencia.

A los Doctores F. Martín y M. Balón por el asesoramiento técnico en algunos aspectos experimentales.

A mi compañero Angel Muñoz por su especial ayuda y amistad.

En general a todos mis compañeros de Departamento por la estimable ayuda que me brindaron en todo momento.

A todos los que de una forma u otra me asesoraron durante la elaboración de este trabajo.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS MAS USADOS

A.A.	Acido Ascórbico
A.D.H.A.	Acido dehidroascórbico
A.M.D.H.A.	Acido monodehidroascórbico
α -T	α -Tocoferol
DOX	Doxorubicina
E.A.P.	Etanol absoluto purísimo
p.a.	Principio activo
T.E.A.	Trietanolamina
Excip. A	Gel de Carbopol 940 (R)
Excip. B	Gel de Carbopol y ácido ascórbico
Prepa. 1	α -Tocoferol en Excip. A
Prepa. 2	α -Tocoferol en Excip. B
H.P.L.C.	Cromatógrafo Líquido-líquido de alta precisión
K	Indice de consistencia
n	Indice de flujo
r.p.m.	Revoluciones por minuto
μ	Viscosidad
$\dot{\gamma}$	Velocidad de cizalla
τ	Tensión de empuje
ν	Viscosidad cinemática
A	Absorbancia
ξ	Coefficiente de extinción molar
l	Espesor de la cubeta
[]	Concentración
K_1	Constante de velocidad, 1ª reacción de degradación
K_2	Constante de velocidad, 2ª reacción de degradación

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
1.1.- REOLOGIA	2
1.1.1.- <u>Técnicas para mediciones reológicas</u>	14
1.1.1.1.- Viscosímetros rotatorios	15
1.1.1.2.- Representación gráfica de datos reológicos	20
1.1.1.2.1.- Curvas de fluidez	20
1.1.1.2.2.- Curvas de viscosidad	20
1.2.- ESTADOS DEGENERATIVOS	22
1.2.1.- <u>Antecedentes históricos</u>	22
1.2.2.- <u>Reactividad de los radicales libres</u>	25
1.2.3.- <u>Evolución de los radicales libres</u>	26
1.2.4.- <u>Mecanismos de control y protección de las células</u>	27
1.2.4.1.- Mecanismos enzimáticos	27
1.2.4.2.- Mecanismos hidrofóbicos	28
1.2.4.3.- Mecanismos hidrofílicos	29
1.2.4.4.- Mecanismos estructurales	29
1.2.5.- <u>Métodos de destrucción oxidativos del tejido</u>	29
1.2.5.1.- Radical anión superóxido	30
1.2.5.2.- Peróxido de hidrógeno	31
1.2.5.3.- Radical hidroxilo	32
1.2.6.- Daños inducidos por radicales libres	32

<u>OBJETIVOS</u>	36
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	39
3.1.- PRINCIPIOS ACTIVOS	40
3.1.1.- <u>α-tocoferol</u>	40
3.1.1.1.- Características generales	40
3.1.1.2.- Actividad biológica	45
3.1.2.- <u>Promotores de radicales libres.</u>	
<u>Antraciclinas</u>	51
3.1.2.1.- Características químicas	52
3.1.2.2.- Mecanismo de acción	53
3.1.2.3.- Características farmacocinéticas	54
3.1.2.4.- Aplicaciones terapéuticas	55
3.1.2.5.- Reacciones adversas	55
3.2.- EXCIPIENTES	57
3.2.1.- <u>Resinas acrílicas. Carbopol[®]</u>	57
3.2.1.1.- Características físico-químicas	57
3.2.1.2.- Formación de geles	59
3.2.1.3.- Envejecimiento de geles	63
3.2.1.4.- Toxicidad de la resina de Carbopol 940 [®]	63
3.2.1.5.- Incompatibilidades	64
3.2.2.- <u>Acido ascórbico</u>	65
3.2.2.1.- Características generales	65
3.2.2.2.- Fuentes de obtención	67
3.2.2.3.- Actividad biológica	67
3.2.2.4.- Funciones	68

3.2.2.5.- Toxicidad	71
3.3.- ELABORACION DE PREPARADOS TOPICOS	72
3.3.1.- <u>Formulación y técnica preparatoria</u>	72
3.3.2.- <u>Incorporación de la sustancia activa</u>	73
3.4.- ENSAYOS GALENICOS	74
3.4.1.- <u>Viscosidad</u>	74
3.4.2.- <u>Extensibilidad</u>	76
3.4.2.1.- Método	76
3.4.2.2.- Técnica de medición	77
3.4.3.- <u>Estabilidad</u>	78
3.4.3.1.- pH	78
3.5.- ESTUDIO ANALITICO DEL α -TOCOFEROL	80
3.5.1.- <u>Método de extracción</u>	80
3.5.2.- <u>Técnica analítica</u>	81
3.5.3.- <u>Pruebas de validación del método</u>	81
3.5.4.- <u>Variación del contenido en α-tocoferol</u>	82
3.6.- ESTUDIO PATOLOGICO: PROMOTORES DE RADICALES	
LIBRES	85
3.6.1.- <u>Necrosis tisular: doxorubicina</u>	86
3.6.1.1.- Material no biológico	86
3.6.1.2.- Reactivo animal	87
3.6.1.3.- Lesiones	89
<u>RESULTADOS</u>	90
4.1.- ENSAYOS GALENICOS	91
4.1.1.- <u>Reología</u>	92

4.1.1.1.- Viscosidad	93
4.1.1.2.- Extensibilidad	103
4.1.2.- <u>Estabilidad</u>	108
4.1.2.1.- pH	109
4.2.- ESTUDIO ANALITICO DEL α -TOCOFEROL	111
4.3.- ESTUDIO PATOLOGICO: PROMOTORES DE RADICALES LIBRES	116
4.3.1.- <u>Necrosis tisular: doxorubicina</u>	117
<u>DISCUSION</u>	124
<u>CONCLUSIONES</u>	140
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	143

INTRODUCCION

1.1.- REOLOGIA.

Las preparaciones farmacéuticas fluidas se pueden considerar como materiales que se deslizan, no teniendo capacidad para mantener su estado original si no están contenidos en un recipiente. Aquellos sistemas que realmente fluyen desde frascos son claramente fluidos. Las pomadas o pastas, que retienen su estado después de la extrusión de un tubo, están asociadas con semisólidos farmacéuticos (1).

El estudio de la deformación y flujo de los materiales se denomina Reología (1 - 11). Esta parte de la Física describe como se deforma un cuerpo sometido a esfuerzos producidos por fuerzas externas. Los sólidos ideales se comportan elásticamente, es decir, la energía de deformación se recupera totalmente cuando desaparece el esfuerzo. Por su parte, los fluidos ideales se deforman irreversiblemente, por tanto, fluyen (1). En ellos su energía se disipa en forma de calor sin que se pueda recuperar al desaparecer el esfuerzo. En un estado intermedio los cuerpos reales, no son ni sólidos ni líquidos ideales (2); desde un punto de vista reológico, se

comportan como sólidos si conservan su forma y volumen y como líquidos si mantienen su volumen (3).

La expresión matemática que representa las fuerzas físicas que causan el movimiento es el esfuerzo; sus dimensiones son fuerza por unidad de superficie. Cuando un material se somete a una tensión éste se deformará en mayor o menor proporción; si se trata de un fluido su alteración será continua, fluirá. Por tanto, los factores fundamentales son la deformación y la velocidad de la misma. El primero de ellos es esencialmente un movimiento relativo, determinándose por gradientes de desplazamiento; igual ocurre con la velocidad de deformación.

Para una mejor comprensión de los aspectos físico-químicos que rigen los procesos reológicos habrá que hacer algunas observaciones previas a la evaluación matemática de dichos procesos. Así, las ecuaciones reológicas de estado se formulan generalmente por razonamiento inductivo y, por ello, representan modelos idealizados de respuesta del material. Es interesante, dentro de este contexto, mencionar asimismo que la mayoría de las suposiciones realizadas se basan en que el material es continuo, es decir, se asume que todas las propiedades del material son

constantes en cada punto o que sus propiedades son iguales en todas las partes del sistema (4).

Por su parte, la temperatura y la determinación de su dependencia son también aspectos importantes para la caracterización completa de la reología de los materiales (2, 4).

A partir de estas consideraciones derivan toda una serie de ecuaciones reológicas que se aplican para la resolución de problemas de deformación y flujo. Si bien antes de expresar las relaciones generales entre el esfuerzo y la deformación, se pueden entender mejor las propiedades reológicas de un material considerando su comportamiento en un estado particular simplificado, denominado "cizalla simple" (4).

Supongamos un material contenido entre dos planos paralelos, uno de los cuales es estacionario, estando el otro obligado a moverse en sí mismo sometido a una fuerza "F" que actúa paralela al plano (Figura 1). Esta fuerza, que tiene un área "A", produce un esfuerzo constante $\tau = F/A$ (1, 4 - 6, 11, 12), también denominado tensión de empuje (τ) (7), que es uniforme a través del material en estado estacionario.

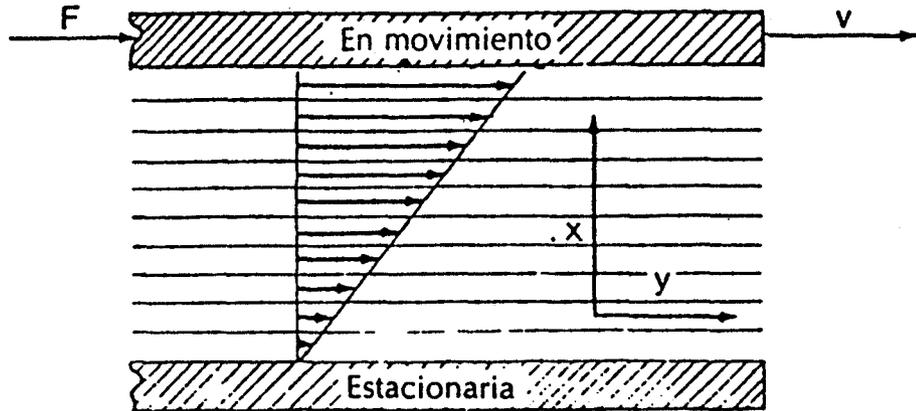


Figura 1.- Flujo laminar de un fluido contenido entre dos placas paralelas.

El desplazamiento del plano superior se produce por un alejamiento relativo de todos sus elementos en la dirección "X", originando una deformación (4, 5). El segundo plano, adyacente al anterior, es arrastrado por fricción, pero su velocidad es reducida por la resistencia subyacente. Cuanto más lejos estén los planos líquidos de la placa en movimiento, menor será su velocidad (3). Si el desplazamiento de un elemento dado, situado a ΔY , es ΔX , la deformación por cizalla viene dada por $\gamma = \Delta X / \Delta Y$ (2, 4, 5). Las propiedades mecánicas de un sistema definen una relación única entre esfuerzo y deformación.

En un fluido en estado estacionario un esfuerzo constante sobre el plano ocasionará una velocidad constante, "V" (4, 5). Con el tiempo, todas las capas excepto la del fondo sufren alteración infinita. La velocidad con que se produce ésta es la diferencia existente entre un fluido y otro (3). En consecuencia, la deformación puede ser descrita por la velocidad de cambio del cizallamiento frente al tiempo y es referida como velocidad de cizalla (2, 4 - 6, 8, 11).

Bajo un estado de cizalla simple, los materiales pueden ser clasificados reológicamente con respecto a su comportamiento esfuerzo cortante - deformación por cizalla, desarrollándose diversas expresiones. Estas representan "modelos" idealizados que definen estos cuerpos, pero no garantizan la reproducción exacta del comportamiento de los materiales reales. Sin embargo, muchos de ellos muestran una representación bastante adecuada de la situación de flujo de un gran número de sistemas.

A partir del planteamiento realizado anteriormente, se va a particularizar en las respuestas de diversas clases de materiales bajo ciertas condiciones específicas impuestas en deformaciones sencillas (caso de cizalla simple).

Sin embargo, en la evaluación práctica de tales magnitudes al utilizar un viscosímetro, no puede hablarse de cizalla simple, situación idealizada, sino más bien del "Flujo Viscosimétrico"; este se define como aquel en el que la deformación que experimenta un elemento dado en un fluido, es indistinguible de la experimentada en cizalla simple estacionaria.

Para muchos fluidos, las medidas del esfuerzo cortante y velocidad de cizalla indican una proporcionalidad directa entre los dos:

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad |I|$$

donde μ , coeficiente de proporcionalidad, es una propiedad reológica del material denominada viscosidad (4, 5) o viscosidad dinámica (2). Se define como la fuerza necesaria para vencer la resistencia opuesta por el rozamiento interno (7). Igualmente, se expresa la viscosidad cinemática (2, 4, 11) " ν " de un fluido como:

$$\nu = \mu / \rho \quad |II|$$

donde " ρ " es la densidad del mismo.

Los materiales en los que la relación de tensión de empuje a velocidad de cizalla es constante, es decir, independiente de la magnitud del esfuerzo cortante o velocidad de cizalla, se denominan newtonianos (1-6, 9, 12-14), también llamados cuerpos viscosos ideales (7). La mayoría de los fluidos de estructura simple, compuestos de moléculas relativamente simples en una sola fase, se comportan como tales (4). Por otra parte, cualquier fluido para el que la relación entre la tensión de empuje y la velocidad de cizalla no pueda ser descrita por la ecuación anterior, se define como no newtoniano (1, 2, 4 - 6, 9, 13, 14). Muchos fluidos complejos, incluyendo aquellos que contienen grandes moléculas (polímeros), suspensiones, emulsiones, etc., pertenecen a este grupo. La mayoría de estos sistemas no son viscosos puros. Sin embargo, pueden realizarse medidas de esfuerzos cortantes y velocidad de cizalla en flujos de cizalla estacionaria; la relación de estas cantidades puede definirse como una característica reológica análoga a la viscosidad newtoniana. Aunque esta relación de tensión de empuje a velocidad de cizalla no es constante, define una función que se denomina viscosidad aparente o función de viscosidad (1, 4 - 6):

$$\mu(\dot{\gamma}) = \tau / \dot{\gamma} \quad |III|$$

Estos fluidos no newtonianos pueden ser clasificados por la forma en la que el esfuerzo cortante varía con la velocidad de cizalla, o en términos de la variación de la viscosidad aparente con el esfuerzo cortante o velocidad de deformación. Una de las clasificaciones más comunes es la que a continuación se indica:

Pseudoplásticos: Estos materiales muestran un descenso en la viscosidad aparente según aumenta la velocidad de cizalla (1, 2, 7, 10, 12 - 15). Las causas del flujo pseudoplástico son la ruptura progresiva de la estructura del medio líquido cuando el esfuerzo aumenta y la reconstrucción de dicha estructura mediante movimiento browniano (3).

Los materiales que presentan este comportamiento, se hacen más líquidos cuanto más rápidamente se mueven, sobre todo en sistemas coloidales, soluciones de polímeros y dispersiones sólido/líquido floculadas (1).

Dilatantes: Hay algunos materiales que parecen expandirse o "dilatarse" cuando se someten a esfuerzos cortantes. Tienden a aumentar su viscosidad aparente con la velocidad de cizalla a causa de esta dilatación (1, 7 - 10, 12, 14).

Estructurales: Este grupo está caracterizado por tres regiones diferenciadas: una newtoniana a bajas velocidades de cizalla; una no lineal a velocidades intermedias; y otra región newtoniana a altas velocidades de deformación.

En fluidos no newtonianos la descripción del comportamiento esfuerzo cortante-velocidad de cizalla, en cizalla estacionaria, ha sido fundamentalmente empírica. La mayoría de los materiales de mayor interés son extremadamente complejos y actualmente las teorías moleculares están muy simplificadas y son inadecuadas para describir el comportamiento real. De aquí que, en el momento presente, las observaciones experimentales representen la fuente de información reológica más fiable.

A continuación se exponen algunos de los modelos empíricos más comunes que han sido utilizados para representar las diversas clases de comportamiento no newtoniano observadas:

- Modelo de OSTWALD-DE WAELE (1, 3, 4, 12, 13):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n$$

|IV|

dónde: n = índice de flujo o índice de la desviación del comportamiento newtoniano de flujo.

K = índice de consistencia

para $n = 1$, el modelo es newtoniano ($K = \mu$)

$n < 1$, el modelo es pseudoplástico

$n > 1$, el modelo es dilatante

Los fluidos que son no newtonianos muestran generalmente no sólo una viscosidad dependiente del tiempo de cizalla, sino uno o más de los siguientes fenómenos:

- Plasticidad
- Estructura dependiente del tiempo
- Viscoelasticidad

A continuación se explican algunos de estos conceptos:

La plasticidad es un fenómeno que muestran ciertos materiales que se comportan como sólidos elásticos, almacenando una cierta cantidad de esfuerzo cuando se someten a una tensión de empuje más pequeña que un cierto valor umbral (τ_0) (4, 5, 10, 13). Igualmente la describen los líquidos de viscosidad estructural que poseen adicionalmente un límite de fluidez (2). Para esfuerzos superiores al umbral, el material se deforma continuamente como un fluido, siendo la tensión de empuje una función

lineal (BINGHAM) (1, 3 - 5, 7, 13), o no lineal (CASSON) (7) de la velocidad de cizalla.

Comportamiento reológico dependiente de la velocidad y tiempo de cizalla: el ajuste de la estructura del fluido en función de la velocidad de deformación requiere una cantidad significativa de tiempo; se aprecia que la viscosidad medida en un experimento en cizalla simple no varía sólo con la velocidad, sino también con el tiempo (4, 5).

$$\mu = \mu (\dot{\gamma}, t) \quad |V|$$

Si la viscosidad desciende con el tiempo, el material se define como tixotrópico (1, 3 - 5, 7, 14). Por el contrario, si aumenta, se dice que es reopéctico o antitixotrópico.

Aunque el término tixotropía fue originalmente acuñado para describir una transición gel-sol (sólido-líquido) isotérmica y reversible debido a una agitación mecánica, en el momento presente existe un acuerdo generalizado en denominar tixotropía a un descenso continuo de la viscosidad aparente con el tiempo de cizalla y la subsiguiente recuperación de viscosidad cuando cese el

flujo (16). En consecuencia, el material debe permanecer en reposo por un tiempo suficientemente largo antes de que el experimento citado se lleve a cabo (2, 4, 5). A partir de la definición de tixotropía se pueden investigar técnicas experimentales para detectarla y evaluarla en los materiales reales. Puesto que se están buscando efectos en función del tiempo, es lógico esperar que medidas transitorias proporcionen información útil.

La tixotropía siempre presupone algún proceso molecular o microscópico que modifica la consistencia. En ausencia de flujo, las moléculas o partículas están enlazadas por fuerzas más bien débiles; bajo cizalla, las fuerzas hidrodinámicas son lo bastante intensas como para romper dichas uniones. Por otro lado, la reducción en el tamaño de enlaces estructurales asociados, se corresponden con una resistencia más pequeña al flujo. En el caso de dispersiones coloidales, el proceso sugerido viene determinado por las fuerzas de atracción entre las partículas. Donde quiera que haya un balance apropiado entre las fuerzas de atracción (Van der Waals) y las de repulsión (electrostáticas y estéricas), podrá tener lugar una débil coagulación. El resultado es la formación de grandes flóculos aislados o una estructura sencilla a través de todo el material. En el primer caso, puede

esperarse un comportamiento semejante al de un líquido a bajas velocidades de cizalla. El segundo da lugar a la aparición de un esfuerzo umbral que será el esfuerzo requerido para romper el entramado de partículas.

La tixotropía y pseudoplasticidad pueden ser producidas por las partículas esféricas. Así, el comportamiento tipo gel, a bajas concentraciones, puede entenderse en términos de un entramado de cadenas de esferas.

1.1.1.- Técnicas para mediciones reológicas.

En este apartado se indican los aspectos básicos de algunos instrumentos de uso común.

Es necesario elegir un viscosímetro apropiado para los límites de viscosidad que se prevean para una aplicación determinada. El instrumento debe suministrar la información reológica requerida en el rango deseable de deformación, tiempo bajo esfuerzo y temperatura.

Los peligros inherentes a la medición de la viscosidad aparente de un material surgen, bien al determinar la misma a una sola velocidad de deformación en lugar de cubrir un amplio rango, o bien dentro de los límites de esta

velocidad. En ambos casos se pueden obtener resultados erróneos (2).

Uno de los procedimientos más usuales para medir la viscosidad se basa en la velocidad de flujo de un líquido a través de un orificio o un conducto de geometría simple, característica de fluidos newtonianos. El otro método depende de la resistencia a la rotación de un cuerpo metálico en contacto con el líquido o sumergido en él (3).

1.1.1.1.- Viscosímetros rotatorios.

El principio del viscosímetro de rotación, en unión a sistemas de medición por cilindros coaxiales y plano/cono, permite la construcción de viscosímetros absolutos de excelente calidad y aplicaciones múltiples (3, 5). El primero de ellos corresponde a una modificación del modelo de placas planas paralelas de Newton, en el que dichas placas han sido curvadas formando así un cilindro interior y otro exterior. Estas condiciones conducen a un flujo laminar y permiten un tratamiento matemático del problema de medición (2).

Estos aparatos se basan en el hecho de que un cuerpo sólido rotativo sumergido en un líquido está sujeto a una

fuerza de retardo, debida al arrastre viscoso, que es proporcional a la viscosidad del líquido. Las ventajas de estos instrumentos son que la velocidad de deslizamiento puede variarse dentro de una amplia gama de valores y que pueden hacerse mediciones continuas a una velocidad o a una fuerza de deslizamiento dadas durante un gran período de tiempo.

Durante el funcionamiento toda la muestra líquida está en rozamiento. Su temperatura asciende poco a poco a medida que la energía usada para vencer su resistencia viscosa se transforma en calor. Por tanto, cuanto mayor sea este parámetro, mayor será el aumento de calor. Como la viscosidad de los líquidos depende mucho de la temperatura, es esencial el control exacto (3) de la misma. De este tipo de viscosímetros se indican las dos versiones siguientes:

a) Sistema Searle: el cilindro interior -a menudo llamado rotor- gira con un número de revoluciones constante o variable según un programa. El cilindro exterior, también llamado vaso de medición, permanece en reposo. El rotor al girar, provoca el flujo del líquido que se encuentra en la ranura anular entre los cilindros. La resistencia del líquido cizallado es proporcional al momento de giro, dependiente de la viscosidad. Entre el

motor de accionamiento y el eje del cilindro interno está colocado un elemento de medición para este momento de giro, normalmente un resorte de acero que se torsiona. Esta torsión es una medida directa de la viscosidad de la sustancia en estudio (2).

b) Sistema Couette (también llamado de cilindros coaxiales): el material se introduce en una brecha anular entre el huso cilíndrico interno y una cubeta redonda externa, concéntrica a la anterior (1, 3, 5, 11). El cilindro exterior gira con un número de revoluciones definido e impulsa en la ranura para fluir al líquido. El desplazamiento angular estaría a la altura de la torsión sobre el cilindro (1). La resistencia del fluido al cizallamiento transmite un momento de giro proporcional a la viscosidad. Este cilindro rotaría como el exterior, si no se le impidiese hacerlo (2). En la literatura no se hace distinción a menudo entre viscosímetros Searle y Couette. Se suele denominar a ambos sistemas como Couette (1, 3, 7). En el futuro se tendrá que distinguir, según las normas de la Sociedad Internacional para Reología, entre los sistemas Searle y Couette (2).

El viscosímetro sincrónico de BROOKFIELD (5, 10, 12, 16 - 18), basado en el sistema Searle, mide la tracción viscosa ejercida sobre un huso que gira en el líquido contenido en un vaso, siendo la velocidad de deslizamiento muy variable en toda la muestra. Cada instrumento tiene un juego de husos cilíndricos o discos intercambiables de diámetro diferente, que se usan para líquidos de viscosidades variables (3). El eje es impulsado por un rotor sincrónico (1, 7) a través de un alambre de torsión de berilio-cobre. El grado en el que el resorte se une a un número dado de revoluciones por minuto, está señalado por un indicador sobre un dial calibrado en unidades de fuerza de rotación (3).

Los viscosímetros cono/placa o platina consisten en un cono rotatorio de ángulo muy obtuso y una placa plana inferior estacionaria, elevada hasta que el ápice del cono apenas toque su superficie. El líquido llena la estrecha brecha triangular entre ambos. El cono funciona a velocidades controladas que pueden variarse continuamente. El arrastre viscoso sobre éste ejerce una fuerza de rotación sobre un dinamómetro que es proporcional a la presión de deslizamiento. El ángulo θ , formado por el cono y la placa, es generalmente menor de 3° y el ancho promedio de la brecha es menor de 2 mm. Esto produce una velocidad

uniforme de deslizamiento en toda la muestra, expresada por Ω/Θ (3, 19).

Cuando un material se estudia dentro de límites amplios de velocidad de deslizamiento, puede usarse más de un viscosímetro. En estos casos las curvas de flujo, representadas como esfuerzo cortante frente a velocidad máxima de deformación, producen una sola curva para un material dado a una temperatura determinada, aunque los instrumentos utilizados sean de diferentes dimensiones e incluso estén basados en principios diversos.

Una variante de la expresión matemática usual de fuerza de cizallamiento, τ , y velocidad de cizalla, $\dot{\gamma}$, admite la existencia de un fluido newtoniano, debido a la situación del cilindro externo e interno. En este caso, se pueden considerar dos alternativas del promedio de esfuerzo y velocidad de cizalla en el vacío entre ambos cilindros. Estas son las medias aritmética y geométrica de los valores de las paredes de ambos cilindros.

1.1.1.2- Representación gráfica de datos reológicos.

1.1.1.2.1.- Curvas de fluidez.

La relación entre esfuerzo cortante y gradiente de velocidad, que describe el comportamiento de fluidez de un líquido, se representa en un diagrama en donde τ viene en ordenadas y $\dot{\gamma}$ en abcisas o viceversa (1, 2, 5, 6) obteniendo en ambos casos un reograma (7). Este diagrama se denomina también curva de fluidez, figura 2 (2).

1.1.1.2.2.- Curvas de viscosidad.

Otra representación usual es aquella donde μ se traza frente a $\dot{\gamma}$. Esta se denomina curva de viscosidad, figura 3 (2).

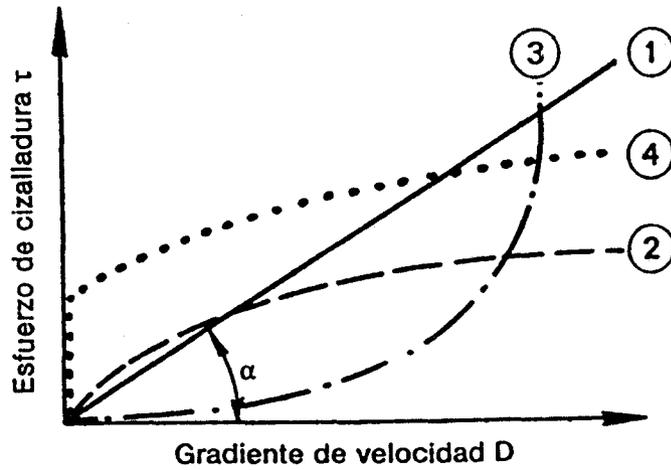


Figura 2.- Curvas de fluidez características de los distintos comportamientos no newtonianos.

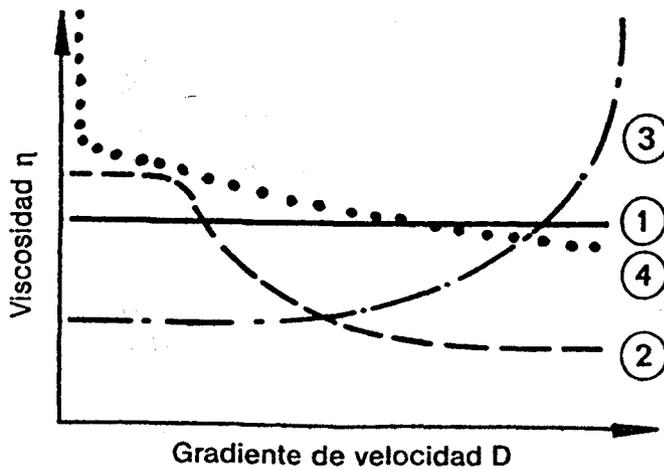


Figura 3.- Curvas de viscosidad características de los distintos comportamientos no newtonianos.

- 1 Fluido newtoniano
FLUIDOS NO NEWTONIANOS
 2 Fluido con viscosidad estructural
 3 Fluido dilatante
 4 Fluido plástico

1.2.- ESTADOS DEGENERATIVOS.

Todo ser vivo sufre una serie continua de períodos relacionados con cambios bioquímicos y fisiológicos desde el nacimiento hasta el momento de morir (20). Es un fenómeno biológico complejo que se ha observado en todos los organismos multicelulares estudiados (21, 22) y que deriva de la pérdida de información a nivel celular (23), o envejecimiento celular.

La causa fundamental de este proceso es una reacción de las células con productos derivados del oxígeno (24). Por tanto, la teoría de los radicales libres es el factor desencadenante de muchos fenómenos degenerativos.

1.2.1.- Antecedentes históricos.

El concepto de radical libre en sistemas biológicos ha tenido una trayectoria confusa. En 1986, OSTWALD declaró que "la misma naturaleza de radicales orgánicos es tal que excluye la posibilidad de aislarlos".

El interés sobre reacciones de especies reactivas comienza en el año 1930 con los estudios de KHARASCH y MAYO, sobre la adición anti-Marcovnikov de HBr al propano,

y WATERS y HEY que aclaran el mecanismo de la sustitución aromática homolítica. MICHAELIS, en 1939, publica su famosa predicción de que "todas las oxidaciones de moléculas orgánicas envuelven radicales libres como intermedios" (25). Esta generalización viene seguida por la demostración de WESTHEIMER y otros en la que indica que algunas reacciones redox, biológicamente importantes, no envuelven especies reactivas.

En los años 60, GERSCHMAN y HARMAN establecen la teoría gerontológica de los radicales libres. La primera de ellas propuso, en 1962, que un ligero desequilibrio entre las oxidaciones no controladas y las defensas antioxidantes puede ser un factor clave en el envejecimiento. Por su parte, HARMAN atribuye un papel a los radicales libres no sólo en el envejecimiento sino en otros procesos degenerativos como el cáncer, la arteriosclerosis, la amiloidosis y la inmunodeficiencia (26, 27).

Según los estudios gerontológicos de MIQUEL y cols. (28) en *Drosophila* y ratón, sólo se puede explicar el envejecimiento a todos los niveles de organización biológica integrando las teorías de GERSCHMAN y HARMAN con las ideas de PEARL -relación entre metabolismo y envejecimiento- y de MINOT -papel clave de la

diferenciación celular-. Por ello, MIQUEL y cols. (28) proponen que el envejecimiento del hombre y de los animales es un "efecto secundario" del intenso metabolismo aerobio de las células, que han experimentado un proceso irreversible de diferenciación, acompañado de niveles muy altos de síntesis de ATP.

Llegados a este punto sería conveniente enunciar algunos conceptos de interés:

* Radical libre es un átomo, grupo de átomos o moléculas en un estado particular con un electrón desapareado ocupando un orbital externo (26, 29-31). Pueden estar cargados positiva o negativamente, incluso sin carga, siendo importantes los tres tipos.

* Birradical es una especie que contiene dos electrones desapareados en orbitales exteriores. El ejemplo más característico es el oxígeno molecular (O_2).

1.2.2.- Reactividad de los radicales libres.

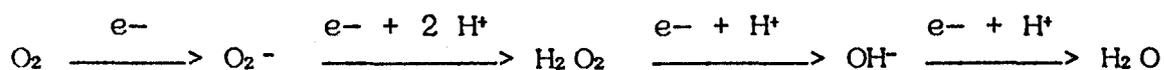
La presencia de un único electrón en el orbital externo de un radical libre le dota de una reactividad química y características físicas poco usuales. Esto explica la fuerte tendencia del electrón desapareado para interactuar con otros iguales formando un par y por tanto, un enlace químico (26). Como consecuencia de la reactividad de muchas especies y de su baja concentración en "steady state" es conveniente dividir las reacciones en tres fases (32): iniciación, propagación y terminación. Generalmente tienden a ocurrir en cadena (25, 26, 33).

Los radicales libres se pueden originar por radiolisis o fotolisis, durante las reacciones de oxidación - reducción (25, 26). Se entiende por reacciones de propagación a una transferencia de radicales libres con alteración de su entorno, pero dando siempre lugar a otra especie reactiva (26, 33). Estas pueden continuar indefinidamente o terminar debido a la actuación de "scavengers" de radicales libres, algunos de los cuales son esenciales para la integridad celular; el agotamiento de éstos (33) o la generación descontrolada de especies reactivas se asocian con mutaciones, cáncer, envejecimiento, inflamación y otras muchas enfermedades; es

decir, con citotoxicidad (34). Aunque las reacciones de terminación no se han estudiado con detalle "in vivo", se presume que inhibidores tales como vitamina E y tioles convierten a estas sustancias activas en especies no reactivas (32).

1.2.3.- Evolución de los radicales libres.

La presencia de O₂ en la atmósfera tiende a cambiar los compuestos formados por carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno en otros como CO₂, NO₂ y H₂O que resultarían de la ruptura de las biomoléculas de la materia viva. Una consecuencia inevitable de estas reacciones es la liberación de un producto tóxico, O₂[·], a la atmósfera. Como resultado de esta evolución se forman mecanismos de defensa que aseguran la continuada supervivencia a través de la propagación. El proceso desarrollado para el control biológico de O₂[·] implica su completa reducción a H₂O, por la adición de cuatro electrones para cada radical (26).



La ubicuidad del oxígeno molecular en organismos aeróbicos y su fácil capacidad para aceptar electrones,

convierte a los radicales libres que lo incluyen en su estructura en mediadores de reacciones de este tipo (33). La completa reducción de la molécula por una vía univalente daría lugar a la formación del anión superóxido (35), peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, como intermedios (24, 26, 36).

1.2.4.- Mecanismos de control y protección de las células.

Estos radicales intermedios son demasiado reactivos para ser tolerados en tejidos vivos y su eliminación y control están condicionados a la aparición de oxígeno molecular en la atmósfera.

1.2.4.1.- Mecanismos enzimáticos.

Existe una homeostasis redox en el organismo que mantiene controlados estos intermedios mediante enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, ...).

La presencia y localización de este tipo de enzimas, en concreto superóxido dismutasa, sugiere que el radical anión es un subproducto importante en el metabolismo oxidativo.

Una de las posibles vías seguidas en la reducción de H_2O_2 a H_2O es mediante el concurso de la glutatión peroxidasa, enzima que contiene selenio; si bien las catalasas y peroxidasas pueden realizar el mismo proceso (26, 37, 38).

1.2.4.2.- Mecanismos hidrofóbicos.

En las células existen unas regiones hidrofóbicas que, gracias a una serie de factores termodinámicos, son responsables del secuestro de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Las membranas lipídicas, con un amplio contenido en ácidos grasos poliinsaturados, son las únicas zonas hidrofóbicas que están asociadas con las células. La peroxidación lipídica se produce a baja velocidad en las células aeróbicas. Este proceso está controlado normalmente por sustancias captadoras de radicales libres, denominadas "scavengers", de tipo hidrofóbico. En este contexto el α -tocoferol, intercalado en las membranas biológicas, previene la propagación de las reacciones de oxidación debido a la cesión de átomos de hidrógeno (26, 38).

1.2.4.3.- Mecanismos hidrofílicos.

Estos mecanismos protectores se llevan a cabo mediante sustancias químicas y tienen lugar en compartimentos celulares iónicos o acuosos. Las sustancias que tienen potencial "scavenging" en este ambiente son compuestos como ácido ascórbico, cisteína y glutatión reducido (26, 38).

1.2.4.4.- Mecanismos estructurales.

Se piensa que los mecanismos protectores están íntimamente asociados con la integridad estructural de las células vivas. La ruptura de esta continuidad conduce rápidamente a la rancidez, que no es más que la inducción de reacciones, dentro de los lípidos poliinsaturados, por parte de los radicales peroxidados (26).

1.2.5.- Métodos de destrucción oxidativos del tejido.

El propósito de los mecanismos protectores es prevenir y reparar el daño bioquímico inducido por diversas especies reactivas derivadas del oxígeno molecular.

1.2.5.1.- Radical anión superóxido.

Las mayores fuentes biológicas de oxígeno molecular continúan desconocidas; sin embargo, existen varios entre los que pueden citarse:

a.- un grupo de enzimas celulares, implicados en catalizar reacciones de oxidación, ocasionan la reducción univalente de esta molécula al anión superóxido (39);

b.- las mitocondrias y cloroplastos pueden generar flujos continuos de este radical (33);

c.- en la irradiación de tejidos vivos, el $O_2 \cdot^-$ se obtiene como radical fundamental, siendo de gran importancia en el deterioro final de las células (33, 40, 41);

d.- muchos agentes antineoplásicos antracíclicos, tales como adriamicina y otros antibióticos que dependen de grupos quinoídicos o metales ligados, son también capaces de generar radicales oxígeno (33, 42).

La química del anión superóxido se ha estudiado extensamente. Este puede reaccionar como un agente

reductor, donando los electrones de los orbitales externos, o como antioxidante, reduciéndose a peróxido de hidrógeno. La vía más importante del anión superóxido está relacionada con la dismutación espontánea a H_2O_2 y O_2 .

Una de las reacciones responsables de la toxicidad del $O_2^{\cdot -}$ en diversos sistemas, conocida como de HABER-WEIS, está basada en la interacción del radical con los productos de dismutación para generar $OH\cdot$, especie de gran reactividad.

1.2.5.2.- Peróxido de hidrógeno.

Este radical se forma como resultado de dos tipos de reacciones (26):

- a.- reducción divalente de oxígeno molecular
- b.- reducción univalente de oxígeno molecular obteniéndose anión superóxido.

Ambos procesos están mediados por distintos enzimas.

El peróxido de hidrógeno, aunque no perjudicial por sí mismo, sí lo es por reacción con quelatos metálicos dando lugar a la formación de $OH\cdot$, radical hidroxilo.

1.2.5.3.- Radical hidroxilo.

Este radical es muy reactivo siendo por lo tanto, una especie oxidante muy potente (43) e inestable que reacciona con una amplia variedad de compuestos orgánicos. El tiempo de vida del radical hidroxilo es muy corto y su toxicidad puede ser mediada a través de compuestos dependientes de él.

Ya que el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son relativamente poco tóxicos y existen mecanismos para su "scavenging", un aminoramiento de la generación del OH· en sistemas vivos puede resultar esencial para el conocimiento del daño tisular iniciado por los radicales derivados del oxígeno (44).

1.2.6.- Daños inducidos por radicales libres.

Inicialmente, el efecto de estos compuestos se ejerce sobre la mitocondria -orgánulo citoplasmático específico de la respiración celular- al oxidar a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos constituyentes de sus membranas lipoprotéicas, tanto interna como externa, limitando su funcionalismo (24 - 26, 31, 33, 45 - 48).

Al mismo tiempo, lesiona el DNA mitocondrial, desprotegido, por situarse en la membrana interna, dando lugar a la formación de puentes de unión entre moléculas, ya que se trata de una macromolécula sensible a la acción directa de los radicales libres (24, 25, 37, 48).

Un segundo paso es el daño producido en otras membranas biológicas también debido a la oxidación lipídica (26, 32, 33, 44). La posterior interreacción de los fosfolípidos degradados (49) con las proteínas adyacentes, dará lugar a lipopigmentos inertes que quedarán como inclusiones citoplasmáticas, indicadoras del grado de envejecimiento celular (24, 32, 35, 44, 50, 51), ya que aumentan su concentración con el tiempo. SHINITZKY y cols. (52) exponen que el aumento de permeabilidad en la membrana, con la edad, precede a los cambios en la composición y química de sus proteínas que es, en principio, irreversible.

La disminución de la capacidad respiratoria de la célula, provocada por la reducción del número de mitocondrias, produce un déficit en la formación de ATP. Esta falta de energía limitará a su vez la síntesis proteica de sus ribosomas, con lo que la célula, primero, y los tejidos y órganos, después, acusarán una disminución funcional paralela que se manifestará como un descenso de

la vitalidad del individuo. Por otra parte, BOUISSOV y cols. (53) indican que el envejecimiento dérmico resultante, es diferente en función de las características individuales y está relacionado con los antecedentes genéticos y la exposición a agresiones múltiples.

Los radicales libres poseen acciones específicas a distintos niveles (37, 48, 51, 53, 54):

* EPIDERMIS: La capa basal se desorganiza, las mitosis se ralentizan, en definitiva la epidermis se adelgaza. La estructura de la capa córnea se modifica: se vuelve laminar y quebradiza. La membrana de corneocitos se altera y no mantiene los compuestos del factor de hidratación natural. La unión dermoepidérmica se aplana reduciendo la imbricación de la dermis y la epidermis, quien ralentiza los cambios nutritivos entre los dos tejidos.

La consecuencia es simple, la piel aumenta de superficie.

* DERMIS: Las fibras de elastina y reticulina de la dermis papilar son destruidas llamativamente dando lugar al aplanamiento de la capa basal.

Las capacidades replicativas de los fibroblastos decrecen, son menos productivos. Las fibras de elastina se sobrecargan de lípidos y pierden su elasticidad. La cantidad de proteoglicanos disminuye así como su poder de hidratación: la tasa de ácido hialurónico decrece. Al mismo tiempo, se produce el establecimiento de puentes anormales entre macromoléculas, fundamentalmente entre colágeno y elastina, favoreciendo la formación de colágeno insoluble.

Los defensores de la teoría de radicales libres en el envejecimiento admiten que muchos aspectos, en el mecanismo postulado por ellos, están aún lejos de un completo conocimiento, pero creen que es una evidencia bastante circunstancial sugerir que las defensas naturales del cuerpo, contra estos procesos, pueden ser significativamente mejoradas por un cambio en la dieta: reducción de ingestión calórica, ácidos grasos poliinsaturados, cobre, etc., y aumento del consumo de "scavengers" de radicales libres, tales como vitamina E. Por el contrario, MASORO (55) concluye su trabajo indicando que la restricción alimentaria no retarda los procesos de envejecimiento pero enlentece la velocidad metabólica; es decir, ésta no puede ser el único proceso responsable del envejecimiento, aunque no excluye que sea uno de los factores que lo ocasionan.

OBJETIVOS

La causa fundamental de los procesos degenerativos tales como cáncer, arteriosclerosis, inmunodeficiencia, amiloidosis, ... o simplemente el envejecimiento, está centrada en una reacción de las células con productos derivados del oxígeno.

Esta aseveración está avalada por las teorías de GERSCHMAN y HARMAN que consideran al desequilibrio entre las oxidaciones no controladas (génesis de radicales libres) y las defensas antioxidantes, como el factor clave de estos procesos.

Con la presente Memoria se pretende evaluar la eficacia terapéutica de un preparado tópico, Gel de α -tocoferol elaborado con ácido ascórbico como agente antioxidante, ante patologías degenerativas promovidas por agentes antineoplásicos (antraciclinas), como doxorubicina, capaces de generar radicales libres.

Se justifica la elección del α -tocoferol ya que, por su carácter antioxidante, impedirá los cambios morfológicos celulares que subyacen al efecto peroxidativo de los

mencionados radicales sobre ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas biológicas.

Por otra parte el ácido ascórbico, depurador de las especies activadas del oxígeno, será utilizado a la vez tanto por su capacidad preventiva en preparados farmacéuticos expuestos a deterioros oxidativos como por poder actuar sinérgicamente con otros compuestos, a los que potencia su acción, en nuestro caso α -tocoferol.

Con todo, los estudios que se desarrollan a continuación y que constituyen un paso más en las investigaciones que iniciara en su día este grupo, comenzarán con ensayos específicos tendentes a comprobar la estabilidad del preparado así como para enunciar las características galénicas del sistema ideado y viabilidad del mismo, condición imprescindible para abordar los conducentes al establecimiento de su eficacia ante las patologías secundarias provocadas por empleo de agentes antineoplásicos como doxorubicina.

Se pretende pues, contribuir a paliar la situación poco agradable a la que se ven sometidos determinados pacientes, sujetos a terapias de esta naturaleza.

MATERIALES Y METODOS

3.1.- PRINCIPIOS ACTIVOS.

3.1.1.- α -tocoferol.

3.1.1.1.- Características generales.

La vitamina E comprende genéricamente dos familias, cada una de ellas con cuatro compuestos naturales, los tocoferoles y los tocotrienoles; ambos exhiben cualitativamente la actividad biológica del α -tocoferol (31, 56). Los miembros de cada familia se designan como α , β , γ o δ , dependiendo del número y posición de los grupos metilo unidos a un anillo cromano. La cadena lateral está saturada en los tocoferoles e insaturada en los tocotrienoles (31). El análisis químico de los primeros demuestra que todos poseen en común el esqueleto estructural del tocol ó 2-metil-2-(trimetil-tridecenil)-6-hidroxicromano (57).

El α -tocoferol (Figura 4) es la forma más potente y generalmente más predominante (31, 58).

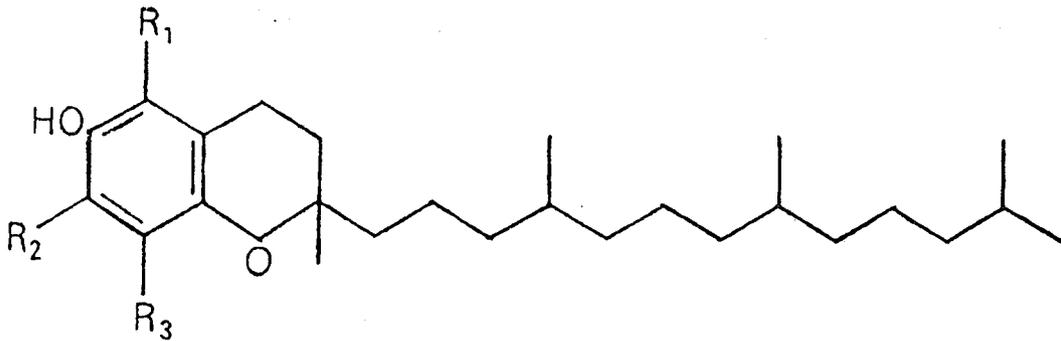


Figura 4.- Estructura del α -tocoferol.

Además, la vitamina E se encuentra en los alimentos en forma de tocoferol, siendo la parte no esterificada altamente susceptible a la oxidación. Por consiguiente, es relativamente fácil destruirlo por diversos métodos (31).

La conocida como "natural" o "d-tocoferol" se obtiene por destilación molecular de aceites vegetales comestibles. Parte de ellos se suministran como concentrados de tocoferoles; además, un amplio porcentaje se metila por medios químicos para obtener "d"- α -tocoferol puro o también se puede convertir por acetilación en la forma más estable, acetato de "d"- α -tocoferilo. Debido a que están implicados algunos procesos químicos, las sustancias "naturales" no deben denominarse como tales sino como "derivados de

fuentes naturales".

El α -tocoferol sintético es producido por condensación de trimetilhidroquinona con isofitol. Es una mezcla de cuatro racematos, designados como α -tocoferol racémico en las publicaciones científicas. En el comercio, se usa el término "dl" (31).

Ya que estos compuestos son inestables en presencia de oxígeno, muchos de los productos comerciales se convierten en ésteres de acetato de mayor estabilidad. Estos ésteres junto con los succinatos son rápidamente hidrolizados a alcoholes, que presentan actividad después de la ingestión (31).

Los tocoferoles son líquidos oleosos a temperatura ambiente (56), de color amarillo, ligeramente viscosos (57, 59). Insolubles en agua, solubles en grasas y en sus disolventes tales como alcohol, cloroformo y éter (57, 59, 60).

Son estables al calor, siempre y cuando no se encuentren en medio alcalino, en cuyo ambiente son termolábiles (57), mientras que en presencia de ácidos no se afectan (59). Por otra parte, son sensibles al oxígeno

en medio alcalino y se pueden destruir durante la saponificación de sus ésteres (31).

Los tocoferoles se oxidan con sustancias tales como sales de hierro, grasas rancias (56), permanganatos, ozono, peróxidos de algunos ácidos grasos, nitrato de plata, etc. dando lugar a tocoferilquinonas (57, 59). El α -tocoferol no esterificado es menos estable debido al grupo fenol libre; su oxidación, con los agentes ya mencionados, conduce sucesivamente a la formación de α -tocoferilquinona, rojo de α -tocoferol, p-quinona y púrpura de α -tocoferol (61). TAPPEL y cols. (62) proponen un mecanismo para la oxidación de α -tocoferol que se recoge en la Figura 5.

Resisten a la iluminación en general, pero son sensibles a las radiaciones ultravioletas (31, 57, 58).

Cualquiera de los componentes de la vitamina E tiene diferentes actividades como vitamina y antioxidante, siendo los cuatro compuestos principales α , β , γ y δ tocoferol, cada uno de los cuales existe en varias formas estereoisoméricas (31). La relación entre sus actividades antioxidante y biológica es muy discutida (63), existiendo discrepancias en cuanto a la capacidad reductora de todos ellos.

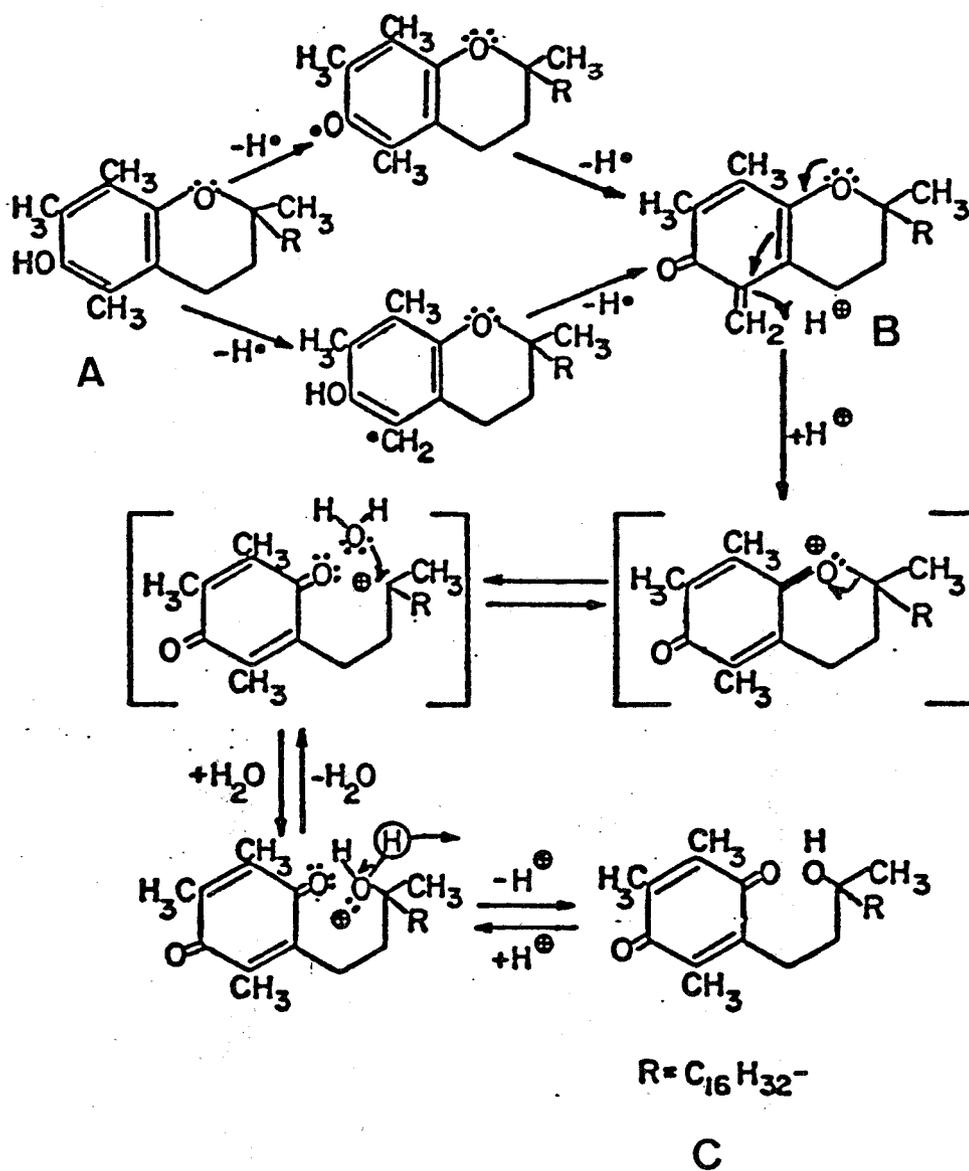


Figura 5.- Mecanismo de oxidación del α -tocoferol propuesto por TAPPEL (62).

3.1.1.2.- Actividad biológica.

Desde hace muchas décadas continúa la investigación de las propiedades de la vitamina E en humanos; aunque se han intensificado en los últimos años, muchos aspectos todavía no están totalmente aclarados (31, 56, 57, 60, 63-66).

Las funciones de la vitamina E como antioxidante biológico, están basadas en la inhibición de ciertas enzimas tales como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, previniendo a la célula del daño originado por los radicales libres que surgen del metabolismo normal o producidos por los agentes ambientales y medicamentos (31, 65, 67 - 69).

El concepto de la iniciación y propagación de las oxidaciones mediadas por radicales libres y su inhibición por antioxidantes, anteriormente comentada, explica el deterioro oxidativo de aceites y grasas comestibles, conocido comúnmente como rancidez. Este proceso se puede retardar por varios procedimientos (31):

a) Reduciendo al mínimo la influencia de los iniciadores.

b) Evitando el contacto con metales pesados y/o añadiendo agentes complejantes.

c) Excluyendo el oxígeno o movilizándolo por sus "scavengers".

d) Interceptando los radicales por "scavengers" de los mismos.

Los "scavengers" de radicales (AH) inhiben las reacciones de propagación donando átomos de hidrógeno a las especies reactivas (31, 62, 70). Cada molécula de AH detiene la oxidación de dos cadenas porque el radical antioxidante (A·) es demasiado poco reactivo como para continuar la cadena (31, 66). El inhibidor más ampliamente distribuido en la naturaleza es el tocoferol (31).

Este concepto se ha extendido en el sentido de que la vitamina E tiene también funciones como un antioxidante "in vivo", el cual protege los lípidos de las membranas tisulares del ataque de radicales libres (31, 62). El orden del poder antioxidante de los tocoferoles, medido por su efecto sobre la velocidad de formación de peróxidos en las grasas, es inverso al de su potencia biológica (64).

El tocoferol, que está principalmente localizado en las membranas de las células, actúa como antioxidante por rotura de la cadena (31, 62), neutralizando los radicales libres que son producidos en las grasas. Así, la formación de los hidroperóxidos es inhibida o, al menos, es reducida. En el caso de que algunos de éstos se formaran, podrían dirigirse a la parte acuosa de la célula convirtiéndose, gracias al sistema glutatión peroxidasa-selenio, en compuestos estables e inocuos (31, 62).

En general, la vitamina E juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad e integridad de las membranas celulares (56, 71). BARBER y cols. (72, 73), demuestran que la peroxidación lipídica en suspensiones microsomales viene ampliamente determinada por la naturaleza hidrofóbica de las asociaciones proteínas-lípidos. La proteína estructural se une a la vitamina E y la inhibición de este proceso se relaciona con las uniones a complejos de lípidos insaturados y proteínas estructurales.

El tocoferol representa la primera línea de defensa contra la peroxidación en la parte lipídica de la membrana celular y la glutatión peroxidasa la segunda. Este mecanismo protege a las células corporales de la existencia

de daño o destrucción por oxidaciones mediadas por radicales libres.

El papel antioxidante "in vivo" de la vitamina E no ha sido aceptado por todos los científicos, si bien, muchos de los efectos bioquímicos y patológicos de su deficiencia se pueden explicar mediante daños en la estructura de la membrana, ocasionados por radicales libres (31).

Por tanto, el α -tocoferol integrado en la estructura lípido-proteica de las membranas, tiene una acción protectora antioxidante y "scavenger" (51, 74). Acorde con lo mencionado, BISBY y cols. (75) sugieren que una de las funciones de la vitamina E puede ser la reparación de radicales en sus proteínas integrantes. Esta sustancia, al ser oxidada por los peróxidos, se convierte en su forma inactiva de tocoferol semiquinona, que puede recuperar la actividad por la acción reductora del glutatión (51, 68) (Figura 6).

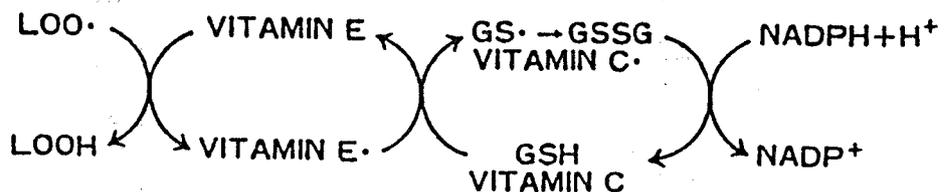


Figura 6.- Regeneración de la vitamina E por medio del glutatión y la vitamina C (68).

Además, experimentos realizados en animales sugieren una posible intervención en la síntesis de DNA (31, 64).

Se sabe poco hasta ahora sobre la absorción y disponibilidad de la vitamina E administrada exógenamente, aunque se piensa que se absorbe por un mecanismo semejante al de las grasas. BATEMAN y cols. (76) estudian los efectos de la formulación en la biodisponibilidad de la vitamina E a partir de varias formas de dosificación. Por otra parte, estos mismos autores (77) afirman que las vitaminas solubles en grasas se absorben mejor cuando se administran en forma de emulsión que cuando se hacen en preparaciones oleosas.

La vitamina E se ha utilizado en multitud de ensayos con el fin de prevenir o retardar los daños producidos por diversos agentes (78 - 94). Los efectos inhibidores de algunos antioxidantes, incluyendo α -tocoferol, sobre la carcinogénesis se podrían explicar por la teoría de los radicales libres y por tanto, actuarían sobre quimioterápicos que poseen este mecanismo de radicales libres (35).

Se han descrito efectos secundarios provocados por megadosis de vitamina E (94, 95). Al mismo tiempo, HOSTA y

cols. (37) indican que cantidades elevadas de esta sustancia pueden suponer un tratamiento etiológico en el mantenimiento del tono vital. Por otra parte, se está difundiendo el uso tópico de este compuesto, como nutriente a nivel dérmico. Se incluye en algunos cosméticos y otras formulaciones tópicas, pero son pocos los informes clínicos que indiquen que estos preparados tengan adecuada seguridad. MARX y cols. (96) estudian los niveles sanguíneos de vitamina E en niños recién nacidos, cuyas madres utilizaban esta sustancia activa por vía tópica.

SAPERSTEIN y cols. (97) investigan dos casos en los que han observado erupciones cutáneas después del uso continuado de esta sustancia a través de esta vía. Por otra parte, se ha descrito dermatitis de contacto (60, 98) como efecto tóxico para este producto tras su aplicación en la piel.

3.1.2.- Promotores de radicales libres. Antraciclinas.

El cáncer se caracteriza por la presencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación. Las células presentes en un tumor no son homogéneas aunque se hayan originado de un mismo grupo clonal. Por otra parte, la población celular presenta divergencias relativas según la fase del ciclo celular en que se encuentren. Así, mientras unas están en periodos de elevado crecimiento o proliferación, otras pueden encontrarse en estado de reposo.

Cada célula proliferativa atraviesa un proceso secuencial de crecimiento y división marcado por las siguientes fases (99, 100):

- Fase G1: La célula recién originada por la división precedente, entra en un período de reposo postmitótico o de presíntesis. Durante él, se sintetizan algunos enzimas, sobre todo los implicados en la síntesis de DNA, pero no hay síntesis del mismo.

- Fase S: comprende la síntesis de DNA mediante la cual se reduplica en los cromosomas.

- Fase G2: Período post-síntesis de DNA, durante el cual la célula sintetiza RNA y proteínas propias de todos los orgánulos celulares, para preparar la división mitótica.

- Fase M: Tiene lugar la mitosis.

El conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para el uso correcto de la generación actual de agentes antineoplásicos. Muchos de las sustancias citotóxicas más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello, sólo son activos contra las células que se encuentran en proceso de división. La mayor parte de estos compuestos actúan específicamente sobre procesos como la síntesis de RNA, la transcripción o la función del huso mitótico; por esta razón, se les considera específicos del ciclo celular (100).

Dentro de la terapia anticancerosa se encuentran las antraciclinas (101, 102).

3.1.2.1.- Características químicas.

Los productos más conocidos son la doxorubicina (adriamicina) y su derivado daunorubicina (daunomicina). Pertenecen al grupo de las rodomicinas, producidas por

diversas cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (103 - 105). Están constituidos por un compuesto de estructura tetracíclica, de carácter cromóforo, unido por enlace glucosídico a un aminoazúcar que, en el caso de estos antibióticos, es la daunosamina (103). Tienen restos de quinona e hidroquinona en anillos adyacentes que les permiten funcionar como agentes aceptores y donadores de electrones (104).

3.1.2.2.- Mecanismo de acción.

Tienen capacidad de intercalarse entre las bases del DNA e interferir así sus funciones, afectando no tanto la síntesis de éste como de RNA. La división de DNA está relacionada con la generación de radicales libres. La doxorubicina reacciona con el citocromo-P-450 reductasa mitocondrial en presencia de nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) para formar radicales semiquinonas intermedios, que a su vez pueden reaccionar con oxígeno para producir radicales aniónicos superóxidos. Estos pueden generar tanto peróxido de hidrógeno como radicales hidroxilo, que como se mencionó anteriormente son altamente destructivos para la célula (35, 103, 104, 106, 107). Por otra parte, pueden interactuar con las membranas celulares y alterar sus funciones. Los fenómenos de

toxicidad son máximos durante la fase S del ciclo celular, como era de esperar en el caso de compuestos capaces de inhibir las funciones del DNA. Una de las estructuras celulares que más se lesiona por la presencia de radicales libres suele ser la membrana celular, a través de los procesos de lipoperoxidación (103, 104, 108). SVINGEN y cols. (106) y NOBBS y cols. (109) exponen que si la citotoxicidad de la piel ocasionada por la doxorubicina es debida a radicales libres, puede ser posible prevenir los efectos de su extravasación accidental usando α -tocoferol (vitamina E) y dimetilsulfóxido, agentes "scavengers" de radicales libres e hidroxilo, respectivamente.

3.1.2.3.- Características farmacocinéticas.

Las antraciclinas se administran generalmente por vía intravenosa desapareciendo posteriormente con rapidez del plasma. La curva de desaparición de la doxorubicina es multifásica, con vidas medias de 1.5 a 10 horas y de 24 a 48 horas. En el metabolismo de este compuesto se escinde la molécula dando lugar por un lado al azúcar y por otro al aglucón; este último sufrirá procesos de oxidación y conjugación para posteriormente ser excretado por bilis (103, 104) y sólo el 5 % de la dosis es eliminada por la orina a lo largo de 5 días (105).

3.1.2.4.- Aplicaciones terapéuticas.

La doxorubicina es un antibiótico antineoplásico utilizado por actuar interfiriendo el DNA y RNA (105, 107). La dosis más habitual es de 60-75 mg por metro cuadrado de superficie corporal o 1.2 a 2.4 mg por Kg de peso (103 - 105).

3.1.2.5.- Reacciones adversas.

Inicialmente aparecen náuseas, vómitos, diarrea y estomatitis. También signos de irritación local (103), daño (106) y necrosis tisular en el hombre (110), sobre todo si hay extravasación (103, 104, 107) o aparición de estrías eritematosas cerca del lugar de administración ("rubor de la adriamicina"). DORR y cols. (111) y ODUKOYA y cols. (112) indican que los agentes "scavengers" de radicales libres, tales como dimetilsulfóxido y vitamina E, reducen las ulceraciones producidas "in vivo" por doxorubicina en piel de cerdo y rata.

Otra reacción adversa es la alopecia que se considera un efecto universal de la doxorubicina (113).

La mielosupresión es una importante complicación que limita la dosis. Existe un sinergismo o sensibilización

entre antraciclina y radiaciones, incrementando la toxicidad en órganos, aunque no hayan sido irradiados directamente (103, 104, 114).

3.2.- EXCIPIENTES.

3.2.1.- Resinas acrílicas. Carbopol[®].

3.2.1.1.- Características físico-químicas.

Bajo esta denominación se conocen a una serie de polímeros sintéticos, derivados carboxivinílicos (115, 116), correspondientes a especies entrecruzadas del ácido acrílico obtenidas por copolimerización con aproximadamente un 0.75 - 2 % p/p de azúcares polialquílicos (117). Su estructura general queda recogida en la Figura 7.

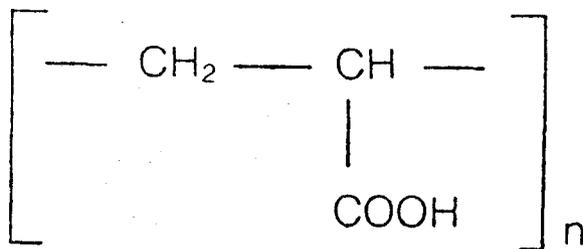


Figura 7.- Estructura general de Carbopol[®].

Se caracterizan estas sustancias por orientar sus grupos carboxílicos (56 - 68 %) (117) hacia un medio acuoso, por lo que mediante adición de una base orgánica se pueden obtener estructuras gelificadas (115).

Existen cinco tipos diferentes de resinas entre las que se encuentra la comercializada como Carbopol 940[®]. Aunque todas son válidas para formulaciones farmacéuticas tópicas, se suele seleccionar la anteriormente aludida por presentar las siguientes características:

- * favorece la formación de suspensiones permanentes a viscosidad media - alta, y

- * produce geles claros y brillantes.

Se presenta como un polvo suelto, blanco, ligeramente ácido e higroscópico. El pH de la dispersión acuosa al 1 % es de 2.5 a 3 unidades (117, 118). Es soluble en agua, alcohol y glicerina (117).

Es una resina aniónica y en consecuencia, incompatible con componentes catiónicos, aunque la eficacia del Carbopol[®] no se verá interferida si el peso molecular de estos componentes catiónicos es medio - alto y si presentan

impedimento estérico. En caso contrario, la incompatibilidad se puede solventar mediante el uso de un tensoactivo anfótero / retardador.

Desde un punto de vista organoléptico los mejores geles son los conseguidos con aminas (en lugar de NaOH) (119). Los geles neutralizados se presentan consistentes y fuertes pero a la vez poco resistentes a la manipulación y trasvasado, lo que les permite ser agitados, bombeados y extendidos fácilmente (118).

Las dispersiones producidas por estas resinas, y posteriormente neutralizadas, son sensibles a la agitación prolongada, mientras que las que no lo están son menos susceptibles a la rotura por cizallado. Las propiedades de flujo vienen dadas por el Carbopol^R que además desarrolla un umbral de fluencia (118).

3.2.1.2.- Formación de geles.

Las resinas de Carbopol^R, al ser dispersadas en un disolvente polar, por contacto forman agregados de partículas. La superficie de éstos se solvata formando una capa que impide la humectación rápida del interior seco de los mismos (118). Este proceso requiere un cierto tiempo y

una tecnología preparatoria adecuada. Con las resinas predispersas (previamente solvatadas y solubilizadas) la operación se simplifica de forma manifiesta (115).

El tiempo total de dispersión está regido por la lenta difusión del disolvente hacia el interior seco, a través de la capa solvatada. Si bien se puede reducir este parámetro empleando un 0.5 % de agente humectante aniónico o no iónico, aunque a veces puede conducir a la formación de espumas.

La agitación, como en cualquier otro sistema, aumenta la velocidad de hidratación de las resinas. En general, los gradientes de deformación altos favorecen la dispersión de esta resina. Sin embargo, hay que evaluar el empleo de mezcladores con alto poder de cizalladura, pues pueden romper las moléculas de polímero perdiendo, por tanto, viscosidad.

Una vez conseguida la interposición de la resina en el disolvente se debe dejar reposar esta dispersión ácida para que puedan escapar las burbujas de aire contenidas en la misma. Por último, se debe adicionar el neutralizante bajo agitación moderada para evitar formación de turbulencias (118).

Se conocen dos mecanismos de espesado:

a.- Formar sales por medio de agentes neutralizantes como: NaOH, KOH, NH_4OH (para disolventes polares); aminas del tipo de la trietanolamina (TEA) y dietanolamina (DEA) (para disolventes de menor polaridad o no polares) (118) y borax (120). De este modo, la molécula enrollada de Carbopol[®], se extiende originando un espesado instantáneo. Este método es de primera elección para los sistemas acuosos.

b.- Añadir un portador de hidroxilos para formar un enlace de hidrógeno entre el carboxilo y el hidroxilo con el consiguiente espesamiento.

La neutralización ioniza la resina, generando cargas negativas a lo largo de la cadena del polímero. La repulsión entre cargas del mismo signo conlleva la expansión de la molécula formando una estructura extendida.

La cantidad de neutralizante debe calcularse previamente, con el fin de no llegar a una sobreneutralización y la consiguiente pérdida de la estructura de gel (116, 118).

Al hacer la medida de pH para determinar el grado de neutralización, hay que dejar que transcurra el tiempo suficiente para que la formulación alcance el equilibrio antes de efectuar nuevos ajustes de pH (118).

El pH de cada uno de los diferentes estadios por los que pasa la dispersión, al ir añadiendo neutralizante, depende de éste y de la concentración de resina. Si ésta aumenta, disminuye el pH debido a la mayor cantidad de grupos carboxilos libres.

De todos modos, siempre hay una zona que permanece con igual viscosidad que es mayor a mayor concentración de Carbopol[®], lo que permite elegir el pH óptimo (el de máxima estabilidad) de acuerdo con las características físico-químicas de cada principio activo. Si ésta tiene carácter alcalino, se debe incorporar en primer lugar y luego ajustar el pH para evitar paso de gel a sol (120).

Las viscosidades aparentes que se alcanzan con cualquier tipo de neutralizante (119), aumenta al conseguir la neutralización plena (118). Por otro lado, si la concentración de resina aumenta, también lo hará la viscosidad aparente (120, 121).

3.2.1.3.- Envejecimiento de los geles.

La viscosidad de estos sistemas dispersos se ve afectada por una serie de factores como son: elevada temperatura, exposición a la luz solar o radiación ultravioleta, presencia de electrolitos fuertes, pH menor de 3 o mayor de 12; así como de algunos conservantes como: ácido benzóico, benzoato sódico y cloruro de benzalconio.

Estos geles no favorecen ni previenen el crecimiento bacteriano siendo compatibles con proporciones normales de los biocidas utilizados para la prevención y desarrollo fúngico y bacteriano (117, 118).

3.2.1.4.- Toxicidad de la resina de Carbopol 940^R.

Debe evitarse el contacto de esta resina con ojos, nariz y garganta por producir irritación de éstos (117), no ocurriendo así en el caso de la instilación ocular (solución al 1 %) de la resina o sus sales. En el caso de la piel humana no produce irritación, ni sensibilización (118). Para el uso interno solo está autorizado el uso de Carbopol 934 ^{PR} (117).

3.2.1.5.- Incompatibilidades.

Las resinas de Carbopol[®] son incompatibles con fenol, polímero catiónicos, ácidos fuertes y altas concentraciones de electrolitos (117).

3.2.2.- Acido ascórbico.

3.2.2.1.- Características generales.

El 3-oxo-L-gulofuranolactona (122, 123) conocido comúnmente como Acido L-Ascórbico, posee la estructura química recogida en la Figura 8.

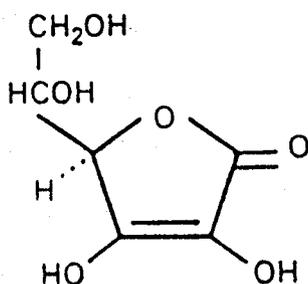


Figura 8.- Estructura del ácido ascórbico.

Se presenta en cristales normalmente planos, a veces en forma acicular, blancos o amarillos (122, 124) con sabor ácido (122, 125). Soluble en agua y parcialmente en alcohol, glicerol y propilenglicol (122, 124, 125). Insoluble en éter, cloroformo, benceno, éter de petróleo (122, 125), aceites, grasas y disolventes de las mismas.

Interfiere con distintas sustancias, bien disminuyendo su disponibilidad metabólica o bien provocando la pérdida de sus características esenciales. Por esta razón el ácido ascórbico (AA) no debe formularse con ácido salicílico (126), salicilato sódico, teobromina sodio salicilato, nitrito sódico, meteramine (122), ácido fólico, cianocobalamina (61), etc.

Es estable en estado seco pero fácilmente oxidado en solución acuosa en presencia de aire (56). La máxima degradación del AA en condiciones aeróbicas se detecta a pH 4, cerca del pK_{a1} del AA y la mínima proporción a pH 5.6 (61).

La oxidación es además acelerada por agentes como: calor, luz (56, 61, 125), álcalis, enzimas oxidativas y trazas de hierro y cobre (56, 61). Gradualmente se oscurece por la exposición a la luz, si bien parece ser que una coloración ligera no debilita la actividad terapéutica de los preparados inyectables de AA (127). Esta oxidación se ve disminuida en presencia de glucosa pudiendo deberse a que la reducción del ácido dehidroascórbico (ADHA) por la glucosa le lleva de nuevo a la formación de AA (128).

3.2.2.2.- Fuentes de obtención.

Se puede encontrar ampliamente distribuido en la naturaleza (animales y plantas) (124, 129) bajo sus formas reducida y oxidada (ADHA). Ambas permanecen, en los sistemas biológicos, en estado de equilibrio reversible y con igual actividad biológica.

La forma comercial se obtiene exclusivamente por síntesis, obtenida por distintos métodos (129).

3.2.2.3.- Actividad biológica.

Parece poco probable que el AA permanezca en el organismo íntegramente bajo su forma reducida, si bien como ADHA puede ser tan efectivo como el principio inmodificado para los requerimientos nutricionales; éste en medio ácido, como el estomacal, está protegido de la hidrólisis pero en sangre debe formar complejos o ser absorbido en los hematíes donde es reducido, tal y como sugirieron HORNIG y cols. (130).

Existen diversas rutas metabólicas, una de las principales es la de oxidorreducción: el AA se oxida a un radical libre intermedio, ácido monodehidroascórbico

(AMDHA), presente en baja concentración en la mayoría de tejidos. Se trata de un radical relativamente poco reactivo (generalmente considerado inócuo), pues no reacciona con el oxígeno, ni aminoácidos, ni con los ácidos nucleicos o los alcoholes. Cuando reacciona lo hace rápidamente bien consigo mismo para dar AA y ADHA o con otros radicales libres culminando así las reacciones de los radicales (129). También puede ser reducido por el sistema enzimático descubierto por STAUDINGER y cols. (130). Se puede formar mediante la reacción rápida de radicales de carbono y oxígeno con el AA (130).

El ciclo de oxidación-reducción en las células vivas termina al volverse a reducir el ADHA a AA por enzimas como la glutathion reductasa (Figura 9) (129).

Otras vías metabólicas son las del ADHA y la del dicetogulonato (130).

3.2.2.4.- Funciones.

El AA tiene la propiedad de actuar como antioxidante (56, 124, 130 - 133). Existe un gran número de definiciones para estas sustancias (133), que podemos englobar como compuestos capaces de proteger, a los alimentos o

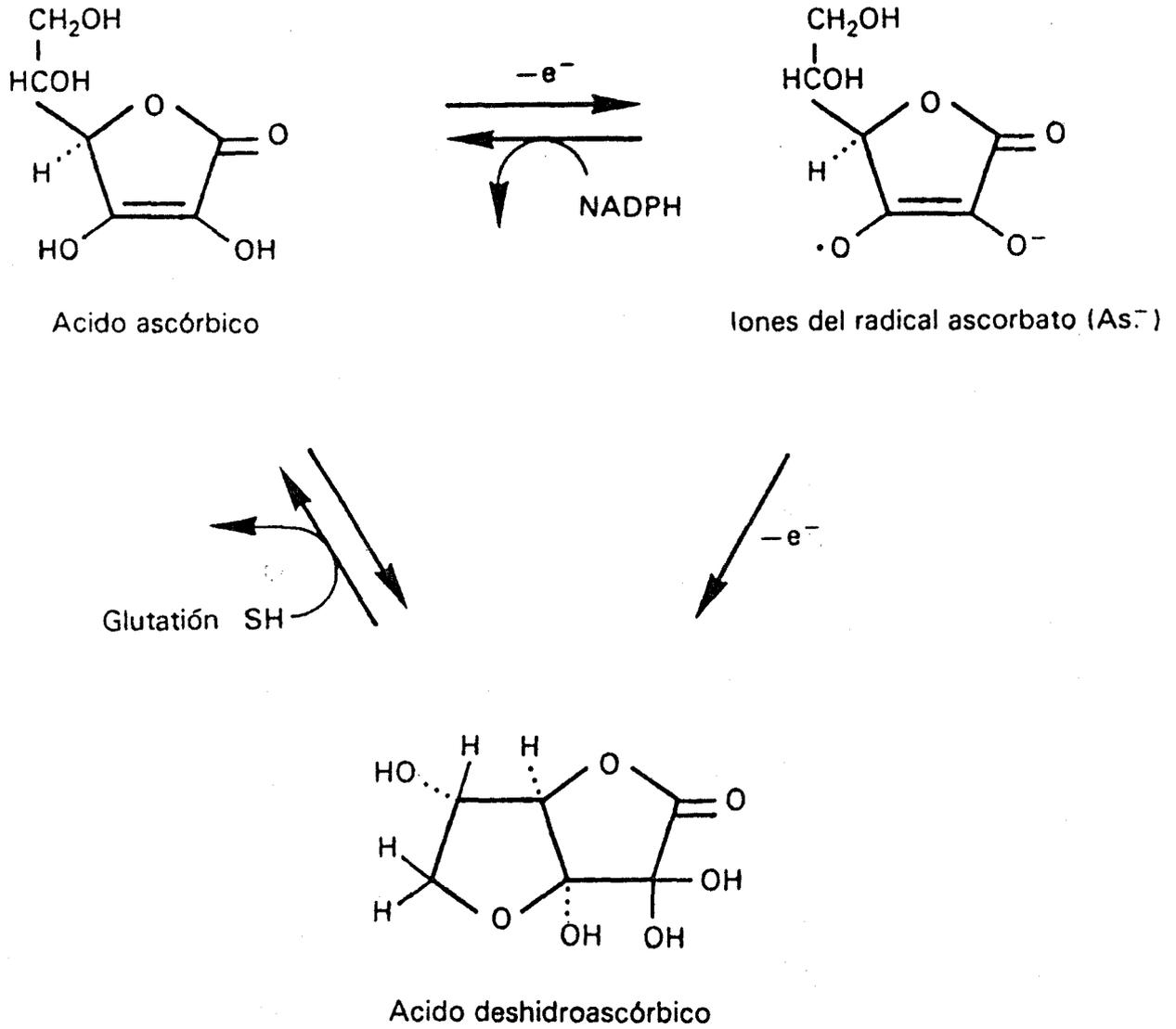


Figura 9.- Ciclo redox del ácido ascórbico.

medicamentos, de las alteraciones oxidativas naturales o provocadas, por la acción del aire, luz, calor, indicios metálicos, etc. Por ello y con esta finalidad preventiva pueden ser adicionadas a los preparados farmacéuticos expuestos a deterioros por procesos oxidativos (56).

Todo antioxidante debe cumplir con una serie de requerimientos (133):

- * ser efectivo y proporcionar un grado de protección satisfactorio a bajas concentraciones,

- * ser adecuadamente soluble en el producto o sustrato oxidable,

- * no ser tóxicos ni irritantes a la concentración efectiva tanto del AA como de sus productos de degradación,

- * ser inodoro e insípido y no colorear el producto,

- * ser estable en un amplio margen de pH,

- * ser compatible con los demás constituyentes del sustrato, y

- * ser poco volátil

Por su propiedad antioxidante, el AA es un protector en los organismos aeróbicos de los tejidos biológicos frente a las especies activadas del oxígeno y del oxígeno simple (130). Es pues un depurador de oxígeno (124) y de radicales libres (69, 130 - 132) reaccionando directamente con ellos por formación del radical intermedio estable (AMDHA) (129).

También puede actuar como: sinérgico (124) potenciando la acción de otros antioxidantes (74, 133); bloqueante en la formación de nitrosaminas, tanto "in vitro" como "in vivo" previniendo con ello el cáncer (85, 134 - 136); regulador metabólico interviniendo en la síntesis de colágeno, en la absorción y movilización del Fe (56, 125, 130, 135, 137), metabolismo del Cu y aminoácidos y como cofactor de oxidasas de función mixta (125, 130).

3.2.2.5.- Toxicidad.

No se conoce toxicidad a la vitamina C, salvo algunos efectos secundarios por administración de dosis elevadas (85, 125, 135).

3.3.- ELABORACION DE PREPARADOS TOPICOS.

3.3.1.- Formulación y técnica preparatoria.

Se han usado como bases dermatológicas geles hidrófilos, cuyas fórmulas se indican a continuación:

	Excip. A	Excip. B
Carbopol ^{R*}	1 g	1 g
Acido ascórbico**	—	0.1 %
Etanol (96 %)	15 mL	15 mL
Trietanolamina*** , c.s.p. pH 5.4 ..	X g	X g
Agua purificada	85 mL	85 mL

Excipiente A: Espolvorear el Carbopol^R en el agua purificada (sin agitar) dejando reposar 24 horas. Pasado este tiempo, añadir la trietanolamina (TEA) y agitar lentamente, para evitar la inclusión de aire (118). Concluir adicionando el etanol de la fórmula. Por otra parte, para obtener el Excipiente B se disuelve el ácido

* Acofarma. Tarrasa (Barcelona)
 ** Acofarma. Tarrasa (Barcelona)
 *** Acofarma. Tarrasa (Barcelona)

ascórbico (AA) en el etanol con la ayuda de un magnetoagitador*.

Previo a la preparación del excipiente se procedió a la determinación de la cantidad de TEA necesaria para la neutralización de los geles (118) y que se requería que fuera alrededor de 5.4 unidades que es el idóneo para la estabilidad del AA (61, 118). Este pH se consiguió con 10 gotas de TEA que correspondían a un volumen aproximado de 3 mL.

3.3.2.- Incorporación de la sustancia activa.

Preparado 1: Se incorpora mediante disolución de 2.5% p/p de α -tocoferol** (α -T) en el etanol que se utiliza para la elaboración del excipiente A.

Preparado 2: Se obtiene por incorporación de α -T al Excipiente B. Dada la menor solubilidad del AA en etanol (122, 124, 125) se interpuso éste primero (según técnica anteriormente aludida), para posteriormente, adicionar el principio activo.

* SBS^R Mod. A-06

** dl- α -tocoferol. F. Hoffman - La Roche and Co. Basel (Suiza)

Una vez formulados los distintos preparados al 2.5 % p/p en α -T (138), se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante las 24 horas posteriores a la elaboración y previas al inicio de los ensayos.

3.4.- ENSAYOS GALENICOS.

Se han llevado a cabo una serie de ensayos tanto a excipientes A y B como al preparado 2, con objeto de determinar cual es el más aceptable desde un punto de vista galénico.

3.4.1.- Viscosidad.

Se realizó este ensayo utilizando un viscosímetro rotatorio* de cilindros coaxiales con el concurso del "spindle" 7.

Este parámetro se determinó a distintas velocidades de deformación: 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 y 100 revoluciones por minuto (rpm).

* Brookfield Mod. RVT

En todos los casos, el viscosímetro giró durante 1 minuto permaneciendo en reposo 30 segundos. Tras alcanzar la máxima velocidad (100 rpm), cada preparación se mantuvo en reposo (15 minutos), con el fin de que recuperase su estructura inicial. Pasado este tiempo, se volvió a repetir la medición si bien se empezó por la velocidad de cizalla superior y concluyó con la inferior.

Para la determinación de las viscosidades aparentes se procedió según la documentación técnica del aparato (139); multiplicando cada valor, obtenido por lectura directa del dial viscosímetro, por un factor relacionado con el "spindle" y las distintas velocidades de cizalla utilizadas.

Se establecieron los períodos de tiempo de 24 horas, 1 y 2 meses desde la elaboración de excipientes y preparados tópicos, con el fin de determinar las modificaciones reológicas ocasionadas por adición de nuevas sustancias.

3.4.2.- Extensibilidad.

3.4.2.1.- Método.

Se ha seguido el método descrito con anterioridad por algunos autores (140) y modificado convenientemente por LEON y cols. (141 - 145) para lo cual se empleó un microtomo manual* de características:

- . platina perfectamente plana con 5 cm de diámetro
- . hueco de tornillo con 1.2 cm de diámetro
- . paso de rosca de 0.68 mm

El tornillo micrométrico se colocó en la posición 1 - correspondiente a una vuelta completa del mismo, desde su posición cero- rellenándose la oquedad producida tanto con los Excipientes A y B como con el Preparado 2. Tras conseguir una superficie lisa y una platina libre de restos de producto, se giró de nuevo el tornillo hasta la posición cero, con lo que quedaron al mismo nivel éste y la platina formándose un cilindro de producto (por encima del nivel de la platina). Después de esta operación previa se colocaron sobre el cilindro de muestra y en condiciones normales de

* Tipo Ranvier

temperatura, una secuencia de pesos de 80, 150, 300 y 500 gramos respectivamente, durante 1 minuto de tiempo cada uno, con intervalos de reposo de medio minuto.

3.4.2.2.- Técnica de medición.

Para evaluar la estabilidad de los excipientes, así como del Preparado tópico 2, se siguió la técnica de LEON y cols. (142 - 145); para lo cual, transcurridos cada uno de los tiempos de acción de los pesos (1 minuto), se impresionaron placas fotográficas* de la superficie ocupada por la extensión de cada muestra**, situada ésta siempre a la misma distancia focal -objetivo / muestra- y sobre la que incidió un foco luminoso de situación e intensidad constantes.

Una vez obtenidas las placas se procedió al revelado de las mismas siempre con el mismo aumento.

Por último, se determinó la superficie en cada muestra sobre las placas fotográficas, utilizando un planímetro***.

* Kodak Tmax 400

** Nikon 501, lente aproximación 5+

*** Staedtler Mars 927

Con objeto de facilitar tal operación, se fijaron ésta y las copias a una superficie completamente plana, procediéndose, a continuación, a la lectura directa de los perímetros obtenidos en los casos estudiados.

Al igual que en el estudio de la viscosidad, se establecieron los periodos de tiempo de 24 horas, 1 y 2 meses desde la elaboración de los excipientes y el preparado tópico.

3.4.3.- Estabilidad.

3.4.3.1.- pH.

El pH de los preparados tópicos fué otro parámetro más en estudio por ser indicativo de la estabilidad de las preparaciones respecto del tiempo.

Por otra parte, el seguimiento de este valor en el intervalo de 4 a 7 unidades era además necesario en estos preparados al ser el óptimo por estar destinados a ser aplicados sobre la piel, sin riesgo de que este tegumento sufra indeseables irritaciones o alteraciones (146).

Al mismo tiempo, el estudio del pH se realizó en los dos Excipientes, A y B, de forma exhaustiva, debido a que el AA posee un estrecho intervalo para la máxima estabilidad; en caso contrario, se produciría la oxidación de esta sustancia y en consecuencia, el favorecimiento de un ambiente reductor del medio circundante (61).

Para efectuar este ensayo se ha utilizado un pHmetro* realizando las mediciones por contacto directo del electrodo** con los distintos excipientes.

Con el fin de detectar posibles variaciones, se determinó el pH de las muestras a las 24 horas, 1 y 2 meses después de su elaboración.

* Type M - 80 Portable

** Crison

3.5.- ESTUDIO ANALITICO DEL α -TOCOFEROL.

Para realizar este ensayo se han utilizado los Preparados 1 y 2.

3.5.1.- Método de extracción.

0.5 gramos de muestra (Preparados 1 ó 2) fueron tratados hasta disolución completa con etanol absoluto purísimo* (EAP). A la solución obtenida (10 mL) se le adicionaron otros 5 mL de reactivo, provenientes del arrastre por lavado del recipiente contenedor. Posteriormente, este volumen es filtrado con ayuda del vacío (asociación embudo Buschner - matraz Kitasato y trompa de agua**). A la fracción de filtrado se le adicionaron otros 5 mL de EAP, empleados para recuperar las trazas de producto existentes en el equipo filtrante. Por último, se llevó el enrase hasta el volumen de 20 mL debido a la evaporación del disolvente durante el proceso de filtración. En el supuesto de que el rendimiento de la extracción fuese máximo, cabría esperar una concentración en α -T equivalente a 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

* Panreac. Barcelona

** Anorsa

3.5.2.- Técnica analítica.

La valoración del α -T se ha llevado a cabo mediante un cromatógrafo líquido-líquido de alta resolución (HPLC)* que consta de una bomba con dos pistones**, un detector ultravioleta - visible de longitud de onda variable*** y un registrador°. El inyector está ocupado con un "loop" de 20 μ L. La columna ODS (22 cm x 4.6 mm) es empaquetada con C18 Spherical de 5 μ m°. La fase móvil ha sido metanol 100 %*** y se ha hecho pasar a una velocidad de flujo de 1.2 mL / min. La absorbancia del eluyente es monitorizada a una longitud de onda de 292 nm para detectar el α -T. La cuantificación se ha llevado a cabo por medición de las alturas de los picos registradas a una velocidad de 30 cm / h .

3.5.3.- Pruebas de validación del método.

Se han preparado diferentes soluciones patrones: α -T en EAP, AA en EAP y mezcla de α -T y AA en EAP. Todas ellas a una concentración de 62.5 μ g / mL. Con ello se

* Kontron Instrument

** Mod. 420

*** Mod. 432

° Varian Techtron Mod. 135A

•• ODS Spheri-5. C18 polyfunctional 5 μ m Spherical

••• Merck. Darmstadt (Alemania)

pretendió determinar a través de los cromatogramas correspondientes (Figura 10) los tiempos de retención de cada una de las sustancias disueltas y la posible interferencia entre ellas.

Dada la inestabilidad física del α -T (31, 56 - 59) y del AA (61, 118, 128) se procedió a elaborar una solución patrón cada día de trabajo. La cuantificación de las muestras objeto de estudio se ha llevado a cabo por comparación con la solución patrón correspondiente a ese día.

3.5.4.- Variación del contenido en α -tocoferol.

Este ensayo se ha llevado a cabo con el fin de determinar la cantidad de α -T que se va degradando en función del tiempo. Para ello, se ha seguido la técnica de extracción descrita anteriormente.

Inicialmente se determinó la cantidad de α -T y AA para justificar que la vitamina C actuaba como antioxidante, tanto de la fórmula elaborada como del principio activo (p.a.).

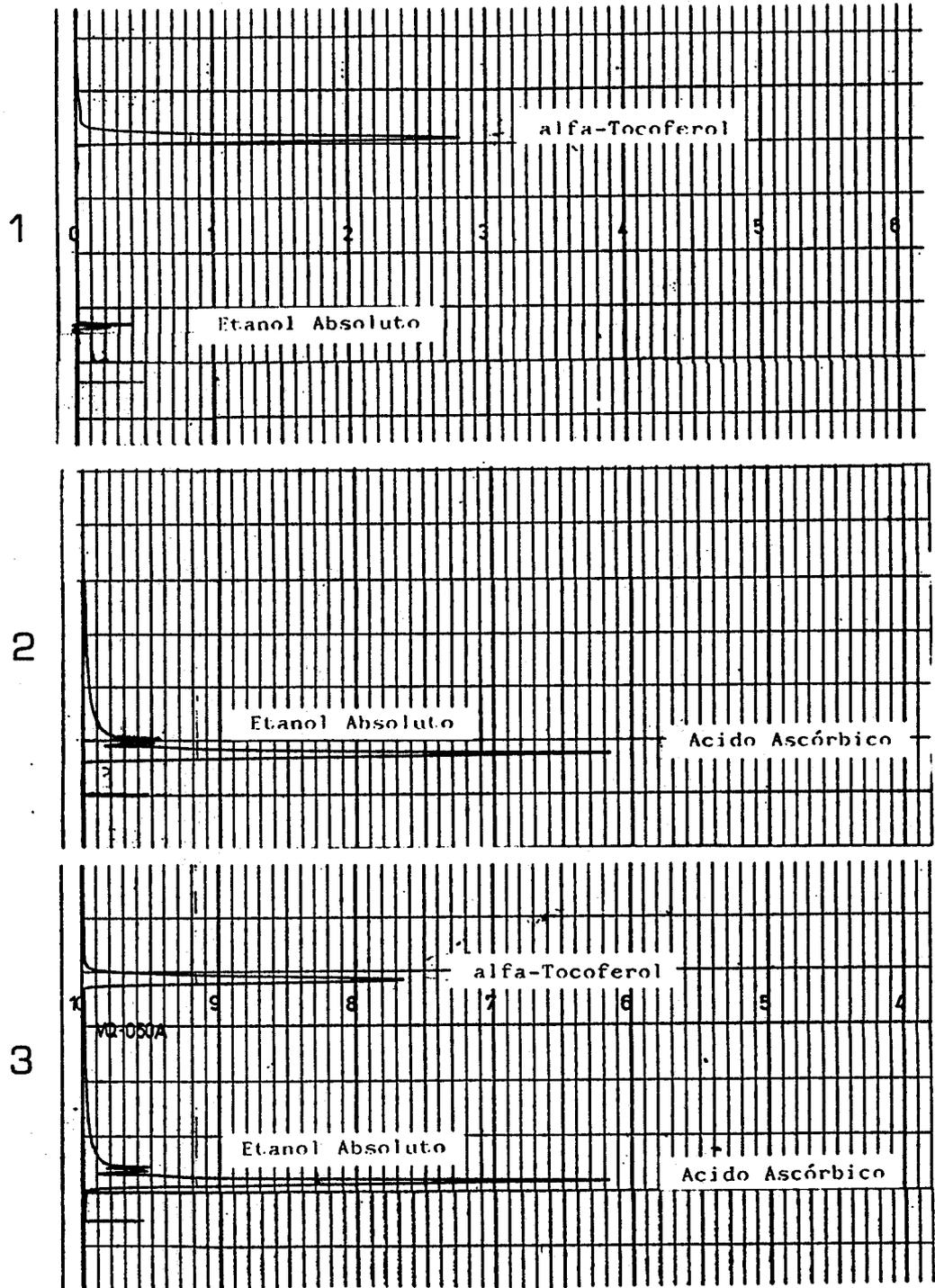


Figura 10.- Cromatogramas de las soluciones patrón de α -tocoferol (1), ácido ascórbico (2) y una mezcla de α -tocoferol y ácido ascórbico (3) en etanol absoluto .

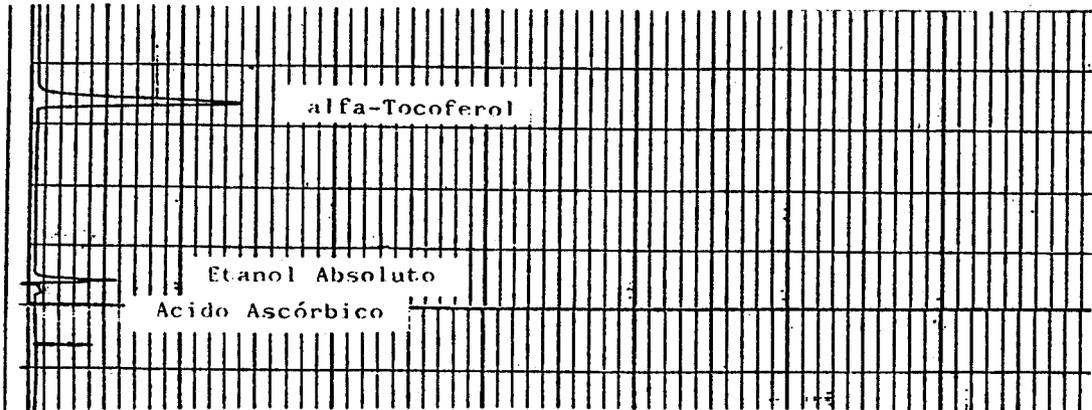


Figura 11.- Cromatograma previa extracción del Preparado 2.
(sensibilidad del detector: 0.1)

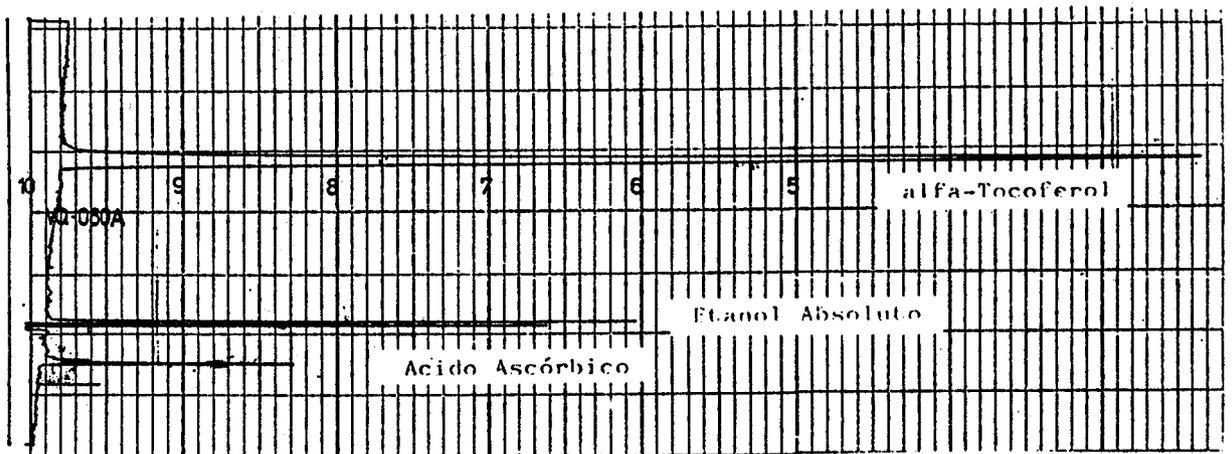


Figura 12.- Cromatograma previa extracción del Preparado 2.
(sensibilidad del detector: 0.01)

Se ha cuantificado la cantidad de p.a. presente en los Preparados semisólidos 1 y 2 en las condiciones ya mencionadas. Para ello se han realizado diluciones para obtener una concentración aproximada de 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de $\alpha\text{-T}$ con independencia del excipiente utilizado.

Por otra parte y en las condiciones en que se llevó a cabo este ensayo, el AA no se pudo cuantificar como consecuencia de su concentración (0.1 % en Excipiente B y Preparado 2) (Figura 11). Ahora bien, se modificaron las condiciones de trabajo del HPLC convenientemente para detectar esta sustancia. Se observó que la cantidad presente en la formulación (Preparado 2) iba disminuyendo conforme transcurría el tiempo de almacenamiento, mientras que el $\alpha\text{-T}$ permanecía aparentemente dentro del mismo rango de concentración (Figura 12).

3.6.- ESTUDIO PATOLOGICO: PROMOTORES DE RADICALES LIBRES.

Como se indicó en la parte general de esta Memoria, la Teoría de Radicales Libres es una de las causas fundamentales de algunos estados degenerativos celulares y tisulares.

Estas especies reactivas poseen un tiempo de duración muy breve (décimas de segundo) por lo que no se han podido aislar (44). Como consecuencia, para poder trabajar con ellos, nos vimos obligados a recurrir a especies promotoras de dichos radicales.

De entre las muchas sustancias existentes hemos elegido la doxorubicina (DOX), antineoplásico por excelencia que provoca necrosis del tejido en el lugar de la extravasación de la inyección intradérmica.

3.6.1.- Necrosis tisular: doxorubicina.

3.6.1.1.- Material no biológico.

A todos los animales se les ha administrado doxorubicina* por vía intradérmica, con jeringa de 1 mL y aguja del calibre 25 G.

Tras los estudios realizados con anterioridad por LUCERO y cols. (138) hemos seleccionado la cantidad de 0.05 mg doxorubicina por ser la que suministra una lesión dérmica adecuada para la consecución de este estudio. Se

* clorhidrato de doxorubicina. Farmiblastina^R. Farmitalia

han inyectado 0.025 mL de solución de doxorubicina en solución salina fisiológica.

3.6.1.2.- Reactivo animal.

Se han empleado un total de 15 ratas hembras de la raza Wistar de peso medio de 310 g, suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina de Sevilla. La alimentación proporcionada a todos los animales, antes y después de someterlos a esta prueba, ha sido a base de piensos* y agua "ad libitum". La habitación donde permanecieron las ratas se encontraba a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Sobre el total de 15 animales se establecieron 3 grupos de 6 efectivos respectivamente.

Los dorsos de todos los animales se rasuraron con una máquina manual**, 24 horas antes de comenzar el ensayo, con el fin de que la piel estuviese en su mejor estado.

Pasado este tiempo se les anestesió con 0.04 mL de

* Pamlab^R

** Gurelan^R no 0000-A

clorhidrato de ketamina* por vía intramuscular, previa inducción con éter etílico**.

A continuación se procedió a la aplicación de los distintos preparados conforme a los grupos siguientes:

. Grupo control: constituido por 3 ratas que fueron tratadas únicamente con doxorubicina en los dos lomos.

. Grupo E: formado por 6 animales, los cuales fueron tratados en su lomo derecho con el Preparado 1 y en el izquierdo con el Excipiente A.

. Grupo E - C: constituido por 6 ratas a las que se le aplicó en el lomo derecho el Preparado 2, mientras que en el izquierdo fué tratado con el Excipiente B.

Todos los grupos, excepto el control, recibieron una aplicación / día de los respectivos geles, durante dos días consecutivos y previos a la inyección de doxorubicina. Inmediatamente antes y después de esta administración se aplicaron de nuevo los correspondientes preparados.

* 100 mg / mL. Ketolar^R. Parke Davis

** Panreac. Barcelona

3.6.1.3.- Lesiones.

Se efectuaron observaciones macroscópicas de todos los animales en los 30 días subsiguientes al comienzo del ensayo. Dado que es factible la existencia de sesgo observacional, se ha realizado dicho estudio y las observaciones macroscópicas a doble ciego. Al sexto día (138), se midieron los diámetros de las úlceras con un calibrador utilizado habitualmente para tal efecto.

A partir del estudio macroscópico se establecieron las observaciones más significativas, asignándoseles los siguientes valores a los distintos grados de incidencia:

- * Fibrosis en formación (+): 10
- * Fibrosis en formación (++) : 20
- * Fibrosis en formación (+++) : 30
- * Fibrosis en formación (++++): 40
- * Fibrosis establecida: 50

RESULTADOS

4.1.- ENSAYOS GALENICOS

4.1.1.- REOLOGIA

4.1.1.1.- VISCOSIDAD

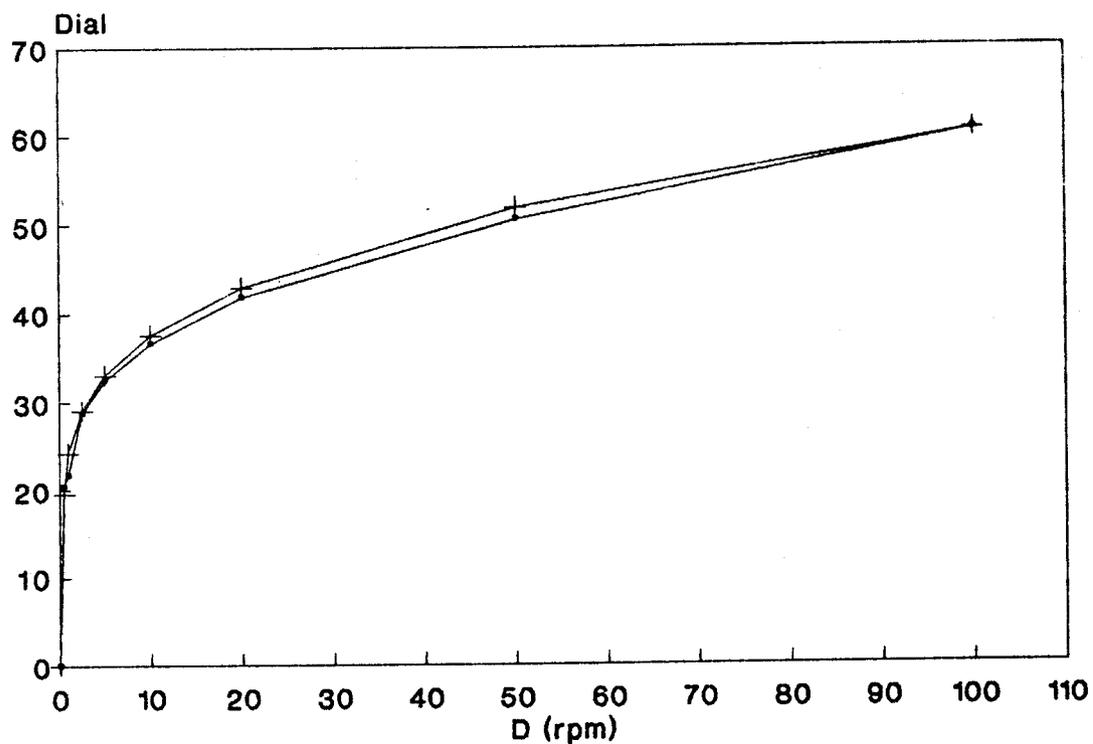


Figura 13.- Reograma del Excipiente A a las 24 horas de su elaboración.

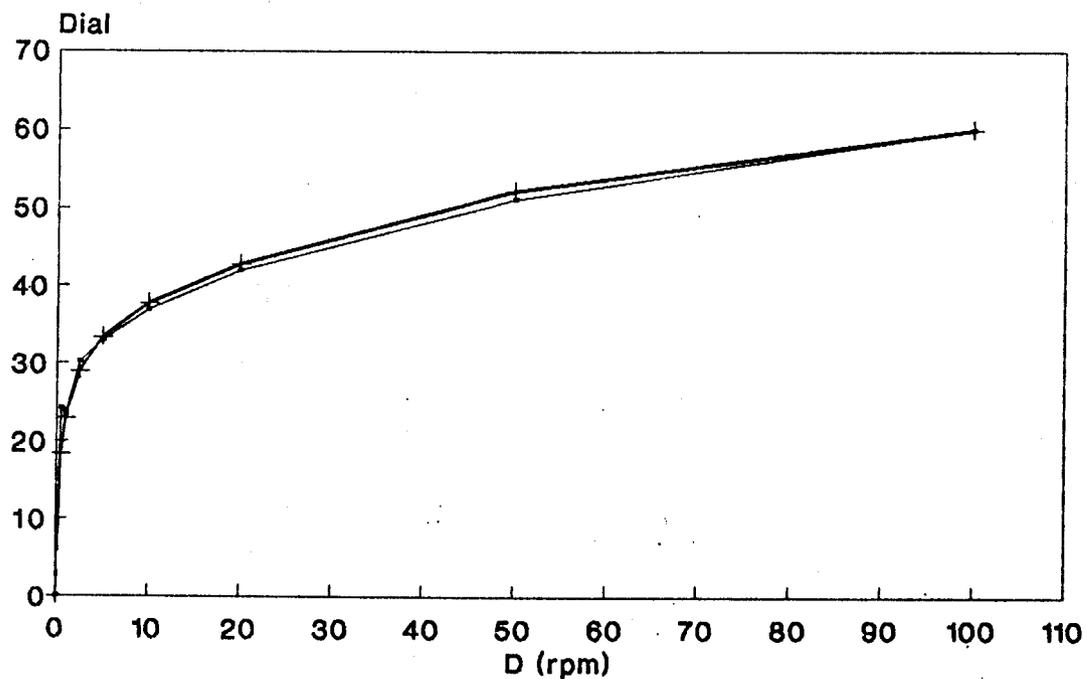


Figura 14.- Reograma del Excipiente A al mes de su elaboración.

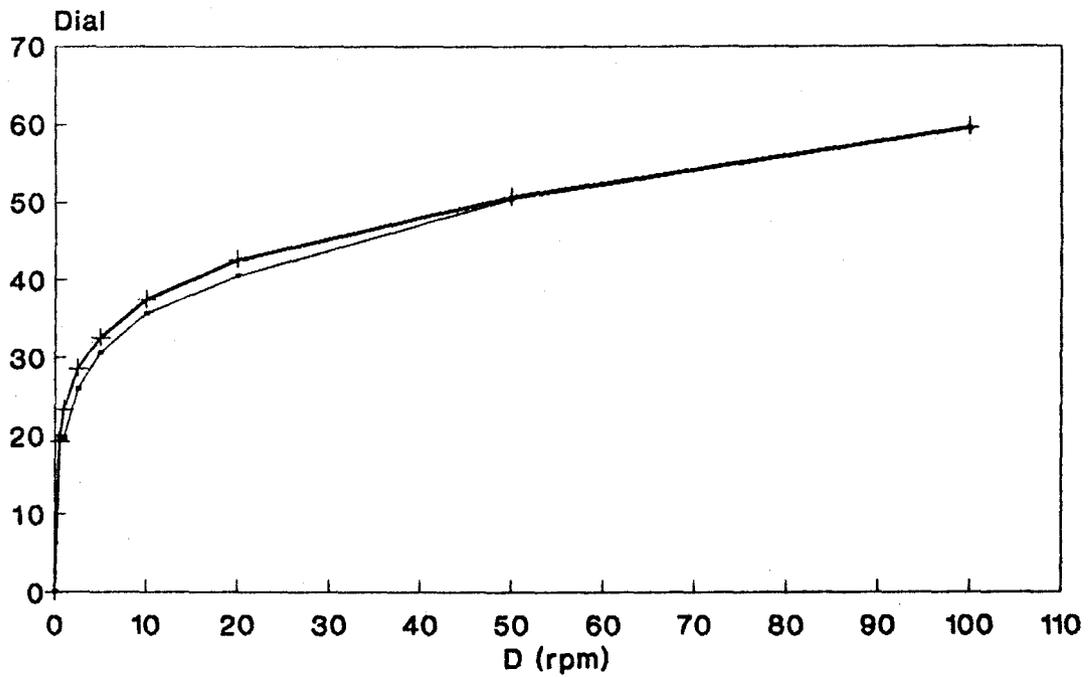


Figura 15.- Reograma del Excipiente A a los 2 meses de su elaboración.

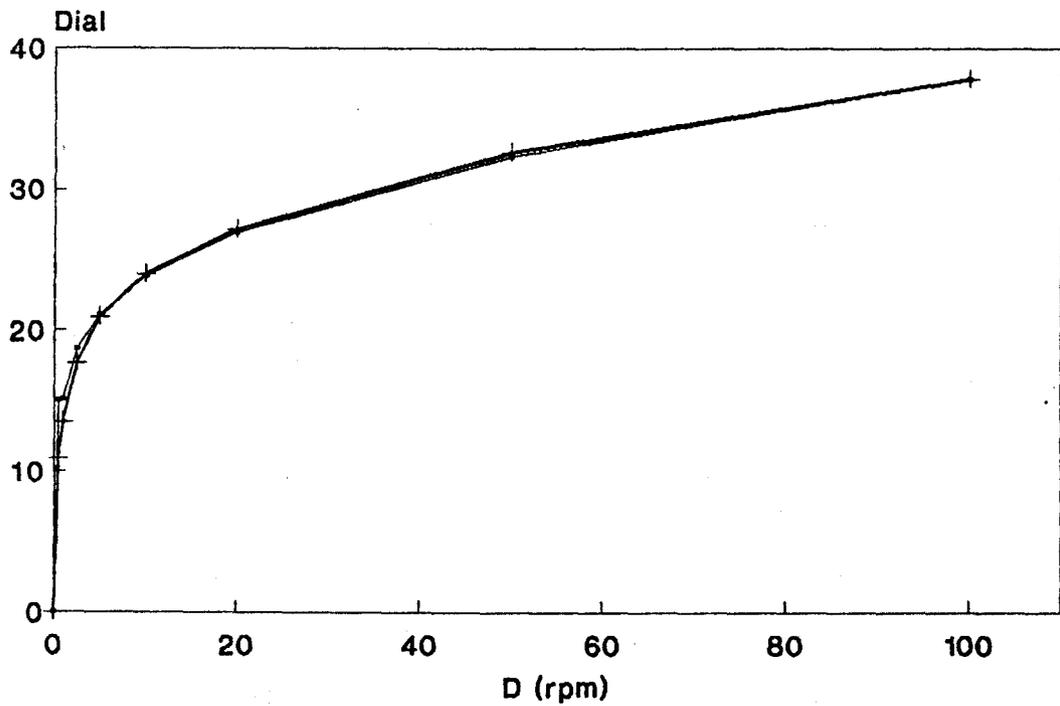


Figura 16.- Reograma del Excipiente B a las 24 horas de su elaboración.

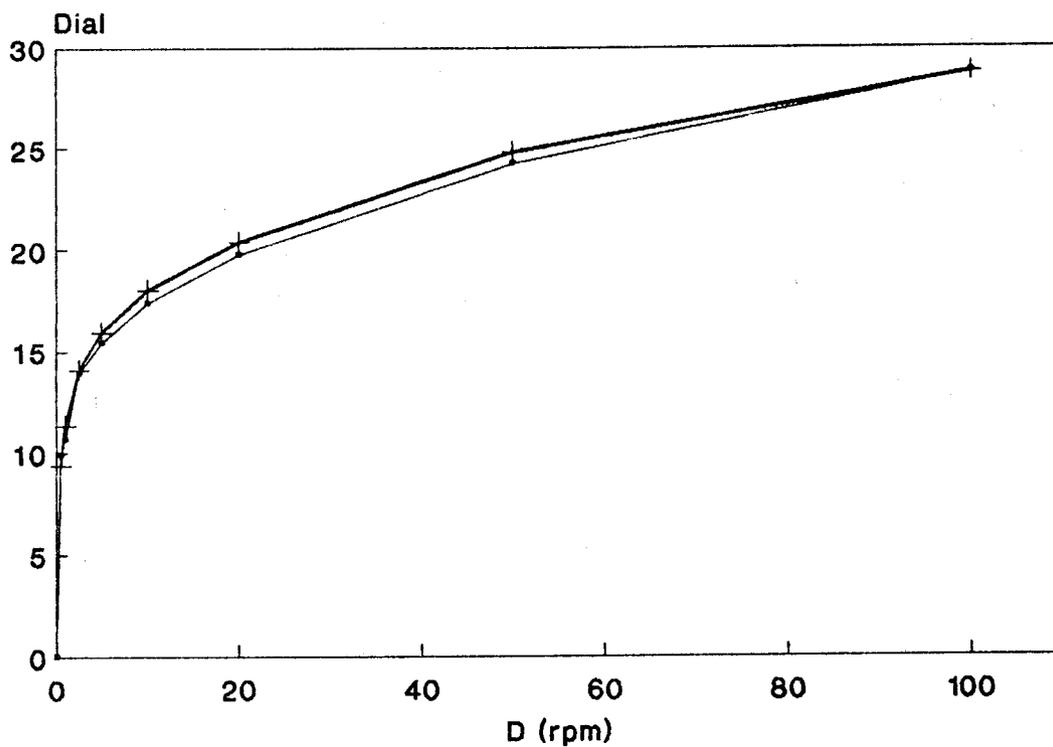


Figura 17.- Reograma del Excipiente B al mes de su elaboración.

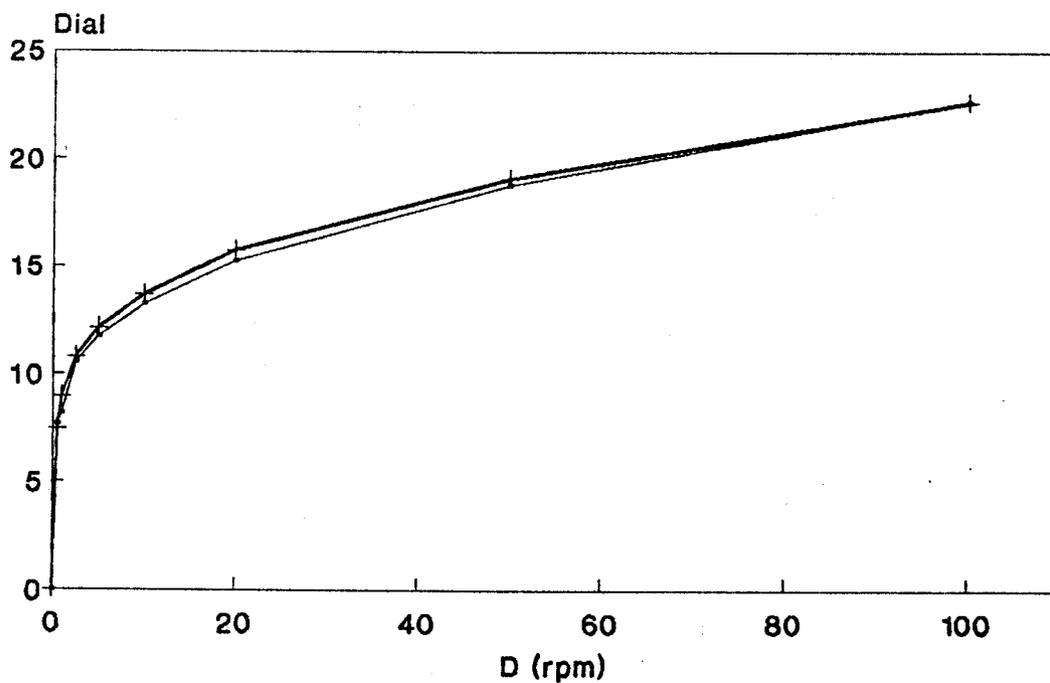


Figura 18.- Reograma del Excipiente B a los 2 meses de su elaboración.

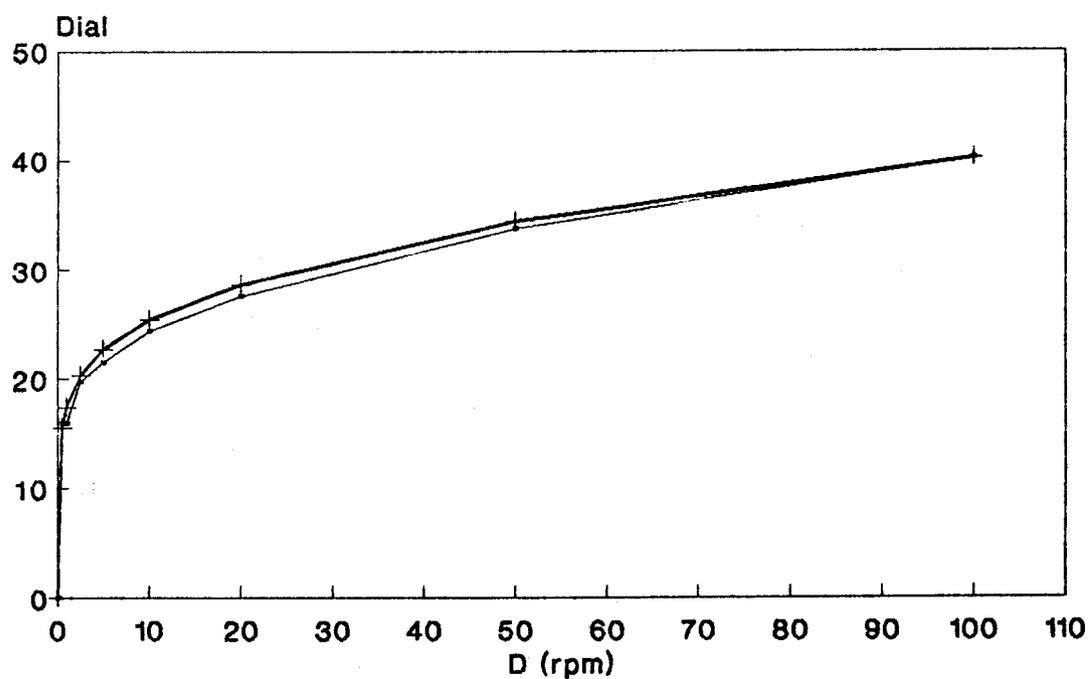


Figura 19.- Reograma del Preparado 2 a las 24 horas de su elaboración.

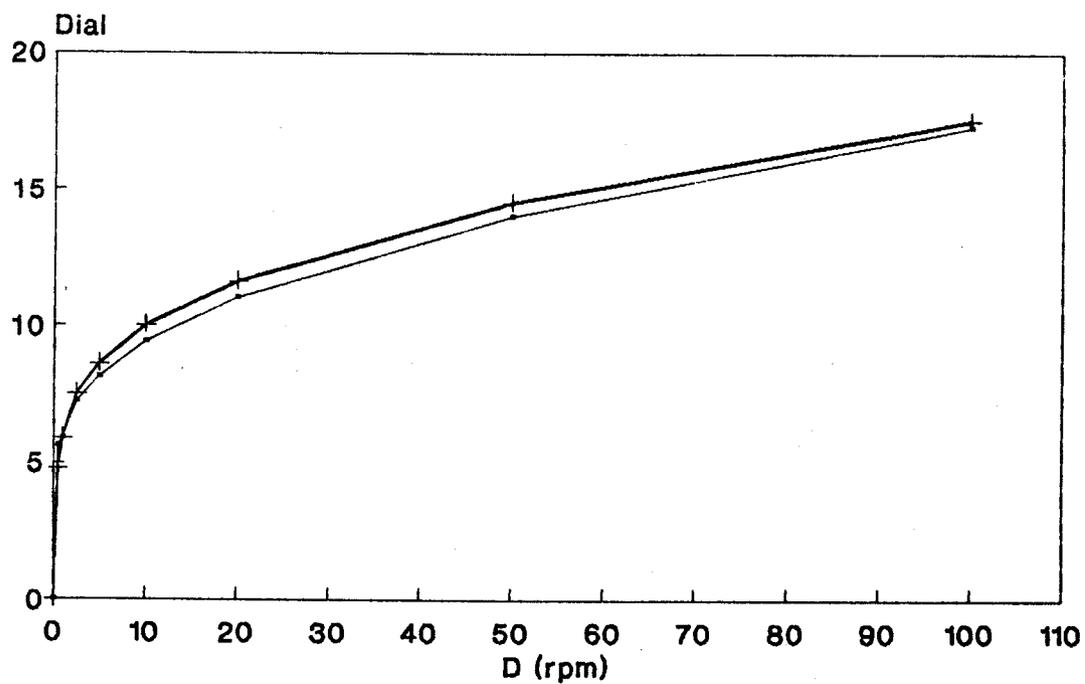


Figura 20.- Reograma del Preparado 2 al mes de su elaboración.

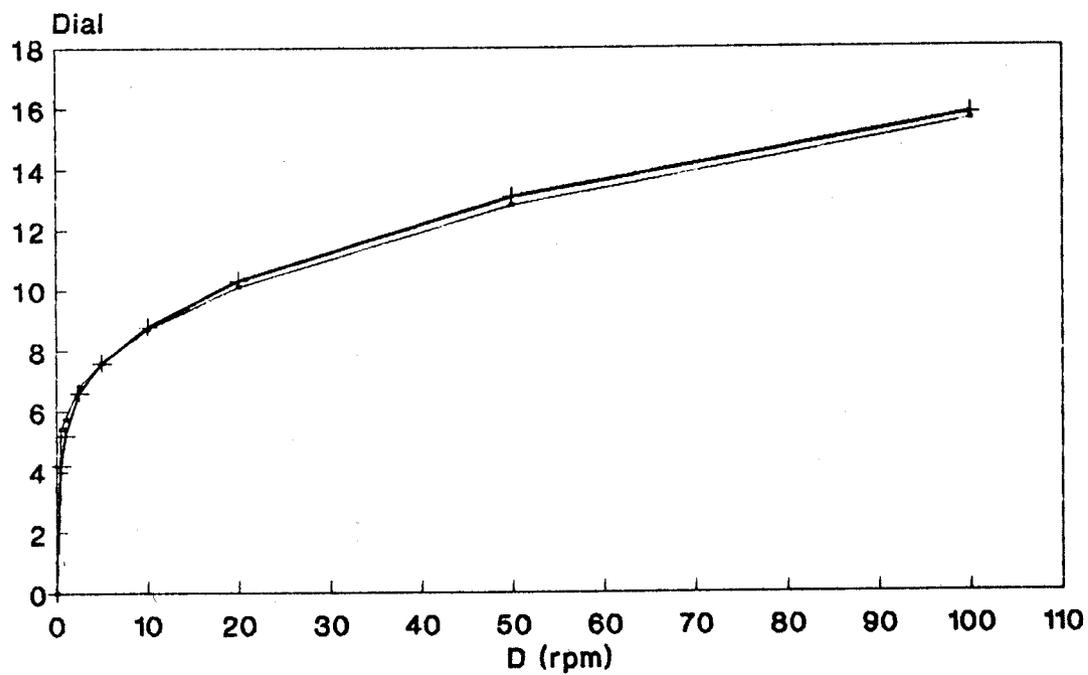


Figura 21.- Reograma del Preparado 2 a los 2 meses de su elaboración.

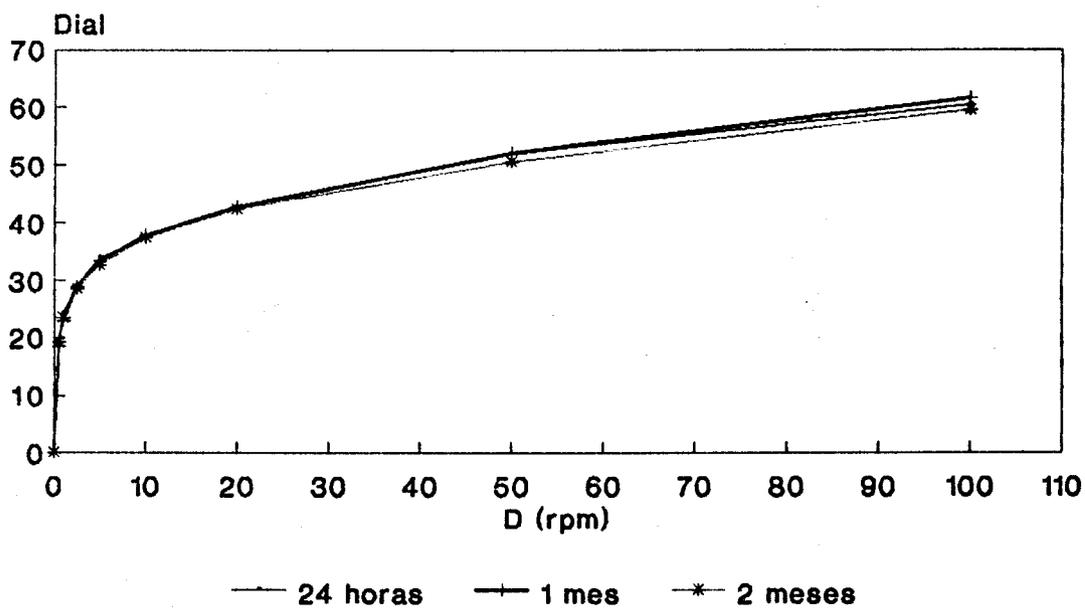


Figura 22.- Ramas descendentes de los reogramas del Excipiente A en los tiempos indicados.

MUESTRAS	TIEMPO	n	k	r _{xy}
Excipiente A	24 horas	0.1967	24.1013	0.9995
	1 mes	0.2074	23.4196	0.9986
	2 meses	0.1991	23.5424	0.9996
Excipiente B	24 horas	0.2162	14.2079	0.9961
	1 mes	0.1981	11.4961	0.9988
	2 meses	0.1980	8.8617	0.9981
Preparado 2	24 horas	0.1788	17.1380	0.9980
	1 mes	0.2304	5.9331	0.9991
	2 meses	0.2368	5.1935	0.9989

Tabla 1.- Indices de flujo (n) y de consistencia (k) para las distintas formulaciones.

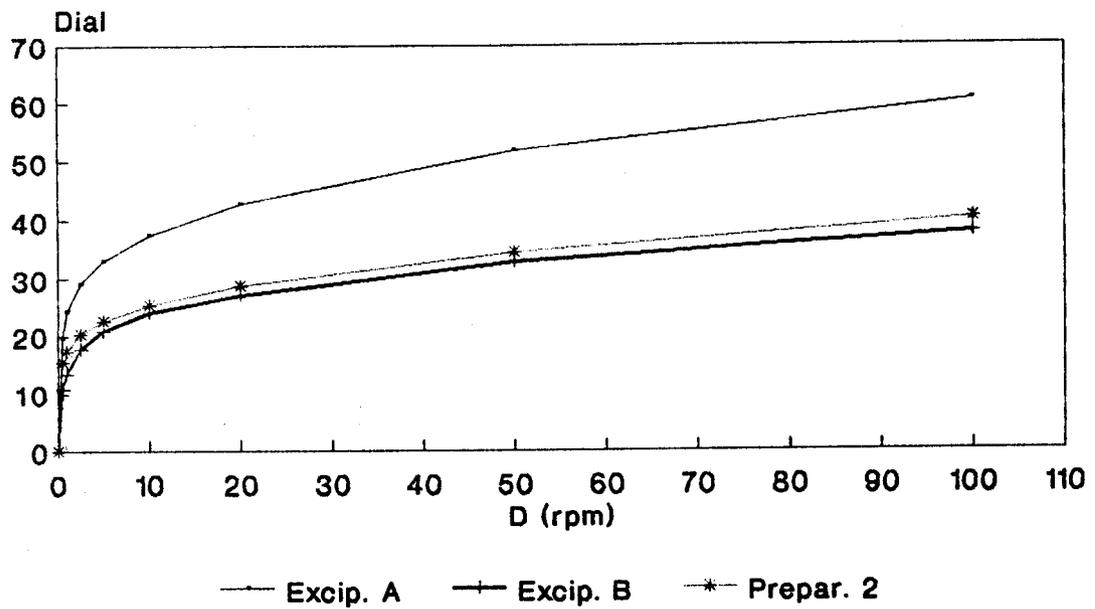


Figura 23.- Ramas descendentes de los reogramas de las formulaciones indicadas a las 24 horas de su elaboración.

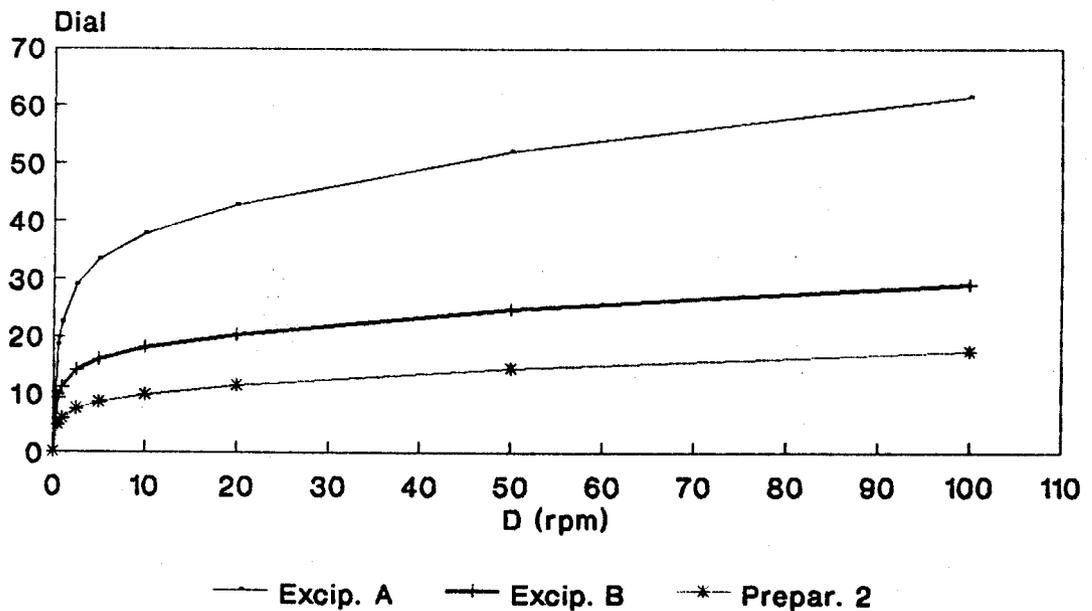


Figura 24.- Ramas descendentes de los reogramas de las formulaciones indicadas al mes de su elaboración.

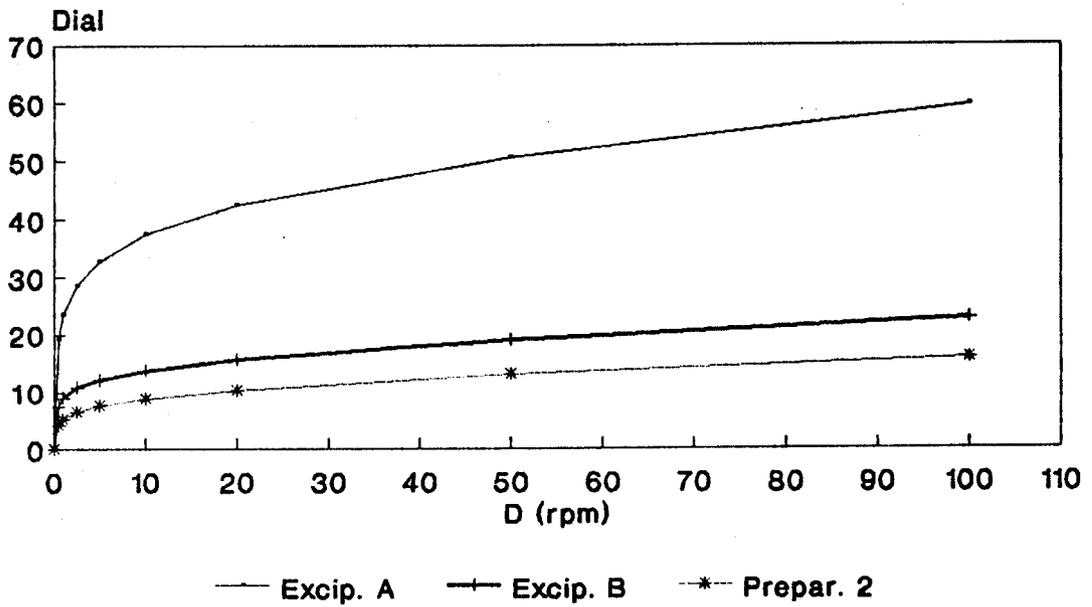


Figura 25.- Ramas descendentes de los reogramas de las formulaciones indicadas a los 2 meses de su elaboración.

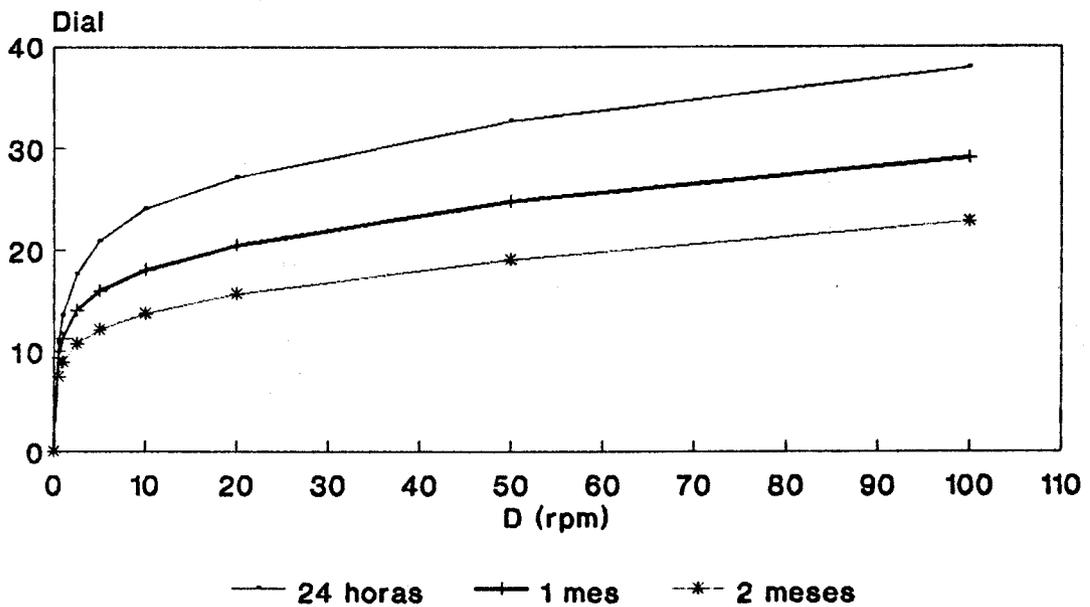


Figura 26.- Ramas descendentes de los reogramas del excipiente B en los tiempos indicados.

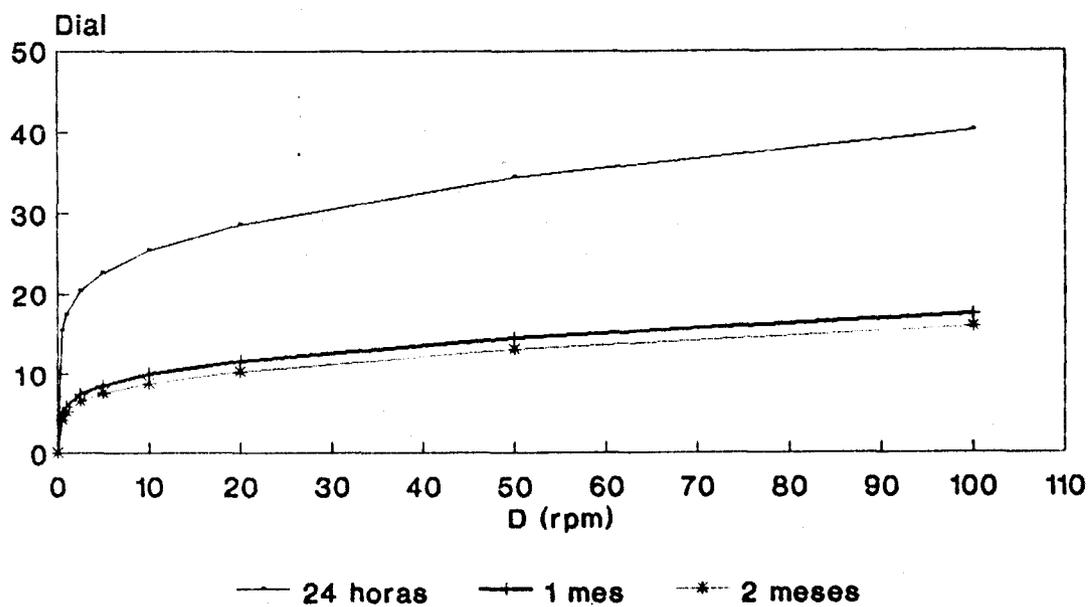


Figura 27.- Ramas descendentes de los reogramas del Preparado 2 en los tiempos indicados.

4.1.1.2.- EXTENSIBILIDAD

MUESTRAS	TIEMPO	PESO 1 (80 g)	PESO 2 (150 g)	PESO 3 (300 g)	PESO 4 (500 g)
Excipiente A	24 horas	3.3061	3.5918	5.1020	6.4670
	1 mes	2.4793	3.3058	4.3618	4.5914
	2 meses	2.2924	2.8547	3.3304	3.7509
Excipiente B	24 horas	2.8228	3.6760	4.6902	5.6275
	1 mes	3.2748	4.6157	5.5176	6.0414
	2 meses	3.7340	4.7682	6.1755	6.6757
Preparado 2	24 horas	2.8063	3.2498	5.0304	5.7566
	1 mes	4.7892	5.6759	6.5654	6.8778
	2 meses	4.4035	5.4216	6.3323	7.3234

Tabla 2 .- Superficies obtenidas (cm²) de las formulaciones indicadas en función del tiempo y pesos aplicados.

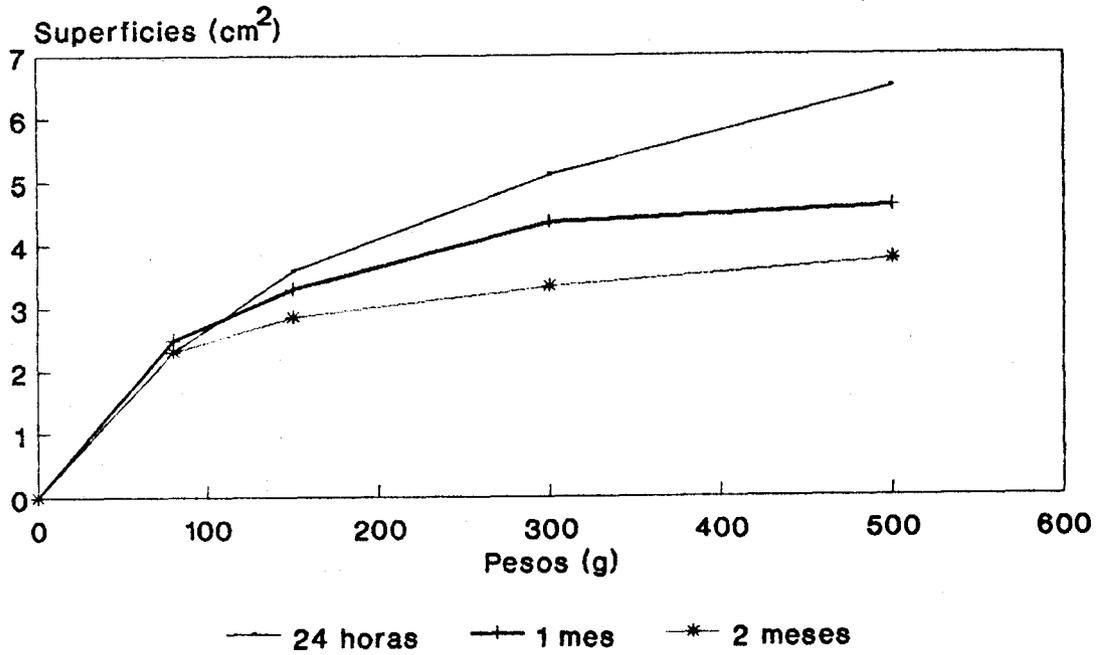


Figura 28.- Extensibilidad del Excipiente A en los tiempos indicados.

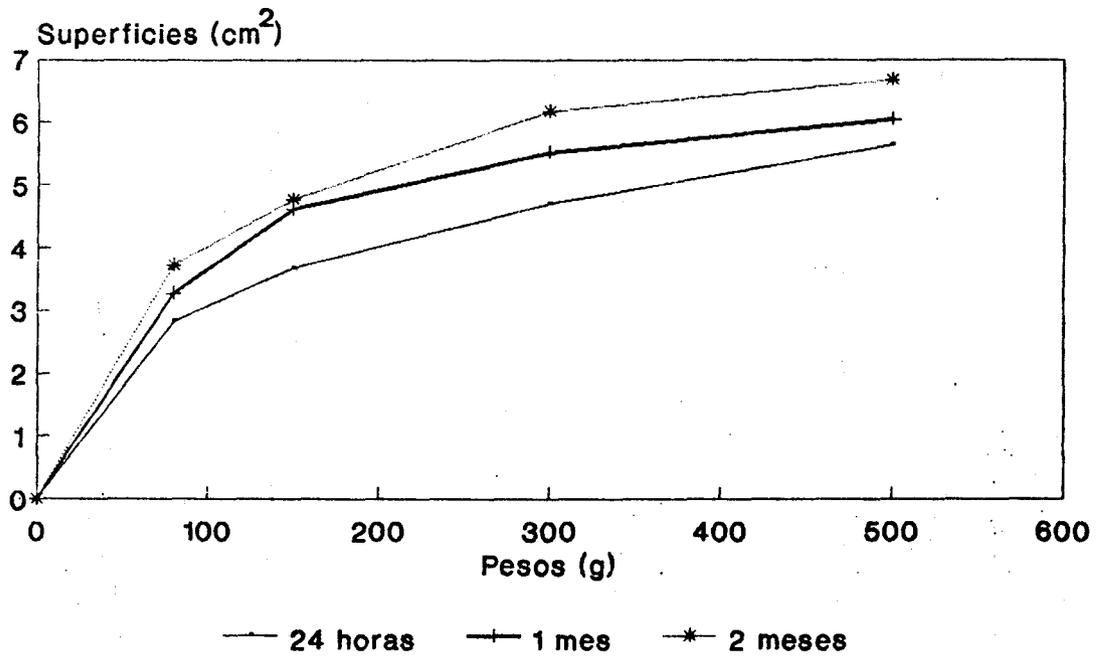


Figura 29.- Extensibilidad del Excipiente B en los tiempos indicados.

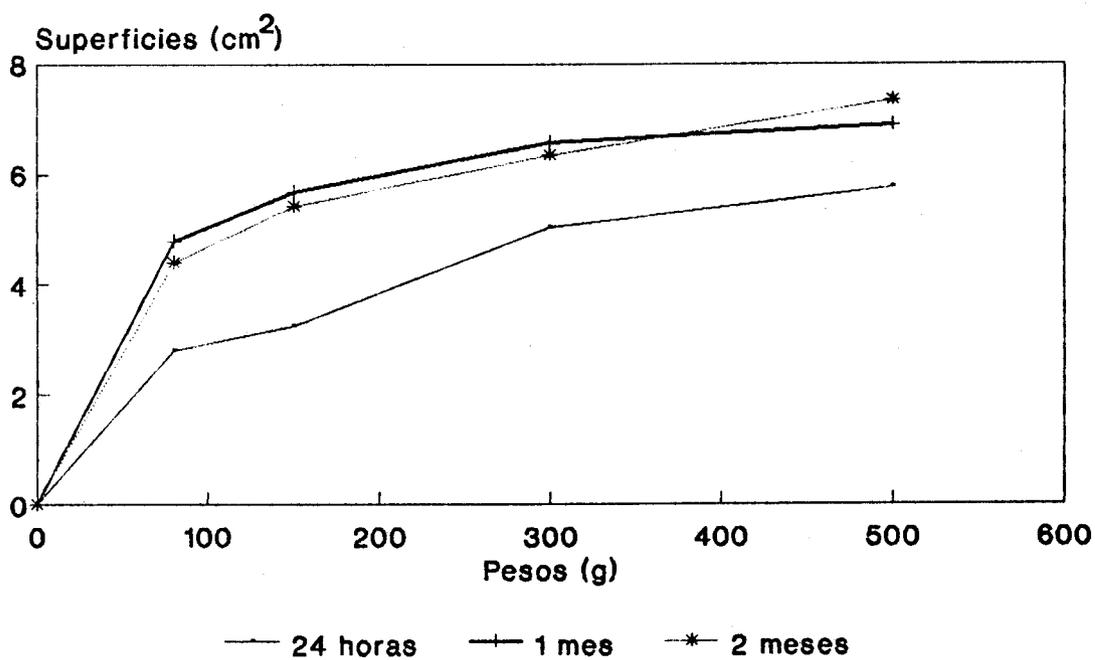


Figura 30.- Extensibilidad del Preparado 2 en los tiempos indicados.

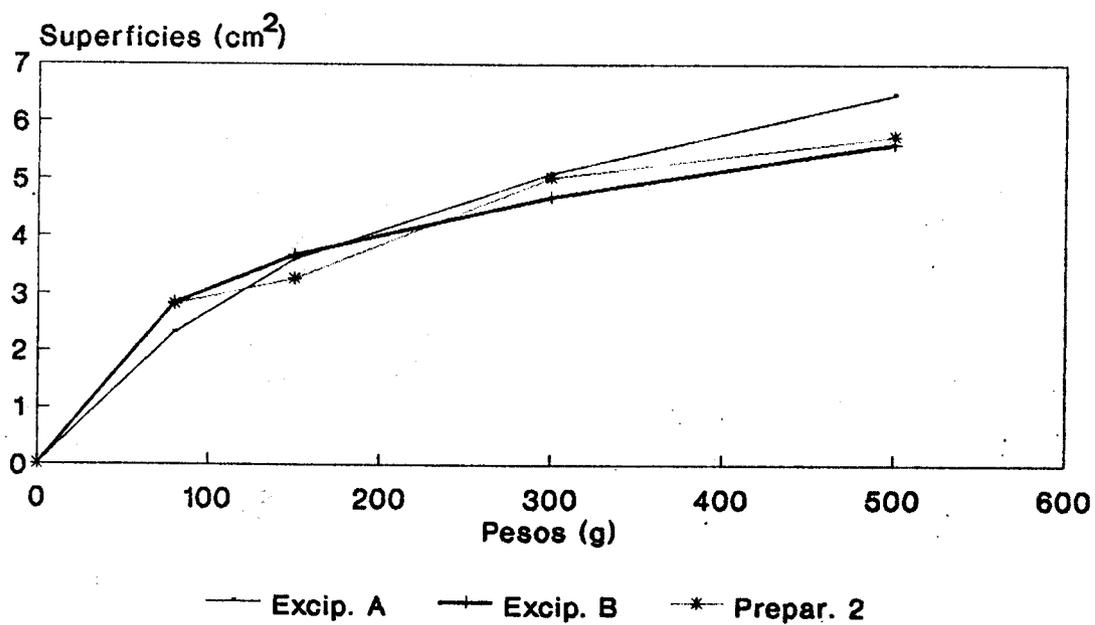


Figura 31.- Extensibilidad de las formulaciones indicadas a las 24 horas de su elaboración.

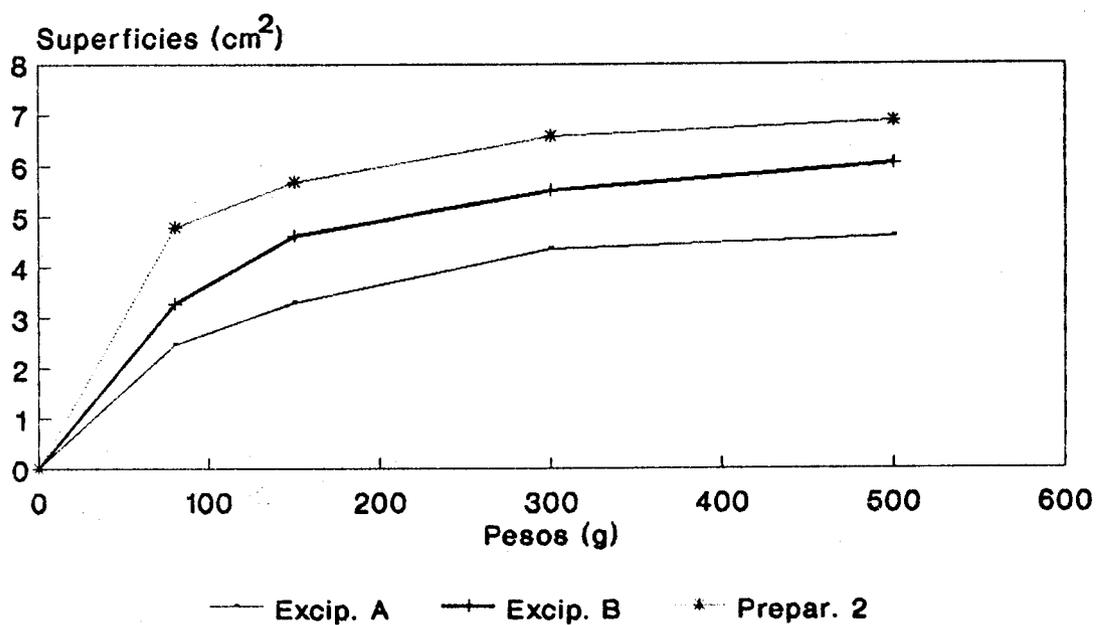


Figura 32.- Extensibilidad de las formulaciones indicadas al mes de su elaboración.

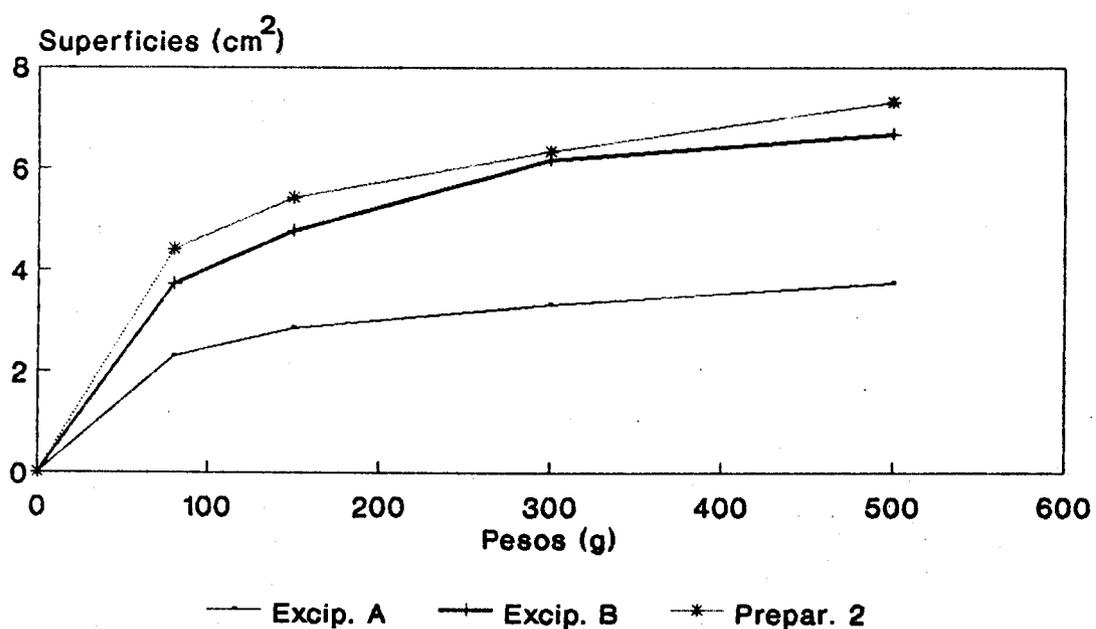


Figura 33.- Extensibilidad de las formulaciones indicadas a los 2 meses de su elaboración.

4.1.2.- ESTABILIDAD

4.1.2.1.- pH

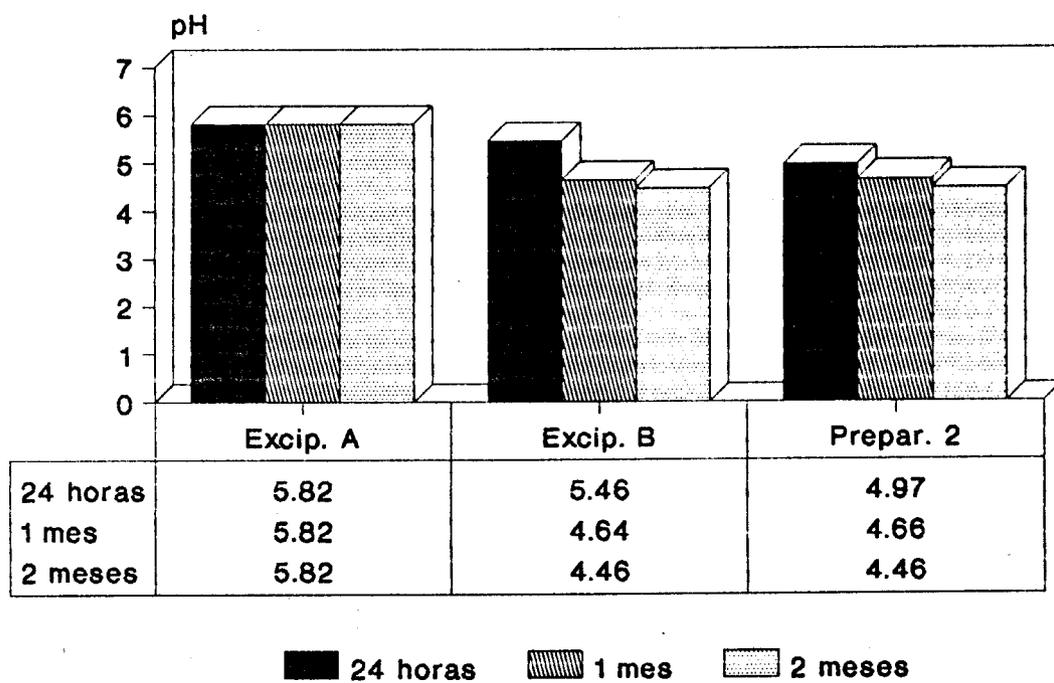
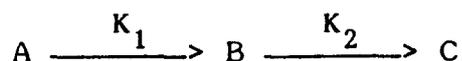


Figura 34.- pH de las formulaciones.

**4.2.- ESTUDIO ANALITICO DEL
ALFA-TOCOFEROL**

Los resultados de absorbancia obtenidos mediante HPLC (detector U - V a 292 nm) a partir de la extracción del α -T de los Preparados 1 y 2 (Figuras 36 - 37) han sido estudiados de acuerdo a las leyes cinéticas de reacciones consecutivas aceptando como mecanismo de degradación las reacciones propuestas por TAPPEL (62) (Figura 5).



En el estudio de la cinética de reacciones consecutivas se obtienen las siguientes curvas teóricas de concentración con respecto al tiempo (147) (Figura 35).

La ecuación teórica para la absorbancia de una solución que contiene una mezcla de dos especies que absorben a una misma longitud de onda sería:

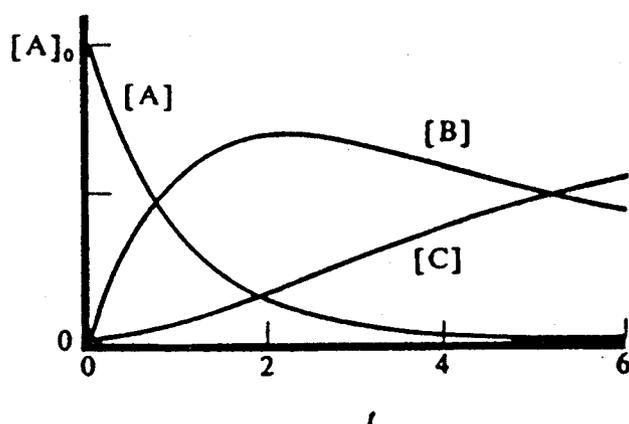


Figura 35.- Curva teórica de la concentración / tiempo para la cinética de las reacciones consecutivas.

$$A_{292 \text{ nm}} = \epsilon_A l [A] + \epsilon_B l [B]$$

$$A_{292 \text{ nm}} = \epsilon_A l [A_0] e^{-k_1 t} + \epsilon_B l \frac{k_1 [A_0]}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

$$A_{292 \text{ nm}} = l [A_0] \left[\epsilon_A e^{-k_1 t} + \epsilon_B \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} - \epsilon_B \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2 t} \right]$$

$$A_{292 \text{ nm}} = l [A_0] \left[\left(\epsilon_A + \frac{\epsilon_B k_1}{k_2 - k_1} \right) e^{-k_1 t} - \left(\frac{\epsilon_B k_1}{k_2 - k_1} \right) e^{-k_2 t} \right]$$

En las gráficas 36 y 37 se han representado la altura de los picos (cm) obtenidos en los cromatogramas en función del tiempo (días). Estas alturas están directamente relacionadas con las absorbancias mediante un selector incorporado en el detector.

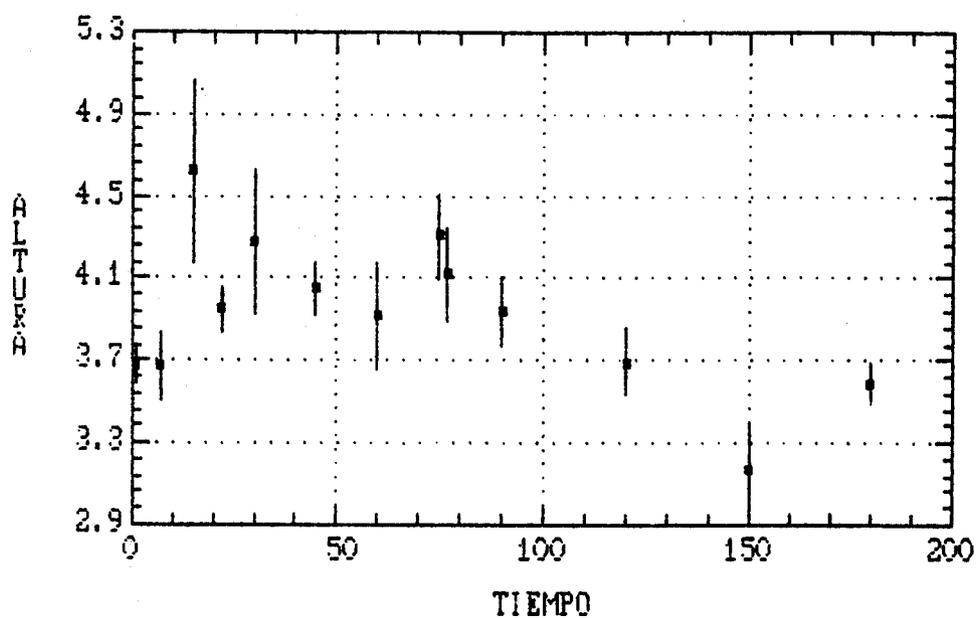


Figura 36.- Detección por HPLC de α -tocoferol en el Preparado 1: altura (cm) de los picos en función del tiempo de almacenamiento (días).

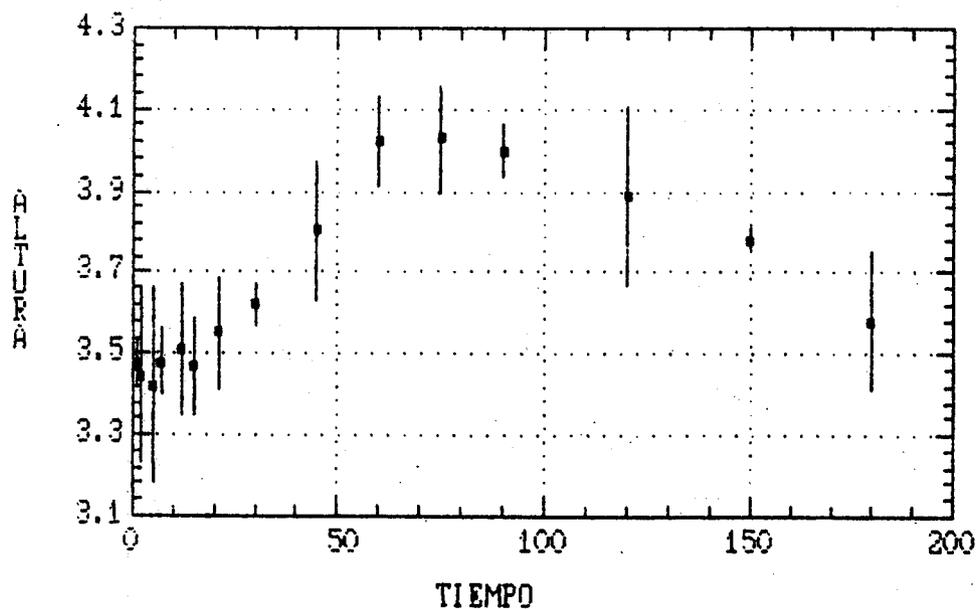


Figura 37.- Detección por HPLC de α -tocoferol en el Preparado 2: altura (cm) de los picos en función del tiempo de almacenamiento (días).

**4.3.- ESTUDIO PATOLOGICO: PROMOTORES
DE RADICALES LIBRES**

4.3.1.- NECROSIS TISULAR:
DOXORUBICINA

	CASOS VALIDOS	MEDIAS \bar{x}	SD	ERROR STANDARD	CV
CONTROL	6	6.6333	0.5279	0.2155	7.9581
EXCIP. A	4	6.4250	0.4573	0.2287	7.1182
EXCIP. B	6	6.6000	0.3098	0.1265	4.6945
PREPA. 1	7	6.2857	0.5145	0.1945	8.1860
PREPA. 2	6	6.0667	0.5391	0.2201	8.8868

Tabla 3.- Diámetros medios de las úlceras producidas por doxorubicina en los grupos establecidos.

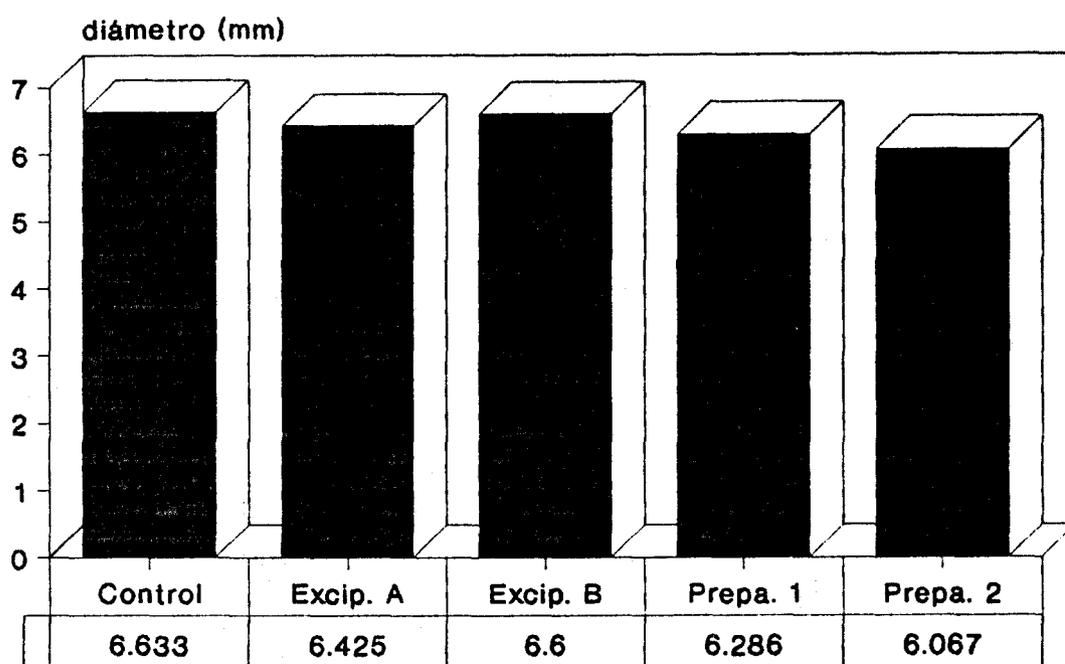


Figura 38.- Diámetros medios de las úlce -
ras a los 6 días.

	GRADOS DE LIBERTAD	T	PROB
CONTROL / EXCIP. A	8	0.6422	0.2694 (N.S.)
CONTROL / EXCIP. B	10	0.1334	0.4483 (N.S.)
CONTROL / PREPA. 1	11	1.2001	0.1277 (N.S.)
CONTROL / PREPA. 2	10	1.8396	0.0478 (S.)
EXCIP. A / PREPA. 1	9	0.4478	0.3324 (N.S.)
EXCIP. B / PREPA. 2	10	2.1009	0.0310 (S.)
EXCIP. B / EXCIP. A	8	0.7286	0.2435 (N.S.)
PREPA. 1 / PREPA. 2	11	0.7487	0.2349 (N.S.)

Tabla 4.- Estudio estadístico del diámetro medio de las úlceras.
T de STUDENT.

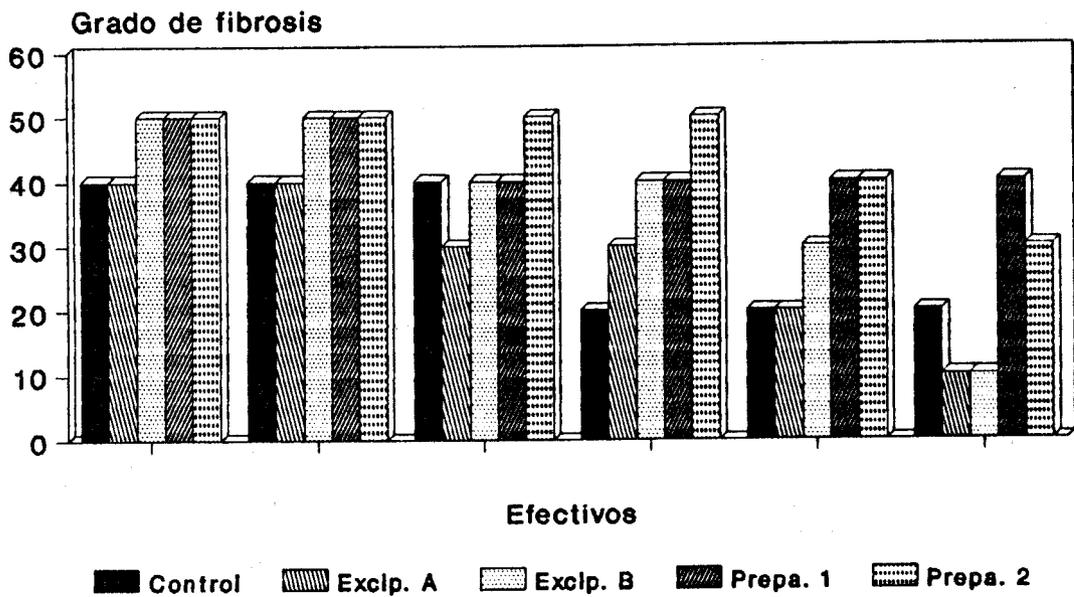


Figura 39.- Necrosis tisular: Observaciones obtenidas a los 30 días de estudio.

VALORACION	GRADOS DE INCIDENCIA				
	F.F. (+)	F.F. (++)	F.F. (+++)	F.F. (++++)	F.E.
	10	20	30	40	50
CONTROL	-	3	-	3	-
EXCIP. A	1	1	2	2	-
EXCIP. B	1	-	1	2	2
PREPA. 1	-	-	-	4	2
PREPA. 2	-	-	1	1	4

Tabla 5.- Casos presentados con los grados de incidencia señalados para cada uno de los grupos establecidos.

F.F. (fibrosis en formación)

F.E. (fibrosis establecida)

	GRADOS DE LIBERTAD	X ²	PROB
CONTROL / EXCIP. A	5	12.5000	0.0285 (S.)
CONTROL / EXCIP. B	5	35.0000	0.0000 (S.)
CONTROL / PREPA. 1	5	65.0000	0.0000 (S.)
CONTROL / PREPA. 2	5	77.5000	0.0000 (S.)
EXCIP. A / PREPA. 1	5	121.6670	0.0000 (S.)
EXCIP. B / PREPA. 2	6	48.3333	0.0000 (S.)
EXCIP. B / EXCIP. A	5	16.6667	0.0052 (S.)
PREPA. 1 / PREPA. 2	5	7.5000	0.1860 (N.S.)

Tabla 6.- Test X². Grados de fibrosis detectados a los 30 días de administrar doxorubicina.

DISCUSSION

Como hemos comentado en capítulos precedentes, una propiedad común a los preparados farmacéuticos semisólidos es la adhesión a la superficie de aplicación debido a su reología (148). Para abordar dicho estudio un requisito previo y fundamental es la comprobación de su estabilidad física (149), pues ello nos conducirá al comportamiento real de cada uno de los preparados ensayados. Es sabido que los parámetros a controlar en ensayos de esta índole dependen fundamentalmente de la forma farmacéutica (150), que en nuestro caso son sistemas dispersos sólido-líquido gelificados.

Sobre el comportamiento reológico influyen asimismo los cambios de temperatura a los que se someten los sistemas dispersos, si bien no les afecta de la misma manera. En los geles se aprecia sólo pérdida de disolvente, sin que ello modifique la estructura propia de estos sistemas, por lo que a estos efectos se consideran con estabilidad óptima (138).

Los geles deben poseer una consistencia adecuada no tan solo para su utilización, sino también y fundamentalmente respecto a la biodisponibilidad o actividad terapéutica que los mismos pudieran desencadenar (151).

Los estudios reológicos los hemos centrado en la evaluación de dos parámetros esenciales, viscosidad y extensibilidad.

Se han determinado las viscosidades aparentes de las formulaciones al cabo de 24 horas, 1 y 2 meses con el fin de conocer la estabilidad física del sistema tanto en el momento de su elaboración como de su evolución posterior con el transcurso del tiempo (16, 19).

En las curvas de fluidez (reogramas), reflejadas en las Figuras 13 a 21 no se observa comportamiento tixotrópico, lo que demuestra la no dependencia del tiempo de cizalla (14) en dicho comportamiento.

A través del estudio de los reogramas obtenidos (Figuras 13 a 21) se puede ya indicar que nuestras preparaciones son cuerpos no newtonianos y de comportamiento pseudoplástico (12) ya que frente a un aumento de la velocidad de deformación aumenta el valor del

dial (o su correspondiente tensión de empuje), esto es, desciende la viscosidad aparente en función de la cizalla aplicada.

Las causas de este comportamiento pseudoplástico pueden ser debidas a la ruptura progresiva de la estructura interna del preparado (por aumento de la cizalla) y su reconstrucción posterior por medio del movimiento browniano (3).

Aplicando el modelo de OSTWALD - DE WAELE (1, 3, 4, 12, 13, 15) igualmente hemos podido determinar el flujo ya detectado con el estudio de los reogramas. Así, en la Tabla 1, se recogen valores del índice de flujo (n) e índice de consistencia (k) obtenidos para cada preparado ensayado (Excip. A, Excip. B, Prepa. 2). Estos parámetros se determinaron a partir de las ramas descendentes del reograma correspondiente, coincidiendo con DOLZ y cols. (16) y no así con la metodología propuesta por MARCHABAN y cols. (152) que contrariamente utilizan la rama ascendente.

En todos los casos los valores de n son inferiores a la unidad (indicativo de flujo pseudoplástico), confirmando lo que ya se reflejaba en las curvas de fluidez.

A través de los valores de k hemos observado una cierta relación con la viscosidad de los preparados. Así, el Excipiente A mostró el índice de consistencia superior (24.1013) mientras que el Excipiente B alcanzó el inferior (14.2079), para un tiempo de 24 horas desde la elaboración de las formulaciones.

Tras la comparación de los datos obtenidos para los Excipientes A y B y Preparado 2 comprobamos que el comportamiento no tixotrópico y pseudoplástico permanece para todos ellos. Por su parte, la viscosidad varía de forma apreciable (en Excipiente A y B y Preparado 2), respecto al tiempo de almacenamiento. Así para el Excipiente A siempre se encontró el mayor valor de viscosidad, que prácticamente no varía, lo que da idea de su gran estabilidad (Figura 22).

Este parámetro disminuyó al adicionar AA y α -T, (Excip. B, Prepa. 2) (Figuras 23 a 25) probablemente debido a la repulsión entre cargas del mismo signo (118), por lo que el gel adoptaría una estructura extendida con la consiguiente pérdida de viscosidad. En función del tiempo el Excip. B muestra una disminución progresiva de su viscosidad (Figura 26), mientras que el Prepa. 2 presenta una clara disminución durante el primer mes de reposo, manteniéndose

casi constante la viscosidad en el período de ensayo subsiguiente (Figura 27).

Debido a que los parámetros físicos n y k se pueden utilizar para caracterizar la estabilidad de los sistemas dispersos (15), en la Tabla 1 se reflejan sus valores para los tiempos estudiados. No se observó que el índice de flujo (n) variara apreciablemente en ningún sistema, confirmándonos de nuevo que el comportamiento de todos ellos es pseudoplástico. Ahora bien, si queremos destacar que el índice de consistencia (k) disminuye en todos los casos (ya comentamos que se observaba una gran disminución de la viscosidad), salvo en el Excipiente A que se mantiene invariable, ratificándonos la gran estabilidad de esta formulación.

La consistencia y elasticidad de la película que las formulaciones semisólidas crean en la superficie de aplicación, son consecuencia de la estabilidad de los preparados (7). De aquí que la justificación del estudio reológico se centre en la conveniencia de la extensibilidad y viscosidad de la fórmula, máxime cuando, si es aceptable, constituye el indicativo de una correcta elaboración y de la consiguiente estabilidad del preparado tópico.

Sobre estas propiedades influyen no sólo la proporción de los componentes -p.a. y excipientes- (141, 153), sino también la posibilidad de formación de enlaces, generalmente débiles que dan lugar a una variación en la viscosidad de las fórmulas (154).

El concepto de extensibilidad como "capacidad de la pomada para ser extendida en condiciones fijadas" fué expuesto ya en 1958 por DEL POZO y SUNE (140, 153) que además describieron el aparato "extensímetro" del que se han hecho sucesivas revisiones metodológicas (141, 142, 156 - 158).

La técnica que hemos seguido en este estudio ha sido descrita por JIMENEZ-CASTELLANOS y cols. (144) cuyo objeto es el de asegurar, con una mayor exactitud, la medida de esta propiedad.

A través de nuestras experiencias se observa que la evolución de la extensibilidad en las muestras ensayadas es, en términos generales (Tabla 2), muy semejante e incluso solapable al comportamiento de viscosidad anteriormente comentado (Figuras 29, 30, 32, 33). Lógicamente, cuando la fuerza de cizalla aumenta -disminuye la viscosidad aparente en la pseudoplasticidad- cabe

esperar un aumento de la extensibilidad, debido a las roturas de enlaces internos en los sistemas dispersos. La única excepción la encontramos para el Excip. A (Figura 28) en donde se evidencia la no constancia de su extensibilidad en función del tiempo. Este resultado podría explicarse porque partiendo de un excipiente de por sí viscoso, a las 24 horas de su preparación, ni el tiempo de almacenamiento ni la cizalla aplicada sean suficientes para evidenciar los cambios de viscosidad y sí por el contrario, la aplicación de una fuerza creciente sobre muestras del mismo a distintos tiempos.

Otros parámetros que hemos considerado en relación con la estabilidad han sido el pH y las características organolépticas consecuentes a una variación del mismo, pues como se sabe, pueden repercutir en la desestabilización del sistema (159).

Los distintos preparados tópicos han sido envasados en cajas de plástico endurecido, con cierre hermético, a temperatura ambiente. Las medidas se han hecho a las 24 horas, 1 y 2 meses.

En todos los casos los valores están comprendidos entre 4 y 7 unidades, rango óptimo para su aplicación en la piel (146).

Considerando los valores de pH obtenidos en nuestras experiencias, se aprecia una variación del mismo tanto por la incorporación AA (Excip. B) y α -T (Prepa. 2) como por la influencia del tiempo (Figura 34).

Tras el estudio aislado de los datos relativos de pH respecto al tiempo de almacenamiento, en el Excip. B la disminución del valor de 5.46 (24 horas) a 4.64 (1 mes) y 4.46 (2 meses) pudiera deberse a la oxidación normal del AA para pasar a ión Ascorbato con marcado carácter ácido (129). La observación de un cambio de coloración en este Excip. B respecto del A (138), bajo las mismas condiciones, puede ser indicativo de alteración máxime cuando entre el rango de pH arriba comentado (5.46 - 4.46) el AA se encontraría en situación inestable (160).

Comentarios semejantes, en cuanto a variación de pH se refiere, merecen los resultados encontrados para el Prepa. 2, si bien la disminución de este parámetro es más paulatina (Figura 34).

Si comparamos Excip. B respecto al Prepa. 2, el pH de éste a las 24 horas, disminuye respecto al primero, debido probablemente a la coexistencia de dos compuestos ácidos. Sin embargo, el resto de los valores, con independencia de

la muestra, son muy semejantes quizás por la propia oxidación del AA ya aludida.

Este hecho, beneficioso para la estabilidad del Prepa. 2, crearía un ambiente reductor (61) conducente a la estabilidad del α -T y cosecuentemente a la de este preparado.

Pero como ya dijimos , el pH aunque varíe, en todos los casos permanece en el rango de pH óptimo para la piel.

Con los datos de altura obtenidos a partir de los cromatogramas (Figuras 36, 37) se ha intentado realizar un ajuste con la curva biexponencial teórica, anteriormente expuesta (consultése Figura 35, pág. 113), usando un programa de ordenador adecuado. Este ajuste resultó no ser significativo debido probablemente al inadecuado número de puntos necesarios para dicho ajuste, en la primera parte de la curva, y a las fluctuaciones de temperatura en los distintos días en que se realizaron las medidas.

Esto constituirá pues uno de los objetivos que plantearemos en las investigaciones a realizar en un futuro próximo.

Se utilizan dos tipos de argumentos para racionalizar el papel de los radicales libres en procesos patológicos, sin la presencia de tratamientos oxidativos especiales. El primero basado en la teoría de uso y desgaste de las células, mientras que el segundo sugiere que las reacciones de radicales aceleran o inician una enfermedad particular como es el caso del cáncer (32).

Dentro de los agentes anticancerosos, aquellos que posean estructuras quinónicas o compuestos de nitrógeno aromáticos, actúan en base a estos principios. La doxorubicina (DOX), sustancia citostática de estructura quinónica, puede producir por extravasación de la misma efectos citotóxicos en la piel, debido a la formación de radicales libres. A este respecto distintos autores (106, 109) indican que esta toxicidad accidental puede paliarse administrando α -tocoferol y / o dimetilsulfóxido.

En nuestro caso, procedimos a la realización de un ensayo en el que, previa a la administración de DOX por vía intradérmica, se somete a los animales a tratamiento con α -T en distintos preparados.

Siguiendo el protocolo propuesto por LUCERO y cols. (138) se seleccionó la administración intradérmica de 0.05

mg de DOX para realizar el ensayo de necrosis tisular, provocada por radicales libres procedentes de este agente químico.

Una vez establecidos los grupos de animales y después de transcurridos 6 días, se observó lo siguiente: úlceras de 5.1 a 7.3 mm de diámetro, elevadas, eritematosas, pigmentadas, de área central costroso. Las lesiones son induradas y abarcan la totalidad de la piel dejando las estructuras epidérmicas completamente libres de planos subyacentes. Estas lesiones no son alopécicas y con cierto componente inflamatorio.

En los 5 grupos bajo estudio se observan en general ligeras diferencias en el diámetro de las úlceras, propias del estado lesivo antes descrito (Tabla 3, Figura 38). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas significativas solamente entre Prepa.2 / Excip. B y Prepa. 2 / Control (Tabla 4).

Esto nos indica, en una primera aproximación, que la asociación α -T / AA es la que demuestra mayor eficacia regeneradora, puesto que si bien los diámetros medios observados con el Excip. B frente al Control varían, esta variación no fue significativa desde el punto de vista

estadístico, lo que conduce a considerar la ausencia de efecto terapéutico del Excipiente aislado.

El mecanismo por el que transcurre el fenómeno observado podría deberse bien al sinergismo del AA respecto al α -T gracias a su acción antioxidante (61, 160), ya detectada a través de los estudios de variación de pH, (consúltense Figura 34, pág. 110), o bien por revertir el radical oxidado del α -T a su forma reducida, gracias a la acción concomitante del AA con el glutatión (68).

Por uno u otro camino, esto determinaría una mayor reducción del área dañada, en aquellos efectivos tratados con el Prepa. 2, como lo demuestran nuestros resultados experimentales, que en general se aproximaron bastante a los obtenidos por SVINGEN y cols. (106) y LUCERO y cols. (138).

Al no encontrar a penas divergencias en los diámetros de las úlceras, nos vimos obligados a continuar la investigación para determinar si nuestros preparados de α -T actúan como "scavenger" de radicales libres procedentes de la DOX. Así, a los 30 días de comenzar este ensayo, volvimos a analizar las lesiones de todos los animales; para ello se asignaron valores numéricos a las

apreciaciones macroscópicas (grado de fibrosis) con el fin de realizar un tratamiento estadístico que corroborase los datos clínicos. En la Tabla 5 se recoge la cuantificación del grado de lesión para este período de tiempo y para los distintos animales. De forma gráfica (Figura 39) se evidencian diferencias entre todos los grupos (Control, Excip. A, Excip. B, Prepa. 1, Prepa. 2).

Para las ratas tratadas con el Prepa. 2 se contempla que en el 67 % de los casos hay una fibrosis establecida, es decir, sus úlceras cicatrizaron por completo. Por su parte, el 33 % de los animales que recibieron el Prepa. 1 presentaban fibrosis establecida, mientras que el resto mostró un grado de fibrosis en formación (++++). Finalmente, se observaron distintos estadios para los grupos restantes, es decir, Control, Excip. A y Excip. B.

A partir de estos resultados, Tabla 5, se realizó el correspondiente estudio estadístico (161) cuyos parámetros se recogen en la Tabla 6. Esto refleja la existencia de diferencia entre todos los grupos que recibieron tratamiento previo (con p.a. o sin él) con respecto al Control. Igual resultado se obtuvo al comparar los dos preparados con sus respectivos excipientes (Prepa. 1 / Excip. A y Prepa. 2 / Excip. B). Al establecer estas

comparaciones entre los Preparados 1 y 2 se aprecian diferencias (Tabla 5), si bien no significativas, por cuanto que de los 6 efectivos que componen cada grupo, 4 presentan una fibrosis, en grado 4 (++++), con el Prepa. 1 frente a 1 caso para los que recibieron el Prepa. 2.

Sin embargo con este Preparado se encontraron 4 efectivos con fibrosis establecida frente a sólo 2 para los que recibieron α -T en Excip. A.

Estos hechos nos conducen de nuevo a considerar el papel desarrollado por el AA como protector del α -T gracias a crear ese ambiente reductor conducente a la estabilización del p.a. en el Excip. B.

Somos conscientes, con todo, que estos datos deberían ser corroborados con nuevos estudios anatomopatológicos que corroborasen estas apreciaciones meramente macroscópicas, abriendo con ello nuevos horizontes para este Grupo de Investigación.

Por otro lado nos queda también comprobar, a través de un planteamiento riguroso, la cinética de degradación del α -T sólo o asociado con AA. Así desde otro ángulo podríamos discernir sobre la influencia real del Excip. B,

presumiblemente cierta para nosotros, sobre la mayor capacidad paliativa del α -T frente a los estados lesivos antes expuestos.

A pesar de ello sí estamos en condiciones de afirmar, coincidiendo con varios autores (106, 109, 138), que la toxicidad accidental provocada por extravasación de la DOX en la piel, que de ser prevenida aplicando preparados de α -T, esta vez en bases gelificadas, gracias a su acción regeneradora de las zonas cutáneas más dañadas.

CONCLUSIONES

- 1.- Los excipientes en estudio son cuerpos no newtonianos de comportamiento pseudoplástico y no tixotrópico, no viéndose influidos por el tiempo de almacenamiento.
- 2.- La adición del principio activo, α -tocoferol, no modifica la pseudoplasticidad ni la tixotropía.
- 3.- La adición de α -tocoferol a su excipiente modifica la viscosidad y extensibilidad, encontrándose para ambas una relación inversa.
- 4.- Los parámetros reológicos, viscosidad y extensibilidad, de los preparados medicamentosos varían con el tiempo de almacenamiento.
- 5.- Considerando los valores de pH obtenidos se aprecia una variación del mismo tanto por la incorporación del ácido ascórbico (Excip. B) y α -tocoferol (Prepa. 2) como por la influencia del tiempo. Esto puede deberse a la oxidación del ácido ascórbico (con producción de compuestos marcadamente ácidos) que determinarían una mayor estabilidad del α -tocoferol.

- 6.- No se ha podido cuantificar la cantidad remanente de α -tocoferol en los preparados bajo estudio, por posible presencia de un compuesto intermedio que interfiere en la detección de la sustancia activa inmodificada.

- 7.- En el ensayo de necrosis tisular producida por doxorubicina se aprecian diferencias estadísticamente significativa solamente en los diámetros de las úlceras de los animales tratados con el Prepa. 2 respecto a su excipiente y control. Esto indica que la asociación α -tocoferol / ácido ascórbico es la que demuestra una mayor capacidad de reducción del área dañada.

- 8.- Se demuestra que el α -tocoferol aplicado por vía tópica en las condiciones de nuestra experiencia favorece la regeneración de la piel. Sin embargo en los animales tratados con el Prepa. 2 (α -T / AA) se contempla que en el 67 % de los casos existe una fibrosis establecida mientras con el Prepa. 1 ésta solamente se observó en el 33 % de los casos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- WOOD J.M.
"Pharmaceutical rheology" en "The theory and practice of industrial pharmacy", LACHMAN L., LIEBERMAN H.A., KANIG J.L., 3rd edit., Lea & Febiger, Philadelphia, 1986, pg. 123
- 2.- SCHRAMM G.
"Introducción a la viscosimetría práctica", Documentación científica, Laboratorios Haake, Alemania.
- 3.- SCHOTT H.
"Reología" en "Remington: Farmacia", GENNARO A.R. (Compilador General), 17ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987, pg. 461
- 4.- Documentación científica del Curso "Reología: aspectos teóricos y prácticos", Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Sevilla, 1987.
- 5.- DEEM D.E.
"Rheology of dispersed systems" en "Pharmaceutical dosage forms: disperse systems", LIEBERMAN H.A., RIEGER M.M., BANKER G.S., Marcel Dekker, New York, 1988, vol. 1, pg. 367
- 6.- GARCIA S., BARRACO M., ADRIA M.A., LOPEZ J.M., GINER P., GARCIA - SOTO L.
"Concepto de reología. Aplicaciones a la industria. Definición de fluidos newtonianos y no newtonianos", Cienc. Ind. Farm., 6 (2ª ép.), (6), 224 (1987).
- 7.- VOIGT R.
"Tratado de Tecnología Farmacéutica", Acribia, Zaragoza, 1979, pg. 11
- 8.- LIN T.J.
"Rheology fundamentals and applications in cosmetic industry" en "The chemistry and manufacture of cosmetics", DE NAVARRE M.G., 2nd edit., D. Van Nostrand Co., New Jersey, 1962, vol. 1, pg. 315
- 9.- BANKER G.S., CHALMERS R.K.
"Pharmaceutics and pharmacy practice", J.B. Lippincott, Philadelphia, 1981, pg. 81

- 10.- "Why measure viscosity?", Documentación científica, Laboratorios Brookfield, U.S.A.
- 11.- SHOTTON E., RIDWAY K.
"Physical pharmaceuticals", Clarendon Press, Oxford, 1974, pg. 56
- 12.- PUGNETTI F.
"Etude comparative des résultats obtenus selon plusieurs méthodes pour la mesure des caractéristiques rhéologiques des dispersions", Bull. Tech. Gatt., (75), 65 (1982).
- 13.- SHERMAN P.
"Rheological properties of emulsions" en "Encyclopedia of emulsion technology", BECHER P., Marcel Dekker Inc., New York, 1983, pg. 405
- 14.- "Solutions to sticky problems", Documentación científica, Laboratorios Brookfield, U.S.A.
- 15.- VEMURI S.
"Flow and consistency index dependence of pseudoplastic guar gum solutions", Drug Dev. Ind. Pharm., 14, (7), 905 (1988).
- 16.- DOLZ M., ALMENAR M.V., HERRAEZ J.V., BELDA R.
"Análisis reológico y estudio del comportamiento tixotrópico de la loción de calamina", Cienc. Ind. Farm., 4 (2ª ép.), (3), 98 (1985).
- 17.- BALL A., JARAMILLO J., MARKOWSKI T.
"A rapid and reliable method for determining viscosity on stability samples", Cosmet. Toilet., 97, (10), 40 (1982).
- 18.- BARRACO M., ADRIA M.A., PIULACHS M., RAVENTOS M.
"Estudio físico-viscosimétrico de la miel de tiliáceas", Cienc. Ind. Farm., 4 (2ª ép.), (11), 357 (1985).
- 19.- DOLZ M., ALMENAR M.V., HERRAEZ J.V., BELDA R.
"Estudio del comportamiento viscoelástico de la loción de calamina y su modificación con la concentración de viscosizante, con el tiempo de agitación y con el tiempo de almacenamiento", Cienc. Ind. Farm., 3 (2ª ép.), (10), 337 (1984).

- 20.- SPENCER R.P., ANTAR M.A.
"Aging: The ultimate intervention" en "Interventional nuclear medicine", SPENCER R.P., Grune and Straton, New York, 1984, pg. 577
- 21.- BAKER G.T., SPROTT R.L.
"Biomarkers of aging",
Experimental Gerontol., 23, (4 / 5), 223 (1988).
- 22.- STADTMAN E.R.
"Biochemical markers of aging",
Experimental Gerontol., 23, (4 / 5), 327 (1988).
- 23.- RODILLA F., CARBO E., GARCIA A.
"Bases celulares del proceso de envejecimiento",
Ind. Farm., (16), 139 (1982).
- 24.- "Los radicales libres: factor etiológico de la disminución del tono vital", Laboratorios Robert S.A., Barcelona.
- 25.- PRYOR W.A.
"The role of free radical reactions in biological systems" en "Free radicals in Biology", PRYOR W.A., Academic Press, New York, 1976, vol. I, pg. 1
- 26.- DEL MAESTRO R.F.
"An approach to free radicals in Medicine and Biology",
Acta Physiol. Scand., (Supl. 492), 153 (1980).
- 27.- MASORO E.J.
"A physiological approach to the study of aging",
Medical Times, 117, (5), 63 (1989).
- 28.- MIQUEL J.
"Radicales de oxígeno y envejecimiento celular", Libro de Resúmenes del Simposium Internacional del Impacto de los Radicales Libres en Biomedicina y Salud, Madrid, 1990.
- 29.- MASON R.P., CHIGNELL C.F.
"Free radicals in Pharmacology and Toxicology. Selected topics",
Pharmacol. Rev., 33, (4), 189 (1982).
- 30.- CILLARD J., CILLARD P.
"Composés phénoliques et radicaux libres",
S.T.P. Pharma., 4, (7), 592 (1988).

- 31.- "Vitamin E", Laboratorios Roche, Suiza.
- 32.- PRYOR W.A.
"The formation of free radicals and consequences of their reactions in vivo",
Photochem. Photobiol., 28, 787 (1978).
- 33.- FREEMAN B.A., CRAPO J.D.
"Biology of disease. Free radicals and tissue injury",
Lab. Invest., 47, (5), 412 (1982).
- 34.- HASSAN J.
"Biochemical and clinical aspects of oxygen free radicals", Libro de Resúmenes del Simposium Internacional del Impacto de los Radicales Libres en Biomedicina y Salud, Madrid, 1990.
- 35.- KAPPUS H., SIES H.
"Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation",
Experientia, 37, (12), 1233 (1981).
- 36.- LOPEZ A.
"Radicales libres e inflamación", Libro de Resúmenes del Simposium Internacional del Impacto de los Radicales Libres en Biomedicina y Salud, Madrid, 1990.
- 37.- CHIU D., LUBIN B., SHOHET S.B.
"Peroxidative reactions in red cell biology" en "Free radicals in Biology", PRYOR W.A., Academic Press, New York, 1982, vol. V, pg. 115
- 38.- ROMERO D., VILLALBA M.P., GOMEZ M.J., MUR M., GUERRERO L., SIMAL E., CABEZA F., FARRER M.
"Interés de los fármacos antioxidantes en la terapéutica actual. Radicales libres del oxígeno, antioxidantes y patología",
S.E.F.H., XIII, (4), 317 (1989).
- 39.- MEAD J.F.
"Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes" en "Free radicals in Biology", PRYOR W.A., Academic Press, New York, 1976, vol. I, pg. 51
- 40.- MESCHAN I.
"Radiología General. Compendio analítico semiológico",
Ed. AC, Madrid, 1978, pg. 11

- 41.- BELLOCH V., CABALLE C., ZARAGOZA R.
"Manual de Terapéutica Física y Radiológica", 3ª edi.,
Ed. Saber, Valencia, 1972, pg. 406
- 42.- VILE G.F., WINTERBOURN C.C.
"Microsomal lipid peroxidation induced by adriamycin,
epirubicin, daunorubicin and mitoxantrone: a
comparative study",
Cancer Chemoter. Pharmacol., 24, (2), 105 (1989).
- 43.- BARNES A.R., SUGDEN J.K.
"The hidroxyl radical in aqueous medio",
Pharm. Acta Helv., 61, (8), 218 (1986).
- 44.- HARMAN D.
"Free radical theory of aging: the free radical
diseases",
Age, 7, (10), 111 (1984).
- 45.- CALATAYUD J.M.
"Teorías sobre el envejecimiento e investigaciones
gerontológicas recientes",
Medicine, 86, (5), 3615 (1987).
- 46.- CARABELLO F.B.
"Role of tocopherol in the reduction of mitochondrial
NAD",
Can. J. Biochem., 52, (8), 679 (1974).
- 47.- DOBA T., BURTON G., INGLOD K., MATSUO M.
"α-tocopheryl decay: lack of effect of oxygen",
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 7, 461 (1984).
- 48.- MIQUEL J.
"Envejecimiento: ciencia ficción",
Mundo Científico, 1, (7), 794 (1981).
- 49.- TRUSHI M.A., MIMNAUCH E.G., GRAM T.E.
"Activation of pharmacologic agents to radical
intermediates. Implications for the role of free
radicals in drug a tion and toxicity",
Biochem. Pharmacol 31, (21), 3335 (1982).
- 50.- HOSTA A.
"Radicales libres y e vejecimiento",
Jano, (496), 37 (1981).

- 51.- HOSTA A.
"Radicales libres y disminución de la vitalidad: nuevo enfoque terapéutico",
Jano, (498), 20 (1981).
- 52.- SHINITZKY M., LYTE M., HERON D.S., SAMUEL D.
"Intervention in membrane aging - The development and application of active lipid" en "Intervention in the aging process. Basic research and preclinical screening", REGELSON W., SINEX F.M., Alan R. Liss, New York, 1983, pg. 175
- 53.- BOUISSOU H., PIERAGGI M., JULIAN M.
"Dermis ageing",
Path. Res. Pract., 178, 515 (1984).
- 54.- HERNANDEZ M., MERCIER-FRESNEL M.M.
"Dossier de l'esthetique cosmetique", 2^a edic.,
Maloine, Paris, 1988, pg. 101
- 55.- MASORO E.J.
"A discussion of the aging process: current theories",
Drug - Nutrient Interaction, 4, 35 (1985).
- 56.- VANDERVEEN E., VANDERVEEN J.E.
"Vitaminas y otros nutrientes" en "Remington: Farmacia", GENNARO A.R. (Compilador General), 17^a edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987, pg. 1377
- 57.- DE GANDARIAS J.M.
"Bioquímica y Fisiología general", 6^a edic., Unibar, Barcelona, 1977, pg. 163
- 58.- "The United States Pharmacopoeia", 21st rev., 1985, pg. 1118
- 59.- "The Merck Index", 9th edit., Merck & Co. Inc., Rahway, 1976, pg. 1290
- 60.- MC EVORY G.K. (Editor)
"Drug Information 85", 27th edit., American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda, 1985, pg. 1705
- 61.- DERITTER E.
"Vitamins in pharmaceutical formulations",
J. Pharm. Sci., 71, (10), 1073 (1982).

- 62.- TAPPEL A.L.
"Vitamin E and free radical peroxidation of lipid",
Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 12 (1972).
- 63.- SKINNER W.A., PARKHURST R.M.
"Antioxidant properties of α -tocopherol derivatives and
relationship of antioxidant activity to biological
activity",
Lipid, 5, (2), 184 (1970).
- 64.- MARKS J.
"Las vitaminas. Una revisión actualizada", J. and A.
Churchill Limited, Londres, 1968, pg. 61
- 65.- BIERI J.G., CORASH L., HUBBARD V.S.
"Medical uses of vitamin E",
New Eng. J. Med., 308, (5), 1063 (1983).
- 66.- BURTON G.W., CHEESEMAN K.H., DOBA T., INGOLD K.U.,
SLATER T.F.
"Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo" en
"Biology of vitamin E", Ciba Foundation Symposium 101,
Pitman, London, 1983, pg. 4
- 67.- SIMON - SCHNAB I., KOEPPE H.W.
"Neure kenntnisse über vitamin E",
Pharm. Ztg., 128, (13), 696 (1983).
- 68.- FURUSE K.
"Vitamin E: biological and clinical aspects of topical
treatment",
Cosmet. Toilet., 102, (11), 99 (1987).
- 69.- FRANKEL E.M.
"The antioxidant and nutritional effects of
tocopherols, ascorbic acid and beta-carotene in
relation to processing of edible oils",
Bibl. Nutr. Dieta., (43), 297 (1989).
- 70.- GARDNER H.W.
"Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty
acids",
Free Rad. Biol. Med., 7, (1), 65 (1989).
- 71.- THOMAS S.M., GEBICKI J.M., DEAN R.T.
"Radical initiated alpha-tocopherol depletion and
lipid peroxidation in mitochondrial membranes",
Biochim. Biophys. Acta, 1002, (2), 189 (1989).

- 72.- VICTORIA E.J., BARBER A.A.
"Peroxidation of microsomal membrane protein-lipid complexes",
Lipids, 4, (6), 582 (1969).
- 73.- TINBERG H.M., BARBER A.A.
"Studies in vitamin E action: peroxidation inhibition in structural protein-lipid micelle complexes derived from rat liver microsomal membranes",
J. Nutr., 100, 413 (1970).
- 74.- NIKI E.
"Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol",
Ann. N. Y. Acad. Sci., 498, 186 (1987).
- 75.- BISBY R.H., AHMED S., CUNDALL R.B.
"Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue",
Biochem. Biophys. Res. Commun., 119, (1), 245 (1984).
- 76.- BATEMAN N.E., UCCELLINI D.A.
"Kinetics of D- α -tocopherol in a water soluble base in man",
J. Pharm. Pharmacol., 37, (10), 728 (1985).
- 77.- BATEMAN N.E., UCCELLINI D.A.
"Effect of formulation on the bioavailability of retinol, D- α -tocopherol and riboflavine",
J. Pharm. Pharmacol., 36, (7), 461 (1984).
- 78.- GOLDSMITH S.
"Vitamin E and onychomycosis",
J. Amer. Acad. Dermatol., 8, (6), 910 (1983).
- 79.- SIMON-SCHNAB I., KOEPPE H.W.
"Vitamin E und arteriosklerose",
Z. All. Med., 59, 1474 (1983).
- 80.- KELLI M.J.
" α -tocopherol as agonist in hipoxia",
J. Pharm. Pharmacol., 38, (1), 66 (1986).
- 81.- MICHAELSON G., EDQW ST L.E.
"Erythrocyte glutathione peroxidase activity in acne vulgaris and the effect of selenium and vitamin E treatment",
Acta Derm. Venereol., 54, (1), 9 (1984).

- 82.- YIP R.K., CHANG L.W.
"Protective effects of vitamin E on methylmercury toxicity in the dorsal root ganglia",
Environm. Res., 28, 84 (1982).
- 83.- SALDANHA R.L., CEPEDA E.E., POLAND R.L.
"The effect of vitamin E prophylaxis on the incidence and severity of bronchopulmonary dysplasia",
J. Pediatrics, 101, (1), 89 (1982).
- 84.- YONEMOTO J., SATO H., HIMENO S., SUZUKI T.
"Toxic effects of sodium selenite on pregnant mice and modification of the effects by vitamin E or reduced glutathione",
Teratol., 28, 333 (1983).
- 85.- BRIGHT-SEE E.
"Vitamins C and E (or fruit and vegetables) and the prevention of human cancer" en "Nutritional factors in the induction and maintenance of malignancy",
BUTTERWORTH C.E., HUTCHINSON M.L., Academic Press, New York, 1983, pg. 217
- 86.- PETERS C.R., SHAW T.E., RAIV D.R.
"The influence of vitamin E on capsule formation and contracture around silicone implants",
Ann. Plas. Surg., 5, (5), 347 (1980).
- 87.- RUNDUS C., PETERSON V.M., ZAPATA-SIRVENT R.,
HANSBROUGH J., ROBINSON W.A.
"Vitamin E improves cell-mediated immunity in the burned mouse: a preliminary study",
Burns, 11, 11 (1984).
- 88.- FLANNIGAN S.A., TUCKER S.B.
"Variation in cutaneous sensation between synthetic pyrethroid insecticides",
Contact Dermatitis, 13, 140 (1985).
- 89.- VATASSERY G.T., ANGERHOFER C.K., KNOX C.A.
"Effect of age on vitamin E concentration in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of the rat brain",
J. Neurochem., 43, (2), 409 (1984).

- 90.- VATASSERY G.T., ANGERHOFER C.K., ROBERTSON R.C., SABRI M.J.
"Vitamin E concentrations in different regions of the spinal cord and sciatic nerve of the rat",
Neurochem. Res., 11, (10), 1419 (1986).
- 91.- VATASSERY G.T., SCHUT L.J.
"Changes in vitamin E concentration in red blood cells and plasma of patients with olivopontocerebellar ataxia within the schut-swier kindred",
J. Amer. Col. Nutr., 6, (2), 151 (1987).
- 92.- VATASSERY G.T., ANGERHOFER C.K., PETERSON F.J.
"Vitamin E concentration in the brains and some selected peripheral tissues of selenium-deficient and vitamin E-deficient mice",
J. Neurochem., 42, (2), 554 (1984).
- 93.- WILLETT W.C., POLK B.F., UNDERWOOD B.A., STAMPFER M.J., PRESSEL S., ROSNER B., TAYLOR J.O., SCHNEIDER K., HAMES C.G.
"Relation of serum vitamins A and E and carotenoids to the risk of cancer",
New Eng. J. Med., 310, (2), 430 (1984).
- 94.- VOGEL F.G.M., SPERLING K.
"Tocopheryl nicotinate- an active ingredient in cosmetics",
Cosmet. Toilet., 102, (7), 51 (1987).
- 95.- GOSSEL T.A., WUEST J.R.
"Vitamins megadoses and toxicity",
U.S. Pharmacist., 7, (7), 48 (1982).
- 96.- MARX C.M., IZQUIERDO A., DRISCOLL J.W., MURRAY M.A., EPSTEIND M.F.
"Vitamin E concentrations in serum of newborn infants after topical use of vitamin E by nursing mothers",
Am. J. Obstet. Gynecol., 152, 668 (1985).
- 97.- SAPERSTEIN H., RAPAPORT M., RIETSCHER R.L.
"Topical vitamin E as a cause of erytoma multiforme like eruption",
Arch. Dermatol., 120, (7), 906 (1984).
- 98.- WADE A. (Editor)
"The Extra Pharmacopoeia: Martindale", 27th edit.,
The Pharmaceutical Press, London, 1977, pg. 1706

- 99.- FLOREZ J., ARMIJO J.A., MEDIAVILLA A.
"Farmacología humana", EUNSA, Pamplona, 1988, vol. II, pg. 822
- 100.- CALABRESI P., PARKS R.E.
"Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas" en "Las bases farmacológicas de la terapéutica", GOODMAN A., GOODMAN L., RALL T.W., MURAD F., 7ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1986, pg. 1179
- 101.- JANSSEN M.J.H., CROMMELIN D.J.A., STORM G., HULSHOFF A.
"Doxorubicin decomposition on storage. Effect of pH, type of buffer and liposome encapsulation", I. J. Pharm., 23, 1 (1985).
- 102.- SIMO-CAMPS E., GRI E., PUIGDOLLERS J.M.
"La adriamicina usada sola o en combinación en el tratamiento de las enfermas afectas de un cáncer de mama metastásico", Med. Clin., 69, 519 (1977).
- 103.- HARVEY S.C.
"Drogas antineoplásicas e inmunosupresoras" en "Remington: Farmacia", GENNARO A.R. (Compilador general), 17ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987, pg. 1560
- 104.- CALABRESI P., PARKS R.E.
"Agentes citostáticos y drogas usadas en la inmunosupresión" en "Las bases farmacológicas de la terapéutica", GOODMAN A., GOODMAN L., RALL T.W., MURAD F., 7ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1986, pg. 1219
- 105.- Loc. cit. (98), pg. 145
- 106.- SVINGEN B.A., POWIS G., APPEL P.L., SCOTT M.
"Protection against adriamycin - induced skin necrosis in the rat by dimethyl sulfoxide and α -tocopherol", Cancer Res., 41, (9), 3395 (1981).
- 107.- SPETH P.A.J., VAN HOESEL Q.G.C.M., HAANEN C.
"Clinical pharmacokinetics of doxorubicin", Clin. Pharmacokin., 15, 15 (1988).

- 108.- PASCOE G.A., REED D.J.
"Vitamin E protection against chemical - induced cell injury. II. Evidence for a threshold effect of cellular alpha-tocopherol in prevention of adriamycin toxicity",
Arch. Biochem. Biophys., 256, (1), 159 (1987).
- 109.- NOBBS P., BARR R.D.
"Soft - tissue injury caused by antineoplastic drugs is inhibited by topical dimethyl sulfoxide and alpha-tocopherol",
Br. J. Cancer, 48, 873 (1983).
- 110.- SVINGEN B.A., POWIS G., APPEL P.L., SCOTT M.
"Protection by α -tocopherol and dimethylsulfoxide (DMSO) against adriamycin induced skin ulcers in the rat",
Chem. Pathol. Pharmacol., 32, (1), 189 (1981).
- 111.- DORR R.T., ALBERTS D.S.
"Failure of DMSO and vitamin E to prevent doxorubicin skin ulceration in the mouse",
Cancer Treatm. Rep., 67, (5), 499 (1983).
- 112.- ODUKOYA O., HAWACH F., SHKLAR G.
"Retardation of experimental oral cancer by topical vitamin E",
Nutr. Cancer, 6, 98 (1984).
- 113.- WOOD L.A.
"Possible prevention of adriamycin - induced alopecia by tocopherol",
New Eng. J. Med., 312, (4), 1060 (1985).
- 114.- WEVERS A.C., KROON B.B., ALBUS-LUTTER C.E., GORTZAK E.
"Epithelioid sarcoma",
Eur. J. Surg. Oncol., 15, (4), 345 (1989).
- 115.- HALBAUT L., FAULI C., DEL POZO A.
"Estudio galénico de los hidrogeles: aplicación al gel Naturfitol[®]",
OFFARM, 9, (4), 85 (1990).
- 116.- ZATZ J.L., KUSFLA G.P.
"Gels" en "Pharmaceutical dosage forms: disperse systems", LIEBERMAN H.A., RIEGER M.M., BANKER G.S., Marcel Dekker, New York, 1988, vol. 2, pg. 495

- 117.- "Handbook of pharmaceutical excipients", The Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 1986, pg. 41
- 118.- Documentación técnica de The BF Goodrich, Company Chemical Group, U.S.A., 1981.
- 119.- RUIZ M.A., MARTIN M.J., PARERA A.
"Influencia del neutralizante y del pH en dispersiones acuosas de Carbopol 940^R. I",
Cienc. Ind. Farm., 6 (2^a ép.), 8 (1987).
- 120.- RUIZ A., PARERA A., MARTIN I.
"Influencia de neutralizantes sódicos en dispersiones de Carbopol 934^R",
Boll. Chim. Farm., 126, (9), 368 (1987).
- 121.- RUIZ M.A., MARTIN M.I., PARERA A.
"Influencia del neutralizante y del pH en dispersiones acuosas de Carbopol 940^R. II. Estudio de la concentración",
Cienc. Ind. Farm., 6 (2^a ép.), 41 (1987).
- 122.- Loc. cit (59), pg. 844
- 123.- Loc. cit. (117), pg. 6
- 124.- BAVERNFEIND J.C.
"Función antioxidante del ácido L-ascórbico en tecnología de alimentos" en "Vitaminas. Agentes nutritivos y terapéuticos", Barcelona, 1986, pg. 297
- 125.- Loc. cit (98), pg. 1666
- 126.- BASU T.K.
"Interacción fármacos - vitaminas" en "Vitaminas. Agentes nutritivos y terapéuticos", Barcelona, 1986, pg. 237
- 127.- Loc. cit. (60), pg. 1697
- 128.- KOLAR F.
"The influence of physical and chemical factors on the oxidation of ascorbic acid with air oxygen",
Farm Vestn, 37, (9), 181 (1986).
- 129.- SEIB P.A.
"Oxidación, monosustitución y síntesis industrial del ácido ascórbico" en "Vitaminas. Agentes nutritivos y terapéuticos", Barcelona, 1986, pg. 249

- 130.- TOLBERT B.M.
"Metabolismo y función del ácido ascórbico y sus metabolitos" en "Vitaminas. Agentes nutritivos y terapéuticos", Barcelona, 1986, pg. 109
- 131.- NAGY E., DEGRELL I.
"Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma and cerebrospinal fluid by liquid chromatography with electrochemical detection",
J. Chromatogr., 497, 276 (1989).
- 132.- HÖNEGGER C.G., LANGEMANN H., KRENGER W., KEMPF A.
"Liquid chromatographic determination of common water - soluble antioxidants in biological samples",
J. Chromatogr., 487, 463 (1989).
- 133.- IRACHE J.M., VEGA F.A.
"Antioxidantes en alimentos, medicamentos y cosméticos. I. Consideraciones generales",
Ind. Farm., (2), 55 (1990).
- 134.- BRIGHT - SEE E.
"Vitamin C and cancer prevention",
Sem. Oncol., X, (3), 294 (1983).
- 135.- "Información del medicamento", Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 1989, vol. 1, pg. 372
- 136.- LOHMANN W.
"Ascorbic acid and cancer",
Ann. N. Y. Acad. Sci., 498, 402 (1987).
- 137.- SITREN H.S.
"Vitamin. Chart nº 13",
Nutr. Supp. Serv., 7, (2), 45 (1987).
- 138.- LUCERO M.J.
"Estudio galénico de preparados semisólidos de α -tocoferol y su acción protectora en el envejecimiento celular", Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 1989.
- 139.- "Instruction manual. Viscosimeter Synchro-lectric Brookfield", Laboratorios Brookfield, U.S.A.

- 140.- BUENESTADO C., SUNE J.M.
"Extensibilidad y granulometría de pomadas suspensión. 3. Extensibilidad: resultados experimentales",
Galénica Acta, 25, 193 (1972).
- 141.- LEON M.J., JIMENEZ-CASTELLANOS M.R., BUENESTADO C., DOMINGUEZ A., RABASCO A., ORTEGA M., FAULI C.
"Extensibilidad de pomadas. I. Influencia de los componentes activos y de los excipientes",
OFFARM, 1, (3), 177 (1982).
- 142.- JIMENEZ-CASTELLANOS M.R., LEON M.J., CASATI J., DOMINGUEZ A., FAULI C.
"Extensibilidad de pomadas. II. Aplicación del planímetro al estudio de la extensibilidad",
OFFARM, 1, (4), 215 (1982).
- 143.- LEON M.J.
"Aportación al estudio actualizado de la influencia de los excipientes sobre la biodisponibilidad de los preparados farmacéuticos de uso tópico", Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 1983.
- 144.- JIMENEZ-CASTELLANOS M.R., LEON M.J., FAULI C.
"Determinación en placas fotográficas de la extensibilidad de productos dermofarmacéuticos con ayuda del planímetro", V Congreso Europeo de Dermofarmacología, Santa Cruz de Tenerife, 1982.
- 145.- LEON M.J., LUCERO M.J., MILLAN R.
"A comparative study of the extensibility and bio-availability of topical preparations of glycol salicylate",
Drug Dev. Ind. Pharm., (en prensa)
- 146.- BLOCK L.H.
"Aplicaciones medicinales" en "Remington: Farmacia", GENNARO A.R. (Compilador general), 17ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987, pg. 2127
- 147.- LEVINE I.N.
"Fisicoquímica", Mc Graw - Hill Latinoamericana, Bogotá, 1978, pg. 354
- 148.- IDSON B., LAZARUS J.
"Semisolids" en "The theory and practice of industrial pharmacy", LACHMAN L., LIEBERMAN H., KANIG J.L., 3rd. edit., Lea and Febiger, Philadelphia, 1986, pg. 534

- 149.- HIGUCHI W.I., SWARBRICK J., HO N.F.H., SIMONELLI A.P., MARTIN A.
"Fenómenos de partículas y dispersiones groseras" en "Remington: Farmacia", GENNARO A.R. (Compilador general), 17ª edic., Médica Panamericana, Buenos Aires, 1987, pg. 423
- 150.- YALABIK - KAS H.S.
"Stability assessment of emulsion systems", S.T.P. Pharma., 1, (10), 978 (1985).
- 151.- GUYOT J.C.
"Les emulsions dans les preparations dermatologiques et cosmetologiques", Actual. Pharm., (172), 31 (1980).
- 152.- MARCHABAN M., PASSET J., MAILLOLS H., SAUNAL H., DELONCA H.
"Etude physico-chimique des mélanges eau-tensioactif-huile", Pharm Acta Helv., 58, (11), 298 (1983).
- 153.- BUENESTADO C., SUÑE J.M.
"Extensibilidad y granulometría en pomadas suspensión. I. Materiales utilizados", Galénica Acta, 25, 69 (1972).
- 154.- SHERRIFF M., ENEVER R.P.
"Rheological and drug release properties of oil gels containing colloidal silicone dioxide", J. Pharm. Sci., 68, (7), 842 (1979).
- 155.- SUÑE J.M.
"Estudio de emulsiones consistentes y excipientes emulgentes para pomadas: Excipientes absorbentes", Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 1955.
- 156.- SUÑE J.M., FRIGOLS J., GARCIA-FERNANDEZ M.P.
"Extensibilidad en pomadas. II. Modificaciones de la técnica original de determinación de extensibilidad", XXI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Pisa, Septiembre, 1961.
- 157.- SUÑE J.M.
"Extensibilidad en pomadas. III. Nueva aportación a su determinación", Ars Pharm., 4, (6), 1 (1963).

- 158.- DEL POZO A., SUNE J.M., FAULI C.
"Diseño de los modelos matemáticos que rigen los fenómenos de extensibilidad de pomadas",
Boll. Chim. Farm., 126, (8), 330 (1987).
- 159.- FRANQUESA R.
"Estabilidad de medicamentos", Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Barcelona, 1985, pg. 10
- 160.- HAJRATWALA B.R.
"Stability of ascorbic acid",
S.T.P. Pharm., 1, (4), 281 (1985).
- 161.- DOMENECH J.M.
"Bioestadística", 3ª edic., Herder, Barcelona, 1980, pg. 174