

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA**

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACEUTICA



*SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACION DE
FARMACOS DE APLICACION TOPICA: LIPOSOMAS
MULTILAMINARES PORTADORES DE ACETONIDO
DE TRIAMCINOLONA*

TESIS DOCTORAL

Dra. Beatriz Clares Naveros
Granada, 2003

TESIS DOCTORAL

presentada por

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Beatriz Clares Naveros
D.L.: GR. 485-2009
ISBN: 978-84-691-9304-4

Beatriz Clares Naveros

VºBº de la Directora del Departamento

Dra. Dña. Guillermina López Andujar

La presente Memoria titulada **“SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACION DE FARMACOS DE APLICACION TOPICA: LIPOSOMAS MULTILAMINARES PORTADORES DE ACETONIDO DE TRIAMCINOLONA”** ha sido realizada en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica bajo la dirección de la Profesora Dra. Dña. Mª del Mar Medina Pérez

Dra. Mª del Mar Medina

*En estos últimos años he sabido que para la realización de la presente Tesis Doctoral es indispensable, en primer lugar, no tener prisa por ver los resultados y en segundo, estar rodeada de personas(en gran parte amigas) como las del departamento de **Farmacia Galénica**, generosas con su tiempo y sus mentes.*

*A los profesionales del **Centro de Instrumentación Científica**, por su trato y eficacia.*

*A **M^a del Mar**, mi directora, quién aceptó dirigirme, abrió las puertas de la investigación y me enseñó a no mirar los obstáculos sino a descubrir las posibilidades.*

A todos mi más sincero agradecimiento.

A José Luis por animarme e infundirme voluntad de victoria.

A mis padres, hermano y abuela, sin los cuales no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

GRACIAS POR LO QUE ME HABEIS DADO Y ME DAIS

INDICE

I.- INTRODUCCION	3
1.- SISTEMAS DE VECTORIZACION DE FARMACOS	5
2.- LIPOSOMAS	10
2.1.- <u>GENERALIDADES</u>	10
2.2.- <u>CARACTERISTICAS Y TIPOS</u>	13
2.2.1.-Estructura	13
2.2.2-Componentes	14
2.2.3.-Formación del liposoma	19
2.2.4.-Estabilidad	20
2.2.5.- Clasificación	23
2.2.5.1.-Plurilaminares o pluricompartimentales	23
2.2.5.1.1.- <u>PML</u>	24
2.2.5.2.- Unilaminares o unicompartimentales	24
2.2.5.2.1.- <u>Microvesiculares</u>	24
2.2.5.2.2.- <u>Macrovesiculares</u>	25
2.2.6.- Tamaño de los liposomas: importancia.....	25
2.3.- <u>VEHICULO DE SUSTANCIAS ACTIVAS</u>	27
2.4.- <u>METODOS DE PREPARACION</u>	31
2.4.1.- Liposomas plurilaminares.....	32
2.4.2.- Liposomas unicompartimentales microvesiculares.....	34

2.4.2.1.- <u>Ultrasonidos</u>	34
2.4.2.2.- <u>Inyección</u>	35
2.4.2.3.- <u>Eliminación del detergente</u>	36
2.4.3.- Liposomas unilaminares macrovesiculares y vesículas obtenidas por evaporación en fase reversa.....	37
2.4.3.1.- <u>Infusión en éter</u>	37
2.4.3.2.- <u>Fusión inducida por calcio</u>	38
2.4.3.3.- <u>Evaporación en fase reversa</u>	38
2.4.3.4.- <u>Microfluidificación</u>	39
2.4.3.5.- <u>Inyección Coaxial Turbulenta</u>	39
2.4.3.6.- <u>Otros Métodos de Preparación</u>	40
2.5.- <u>SEPARACION DE LA FRACCION NO ENCAPSULADA</u>	40
2.6.- <u>CARACTERIZACION</u>	41
2.7.- <u>MECANISMOS DE INTERACCION LIPOSOMA-CELULA</u>	42
2.8.- <u>APLICACIONES TERAPEUTICAS</u>	44
2.9.- <u>OTRAS UTILIDADES DE LOS LIPOSOMAS</u>	52
2.10.- <u>LIPOSOMAS DE ADMINISTRACION TOPICA</u>	52
2.10.1.- Estructura de la piel y sus anexos	53
2.10.1.1.- <u>Absorción Percutánea</u>	57
2.10.1.2.- <u>Vías de absorción</u>	58
2.10.1.3.- <u>Parámetros implicados en la Absorción Percutánea</u>	59
2.10.2.- Biodisponibilidad cutánea de los principios activos encapsulados en liposomas.....	59
2.10.2.1.- <u>Absorción Percutánea</u>	61
2.10.2.2.- <u>Acumulación Cutánea</u>	62
2.10.3.- Comportamiento tópico de los liposomas.....	63
2.9.5.- Liposomas de aplicación en dermatología.....	68
2.9.6.- Liposomas de aplicación en cosmética	72
II. OBJETO Y PLAN DE TRABAJO	79
III.- PARTE EXPERIMENTAL	87
1.- MATERIAL Y METODOS	87

1.1.- MATERIAL	87
1.1.1.- Fase Lipídica.....	88
1.1.2.- Fase acuosa	97
1.2.-METODOS.....	98
1.2.1.-Formulaciones de liposomas multilaminares	98
1.2.2.-Metodo de elaboración	
.....	10
0	
1.2.3 –Método de separación: Centrifugación	
.....	10
2	
1.2.4.-Método de valoración: Espectrofotometría u.v.	
.....	10
3	
<u>1.2.4.1.- Porcentajes de acetónido de triamcinolona captado por los liposomas y libre en el medio.</u>	
.....	10
4	
<u>1.2.4.2.- Grado de captación</u>	
.....	10
4	
1.2.5.- Estudio de la estabilidad en función del tiempo	
.....	10
5	
1.2.6.- Caracterización	
.....	10
6	
1.2.7.- Métodos de Estudio Experimental de la Absorción Percutánea	
.....	10
7	
<u>1.2.7.1.- Excipientes: Importancia para el estudio de los sistemas liposómicos y su aplicación sobre la piel.</u>	

.....	10
7	
1.2.7.1.1.- <i>Consideraciones en la Elección de los Excipientes</i>	
.....	10
7	
1.2.7.1.2.- <i>Elaboración de Excipientes</i>	
.....	10
9	
1.2.7.2.- <u>Liberación del fármaco</u>	
.....	11
3	
2.-RESULTADOS	
.....	11
7	
2.1.- <u>COMPOSICION DEL LIPOSOMA Y GRADO DE CAPTACION</u>	
.....	11
7	
2.1.1.- Datos Experimentales	
.....	11
7	
2.1.2.-Discusión	
.....	12
2	
2.2.- <u>ESTUDIO DE ESTABILIDAD</u>	
.....	12
4	
2.2.1.- Datos experimentales	
.....	12
4	
2.2.2.- Discusión	
.....	14
4	

2.3.- <u>CARACTERIZACION</u>	14
8	
2.3.1.- Microscopía electrónica de transmisión	14
8	
2.3.2.- Discusión	15
0	
2.4.- <u>LIBERACIÓN "IN VITRO" DE ACETONIDO DE TRIAMCINOLONA ENCAPSULADO Y LIBRE DESDE EXCIPIENTE</u>	16
1	
2.4.1.- Datos experimentales	16
1	
2.4.2.- Discusión	17
1	
IV.- CONCLUSIONES	17
7	
V.- BIBLIOGRAFIA	18
3	

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

En el tratamiento de un proceso fisiopatológico, es deseable que la administración de medicamentos se realice de tal forma que el fármaco alcance su lugar de actuación (**biofase**) a una determinada concentración, dentro de un rango de dosis terapéuticas efectivas, permaneciendo la misma constante durante el tiempo necesario para alterar el mencionado proceso. Dicha administración aparece limitada por resistencias al fármaco, captura del medicamento por otras células del organismo, incapacidad del fármaco para penetrar en las células o tejidos en tratamiento o por carecer de un tropismo específico, distribuyéndose por el organismo y dirigiéndose no solo a la biofase, sino también al resto de células y tejidos. En consecuencia, para obtener una concentración suficiente a nivel de las células blanco, es necesario administrar dosis relativamente elevadas, que conducen a efectos toxicológicos e inmunológicos indeseables (PUISIEUX y POLY, 1985).

Desde el punto de vista galénico, la solución a estos problemas podría estar en la asociación química de la sustancia activa a un transportador apropiado, dotado de un poder de reconocimiento para un determinado tipo de células (citotropismo) y capaz de conferir al fármaco especificidad de acción. En este sentido, uno de los objetivos de la investigación farmacéutica en las últimas décadas (PUISIEUX, 1983), consiste en el desarrollo de sistemas que liberan selectivamente al principio activo a nivel del órgano dañado, sin producir alteraciones en tejidos sanos.

Los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos desarrollados permiten controlar la absorción, las concentraciones plasmáticas, el metabolismo, la distribución tisular, así como la captación celular de agentes farmacológicamente activos (JULIANO, 1980).

Entre las múltiples ventajas aportadas por estos vectores caben señalar las siguientes (PUISIEUX y cols., 1985):

- Protección de la sustancia activa contra la inactivación (química, enzimática o inmunológica), desde el lugar de administración hasta la biofase.
- Mejora del transporte de principios activos hasta lugares difíciles de alcanzar.
- Aumento de la especificidad de acción y eficacia a nivel celular y/o molecular.
- Incremento de la vida media del fármaco en circulación.
- Alteración de las características de solubilidad de la sustancia activa y reducción de su inmunogenicidad y antigenicidad.
- Disminución de la toxicidad para ciertos órganos por modificación de la distribución tisular del principio activo.
- Carecen de toxicidad, son biodegradables y pueden prepararse industrialmente a gran escala.

1.- SISTEMAS DE VECTORIZACION DE FARMACOS

Se define vectorización como la consecución de la máxima eficacia de un fármaco, al aumentar en lo posible su liberación en la zona donde se encuentran sus receptores farmacológicos, disminuyendo al mínimo su concentración en otras zonas del organismo, con lo que se reducen los efectos adversos (TORRADO y CADORNIGA, 1989).

Los sistemas de vectorización de fármacos se clasifican en base a su magnitud estructural, considerándose dos grandes grupos: vectores macromoleculares y vectores de tamaño de partícula.

Los vectores macromoleculares pueden ser moléculas de origen natural (HOLLGADO y cols., 1990), como ácidos nucleicos (ADN), inmunoglobulinas específicas, anticuerpos específicos, eritrocitos resellados, hormonas peptídicas, dextrano, polisacáridos, proteínas plasmáticas, colágeno, lipoproteínas, glucoproteínas, y moléculas sintéticas, tales como polímeros de alcohol vinílico y derivados (polivinil pirrolidona; n-vinilpirrolidona), así como polipéptidos de alanina y tiroxina o de lisina. Estos transportadores poseen la ventaja de ser biodegradables y generalmente endocitables. Así ciertos citostáticos han sido asociados con éxito a IgG o a ADN (complejo adriamicina-ADN), pudiendo reducir sensiblemente la toxicidad intrínseca de la sustancia activa. Por el contrario, presentan una capacidad de unión limitada a un número reducido de agentes. Incluso la afinidad de la molécula transportadora por ciertos receptores celulares puede ser sensiblemente atenuada cuando este vector está ligado a un fármaco (PUISIEUX, 1978; MEZEI, 1985; KOST y LANGHER, 1986).

Los sistemas de tamaño de partícula se subdividen a su vez en vectores microparticulares, donde se incluyen microesferas, microcápsulas y partículas de látex, y vectores nanoparticulares, integrados por nanocápsulas, nanoesferas, niosomas y liposomas, constituyendo éstos últimos el objetivo fundamental de este estudio (PUISIEUX, 1985).

Las microesferas son vectores esféricos sin una distinción clara entre cubierta y núcleo y con un tamaño entre una y varias decenas de micras. Están elaboradas con polímeros sintéticos del tipo de la poliacrilamida (EDMAN y cols., 1984), poliacrildextrano (EDMAN y SJOHOLM, 1983 a) y copolímeros de etilenvinilacetato (SEFTON y cols., 1984). En el campo de la farmacoterapéutica han sido utilizadas para la administración de agentes quelantes en casos de envenenamiento por mercurio (MARGEL y HIRSH, 1982); en el transporte de enzimas inmovilizadas como la asparraginasa, detectándose un incremento en la eficacia terapéutica en el tratamiento de la leucemia linfática (EDMAN y SJOHOLM, 1983 b); así como en la vehiculización de antineoplásicos (GYVES y cols., 1983), de material biológico de elevado peso molecular (antígenos virales, concanavalina A y otras proteínas) y en inmunología (KANKE y cols., 1983). Igualmente, estas microesferas sintéticas han sido

destinadas al transporte de esteroides y citotóxicos, administrados en la cavidad intraarticular a pacientes con inflamación tópica, evitando las complicaciones derivadas del empleo de estas sustancias activas en su forma libre, facilitando su liberación en la circulación sistémica y prolongando la duración de la respuesta farmacológica (RATCLIFFE y cols., 1984).

Las más usadas son las microesferas de albúmina (TORRADO y CARDONIGA, 1989). Se utilizan en radiofarmacia como sistema de diagnóstico clínico y como transportadoras de antiasmáticos, tuberculostáticos, analgésicos e hipoglucemiantes. Son también interesantes la incorporación de citostáticos como bleomicina y fluorouracilo (GONZALEZ y cols., 1992).

Recientemente, se vienen utilizando con éxito para la preparación de microesferas sustancias como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y sus copolímeros. Destacan los satisfactorios estudios de liberación in vitro de ketoprofeno y naproxeno (CASTELLI y cols., 1998) o del toxoide tetánico (ALONSO, 2001).

Las microcápsulas, con un tamaño de partícula comprendido entre 1 y 2000 μm , se caracterizan por su capacidad para transportar agentes farmacológicamente activos en el núcleo de su estructura (DEASY, 1984 a). En el proceso de elaboración, por técnicas de polimerización interfacial, lecho fluido o coacervación simple y compleja (ARANCIBIA, 1981; MERKLE, 1984), se ha venido utilizando con gran frecuencia gelatina para la constitución de la cubierta de dichas cápsulas (NIXON y HASSAN, 1980; HARRIS, 1981; Mc MULLEN y cols., 1984). En la actualidad la relación de sustancias integrantes de la misma resulta casi interminable, destacando el empleo de polímeros acrílicos y copolímeros (poliacrilamida, poliacrildextranos, polialquilcianoacrilato, polimetilmetacrilato) (FOULI y cols., 1983), albúmina (ISHIZAKA y cols., 2002), alginatos (RAK y cols., 1984), celulosas y derivados (MOTYCKA y cols., 1985) dextranos y poliamidas (DEASY, 1984 b). Se han obtenido excelentes resultados con la microencapsulación de virus y bacterias, cristales líquidos para termografías y sustancias de diagnóstico para radioinmunidad (MAGGI y

cols., 1980). Asimismo, destacan las investigaciones destinadas a la encapsulación de hemoglobina, diuréticos (NIXON, 1981), citostáticos (KAWASIMA y cols, 1984), teofilina, esteroides y hormonas, antibióticos (GUTCHO, 1979) y enzimas (RAMBOURG y cols., 1980) y recientemente del insecticida cipermetrina (RIVAS y cols., 2001).

Los sistemas vectores a base de látex son dispersiones acuosas constituidas por partículas esféricas de tamaño inferior a una micra. Para su elaboración se utiliza látex natural o sintético. Este polímero, insoluble en agua, posee capacidad variable para retener sustancias activas en base a sus características fisicoquímicas. Se emplea como soporte para la administración de fármacos por vía tópica, ocular y parenteral (GURNEY y cols., 1979).

Las nanopartículas son partículas sólidas coloidales de tamaño entre 0.01 y 1 micra, formadas por materiales macromoleculares en las que el principio activo se disuelve, engloba, encapsula, se absorbe y/o se une de distintas formas. Según el método de elaboración pueden ser nanocápsulas o nanoesferas. Se clasifican según la naturaleza de la matriz en: nanopartículas acrílicas o nanocápsulas y nanopartículas naturales o nanoesferas (HOLGADO y cols., 1990).

Las nanocápsulas son partículas submicroscópicas generalmente esféricas y constituidas por un material polimerizado capaz de retener sustancias activas por secuestro o adsorción, en función del pH de la suspensión y de la constante de disociación del agente transportado (COUVREUR y cols., 1980 a). El proceso de elaboración consiste en la polimerización en medio ácido y en presencia de tensioactivos de monómeros hidrofílicos de tipo acrílico (acrilamida, metilmetacrilato, cianoacrilato, alquilcianoacrilato), siendo factores decisivos para su utilización en terapéutica el tamaño, estructura, capacidad de fijar el principio activo, facilidad de preparación, estabilidad y reproductividad.

Desde el punto de vista biofarmacéutico una de las grandes ventajas de las elaboradas con alquilcianoacrilato es su elevada capacidad de carga (ALSINA y cols., 1988) además de ser biodegradables, a diferencia de las otras (ALONSO, 1990)

En ellas se han incluido antimicóticos, antineoplásicos (ROLLAND y cols, 1989), (daunorubicina, actinomicina D, vinblastina, metotrexato), antibióticos (penicilina V, ampicilina), antiparasitarios (levamisol), (ALONSO, 1990), virus, compuestos de elevado peso molecular por vía oral (insulina) (DEASY, 1984 b) o indometacina por igual vía (AMMOURY y cols., 1990). Señalar también la mayor respuesta miótica de la pilocarpina gracias a estos transportadores (DIEPOL y cols., 1989).

Las nanopartículas de metilmetacrilato y acrilamida poseen ciertas limitaciones en su utilización como transportadoras de principios activos. No son biodegradables. Son metabolizadas muy lentamente, de tal forma que los productos de degradación del polímero no se eliminan del lugar de inyección hasta no alcanzar un valor determinado de peso molecular.

Las nanoesferas se presentan al microscopio electrónico bajo la forma de una red polimérica muy densa sensiblemente esférica y de aproximadamente 0.2 μm de diámetro. Se obtienen a partir de polímeros naturales por dispersión (albúmina y gelatina) o sintéticos (polialquilcinoacrilatos) por solubilización y polimerización (KREUTER, 1983). El interés

de estas partículas ultrafinas radica en su reducida toxicidad y carácter biodegradable, por hidrólisis de las funciones éster del polímero; paralelamente, la hidrofília de la cadena hidrocarbonada aumenta progresivamente hasta una solubilización del polímero. Investigaciones realizadas en presencia de microsomas hepáticos, no descartan una posible contribución enzimática a este mecanismo de degradación (LEYH y cols., 1984).

Aparte de su empleo en el transporte de antineoplásicos (actinomicina D, vinblastina, metotrexato), se vienen utilizando como vehículos de insulina (COUVREUR y cols., 1980 b),

virus, vacunas, agentes de diagnóstico, antiartríticos, antiparasitarios, en inmunología, así como en el tratamiento de deficiencias enzimáticas congénitas y de ciertas infecciones intracelulares (GUIOT y COUVREUR, 1983). Recientemente, cabe destacar las cualidades de estos vectores en el ámbito de la farmacología ocular dado su carácter biodegradable asociado a propiedades bioadhesivas y adsorbentes. Por ello, se han utilizado como transportadores de acetónido de triamcinolona y en el tratamiento de procesos inflamatorios del polo posterior del ojo (uveitis) con flurbiprofeno (VALERO y cols., 1994).

Los niosomas se pueden considerar un caso especial de liposomas cuyos componentes son alcoholes grasos etoxilados o éteres de poliglicerol de cadena lineal o ramificada (SANTUCCI y cols., 1996). Estos compuestos son tensioactivos de carácter no iónico, los cuales para su formulación en niosomas necesitan la inclusión de colesterol y de diacetilfosfato. Estos son más estables químicamente (VORA y cols., 1998) aunque notablemente más permeables y sensibles a los electrolitos que los liposomas. Destaca, su capacidad para vehiculizar agentes polares y apolares, simultáneamente. Desde el punto de vista farmacéutico pueden capturar sustancias hidrosolubles (AMP cíclico, heparina, inmunoglobulinas) y liposolubles (vitamina A, ácido linoléico). Como aplicaciones más relevantes los niosomas contribuyen a mejorar la actividad de la bleomicina a nivel tumoral (RAJA y UDUPA, 1996) y el flujo del estradiol a través del estrato córneo (VAN y cols.,1996) sin olvidar su papel en radioagnóstico como

transportadores de iopramida (ERDOGAN y cols., 1998). En cosmética se han utilizado para el transporte de agentes humectantes y filtros solares, entre otros (SEIJOO y cols., 1992).

2.- LIPOSOMAS

2.1.- GENERALIDADES

Los liposomas son vesículas microscópicas constituidas por bicapas fosfolipídicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí (lo cual constituye una capa) y enfrentadas a las cadenas hidrófobas de la otra capa. De esta forma, se aísla una amplia zona hidrófoba, ya que todas las cabezas polares se hallan en ambos lados, lo cual forma una estructura concéntrica, alternando con compartimentos acuosos. Esta distribución resulta similar a las micelas originadas por la ordenación de las moléculas tensioactivas en medio acuoso, con una importante diferencia: las micelas conforman una esfera cuya cavidad interna puede contener lípidos (por estar en contacto con las cadenas hidrófobas), mientras que la cavidad interna de los liposomas sólo contiene agua o una solución acuosa de un principio activo (MAIERHOFER, 1988; GREGORIADIS, 1990).

Estos vectores poseen una forma, estructura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 0.01 μm y 10 μm . Visualizados por microscopía electrónica (figura 1), presentan forma esferoide, observándose una sucesión de bandas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y acuosas. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfífilicas (PUISIEUX y cols., 1982; COUVREUR y cols., 1980 b).

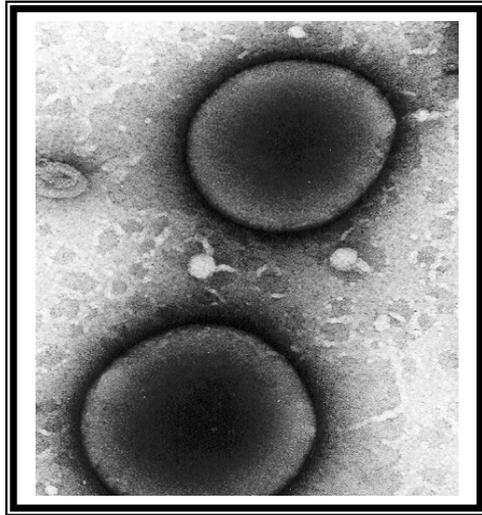


Figura 1

En 1964 el azar hizo que ALEC D. BANGHAM y cols. al estudiar el efecto de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea, observaran que estos dispersos en agua, formaban espontáneamente vesículas multilaminares, las cuales recibieron la denominación de liposomas. Por primera vez se había creado artificialmente un modelo de membrana biológica, que coincidía con la teoría presentada por GATER y GRENDEK en 1925, según la cual las membranas celulares debían estar formadas por una doble capa de moléculas parcialmente hidrófilas.

Sólo moléculas anfipáticas (con un extremo hidrófilo y otro hidrófobo) podían ordenarse en un medio acuoso formando una estructura trilaminar (una zona hidrófoba en el centro y dos zonas hidrófilas en ambos lados) con capacidad para establecer una compleja permeabilidad selectiva para los componentes moleculares del citoplasma celular.

Estos primeros liposomas fueron muy útiles para la investigación de las membranas biológicas. Gracias a este modelo de membrana SINGER y NICOLSON establecieron en 1972 que la estructura de las membranas biológicas era la de un mosaico fluido, cohesionado por fuerzas de Van der Waals, en el cual los fosfolípidos se ordenaban en forma de bicapas, pero incluían en su seno numerosas moléculas. Todas estas moléculas “flotaban” e incluso podían

desplazarse lateralmente a lo largo de la bicapa, ya que no se establecían enlaces covalentes entre ellas. Esta fluidez es consecuencia de las características de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, especialmente de la proporción relativa que existe entre ácidos grasos saturados y no saturados y de la longitud de su cadena.

Destaca el uso de este modelo para el estudio de sistemas bioquímicos, rodeados por membranas. En este sentido, se ha obtenido información sobre algunas de las propiedades básicas referentes a la agregación de moléculas anfifílicas en disolventes polares, realizándose estudios, igualmente, relativos a la permeabilidad de las membranas a moléculas, por determinación de coeficientes de partición. Posteriormente, se ha investigado el efecto de diversas sustancias activas (antibióticos poliénicos, esteroides...) sobre las características de fluidez de las membranas, mediante el establecimiento de las alteraciones en la permeabilidad de sistemas liposomiales (SENTJURC, 1980).

También constituyen un modelo de elección a la hora de establecer el papel de los lípidos de membranas en la modulación del metabolismo de los medicamentos, siendo su composición, carga y presencia de colesterol en las bicapas factores decisivos que permiten reducir la importancia relativa de factores estructurales y constitucionales de las membranas, al objeto de evidenciar las interacciones entre el medicamento y los fosfolípidos de los liposomas, y dilucidar su mecanismo de acción “in vivo” (MARKELLO y LICHTENBERG, 1984).

Sin embargo, las razones por las cuales se ha abordado el tema residen en su interés como sistemas de transporte y liberación de fármacos. Los liposomas poseen una arquitectura molecular que les permite captar una variedad de agentes activos, a través de un mecanismo relativamente específico, proporcionando una vía de transporte que lleve al fármaco al lugar de actuación, a concentraciones adecuadas, con objeto de obtener la respuesta farmacológica

deseada en condiciones de eficacia y seguridad, dado el carácter biodegradable, atóxico y no inmunogénico de este sistema de liberación. Además, la posibilidad de determinar el lugar de actuación de los liposomas por modificación de sus características superficiales, permite optimizar la disposición de las moléculas administradas a receptores específicos restringiendo su área de difusión en el organismo y evitando una distribución innecesaria de las mismas (GREGORIADIS, 1976).

A todo lo anterior, suele ir unida la propiedad de aislar el medicamento del medio durante su paso por el organismo, protegiéndolo de acciones enzimáticas. Igualmente, esta propiedad desempeña la misión de proteger al organismo frente a los efectos tóxicos derivados de la actuación de ciertos agentes terapéuticos, e incluso impedir las manifestaciones antigénicas de otros (GIOMINI y cols., 1979; DAVIS, 1981). Todas estas características equipan a los liposomas de una capacidad potencial para el transporte de agentes quimioterapéuticos (SHARATA y KATK, 1996).

2.2.-CARACTERISTICAS Y TIPOS

2.2.1.-Estructura

Las características más relevantes de estas vesículas lipídicas son (PUISIEUX, 1978):

- Presentan una pared integrada por moléculas fosfolípídicas constituyendo una doble capa. (figura 2).
- Estos fosfolípidos están orientados de forma que el polo hidrófilo se sitúa hacia el agua y el polo lipófilo mirando al interior de esta pared.
- El compartimento central lo ocupa el agua.

- Las sustancias hidrófilas ocupan el compartimento acuoso, mientras que las lipófilas se sitúan entre los fosfolípidos de la pared y las anfifílicas se unen a las bicapas por su resto lipófilo.

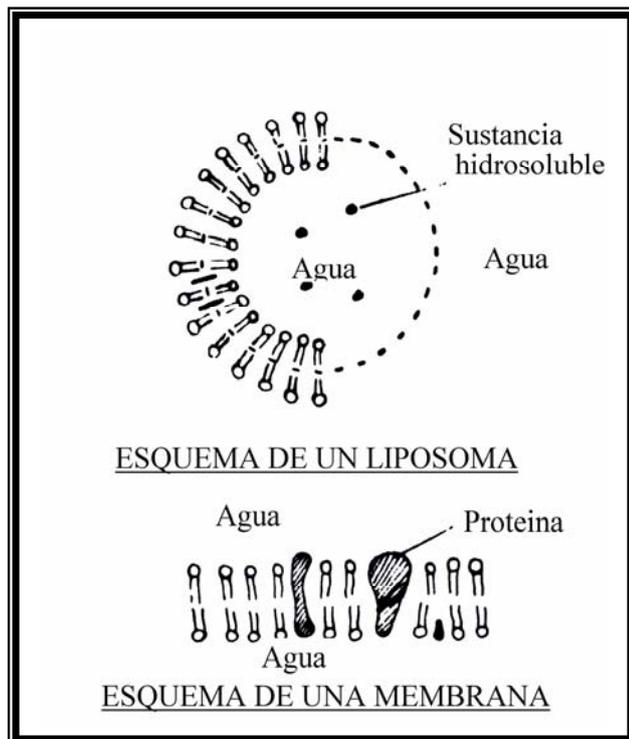


Figura 2

2.2.2-Componentes

Las materias primas constituyentes de los liposomas se pueden clasificar en varios apartados (GREGORIADIS, 1973):

- a) Fosfolípidos
- b) Colesterol
- c) Lipoides iónicos:

- aniónicos: ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, diacetilfosfato.
- catiónicos: estearilamina, esfingomielina.

d) Otros: esteroides, glucolípidos, polímeros sintéticos o proteínas.

a) Fosfolípidos:

Los fosfolípidos o lípidos anfipáticos son ésteres de ácidos grasos cuyo componente alcohólico contiene un grupo fosfato (figura 3). Están formados por dos cadenas de ácidos grasos esterificadas con los hidroxilo 1 y 2 de una molécula de glicerina. El hidroxilo 3 de esta glicerina está esterificado a su vez con una molécula de ácido fosfórico, cuya carga eléctrica ácida está salificada con una base. Esta base puede ser diversa, siendo la más frecuente la colina y la etanolamina (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, respectivamente) o bien moléculas del tipo serina e inositol (fosfatidilserina y fosfatidilinositol).

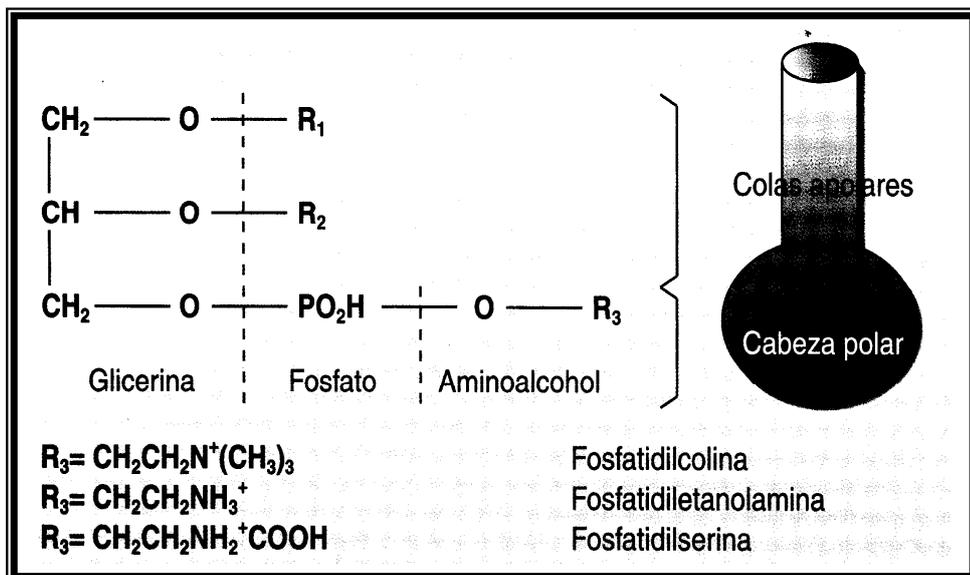


Figura 3

Formula estructural de los fosfolípidos

Los fosfolípidos poseen, por lo tanto, dos colas hidrófobas y un grupo polar o “cabeza” unido a ambas cadenas. Estas últimas suelen ser un ácido graso saturado (palmítico o esteárico) y un ácido graso insaturado (oléico, linoléico o araquidónico) (MAIERHOFER, 1988; DUFOURC, 1985).

También existen y se emplean fosfolípidos semisintéticos cuya composición se conoce exactamente como son la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), (FANG y cols., 1999), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), (HANIN Y PEPEU, 1990). Tienen especial interés estos productos obtenidos tras la purificación de lecitinas hidrogenadas con los que se reduce el número de factores que influyen en la encapsulación (KULKARNI y VARGHA-BUTLER, 1995).

Recientemente se han elaborado liposomas de nistatina con combinaciones como la DPPC y la DSPC-fosfatidiletanolamina (PE)-polietilenglicol (PEG), formándose un complejo entre la nistatina-DSPE-PEG, que contribuye a la adsorción del principio activo a la membrana liposomal y a su mayor encapsulación (KUNIKAZU y cols., 2000).

La principal fuente de fosfolípidos es la lecitina, sustancia natural obtenida de las habas de soja o de la yema de huevo. La composición de la lecitina y sus propiedades físicas pueden variar enormemente según la fuente de obtención y el grado de purificación. La lecitina de huevo con un 69% de fosfatidilcolina y un 24% de fosfatidiletanolamina y la lecitina de soja con un 21% de fosfatidilcolina, un 22% de fosfatidiletanolamina y un 19% de fosfatidilinositol (ASH. M. y ASH. I., 1995).

La consistencia de las lecitinas varía ampliamente, desde líquidos viscosos hasta sólidos pulverulentos, pasando por masas cerasas según el contenido en ácidos grasos libres. El color puede oscilar del blanco al amarillo o marrón. Los fosfolípidos no presentan olor, aunque las lecitinas vegetales tienen un olor y un gusto similares a los del aceite de cacahuete (WADE y WELLER, 1994).

Los fosfolípidos son prácticamente insolubles en aceites fríos tanto animales como vegetales, disolventes polares y agua. Son solubles en hidrocarburos alifáticos y aromáticos, hidrocarburos halogenados (cloroformo), aceites minerales, ácidos grasos, éter y éter de petróleo (LEHNINGER, 1988); en agua adquieren una forma de agregación diferente en función del pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de sustancias cargadas y colesterol. La

estructura de capa bimolecular se da de manera rápida y espontánea en el agua y se debe a su carácter anfipático (DE GIER y cols., 1969).

La formación de liposomas sólo tiene lugar a temperaturas superiores a la crítica, a la que las cadenas acílicas grasas de los fosfolípidos son líquidas. La temperatura de transición crítica es una propiedad característica de las bicapas lipídicas y está asociada con la transformación de un estado ordenado (gel) de las cadenas hidrocarbonadas grasas en otro más desordenado (cristal-líquido) debido a la fusión de estas. En el curso de esta transición, los grupos CH₂ en conformación trans pasan a un estado en el cual existen diferentes conformaciones gauches, siendo este desorden dinámico. La temperatura de transición es función de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, aumentando constantemente cuando estas crecen de C₁₀ a C₁₈. La hidratación de los fosfolípidos origina la aparición de numerosas fases de estructura variada (GOMEZ FERNANDEZ y GOÑI, 1983):

- Por debajo de la temperatura crítica los fosfolípidos se encuentran en fase de gel, con cadenas ordenadas paralelamente en conformación totalmente trans como en las estructuras anhidras.
- Por encima de la temperatura crítica se origina una disminución del espesor de las bicapas y un aumento de la distancia entre las cadenas dando lugar a la fase de cristal-líquido. El estudio in vitro del nicotinato de tocoferol ha permitido mostrar que esta molécula difunde más fácilmente a través del estrato córneo cuando se encapsula en liposomas fluidos (compuestos por fosfolípidos con una temperatura de transición baja), que en liposomas sólidos (compuestos por fosfolípidos con una temperatura de transición elevada) (GABRIJEDEIE y cols., 1990).

b) Colesterol:

Un factor que condiciona la permeabilidad y fluidez de las bicapas lipídicas, y por tanto la estabilidad de los liposomas es la presencia de colesterol en éstas. Los fosfolípidos pueden incorporarlo hasta una concentración molar del 50%. Por encima de este valor los liposomas son metaestables (entre gel y cristal-líquido) y las vesículas tienden a agregarse y precipitar;

además se forman cristales de colesterol y disminuye la razón molar colesterol/fosfolípidos. Las modificaciones por la adición de colesterol sobre las características de la membrana liposomal dependen de su estado inicial; es decir, cuando se trata de la fase cristal líquido (temperatura $>T_c$), el colesterol se inserta en las cadenas lipídicas, aumenta el empaquetamiento entre los fosfolípidos y la permeabilidad disminuye. En el estado de gel (temperatura $<T_c$), el colesterol se inserta (figura 4) junto a las cabezas polares, de modo que la fluidez de las cadenas y la permeabilidad se ve aumentada (YATVIN y cols., 1982).

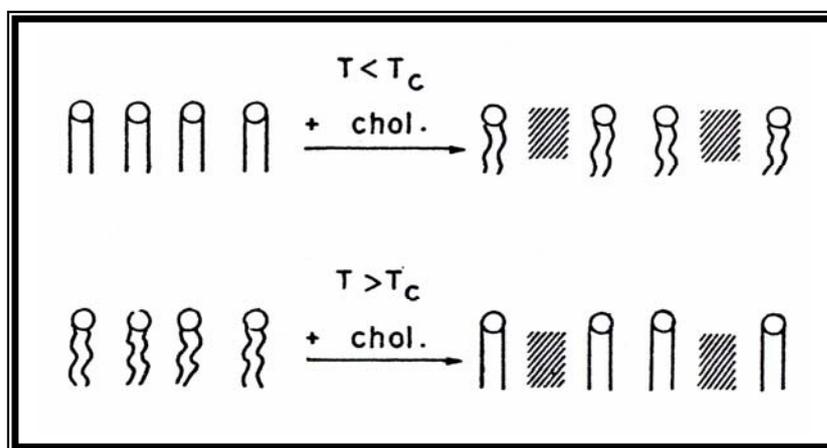


Figura 4

c) Lipoides iónicos:

La adición de compuestos iónicos confiere a los liposomas una carga positiva o negativa, lo que conlleva una repulsión electrostática entre las diferentes láminas de la

vesícula. Como resultado, aumenta el espacio interlaminar para la captación de sustancias hidrófilas (PUISIEUX, 1985). Los utilizados pueden ser:

- aniónicos: ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, diacetilfosfato.

- catiónicos: estearilamina, esfingomielina.

a) Otros componentes:

Recientemente se han empleado por distintos autores: diclorato de glicerol/colesterol/polioxietileno-10-esteárico éter (JAYARAMAN y cols., 1996), glicerol/dilaurato/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter (HU y cols., 1995), dimiristoilfosfatidilglicerol (SUAREZ y cols., 1998).

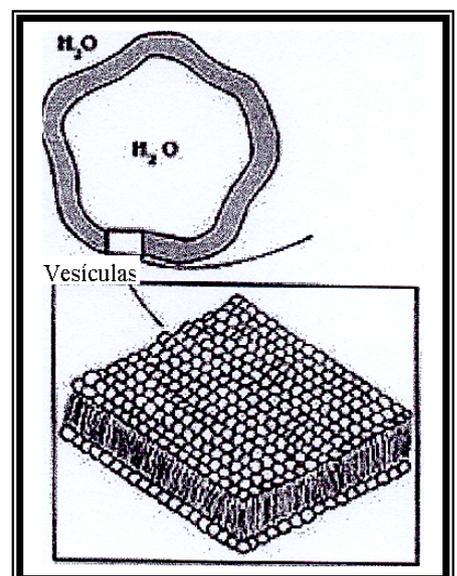
Se están utilizando polímeros como el polietilenglicol (PEG) para incrementar la vida media plasmática de los liposomas y reducir su acumulación en el SRE (LASIC, 1993; LAVERMAN y cols., 2000). Similares resultados se han obtenido con otros polímeros sintéticos como la polietiloxazolina (ZALIPSKY y cols., 1995).

2.2.3.-Formación del Liposoma

La formación de bicapas a partir de fosfolípidos se da de manera rápida y espontánea en el agua a causa de (GIOMINI y cols., 1979) (figura 5):

- Las interacciones hidrofóbicas, que son las fuerzas dirigentes principales.
- La interacción de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas.
- La interacción electrostática entre el grupo polar y el agua.

Las moléculas de agua son liberadas de las colas hidrocarbonadas a medida que quedan secuestradas en el interior apolar de la bicapa; esta liberación da como resultado un gran aumento en la entropía. Los fosfolípidos se agregan para formar los liposomas, debido a la tendencia del medio acuoso circundante a adquirir el estado de



máxima entropía en el que las moléculas lipídicas se disponen de forma que reducen al mínimo, el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al agua. De esta forma, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse en sí mismas, de tal manera que no existan extremos con cadenas expuestas, lo que da como resultado la formación de un compartimento central acuoso. La cabeza polar del fosfolípido se orienta hacia la fase acuosa, en tanto que la región hidrófoba se sitúa fuera del contacto del agua (STRYER, 1976).

Figura 5

2.2.4.-Estabilidad

En principio los liposomas poseen una estructura estable ya que en ellos están presentes los fosfolípidos en agua al estado termodinámicamente más estable. Sin embargo, su conservación es un fenómeno complejo. Desde el punto de vista químico los fosfolípidos de los liposomas pueden autooxidarse especialmente aquellos que contienen ácidos grasos con dobles enlaces. Esta peroxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y pH elevado, e inhibida por agentes quelantes, como EDTA (USTER, 1997) y antioxidantes, como es el caso del α -tocoferol (HUNT y TSANG, 1981; MEDINA y cols., 1986; MAIERHOFER, 1988). Sin embargo el colesterol es afectado mínimamente por la oxidación ya que la fosfatidilcolina es un inhibidor muy efectivo (WEINER y cols., 1973).

Otro factor a considerar es la hidrólisis de los ácidos grasos, que depende del tiempo, la temperatura y el pH. Dicha hidrólisis se minimiza a pH = 6.5 (FROKJAER y cols., 1982).

Físicamente, el principal problema consiste en la agregación de los liposomas, lo que modifica las características de permeabilidad de la pared lipídica, con la consiguiente liberación del principio activo captado.

La agregación de vesículas lipídicas puede controlarse aportando carga eléctrica negativa al liposoma, mediante la adición de pequeñas cantidades de lípidos aniónicos. Asimismo, la

presencia de lípidos catiónicos, como la estearilamina, carga positivamente al liposoma, aunque su toxicidad limita su uso.

Una de las posibles soluciones a este problema sería la liofilización. Investigaciones al respecto manifiestan la fácil rehidratación de las vesículas liofilizadas, constatándose una retención del 60 al 70% del producto inicialmente encapsulado. También la encapsulación de fármaco se puede realizar en el curso de la rehidratación (PEER y MARGALIT, 2000). De esta forma podría asegurarse su conservación durante 18 meses (SZOKA y PAPAHADJOPOULOS, 1978; GORDON y cols., 1982; MICHELLAND-HENRY y cols., 1983).

También se ha propuesto la congelación como método de conservación, combinada con el empleo de crioprotectores (glicerol, lactosa, manitol, dimetilsulfóxido) a bajas concentraciones (GORDON y cols., 1982; CROMMELIN y cols., 1983; PUISIEUX y POLY, 1985; MEDINA y cols., 1986).

En lo referente a la liberación prematura del principio activo, depende fundamentalmente de su naturaleza, tamaño molecular y solubilidad, así como de la temperatura.

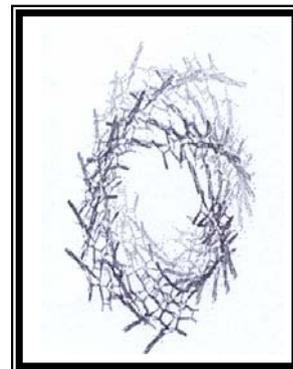
Con objeto de mejorar la estabilidad del sistema, se suele incorporar colesterol a la bicapa lipídica, detectándose un descenso en la permeabilidad de la membrana liposomal (KUNIKAZU, 2000; FANG y cols., 1997; VIRTANEN y cols., 1995). Este efecto también se manifiesta con mayor intensidad cuanto más larga es la cadena de carbonos del o de los lípidos constituyentes de las bicapas. Por el contrario, la permeabilidad aumenta y por tanto la inestabilidad, como consecuencia de la presencia de compuestos cargados o de proteínas en el medio, éstas últimas por insertarse en la pared liposomal (MAIERHOFER, 1988).

En este apartado dedicado a la estabilidad cabe destacar las innovaciones realizadas en la formulación de liposomas destinados a aplicación por vía tópica. En este campo y al objeto de mejorar la estabilidad de las vesículas lipídicas se utilizan con relativa frecuencia esfingolípidos, así como otras sustancias de carácter anfílico como alquilfosfatos, sales de N, N-dimetil-N, N dialquil amonio o los diésteres de ácidos dicarboxílicos con sacarosa (SEIJOO y cols., 1992).

Igualmente, se ha sugerido la posibilidad de utilizar liposomas con una estructura, similar a la observada en los queratinocitos de la capa córnea de la piel, para formulaciones de administración tópica. De esta manera se garantizaría una máxima compatibilidad entre el vehículo portador de los ingredientes activos y la piel. Así, se propone que en lugar de fosfolípidos, se incluyan en su composición ceramidas acompañadas de colesterol, colesteril sulfato y ácido palmítico, ya que esta mezcla es muy similar a la que forma el estrato córneo de la piel (WESTERHOF, 1985).

Por último mencionar que las formulaciones de liposomas destinadas a la administración intravenosa requieren ser estabilizadas, al objeto de incrementar la vida media plasmática de los fármacos. Con este fin el CSIC ha desarrollado polímeros cristal-líquido colestéricos (figura 6),

Figura 6



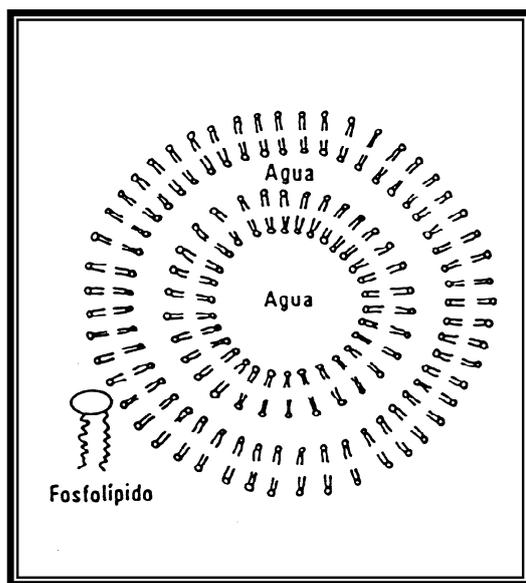
biocompatibles, que interaccionan con los liposomas, recubriéndolos, gracias a su estructura helicoidal, sin alterar la estructura molecular de estos vectores y contribuyendo a su estabilización.

2.2.5.- Clasificación

Los liposomas se clasifican en virtud de su tamaño, número de compartimentos y modo de obtención (PUISIEUX, 1978, PUISIEUX y cols., 1982, DOUSSET y DOUSTE., 1985):

2.2.5.1.-Plurilaminares o pluricompartimentales (vesículas multilaminares– MLV)

Se caracterizan porque poseen varios compartimentos acuosos concéntricos (figura 7). El diámetro total, de 0.1 a 10 μm , cambia con las condiciones de fabricación, pero suele mantenerse en el intervalo anterior. La distancia entre las capas lipídicas es función de la



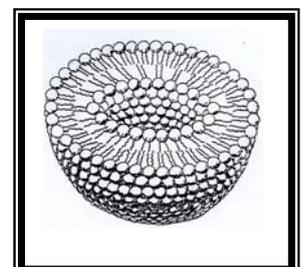
naturaleza de la pared y condiciona el volumen de las capas acuosas. En general es de 30 Å . El diámetro del compartimento central va de 100 a 150nm. La distancia interlaminar es de 1.8 nm y el espesor de cada lámina es de 4,8 a 6,9nm (KELLAWAY, 1980). Se forman cuando el fosfolípido es suspendido y sometido a agitación en un exceso de solución acuosa (BANGHAM y cols., 1965). Recientemente han sido utilizados por VEMURI y RHODES, 1995; YU y LIAO, 1996; SCHRAMLOVA y cols., 1997.

Figura 7 LIPOSOMA PLURILAMINAR

2.2.5.1.1.- PML (Liposomas Plurilaminares Multivesiculares)

Poseen un tamaño entre 150-250nm. Se obtienen a partir de liposomas MLV previamente sintetizados, a los que se somete a un proceso de microfluidificación. La estructura característica de estas vesículas se podría definir como la de un liposoma multilaminar que engloba en su interior otros liposomas, que a su vez son multilaminares (MARTI y cols., 1998).

2.2.5.2.- Unilaminares o unicompartmentales



Poseen un compartimento central acuoso y una pared. En función de su tamaño se subdividen en microvesiculares y macrovesiculares (figura 8). Recientemente han sido utilizados por YU y LIAO, 1996; SCHRAMLOVA y cols., 1997; GABIZON y cols., 1997.

Figura 8

2.2.5.2.1.- Microvesiculares (vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones – SUV)

Su diámetro total es 40 veces menor (25 a 50nm) que el de los plurilaminares. Suelen obtenerse por tratamiento de una suspensión de MLV con ultrasonidos. Para evitar la degeneración oxidativa, térmica o hidrolítica de la cadena grasa, la sonicación se debe realizar bajo atmósfera inerte y en condiciones de temperatura controlada (GIOMINI y cols., 1979). El tiempo de sonicación necesario depende del pH, de la estructura química del fosfolípido y de la fuerza iónica de la solución en la que está dispersada.

Cabe destacar los obtenidos mediante tecnología DRV (Deshidratación Rehidratación Vesicular) (KIRBY, 1984). El procedimiento consiste en formar en primer lugar una suspensión con liposomas unilaminares pequeños, los cuales contienen el producto a

encapsular. A continuación se liofiliza la dispersión y posteriormente se rehidrata, separando el material no encapsulado.

2.2.5.2.2.- Macrovesiculares (vesículas unilaminares de grandes dimensiones- LUV)

Su diámetro total es de 0.2 a 1 μm . Su capacidad de encapsulación es 10 veces mayor que los plurilaminares y 40 veces superior que los microvesiculares. La importancia de estos liposomas reside en que son capaces de vehicular una cantidad algo más elevada de agua y, por consiguiente, de principio activo hidrosoluble.

2.2.6.- Tamaño de los liposomas: importancia

En cuanto a la estabilidad y al comportamiento físico de los liposomas tiene gran importancia el tamaño y la homogeneidad, asociando la disminución en la encapsulación con un aumento del tamaño (FANG y cols., 1997), ya que estos parámetros influyen en el comportamiento y el destino de los liposomas en la circulación sanguínea.

El tamaño de los liposomas juega un papel importante en la velocidad de eliminación, así como en el mecanismo de eliminación. En general, una población heterogénea de liposomas se elimina en dos fases: primero una eliminación rápida y después una eliminación lenta. En el caso de una población homogénea (en cuanto al tamaño), la eliminación de la circulación sanguínea es monofásica (SCHNEIDER, 1978). Los liposomas pequeños son eliminados más lentamente que los grandes (SANTOS y GUERRERO, 1994).

También el tamaño puede caracterizar la liberación, así los liposomas de mayor tamaño liberan más lentamente los solutos solubles en agua que los de menos diámetro (SUAREZ y cols., 1998).

En la práctica es importante determinar si el método de preparación permite obtener un tamaño de liposomas compatible con la acción terapéutica deseada. En este sentido fueron realizados estudios “in vitro” sobre la influencia del tamaño de los liposomas observando su fagocitosis por células macrófagas peritoneales de ratón (MATTENBERGER-KREBER, 1976) sólo en vesículas mayores de 100nm (SCHNEIDER y cols., 1978).

A modo de ejemplo la figura 9 resume la influencia del diámetro externo de los liposomas (unilaminares) sobre algunas de sus características (WILSCHUT, 1982), apreciándose un volumen acuoso y un porcentaje de encapsulación más elevados en LUV, siendo los menores valores los aportados por liposomas SUV (PUISIEUX , 1985):

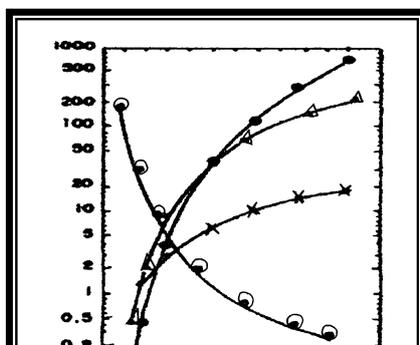


Figura 9

(x) volumen acuoso (l/mol de lípido), (λ) volumen encapsulado por vesícula (1×10^{-15}), (μ) vesículas por mol de lípido ($n \times 10^{-18}$), (Δ) moléculas de lípido por vesícula ($n \times 10^4$)

También es importante considerar la influencia que tiene la carga iónica de las vesículas liposómicas en su permeación cutánea. La aplicación tópica de liposomas cargados positivamente, duplica la cantidad de lípidos depositados en las capas más profundas de la piel en comparación con los liposomas cargados negativamente. Sin embargo también debe

tenerse en cuenta que la aplicación de formulaciones que poseen una carga neta positiva sobre la piel puede inducir un marcado grado de irritación cutánea.

2.3.- VEHICULO DE SUSTANCIAS ACTIVAS

Se considera que un vehículo ideal de sustancias activas debe poseer las siguientes cualidades: ser biodegradable (si es posible) y atóxico (sea cual sea la vía de administración) tanto él como sus metabolitos. Debe poseer la forma y tamaño más convenientes para la incorporación del principio activo y su absorción por las células del receptor. También debe conferir aislamiento y protección a las sustancias activas desde el lugar de administración

hasta la biofase, donde liberaría la sustancia activa. Debe estar dotado de cierto tropismo (afinidad) por la célula “diana”. En definitiva, el vehículo ideal sería aquel cuyo destino fuera modificable fácilmente, en función de la molécula administrada y del lugar de acción (PUISIEUX, 1978).

En el caso de los liposomas, estas vesículas tienen una tendencia natural a ligarse a determinados tipos de tejidos y células, cualidad que se puede utilizar para incrementar al máximo la eficacia terapéutica del fármaco administrado y reducir al mínimo los efectos sistémicos no deseados. Igualmente, pueden programarse para la liberación controlada de fármacos durante un periodo prolongado de tiempo. Al ser químicamente similares a otras células que circulan en la sangre, son biológicamente compatibles con ellas y también fáciles de metabolizar por el organismo. Conjugados con anticuerpos se unen a las células diana con mayor avidez que las formas solubles de los mismos. Constituyen un medio útil para proteger productos lábiles biológicamente activos, como proteínas, y las dosis eficaces de un fármaco se pueden reducir de forma espectacular cuando se administra en un preparado liposomal, por ejemplo, 800 veces en el caso de agentes incorporados en liposomas contra la leishmaniosis (MAIERHOFER, 1988).

Aparte de todas las ventajas reseñadas, los liposomas poseen la capacidad de incorporar solutos, tanto en la fase acuosa como en la lipídica, durante su formación. La eficacia en la encapsulación es función de diversos factores, entre los que cabe destacar el tipo de vesícula, la composición de la pared lipídica, concentración de fosfolípidos directamente proporcional a la cantidad de fármaco encapsulado (FANG y cols., 1997), la carga del liposoma, así como la naturaleza del material a transportar (DOUSET y DOUSTE, 1985). En lo referente a este último aspecto se ha apreciado como la capacidad de encapsulación en liposomas multilaminares de distintos esteroides (hidrocortisona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y hexacetónido de triamcinolona) se ve influenciada por su hidrofobicidad, solubilidad acuosa, peso molecular y concentración inicial (KULKARNI y VARGHA-BUTLER, 1995). Así, moléculas altamente polares y relativamente pequeñas, son atrapadas

en el compartimento acuoso, siempre y cuando no interfieran en la formación de los liposomas, y su tamaño sea compatible con las dimensiones de los espacios acuosos entre los planos de las cabezas de los grupos hidrófilos (GREGORIADIS, 1976). En este proceso juega un papel preponderante las interacciones electrostáticas. Las moléculas no polares son intercaladas entre las bicapas, mientras que las anfifílicas se fijan a la vesícula por su resto lipófilo (figura 10). La extensión y lugar de unión dependen, fundamentalmente, de las interacciones electrostáticas e hidrófoba (PUISIEUX, 1978).

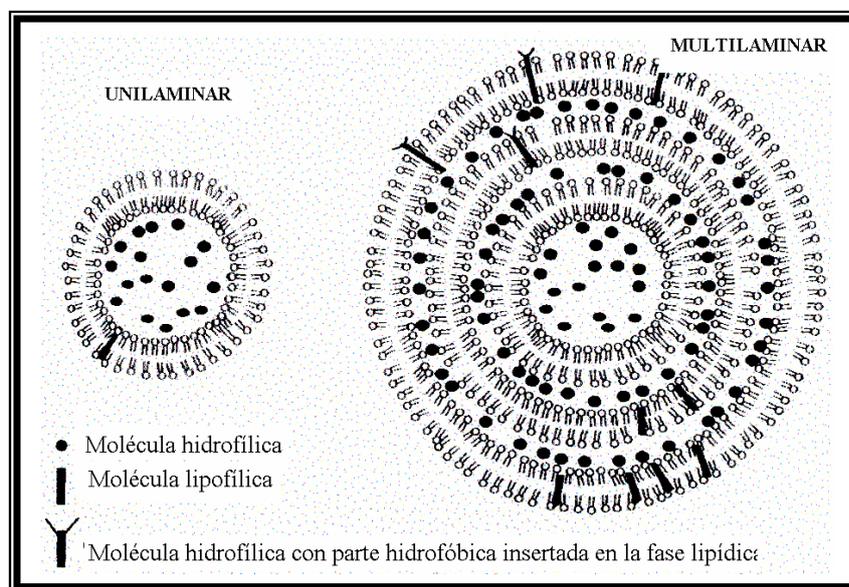


Figura 10

No obstante, algunos inconvenientes limitan su utilización (CORAN y cols., 1980; BETAGERI y cols., 1993). A los problemas de estabilidad ya comentados, se une su débil capacidad de encapsulación y poder protector limitado. Asimismo, estudios de distribución tisular demuestran su acumulación casi exclusiva a nivel hepático y esplénico, lo cual reduce la disponibilidad del vector para otros órganos.

Para conseguir dirigir adecuadamente a los liposomas se están utilizando con mayor o menor éxito (LONGER y cols., 1987):

- Anticuerpos que se fijan a la superficie del liposoma para encaminar el anticuerpo y el fármaco que contiene hacia determinados receptores antigénicos específicos de la superficie de un tipo celular en particular (KLEGERMAN y cols., 2002) (figura 11).

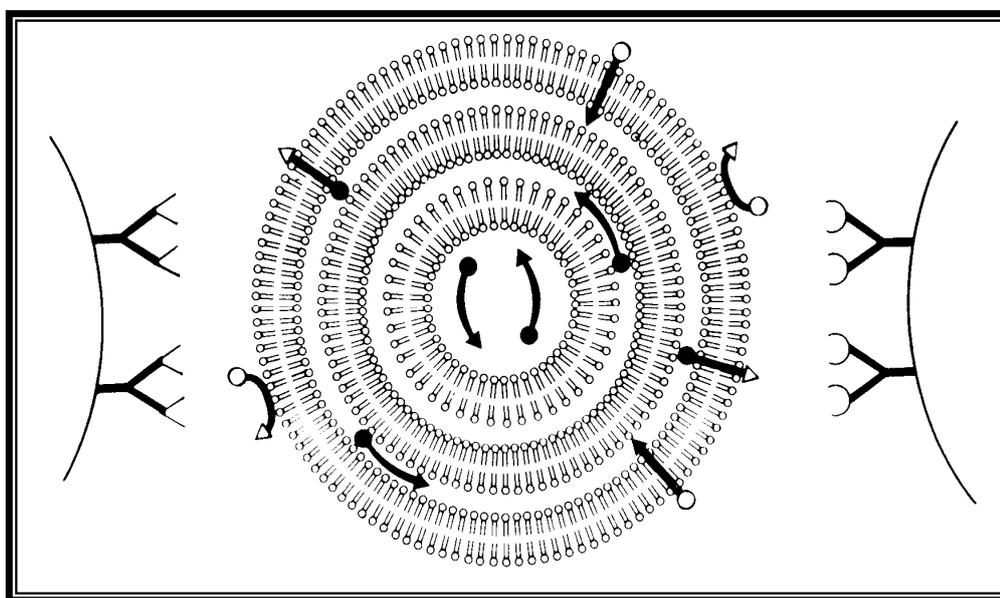


Figura 11

- Determinantes hidrocarbonados como sitios de reconocimiento. Los determinantes son componentes de las glucoproteínas o glucolípidos de la superficie celular, que intervienen en el reconocimiento, interacción y adhesión célula-célula. Tienen potencial para dirigir liposomas hacia determinados tipos celulares mediante su inclusión en la membrana liposómica. Así pues los macrófagos poseen un sistema de reconocimiento formado por receptores para manosilo, galactosilo, inmunoglobulina... que facilitan la fagocitosis del liposoma a través de esos ligandos (SHAO y MA, 1997).

Igualmente y con objeto de solucionar alguno de los inconvenientes de su utilización se está intentando aumentar la afinidad de los liposomas por un tejido determinado modificando su carga eléctrica (GREGORIADIS, 1995). Es decir, la unión de liposomas a algunas superficies puede ser mediada por interacciones electrostáticas.

La utilidad médica de los liposomas convencionales se ve limitada por su rápida fagocitosis por las células del S.R.E., fundamentalmente en hígado y bazo. Aunque esta característica es útil cuando los liposomas se utilizan para transportar drogas en el tratamiento de ciertos procesos infecciosos en los que el S.R.E. es el órgano diana, no lo es tanto cuando se utilizan en el tratamiento de tumores (ALVING, 1992). Se están desarrollando en la actualidad nuevos liposomas a los que se les incorpora pequeñas cantidades de glicolípidos con carga negativa que los vuelve más hidrófilos y reduce la opsonización y fagocitosis por el sistema retículo endotelial. Estos liposomas permanecen en sangre 100 veces más que los liposomas convencionales y pueden así aumentar la eficacia farmacológica de los principios activos encapsulados (PAPAHADJOPOULOS y cols., 1991). Tanto es así que los liposomas cargados negativamente liberan su contenido y se unen con mayor eficacia que los neutros (HEATH y cols., 1985).

Estudios realizados en la misma línea demostraron como el grado de unión de liposomas a córneas extirpadas de conejo, era el doble para los cargados positivamente comparados con los de carga negativa y estos últimos el doble que los liposomas neutros (SHAEFFER y KROOHN, 1982).

2.4.- METODOS DE PREPARACION

Ante todo un método de preparación debería ser sencillo, estandarizado, reproducible y con una buena relación entre coste y eficacia. Existen variables que permiten obtener liposomas de distintos tipos (DOUSSET. N. y DOUSTE. L., 1985), no solo en lo que se refiere a su tamaño o laminaridad, sino también en cuanto a sus características superficiales o a su capacidad para incorporar ingredientes activos.

A la hora de seleccionar los componentes y el método de preparación más adecuados al objeto de obtener liposomas con unas características determinadas, es importante tener en cuenta lo siguiente:

- Cuanto más elevada es la concentración de los lípidos una mayor proporción de la fase acuosa puede ser encapsulada.
- La vida media de un liposoma se incrementa cuando aumenta la dosis de lipido.
- El índice de encapsulación es más elevado cuanto más lentamente se realice la hidratación.
- La adición de fosfolípidos cargados incrementa la distancia entre las membranas lipídicas.
- Otra variación en estudio es la que realizan la formación de liposomas, cuyos lípidos posean una temperatura de transición fácilmente alcanzable, ya que existen métodos físicos que pueden elevar la temperatura de una zona corporal, (por ejemplo, la zona cancerígena), con lo cual se logra que sólo en la zona afectada se libere el principio activo, que así deja de ser nocivo en otras zonas corporales (PONS, 1995).

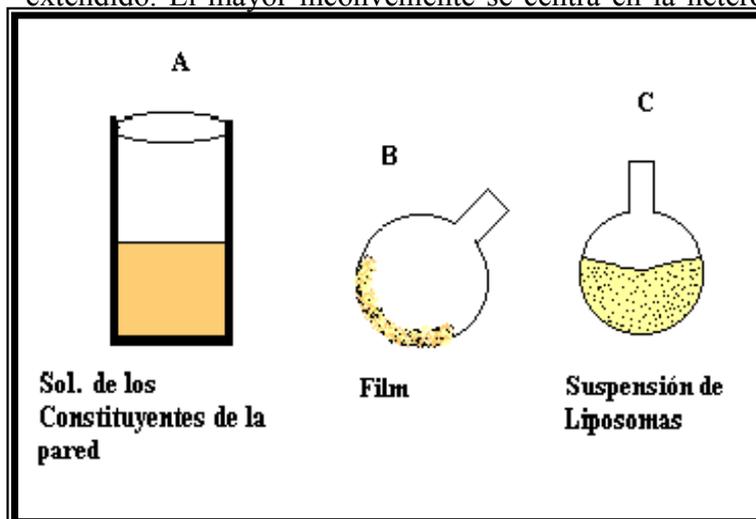
Así pues el procedimiento de fabricación deberá elegirse, en cada caso concreto, teniendo en cuenta sobre todo la composición, el tipo de vesícula y la naturaleza del principio activo que se pretende incluir en el sistema.

2.4.1.- Liposomas plurilaminares (MLV)

BANGHAM y cols., en 1974, propusieron un método para la obtención de vesículas multilaminares de grandes dimensiones. Consta de diferentes etapas, esquematizadas en la figura 12:

- El fosfolípido, o una mezcla de diferentes fosfolípidos, y el resto de los componentes de la pared lipídica, son solubilizados en un disolvente orgánico volátil .
- En las paredes del matraz que contiene la solución anterior, se sitúa una película lipídica, por evaporación a vacío del disolvente.
- Con el fin de hidratar los lípidos, una solución acuosa, generalmente tamponada, es vertida en el matraz bajo ligera agitación, a una temperatura superior a la de transición del lípido, o a la de transición más elevada cuando se trata de una mezcla de fosfolípidos. El resultado es la formación de una suspensión de liposomas en el exceso de solución acuosa.

Dependiendo de la naturaleza del agente a encapsular, en el caso de sustancias hidrófilas, el principio activo es incorporado al sistema en al fase acuosa; cuando sean lipófilas, es añadido desde el comienzo en la solución orgánica. La facilidad de preparación y una aceptable eficacia en la encapsulación son, probablemente, las razones de que su empleo esté muy extendido. El mayor inconveniente se centra en la heterogeneidad de su tamaño (OLSON y



cols., 1984), aunque pueden ser presionados a través de filtros para mejorar la distribución de tamaños.

Figura 12

2.4.2.- Liposomas unicompartmentales microvesiculares (SUV)

Este tipo de vesículas lipídicas se obtienen, principalmente, por los métodos denominados: irradiación con ultrasonidos, inyección de una solución etanólica, eliminación del detergente y por extrusión a alta presión (PUISSIEUX y DELATTRE, 1985).

2.4.2.1.- Ultrasonidos

La preparación de SUV por irradiación con ultrasonidos es la técnica más frecuentemente utilizada y permite obtener vesículas, homogéneas en dimensiones y rodeadas por una sola capa bimolecular, aplicando la filtración en gel para separar las vesículas multilaminares restantes de las unilaminares (HUANG, 1969), o bien la ultracentrifugación (GIOMINI y cols., 1979).

La suspensión de MLV, elaborada por el método previamente descrito, es sometida a ultrasonidos. Las frecuencias empleadas en los dispositivos de sonicación son del orden de 20KHz. La acción de ultrasonidos sobre dispersiones de fosfolípidos, a una temperatura inferior a la crítica de los lípidos, entraña la formación de vesículas inestables, altamente permeables, produciéndose fenómenos de fusión vesícula-vesícula que se producen cuando se supera la temperatura crítica (KREUSCHNER, 1986).

La irradiación comporta una serie de inconvenientes, como la degradación química del lípido o de la sustancia activa, y una contaminación de la preparación por partículas del metal constituyente de la sonda.

Aparte del empleo de la cromatografía en gel (PRIGENT y ALOUF, 1978), los MLV restantes pueden ser separados por ultracentrifugación (GIOMINI y cols., 1979); los

liposomas pluricompartimentales, de mayor peso, se depositan en el fondo del recipiente, mientras que los SUV quedan en el sobrenadante (SENTJURC, 1980; CORAN y cols., 1980).

2.4.2.2.- Inyección

Inyección en agua o en una solución tamponada, de una solución etanólica que contiene el fosfolípido y los otros constituyentes de la pared (BATZRI y KORN, 1976). Este método consta esencialmente de cuatro fases: (figura 13).

- Disolución de los componentes de la pared en etanol; las concentraciones habitualmente empleadas son de 20 a 40 μ moles de fosfolípido por ml.
- La solución alcohólica es rápidamente inyectada con la ayuda de una jeringa, en una solución tamponada (CLK 0.1-0.2 M), donde se forman espontáneamente las vesículas unilaminares.
- La solución es rápidamente concentrada por ultrafiltración.
- Eventualmente la solución es sometida a diálisis, para eliminar los restos de alcohol.

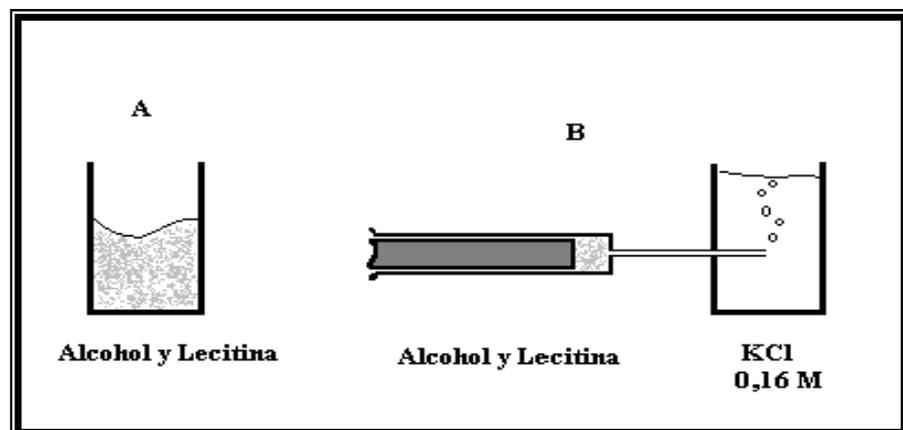


Figura 13

La ausencia total de ultrasonidos, así como de agentes tensioactivos, constituyen las ventajas primordiales de este método.

Se utiliza también una modificación de este método consistente en técnicas de congelación-deseccación de las vesículas lipídicas y posterior reconstitución por liofilización (LIN y cols., 1996).

2.4.2.3.- Eliminación del detergente

Otra técnica, ampliamente utilizada para la reconstrucción de membranas biológicas, es la denominada eliminación del detergente. El principio del método consiste en la dispersión de los fosfolípidos en agua por formación de micelas mixtas con la ayuda de agentes tensioactivos (sales biliares y derivados: colatos, desoxicolatos, tritón X-100). La eliminación del detergente se realiza, posteriormente, por centrifugación, diálisis o filtración a través de geles. La eliminación se efectúa a velocidad constante y de forma reproducible. Se obtienen poblaciones homogéneas con tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm, en función de la relación fosfolípido/tensioactivo. No obstante, el mayor inconveniente reside en la persistencia de este último en la preparación con problemas derivados de su acción sobre las propiedades físicas de las vesículas (MAIERHOFER, 1988).

2.4.2.4.- Extrusión a alta presión

Los liposomas multilaminares pueden ser reducidos por extrusión, a alta presión, a través de unos filtros de tamaño pequeño de poro. Este proceso se ha descrito detalladamente e indica que el 60% de las vesículas obtenidas poseen un diámetro medio comprendido entre

250 y 500 Å. Es aplicable a grandes volúmenes de dispersiones lipídicas con alta concentración (BAREN-HOLZ y cols., 1979).

Dousset y Douste describen otra forma de elaboración basada en el hecho de que los ácidos fosfatídicos a pH 10-11, y las mezclas de ácidos fosfatídicos y lecitinas a pH 7-8, se transforman espontáneamente en liposomas unilaminares cuando el pH de la suspensión aumenta rápidamente (en menos de 2 minutos), reajustándose seguidamente hasta la neutralidad.

2.4.3.- Liposomas unilaminares macrovesiculares (LUV) y vesículas obtenidas por evaporación en fase reversa (REV)

2.4.3.1.- Infusión en éter

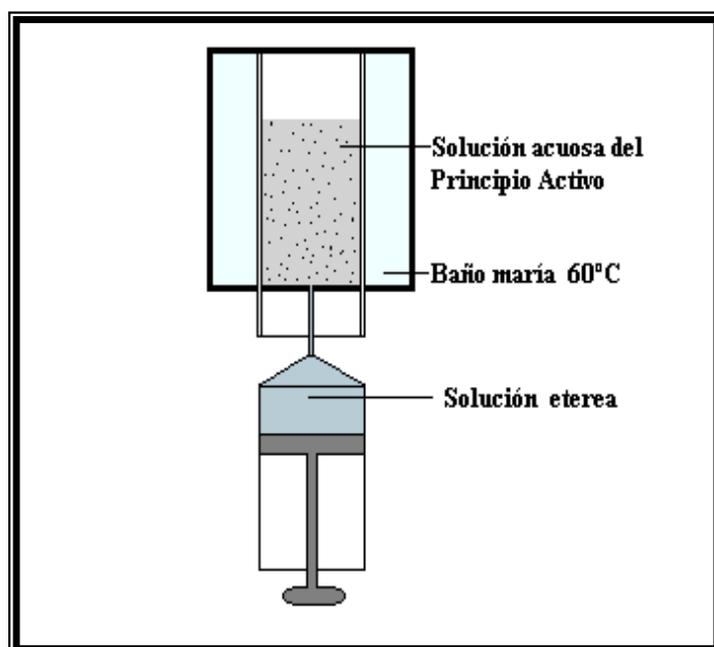


Figura 14

Este método consiste en inyectar una solución etérea del fosfolípido en otra acuosa del agente activo a la temperatura de 55-66° C o bien, a 30° C a baja presión (figura 14). Una vez eliminado el disolvente por evaporación, se obtiene una población heterogénea de LUV (0.05 a 0.25 µm), por lo que se recurre generalmente a la filtración para conseguir vesículas uniformes.

Aplicable a numerosos lípidos y mezclas lipídicas, el uso de disolventes orgánicos y temperaturas elevadas pueden desnaturalizar o inactivar a las macromoléculas; los fosfolípidos insaturados son insolubles en éter (DEAMER y BANGHAM, 1976).

2.4.3.2.- Fusión inducida por calcio

Permite elaborar vesículas unilaminares a partir de lípidos de carácter ácido (ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, cardiolípidos) asociados o no a colesterol, hasta una concentración límite equimolecular (PAPAHADJOPOULOS y cols., 1975).

La base de este método se asienta en la fusión inducida por el calcio, tras la adición de una solución acuosa del mismo a una suspensión de vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones, con la formación de grandes estructuras cilíndricas multilaminares en disposición helicoidal. El secuestro del ión por EDTA, conduce a la obtención de vesículas unilaminares de grandes dimensiones. La principal ventaja consiste en la capacidad para incorporar macromoléculas, tales como ferritina, poliovirus, RNA mensajero y DNA (PUSSIEUX y DELATTRE, 1985).

Con el fin de evitar el carácter restrictivo de este método, reservado exclusivamente a lípidos aniónicos, se propuso una modificación (DOUSSET y DOUSTE, 1985) que permite emplear tanto lípidos aniónicos como catiónicos. Así se origina un agregado de vesículas, con posterioridad a la adición de cloruro cálcico a liposomas de fosfatidil serina y estearilamina-fosfatidilcolina-colesterol (1:7:2) que se transforman en macrovesiculares al añadir EDTA.

2.4.3.3.- Evaporación en fase reversa

En este método, los fosfolípidos se disuelven en un disolvente orgánico (dietil o isopropiléter o mezclas de éstos con cloroformo en relación 1:1), al que se adiciona la solución acuosa. El sistema se somete a la acción de ultrasonidos, durante 5 minutos y a 0° C, con el fin

de obtener una emulsión homogénea de pequeñas gotas de agua en el éter, estabilizadas por una monocapa fosfolipídica (micelas inversas). La evaporación del disolvente a presión reducida, entraña la formación de liposomas macrovesiculares de dimensiones comprendidas entre 0.08 y 0.24 μm , según la composición lipídica, con una gran eficacia en la encapsulación (30-50%). La aplicación de este protocolo aparece limitada por la sensibilidad de los compuestos encapsulados a los disolventes orgánicos y a los ultrasonidos (SZOKA y PAPAHADJOPOULOS, 1978).

El uso de disolventes orgánicos alternativos como etanol, acetato de etilo o mezclas de ambos disminuye la toxicidad residual en la formación final del liposoma, además de aumentar la encapsulación de fármacos hidrofílicos (CORTESI, 1999).

2.4.3.4.- Microfluidificación

La microfluidificación permite reducir el tamaño de las vesículas por debajo de los 300nm. Se preparan con antelación los liposomas tipo MLV y gracias a una elevada energía mecánica son transformados en LUV en una cámara de reacción especial (HAUSER, 1982). Conduce a la formación de vesículas cuyo tamaño guarda relación con el número de ciclos de microfluidificación aplicados (MAYHEW y cols., 1985).

2.4.3.5.- Inyección Coaxial Turbulenta

Se ha puesto a punto un nuevo método que permite mejorar la homogeneidad entre lotes minimizando el coste del proceso. Los liposomas son obtenidos al generar un flujo turbulento mediante la inyección de dos fases a gran velocidad en una célula de reacción. Además este nuevo procedimiento posibilita preparar liposomas, nanopartículas y micropartículas en un mismo aparato y de forma continua.

2.4.3.6.- Otros Métodos de Preparación

Existe una técnica que evita el empleo de disolventes inaceptables para el uso farmacéutico así como procedimientos energéticos costosos como la sonicación. Dicho método está basado en la formación inicial de una mezcla denominada **proliposoma**, que contiene el lípido, etanol y agua, que da lugar a los liposomas por un paso de simple progresión de la dilución (PERRETT y cols.,1991; RECASENS,1995).

Este método podría resultar interesante en el caso de liposomas de uso tópico ya que permite la formación del sistema “in situ”, justo en el momento de su aplicación sobre la piel mediante el empleo de un aerosol (FARR y cols., 1989). Por microscopía se comprueba como los proliposomas minutos después de su contacto con el agua se convierten en liposomas. Precisamente la absorción de nicotina desde proliposomas es factible tras el contacto con el sudor, sí dicha formulación se aplica tópicamente bajo condiciones oclusivas (HWANG y cols., 1997).

2.5.- SEPARACION DE LA FRACCION NO ENCAPSULADA

Del análisis de los métodos anteriormente reseñados, se deduce que los liposomas poseen una capacidad limitada de encapsulación, de tal forma que siempre existirá una parte del fármaco no incorporada en las vesículas lipídicas. La separación de la fracción no captada puede llevarse a cabo por cromatografía en gel, HPLC (FANG y cols., 1997), centrifugación, diálisis o ultrafiltración (PUISIEUX, 1978).

En la filtración a través de los geles aparecen dos picos bien diferenciados; uno de ellos corresponde a los liposomas, y el otro al producto sin encapsular. El inconveniente radica en la dilución de la dispersión liposomal durante la separación, así como posibles fenómenos de adsorción lipídica en el lecho filtrante (MEDINA y cols., 1984).

Las condiciones óptimas de la centrifugación dependen del tamaño de los liposomas. En el caso de vesículas multilaminares, una centrifugación a 700 g, durante 10 minutos es suficiente para separarlos del medio acuoso externo. La sedimentación de dispersiones unilaminares requiere velocidades y tiempos superiores, del orden de 150000 g, durante 4 horas (FROKJER y cols., 1982; PUISIEUX y DELATRE, 1985). Más recientemente, se ha constatado una separación por simple lavado con solución salina (VEMURI y RHODES, 1995).

2.6.- CARACTERIZACION

La caracterización de suspensiones liposomiales tiene por objeto, fundamentalmente, conocer con precisión el tipo de estructura obtenido, su composición, tamaño, homogeneidad, estabilidad, volumen de encapsulación (BANGHAM y cols., 1965), y rendimiento final de la técnica de elaboración. Existen distintos métodos para esta caracterización:

- Microscopía electrónica de transmisión, incorporando a la muestra diversas soluciones de sales de metales pesados (ácido fosfotúngstico y ósmico, molibdato amónico, acetato de uranilo, etc.) para así aumentar el grado de dispersión electrónica (tinción negativa) (HINKLE y cols., 1978; LASIC y cols., 1980; MEDINA y cols., 1984 y 1986; BULA Y GHALY, 1995).
- Técnicas espectroscópicas de dispersión láser, para el análisis de la forma y tamaño de los liposomas (FAIRBROTHER, 1979).

- Espectroscopía de resonancia electroparamagnética, usando liposomas spin para evaluar las características de las bicapas lipídicas y su influencia en los enzimas vinculados a las membranas (PECAR, 1980).
- Resonancia magnética nuclear, para el estudio de las funciones dependientes de la estructura y dinámica de la fase lipídica, sí como de las interacciones entre lípidos, proteínas de lípidos y de membrana, y entre moléculas biológicamente activas (KIDRIC, 1980; LASIC, 1980).
- Modelos matemáticos para el cálculo del área superficial total, porcentaje de encapsulación, volumen específico parcial de los lípidos integrantes y frecuencia de distribución de la población (PIDGEO y HUNT, 1981).
- Técnicas de fluorescencia, para dilucidar la localización de los principios activos en la estructura del liposoma (KUNIKAZU y cols., 2000).
- Microscopía de fuerzas, esta ofrece numerosas ventajas en cuanto a la caracterización morfológica (OLIVA y cols., 2001).

2.7.- MECANISMOS DE INTERACCION LIPOSOMA-CELULA

Las células se unen a liposomas de todos los tamaños, aunque la captación celular es mayor para los liposomas menores de 80nm de diámetro (KIM y MARTIN., 1981).

Investigaciones realizadas han permitido detectar cuatro formas diferentes de interacción entre los liposomas y las células, pudiendo actuar más de un mecanismo al mismo tiempo (figura 15), (SANTOS y GUERRERO, 1994):

- 1) Los liposomas pueden penetrar en la célula por endocitosis de las células fagocitarias del sistema retículo endotelial (ALLEN y cols., 1991). Se desintegran por la acción de los enzimas celulares, liberando el fármaco. Según este mecanismo, los liposomas quedarían

englobados en células con gran capacidad fagocitaria (hígado, bazo...). La endocitosis del vector en lisosomas puede modificar a la sustancia transportada (PIPAN, 1980).

- 2) Puede producirse una fusión directa de las membranas del liposoma con la membrana plasmática celular (BAILEY y CULLIS, 1997), mediante inserción del biestrato lipídico del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea del contenido

liposómico dentro del citoplasma; es decir por coalescencia, el fármaco pasa del liposoma al interior celular (MAIERHOFER, 1988).

- 3) Igualmente, cabe la posibilidad de una transferencia de lípidos de la bicapa liposomal a las membranas celulares o subcelulares, sin adsorción previa ni asociación del contenido liposomal.
- 4) Por adsorción estable de los liposomas a la superficie celular mediante fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles o mediante interacciones inespecíficas con componentes de la superficie celular.

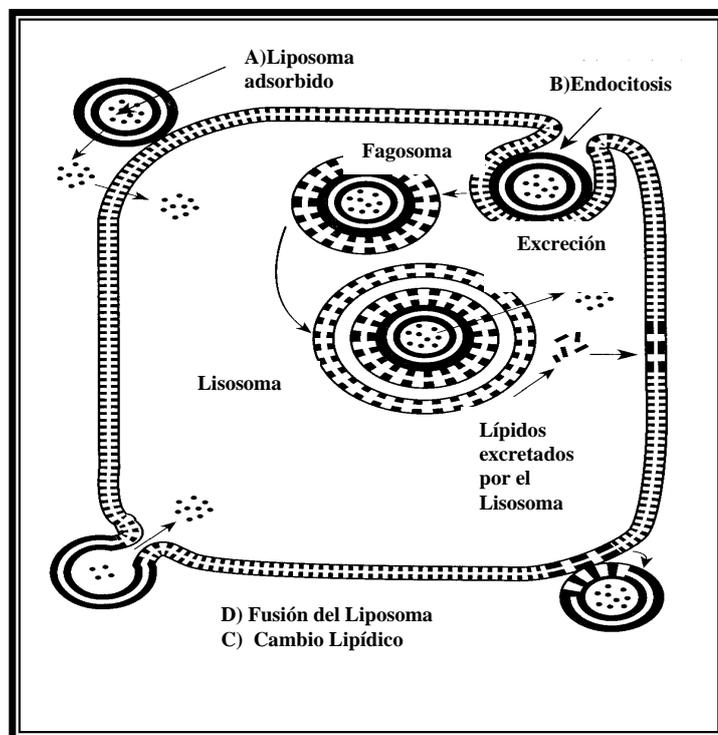


Figura 15 Mecanismo de Interacción

El mecanismo de interacción preferente es función de la composición y método de elaboración de las vesículas, del tipo de células y del medio extracelular, entre otros. Asimismo, depende de la carga y fluidez de la pared liposomal, de tal forma que las vesículas sólidas y cargadas, así como las fluidas y neutras lo harán por endocitosis. En la asociación de liposomas fluidos y cargados intervienen otros mecanismos, predominando la fusión (POSTE y PAPAHADJOPOULOS, 1976; BULA y GHALY, 1995).

Por lo general, los liposomas cargados negativamente son captados más rápidamente que los liposomas neutros o los liposomas con una carga neta positiva. Debido al tamaño de los poros endoteliales de los capilares sanguíneos, sólo las vesículas de diámetro inferior a 100nm pueden llegar a los tejidos.

Sin embargo la elección pasiva del órgano o célula diana, controlada por el tamaño y composición lipídica de los liposomas no es siempre satisfactoria. Esta elección se puede mejorar utilizando ligandos específicos para tipos de órganos o células, que se encuentran encapsulados o acoplados a la superficie de los liposomas (MAIERHOFER, 1988).

2.8.- APLICACIONES TERAPEUTICAS

Hace más de 30 años que se viene hablando de las expectativas terapéuticas de los liposomas y previsiblemente se hablará de ellos durante bastantes años más. Existe una extensísima bibliografía sobre esta cuestión, y solo citaremos algunos aspectos más significativos. Los liposomas pueden utilizarse como sistema de transporte y liberación de fármacos, contribuyendo en gran medida a la solución de algunos problemas derivados de su utilización. Las aplicaciones médicas más prometedoras son:

- Dirigir los inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario.

- La liberación controlada de fármacos frente a infecciones sistémicas.
- La reducción de los efectos no deseados de algunos fármacos.
- Otras aplicaciones como, sustitutivos de la sangre, parecen tener también un futuro prometedor.

- Las pruebas “in vitro” con liposomas y cultivos celulares demuestran que éstas vesículas constituyen un medio ideal para mejorar la sensibilidad de los estudios de diagnóstico médico. Un anticuerpo se une a su antígeno en la superficie de la célula provocando una microaglutinación. En caso de que un anticuerpo se acople a la superficie de un liposoma, el mismo proceso produce agregados visibles.
- También se utilizan los liposomas para diagnósticos “in vivo”. Se ha podido demostrar que un contraste para el hígado, cuando se administra vía liposomas, permite detectar incluso las metástasis más pequeñas.

Como sistemas de transporte y liberación de fármacos, se han investigado casi todas las vías de administración (MAIERHOFER, 1988):

1) Intravenosa:

El destino y eliminación (LONGER y ROBINSON, 1987) de los liposomas inyectados intravenosamente depende de sus propiedades físicas como tamaño, fluidez y carga superficial. Pueden persistir en los tejidos durante horas o días según su composición. La vida media en sangre está comprendida entre minutos y varias horas. Los MLV y LUV son captados rápidamente por las células fagocitarias del SRE, en particular por células de Kupffer del hígado y macrófagos esplénicos, pero la fisiología del aparato circulatorio restringe la salida de tales especies grandes en la mayoría de los sitios . También se acumulan (OSTRO y CULLIS, 1989) en las zonas donde existe inflamación e infección y en algunos tumores sólidos, aunque la razón no está clara. Todo esto se demuestra por ejemplo en la mejora de las características farmacocinéticas tras la administración intravenosa de carbamazepina (JIA y cols., 2002).

Liposomas de 25nm de diámetro, e incluso de 60nm, pueden inyectarse al torrente circulatorio y probablemente serán fagocitados por los macrófagos del sistema retículoendotelial, cuyos lisosomas digerirán las bicapas y liberarán al principio activo dentro del macrófago. El primer blanco de estos macrófagos cargados de fármaco son las

propias células retículoendoteliales, que, cuando sufren una parasitosis o una infección, podrán ser tratadas con una gran selectividad. Así, los antimoniales incorporados a liposomas, resultan ser 700 veces más activos que en forma libre, y pueden curar con muchísimo menos riesgo a las células hepáticas infectadas de parásitos (leishmaniosis). Lo mismo podríamos decir de enfermedades como listeriosis, brucelosis, salmonelosis, enfermedades sistémicas, tumores malignos, enfermedades micóticas, entre otras (ALVING, 1986).

- 2) Intraperitoneal: Esta vía no es utilizada en los seres humanos, sin embargo se utiliza con éxito en el tratamiento de animales (SADZUKA y cols 2002). El mecanismo por el cual acceden los liposomas al torrente circulatorio no está aún dilucidado. Parece que no existen diferencias entre liposomas de diferentes tamaños. Entre las aplicaciones destaca la administración intraperitoneal de interleucinas con eficacia en el tratamiento de un linfoma (WANG y cols., 2000).
- 3) Subcutánea: La administración por vía subcutánea también se ha utilizado con éxito. Con frecuencia se puede obtener un buen efecto dépot.
- 4) Intramuscular: Por esta vía los liposomas son absorbidos por el sistema linfático antes que por la sangre. No obstante, estudios con sustancias de prueba ponen de manifiesto un paso rápido al torrente circulatorio, alcanzándose niveles plasmáticos elevados tras un corto periodo de latencia (MAIERHOFER,1988).
- 5) Intralinfática: Se ha empleado con éxito ésta vía para el tratamiento de tumores linfáticos mediante la administración de bleomicina en liposomas, evitando el paso por el sistema retículoendotelial. Igualmente, se ha aplicado para la administración de materiales de contraste, encapsulados en liposomas, capaces de llegar incluso a los vasos linfáticos más pequeños (GABIZON y cols., 1997).

- 6) Oral: La aplicación de los liposomas por vía oral parece difícil debido al largo trayecto que deben recorrer los liposomas hasta llegar al lugar de absorción. Los liposomas deben superar fuerzas mecánicas, diferentes pH, enzimas, colatos, sales biliares... (SEIJO, 1990). No obstante, se ha podido demostrar como la insulina y el factor VIII se pueden recuperar

en la sangre cuando se administran por vía oral encapsulados en liposomas. Quizás se superen algunas de estas dificultades cuando los liposomas se introduzcan en cápsulas de gelatina. El mecanismo de la captación en el intestino delgado se desconoce y se duda si los liposomas son capaces o no de atravesar la pared intestinal sin perder su integridad (MOUFTI y cols., 1980). Pese a ello se han realizado satisfactorios estudios “in vitro” sobre la absorción de acetónido de triamcinolona encapsulado (SVEINSSON, 1992); también se ha estudiado la absorción oral de aminoglucósidos (SANTOS y GUERRERO, 1994).

- 7) Nasal: La administración de liposomas por esta vía se está estudiando para la aplicación de alérgenos y superoxidodismutasa (CEVC y cols., 1997).
- 8) Oftálmica: Se ha comprobado (SEIJO, 1990) que la carga de superficie influye en la penetración a través del epitelio corneal; los que tienen carga positiva son los que mejor penetran. A modo de ejemplo citaremos los sistemas liposómicos de aciclovir (LAW y cols., 2000).

La vectorización posibilita un aporte de principio activo a los tejidos oculares; mediante incremento del tiempo de contacto del fármaco con la córnea (BILL, 1971; GRASS y ROBINSON, 1988; BARZA y cols., 1987)

- 9) Intraarticular: Cuando se inyecta un medicamento por ésta vía para tratar procesos artríticos, sufre una rápida aclaración pudiendo provocar reacciones locales, o riesgo de infección en la articulación. Teniendo en cuenta que el objetivo de esta terapia son las células sinoviales de capacidad fagocítica, la administración de liposomas por esta vía estaría justificada.

- 10) Intratraqueal: El uso de liposomas para la liberación sostenida de acetónido de triamcinolona en pulmón representa resultados óptimos y superiores a los de su administración en solución (GONZALEZ-ROTHI y cols., 1996).
- 11) Tópica: Se ha propuesto la utilización de los liposomas como vehículo para la aplicación tópica sobre la superficie cutánea y en mucosas, tanto de fármacos como de productos cosméticos.

Teniendo en cuenta las características y aplicaciones del principio activo objeto de este estudio, acetónido de triamcinolona, se ha estimado oportuno profundizar en esta última vía de administración, la vía tópica. No obstante, y a modo de resumen, se han recopilado las principales aplicaciones terapéuticas de los liposomas como sistemas de vectorización de fármacos:

- Una de las primeras aplicaciones que se ha dado a los liposomas ha sido la ENZIMOTERAPIA. Ciertas afecciones genéticas de enzimas dan lugar a la acumulación del correspondiente sustrato en el tejido y la consiguiente patología clínica (SAINZ y cols., 1989); se han tratado las enfermedades de Gaucher y de Pompe con liposomas portadores de β -glucosidasa y glucosamina respectivamente, observándose en ambas una disminución de la exagerada acumulación de glucógeno en el hígado pero no en otras zonas del organismo como el músculo esquelético o cardiaco (GREGORIADIS, 1978; GUZMÁN y cols, 1987). También pueden emplearse para tratamientos con superoxidodismutasas con actividad en inflamación y ciertas enfermedades autoinmunes.
- ELABORACIÓN DE VACUNAS, ya que los liposomas se comportan como coadyuvantes de la inmunidad. Las vacunas así preparadas proporcionarían una inmunidad mayor al carecer de efectos adversos (SATLC, 1980; RYMAN,1980; NICOLAU, 1981). El objetivo de la inclusión de liposomas es facilitar la presentación de antígenos capsulares

de la bacteria aislada (exopolisacáridos) al sistema inmunitario y potenciar su respuesta (figura 16).

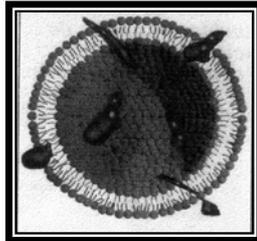


Figura 16

CORTE DE UN LIPOSOMA CARGADO DE EXOPOLISACARIDOS

Los exopolisacáridos se incorporan en las paredes e interior de los liposomas, y así permiten su entrada en el interior de los macrófagos de modo que el sistema inmunitario del individuo es capaz de producir anticuerpos y en consecuencia, la reacción inmunitaria reforzada asegura un incremento de la protección (GREGORIADIS y cols., 1999; PIETERSZ y cols., 2000).

- TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS, especialmente las provocadas por bacterias del sistema retículoendotelial, para conseguir la localización intracelular de los agentes antiinfecciosos (GREGORIADIS, 1983). Se ha demostrado la efectividad de la anfotericina B encapsulada en liposomas (Ambisome) (CALVIÑO y cols., 1999) frente a infecciones fúngicas como brucelosis (FOUNTAIN y cols., 1985) y candidiasis (LOPEZ-BERESTEIN, 1988) obteniéndose efectos terapéuticos con menores dosis de principio activo. También esta asociación fármaco-liposoma ha resultado más eficaz como citostático (HARRIS y cols., 2002) y en el tratamiento de la Aspergillosis intracerebral (ELLIS y cols., 2002) que la anfotericina B convencional. Se han realizado estudios con liposomas frente a la infección producida por Mycobacterium

avium en ratón, que podría tener aplicación en afecciones pulmonares de pacientes con SIDA.

- TRANSPORTADOR DE AGENTES QUELANTES, que por sí solos difícilmente penetrarían en el interior de las células, en el tratamiento de intoxicaciones metálicas accidentales o de origen metabólico (hemosiderosis, anemia de Cooley, enfermedad de Wilson) (PUISIEUX, 1985). La encapsulación favorece su captura por parte del hígado y bazo, lugares donde el metal tiende a acumularse (GUZMAN y cols., 1987).
- Tratamiento de PROCESOS INFLAMATORIOS con formulaciones de acetónido de triamcinolona (LOPEZ-GARCIA y cols., 1993) concretamente a nivel artrítico, la acumulación en el tejido inflamado depende del tamaño de las vesículas (SEIJO y cols., 1991).
- Transportadores de COMPUESTOS ANTISENTIDO como los que participan en el proceso de hipertensión (PHILLIPS, 2001).
- Tratamiento de ENFERMEDADES PARASITARIAS, como leishmaniosis, con ventajas comprobadas frente a la terapia convencional (ALVING, 1986).
- Una de las mayores limitaciones en la quimioterapia antitumoral es el desarrollo de resistencia de las células tumorales. Para la liberación específica del agente en las células y superar dicha resistencia se han asociado numerosos CITOSTÁTICOS a los liposomas, como cisplatino (BRIZ y cols., 1999), adriomicina D (CROMMELIN y cols., 1983), citosina, vinblastina, metotrexato (GREEN y FOONG, 1982). El empleo de liposomas de muramil tripéptido mejora la supervivencia postquirúrgica en perras con carcinomas.

- Inclusión en liposomas de MOLÉCULAS PEPTÍDICAS como la ciclosporina A u otros agentes de mayor potencia inmunosupresora que esta (como el Tacrolimus) (LEMDAR, 2002) reduciendo u nefrotoxicidad sin disminuir su actividad inmunosupresora (SEIJO y cols, 1991). También se utilizan péptidos para direccionar liposomas conteniendo citostáticos a células proliferantes (GARCIA y cols., 1998).
- Se ha experimentado el uso de liposomas para la administración de insulina por vía perlingual (MOUFTI y cols., 1980). En esta línea de trabajo, se ha comprobado la absorción de la misma a nivel de yeyuno (KENNEDY, 1991; SATOS y GUERRERO, 1994).
- Recientemente se ha mostrado por microscopía atómica que es posible la TRANSFERENCIA GENÉTICA consistente (NAKANISHI y NOGUCHI, 2001) en la administración de genes sanos, transportados en liposomas, que se insertan en un tipo celular determinado, donde compensan la falta o el mal funcionamiento endógeno, o crean una propiedad nueva . Actualmente se observa su eficacia en la transferencia de un gen en útero (DAFTARY y TAYLOR, 2001) y en ovarios humanos con adenocarcinoma (KIM y cols., 2002).
- MANIPULACIÓN CINÉTICA DE ANTICANCEROSOS encapsulados en liposomas proporcionando un incremento de la liberación de fármaco en el tumor. Este ensayo terapéutico ha sido validado en pacientes enfermos de SIDA con sarcoma de Kaposi's (GABIZON y cols., 1997). También se ha constatado una inhibición de metástasis, gracias a la encapsulación de inmunomoduladores en liposomas (YAMASHITA y HASHIDA, 2002).

Se han obtenido muy buenos resultados en cuanto a la actividad antitumoral de la doxorubicina en liposomas tras su administración a enfermos con cáncer avanzado, sin que se produzcan los efectos colaterales derivados de la administración de este fármaco bajo una forma convencional (DELGADO , 1989). Para estos casos se han comercializado dos especialidades Caelvx® y Myocet®, consistentes en asociaciones de doxorubicina con

liposomas, indicadas para el tratamiento en mujeres que no responden a los derivados del platino.

2.9.- OTRAS UTILIDADES DE LOS LIPOSOMAS

Desde que en 1964 Bangham descubriera por primera vez los liposomas, se conocen cada vez más aplicaciones de estas vesículas. En la actualidad existen proyectos del CSIC en las siguientes áreas:

Tecnología de los alimentos

Encapsulación de nuevas enzimas y adición de estas a la leche, lo que permite acelerar la maduración de los quesos manchegos.

Obtención de una nueva variedad de queso con características intermedias entre el elaborado con cuajo animal y el elaborado con cuajo vegetal mediante cipsosinas encapsuladas en liposomas.

Acuicultura

Elaboración de liposomas unilaminares con sustancias aptas para la nutrición y enfermedades del camarón.

Alimentación y tratamiento terapéutico de larvas de peces marinos de cultivo.

2.10.- LIPOSOMAS DE ADMINISTRACIÓN TOPICA

El objetivo de la inclusión de fármacos de uso tópico en liposomas, es incrementar su efectividad biológica en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, cuya estructura y funcionamiento estudiaremos a continuación. También se abordarán en este apartado aspectos como la absorción percutánea, la biodisponibilidad de los principios activos encapsulados, el

comportamiento tópico de los liposomas, finalizando el capítulo de introducción con las principales aplicaciones en dermatología y en cosmética.

2.10.1.- Estructura de la piel y sus anexos

La piel está constituida por cuatro capas bien caracterizadas y muy distintas en cuanto a sus funciones: capa superficial, epidermis, dermis e hipodermis. La primera está en contacto con el medio externo y la última separa la piel de los tejidos subyacentes. La piel está, además, atravesada por el sistema pilosebáceo y las glándulas sudoríparas (MONTAGNA, 1961) (figura 17).

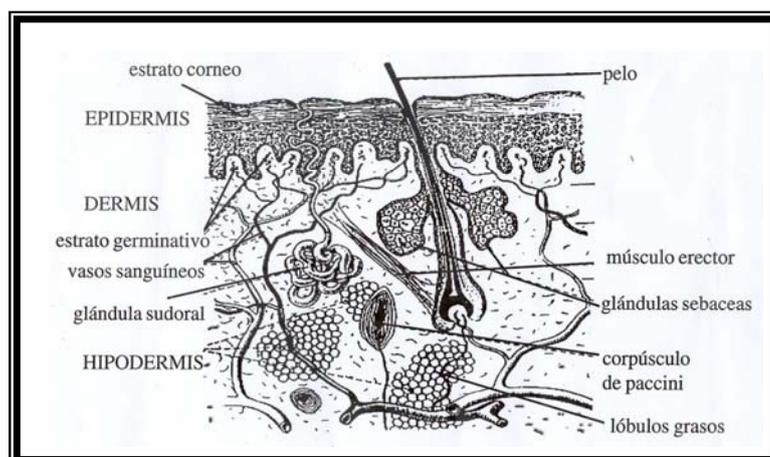


Figura 17
ESTRUCTURA DE LA PIEL

CAPA SUPERFICIAL

Es una cutícula sin estructura aparente que recubre la superficie de la piel y que está constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor) procedentes de las glándulas sebáceas y sudoríparas; engloba además, células descamadas, bacterias y cierta cantidad de suciedad sólida y líquida procedente del exterior.

Es una capa irregular y discontinua de espesor, comprendido entre 0.4 y 10 micras, miscible con el agua y de pH ácido, aunque este aumenta cuando existen afecciones cutáneas.

Desde el punto de vista de la penetración, su papel es prácticamente nulo, ya que es englobada o desplazada por los excipientes.

EPIDERMIS

Es una capa epitelial estratificada y avascular. Las células que la componen sufren modificaciones químicas importantes a medida que progresan hacia el exterior enriqueciéndose progresivamente en queratina. Es un estrato fundamental para la penetración de fármacos (HADGRAFT, 1987).

Está formada por células que nacen de una capa basal interna o capa germinativa, que constituye la zona de separación entre la epidermis y la dermis, y se prolongan hacia el exterior dando origen primero a la llamada capa espinosa y luego, a la capa granulosa que enlaza con el estrato córneo.

Las células de la capa basal germinativa están en continuo crecimiento; a medida que crecen, van cambiando de células metabólicamente activas a células muertas que darán origen finalmente al estrato córneo constituido por numerosas capas de células queratinizadas de forma aplanada y muy compactas cuya función es muy importante desde el punto de vista fisiológico. La queratina es un producto final de transformación de las células epidérmicas,

pero su formación no debe considerarse de ningún modo como un proceso degenerativo; antes bien, está orientado a la función que el estrato córneo debe desarrollar, que es triple:

- Protección frente al medio externo.
- Conservación del agua corporal, impidiendo la excesiva evaporación de agua interna.
- Emuntorio terminal de muchos productos del metabolismo epidérmico.

Su espacio intercelular es muy importante. Es en esta capa donde se forman los lípidos. Atraviesan el aparato de Golgi en donde están rodeados de una membrana. Se les denomina entonces corpúsculos laminares. Estos corpúsculos migran hacia el límite de la célula y vierten su contenido lipídico en láminas dentro del espacio intercelular. Así la capa córnea forma como un muro de ladrillos, donde las células queratinizadas (escasamente hidrófilas) serían los ladrillos y las capas lipídicas (mayoritariamente hidrófilas) el cemento de unión. Estas lamelas tienen siempre la misma constitución que la membrana celular, es decir, una capa de lípidos incluida en un medio acuoso. Consecuentemente, por una parte, estas barreras lipídicas representan la barrera epitelial y por otra contienen agua necesaria para la piel. En las capas inferiores de la epidermis se encuentran muchos fosfolípidos, mientras que la capa córnea, debido a las acciones enzimáticas y de síntesis, contiene mayoritariamente esfingolípidos, glucoceramidas, ácidos grasos y colesterol. El colesterol es capaz de retener cierta cantidad de agua de forma emulsionada y puede transmitir estas cualidades a otros lípidos; posee, pues, una misión importante para el funcionamiento de la barrera cutánea (SCHAFER-KORTING y cols.,1989).

De hecho, el estrato córneo es la barrera fundamental que ofrece el organismo a la penetración de los tóxicos y microorganismos, debido a la naturaleza altamente impermeable de sus constituyentes. Pese a ello, si se dan las condiciones adecuadas, puede ser un camino de penetración de fármacos (WERTZ y DOWNING,1989; SCHEUPLEIN, 1972).

DERMIS

Situada inmediatamente por debajo de la capa germinativa basal, está formada por un parénquima de células conjuntivas entre las que se encuentran vasos y nervios. Es pues, un tejido sensible y ricamente irrigado; a nivel de los capilares sanguíneos de la dermis, los fármacos pasan a la circulación sistémica.

HIPODERMIS

Constituye la zona de separación entre la dermis y los tejidos subyacentes y varía en su constitución según la región del cuerpo. Contiene células adiposas que se agrupan en panículos. En cuanto a la penetración de formas tópicas carece de importancia práctica. Es la base de sustentación de los folículos pilosebáceos y de las glándulas sudoríparas.

FOLICULOS PILOSOS Y GLANDULAS SEBACEAS

Normalmente las glándulas sebáceas están asociadas al folículo piloso. Este último tiene forma de botella y posee una vaina de células epiteliales. Nace en la hipodermis o en la dermis, atraviesa la epidermis y desemboca en la superficie de la piel (figura 18). En su base los folículos están constituidos por células conjuntivas de gran vitalidad y muy bien irrigadas. Estas células se dividen rápidamente y, a medida que crecen, desplazan a las ya existentes, que por una parte dan origen a la cutícula que envuelve al pelo y por otra se queratinizan y forman

el pelo propiamente dicho. La queratinización no es tan rápida como en el estrato córneo, de modo que el núcleo de la célula se va haciendo denso y picnótico gradualmente hasta que desaparece englobado por la queratina.

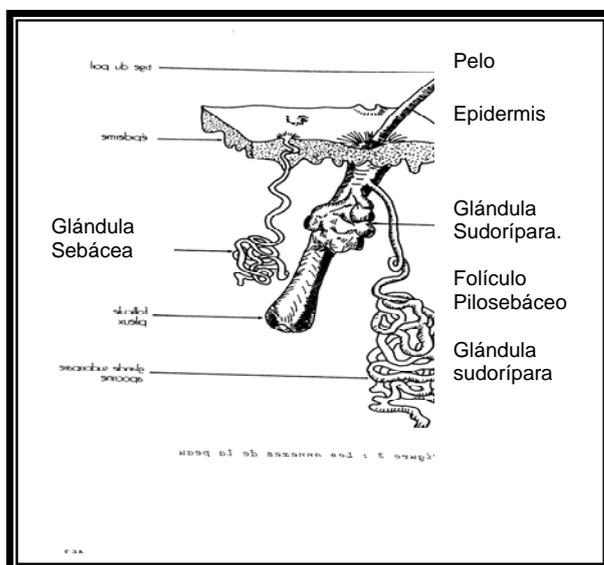


Figura 18

ESTRUCTURA FOLÍCULO-SEBACEA

Hacia el primer tercio de su longitud, las glándulas sebáceas conectan con el folículo. El alveolo sebáceo consiste en una masa de células epiteliales especiales rodeadas de una membrana basal que se confunde con la cutícula del pelo; dichas células proliferan y desplazan hacia arriba, por el interior del folículo, a las preexistentes, que van acumulando lípidos en su interior en tal proporción que, finalmente, se rompen y la secreción se vierte al exterior por la abertura del folículo.

GLANDULAS SUDORIPARAS

Son estructuras independientes que nacen en la hipodermis y se continúan en forma de conducto rectilíneo o espiral (túbulo) hasta la superficie de la piel, donde desembocan vertiendo su secreción (sudor), de naturaleza fundamentalmente acuosa, cuya evaporación desempeña un importante papel termorregulador.

2.10.1.1- Absorción Percutánea

Los procesos que sufre el fármaco tras su aplicación tópica sobre la piel para lograr su objetivo terapéutico pueden resumirse así (DOMÉNECH y cols., 1998):

- Liberación: se favorece cuando el principio activo está en forma muy dispersa. Un excipiente con escasa capacidad para disolver el principio activo facilita este proceso.

- Adsorción: es el proceso por el cual el fármaco queda retenido en la superficie de la piel, generalmente por uniones fisicoquímicas, a componentes cutáneos de elevado peso molecular (queratina, melanina, etc.).
- Penetración: depende de la afinidad del principio activo por la capa córnea y puede ser favorecida por productos que la mejoren y por propiedades oclusivas de los excipientes.
- Permeación: consiste en el paso del fármaco a través de la piel por difusión desde una capa histológica a otra estructuralmente distinta.
- Absorción: es el proceso que sufre el fármaco, tras su aplicación sobre la piel, para acceder a la circulación sistémica.

2.10.1.2.- Vías de absorción

Una vez que difunden a través de glándulas sebáceas el excipiente y luego se disuelven en la capa superficial de la piel, las moléculas de fármaco disponen de dos caminos para su penetración (DOMENECH y cols., 1998):

1. VIA TRANSPENDICULAR que a su vez se divide en:
 - Transfolicular, a través de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.
 - Transudorípara, a través de los conductos y glándulas sudoríparas.
2. VIA TRANSEPIDERMICA, a través del estrato córneo (figura 19).

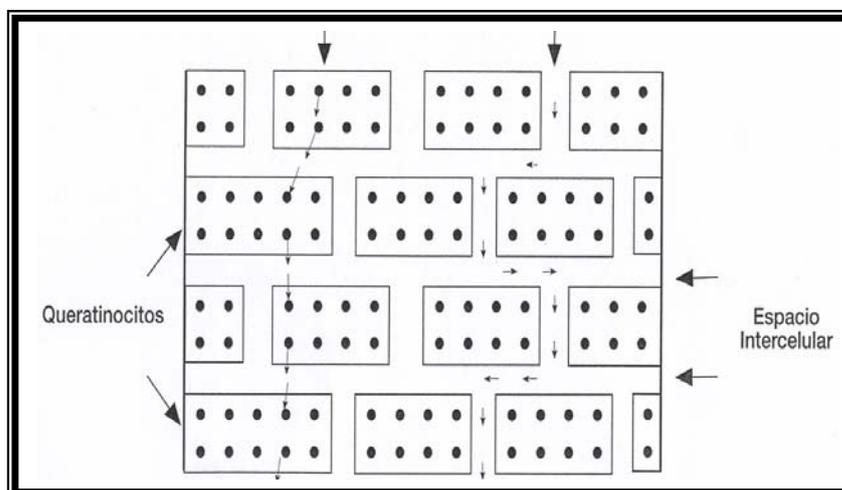


Figura 19
VIAS ALTERNATIVAS DE PENETRACIÓN EN EL ESTRATO CORNEO

De forma general se puede decir que las vías de paso de los fármacos a través de la piel pueden ser la epidérmica y folicular , con predominio de la primera; mientras que la vía transudorípara tiene un papel bastante menos relevante. En lo que se refiere al paso de los fármacos, se desarrolla en dos estadíos. Tras su administración se establece, en primer lugar, un gradiente de concentración de fármaco desde las distintas vías de entrada del mismo. En un segundo estadio, el fármaco pasa a través de la piel por difusión pasiva, consiguiéndose un flujo del mismo normalmente constante a lo largo de todo el espesor de la piel.

La vía de paso mayoritaria es la transepidérmica, dado que el estrato córneo constituye el 99% de la superficie cutánea. En este sentido, cabe señalar que la difusión intracelular supone atravesar las membranas córneas y los lípidos que impregnan la queratina. Por otra parte, si el fármaco pasa a través de la piel por vía intercelular, debe atravesar el espacio lipídico intercelular que une las células que constituyen el estrato córneo. Este espacio representa una vía tortuosa que no alcanza el 1% del estrato córneo.

Ambas vías de penetración están implicadas en la permeación de un fármaco disuelto. En la práctica, los fármacos pasarán a través de la piel por las dos vías, prevaleciendo una u otra en función de las características fisicoquímicas de aquellos.

2.10.1.3.- Parámetros implicados en la Absorción Percutánea

Biológicos:

Las variaciones en las características de la piel con la edad (BEHL y cols., 1985) y según la zona anatómica del organismo (WESTER y cols., 1984) pueden influir en la permeabilidad de la misma. Sin embargo los factores principales a considerar son:

- Estado de la piel: en piel escamada (MAIBACH, 1976) o en alteraciones de la piel por causa de enfermedad (TURPEINEN, 1988), la absorción de los fármacos es mucho más rápida, debido a la escasez de capa córnea.
- Hidratación de la piel (POTS, 1986): es un factor relevante que afecta a la velocidad y extensión de la absorción percutánea. El estrato córneo puede retener

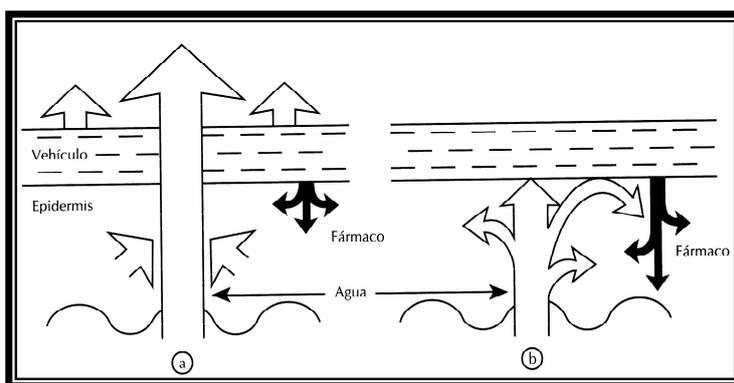


Figura 20

INFLUENCIA DEL VEHÍCULO SOBRE LA HIDRATACIÓN DE LA PIEL Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA ABSORCIÓN PERCUTANEA

por adsorción una cantidad de agua que puede ser superior a su propio peso. El agua retenida orienta sus moléculas y hace a la zona más polar aumentando la absorción de muchos fármacos, como corticoides (figura 20). También, mediante mecanismos de oclusión, se previene la evaporación superficial del agua endógena, con lo que se incrementa las características de absorción.

Fisicoquímicos, que pueden depender del:

- Vehículo: interacciones vehículo-piel, interacciones vehículo-fármaco.
- Fármaco: peso molecular, tamaño molecular, punto de fusión y coeficiente de reparto. En general, cuanto menores son el peso, tamaño y punto de fusión, más fácil

es el paso del fármaco a través de la piel. Los fármacos con un coeficiente de reparto inferior a 0.1 no se adecuan para ser administrados vía transdérmica.

2.10.2.-Biodisponibilidad cutánea de los principios activos encapsulados en liposomas

Como ya se ha comentado, en los espacios intercelulares del estrato córneo, se localiza una bicapa lipídica que se encuentra principalmente en fase de gel y que constituye una barrera limitante para el paso de moléculas a la piel (ELIAS, 1991). Los espacios intercelulares son muy estrechos; lo que es insuficiente para dejar pasar partículas de un diámetro importante como el de los liposomas. Sin embargo, en razón de su composición los liposomas, pueden modificar la permeabilidad de la bicapa lipídica y como consecuencia la penetración cutánea de las moléculas activas.

Cabe destacar, en este sentido, la estructura natural de los ácidos grasos insaturados, que modifica la fluidez lipídica subcutánea facilitando la absorción de fármacos en la piel. Los ácidos grasos insaturados presentes en fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, (tensioactivos biológicos) presentes en las lecitina de huevo y soja, son los responsables de una mayor absorción del principio activo (VALENTA y cols., 2000; VALJAKKA y cols 1998).

2.10.2.1.- Absorción Percutánea

Existe un gran número de trabajos en los que se demuestra una mejora de la biodisponibilidad para los principios activos vehiculizados por los liposomas.

Jacobs y cols. (1988), midieron la biodisponibilidad cutánea de cuatro corticoides en liposomas de fosfatidilcolina, demostrando en todos los casos un paso percutáneo superior en presencia de liposomas. Del mismo modo, el papel promotor en la absorción de los fosfolípidos ha sido evidenciado por Kato y cols., (1987) así como por Nishihata y cols., (1987). También se mostró como un sistema disperso que contiene fosfatidilcolina y glicosilceramida favorece la absorción percutánea del ácido flufenámico (KIMURA, y cols., 1989).

Se han descrito unos liposomas, fácilmente deformables, llamados “transfersomas”, compuestos de sales biliares y fosfolípidos, capaces de difundir más fácil y profundamente en la piel (CEVC y BLUME, 1992). Asimismo, la actividad biológica antiedema de corticoesteroides en transfersomas es mayor con respecto a los productos comerciales (CEVC y cols., 1996).

Finalmente indicar que se ha creado un nuevo sistema para incrementar la penetración en la piel “ethosomas”. Se componen de fosfatidilcolina, etanol y agua. Las medidas de fluorescencia son mayores en cantidad y profundidad respecto a liposomas con sustancias como minoxidilo y testosterona (TOUITOU y cols., 2000).

2.10.2.2.- Acumulación Cutánea

Citaremos las investigaciones realizadas por Michael Mezei y Gulusekaram con acetónido de triamcinolona marcado radiactivamente e incorporado a liposomas de tipo MLV. Tras la aplicación cutánea a conejos se apreció una acumulación del agente en la epidermis y en la dermis (lugar de acción) 5 y 3 veces superior a la detectada en el caso de la administración bajo una forma convencional (MEZEI y GULUSEKHARAM, 1982).

Patel (1985) mostró como el metotrexato encapsulado en liposomas MLV se acumula 5 veces más en la piel que en su forma libre. La posibilidad de utilizar los liposomas para concentrar las moléculas de fármaco a nivel cutáneo ha sido confirmada por Wolhrab y Lasch (1989) con hidrocortisona y por Masini (1993) con vitamina A. En general todos los trabajos tienden a mostrar que los liposomas son capaces de aumentar la concentración de los principios activos a nivel del estrato córneo y disminuir la absorción percutánea. En ciertos casos parece que los liposomas concentran las moléculas a nivel del estrato córneo para favorecer así su paso percutáneo (MEZEI, 1993).

Por otro lado se constató que los liposomas cuya composición se asemeja a la del estrato córneo permiten concentrar la inulina en las capas más profundas de la piel (EGBARIA y cols., 1990). En este mismo estudio se mostró que los liposomas permiten obtener una mejor acumulación del interferón a nivel cutáneo.

En otro estudio la acumulación en la capa córnea de la ciclosporina sigue el siguiente orden: liposomas constituidos por lípidos semejantes a los de la piel, mayor que, liposomas convencionales, mayor que, ciclosporina libre (EGBARIA y cols.,1991).

Teniendo en cuenta la estructura de la piel, lugar de aplicación de los fármacos de acción tópica, así como el importante papel de barrera que esta ejerce, para conseguir una efectividad es preciso diseñar un vehículo que posibilite la penetración cutánea del agente transportado (SCHREIER y BOUWSTRA, 1994). En este sentido, el diseño de una formulación de liposomas eficaz requiere un conocimiento profundo de lo que podríamos denominar comportamiento tópico de los liposomas (SEIJOO y cols., 1992).

2.10.3.- Comportamiento tópico de los liposomas

Una de las hipótesis emitida a este respecto alude al *paso de los liposomas intactos a través de la estructura cutánea* (FOLDVARI y cols., 1990; MEZEI, 1985). En el esquema de la figura 21 se compara el posible paso a través de la piel, de un principio activo a partir de una formulación convencional (loción, crema...) y de otra que contiene liposomas.

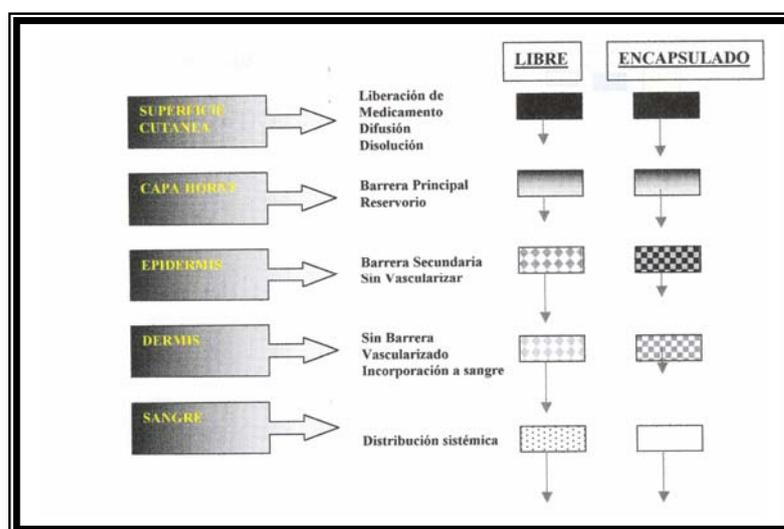


FIGURA 21

Representación esquemática del mecanismo y velocidad de penetración del fármaco libre o encapsulado en liposomas. La densidad de los cuadros indica la concentración; la longitud de las flechas la magnitud de la velocidad de difusión.

Como puede apreciarse se observan diferencias a todos los niveles en el paso del principio activo a partir de ambas formulaciones. Estas diferencias se refieren en primer lugar, a la disposición y a la forma de atravesar la capa córnea, en principio más favorables en el caso de los liposomas, ya que la naturaleza fosfolipídica de las vesículas hacen que sean fácilmente miscible con la superficie grasa de la piel que representa una barrera insalvable para sustancias

activas que no sean liposolubles. El paso a través de la capa córnea de los liposomas está potenciado por el efecto oclusivo que producen y que incrementa su grado de permeabilidad, facilitando así este paso. Además, la estructura liposomal protege, en mayor o menor medida, a los ingredientes activos que contienen, de la unión a las proteínas presentes en proporción elevada en esta capa. A nivel de la epidermis, la principal diferencia está en la velocidad a la que se atraviesa esta capa, debiendo suponerse que si el principio activo se halla en forma libre difundirá a velocidad mayor que si se encuentra incluido en liposomas, simplemente en razón de sus tamaños relativos. La difusión más lenta a partir de las vesículas conlleva también un aumento del tiempo de permanencia en la epidermis del principio activo encapsulado (efecto reservorio). Cuando se alcanza la dermis, que presenta una elevada vascularización, el fármaco libre que llega a ella desaparece rápidamente por efecto de la sangre circulante. Los liposomas, de tamaño relativamente grande, no son capaces de penetrar en los vasos sanguíneos, razón por la cual el principio activo que transportan se ve sometido a un aclaramiento cutáneo mucho menor con respecto al libre disminuyendo, por tanto, su distribución sistémica (MEZEI, 1985).

El caso de que liposomas no iónicos de tamaño relativamente grande se encuentren en las capas más profundas del estrato córneo podría explicarse por el hecho de que los constituyentes de la pared de los liposomas se separan y difunden a través de los espacios intercelulares para formar de nuevo vesículas en las zonas ricas en lípidos (LASCH y cols., 1991).

Esta teoría del paso de los liposomas intactos hasta las capas más profundas de la piel ha sido rebatida por diferentes autores, casi siempre apoyándose en que el empaquetamiento íntimo que presenta la estructura cutánea puede suponer un grave impedimento al paso de liposomas de tamaño relativamente grande (ELIAS, 1983). Así, a nivel del estrato córneo, se apunta la posibilidad de que el paso de los principios activos se produzca por un mecanismo de fusión o transferencia lipídica entre la estructura del liposoma y las membranas de las

células que se puedan encontrar a su paso (SCHINDLER, 1979). Se ha sugerido que la mayor eficacia de los liposomas por vía tópica bien podría estar relacionada con la capacidad tensioactiva de los fosfolípidos que los constituyen, la cual modificaría las características normales de permeabilidad de la piel (NISHIHATA y cols., 1987). Se especula acerca de cómo puede ser la interacción de los liposomas con las células cutáneas; esta se debe producir a tres niveles distintos marcados por la interacción de los fosfolípidos con la queratina a nivel de la capa córnea, cuyo resultado es la rotura de un buen número de vesículas y la penetración de los fosfolípidos que la constituyen hasta las capas profundas de la piel. Este paso de fosfolípidos produce una fluidificación de las membranas de las células de la capa córnea, sumamente interesante a la hora de lograr un incremento de la penetración de ingredientes activos en su interior. Además, estos fosfolípidos pueden hidrolizarse parcialmente, produciendo ácido linoléico libre que se distribuye en la epidermis y que suple o complementa la función de las propias glándulas sebáceas (LAUTENSCHLÄGER, 1990). Dentro de esta misma teoría se piensa que los liposomas se rompen en la superficie de la piel y forman una capa oclusiva de lípidos sobre el contenido liberado en la superficie cutánea (HOFLAND y cols., 1995).

En cuanto a la difusión de los liposomas a largo de los folículos pilosebáceos se demuestra que los liposomas permiten una mayor acumulación de sustancias en estos anexos, que otros vehículos. Este resultado parece interesante para el tratamiento de afecciones locales situadas a este nivel de la piel, pero el número de estos folículos es poco importante y corresponde a una escasa superficie para esperar una gran absorción (LIEB y cols., 1992).

Aún así, otros autores remarcan la relevancia de las glándulas sudoríparas en la penetración cutánea de los principios activos. Se aplicó un antiandrógeno en piel normal y en piel sin glándulas sebáceas. En la primera la absorción cutánea y acumulación fue cuatro veces mayor (BERNARD y cols., 1997).

Finalmente y dentro de este apartado, resulta interesante comentar alguno de los estudios realizados sobre las posibles interacciones entre los liposomas (constituidos por ceramidas, colesterol y ácidos grasos) y las estructuras cutáneas:

Las observaciones realizadas al microscopio electrónico con corneocitos aislados, muestran que los liposomas se adsorben a la superficie de las células y se transforman en fase laminar y liberan su contenido al interior del citoplasma (ABRAHAM y DOWNING, 1990). Por el contrario otros autores, muestran como los liposomas, de composición más clásica son captados por los corneocitos por fagocitosis (KORTING y cols., 1993).

La piel es capaz de incorporar grandes cantidades de lípidos (DU PLESSIS y cols., 1992). Wolrab pone de manifiesto la existencia de un gradiente de concentración de fosfolípidos que decrece desde la superficie de la piel hasta las capas más profundas del estrato córneo. Resultados muestran que la razón molar de los lípidos se conserva en las capas superficiales pero ocurre a la inversa en las regiones profundas lo que evidencia una ruptura de la membrana de estas vesículas.

Los estudios realizados por el equipo de Junginger ponen de manifiesto que liposomas no iónicos se fusionan con los corneocitos de la primera capa celular (BOUWSTRA y cols., 1992). Se observó presencia de vesículas en los espacios lipídicos intercelulares situados entre la primera y décima capa de corneocitos. Considerando que es imposible su paso dado su elevado diámetro, podrían atravesar la primera capa celular hasta su descamación.

A modo de resumen y tomando como base los resultados derivados de las investigaciones en el campo de los liposomas de aplicación tópica se extraen las siguientes conclusiones:

- La unión de liposomas a ciertas superficies cutáneas puede ser mediada por interacciones electroestáticas.
- La aplicación tópica de liposomas puede fomentar la concentración de los principios activos a nivel cutáneo, reduciendo su absorción sistémica.

- La liberación transdérmica de moléculas lipofílicas se ve favorecida tras su incorporación a liposomas. Por el contrario, no varía en el caso de materiales hidrofílicos.
- La vehiculización liposómica en el interior del estrato córneo posibilita la existencia de un efecto reservorio sustancial.

2.9.5.- Liposomas de aplicación en dermatología

En lo que se refiere a las principales aplicaciones en el campo de la dermatología destacan los esteroides. Citaremos las investigaciones realizadas por Michael Mezei y Gulusekharam (1981); con acetónido de triamcinolona marcado radiactivamente e incorporado a liposomas de tipo MLV. Tras la aplicación cutánea a conejos se apreció una acumulación del agente en la epidermis y en la dermis (lugar de acción) cinco y tres veces superior a la detectada en el caso de la administración bajo una forma convencional. Asimismo, las concentraciones urinarias disminuyeron de forma significativa (MEZEI y GULUSEKHARAM, 1982). Más adelante Mezei estudió además de la triamcinolona, econazol, minoxidilo y ácido retinóico; en todos los casos encontró concentraciones de 5 a 8 veces superiores en dermis y epidermis con respecto a las formas libres. De los trabajos realizados sobre el acetónido de triamcinolona destacan los siguientes:

- La formulación liposomal de 21-palmitato acetónido de triamcinolona posee un efecto antiinflamatorio para la supresión de la artritis más eficiente que la solución de su forma libre (LOPEZ-GARCIA, 1993).
- En el tratamiento de vitreoretinopatía la encapsulación de acetónido de triamcinolona aumenta su eficacia y reduce su toxicidad (HUI y cols., 1993).
- El uso de liposomas optimizó la liberación sostenida del glucocorticoide en cuestión, tras su administración en el pulmón (GONZALEZ y cols.,1996).
- Aumento de la eficacia del acetónido de triamcinolona tras su aplicación sobre úlceras bucales (HARSANYI y cols., 1986).

Similares resultados se obtuvieron con hidrocortisona, observándose una acumulación en tejidos cutáneos considerablemente superior a la detectada bajo forma libre (cuatro veces mayor en la epidermis y catorce veces en la dermis) (LASCH y WOHLRAB, 1987).

En el caso de corticoesteroides, la liberación dérmica controlada mediante liposomas posibilitó un incremento de los efectos farmacológicos, mientras que los secundarios resultaron 5 veces menores que con formulaciones convencionales (CEVC y cols., 1997).

También se trabaja con antiinflamatorios no esteroídicos como ibuprofeno (STOYE y cols., 1998) o piroxican (CANTO y cols., 1999).

Diferentes antibióticos encapsulados en liposomas e incluidos en una matriz tipo esponja han sido utilizados en heridas superficiales contaminadas para disminuir el contenido bacteriano. Esta aplicación clínica se puede extender a tratamientos de heridas quirúrgicas postoperatorias con antimicrobianos, para prevenir las infecciones (JULIANO, 1989). Por ejemplo, la absorción subcutánea de enoxacina (quinolona fluorada) fue mucho mayor en su forma liposomal que en su forma libre (FANG y cols., 1999).

Antimicóticos

El tratamiento de diferentes infecciones fúngicas de la piel también ha sido abordado con el objetivo de resolver los problemas de biodisponibilidad que presentan algunos fármacos antifúngicos en forma tópica convencional (SUD y cols., 1979). Entre los agentes de este tipo que han sido formulados en forma liposómica se encuentran: miconazol, ketoconazol y econazol, entre otros (GALIANO y cols., 1990; Hanel y cols., 1992).

En el caso del econazol, se prepararon varias formulaciones con el producto en forma de base y de nitrato, las cuales se evaluaron mediante estudios “in vivo”, comparadas con los estudios comerciales existentes en forma de crema, gel y loción y en formas liposómicas. Los

resultados indicaron que la mayoría de los productos liposómicos produjeron mayores concentraciones de econazol en las diferentes capas de la piel y menores concentraciones en los órganos internos si se compara con las formas comerciales. En algunos casos, según la formulación, se logra incrementar la penetración dérmica y trasdérmica simultáneamente, como resultado de la encapsulación de liposomas (MEZEI, 1992).

Posteriormente se desarrolló un nuevo sistema de liberación de fármacos en forma liposómica, denominado multifásico, el cual permite optimizar la concentración del agente activo encapsulado en los liposomas, así como lograr la liberación selectiva en la piel. Los estudios clínicos realizados con estos preparados parecen demostrar que incluso las formas liposómicas de menor concentración (0.2 y 0.5%) presentaron igual efectividad que las formas comerciales existentes en forma de crema. Además la forma liposómica requirió una menor frecuencia de aplicación y obtuvo una mayor aceptabilidad por parte de los pacientes tratados, dada la ausencia de irritación (MEZEI, 1990).

Anestésicos locales

Los anestésicos locales constituyen una familia de agentes activos que se caracterizan por tener un periodo de vida media corto en el organismo; la mayoría poseen escasa penetración en la piel y, en general, se consideran poco efectivos por vía tópica.

En 1988 Mezei estudió la encapsulación del clorhidrato de tetracaína al 0.5% en liposomas con respecto a un producto control (clorhidrato de tetracaína al 1%) en crema. La intensidad y duración de la acción anestésica revelan la capacidad de los liposomas para incrementar la penetración del agente activo y la posibilidad de que la preparación funcione como un sistema de liberación prolongada dentro de la dermis. También resultados de microscopía electrónica avalan la penetración del agente activo dentro de las diversas capas de la piel (FOLDVARI y cols., 1990).

Retinoides

Los retinoides han demostrado ser eficaces en el tratamiento de diversos tipos de acné y otras dermatosis. Cuando se administran por vía sistémica producen teratogenicidad. La vitamina A y la isotretionina tienen el inconveniente adicional de que son irritantes y exacerbaban algunos síntomas. Estudios experimentales sobre el palmitato de vitamina A encapsulado en liposomas demuestran un aumento de su poder comedolítico (RECASENS y cols., 1998).

Estas limitaciones motivaron su encapsulación en liposomas y los resultados preliminares han demostrado ventajas como: menor tiempo de tratamiento, no recurrencia de los síntomas al terminar el tratamiento y mayor aceptabilidad cosmética (MASINI y cols., 1993; QUIGLEY y BUCKS, 1998; FRESNO y cols., 2001).

Otros Fármacos:

Otros agentes investigados han sido progesterona para el tratamiento del hirsutismo idiopático (ROWE y cols., 1984), hormona del crecimiento (FLEISHER y cols., 1995), eritromicina (JAYARAMAN y cols., 1996) e interferón α -2b. Este último asociado a liposomas, funciona como factor antifibrinogénico frente a fibroblastos dérmicos humanos (GHAHARY y cols., 1997).

En pacientes con xeroderma pigmentosum, el tratamiento con una loción de endonucleasa T4 tipo V encapsulada reduce significativamente la aparición de nuevas lesiones de queratosis actínica y de carcinoma de células basales (ANONIMO, 2001).

El *minoxidilo* es un agente útil en el tratamiento de la alopecia, pero su uso se ve limitado por la escasa biodisponibilidad de las fórmulas comerciales. Su encapsulación en liposomas incrementa las concentraciones de fármaco dentro de las diversas capas de la piel (MEZEI, 1988).

La encapsulación de varios tipos de *interferón* se ha abordado en forma liposómica como una vía para incrementar su efectividad (WEINER, 1989). Se encontró un discreto incremento en la efectividad del interferón aplicado en forma liposómica. Estos resultados difieren de aquellos investigados para el tratamiento de las infecciones genitales producidas por papilomavirus con interferón alfa encapsulado en liposomas, comprobándose la desaparición de las lesiones cutáneas en una población femenina al término de 12 semanas de tratamiento (FOLDVARI y MORELAND, 1997).

El *metotrexato* administrado tópicamente en forma liposómica, puede actuar como un sistema de liberación controlada en la epidermis. Además, es retenido en esta, tres veces más que el fármaco libre (PATEL, 1985).

2.9.6.- Liposomas de aplicación en cosmética

La cosmética está utilizando liposomas debido a sus posibilidades resolutivas a nivel de los estratos epidérmicos más superficiales. Desde una perspectiva ideal se puede decir que tras la aplicación de un preparado cosmético sobre la piel, todos los coadyuvantes presentes en el mismo (fragancias, agentes tensioactivos...) deberían permanecer en la superficie, siendo sólo los ingredientes activos los que tuvieran capacidad para atravesar la barrera cutánea. Los liposomas, pueden contribuir en gran medida a lograr este objetivo. Así, se ha comprobado que muchos ingredientes activos encapsulados en liposomas son mucho más eficaces que si se incorporan simplemente a una base cosmética. A ello contribuye también la enorme afinidad que los propios fosfolípidos que constituyen las vesículas poseen por la piel, así como su excelente capacidad humectante (STRIASNE, 1978); (MARTI y cols., 1998).

Algunos de los principios activos comercializados son: alantoína, aloe-vera, urea, levaduras, mucopolisacáridos, germen de trigo, colágeno, elastina, entre otros.

La función protectora del estrato córneo depende de su elasticidad, la cual a su vez es función de su contenido lipídico, de la presencia de sales inorgánicas así como de su estado de hidratación. Un aumento de la humedad de la piel favorece su elasticidad. La humedad cutánea está regulada sobre todo por los lípidos existentes en el estrato córneo. La composición lipídica de una formulación liposómica podría afectar al grado de hidratación de la piel. La aplicación tópica de distintas composiciones liposómicas ha permitido demostrar que cuando el contenido en fosfatidilcolina del liposoma es elevado (80%), el incremento en hidratación cutánea es importante (38 %), transcurridos 30 minutos después de la aplicación tópica (LE PONS, 1995).

En lo que se refiere a la cosmética, tanto los procedimientos de fabricación como las distintas aplicaciones han sido objeto de patente (como los comercializados por Christian Dior con el nombre genérico de “Capture”). Hoy se pueden encontrar en el mercado múltiples preparados que contienen liposomas, adecuados para usos muy diversos:

Uno de los más extendidos es el denominado “cuidado de la piel” (skin care preparations), pudiendo incorporar o no los liposomas agentes hidratantes. Estos preparados reducen la pérdida de agua transdérmica, por lo que resultan convenientes para el tratamiento de la piel seca (LAUTENSCHIAGER, 1990). En este sentido se ha incorporado en liposomas de lecitina hidrogenada un factor hidratante natural (aminoácidos o azúcares), los cuales han sido incluidos en una crema, demostrando que el contenido de humedad de la piel aumenta a lo largo del tiempo si la humedad relativa del ambiente no es muy elevada (TAGAWA y cols., 1986). Estos resultados únicamente se pueden explicar si se acepta que, en el caso de la crema que contiene liposomas, se produce una penetración de las vesículas más o menos intactas al interior de la piel, sumándose el efecto del agente hidratante al de los propios fosfolípidos constitutivos de las mismas.

Por medio de los liposomas, se han obtenido lociones limpiadoras, que al mismo tiempo presentan un efecto protector, ya que penetran fácilmente en un entorno lipofílico, sin producir ninguno de los efectos agresivos que normalmente se asocian a la presencia de agentes tensioactivos (LAUTENSCHIAGER, 1990). Asimismo, la inclusión de liposomas en lociones capilares puede producir un efecto paralelo sobre el cuero cabelludo y el pelo como resultado de la asociación de los fosfolípidos y la queratina (STRAUSS, 1989). En la actualidad una solución liposomada de coaltar corrige la seborrea y los procesos descamativos.

En el tratamiento de las estrías maternas normalmente se utilizan preparados oleosos que contienen triglicéridos naturales, lecitina y vitaminas liposolubles, como consecuencia se ha pensado en la aplicación de liposomas (LAUTENSCHIAGER, 1990).

En cuanto al papel que pueden desempeñar los liposomas en fotoprotección, la combinación de “agentes antioxidantes” que reducen la respuesta inflamatoria que produce la radiación ultravioleta (eritema solar) y “capturadores” o “neutralizadores” (antirradicales libres) que previenen la peroxidación que los radicales libres provocan sobre los lípidos cutáneos, conduce a la fabricación de productos solares que protegen frente al daño solar (AES, 1990). De modo que la vehiculización de palmitato de vitamina A en liposomas a igual concentración produce un efecto fotorreparador superior que cuando se utiliza incorporado en la crema convencional (RECASENS y cols., 1998).

También mencionaremos el papel de los liposomas como protectores de la piel: además de la descamación natural de la capa córnea, con una cierta pérdida de lípidos, la barrera cutánea es deteriorada por multitud de agentes; estos disminuyen la hidratación de la piel, desecándola, y la evaporación transepidérmica se ve también deteriorada. Se piensa que los liposomas penetran en el estrato córneo aportando apreciables cantidades de agua (SUZUKI y SAKON, 1990). Los liposomas extraídos de cerebro de buey (comercializados con el

nombre de “Glycosome”) contienen fosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, colesterol y glicoesfingolípidos. Todos estos lípidos están presentes en la epidermis y en los espacios intercelulares de la capa córnea desempeñando un importante papel en la retención hídrica de este estrato. Su acción contribuye a la rápida regeneración de una barrera de permeabilidad dañada y estimula la reconstrucción de las membranas lipídicas en los espacios intercelulares del estrato córneo. Experiencias en voluntarios humanos han confirmado que los liposomas penetran en los espacios intercelulares del estrato córneo. Como es lógico pueden cargarse de principios activos como ácido hialurónico u otros, los cuales serán transportados por los liposomas a las capas de la epidermis, en donde podrán actuar localmente. Así, el aporte de glicosaminglicanos ha permitido eliminar las estrías atróficas causadas por hiperdistensiones anormales de la piel (HALLER, 1987).

Hemos de citar la gran variedad de principios activos de origen vegetal, también encapsulados en liposomas: cola de caballo, fucus, ginseng, árnica, extractos de azahar, nogal, caléndula, papaya, hiedra, romero, hamamelis, manzanilla y jalea real entre otros.

OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

II. OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

Los liposomas constituyen un sistema de vectorización de fármacos con grandes perspectivas de futuro, debido a sus numerosas aplicaciones. No es de extrañar que estén sometidos a una intensa investigación en la actualidad para tratar de determinar todas sus posibilidades.

En la introducción del presente trabajo, se ha realizado una revisión del tema, haciendo especial hincapié en sus aplicaciones en el campo de la dermatología y cosmética. Como se ha reseñado, los liposomas, constituyen una forma farmacéutica especial dotada de poder de reconocimiento para determinado tipo de células, en virtud de lo cual se consiguen óptimos resultados terapéuticos a dosis bajas del medicamento, y se reducen los efectos secundarios derivados de su administración. Con ello se logran las mejores condiciones de eficacia y seguridad en la administración de medicamentos.

A la vista de lo anterior, se han abordado diferentes aspectos de este tema de trabajo y en especial nos hemos ocupado de desarrollar formulaciones alternativas para la administración de los fármacos, mediante la asociación química de las sustancias activas a un sistema transportador.

La sustancia medicamentosa seleccionada es el acetónido de triamcinolona, antiinflamatorio esteroideo de amplio espectro. Posee acción antiinflamatoria, antialérgica y antipruriginosa; es liposoluble y se vincula a los liposomas a nivel de sus bicapas lipídicas. Dicha elección se ha llevado a cabo en función de la importancia de los antiinflamatorios como componentes de la mayoría de los procesos patológicos. La eficacia de la terapia antiinflamatoria es el resultado de un balance entre la potencia de un fármaco frente a un cuadro antiinflamatorio y los efectos secundarios que produce en otros órganos sanos. La limitación de la dosis de fármaco administrado, hasta valores inferiores en muchos casos a la dosis terapéutica, con el fin de reducir los efectos adversos, puede dar lugar a dosis insuficientes de principio activo en el lugar de acción, especialmente en zonas de difícil acceso, como la cavidad articular o diferentes estructuras oculares, con la consiguiente pérdida de efectividad. En el presente trabajo se intenta mejorar la biodisponibilidad del fármaco mediante su encapsulación en liposomas multilaminares y facilitar la penetración a través de las diferentes barreras anatomofisiológicas, prolongando la dosis efectiva del mismo en el lugar de acción (dermis y epidermis).

Por tanto, al objeto de conseguir un adecuado grado de captación del acetónido de triamcinolona en liposomas multilaminares o plurilaminares, se normaliza o pone a punto la técnica de elaboración de estos vectores. Asimismo, se elaboran diferentes formulaciones de liposomas, para determinar los componentes más idóneos para su obtención y los rendimientos proporcionados al variar las concentraciones de los mismos. También se evalúa el papel desempeñado por el colesterol en la permeabilidad y fluidez de las bicapas lipídicas.

Posteriormente, se realiza una caracterización de los liposomas obtenidos, a fin de observar su estructura, dimensiones y grado de homogeneidad, y comprobar la eficacia del método de obtención.

Los sistemas liposomiales elaborados deberían ser capaces de retener y liberar el principio activo adecuadamente. No obstante, factores como la peroxidación lipídica, la hidrólisis de los ácidos grasos integrantes de los fosfolípidos y como consecuencia, la agregación de las vesículas, conducen a una liberación prematura del principio activo. Con el fin de encontrar una posible solución a estos problemas, se estudia el efecto que sobre la estabilidad puede desencadenar la incorporación de antioxidante y/o conservador en los sistemas ensayados.

Para ello se determina la estabilidad de las formulaciones elaboradas (protegidas de la luz), a temperatura ambiente y a 4-6 °C, mediante el estudio de la disminución de principio activo encapsulado en función del tiempo.

El estudio de estabilidad se realiza paralelamente al de caracterización, al objeto de relacionar la pérdida de principio activo con el tamaño, aspecto y estado de agregación de las vesículas.

Finalmente, y al objeto de diseñar una forma adecuada para la administración tópica de los liposomas ensayados, se incorporan a diferentes excipientes, estudiándose la liberación “in vitro” del acetónido de triamcinolona desde los mismos.

El trabajo se ha desarrollado con arreglo al siguiente esquema:

En primer lugar se normaliza la técnica de elaboración de liposomas de acuerdo con el método descrito por BANGHAM y cols. en 1974, para adecuarlo al principio activo objeto de estudio.

Como componentes de las formulaciones a estudiar, que serán la base de la matriz lipídica de los liposomas, se han elegido fosfolípidos y esteroides. El fosfolípido y esteroles empleados son la fosfatidilcolina de yema de huevo y el colesterol, respectivamente.

Con el fin de establecer la idoneidad de los componentes para la elaboración y los porcentajes de sustancia medicamentosa encapsulada, se procede a la separación del agente captado por los liposomas del libre en el medio de dispersión. Las fracciones resultantes se someten a valoración espectrofotométrica y con auxilio de una curva patrón de calibrado se obtienen los porcentajes de principio activo encapsulado y libre. Todo ello permitirá hacer una primera selección de la formulación más idónea con vistas a su aplicación tópica.

Los liposomas se caracterizan por tinción negativa de una preparación y posterior visualización por microscopía de transmisión electrónica. Esta fase de la investigación se completará con la evaluación de la estabilidad de las formulaciones elaboradas, tomando muestras periódicamente, a fin de establecer la formulación más adecuada para su posterior utilización, y fijar las condiciones más idóneas para su conservación.

Al objeto de dilucidar el papel del tocoferol como antioxidante y del phenonip® como conservador se incluyen en la elaboración de formulaciones, estudiándose su influencia en la estabilidad de los liposomas.

Por último se estudia la liberación “in vitro” del acetónido de triamcinolona desde diversos excipientes, al objeto de seleccionar el más idóneo. Para ello se toman muestras

periódicamente hasta 24 horas y transcurridos 7 y 14 días desde la elaboración, evaluándose la cantidad de principio activo liberado.

MATERIAL Y METODOS

III.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL Y METODOS

1.1.- MATERIAL

Se describen los componentes de las preparaciones de liposomas multilaminares obtenidas, objeto de ensayo, utilizando diferentes concentraciones de lípidos y cantidades constantes, en todos los casos, de sustancia activa. En su composición destacan dos fases: lipídica y acuosa.

1.1.1.- Fase Lipídica

Constituida por los siguientes elementos:

*** Fosfolípidos**

Los fosfolípidos son los componentes fundamentales de la bicapa lipídica de los liposomas. El fosfolípido empleado en este trabajo corresponde a la L- α -fosfatidilcolina (PC) de huevo fresco, tipo IX-E, suministrada por la firma Sigma Chem. co., en estado sólido y con un contenido base de colina del 60%. La conservación de esta fosfatidilcolina natural de origen animal se llevó a cabo en recipientes herméticamente cerrados a 0°C y en ausencia de luz.

La molécula de fosfatidilcolina es el componente más frecuente e importante de la inmensa mayoría de liposomas ensayados. Por eso se han realizado numerosos estudios destinados a investigar su comportamiento. Así, se ha comprobado como la fosfatidilcolina natural posee un índice de inhibición del 50% de peroxidación lipídica en presencia de vitamina E, mayor que las lecitinas semisintéticas (BERROCAL y cols., 1998).

La liberación de fluoresceína es mayor desde liposomas “fluidos” elaborados con fosfatidilcolina que desde liposomas “rígidos” elaborados con PC hidrogenada. La interacción con los lípidos del estrato córneo depende del estado fluido de los liposomas (PEREZ-CULLELL y cols., 2000).

Estudios realizados con cultivos de queratinoblastos confirman una mayor absorción para liposomas de fosfatidilcolina; estas vesículas permanecen homogéneamente dispersadas, al contrario que los liposomas elaborados con otros fosfolípidos, los cuales se agregan en la superficie cutánea (ZELLMER y cols., 1998).

Como ya se ha comentado, de manera general, el grado de interacción entre las vesículas lipídicas y la piel depende de las propiedades físico-químicas de los fosfolípidos que las componen. La cabeza polar juega un papel muy importante y la fosfatidilcolina parece interactuar mejor con la piel que otros fosfolípidos como el fosfatidilinositol (JUNINGER y cols., 1991).

* **Colesterol** ($C_{27}H_{46}O$ Mr = 386.7)

Se utiliza colesterol o colestina recristalizado (CH), suministrado por la casa Claudio Barciá. El colesterol actúa a nivel de la bicapa lipídica proporcionando una estructura más compacta, menos porosa y menos permeable. Su efecto es modulador, es decir, funciona como “buffer de fluidez” suprimiendo el cambio brusco que se produce en la fase de transición de las membranas liposómicas desde un estado de gel hasta un estado fluido (cristal líquido) (JULIANO, 1980).

También se ha comprobado como dicho esteroles desarrolla un efecto antioxidante (FILIPEK y cols., 2001) probablemente debido a:

- La separación lateral de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados tras la inserción del colesterol entre las moléculas de fosfatidilcolina.
- El creciente empaquetamiento entre las regiones polar e hidrófoba por disminución en la hidratación de la bicapa.

* **Disolvente de la fase lipídica**

Todos los componentes de la fase lipídica han sido solubilizados en un disolvente orgánico volátil; el seleccionado es el cloroformo (Cl_3CH).

*** Principio activo: Acetónido de triamcinolona (Acofarma®)**

El acetónido de triamcinolona es un agente antiinflamatorio esteroideo de potencia intermedia y vida media prolongada, ampliamente utilizado en terapéutica por su probada eficacia frente a procesos reumáticos (artritis), alérgicos (asma, rinitis alérgica), respiratorios (sarcoidosis), renales (síndrome nefrótico), oculares (uveitis) y óticos (otitis externas y medias).

En terapéutica se utiliza por vía oral para el tratamiento de afecciones reumáticas y procesos oftálmicos alérgicos e inflamatorios graves.

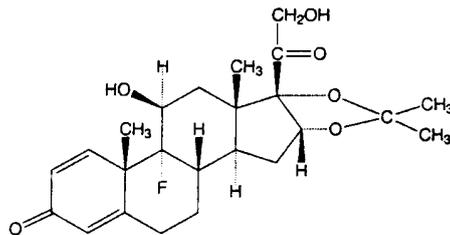
En inyectables, vía intramuscular e intraarticular, se emplea por su acción local en reumatología y dermatología. Se trata de un glucocorticoide de “depósito”, de 3 a 6 semanas de duración.

Además se administra para el tratamiento del asma y está indicado por vía rectal para el tratamiento de colitis ulcerosa de localización distal y proctitis granular.

Por vía tópica presenta los inconvenientes de la corticoterapia. No obstante, su encapsulación en un transportador, como los liposomas, permitiría facilitar la penetración de este fármaco a través de las diferentes barreras anatomofisiológicas, prolongando la dosis efectiva en el lugar de acción. Estudios al respecto (MEZEI, 1981) ponen en evidencia concentraciones de acetónido de triamcinolona en epidermis y dermis cuatro veces superiores a las constatadas tras aplicación tópica del agente en forma libre. Asimismo, se aprecia una reducción en la absorción percutánea y en la excreción urinaria.

Estructura:

Químicamente es el: 9-fluoruro-11 β , 21 dihidroxi-16 α , 17-isopropilidenodioxipregna-1,4-dien-3, 20-diona.



Su actividad antiinflamatoria resulta diez veces superior a la manifestada por la hidrocortisona, gracias al grupo cetónico en C₃, al doble enlace entre C₄ y C₅ y al átomo de flúor en 9 α . El derivado acetónido, presenta un doble enlace entre C₁ y C₂, que lo hace de cuatro a seis veces más activo (FLOREZ y cols. ,1993).

Mecanismo de acción:

El acetónido de triamcinolona penetra en la célula por un simple proceso de difusión. Ya en el interior interacciona con un receptor glucocorticoide, que es una proteína específica. El complejo receptor-esteroide alcanza el núcleo celular donde interactúa con el DNA promoviendo la síntesis de ciertas proteínas específicas “mediadoras” (lipocortina), que son las responsables de la acción corticoide. Todo el conjunto de acciones antiinflamatorias y antialérgicas derivan en el bloqueo de la síntesis de los mediadores químicos de la inflamación: prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos y ácidos hidroxieicosatrienóicos; todos ellos sintetizados a partir del ácido araquidónico, cuya liberación está catalizada por la enzima fosfolipasa A que será inhibida por la lipocortina. Como resultado de esta acción se producen los efectos antiinflamatorios: retardo en la migración de leucocitos polimorfonucleares, descenso de la fibrinogénesis, disminución de la

elaboración de la proteína C reactiva, supresión de la desgranización de los mastocitos, y efectos inmunosupresivos, como supresión de los procesos de fagocitosis y descenso del número de eosinófilos y linfocitos. De modo que, a nivel tópico, se producirá vasoconstricción, descenso de la extravasación de suero en la piel y supresión de permeabilidad de la membrana de los lisosomas (FLOREZ y cols., 1993).

El acetónido de triamcinolona está indicado en dermatitis atópica, de contacto, seborrética y eczematosa, neurodermatitis, psoriasis e intertrigo (tópica). Liquen plano, liquen simple, sarcoidosis, alopecia y lupus eritematoso discoide (inyección intralesional). Trastornos cutáneos, artríticos y alérgicos (inyección intraarticular) (REVILLA y cols., 1980).

Perfil biofarmacéutico:

La absorción de este principio activo se realiza prácticamente por todas las vías de administración. Aplicado tópicamente se absorbe a través de la piel. Por vía intramuscular se absorbe muy lentamente. Por vía intraarticular, intrasinovial o intrabursal manifiesta sus efectos a las pocas horas y permanecen durante 1-3 semanas. Rápida y completa absorción por el tracto gastrointestinal (REVILLA y cols., 1980; GOODMAN-GILMA, 1996).

Se distribuye por todo el organismo. Se encuentra unido en un porcentaje elevado a proteínas plasmáticas. Atraviesa la barrera placentaria. Su vida media es de 18-36 horas y posee una duración de acción intermedia (FLOREZ y cols., 1993).

El metabolismo se produce principalmente, aunque no de forma exclusiva, a nivel hepático. Las principales reacciones metabólicas son: reducción del doble enlace C₄-C₅ y reducción de la cetona del C₃ a un grupo hidroxilo, por donde se une el ácido glucurónico o al sulfato, aumentando su solubilidad.

La metabolización se ve enlentecida por el flúor del C₉ y el doble enlace entre C₁-C₂ (RANG y cols., 1995).

Se excreta principalmente por vía renal, aproximadamente un 70% y por heces un 30%. A través de la leche materna se elimina un pequeño porcentaje (CLARKE, 1986).

Interacciones (VELASCO y cols., 1993):

- Su acción es inhibida por los antihistamínicos, barbitúricos, hidrato de cloral, glutetimida y productos halogenados.
- Inhibe la acción de las anticolinesterasas, colinérgicos, insulina, antidiabéticos y anticoagulantes orales, antibióticos, quimioterápicos, vacunas y ciclofosfamida.
- Puede ser peligrosa su asociación con simpaticomiméticos, anticolinérgicos, meperidina, anestésicos, vacunas y diuréticos, existiendo aumento de toxicidad con pirazolonas, salicilatos y antiinflamatorios en general.

Está contraindicado en pacientes con miastenia grave, alergia a los corticoides, procesos tuberculosos y en infecciones de origen vírico (varicela, herpes simple, herpes zoster). No debe administrarse durante el embarazo (o al menos evitar su aplicación en grandes dosis, zonas extensas o tratamientos prolongados) y en el tratamiento tópico de rosácea. En niños, es importante evitar la administración de dosis elevadas en áreas extensas de la piel (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2001).

Efectos adversos:

En cuanto al riesgo de efectos secundarios no dependen del preparado elegido, ni de la dosis, sino del área de aplicación, de si se utiliza o no vendaje oclusivo y sobre todo de la duración del tratamiento. Durante un periodo corto pueden administrarse dosis muy altas con efectos secundarios mínimos, pero a medida que transcurre el tiempo comienzan a notarse los efectos típicos de la terapia corticoide, produciendo retroacción a nivel de la adenohipófisis,

inhibiendo la liberación de la hormona ACTH y por tanto, la liberación de glucocorticoides a nivel de la corteza suprarrenal; por eso un tratamiento de varios meses de duración nunca debe suspenderse bruscamente sino gradualmente para permitir a la corteza suprarrenal recuperar su función normal.

A elevadas dosis y tratamientos prolongados, debido al paso del glucocorticoide a la circulación general, también se pueden producir alteraciones en el metabolismo glucídico (hiperglucemia, diabetes), lipídico (síndrome de Cushing), protéico (debilidad y atrofia muscular, miopatía, retraso en el crecimiento), osteoporosis, efectos gastrointestinales (anorexia, úlcera péptica), psicológicos (alteración de la personalidad, euforia). Además, por su efecto inmunosupresor, sensibiliza frente a infecciones fúngicas, virales y bacterianas.

Por vía tópica, su uso en tratamientos prolongados puede producir: alteraciones atróficas de la piel, irritación cutánea, vasoconstricción, foliculitis, acné, infecciones bacterianas, pérdida de colágeno, estrías dérmicas, hipertrichosis, telangientasia, desórdenes pigmentarios y alergias. Aunque su actividad mineralocorticoide es nula, como precaución, no se debe aplicar vendaje oclusivo en zonas muy extensas de la piel ya que puede producirse absorción sistémica con riesgo de toxicidad como retención hidrosalina (edema, hipertensión).

Asimismo, tras su aplicación oftálmica, puede ocasionar exacerbación de infecciones oculares (víricas, fúngicas o bacterianas), glaucoma, cataratas y reducción de la función visual.

Por vía intraarticular puede producir lesión articular, atrofia ligera, síncope y reacciones anafilácticas (RANG y cols., 1995).

La dosis diaria de acetónido de triamcinolona habitualmente es del 0.025-0.1% en forma de pomada, crema o loción, de 2-4 aplicaciones/día para adultos y 1 aplicación/día en niños, 1-3 mg en forma de suspensión inyectable intralesional y 40mg en forma de suspensión vía intramuscular. (REVILLA y cols., 1980).

Perfil tecnológico:

• **Características físico-químicas:**

El acetónido de triamcinolona se presenta como un polvo blanco, o casi blanco, inodoro o casi inodoro. Su masa molecular relativa es de 434.50. Muy soluble en alcohol absoluto y metanol, 1:11 de acetona, 1:40 de cloroformo y 1:150 de etanol. Fotosensible (CLARKE, 1986; Real Farmacopea Española, 1997).

• **Identificación:** (CLARKE, 1986; USP 23, 1995)

- Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo
- Cromatografía en capa fina
- Intervalo o punto de fusión: 290-294 °

• **Valoración** (Real Farmacopea Española, 1997):

- Espectrofotometría de absorción ultravioleta, presentando un máximo de absorción de 238nm cuando el disolvente es metanol y 239nm cuando el disolvente es etanol.
- Rotación óptica específica comprendida entre + 100° y +107°.

• **Formas farmacéuticas** (Catálogo de especialidades farmacéuticas, 2001):

Por vía tópica hay cremas (Interderm[®], Positon[®], Nesfare antibiótico[®]), ungüento (Positon[®]), pomadas (Aldoderma[®], Aldoderma[®], Anasilpiel[®], Trigon tópico[®], Anso[®]), loción (Positón[®]), también existe un aerosol-espuma (Proctosteroid[®]) y una pomada (Trigon rectal[®]) rectales; y de aplicación nasal el nasacort[®]. De administración oral, unos comprimidos (Kenalog Orabase[®]); por vía sistémica existen inyectables (Trigon depot[®]) y por último de aplicación ótica, unas gotas (Aldo ótico[®])

* **Vitamina E o Tocoferol** (C₂₉H₅₀O₂ Mr 430,69)

Existen varios compuestos con actividad de vitamina E pero el más activo es el α -tocoferol y sus ésteres. En la presente investigación se ha utilizado el acetato de α -tocoferol (Ephynal®, Roig Farma), que se presenta como un aceite viscoso, transparente, amarillo o verdoso e inodoro. Es soluble o miscible en alcohol, éter, acetona, aceites vegetales, y cloroformo; insoluble en agua. Posee capacidad antioxidante. Se adiciona en una concentración de 10 moles %.

La vitamina E impide la peroxidación de los lípidos, actúa especialmente sobre las membranas liposomiales ejerciendo sobre ellas un efecto estabilizador. Contribuye pues a mantener una resistencia y asegurar la estabilidad de la pared del liposoma.

Se ha elegido la vitamina E como antioxidante en base a los satisfactorios resultados derivados de su empleo para mejorar la estabilidad de los liposomas (FUKUZAWA y cols., 1998; LEL'IKY y cols., 2000); destacan aquellos que demuestran como la inducción con iones Fe^{2+} a la peroxidación fosfolipídica es inhibida o disminuida por el α -tocoferol (VASILJEVA y cols., 2000).

En la actualidad se estudian los productos de reacción del α -tocoferol durante la peroxidación en sistemas biológicos (YAMAUCHI y cols., 2002) a partir de sistemas lipídicos como vesículas unilaminares grandes, idóneas como modelos en la oxidación biológica de los lípidos (Mc DONALD y cols., 1991; FIORENTINI y cols., 1994). Los productos primarios de peroxidación lipídica son los hidroperóxidos (estables a temperatura fisiológica) que se disociarán en radicales libres por reacciones metal-catalizadas (HALLIWEL y GUTTERIDGE, 1984; SEVANIAN y HOCHSTEIN, 1985). El tocoferilo reacciona rápida e irreversiblemente con los radicales peroxil del fosfolípido dando lugar a productos estables.

Debe tenerse en cuenta que los distintos tipos de vesículas (multilaminares o unilaminares) poseen diferente estabilidad frente al ataque oxidativo, así como el grado de

oxidación de los ácidos grasos, siendo en los no saturados donde se observa la acción antioxidante del α -tocoferol más pronunciada (RANGELOVA y cols., 1990).

La evaluación de la acción antioxidante ha permitido establecer el orden de eficacia de algunos compuestos ensayados (MORA y CASADO, 2002): vitamina E > Extractos vegetales > acetato de vitamina E.

1.1.2.- Fase acuosa

La fase acuosa está constituida por **agua destilada**, a la que se adiciona en algunas formulaciones DL- α -tocoferol en solución acuosa coloidal (**Ephynal®**, Roche) y un conservador.

El conservador elegido es el **Phenonip®** (C₂₇ H₄₆ O PM=386.7) (Roig Farma) químicamente está constituido por una mezcla de metil y propil paraben en fenoxietanol. Se presenta como un líquido viscoso no volátil, de olor aromático débil. Es soluble en etanol, propilenglicol, disolventes orgánicos y tensioactivos; es poco soluble en agua.

Posee un amplio espectro de actividad frente a bacterias, hongos y levaduras, siendo estable a cambios de temperatura y pH (3-8). Con esta mezcla de parabenos y fenoxietanol, se complementan sus respectivos espectros antimicrobianos. Posee baja toxicidad. Se adiciona en caliente a la fase acuosa.

En soluciones acuosas se emplea a concentraciones del 0,1-0,3%. En cambio, para las formulaciones de liposomas, la concentración recomendada es del 0,5% (MARTI y cols., 1998), ya que el conservante puede ser atrapado y encapsulado por estas vesículas. Por ejemplo los parabenos, se inactivan en los liposomas por su participación en la bicapa. El grado de inactivación será función del coeficiente de partición y concentración total lipídica.

Consecuentemente, la cantidad total de conservador debe incrementarse para lograr un efecto satisfactorio. Puede ser calculada con la ecuación modificada de Bean (BEAN y HEMAN, 1964):

$$C_T = C_L \times (\phi \times K_p + 1) / (\phi + 1)$$

donde:

ϕ : proporción de lípido en fase acuosa (p/p)

K_p : (g P/g lípido)/(g P/g fase acuosa)

C_T : concentración total

C_L : concentración libre

$g P$: gramos de conservante

K_p : coeficiente de partición liposomas-agua

1.2.-METODOS

1.2.1.-Formulaciones de liposomas multilaminares

Las diferentes formulaciones empleadas en la elaboración de los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona (AT) , así como las proporciones molares relativas de los componentes, figuran en los cuadros I y II.

Dichos cuadros también incluyen las cantidades de cada componente empleadas expresadas en mmoles/100ml y en mg/100ml.

El número I corresponde a las formulaciones elaboradas con fosfatidilcolina de huevo (PC) y el número II con fosfatidilcolina de huevo y colesterol (CH), con la finalidad de comprobar el efecto desarrollado por dicho esterol sobre las características de estabilidad de las vesículas

lipídicas. En todas las preparaciones la concentración del principio activo permanece constante e igual a 1mg/ml (0.23 mmoles/100ml).

CUADRO I

FORMULACION N°	PROPORCION MOLAR PC : AT	mmoles/ 100 ml		mg/100ml	
		PC	AT	PC	AT
1	1 : 1	0.230	0.230	181.15	100.0
2	2 : 1	0.460	0.230	362.30	100.0
3	3 : 1	0.690	0.230	543.45	100.0

PC: fosfatidilcolina; AT: acetónido de triamcinolona

CUADRO II

FORMULACION N°	PROPORCION MOLAR PC:CH:AT	mmoles/100ml			mg/100ml		
		PC	CH	AT	PC	CH	AT
4	1 : 0.5 : 1	0.230	0.115	0.230	181.15	44.46	100.0
5	2 : 1 : 1	0.460	0.230	0.230	362.30	88.92	100.0
6	3 : 1.5 : 1	0.690	0.345	0.230	543.45	133.38	100.0

PC: fosfatidilcolina; CH: colesterol; AT: acetónido de triamcinolona

1.2.2.-Metodo de elaboración

Los liposomas MLV poseen varias bicapas lipídicas, siendo especialmente idóneos para la encapsulación de esteroides, dado el carácter lipofílico de estos (KULKARNI y VARGHA-BUTLER, 1995).

La utilidad de estas vesículas multilaminares en su aplicación tópica ha sido ya probada. Concretamente para liposomas neutros transportadores de fármacos lipofílicos (KATAHIRA y cols., 1998), siendo estos más estables que los unilaminares LUV (SUZUKI y SAKON, 1990).

Los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona han sido obtenidos, tal como se indicaba anteriormente, por el método de BANGHAM y cols., (1974) , previamente normalizado por MEDINA y cols., (1984 y 1986).

Este método, específico para la preparación de liposomas plurilaminares, consta de diferentes fases. La primera fase consiste fundamentalmente en la solubilización de todos los componentes de la pared lipídica. El disolvente empleado debe ser volátil, a fin de permitir su eliminación durante la segunda fase del método. Como disolvente orgánico volátil se ha utilizado el cloroformo en cantidad suficiente para la total disolución de los lípidos.

Como resultado se obtiene una solución clorofórmica del fosfolípido (fosfatidilcolina de huevo) y del resto de los componentes de la bicapa lipídica (colesterol). El acetónido de triamcinolona, dada su liposolubilidad, es incorporado en ésta etapa a la solución orgánica; y si procede, también se incorporará el acetato de α -tocoferol (VEMURI y RODES, 1995).

En una segunda fase, dicha solución se adiciona a un matraz de 100ml del rotavapor, completándose el volumen hasta aproximadamente 50ml con cloroformo puro (Merck).
La

evaporación del disolvente se efectúa en un rotavapor Büchi (modelo R-110), operando a vacío y a la máxima velocidad de giro del aparato, prolongándose el proceso el tiempo necesario hasta la total desecación de los lípidos, y formación de una película lipídica adherida a las paredes del matraz. Las condiciones de trabajo permanecen constantes en todos los casos, siendo la temperatura del baño termostático de 37°C (PUISIEUX, 1978; MEDINA, 1984).

La finalidad del empleo de un volumen elevado de cloroformo radica en la necesidad de asegurar una uniformidad en la superficie ocupada por la película y, consecuentemente, en el espesor de la misma , tras la evaporación.

La tercera etapa conduce a la obtención de suspensiones liposomiales portadoras de acetónido de triamcinolona. En este sentido, se adiciona al matraz la fase acuosa del sistema constituida por agua destilada y en su caso el conservador (adición realizada en caliente) y la solución acuosa del antioxidante.

Por agitación continua a una temperatura superior a la de transición de fase de gel a cristal líquido del fosfolípido (37°C para la fosfatidilcolina de huevo), se produce la hidratación de la película lipídica, que se desprende de las paredes del recipiente, y la formación de una suspensión de liposomas en el exceso de solución acuosa.

El periodo de agitación mecánica es de 30 minutos a 300 r.p.m., y el volumen de la fase acuosa de 10ml, en todas las formulaciones elaboradas. El número de réplicas realizadas por fórmula para evaluar el grado de captación ha sido de 15.

Posteriormente, las suspensiones resultantes se dejan estabilizar durante 24 horas a 4°C, para favorecer el crecimiento y formación de las vesículas, antes de la separación (MEDINA y

cols ., 1986). El acetónido de triamcinolona, en base a sus características de solubilidad, se localizará en la matriz lipídica de los liposomas elaborados.

El pH de todas las suspensiones liposomiales elaboradas oscilaba entre 6.5 y 7, manteniéndose estos valores a lo largo del periodo de estudio.

1.2.3 –Método de separación: Centrifugación

Una vez obtenidas las suspensiones de liposomas portadores de acetónido de triamcinolona es necesario proceder a la separación del principio activo encapsulado, del resto de sustancia activa libre situada en la fase acuosa externa que rodea a los liposomas. Esta separación debe realizarse en base a que la capacidad de encapsulación por parte de los liposomas es limitada; en otras palabras, los rendimientos obtenidos en la práctica nunca alcanzan el 100% como consecuencia de esta limitación.

Para cada muestra por formulación se preparan 10ml; dicho volumen se divide en frascos de 5ml cada uno procediendo en cada caso a su separación y valoración. La separación de las fracciones correspondientes a agente captado y libre, se realiza por centrifugación durante diez minutos a 1000 r.p.m. (Hermle; Z 252 M).

Transcurrido este tiempo se observa en el sobrenadante del tubo de centrifugación una fracción acuosa prácticamente transparente, correspondiente al principio activo libre dispersado en la fase acuosa y otra fracción de precipitado en el fondo que corresponde a los liposomas que contienen acetónido de triamcinolona.

Para la valoración se toman 0.32ml del sobrenadante y se disuelven en 5ml de alcohol de 95 °, al objeto de obtener soluciones hidroalcohólicas al 90% (V/V). Finalmente se determina la absorbancia por espectrofotometría uv.

1.2.4.-Método de valoración: Espectrofotometría u.v.

A fin de establecer la formulación de liposomas más idónea así como los porcentajes de acetónido de triamcinolona encapsulado por dichos vectores y libre en el medio y su grado de captación, se ha utilizado como técnica de valoración cuantitativa el método espectrofotométrico.

Una vez constatada la solubilidad del agente en etanol de 90 °, se trazan los espectros de absorción de diversas soluciones de acetónido de triamcinolona en dicho disolvente, mediante barrido de escala, para determinar así la longitud de onda más adecuada. El máximo de absorbancia detectada en todos los casos corresponde a 239nm.

A continuación, se preparan igualmente una serie de soluciones para comprobar si existe una relación lineal entre absorbancia y concentración, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5-6mg/100ml, posteriormente utilizados en los análisis. Esto nos permite conocer los límites de detección y la sensibilidad del método. A la longitud de onda seleccionada se cumple la ley de Beer.

La valoración se realiza en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Hitachi 124 , a 239nm y empleando como blanco, alcohol de 90 °. Los valores de absorbancia determinados para cada fracción, así como los volúmenes de las mismas, permiten calcular las concentraciones de agente no encapsulado, expresadas en mg/100ml, por extrapolación en una curva patrón de calibrado.

1.2.4.1.-Porcentajes de acetónido de triamcinolona captado por los liposomas y libre en el medio.

Conocidos los valores de concentración de sustancia medicamentosa libre en el medio (C_{libre}), expresada en mg/100ml, y el volumen de la fracción resultante de la centrifugación (V_{libre}), la determinación del porcentaje libre se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Acetónido de triamcinolona libre (} AT_{\text{libre}}) = \frac{C_{\text{libre}} \times V_{\text{libre}}}{100\text{ml}} \text{ (mg)}$$

$$\text{Porcentaje libre} = \frac{AT_{\text{libre}} \times 100 \text{ mg}}{AT_{\text{total}}} \text{ (\%)}$$

La cantidad de acetónido de triamcinolona contenida en los liposomas se calcula por diferencias entre la concentración inicial y la existente en el medio acuoso externo. Asimismo, se halla la proporción de principio incorporado en relación a la cantidad total utilizada en la preparación del sistema (porcentaje captado).

1.2.4.2.- Grado de captación

El grado de captación viene dado por los microgramos de acetónido de triamcinolona captados por miligramo de lípidos. A partir del valor de porcentaje de acetónido de triamcinolona encapsulado, la expresión matemática del grado de captación sería:

$$\text{grado capt.} = \frac{\text{Porcentaje captado} \times AT_{\text{total}}}{100 \times \text{fosfolípidos}_{\text{totales}}} \times 10^3 \left(\frac{\mu\text{g AT captados}}{\text{mg PC}} \right)$$

1.2.5.- Estudio de la estabilidad en función del tiempo

Para evaluar la estabilidad de los liposomas, se han elaborado cuatro series de muestras por formulación estudiada. Dichas formulaciones corresponden a las integradas por fosfatidilcolina de huevo y acetónido de triamcinolona, en proporciones molares 1:1, 2:1, 3:1, y a las formulaciones de fosfatidilcolina de huevo, colesterol y acetónido de triamcinolona, en proporciones molares 1:0.5:1, 2:1:1 y 3:1.5:1, obtenidas por la técnica descrita con anterioridad. En estas últimas la concentración del esteroles es del 50% con respecto al fosfolípido (MEZEI, 1985; KULKARNI y VARGHA-BUTLER, 1995).

Para cada formulación, se han preparado cuatro series:

La serie I incluye muestras elaboradas con los componentes básicos. La serie II incorpora en la composición un antioxidante (vitamina E) en solución acuosa, el cual se adiciona tras la formación de la película lipídica. En la serie III, las formulaciones se elaboran con los componentes fundamentales y un conservador (Phenonip®). Finalmente, en la serie IV, se incorporan conjuntamente antioxidante y conservador, para evaluar su efecto combinado sobre la estabilidad de estas vesículas lipídicas.

Cabe precisar que también se ha formulado una serie de muestras (serie II oleosa), en las que el antioxidante (vitamina E) se ha adicionado en forma oleosa, para su incorporación en las bicapas lipídicas, al objeto de comprobar posibles diferencias con la serie II acuosa.

Las cinco series de muestras elaboradas por formulación, se estudian bajo diferentes condiciones de temperatura: ambiente (20-25°C) y a temperatura de refrigeración (4-6 °C), protegidas todas de la acción de la luz.

El periodo de estudio ha sido de 90 días, determinándose a intervalos de 15 días la liberación o pérdida de agente captado por parte de las vesículas lipídicas. Para ello, se

procede como anteriormente, a la separación del principio activo retenido del resto libre mediante centrifugación. La fracción libre se valora por espectrofotometría a 239nm, determinándose la concentración de acetónido de triamcinolona no encapsulado.

En base a dichos valores, y conocida la concentración inicial de agente, se calcula los porcentajes de fármaco captado. Por diferencias entre el porcentaje retenido en el día 0 (momento de la elaboración) y los obtenidos en días sucesivos, se determina la pérdida de acetónido de triamcinolona encapsulado en función del tiempo.

1.2.6.- Caracterización.

Los liposomas se han caracterizado por tinción negativa de las preparaciones y posterior visualización por microscopía de transmisión electrónica. Se ha observado la estructura y se han evaluado las dimensiones de las seis formulaciones de liposomas objeto de estudio, tres de ellas con fosfatidilcolina y las tres restantes con dicho lípido y colesterol, en las proporciones ya indicadas. Para la caracterización se toman liposomas elaborados en las 24 horas precedentes. Se han caracterizado en función del tiempo, a intervalos de 15 días, hasta los 3 meses desde su preparación, con objeto de apreciar la incidencia del paso del tiempo sobre la estructura, dimensiones y grado de agregación de las vesículas lipídicas. También analizaremos la posible repercusión del conservador y antioxidante en el tamaño de las vesículas lipídicas portadoras de acetónido de triamcinolona.

Para la observación al microscopio electrónico de transmisión de los liposomas se ha utilizado una técnica de tinción negativa, empleando como colorante el acetato de uranilo (HAYAT, 1989). El proceso seguido ha sido el siguiente:

- Incubación de las rejillas de cobre cubiertas de una lamina de formvar (Ernest F. Fullam, Inc.) con la suspensión de liposomas durante 4 minutos.

- Lavado de las rejillas con agua ultra pura; dos cambios de un minuto cada uno.
- Tinción con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa durante 1 minuto.
- Secado de las muestras en estufa a 37°C.
- Observación microscópica de las muestras.

El microscopio de transmisión electrónica empleado ha sido un TEM Zeiss 902. Se han utilizado para la visualización de los liposomas, aumentos de 7000 hasta 140000.

1.2.7.- Métodos de Estudio Experimental de la Absorción Percutánea.

1.2.7.1.- Excipientes: Importancia para el estudio de los sistemas liposómicos y su aplicación sobre la piel.

Para llevar a cabo el estudio de la liberación de un determinado fármaco en forma liposómica dentro y a través de la piel, resulta indispensable contar con un producto liposómico apropiado para la aplicación tópica y que reúna los requisitos de consistencia, extensibilidad, adhesión y calidad cosmética necesarios. Esto se logra incorporando la suspensión liposómica obtenida a una formulación que proporcione estas características; es decir, para combatir una afección determinada de la piel no basta disponer del fármaco adecuado; es necesario aplicar éste de forma que su acción se desarrolle lo mejor posible y, para ello, hay que incorporarlo a un excipiente idóneo.

1.2.7.1.1.-Consideraciones en la Elección de los Excipientes

La acción desarrollada por una preparación que se aplica sobre la piel depende de las interacciones mutuas fármaco-excipiente-piel (ZIEGENMEYER, 1982).

I) Factores fisicoquímicos y biofarmacéuticos que condicionan la selección del excipiente idóneo:

En general, se pretende que el excipiente actúe como un depósito con el fin de suministrar continuamente el fármaco y prolongar así la duración del efecto .

En algunos casos, el excipiente deberá favorecer la hidratación de la piel o, en su defecto, penetrar en las capas superficiales de la misma o incluso en las más profundas si el fármaco está desprovisto de esta propiedad y la medicación lo requiere (IDSON, 1983).

El estado de alteración de la piel es también de importancia decisiva en la elección del excipiente. Para estados de inflamación aguda son más adecuados los vehículos acuosos, como las lociones, mientras que estados de inflamación prolongada o crónica suelen responder mejor con la hidratación que producen los vehículos lipófilos como lipogeles y pomadas A/O (ARNDT, 1989).

II) Interacciones vehículo-piel:

Un vehículo, al ser aplicado sobre la piel, interacciona con ella a varios niveles y ello se refleja en la penetración del fármaco que transporta que es función de tres factores.

-La lipofilia propia del acetónido de triamcinolona y los liposomas en relación con el vehículo y el estrato córneo es decir, las interacciones fármaco-vehículo. Para que exista una buena cesión del fármaco deberían cumplirse las siguientes condiciones:

- El coeficiente de difusión del fármaco en el vehículo debería ser óptimo; será mayor cuanto más esté disuelto y menor sea la viscosidad.
- El fármaco debería ser soluble en el vehículo y garantizar la homogeneidad del preparado, pero sin una afinidad específica o selectiva hacia el mismo. Los vehículos hidrófilos como el gel seleccionado ceden el fármaco directamente de acuerdo con la lipofilia de este.

- El vehículo debería incrementar la permeabilidad de la barrera cutánea, ya sea por oclusión o por penetración directa.

-La hidratación de la piel que depende del vehículo: Un vehículo puede aumentar o disminuir el grado de hidratación de la piel o, más concretamente, del estrato córneo. En general la hidratación es un factor favorable para la penetración de cualquier fármaco, mientras que la deshidratación la reduce (BARRY, 1983).

-La penetración del propio vehículo: Para facilitar dicha penetración se usan promotores, sustancias químicas capaces de modificar de forma reversible la permeabilidad de la piel. Sin embargo, a la larga producen irritación y actúan como alérgenos.

En este último aspecto cabe indicar que en el caso de los liposomas se ha comprobado mediante técnicas espectrofotométricas y calorimétricas, como los ácidos grasos cis monoinsaturados, actúan incrementando la fluidez lipídica. Este efecto se traduce en una mayor facilidad para el paso transdérmico de los fármacos vehiculizados, reduciendo la resistencia a la difusión (GOLDEN y cols., 1987).

1.2.7.1.2.-*Elaboración de Excipientes*

GEL DE CARBOPOL

Uno de los inconvenientes principales del uso tópico de los liposomas es la naturaleza líquida de la preparación. Una viscosidad apropiada se puede alcanzar tras su incorporación a un vehículo apropiado (PAVELIC y cols., 2001). Por ejemplo, en terapia intravaginal, la eficacia de una gran variedad de formulaciones se ve limitada por una retención escasa. Este problema se solventa con el uso de un gel liposómico.

El uso de geles liposómicos ha atraído la atención, dada su capacidad para prolongar el contacto del fármaco con la superficie cutánea, sin inducir efectos locales adversos sobre el epitelio (RICHARDSON y cols., 1996). También se confirma que los liposomas son

bastantes compatibles con agentes viscosizantes tales como metilcelulosa y polímeros derivados del ácido acrílico (FOLDVARI, 1996 y SKALKO, 1998).

El gel de carbopol seleccionado pertenece al grupo de los excipientes hidrófilos, vehículos sin grasas, constituidos por materiales que, por sí mismos o en presencia de agua, adquieren consistencia de pomadas y son útiles como excipientes para la aplicación de fármacos sobre la piel. Las ventajas de esta base reside en su acción favorable sobre los tejidos y su fácil eliminación por lavado. No posee capacidad oclusiva y no favorece, por sí misma, la penetración del acetónido de triamcinolona; este papel lo desempeñan los liposomas en los que se incorpora el corticoide. Bajo un punto de vista fisiológico, estas bases son atóxicas y bien toleradas por la piel.

Este excipiente se ha seleccionado para el presente trabajo tomando como base los excelentes resultados obtenidos por MEZEI y cols. (1990), los cuales detectaron concentraciones de fármaco cuatro veces superiores en dermis y epidermis. Experiencias similares se realizaron para el estudio de hidrocortisona en un gel al 1% (KIM y cols., 1997).

En otras investigaciones, el principio activo liberado por los liposomas fue del 40%, tras incubación a 37°C durante 24 horas. En cambio, dicho valor fue del 20%, tras la incorporación de los liposomas a un hidrogel. Todos estos resultados confirman el efecto protector desarrollado por el hidrogel (BRANDL y cols., 1997).

El hidrogel empleado se obtiene por esponjamiento de Carbopol “940” en la suspensión liposómica, a una concentración del 1%, durante 24 horas. Posteriormente se procede a su neutralización con trietanolamina, hasta obtención de un gel.

EMULSION O/A

A menudo se prescriben fórmulas magistrales de acetónido de triamcinolona destinadas al tratamiento de afecciones de la piel, y en la mayoría de los casos se trata de emulsiones de fase externa acuosa o cremas. Se han obtenido resultados satisfactorios con dispersiones de liposomas incorporadas a emulsiones O/A (MARTI y cols., 1998). Asimismo, en una patente francesa, de Pola Chemical Industries (FR2, 1988) se describe una emulsión de estas características, utilizada como crema hidratante de acción prolongada.

Se trata de un excipiente semisólido que se caracteriza por su elevado contenido acuoso. Con este tipo de preparados se puede conseguir interponer componentes liposolubles (fase interna) en hidrosolubles (fase externa) mediante el concurso de los llamados agentes tensioactivos. Son consistentes y lavables con todas las ventajas que ello supone. No son tan oclusivos como los excipientes grasos, y son mucho más agradables en todos los aspectos.

A veces se denominan evanescentes, ya que, aplicadas a la piel con frotamiento suave, desaparecen de esta aparentemente, dejando la piel tersa y suave, impidiendo que penetren polvos extraños y facilitando así su limpieza posterior.

Los vehículos emulsión son más favorables a la penetración de los fármacos porque contienen emulgentes que, como se ha indicado, poseen cierta capacidad de penetración en las capas superiores del estrato córneo y allanan el camino. La presencia de la fase oleosa favorece adicionalmente la penetración en el estrato córneo.

En la emulsión la penetración del fármaco es función de su lipofilia, de la que depende la cesión; así los liposomas de acetónido de triamcinolona se dispersarán en la fase acuosa.

La formula de la emulsión es la siguiente:

Fase oleosa

Vaselina líquida: 0.78%

Alcohol cetisteárico: 0.7%

Acido esteárico: 1.17%

Cera blanca: 0.39%

Emulgente : 8.21%

Fase acuosa

Carbopol 940: 0.46%

Glicerina: 1.17%

Trietanolamina A csp Ph:6

Dispersión liposomada csp 100ml

El gel de carbopol resultante de la fase acuosa se incorpora sobre los componentes fundidos de la fase oleosa, manteniendo durante todo el proceso una agitación constante. La agitación se mantiene durante el proceso de enfriamiento de la muestra, hasta temperatura ambiente, a fin de formar correctamente la emulsión.

Los preparados así formados son estables a temperatura ambiente (KIRBY, 1984).

Como emulgente se utiliza **Olivem 700** (PEG-4 Olivite) de carácter no iónico y origen vegetal (olivo). Pertenece al grupo de los de menor potencial irritativo y ejerce un efecto acusado en las características de permeabilidad. Previene la oxidación de lípidos, estabiliza la emulsión y posee un destacable poder hidratante al reducir la pérdida de agua transepidérmica (AMARI y cols., 1998). Los mejores resultados se obtienen con un 10% de este emulsionante.

1.2.7.2.- Liberación del fármaco

Existe un gran número de técnicas descritas para determinar la permeabilidad cutánea y la liberación de los fármacos desde sus excipientes.

Las técnicas de cesión y transferencia pueden clasificarse según diversos criterios. Las clasificaciones más corrientes tienen puntos de confluencia (BLANK, 1960; GEMMEL y MORRINSON, 1957):

Métodos “in vitro”: Se analiza la difusión del fármaco sobre modelos simples, poniendo en contacto directo o intermediado, ya sea la forma posológica, el fármaco o una disolución de él, con un modelo simple que simula el efector.

Las técnicas “in vitro” requieren unas condiciones experimentales relativamente sencillas y pueden minimizar o eliminar el uso de animales. Es importante tener presente que los métodos “in vitro” permiten ir tomando muestras analíticas con gran precisión.

La técnica seguida ha sido de difusión sin membrana: difusión directa sobre excipientes fluidos (agua, soluciones acuosas, líquidos hidrófobos como aceites, miristatos), o bien, excipientes gelificados (geles de agar, gelatina, etc.); se cuantifica por análisis químico, físico o microbiológico del fármaco difundido.

En nuestro caso hemos usado un dispositivo para difusión a medio líquido. Como líquido lixivante se emplea agua. El contacto entre el excipiente y la fase receptora es directo (POULSEN y cols., 1968; DEMPSKI y cols., 1969). El excipiente se coloca sobre un portaobjetos, el cual a su vez se ubica en el fondo de un vaso de precipitado, en el que se pone como líquido de transferencia 100 ml de agua destilada. El vaso se introduce en un baño a 37°C con una agitación onstante de 90 rpm. Se irán tomando muestras cada 5 minutos en la

primera media hora y posteriormente cada hora hasta la octava toma y una última a las veinticuatro horas (figura 22).

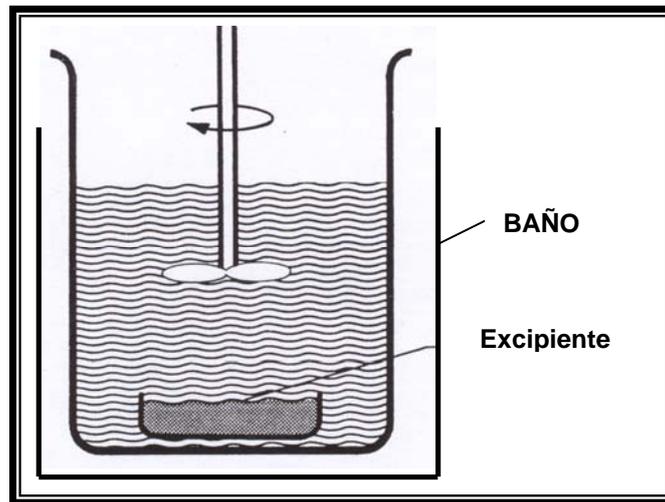


Figura 22

Métodos “in vivo”: la utilidad de los modelos “in vitro” se ha demostrado ampliamente y existe el convencimiento de que su uso continuará predominando en el futuro. Sin embargo, los resultados obtenidos deben refrendarse con investigaciones con humanos ya sea para extrapolar o refrendar su validez.

RESULTADOS

2.-RESULTADOS

2.1.-COMPOSICION DEL LIPOSOMA Y GRADO DE CAPTACIÓN

2.1.1.- Datos Experimentales

La determinación del grado de captación de acetónido de triamcinolona (AT), por parte de liposomas multilaminares, se ha efectuado mediante valoración espectrofotométrica de la fracción de agente no incorporado a estos sistemas, resultante de la separación por centrifugación.

Dicho proceso de valoración ha requerido la elaboración de varias rectas de regresión, a partir de concentraciones conocidas de acetónido de triamcinolona, expresadas en mg/100ml, y de sus correspondientes valores de absorbancia a 239nm.

El cuadro III muestra los resultados obtenidos para la construcción una recta de regresión, así como la ecuación correspondiente, siendo:

x = Concentración de Acetonido de Triamcinolona (mg/100ml)

y = Absorbancia.

En el cuadro IV se recogen los cálculos que han permitido obtener el coeficiente de correlación de la ecuación anterior. Como puede observarse comparando el valor experimental con los teóricos, se infiere una correlación positiva entre los pares de valores considerados.

La figura 23 pertenece a la representación gráfica de dicha curva de calibración.

REGRESIÓN LINEAL ACETONIDO TRIAMCINOLONA/ETANOL 90% (V/V)

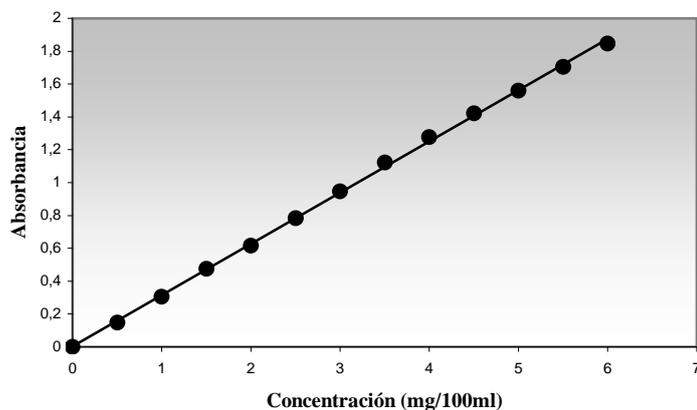


Figura 23

CUADRO III

Regresión lineal AT/Etanol 90% (V/V)

X	Y	X²	X·Y
0.5	0.148	0.25	0.074
1.0	0.304	1.00	0.304
1.5	0.474	2.25	0.711
2.0	0.615	4.00	1.230
2.5	0.782	6.25	1.995
3.0	0.947	9.00	2.841
3.5	1.123	12.25	3.9305
4.0	1.278	16.00	5.112
4.5	1.420	20.25	6.390
5.0	1.560	25.00	7.800
5.5	1.705	30.25	9.3775
6.0	1.845	36.00	11.070
$\Sigma = 39.00$	$\Sigma = 12.201$	$\Sigma = 162.50$	$\Sigma = 50.795$

Ecuación: $y = 0.3116573x + 3.8636 \cdot 10^{-3}$

CUADRO IV

Coefficiente de correlación lineal correspondiente a la recta de regresión acetónido de triamcinolona

dx	d²x	dy	d²y	dx·dy
-2.75	7.5625	-8.687	0.7546	2.3889
-2.25	5.0625	-0.7127	0.5079	1.6036
-1.75	3.0625	-0.5427	0.2945	0.9497
-1.25	1.5625	-0.4017	0.1614	0.5021
-0.75	0.5625	-0.2347	0.0551	0.1760
-0.25	0.0625	-0.0697	0.0048	0.0174
0.25	0.0625	0.1063	0.0113	0.0266
0.75	0.5625	0.2613	0.0683	0.1960
1.25	1.5625	0.4033	0.1626	0.5041
1.75	3.0625	0.5433	0.2952	0.9508
2.25	5.0625	0.6883	0.4737	1.5487
2.75	7.5625	0.8283	0.6861	2.2778
	$\Sigma = 35.75$		$\Sigma = 3.47565$	$\Sigma = 11.14175$

$$r_{\text{experimental}} = 0.999531$$

$$r_{\text{teóricos}} = 0.5769 (0.05), 0.7079 (0.01) \text{ y } 0.8233 (0.001)$$

Las investigaciones sobre el grado de captación del acetónido de triamcinolona por liposomas multilaminares se iniciaron con un estudio de la influencia ejercida por el fosfolípido seleccionado. Para ello se prepararon una serie de suspensiones liposomiales, con una cantidad de acetónido de triamcinolona constante, equivalente a 0.230 mmoles/100ml, y

cantidades variables de fosfatidilcolina de huevo (PC) desde una concentración de 0.230 mmoles/100ml hasta 0,690mmoles/100ml. Asimismo, y al objeto de obtener la máxima incorporación del principio activo y la mejor estabilidad, se elaboraron formulaciones de liposomas de fosfatidilcolina de huevo, que contenían colesterol (CH) en su matriz lipídica, a una concentración molar del 50% con relación a la proporción de fosfolípido (CLARES, 1998).

Con los datos experimentales de absorbancia a 239nm, determinados espectrofotométricamente, se han calculado las concentraciones de acetónido de triamcinolona no encapsulado expresadas en mg/100ml. Conocida la cantidad total de sustancia activa utilizada para la preparación de los liposomas, y por diferencias con respecto a la libre, se ha determinado la proporción de principio activo captado.

En el cuadro V se incluyen los valores medios de las 15 determinaciones efectuadas para cada una de las 6 fórmulas ensayadas, incluyéndose las desviaciones estándar de los mismos. Dichos valores corresponden a los microgramos de acetónido de triamcinolona retenidos por miligramo de lípido, la tasa ó % de principio activo libre, así como el % captado, que constituyen la expresión cuantitativa del proceso de encapsulación de acuerdo con la terminología propuesta por PUISIEUX y cols. en 1985, y basada en las definiciones aportadas por HUNT y cols. en 1982.

CUADRO V

Formulaciones de liposomas portadores de acetónido de triamcinolona

Evaluación del grado de captación (n=15)

FORMULACION (Nº)	PROPORCION MOLAR PC:CH:AT	$\mu\text{g AT captados}$ MG PC	% LIBRE	%CAPTADO
1	1: 0 :1	499.09±10.93	9.59±1.97	90.41±1.97
2	2: 0 :1	241.73± 4.25	12.42±1.54	87.58±1.54
3	3: 0 :1	164.95±7.92	10.36±4.30	89.64±4.30
4	1: 0.5 :1	445.60±10.17	19.28±1.84	80.72±1.84
5	2: 1 :1	287.83± 5.06	21.08±1.83	78.92±1.83
6	3: 1.5 :1	139.17± 6.53	24.37±3.54	75.63±3.54

Todos los resultados de este estudio se han sometido a un tratamiento estadístico consistente en un análisis de varianza o ANOVA, con el cálculo de las varianzas intra e intergrupos y el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95.0% (cuadros XII y XIII). El objeto de este análisis es comprobar las existencias de diferencias significativas entre las medias de las poblaciones comparadas.

CUADRO VI
Resultados del análisis de varianza (ANOVA)
Valores comparados : % Captado

<i>FORMULACIONES</i> (Nº)	<i>DIFERENCIA ENTRE</i> <i>VALORES MEDIOS</i>
1,2	*2.824
1,3	0.765
1,4	*9.684
1,5	*11.484
1,6	*14.773
2,3	*-2.058
2,4	*6.86
2,5	*8.66
2,6	*11.949
3,4	*8.918
3,5	*10.718
3,6	*14.008
4,5	1.8
4,6	*5.089
5,6	*3.289

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 95.0 %)

CUADRO VII
Resultados del análisis de varianza (ANOVA)
Valores comparados : Grado de Captación

<i>FORMULACIONES</i> (Nº)	<i>DIFERENCIA ENTRE</i> <i>VALORES MEDIOS</i>
1,2	*257.321
1,3	*334.111
1,4	*53.457
1,5	*281.224
1,6	*359.899
2,3	*76.789
2,4	*-203.864
2,5	*23.902
2,6	*102.578
3,4	*-280.653
3,5	*-52.886
3,6	*25.788
4,5	*227.767
4,6	*306.442
5,6	*78.675

***Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 95.0%)**

Las medias aritméticas comparadas y correspondientes en el primer caso a % captado por los liposomas (cuadro VI) han resultado estadísticamente diferentes; las únicas excepciones se han presentado al contrastar los valores medios de las fórmulas 1 y 3, y de las fórmulas 4 y 5, a pesar de ello por características como la reducida concentración de fosfolípidos utilizada en la elaboración resaltaremos a continuación las formulas 1 y 4 respecto 3 y 5.

En el caso de los datos referentes a grado de captación (cuadro VII), todos los pares de valores medios comparados han presentado diferencias significativas también para un nivel de confianza del 95.0%.

2.1.2.-Discusión

Los resultados obtenidos en estos primeros estudios (CLARES, 1998) pusieron de manifiesto como al aumentar la concentración de fosfolípido de 0.230 mmoles/100ml a 0.690 mmoles/100ml, variaba, aunque en baja proporción, el porcentaje de agente captado. El rendimiento resultó muy elevado en las tres formulaciones ensayadas con valores medios que oscilaban entre el 87.60% y el 90.41% (cuadro V).

La elevada capacidad de incorporación de acetónido de triamcinolona por parte de éstos liposomas sería, probablemente, consecuencia de la presencia de gran variedad de ácidos grasos insaturados en la composición de la fosfatidilcolina de huevo, así como de su baja temperatura de transición, de tal manera que los lípidos se encontrarían en estado fluido (cristal-líquido) a la temperatura de trabajo (DUFORC, 1985). En general, y en base a la bibliografía consultada, la encapsulación de sustancias activas lipofílicas (como es el agente objeto de estudio) se ve favorecida cuando las bicapas lipídicas presentan una cierta fluidez, como es este caso (VASSON, 1981; DUFORC, 1985).

De las tres fórmulas ensayadas, la número 1 aportó un mayor rendimiento económico, al conseguirse una elevada captación de principio activo con menor concentración de fosfolípido.

Asimismo estas investigaciones previas mostraron como la adición de 0.115 mmoles/100ml de colesterol (fórmula número 4) a los liposomas PC:AT (1:1) provocaba una reducción media del 9.69% en la captación ($80.72 \pm 1.84\%$ captado). Similares variaciones se apreciaron en las muestras número 5 y 6, ambas con una concentración del 50% de colesterol con respecto a la cantidad de fosfatidilcolina. La disminución media en la tasa de encapsulación fue del 8.66% para la fórmula PC:CH:AT (2:1:1) con respecto a la número 2 (PC:AT 2:1); dicha reducción alcanzó un valor medio del 14.01% para los liposomas PC:CH:AT (3:1.5:1) en relación con la captación evaluada para la muestra número 3 (PC:AT 3:1) (cuadro V).

El descenso provocado en la cantidad captada por la inclusión de colesterol, podría ser consecuencia de su orientación en la zona hidrófoba de la matriz liposomal, lugar de localización del agente estudiado. Aunque el modo de interacción con la bicapa lipídica no está totalmente aclarado, el colesterol se alinea paralelamente a las cadenas grasas del fosfolípido con el grupo hidroxilo del anillo esteroídico orientado hacia el interior de la bicapa. La disposición espacial del OH en posición 3 parece ser decisiva en la interacción (GUZMAN, 1985; DUFORC, 1985).

No obstante, las formulaciones ensayadas que contienen colesterol también han aportado una tasa de encapsulación bastante elevada y comprendida entre valores medios del 75.63% y el 80.72% de captación (cuadro V).

Estos primeros resultados han servido como base para el estudio de la estabilidad de estas vesículas lipídicas, así como de la liberación del principio activo “in vitro”.

2.2.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Tras el estudio de encapsulación de acetónido de triamcinolona en liposomas multilaminares, y una vez comprobada la influencia de los componentes de la formulación y la concentración de los mismos en el grado de captación del principio activo, se ha investigado la estabilidad de dichas vesículas lipídicas. En este sentido se han incluido en su composición un antioxidante (vitamina E) y un conservador (Phenonip®) analizando su repercusión en las propiedades del liposoma.

2.2.1.- Datos experimentales

Para el estudio de estabilidad se han preparado 5 series de suspensiones liposomiales que se diferencian en la adición o no de conservador y/o antioxidante.

Cada una de las series consta de 6 fórmulas con una cantidad de acetónido de triamcinolona constante, equivalente a 0.230mmoles/100ml y cantidades variables de fosfatidilcolina de huevo y colesterol (material y métodos, cuadros I y II).

Como ya se ha indicado, las series elaboradas corresponden a las formulaciones de liposomas señalados sin antioxidante ni conservador (serie I), con antioxidante (serie II oleosa: vitamina E en solución oleosa; serie II acuosa: vitamina E en solución acuosa), con conservador (serie III) y con ambos componentes (serie IV).

Se han realizado 6 ensayos para cada una de las 6 formulaciones integrantes de las series investigadas.

Cada serie se ha elaborado por duplicado, conservando las muestras a temperatura ambiente (20-25°C) y a temperatura de refrigeración (4-6°C), protegidas de la acción de la luz. La duración del estudio de estabilidad fue de 90 días, valorándose mediante espectrofotometría las formulaciones a intervalos de 15 días, desde el momento de la preparación.

En los cuadros VIII a XVII se recopilan los datos de absorbancia medida a una longitud de onda de 239nm, obtenidos al valorar las muestras durante los tres meses de estudio. Se incluyen la media aritmética de las 6 determinaciones por fórmula, serie, temperatura y día, así como su desviación estándar. Las figuras 24 a 33 corresponden a la representación gráfica de dichos valores.

Con el fin de observar la existencia de diferencias significativas en cuanto a la estabilidad de las distintas fórmulas, en base a su composición, tiempo ensayado, temperatura de conservación y serie se ha llevado a cabo un estudio estadístico (Anova) que compara los valores obtenidos para cada fórmula.

CUADRO VIII SERIE I-TEMPERATURA:4°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media \pm Desviación Estándar					
0	0,21 \pm 0,006	0,23 \pm 0,010	0,35 \pm 0,020	0,40 \pm 0,006	0,58 \pm 0,006	0,68 \pm 0,021
15	0,32 \pm 0,017	0,23 \pm 0,017	0,41 \pm 0,017	0,41 \pm 0,017	0,77 \pm 0,043	0,70 \pm 0,025
30	0,32 \pm 0,010	0,23 \pm 0,006	0,41 \pm 0,020	0,42 \pm 0,006	0,77 \pm 0,026	0,71 \pm 0,036
45	0,32 \pm 0,015	0,23 \pm 0,025	0,41 \pm 0,026	0,42 \pm 0,015	0,78 \pm 0,017	0,73 \pm 0,030
60	0,36 \pm 0,036	0,25 \pm 0,017	0,45 \pm 0,015	0,42 \pm 0,005	0,81 \pm 0,036	0,76 \pm 0,060
75	0,36 \pm 0,030	0,25 \pm 0,026	0,49 \pm 0,017	0,46 \pm 0,017	0,82 \pm 0,026	0,80 \pm 0,091
90	0,70 \pm 0,034	0,31 \pm 0,046	0,56 \pm 0,043	0,54 \pm 0,040	0,82 \pm 0,036	0,85 \pm 0,053

CUADRO IX SERIE I-TEMPERATURA:25°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media \pm Desviación Estándar					
0	0,22 \pm 0,010	0,27 \pm 0,026	0,38 \pm 0,006	0,47 \pm 0,006	0,58 \pm 0,006	0,70 \pm 0,023
15	0,35 \pm 0,017	0,29 \pm 0,036	0,45 \pm 0,010	0,48 \pm 0,020	0,83 \pm 0,036	0,71 \pm 0,043
30	0,35 \pm 0,017	0,30 \pm 0,026	0,45 \pm 0,006	0,48 \pm 0,011	0,84 \pm 0,026	0,72 \pm 0,036
45	0,38 \pm 0,006	0,32 \pm 0,036	0,50 \pm 0,020	0,49 \pm 0,036	0,84 \pm 0,043	0,80 \pm 0,046
60	0,48 \pm 0,017	0,32 \pm 0,026	0,51 \pm 0,017	0,49 \pm 0,026	0,87 \pm 0,017	0,92 \pm 0,046
75	0,57 \pm 0,070	0,32 \pm 0,020	0,52 \pm 0,043	0,49 \pm 0,017	0,87 \pm 0,017	0,92 \pm 0,017
90	0,71 \pm 0,032	0,38 \pm 0,020	0,63 \pm 0,060	0,67 \pm 0,106	0,96 \pm 0,235	0,93 \pm 0,036

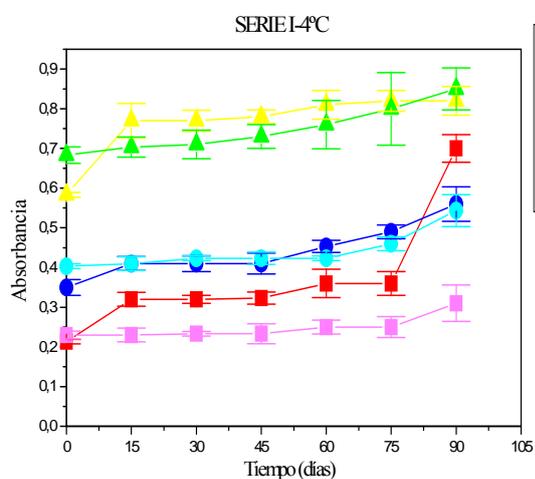


Figura 24

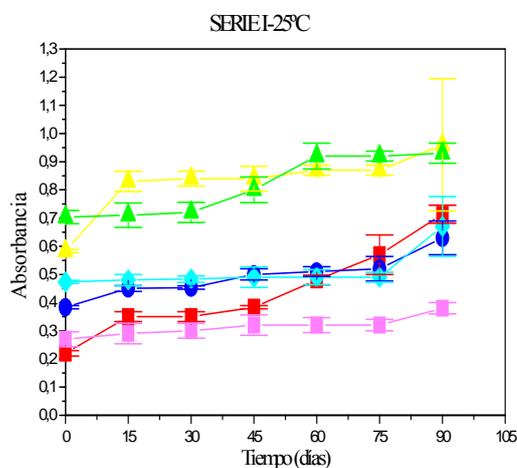


Figura 25

CUADRO X SERIE II oleosa-TEMPERATURA:4°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,38 ± 0,006	0,60 ± 0,006	0,63 ± 0,006	0,70 ± 0,017	0,80 ± 0,017	0,79 ± 0,006
15	0,39 ± 0,015	0,60 ± 0,020	0,68 ± 0,020	0,70 ± 0,010	0,82 ± 0,006	0,83 ± 0,030
30	0,41 ± 0,020	0,62 ± 0,017	0,71 ± 0,010	0,71 ± 0,028	0,94 ± 0,026	0,85 ± 0,036
45	0,42 ± 0,036	0,62 ± 0,015	0,71 ± 0,030	0,72 ± 0,011	1,00 ± 0,087	0,87 ± 0,026
60	0,42 ± 0,017	0,62 ± 0,015	0,73 ± 0,055	0,78 ± 0,017	1,15 ± 0,062	0,92 ± 0,017
90	0,43 ± 0,060	0,63 ± 0,006	0,75 ± 0,020	0,80 ± 0,020	1,20 ± 0,02	0,99 ± 0,085
15	0,42 ± 0,017	0,63 ± 0,011	0,72 ± 0,036	0,72 ± 0,026	0,90 ± 0,026	0,84 ± 0,040
30	0,42 ± 0,010	0,63 ± 0,026	0,76 ± 0,017	0,75 ± 0,026	0,97 ± 0,085	0,88 ± 0,026
45	0,43 ± 0,098	0,65 ± 0,017	0,76 ± 0,026	0,77 ± 0,030	1,05 ± 0,132	0,92 ± 0,026
60	0,44 ± 0,040	0,65 ± 0,010	0,76 ± 0,030	0,78 ± 0,026	1,20 ± 0,050	0,96 ± 0,036
75	0,45 ± 0,050	0,65 ± 0,043	0,76 ± 0,036	0,81 ± 0,030	1,20 ± 0,046	1,07 ± 0,043
90	0,63 ± 0,098	0,65 ± 0,046	0,90 ± 0,070	0,82 ± 0,032	1,29 ± 0,201	1,20 ± 0,087

CUADRO XI SERIE II oleosa-TEMPERATURA:25°C (n=6)

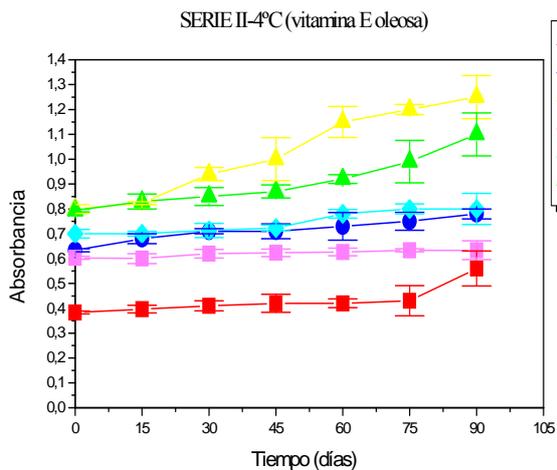


Figura 26

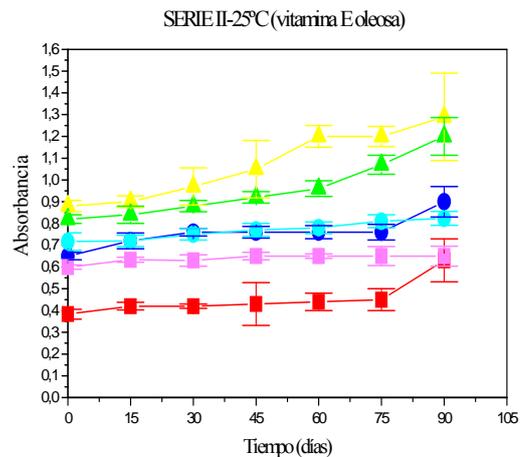
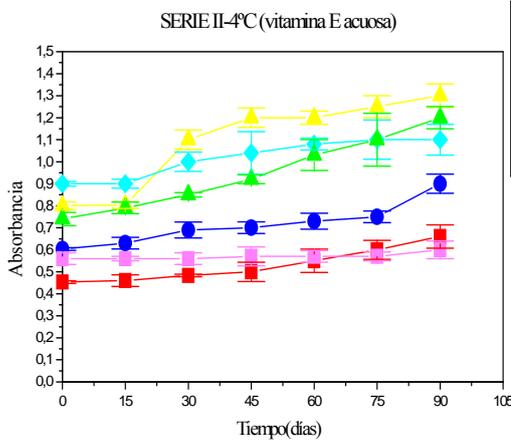


Figura 27

CUADRO XII SERIE II acuosa-TEMPERATURA:4°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,45 ± 0,006	0,56 ± 0,026	0,60 ± 0,006	0,90 ± 0,010	0,80 ± 0,017	0,74 ± 0,030
15	0,46 ± 0,026	0,56 ± 0,010	0,63 ± 0,026	0,90 ± 0,020	0,80 ± 0,015	0,79 ± 0,026
FORMULA	0,48 ± 0,006	0,56 ± 0,026	0,69 ± 0,036	1,00 ± 0,043	1,10 ± 0,043	0,85 ± 0,010
Días	Media ± Desviación Estándar					
15	0,55 ± 0,053	0,57 ± 0,043	0,70 ± 0,036	1,04 ± 0,096	1,20 ± 0,043	0,92 ± 0,020
30	0,57 ± 0,053	0,57 ± 0,026	0,73 ± 0,036	1,08 ± 0,026	1,20 ± 0,030	1,03 ± 0,070
45	0,57 ± 0,006	0,59 ± 0,017	0,69 ± 0,006	1,10 ± 0,006	0,90 ± 0,010	0,79 ± 0,010
60	0,51 ± 0,023	0,50 ± 0,010	0,65 ± 0,010	0,95 ± 0,026	0,85 ± 0,023	0,82 ± 0,020
75	0,60 ± 0,033	0,60 ± 0,040	0,90 ± 0,043	1,10 ± 0,070	1,30 ± 0,050	1,20 ± 0,030
90	0,54 ± 0,006	0,65 ± 0,060	0,70 ± 0,036	1,00 ± 0,050	1,20 ± 0,050	0,90 ± 0,030
45	0,56 ± 0,040	0,66 ± 0,046	0,70 ± 0,020	1,10 ± 0,130	1,30 ± 0,080	0,95 ± 0,030
60	0,59 ± 0,036	0,66 ± 0,053	0,80 ± 0,026	1,13 ± 0,090	1,40 ± 0,110	1,10 ± 0,140
75	0,63 ± 0,040	0,66 ± 0,026	0,87 ± 0,046	1,17 ± 0,026	1,40 ± 0,050	1,20 ± 0,090
90	0,73 ± 0,053	0,66 ± 0,046	0,96 ± 0,036	1,24 ± 0,110	1,50 ± 0,160	1,30 ± 0,170



CUADRO XIII SERIE II acuosa-TEMPERATURA:25°C (n=6)

Figura 28

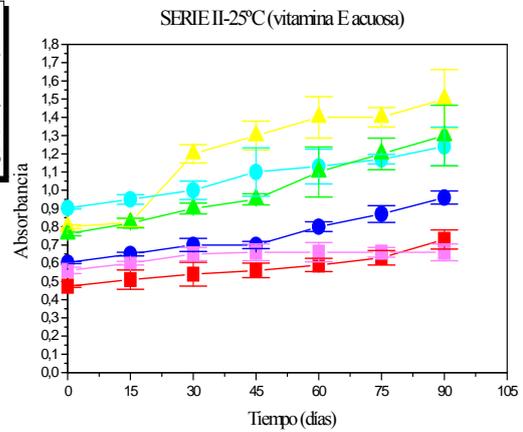


Figura 29

CUADRO XIV SERIE III-TEMPERATURA:4°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,33 ± 0,006	0,35 ± 0,006	0,45 ± 0,043	0,66 ± 0,026	0,78 ± 0,060	0,83 ± 0,006
15	0,42 ± 0,021	0,35 ± 0,015	0,54 ± 0,045	0,66 ± 0,030	0,80 ± 0,062	0,85 ± 0,021
30	0,42 ± 0,010	0,35 ± 0,006	0,56 ± 0,036	0,69 ± 0,026	0,81 ± 0,017	0,85 ± 0,011
45	0,43 ± 0,030	0,35 ± 0,025	0,563 ± 0,006	0,69 ± 0,036	0,83 ± 0,030	0,88 ± 0,036
60	0,45 ± 0,020	0,36 ± 0,040	0,57 ± 0,017	0,70 ± 0,021	0,83 ± 0,036	0,92 ± 0,061
75	0,45 ± 0,035	0,36 ± 0,036	0,58 ± 0,025	0,80 ± 0,030	0,88 ± 0,062	0,95 ± 0,036
90	0,50 ± 0,049	0,36 ± 0,053	0,61 ± 0,092	0,80 ± 0,060	0,93 ± 0,053	0,98 ± 0,072

CUADRO XV SERIE III-TEMPERATURA:25°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,34 ± 0,029	0,37 ± 0,040	0,50 ± 0,056	0,70 ± 0,006	0,78 ± 0,006	0,83 ± 0,000
15	0,45 ± 0,020	0,40 ± 0,010	0,56 ± 0,010	0,75 ± 0,030	0,80 ± 0,020	0,87 ± 0,017
30	0,45 ± 0,017	0,43 ± 0,017	0,56 ± 0,017	0,80 ± 0,026	0,82 ± 0,010	0,90 ± 0,046
45	0,53 ± 0,050	0,45 ± 0,056	0,58 ± 0,030	0,82 ± 0,026	0,84 ± 0,036	0,95 ± 0,015
60	0,55 ± 0,046	0,49 ± 0,082	0,58 ± 0,021	0,84 ± 0,026	0,84 ± 0,030	0,97 ± 0,104
75	0,56 ± 0,035	0,58 ± 0,029	0,61 ± 0,087	0,84 ± 0,043	0,90 ± 0,056	0,98 ± 0,065
90	0,60 ± 0,052	0,62 ± 0,092	0,67 ± 0,050	0,85 ± 0,061	0,98 ± 0,046	1,20 ± 0,191

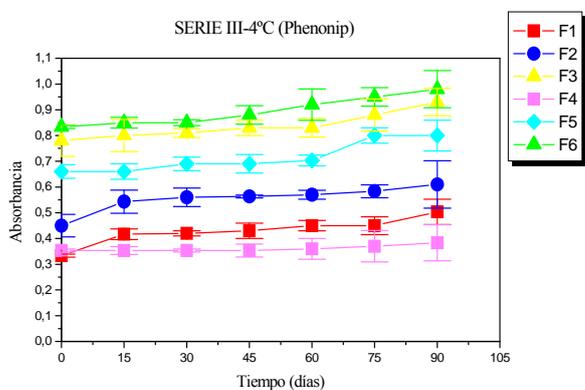


Figura 30

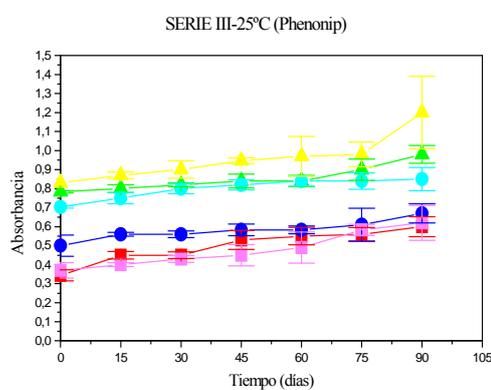


Figura 31

CUADRO XVI SERIE IV-TEMPERATURA:4°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,22 ± 0,006	0,31 ± 0,017	0,46 ± 0,020	0,27 ± 0,006	0,76 ± 0,026	0,65 ± 0,040
15	0,38 ± 0,006	0,31 ± 0,017	0,48 ± 0,017	0,27 ± 0,006	0,77 ± 0,036	0,65 ± 0,053
30	0,38 ± 0,015	0,33 ± 0,026	0,49 ± 0,017	0,28 ± 0,000	0,78 ± 0,020	0,67 ± 0,026
45	0,40 ± 0,021	0,36 ± 0,036	0,50 ± 0,020	0,31 ± 0,006	0,78 ± 0,006	0,67 ± 0,026
60	0,41 ± 0,066	0,39 ± 0,026	0,50 ± 0,010	0,33 ± 0,056	0,84 ± 0,020	0,68 ± 0,042
75	0,43 ± 0,061	0,40 ± 0,036	0,50 ± 0,030	0,37 ± 0,069	0,84 ± 0,036	0,71 ± 0,030
90	0,43 ± 0,035	0,40 ± 0,043	0,57 ± 0,052	0,40 ± 0,050	0,89 ± 0,036	0,77 ± 0,100

CUADRO XVII SERIE IV-TEMPERATURA:25°C (n=6)

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Días	Media ± Desviación Estándar					
0	0,23 ± 0,026	0,32 ± 0,020	0,55 ± 0,006	0,28 ± 0,006	0,78 ± 0,020	0,693 ± 0,011
15	0,38 ± 0,006	0,34 ± 0,010	0,55 ± 0,046	0,28 ± 0,006	0,78 ± 0,026	0,70 ± 0,015
30	0,40 ± 0,015	0,36 ± 0,006	0,56 ± 0,035	0,28 ± 0,000	0,78 ± 0,026	0,75 ± 0,040
45	0,44 ± 0,036	0,36 ± 0,030	0,57 ± 0,035	0,37 ± 0,075	0,78 ± 0,036	0,75 ± 0,036
60	0,57 ± 0,043	0,40 ± 0,030	0,64 ± 0,040	0,39 ± 0,040	0,85 ± 0,017	0,78 ± 0,036
75	0,60 ± 0,053	0,41 ± 0,036	0,64 ± 0,050	0,41 ± 0,034	0,85 ± 0,043	0,78 ± 0,043
90	0,60 ± 0,060	0,41 ± 0,035	0,64 ± 0,053	0,69 ± 0,147	0,97 ± 0,087	0,84 ± 0,092

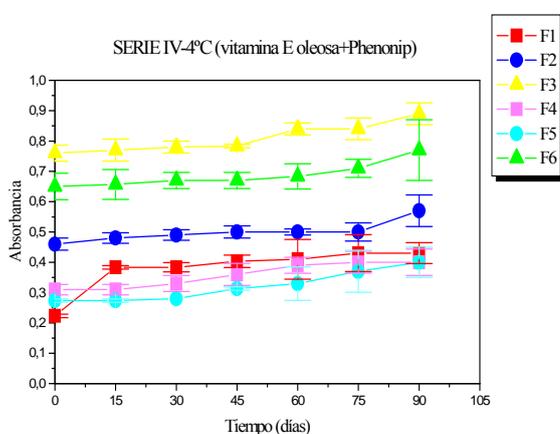


Figura 32

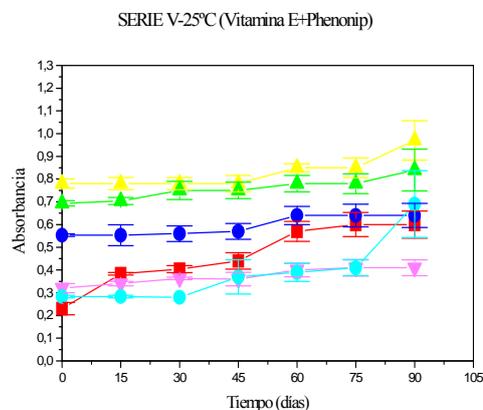


Figura 33

A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calcula el porcentaje de fármaco libre en el medio y el captado por los liposomas. Comparando los datos de captación evaluados al comienzo del estudio (día 0) con los obtenidos en días sucesivos, se determina el porcentaje de fármaco perdido a lo largo del tiempo.

Analizando los valores de acetónido de triamcinolona captado por los liposomas de fosfatidilcolina recién elaborados (día 0), todos han resultado elevados o incluso muy

elevados, dependiendo de la serie y de la concentración de fosfolípido. Dichos datos se encuentran entre el 90.74% y el 48.47% de captación.

CUADRO XVIII SERIE I

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre											
0	90.74	90.3	89.85	88.07	83.83	82.50	81.50	78.39	72.31	67.00	64.60	63.73
	9.26	9.70	10.15	11.93	16.17	17.50	18.50	21.61	27.69	33.00	35.40	36.27
15	85.86	84.53	89.85	87.18	81.17	79.40	81.05	77.95	63.90	61.22	63.73	63.29
	14.14	15.47	10.15	12.82	18.83	20.60	18.95	22.05	36.10	38.78	36.27	36.71
30	85.86	84.53	89.85	86.74	81.17	79.40	80.60	77.95	63.90	60.78	63.29	62.84
	14.14	15.47	10.15	13.26	18.83	20.60	19.40	22.05	36.10	39.22	36.71	37.16
45	85.86	83.20	89.85	85.85	81.17	77.18	80.60	77.50	63.44	60.78	62.40	59.30
	14.14	16.80	10.15	14.15	18.83	22.82	19.40	22.50	36.56	39.22	37.60	40.70
60	84.09	78.77	88.96	85.85	79.40	76.79	80.60	77.50	62.11	59.45	61.07	53.97
	15.91	21.23	11.04	14.15	20.60	23.26	19.40	22.50	37.89	40.55	38.93	46.03
75	84.09	74.78	88.96	85.85	77.62	76.30	78.83	77.50	61.67	59.45	59.30	53.97
	15.91	25.22	11.04	14.15	22.38	23.71	21.17	22.50	38.33	40.55	40.70	46.03
90	69.02	68.57	86.3	83.19	74.52	71.41	73.07	69.52	61.67	55.46	57.08	55.53
	30.98	31.43	13.7	16.81	25.48	28.59	26.93	30.48	38.33	44.54	42.92	46.47

CUADRO XIX SERIE II oleosa

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre											
0	83.42	83.12	73.52	73.52	73.52	71.13	65.93	65.49	62.54	58.99	59.74	58.40
	16.88	16.88	26.48	26.48	26.48	28.87	34.07	34.51	37.46	41.01	40.26	41.60
15	82.23	81.35	73.52	72.19	72.19	68.02	65.93	65.04	61.65	58.10	57.96	57.52
	17.77	18.65	26.48	27.81	27.81	31.98	34.07	34.96	38.35	41.90	42.04	42.48
30	81.79	81.35	72.63	72.19	72.19	66.25	65.49	63.71	56.33	55.00	57.08	55.75
	18.21	18.65	27.36	27.81	27.81	33.75	34.51	36.29	43.67	45.00	42.92	44.25
45	81.35	80.90	72.63	71.30	71.30	66.25	65.04	62.83	53.66	51.45	56.19	53.97
	18.65	19.10	27.36	28.70	28.70	33.75	34.96	37.17	46.33	48.55	43.81	46.23
60	81.35	80.46	72.19	71.30	71.30	66.25	62.38	62.38	47.01	44.80	53.97	52.20
	18.65	19.54	27.81	28.70	28.70	33.75	37.62	37.62	52.99	55.20	46.23	47.80
75	80.90	80.02	72.19	71.30	71.30	66.25	61.49	61.05	44.80	44.80	50.87	47.32
	19.10	19.98	27.81	28.70	28.70	33.75	38.50	38.95	55.20	55.20	49.13	52.68
90	75.14	72.03	72.19	71.30	71.30	60.04	61.49	60.61	42.58	38.59	46.00	41.56
	24.86	27.97	27.81	28.70	28.70	39.96	38.50	39.39	57.42	61.41	54.00	58.44

CUADRO XX SERIE II acuosa

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre											
0	71.02	70.13	65.74	65.74	67.97	67.97	54.26	54.26	59.50	59.50	49.35	48.47
	28.98	29.87	34.26	34.26	32.03	32.03	45.74	45.74	40.50	40.50	50.65	51.53
15	70.57	68.35	65.74	63.97	66.63	65.75	54.26	51.60	59.50	58.61	47.14	45.81
	29.43	31.64	34.02 6	36.03	33.37	34.25	45.74	48.40	40.50	41.39	52.86	54.19
30	69.69	67.02	65.74	61.75	63.97	63.53	49.83	49.83	46.19	41.76	44.48	42.26
	30.31	32.98	34.26	38.25	36.03	36.47	50.17	50.17	53.81	58.24	55.52	57.74
45	68.80	66.14	65.30	61.30	63.53	63.53	48.05	45.40	41.76	37.32	41.37	40.04
	31.20	33.86	34.70	38.70	36.47	36.47	51.95	54.60	58.24	62.68	58.63	59.96
60	66.58	64.81	65.30	61.30	62.20	59.10	46.28	44.06	41.76	32.88	36.50	33.39
	33.42	35.19	34.70	38.70	37.80	40.90	53.72	55.94	58.24	67.12	63.50	66.61
75	64.36	63.03	65.30	61.30	61.31	56.00	45.40	42.29	39.54	32.88	33.39	28.96
	35.63	36.97	34.70	38.70	38.69	44.00	54.60	57.71	60.46	67.12	66.61	71.04
90	61.70	58.59	63.97	61.30	54.66	52.00	45.40	39.18	37.32	28.45	28.96	24.52
	38.30	41.41	36.03	38.70	45.34	48.00	54.60	60.82	62.68	71.55	71.04	75.48

CUADRO XXI SERIE III

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre											
0	85.46	85.01	83.69	82.80	78.08	75.86	70.87	69.10	65.38	65.38	63.18	63.18
	14.54	14.99	16.31	17.20	21.92	24.14	29.13	30.90	34.62	34.62	36.82	36.82
15	81.47	80.13	83.69	81.47	74.08	73.20	70.87	66.90	64.50	64.50	62.30	61.41
	18.53	19.87	16.31	18.53	25.92	26.80	29.13	33.10	35.50	35.50	37.70	38.59
30	81.47	80.13	83.69	80.14	73.20	73.20	69.50	64.67	64.05	63.61	62.30	60.08
	18.53	19.87	16.31	19.86	26.80	26.80	30.50	35.33	35.95	36.39	37.70	39.92
45	81.02	76.59	83.69	79.25	73.20	72.31	69.50	63.78	63.16	62.72	60.97	60.08
	18.98	23.41	16.31	20.75	26.80	27.69	30.50	36.22	36.84	37.28	39.03	39.02
60	80.13	75.70	83.25	77.48	73.14	72.31	69.10	62.90	63.16	62.72	59.20	56.98
	19.87	24.30	16.75	22.52	26.86	27.69	30.90	37.10	36.84	37.28	40.80	43.02
75	80.13	75.26	82.80	73.49	72.31	70.98	64.67	62.90	60.95	60.06	58.01	56.68
	19.87	24.74	17.20	26.51	27.69	29.02	35.33	37.10	39.05	39.94	41.99	43.32
90	77.92	73.48	82.36	71.71	70.98	68.32	64.67	62.45	58.73	56.51	56.68	46.78
	22.08	26.52	17.64	28.28	29.02	31.68	35.33	37.55	41.27	43.49	43.32	53.22

CUADRO XXII SERIE IV

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT Captado/Libre											
0	89.11	88.67	86.28	85.83	87.76	87.31	79.47	75.48	66.29	65.40	71.15	69.37
	10.89	11.33	13.72	14.17	12.24	12.69	20.53	24.52	33.71	35.60	28.85	30.63
15	88.02	88.02	86.28	84.94	87.76	87.31	78.59	75.48	65.85	65.40	71.15	68.93
	11.98	11.98	13.72	15.06	12.24	12.69	21.41	24.52	34.15	35.60	28.85	31.07
30	88.02	81.13	85.39	84.06	87.31	87.31	78.14	75.04	65.40	65.40	70.26	66.71
	11.98	18.87	14.61	15.94	12.69	12.69	21.86	24.96	35.60	35.60	29.74	33.29
45	81.13	79.36	84.06	84.06	85.98	82.44	77.70	74.60	65.40	65.40	70.26	66.71
	18.87	20.64	15.94	15.94	14.02	17.56	22.30	25.40	35.60	35.60	29.74	33.29
60	80.69	73.60	82.73	82.28	85.10	83.32	77.70	71.50	62.74	62.30	69.82	65.38
	19.31	26.40	17.27	17.71	14.90	16.68	22.30	28.50	37.26	37.70	30.18	34.62
75	79.80	72.26	82.28	81.84	83.32	81.55	77.30	71.50	62.74	62.30	68.49	65.38
	20.20	27.74	17.71	18.16	16.68	18.45	22.30	28.50	37.26	37.70	31.51	34.62
90	79.80	70.49	82.28	81.83	82.00	77.56	74.60	69.27	60.52	56.98	65.82	62.72
	20.20	29.51	17.71	18.16	18.00	22.44	25.40	30.73	39.48	43.02	34.18	37.28

Los datos anteriores, ordenados por series de mayor a menor captación, se resumen en el siguiente cuadro:

CUADRO XXIII

SERIE Formula	I	IV	III	II oleosa	II acuosa
4°C/25°C					
F1	90.74/90.3	89.11/88.67	85.46/85.01	83.42/83.12	71.02/70.13
F2	83.83/82.50	87.76/87.31	78.08/75.86	73.52/71.13	67.97/67.17
F3	72.31/67.00	66.29/65.40	65.38/65.38	62.54/58.99	59.50/59.50

Analizando los valores de acetónido de triamcinolona captado por los liposomas de fosfatidilcolina recién elaborados (día 0), todos han resultado elevados o incluso muy elevados, dependiendo de la serie y de la concentración de fosfolípido. Dichos datos se encuentran entre el 90.74% y el 48.47% de captación. Todas las fórmulas ensayadas para cada serie en el día 0 han resultado estadísticamente diferentes.

Al igual que en el estudio de encapsulación previo, la fórmula 1 sigue siendo la que aporta mayor captación de principio activo y, por tanto, mejor rendimiento económico que el resto (fórmulas 2 y 3).

La adición de un 50% de colesterol con respecto a la concentración de fosfatidilcolina provoca una disminución variable de la tasa inicial de encapsulación, constatándose diferencias significativas entre las fórmulas con colesterol y las mismas pero sin la inclusión

de éste. Estas diferencias atañen tanto al día 0, aspecto que se refleja en el % captado, como al día 90, mostrado en el % perdido y, por tanto, en la estabilidad de la fórmula. En las primeras 24 horas resaltan las fórmulas 1,4 (series I y III) y 3,6 (series II oleosa, II acuosa y III). A pesar de la similitud en el porcentaje de AT captado a las 24 horas tras la elaboración de los liposomas la presencia de colesterol en las fórmulas 4 y 6 las capacita para retener mayor cantidad de AT tras 90 días, hecho que se ratifica con diferencias estadísticamente significativas.

CUADRO XXIV

Fórmulas	F4 respecto F1	F5 respecto F2	F3 respecto F6
Serie I	0.89%/2.23%	2.33%/4.11%	7.71%/3.27%
Serie IIoleosa	9.6%/9.6%	6.08%/5.64%	2.80%/0.59%
Serie IIacuosa	5.28%/4.39%	13.71%/13.71%	10.15%/11.03%
Serie III	1.77%/2.21%	7.21%/6.76%	2.20%/2.20%
Serie IV	2.83%/2.84%	8.29%/11.83%	4.86%/3.97%

A pesar del descenso en la encapsulación del corticoide, esta sigue siendo elevada sobre todo para las fórmulas 4 (máximo valor) de las diferentes series; y oscilan entre el 89.85% en la serie I seguida por las series IV, III y II oleosa hasta un 65.74% para la II acuosa. La formula 6 es la que menos encapsula en todos los casos.

También en estas fórmulas con colesterol, el porcentaje captado disminuye a medida que aumenta la concentración de fosfatidilcolina.

Los valores máximo y mínimo de porcentaje captado, se repiten en todas las series, siendo estos los de las fórmulas 1 y 6, respectivamente (con diferencias significativas comprobadas en todas las series).

Los valores de captación iniciales sirven de base para evaluar la estabilidad a lo largo del tiempo. Cada 15 días, durante los 3 meses de estudio, se ha calculado el porcentaje de corticoide captado por los diferentes liposomas elaborados. Por diferencia entre el tanto por ciento captado en el día 0 y el evaluado en día sucesivos, se determina el porcentaje de agente liberado o perdido por las vesículas lipídicas. Las medias aritméticas de dichos valores se recopilan en los cuadros XXV a XXIX, para cada fórmula, serie y temperatura ensayada.

CUADRO XXV-SERIE I

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT perdido											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	4.88	5.77	0	0.89	2.66	3.10	0.45	0.44	8.41	5.78	0.87	0.44
30	4.88	5.77	0	1.33	2.66	3.10	0.9	0.44	8.41	6.22	1.31	0.89
45	4.88	7.1	0	2.22	2.66	5.32	0.9	0.89	8.87	6.22	2.2	4.43
60	6.65	11.53	0.89	2.22	4.43	5.77	0.9	0.89	10.2	7.55	3.53	8.2
75	6.65	15.52	0.89	2.22	6.21	6.2	2.67	0.89	10.64	7.55	5.3	9.76
90	21.72	21.73	3.55	4.88	9.31	11.09	8.43	8.87	10.64	11.54	7.52	9.76

CUADRO XXVI-SERIE II oleosa

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT perdido											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.89	1.77	0	1.33	2.21	3.11	0	0.45	0.89	0.89	1.78	0.88
30	1.33	1.77	0.89	1.33	3.54	4.88	0.44	1.78	6.21	3.99	2.66	2.65
45	1.77	2.22	0.89	2.22	3.54	4.88	0.89	2.66	8.88	7.54	3.55	4.43
60	1.77	2.66	1.33	2.22	4.43	4.88	3.55	3.11	15.53	14.19	5.77	6.2
75	2.22	3.1	1.33	2.22	5.32	4.88	4.44	4.44	17.74	14.19	8.87	11.08
90	7.98	11.09	1.33	2.22	6.65	11.09	4.44	4.88	19.96	20.4	13.74	16.84

CUADRO XXVII-SERIE II acuosa

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT perdido											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.45	1.78	0	1.77	1.34	2.22	0	2.66	0	0.89	2.21	2.66
30	1.33	3.11	0	3.99	4	4.44	4.43	4.43	13.31	17.74	4.87	6.21
45	2.22	3.99	0.44	4.44	4.44	4.44	6.21	8.86	17.74	22.18	7.98	8.43
60	4.44	5.32	0.44	4.44	5.77	8.87	7.98	10.2	17.74	26.62	12.85	15.08
75	6.66	7.1	0.44	4.44	6.66	11.97	8.86	11.97	19.96	26.62	15.96	19.5
90	9.32	11.8	1.77	4.44	13.31	15.97	8.86	15.08	22.18	31.05	20.39	23.95

CUADRO XXVIII-SERIE III

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT perdido											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	3.99	4.88	0	1.33	4	2.66	0	2.2	0.88	0.88	0.88	1.77
30	3.99	4.88	0	2.66	4.88	2.66	1.37	4.43	1.33	1.77	0.88	3.1
45	4.44	8.42	0	3.55	4.88	3.55	1.37	5.32	2.22	2.66	2.21	3.1
60	5.33	9.31	0	5.32	4.94	3.55	1.77	6.2	2.22	2.66	3.98	6.2
75	5.33	9.75	0.44	5.32	5.77	4.88	6.2	6.2	4.43	5.32	5.17	6.5
90	7.54	11.53	1.33	5.32	7.1	7.54	6.2	6.65	6.65	8.87	6.5	16.4

CUADRO XXIX-SERIE IV

FORMULA	1		4		2		5		3		6	
Temperatura	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
Días	% AT perdido											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1.09	0.65	0	0.89	0	0	0.88	0	0.44	0	0	0.44
30	1.09	7.54	0.89	1.77	0.45	0	1.33	0.44	0.89	0	0.89	2.66
45	7.98	9.31	2.22	1.77	1.78	3.99	1.77	0.88	0.89	0	0.89	2.66
60	8.42	15.07	3.55	3.55	2.66	4.87	1.77	3.98	3.55	3.1	1.33	3.99
75	9.31	16.41	4	4	4.44	5.76	1.77	3.98	3.55	3.1	2.66	3.99
90	9.31	18.18	4	4	5.76	9.75	4.87	6.21	5.77	8.42	5.33	6.65

Las figuras 34 a 63 representan comparativamente los porcentajes de agente liberado o perdido por las vesículas lipídicas, a lo largo de los 90 días de estudio, tras su conservación a

temperatura ambiente (20-25°C) y a temperatura de refrigeración (4°C), para cada serie elaborada. Las figuras 64 a 68 resumen las seis fórmulas para cada serie.

SERIE I

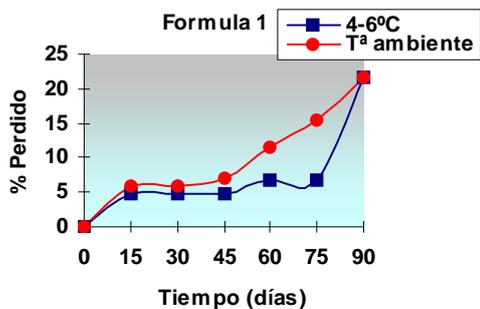


Figura 34

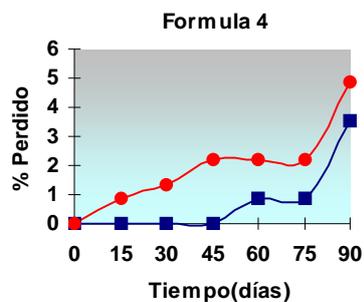


Figura 35

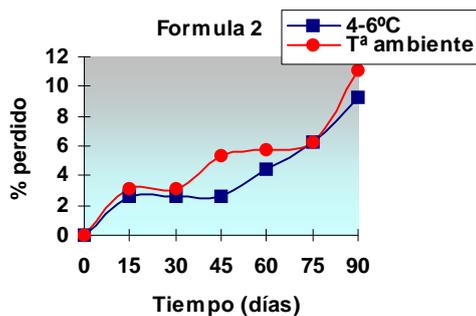


Figura 36

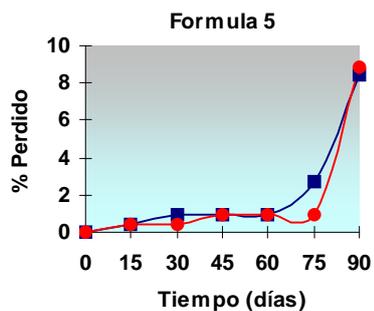


Figura 37

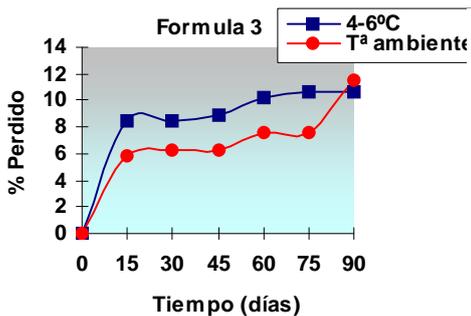


Figura 38

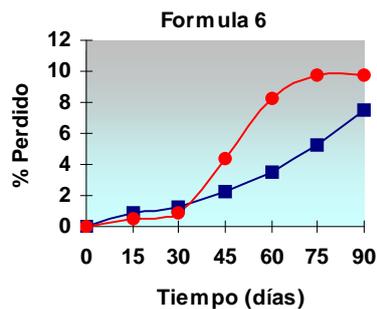


Figura 39

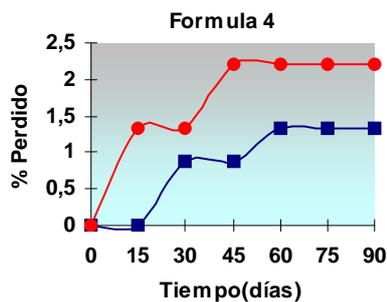
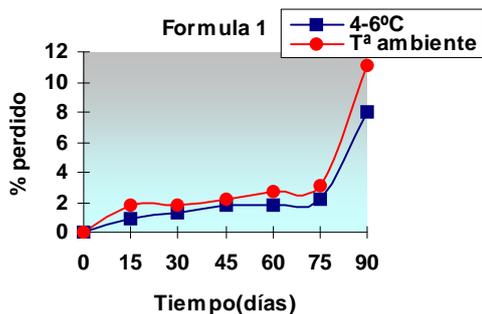


Figura 40
 Figura 42
 Figura 44

Figura 41
 Figura 43
 Figura 45

SERIE II Acuosa

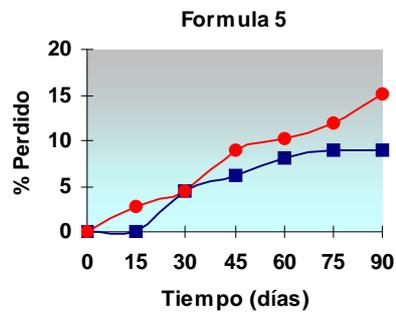
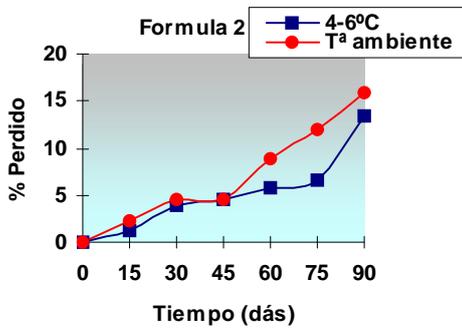
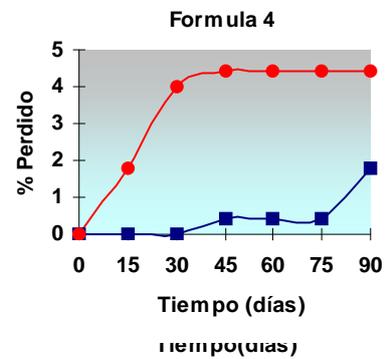
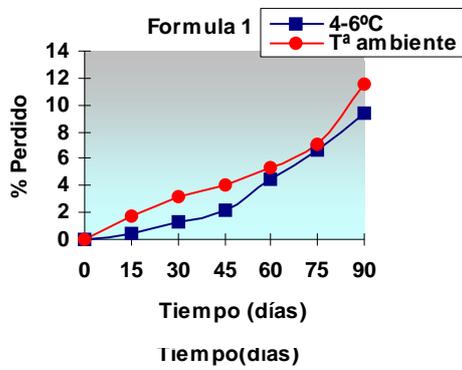
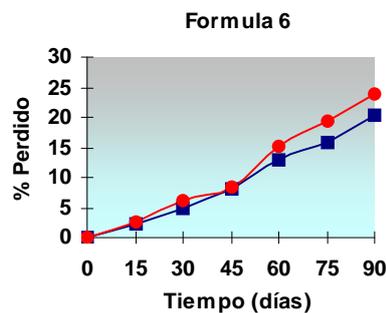
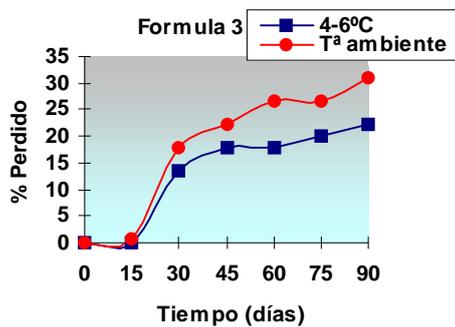


Figura 46
 Figura 48
 Figura 50

Figura 47
 Figura 49
 Figura 51



SERIE III

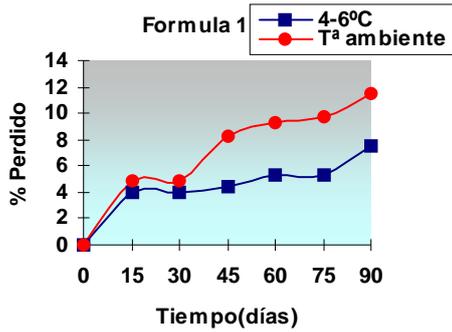


Figura 52

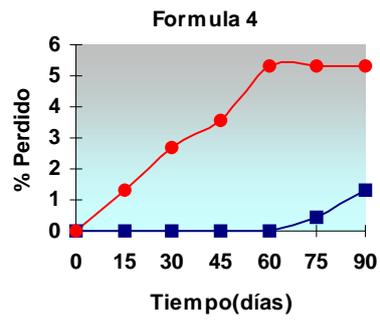


Figura 53

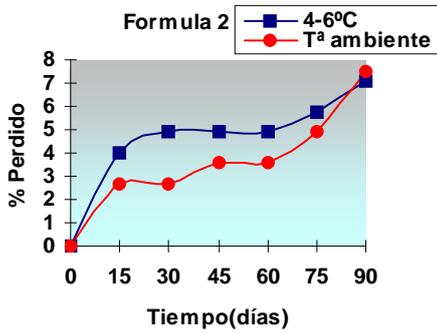


Figura 54

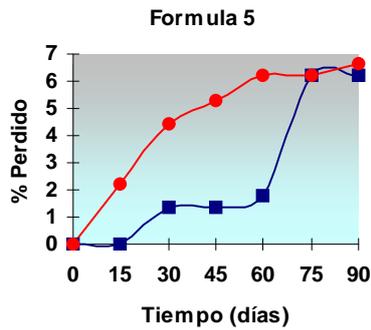


Figura 55

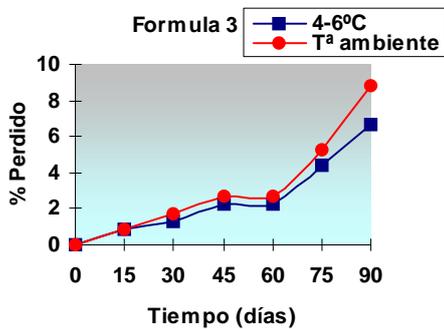


Figura 56

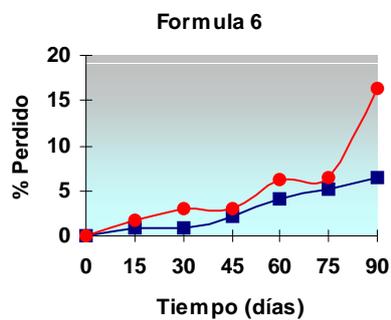


Figura 57

SERIE IV

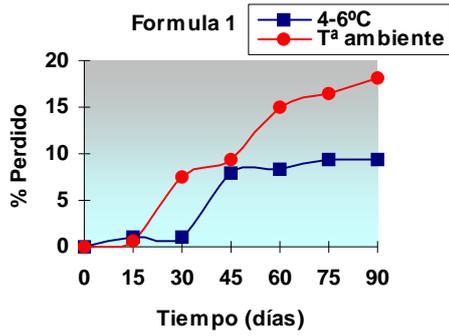


Figura 58

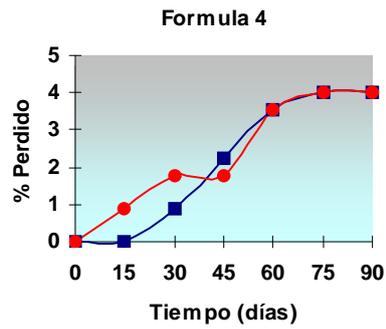


Figura 59

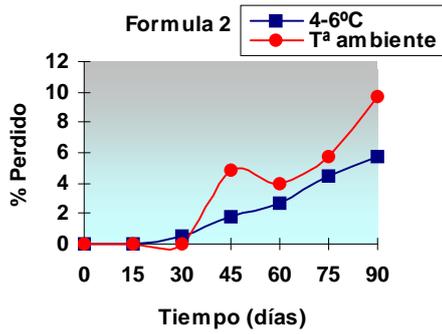


Figura 60

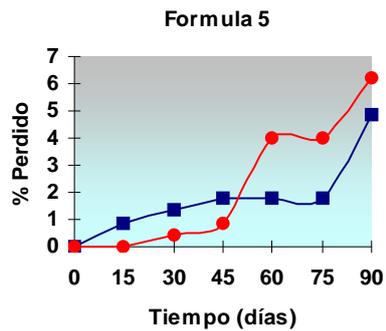


Figura 61

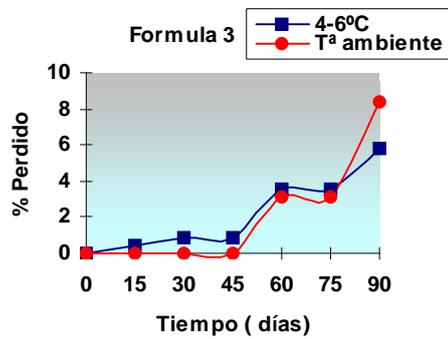


Figura 62

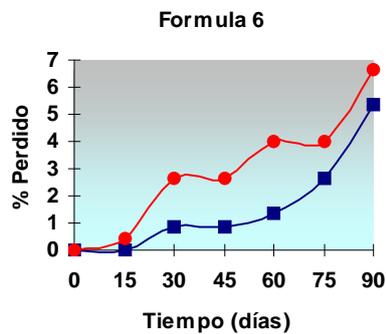


Figura 63

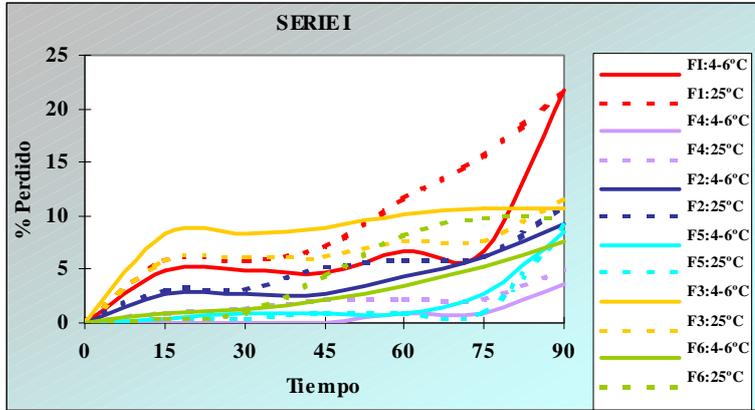


Figura 64

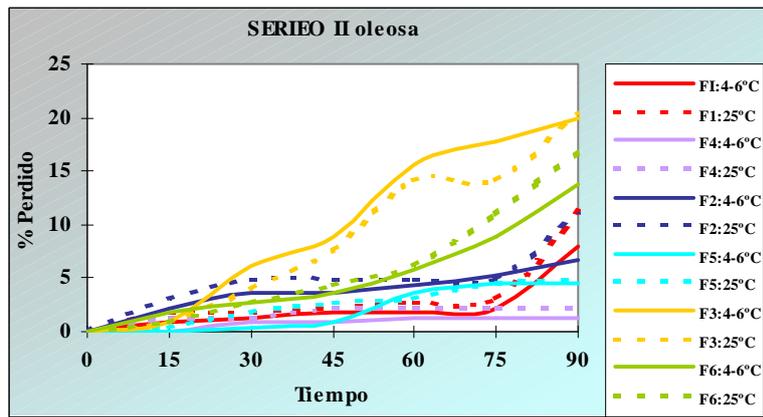


Figura 65

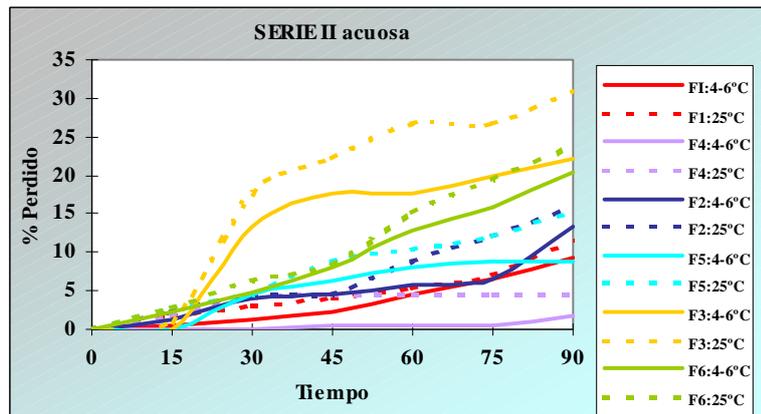


Figura 66

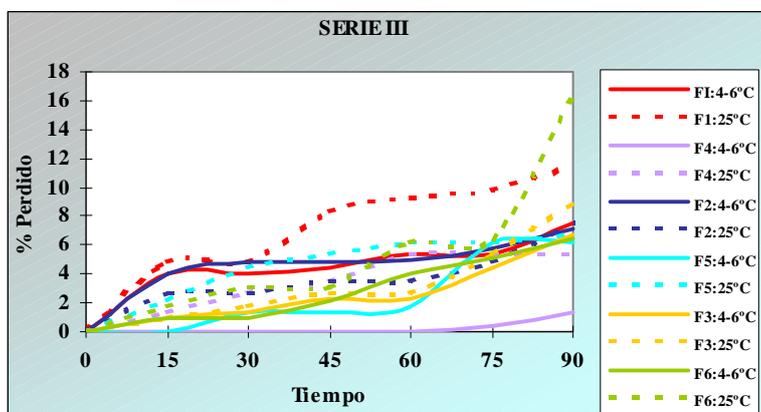


Figura 67

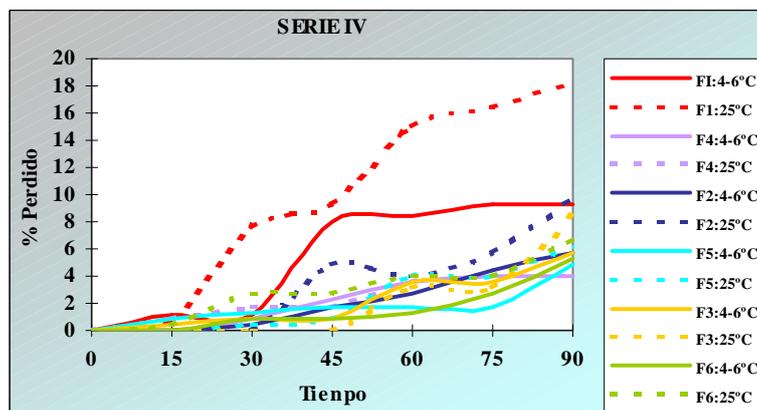


Figura 68

2.2.2.- Discusión

En base a los datos aportados por este estudio de estabilidad, las muestras conservadas a temperatura inferior a la ambiente (4-6°C) han experimentado de forma general, una pérdida o fuga estadísticamente significativa menor del agente captado inicialmente por las vesículas lipídicas, a lo largo del periodo de estudio (90 días). Dicha reducción en el porcentaje de acetónido de triamcinolona perdido se ha constatado en las seis formulaciones ensayadas de las cinco series (figuras 34 a 63), tras comparar los valores experimentales de agente

encapsulado y perdido, evaluados a temperatura de refrigeración y a temperatura ambiente. No obstante hemos de puntualizar las excepciones siguientes para la fórmula 2: 0 y 30 días (Series I, II oleosa, II acuosa y III), 60 y 90 días (series I y III), y 60 días (serie II acuosa). De cualquier forma es lógico pensar que en el día 0 no existan diferencias significativas ya que la influencia de la temperatura no se hará notar hasta transcurridos 15 días, a partir de los cuales si aparecen diferencias estadísticamente significativas.

De lo anterior se deduce la influencia de la temperatura de conservación sobre la estabilidad del sistema, de tal manera que los liposomas mantenidos a baja temperatura (4-6°C) poseen una estabilidad mayor, con menor difusión prematura del principio activo a través de la pared.

Analizando la influencia de los componentes básicos del sistema (lípidos y colesterol) sobre la estabilidad indican en primer lugar, que las fórmulas elaboradas con mayor concentración de fosfolípido (fórmulas 3 y 6) han presentado una cantidad más elevada de principio activo libre al final del estudio, para las temperaturas y series ensayadas.

Asimismo, se han observado diferencias debidas a la presencia o no de colesterol. Las fórmulas elaboradas con dicho esterol (fórmulas 4, 5 y 6) pierden menor cantidad de agente captado a lo largo de los tres meses de estudio, en comparación con aquellas que no lo incorporan a su formulación (fórmulas 1, 2 y 3, respectivamente). Estas apreciaciones se repiten en todos los casos tanto a temperatura ambiente, como a temperatura de refrigeración. Los únicos datos que no revelaron diferencias estadísticamente significativas se reducen a los correspondientes a 90 días para las fórmulas 2 y 5 de la serie I a 4°C,

Resulta relevante destacar la formulación número 4 constituida por PC:CH:AT en relación molar 1:0.5:1. Conservada en frío, mantiene retenido el principio activo durante 15 días (series II oleosa y IV), 30 días (serie II acuosa), 45 días (serie I) y 60 días (serie III), con pérdidas

hasta ese momento del 0%. A temperatura de 25°C, se ha retenido siempre hasta el día 15.
A

los 90 días y a temperatura de refrigeración, los porcentajes de corticoide perdidos por dicha fórmula han oscilado entre el 1.33% para la serie III (figura 53) y el 4,44% para la serie II oleosa (figura 41), inferiores a los constatados para el resto de las fórmulas elaboradas.

Estos resultados serían consecuencia del papel desarrollado por el colesterol sobre la permeabilidad de las bicapas lipídicas. Su incorporación al sistema parece ser que reduce la formación de poros en las membranas liposomiales y, por tanto, la liberación prematura del principio activo (VIRTANEN, 1995).

Su efecto se traduciría en un descenso de la permeabilidad de los fármacos a través de la bicapa, ya que posee efectos herméticos (Mc MULLEN y cols., 1993).

Como se ha indicado, se han elaborado diferentes series de muestras con antioxidante y/o conservador, al objeto de constatar su posible influencia sobre la estabilidad del sistema. En concreto, se han diseñado dos series de muestras que incorporan en su composición, además de los componentes básicos, un antioxidante (vitamina E). La serie II oleosa (figuras 40 a 45) está elaborada con vitamina E en estado oleoso, la cual se adiciona durante la preparación a la fase orgánica (VEMURI y RODEES, 1995). Por el contrario, la serie II acuosa (figuras 46 a 51) está constituida por vitamina E en solución acuosa coloidal e incorporada a la fase acuosa del sistema liposomal.

Las fórmulas correspondientes a la serie II oleosa presentan un porcentaje de agente encapsulado en el día 0 sensiblemente superior al determinado por la serie II acuosa (cuadro XIX). Igualmente, las pérdidas observadas durante el periodo de estudio han resultado inferiores en las muestras que incorporan vitamina E liposoluble. Estas diferencias se aprecian especialmente en las formulaciones 3, 5 y 6 (figuras 40 a 45). Resumiendo, se considera más adecuado el empleo de este antioxidante en solución oleosa, al resultar las fórmulas con mayor

grado de captación y mayor estabilidad, en líneas generales, que las elaboradas con vitamina E en solución acuosa. Por todos estos motivos, se ha estimado conveniente combinar la vitamina E liposoluble con el conservador (Phenonip®) para la elaboración de la serie IV.

Las seis fórmulas de la serie IV han sido comparadas con sus respectivas del resto de las series resultando todas diferentes a excepción de la fórmula 3 de la serie III con idéntica de la serie IV.

Los datos aportados por esta última serie manifiestan un grado de captación en el día 0 superior al observado para las muestras solo con antioxidante (serie II oleosa) o solo con conservador (serie III), y similar a la serie I (cuadro XVIII).

Asimismo, finalizando el periodo de ensayo, los valores de porcentaje de corticoide perdido por los liposomas han resultado similares, en algunos casos, para las series II oleosa, III y IV, e inferiores a los detectados para las muestras sin conservador, ni antioxidante (serie I). Incluso las muestras correspondientes a las fórmulas 3 y 6 elaboradas con vitamina E y Phenonip® (serie IV) manifestaron una liberación de agente retenido menor a la constatada para las otras series.

Estos datos revelan un incremento de la estabilidad del sistema tras la adición de conservador y antioxidante, y almacenamiento a temperatura de refrigeración (4-6°C) en ausencia de la luz, así como un adecuado grado de captación de corticoide por parte de los liposomas así diseñados.

2.3.- CARACTERIZACION

2.3.1.- Microscopía electrónica de transmisión

Se han caracterizado los liposomas estudiados mediante microscopía electrónica de transmisión, al objeto de obtener información sobre su estructura, dimensiones y grado de agregación.

Las figuras 69 a 99 son un ejemplo representativo de la misma y corresponden a suspensiones de vesículas lipídicas portadoras de acetónido de triamcinolona teñidas con acetato de uranilo al 2% (tinción negativa).

En los cuadros XXX a XXXIV, se incluyen los valores medios de tamaño de partícula (μm) evaluados para las seis formulaciones ensayadas y las cinco series diseñadas, acompañados de sus respectivas desviaciones estándar. Los diámetros han sido determinados, en el momento de la elaboración y transcurridos 30, 60 y 90 días de la misma, al objeto de comprobar la influencia del paso del tiempo en las dimensiones de estos vectores. El número de medidas efectuadas han sido de 100 por fórmula, serie y por periodo de tiempo. Las muestras se han conservado a temperatura de refrigeración (4-6°C) y protegidas de la luz hasta el momento de la caracterización. No obstante, también se han caracterizado muestras mantenidas a temperatura ambiente (20-25°C), a los 90 días de su preparación, y correspondientes a las series I (sin antioxidante, ni conservador) y II acuosa (con vitamina E en solución acuosa).

CUADRO XXX SERIE I

FORMULA	1	4	2	5	3	6	
Tiempo	Tamaño de partícula medio ± Desviación Estándar						
0	0.45±0.13	0.42±0.31	0.19±0.17	0.57±0.13	0.6±0.17	0.46±0.08	
30	0.53±0.17	0.46±0.14	0.24±0.26	0.77±0.31	0.99±0.35	0.69±0.14	
60	0.35±0.14	0.17±0.06	0.25±0.04	0.23±0.09	0.57±0.27	0.37±0.14	
Temperatura							
90	4°C	0.88±0.33	0.52±0.16	0.38±0.16	0.66±0.2	0.24±0.14	0.71±0.62
	25°C	1.06±0.53	0.73±0.28	0.81±0.23	0.77±0.27	0.12±0.05	1.07±0.45

CUADRO XXXI SERIE II oleosa

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Tiempo	Tamaño de partícula medio ± Desviación Estándar					
0	0.078±0.02	0.023±0.01 2	0.14±0.07	0.24±0.15	0.25±0.13	0.39±0.27
30	0.24±0.11	0.44±0.085	0.22±0.13	0.28±0.08	0.72±0.12	0.2±0.13
60	0.06±0.02	0.42±0.12	0.49±0.5	0.6±0.21	0.1±0.03	0.098±0.05
90	0.15±0.04	0.082±0.01 3	0.12±0.12	0.08±0.025	0.096±0.01	0.05±0.02

CUADRO XXXII SERIE II acuosa

FORMULA	1	4	2	5	3	6	
Tiempo	Tamaño de partícula medio ± Desviación Estándar						
0	0.15±0.07	0.2±0.11	0.31±0.15	0.27±0.09	0.11±0.05	0.35±0.14	
30	0.1±0.05	0.15±0.07	0.11±0.05	0.082±0.06	0.1±0.03	0.096±0.057	
60	0.44±0.14	0.33±0.08	0.41±0.07	0.64±0.15	0.19±0.09	0.9±0.32	
Temperatura							
90	4°C	0.22±0.2	0.71±0.27	0.24±0.09	0.6±0.26	0.7±0.25	0.47±0.15
	25°C	1.6±0.92	0.97±0.2	2.15±0.91	0.99±0.35	0.074±0.04	0.78±0.3

CUADRO XXXIII SERIE III

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Tiempo	Tamaño de partícula medio ± Desviación Estándar					
0	0.34±0.23	0.18±0.08	0.27±0.19	0.29±0.12	0.12±0.06	0.21±0.12
30	0.29±0.19	1.05±0.39	0.57±0.24	0.32±0.18	0.46±0.22	0.42±0.09
60	0.17±0.042	0.4±0.16	0.3±0.24	0.33±0.07	0.19±0.05	0.6±0.16
90	0.07±0.024	0.16±0.11	0.28±0.3	0.03±0.037	0.084±0.03	0.094±0.06

CUADRO XXXIV SERIE IV

FORMULA	1	4	2	5	3	6
Tiempo	Tamaño de partícula medio ± Desviación Estándar					
0	0.25±0.13	0.40±0.10	0.37±0.16	0.18±0.17	0.36±0.18	0.38±0.16
30	0.5±0.14	0.42±0.18	0.46±0.14	0.52±0.19	0.49±0.14	0.52±0.06
60	0.27±0.27	0.45±0.17	0.28±0.12	0.3±0.11	0.39±0.09	0.49±0.07
90	0.16±0.06	0.31±0.14	0.31±0.16	0.29±0.07	0.34±0.17	0.42±0.13

2.3.2.- Discusión

La caracterización de los liposomas multilaminares elaborados, mediante tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión (TEM), ha aportado resultados muy satisfactorios. La técnica seleccionada ha permitido constatar la formación de vesículas lipídicas plurilaminares en todas las formulaciones ensayadas, denotando la eficacia del método de elaboración empleado. Asimismo, ha aportado información sobre la estructura, dimensiones y estabilidad de estos transportadores de medicamentos.

La figura 69 corresponde a una microfotografía tomada a 140000 aumentos, de una suspensión de liposomas multilaminares constituidos por PC:AT en relación molar 1:1 a las 24 horas de elaboración. Estos vectores poseen un diámetro medio de $0.45 \pm 0.13 \mu\text{m}$. En la figura se visualizan las bicapas fosfolipídicas alternando con compartimentos acuosos, así como una zona central polar. La difusión del colorante utilizado (acetato de uranilo al 2%) revela la existencia de regiones transparentes al bombardeo electrónico (zonas a las que el colorante no ha podido acceder) y zonas electrodensas que denotan la presencia del metal pesado.

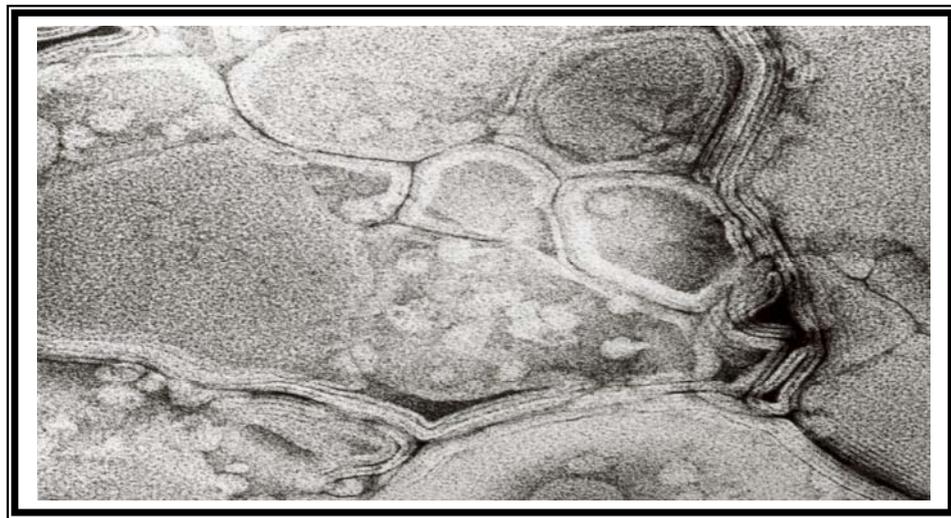


Figura 69

Por ello, las capas hidrófobas de las vesículas se comportan como transparentes, mientras que las partes polares, concéntricas a las anteriores, corresponden a las zonas electrodensas, oscuras a nuestra percepción.

Esta estructura multilaminar, característica de los liposomas, se sigue manteniendo con el paso del tiempo en la mayor parte de los casos, tal y como se observa en las figuras 70 y 71 (40000 x), correspondientes a la fórmula 2 (serie IV) y fórmula 5 (serie II oleosa) transcurridos 60 y 90 días desde su elaboración, respectivamente.

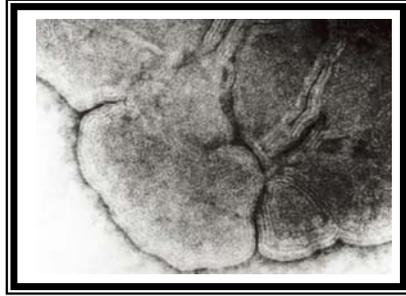


Figura 70



Figura 71

Las figuras 72 y 73 reflejan el estado de agregación y la forma de liposomas elaborados con PC:AT en proporción molar 2:1 (fórmula número 2) en el momento de la preparación (140000x) y a los 30 días (30000x), respectivamente.

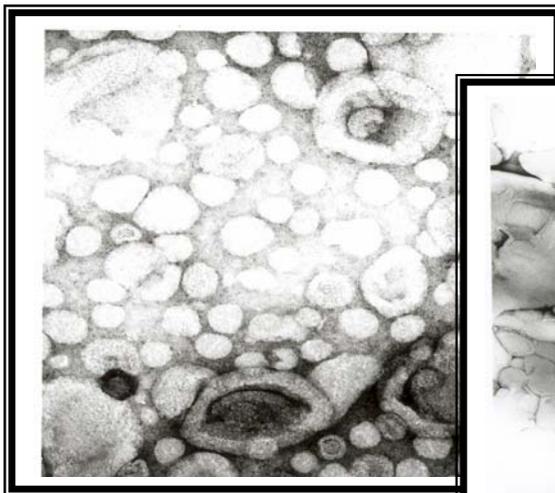


Figura 72

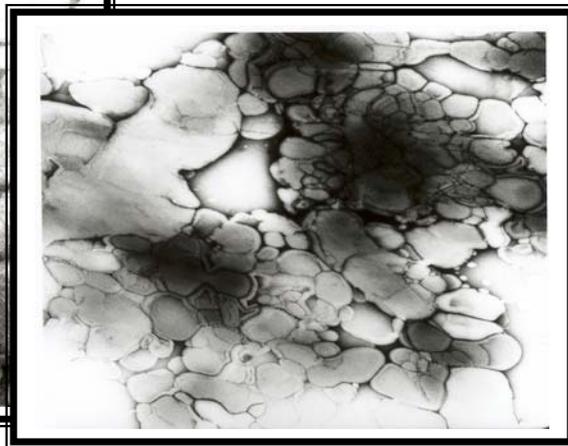
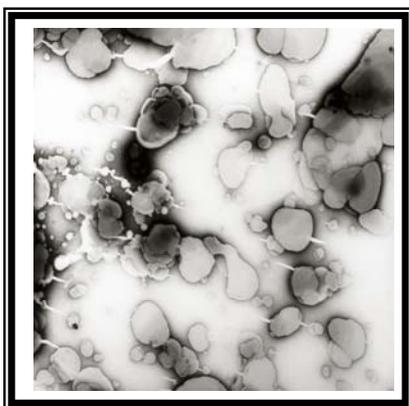


Figura 73

Se ha comprobado como el diámetro medio de liposomas individualizados varía levemente de una muestra a otra ($0.19\pm 0.17\mu\text{m}$ y $0.24\pm 0.26\mu\text{m}$), así como sus características de

estabilidad. Se aprecia en la figura 73 como a los 30 días las vesículas se van agregando progresivamente unas a otras, perdiendo su individualidad. Este hecho contribuye, junto a otros factores, a la modificación de las características de permeabilidad de la pared, facilitando la pérdida de acetónido de triamcinolona captada por el vector.

En cambio, cuando se incluye colesterol en la matriz lipídica de la fórmula anterior (PC:CH:AT 2:1:1) la agregación es sensiblemente menor transcurridos 30 días desde la elaboración (figura 74; 12000x). En este caso si se apreciaron diferencias significativas en



los diámetros medios con el paso del tiempo, obteniéndose valores entre $0.57 \pm 0.13 \mu\text{m}$ (0 días) y $0.77 \pm 0.31 \mu\text{m}$ (30 días). De lo anterior se deduce que los cambios en la estructura y morfología de los liposomas se reducen en parte gracias a la incorporación de dicho esterol.

Figura 74

En todas las series, las fórmulas con colesterol se caracterizan por presentar un menor índice de rotura de las vesículas y un contorno más liso; las elaboradas sin colesterol manifiestan en algunos casos rugosidades y poros en sus bicapas lipídicas (figuras 75 y 76).

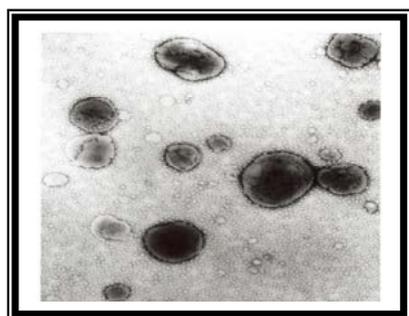


Figura 75

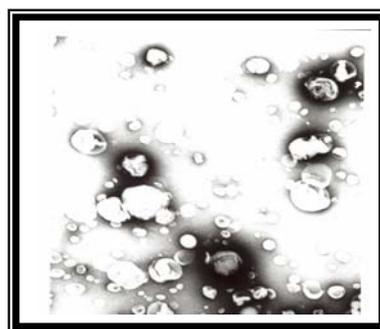


Figura 76

En cuanto a la influencia de la temperatura, los liposomas conservados a 25°C suelen destruirse con mayor facilidad que los mantenidos a temperatura de refrigeración, como se aprecia en las figuras 77 y 78 (fórmula 1-serie I) tomadas a los 90 días de su elaboración.

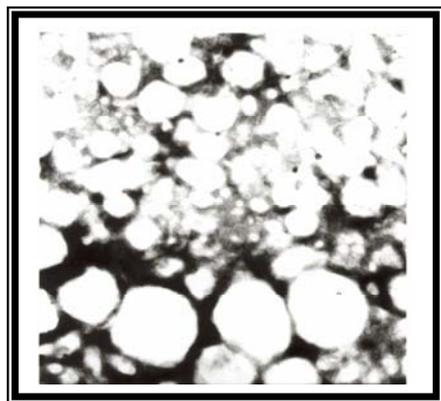


Figura 77 (Fórmula 1-4°C)

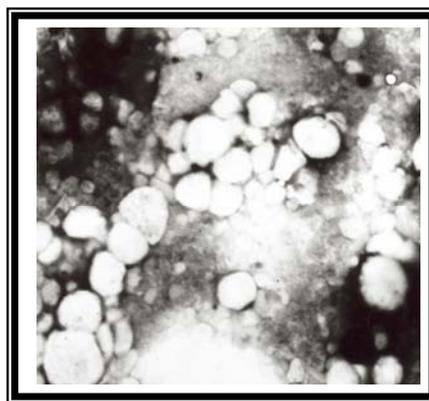


Figura 78 (Fórmula 1-25°C)

En otros casos, el grado de fusión vesicular es apreciable (figuras 79 y 80) (fórmula 4-serie I).

Figura 79

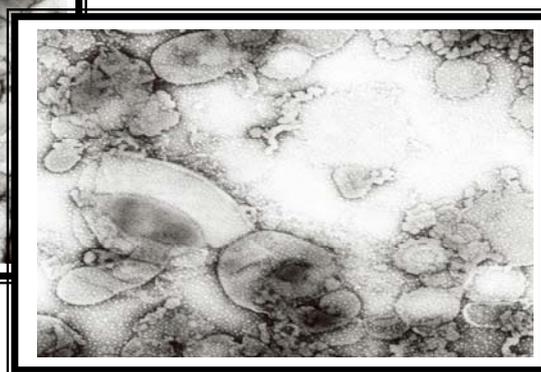
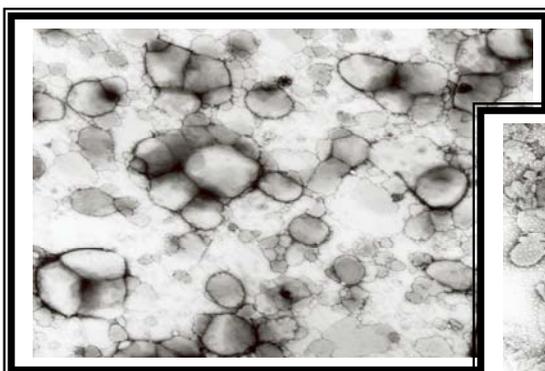


Figura 80

Al analizar la incidencia del antioxidante sobre la estabilidad del liposoma, las fórmulas elaboradas con vitamina E oleosa (figuras 81, 82 y 83) mantuvieron una estructura más definida que las fórmulas tradicionales (serie I), conservadas a 4°C.

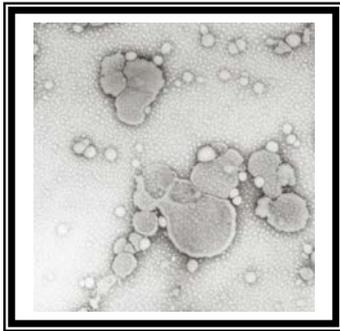


Figura 81 (30 días)



Figura 82 (60 días)

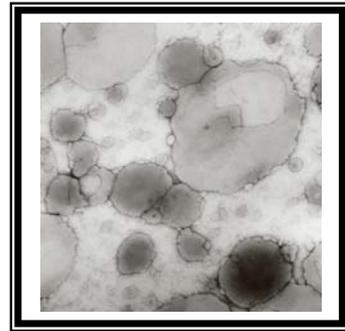


Figura 83 (90 días)

No ocurre lo mismo a 25°C, donde el grado de agregación de las vesículas lipídicas es considerable (figura 84).

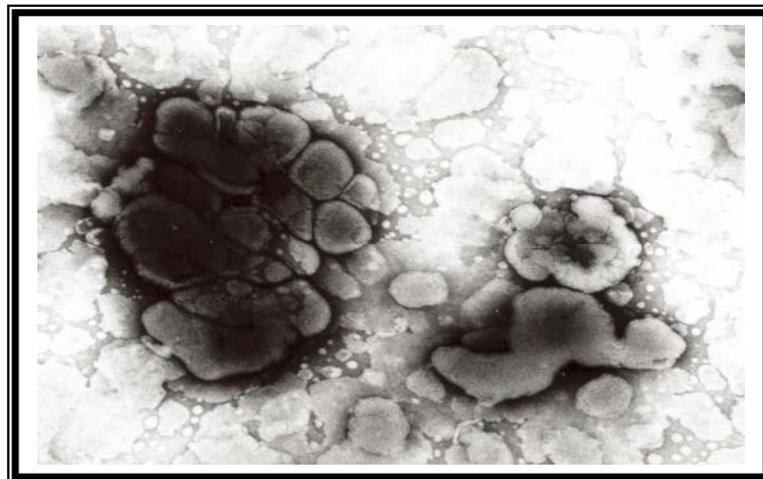


Figura 84

Los mejores resultados aportados por la caracterización microscópica corresponden a la serie IV. En este caso, se aprecian diferencias a considerar en cuanto a fusión y morfología con la serie I (figuras 85 a 90). La adición conjunta de conservador y antioxidante podría ser la causa de que las vesículas conserven un mayor grado de individualidad y una forma más esférica durante el periodo de estudio.

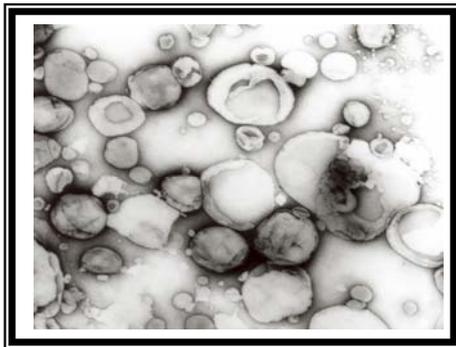


Figura 85 (Fórmula 1-0 días)

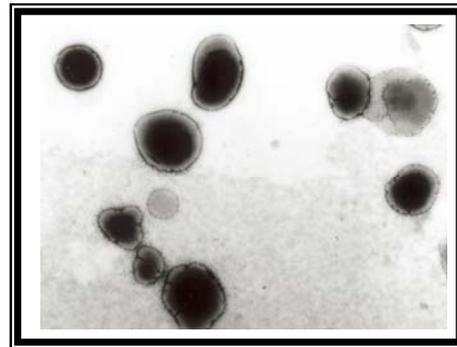


Figura 86 (Fórmula 4-0 días)

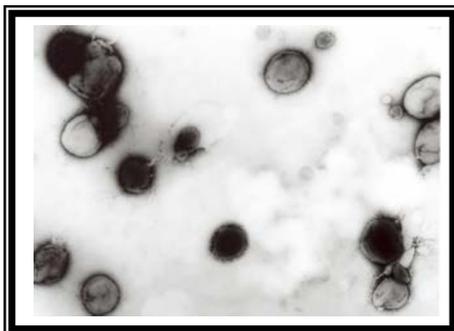


Figura 87 (Fórmula 1-30 días)

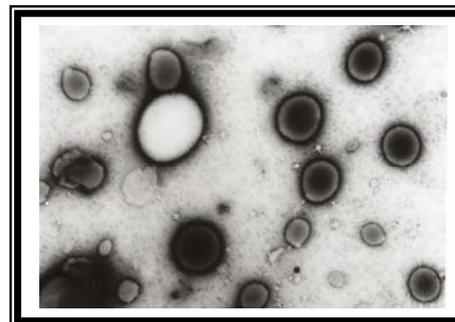


Figura 88 (Fórmula 4-30 días)

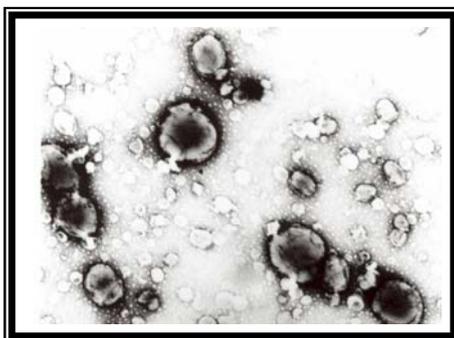


Figura 89 (Fórmula 1-60 días)

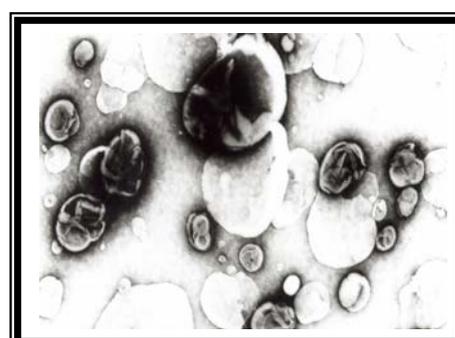


Figura 90 (Fórmula 4-60 días)

Las últimas microfotografías seleccionadas son un ejemplo representativo de los efectos que ocasiona el paso del tiempo sobre la estructura y estabilidad del sistema transportador. A simple vista podemos ver el cambio producido sobre la membrana del liposoma: lisa y uniforme a los 30 días de su elaboración (figura 91) y extremadamente rugosa a los tres años (figura 92).

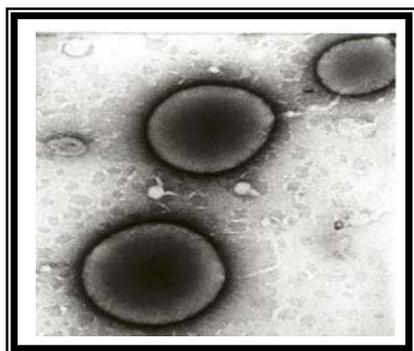


Figura 91

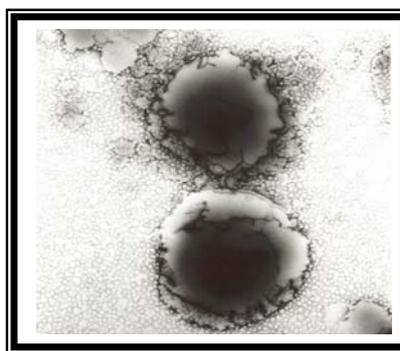


Figura 92

Igualmente la figura 93 revela un elevado grado de destrucción de las vesículas, transcurrido un año (fórmula 6-serieI). Estas han adquirido un aspecto rugoso, replegadas en sí mismas y con un contenido acuoso aparentemente menor. Este efecto resultó menor en las fórmulas de la serie IV (figura 94).

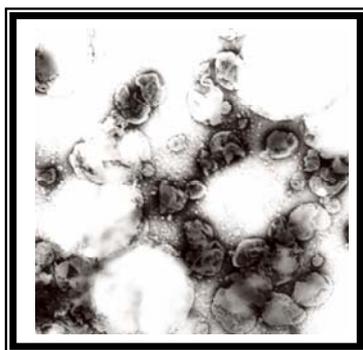


Figura 93

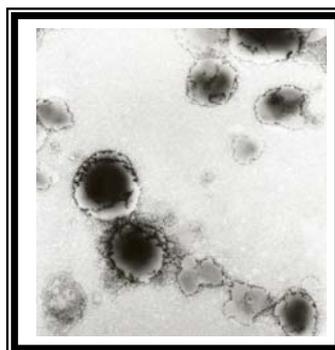


Figura 94

Para finalizar y como ejemplo ilustrativo de la incidencia de los componentes de la formulación en la estabilidad del sistema, se compara la morfología y estado de agregación de fórmulas sin colesterol correspondientes a las serie I (figuras 95 y 96) y serie IV (figura 97), y fórmulas con colesterol de ambas series (figuras 98 y 99), transcurridos 3 años desde su elaboración y conservadas a 4°C.

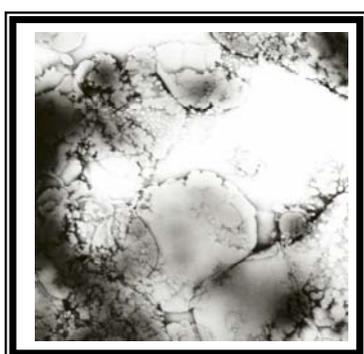


Figura 95

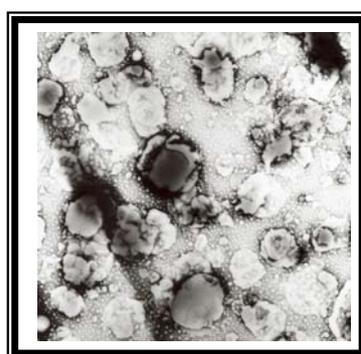


Figura 96



Figura 97

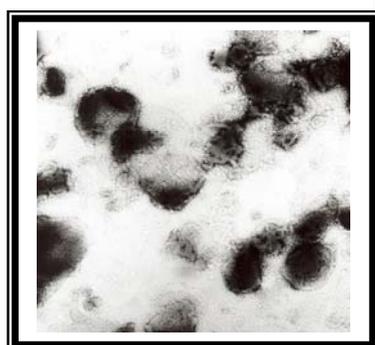


Figura 98

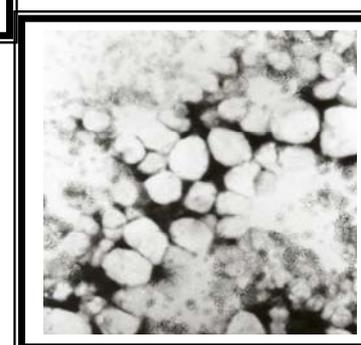


Figura 99

El estudio de caracterización de los liposomas ha incluido, además de su visualización microscópica, la determinación del tamaño de partícula.

Los datos experimentales obtenidos tras la caracterización se han sometido, al igual que en el estudio de estabilidad, a un tratamiento estadístico determinándose las varianzas intra e intergrupos y el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95.00%.

El objeto de este análisis es evaluar la posible incidencia sobre el tamaño final de las vesículas lipídicas de los componentes de la formulación, de las concentraciones de los mismos, de la temperatura de conservación, así como de la presencia de vitamina E y/o de phenonip.

Al analizar la incidencia que podría tener la concentración de fosfatidilcolina sobre el tamaño inicial de estos vectores, de los tres valores evaluados para la serie I (cuadro XXX), los mejores resultados han sido aportados por la fórmula 2, con una concentración de fosfolípido equivalente a 0.46mmoles/100ml. En este caso el diámetro medio fue de $0.19\mu\text{m} \pm 0.17$, significativamente menor a los calculados para las otras dos fórmulas (número 1: $0.45\mu\text{m} \pm 0.13$ y número 3: $0.60\mu\text{m} \pm 0.17$).

Asimismo, se ha constatado por las medidas efectuadas que, de manera general en todas las series y transcurridos 30 días desde la elaboración los liposomas experimentan un incremento de su diámetro medio, comprobado estadísticamente. No ocurre lo mismo en las fórmulas 1, 3 y 4 de la serie con vitamina E en solución acuosa, en las que los diámetros entre el día 0 y el 30 son estadísticamente similares. Igualmente, se aprecia como la bicapa más externa se vuelve más rígida, lo que fomentaría la formación de poros conducentes a una prematura liberación del principio activo. Las fórmulas con colesterol también aumentan de tamaño al día 30. No obstante, gracias al esterol, sus bicapas serían más fluidas y la formación de poros menor.

A veces la diferencia de tamaño entre intervalos de tiempo no varía como ocurre en la fórmula 4 en todas las series, a excepción de la serie IV, constatado estadísticamente.

Las dimensiones de los liposomas se incrementan aún más a los 60 días de su preparación en el caso concreto de todas las fórmulas correspondientes a la serie II acuosa (cuadro XXXI), las fórmulas 2, 4 y 5 de la serie II oleosa (cuadro XXXII) y la 1, 5 y 6 de la serie III (cuadro XXXIII). A partir del primer o segundo mes, según los casos, las vesículas disminuyen de tamaño, se arrugan.

Las fórmulas se han conservado a 4°C, efectuando posteriormente su caracterización. No obstante, algunas fórmulas se almacenaron también a temperatura ambiente (20-25°C) al objeto de comprobar su incidencia sobre el tamaño del sistema. Todas las fórmulas en las 2 series analizadas poseen diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas temperaturas.

Así, las series estudiadas (I y II acuosa) a 25°C poseen un crecimiento más elevado y a veces desmesurado (cuadros XXX y XXXII), excepto la fórmula 3 que presenta un tamaño inferior a los 90 días de su elaboración.

A fin de analizar la incidencia del antioxidante y/o conservador sobre el tamaño de partícula de estos vectores, en el siguiente cuadro se han incluido las diferencias detectadas en el diámetro medio para cada fórmula, entre el día 0 y el 90 (valores positivos cuando aumentan de tamaño y negativos cuando disminuyen):

CUADRO XXXV

	F1	F4	F2	F5	F3	F6
Serie I 4°C/25°C	0.43/0.61	0.1/0.31	0.19/0.62	0.09/0.2	-0.36/0.48	0.25/0.61
Serie II oleo	0.072	0.059	-0.02	-0.016	-0.15	-0.34
Serie II acu 4°C/25°C	0.07/1.45	0.51/0.77	-0.07/1.84	0.33/0.72	0.59/-0.036	0.12/0.43
Serie III	-0.28	-0.02	0.01	-0.25	-0.036	-0.11
Serie V	-0.09	-0.09	-0.06	0.11	-0.02	0.04

Efectivamente, las diferencias mínimas de tamaño entre los días 0 y 90 que se dan en algunas fórmulas se ratifican estadísticamente comprobando que no existen diferencias significativas.

Ya sea porque aumenten o finalmente disminuyan de tamaño, los liposomas de las series II oleosa, III y IV no cambian tanto como las series I y II acuosa (con tamaños finales más elevados que el resto), hecho que se refleja en las grandes pérdidas de agente captado de estas dos series. Es decir las propiedades antioxidantes de la vitamina E liposoluble y las propiedades antifúngicas y antimicrobianas del Phenonip® contribuyen a que los liposomas mantengan tamaños semejantes a los de su elaboración.

A los 90 días las diferencias de tamaño entre las fórmulas de la serie I y II oleosa son estadísticamente significativas. Asimismo, a los 90 días los tamaños de las fórmulas con colesterol son diferentes a excepción de las fórmulas 2 y 5 (para todas las series).

Los datos de liberación junto con los tamaños presentados por este estudio, sugieren que tras tres meses de almacenamiento, los liposomas empiezan a perder su integridad física; no solo se pierde agua, sino que también se rompen las bicapas externas, se liberan fosfolípidos y los liposomas son cada vez más pequeños y por tanto queda menos principio activo en su interior. No obstante, estos fenómenos se reducen en la serie IV (antioxidante y conservador).

2.4.- LIBERACIÓN “IN VITRO” DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA ENCAPSULADO Y LIBRE DESDE EXCIPIENTE

2.4.1.- Datos experimentales

Uno de los principales inconvenientes del uso tópico de los liposomas es la naturaleza líquida de la preparación. Para resolver el problema, se suelen incorporar a un vehículo apropiado que le proporcione la viscosidad adecuada, sin afectar negativamente a la liberación cutánea del principio activo encapsulado.

Con objeto de diseñar una forma adecuada para la administración tópica de los liposomas ensayados, se han seleccionado diferentes excipientes (gel, crema), estudiándose la liberación “in vitro” del acetónido de triamcinolona desde los mismos. Para ello se ha efectuado la incorporación del fármaco, en forma libre, a los excipientes, determinándose la cantidad de principio activo liberado en función del tiempo. Paralelamente, se ha realizado idéntico estudio con suspensiones de liposomas multilaminares portadores de corticoide, solos e incorporados al gel y a la crema elegidos.

La determinación de la cantidad de acetónido de triamcinolona liberado se ha realizado mediante medidas espectrofotométricas a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del corticoesteroide en agua (241nm).

La ecuación de la recta de ajuste obtenida por mínimos cuadrados es igual a $y = a + bx$; siendo “y”, la absorbancia y “x”, la concentración de acetónido de triamcinolona (mg/100ml), “a”, la ordenada en el origen y “b” la pendiente de la recta.

El cuadro XXXVI muestra los resultados obtenidos para la construcción de una de las rectas de regresión así como la ecuación y coeficiente de correlación. La figura 100 corresponde a la representación gráfica de la curva de calibrado.

CUADRO XXXVI
Regresión lineal AT/Agua (V/V) (n = 20)

X	Y	X ²	X · Y
0.025	0.1	0.000625	0.0025
0.5	0.19	0.25	0.095
0.75	0.3	0.5625	0.225
1.0	0.3	1.00	0.33
1.25	0.4	1.5625	0.5125
1.5	0.55	2.25	0.825
1.75	0.61	3.0625	1.0675
2.0	0.73	4.00	1.46
2.25	0.76	5.0625	1.71
2.5	0.9	6.25	2.25
2.75	0.95	7.5625	2.6125
3.0	1.06	9.00	3.18
3.25	1.09	10.5625	3.5425
3.5	1.267	12.25	4.4345
3.75	1.293	14.0625	4.8487
4.0	1.432	16.00	5.728
4.25	1.516	18.0625	6.443
4.5	1.558	20.25	7.011
4.75	1.63	22.5625	7.7425
5.0	1.71	25	8.55
$\Sigma=52.275$	$\Sigma=18.386$	$\Sigma=179.31$	$\Sigma=62.57$

Ecuación: $y = 0.341608x + 0.0251634$ / $r_{\text{teóricos}} = 0.4438 (0.05), 0.5614 (0.01) \text{ y } 0.6788 (0.001)$

$r_{\text{experimental}} = 0.998$

REGRESIÓN LINEAL ACETONIDO TRIAMCINOLONA/AGUA

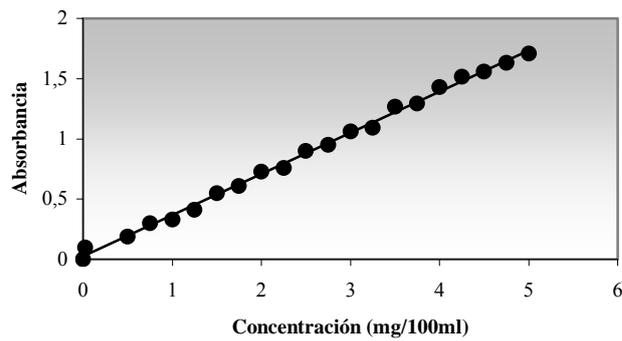


Figura 100

Los datos experimentales derivados de la liberación “in vitro” del acetónido de triamcinolona, en forma libre (para n= 6), desde los excipientes seleccionados se incluyen en el cuadro XXXVII, y se expresan en mg/100ml.

CUADRO XXXVII

Tiempo	Gel	Crema
5'	0	0,04±0.001
10'	0	0,22±0.017
15'	0,035±0.005	0,60±0.025
20'	0,035±0.005	0,60±0.013
25'	0,020±0.003	0,60±0.011
30'	0,120±0.014	0,83±0.018
1h	0,730±0.052	0,89±0.009
2h	1,190±0.030	0,95±0.011
3h	1,440±0.024	1,33±0.018
4h	1,670±0.017	1,54±0.011
5h	1,810±0.011	1,54±0.015
8h	2,000±0.052	1,97±0.031
24h	2,000±0.022	2.00±0.011

En el estudio de la liberación “in vitro” del corticoide encapsulado se han ensayado las seis formulaciones de liposomas multilaminares, al objeto de determinar la influencia de los componentes de la formulación y de las concentraciones de los mismos.

El ensayo de liberación se efectúa para cada fórmula, en forma de suspensión fluida, y también incorporada a un gel y a una crema. Las determinaciones se realizan durante las primeras 24 horas y al cabo de 7 y 14 días desde su elaboración, con el fin de comprobar la incidencia de la estabilidad del sistema sobre la liberación. El número de muestras elaboradas por fórmula y excipiente ha sido de 6.

Los resultados derivados de esta investigación se incluyen en los cuadros XXXVIII a XL y corresponden a cantidad de corticoide liberado expresada en tanto por ciento. Dichos resultados se obtienen a partir de los datos de absorbancia proporcionados por la muestra en cuestión. Por diferencia con los valores de absorbancia correspondientes al excipiente solo, a los liposomas vacíos y a las pérdidas de fármaco derivadas del método de elaboración, se obtiene el valor correspondiente a acetónido de triamcinolona liberado. El número de medidas efectuadas ha sido 6. Las figuras 101 a 109 corresponden a la representación gráfica del porcentaje de corticoide liberado en función del tiempo. En el cuadro XLI se resumen los anteriores.

CUADRO XXXVIII

FORMULA PC:CH:AT	1 1:0:1	4 1:0.5:1	2 2:0:1	5 2:1:1	3 3:0:1	6 3:1.5:1
TIEMPO	Media±Desviación Estándar (% AT LIBERADO DESDE SUSPENSION)					
1H	3.90±0.025 8	14.19±0.94 8	23.25±0.53 3	41.11±1.68 2	25.08±0.67 0	25.23±1.01 1
2H	6.85±0.366	15.66±0.53 4	27.64±0.30 8	44.04±2.23 2	30.94±0.55 9	34.02±1.09 6
3H	12.71±0.31 2	21.51±0.42 3	32.03±0.54 5	48.43±1.36 7	38.26±0.48 8	39.87±1.491
4H	18.56±0.80 6	24.44±0.58 5	36.42±0.41 8	48.43±0.55 4	44.11±0.50 6	45.73±1.26 7
5H	24.42±0.59 0	30.30±0.43 5	40.81±0.77 4	52.82±0.84 1	48.50±0.52 8	50.12±1.71 1
8H	39.05±0.58 5	42.00±0.93 5	55.45±1.98 3	60.14±3.14 7	63.14±0.79 8	63.29±1.33 1
24H	54.79±0.23 5	52.25±0.90 1	71.55±0.49 1	67.46±0.47 7	89.49±0.77 5	88.17±0.30 8
7DIAS	58.08±0.43	53.71±0.53	75.94±1.06	70.40±0.34	92.41±0.46	91.10±0.44
FORMULA PC:CH:AT	1 1:0:1	4 1:0.5:1	2 2:0:1	5 2:1:1	3 3:0:1	6 3:1.5:1
TIEMPO	Media±Desviación Estándar (% AT LIBERADO desde Crema)					
1H	0.00	0.00	0.00	3.06±0.388	0.00	0.00
2H	0.00	5.40±0.527	14.47±0.63 4	17.70±0.64 8	0.00	16.45±0.79 3
3H	8.32±0.587	9.80±0.553	20.32±0.44 7	25.00±0.89 7	16.30±0.99 0	16.45±1.03 3
4H	15.63±0.77 3	20.05±0.83 3	27.64±0.85 3	27.94±0.73 9	23.62±0.45 6	28.16±0.38 2
5H	22.95±0.52 4	27.37±0.41 6	33.49±0.67 6	32.30±0.57 9	30.94±0.67 1	38.41±1.16 3
8H	30.27±0.65 5	34.69±0.40 4	39.35±0.95 9	39.65±0.51 6	38.26±0.24 2	42.80±0.36 0
24H	41.98±1.50 4	40.54±0.58 5	49.59±0.90 7	48.43±0.55 1	51.43±0.46 1	48.65±0.67 1
7DIAS	50.76±1.18 4	46.40±0.73 8	56.91±1.07 2	52.82±0.33 5	60.21±0.64 1	55.97±0.85 7
14DIAS	55.15±0.54 5	49.32±0.37 0	64.23±0.74 9	60.14±0.62 5	69.00±0.46 6	63.30±0.82 5

CU
AD
R
O
XX
XI
X

C
U
A
D
R
O
X
L

FORMULA PC:CH:AT	1 1:0:1	4 1:0.5:1	2 2:0:1	5 2:1:1	3 3:0:1	6 3:1.5:1
TIEMPO	Media±Desviación Estándar (% AT LIBERADO DESDE GEL)					
1H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2H	0.00	0.00	4.2±0.570	6.00±0.707	0.00	0.00
3H	9.19±0.752	12.15±0.44 1	21.20±0.79 2	21.50±0.34 0	14.25±0.61 7	15.87±0.81 0
4H	14.9±1.841	23.70±0.39 6	26.91±0.21 2	28.67±0.32 7	30.21±0.76 8	31.82±0.44 9
5H	22.22±0.92 0	29.56±0.59 0	37.15±1.85 4	38.92±0.78 1	41.92±0.32 3	43.53±0.52 3
8H	31.73±1.10 7	37.61±0.40 6	40.81±0.18 3	41.11±0.62 1	45.58±0.98 2	45.73±0.68 6
24H	43.44±0.48 5	42.00±0.99 6	51.06±0.36 3	49.89±0.95 4	54.35±0.91 6	51.58±0.34 5
7DIAS	56.61±0.33 5	47.86±0.96 2	67.15±0.52 0	57.21±0.54 7	73.39±0.62 0	66.21±0.54 1
14DIAS	63.93±1.07 0	55.16±0.31 6	75.94±0.72 9	67.46±0.66 1	80.70±1.53 5	73.54±1.07 5

CUADRO XLI

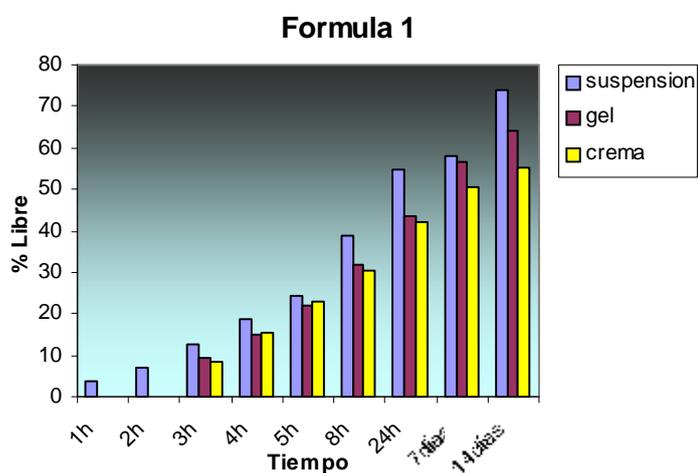


Figura 101

FORMULA PC:CH:AT	TIEMPO	1H	2H	3H	4H	5H	8H	24H	7DÍAS	14DÍAS
1 1:0:1	Suspensión	3.90	6.85	12.71	18.56	24.42	39.05	54.79	58.08	73.79
	Gel	0.00	0.00	9.19	14.9	22.22	31.73	43.44	56.61	63.93
	Crema	0.00	0.00	8.32	15.63	22.95	30.27	41.98	50.76	55.15
4 1:0.5:1	Suspensión	14.19	15.66	21.51	24.44	30.30	42.00	52.25	53.71	59.57
	Gel	0.00	0.00	12.15	23.70	29.56	37.61	42.00	47.86	55.16
	Crema	0.00	5.40	9.80	20.05	27.37	34.69	40.54	46.40	49.32
2 2:0:1	Suspensión	23.25	27.64	32.03	36.42	40.81	55.45	71.55	75.94	78.87
	Gel	0.00	4.2	21.20	26.91	37.15	40.81	51.06	67.15	75.94
	Crema	0.00	14.47	20.32	27.64	33.49	39.35	49.59	56.91	64.23
5 2:1:1	Suspensión	41.11	44.04	48.43	48.43	52.82	60.14	67.46	70.40	73.31
	Gel	0.00	6.00	21.50	28.67	38.92	41.11	49.89	57.21	67.46
	Crema	3.06	17.70	25.00	27.94	32.30	39.65	48.43	52.82	60.14
3 3:0:1	Suspensión	25.08	30.94	38.26	44.11	48.50	63.14	89.49	92.41	96.80
	Gel	0.00	0.00	14.25	30.21	41.92	45.58	54.35	73.39	80.70
	Crema	0.00	0.00	16.30	23.62	30.94	38.26	51.43	60.21	69.00
6 3:1.5:1	Suspensión	25.23	34.02	39.87	45.73	50.12	63.29	88.17	91.10	94.00
	Gel	0.00	0.00	15.87	31.82	43.53	45.73	51.58	66.21	73.54
	Crema	0.00	16.45	16.45	28.16	38.41	42.80	48.65	55.97	63.30

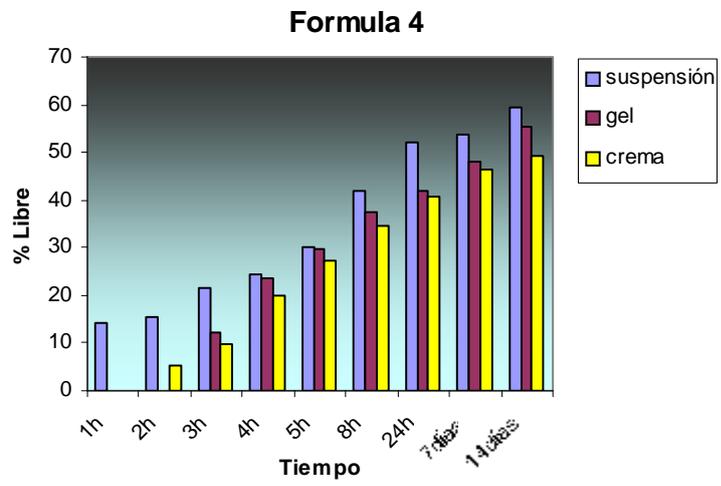


Figura 102

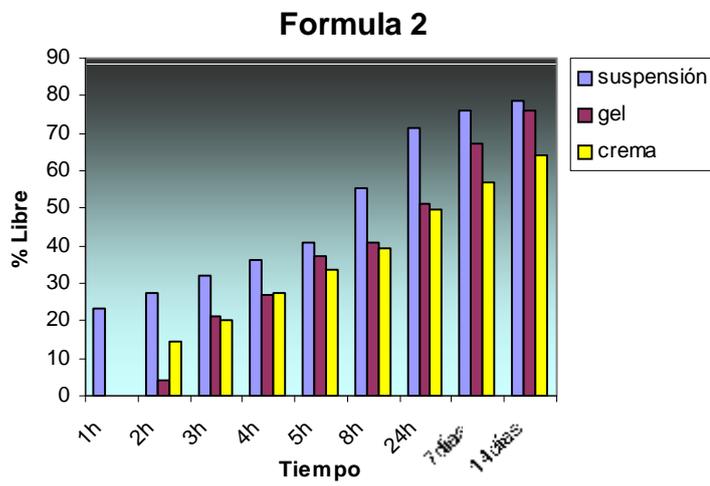


Figura 103

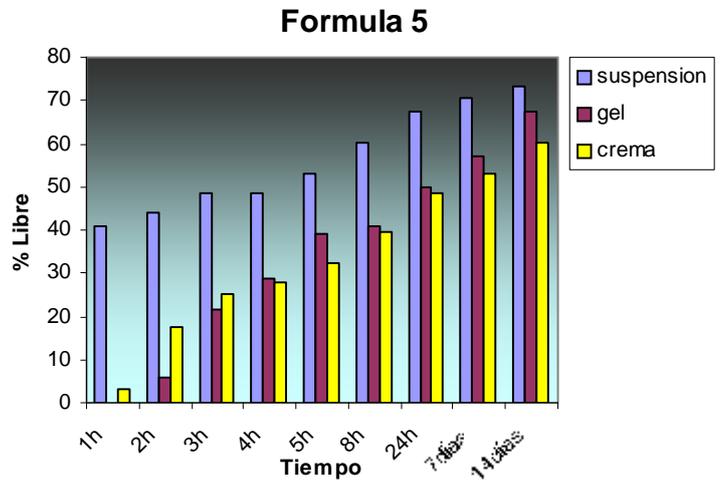


Figura 104

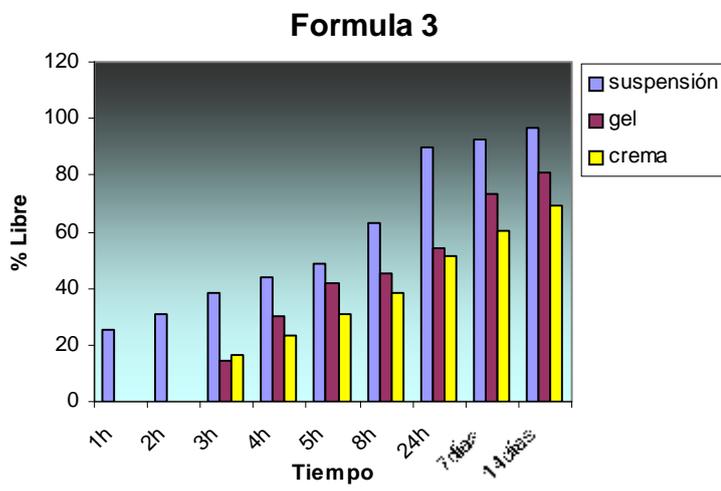


Figura 105

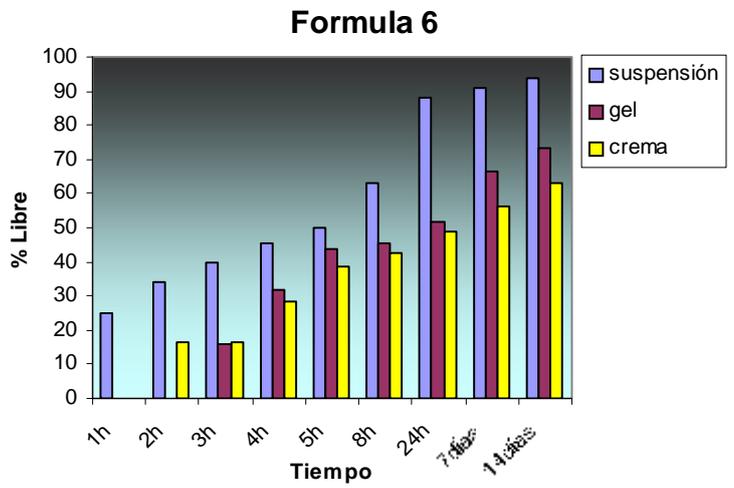


Figura 106

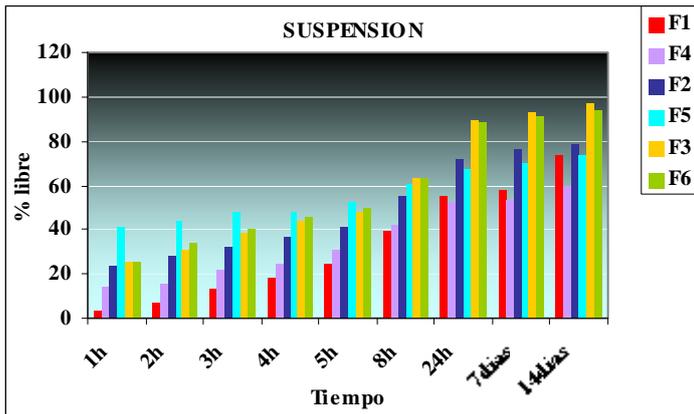


Figura 107

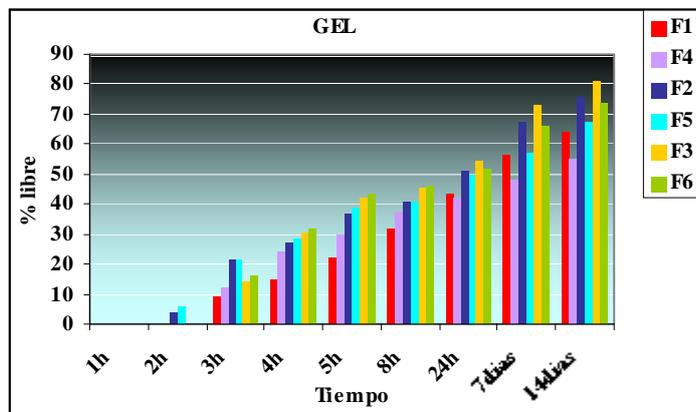


Figura 108

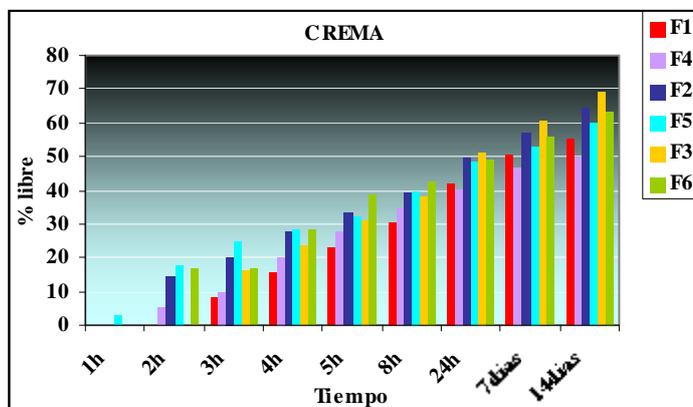


Figura 109

2.4.2.- Discusión

Del mismo modo que en las experiencias anteriores se ha llevado a cabo un estudio de Anova, con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias en la liberación del corticoide (en forma libre y encapsulada) a partir de los tres excipientes ensayados: suspensión, gel y crema.

En primer lugar, este estudio ratifica la no existencia de diferencias significativas en la cantidad liberada de AT(en forma libre) desde el gel a los 5 y 10 minutos y a partir de las 5 horas hasta las 24. También en el caso de la crema la cantidad de AT(en forma libre) liberada es igual a los 15, 20 y 25 minutos; y 4 y 5 horas. El análisis estadístico ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre el gel y la crema.

Con el fin de comprobar la incidencia de los componentes de las formulas de liposomas, de la concentración de fosfolípidos así como del excipiente usado en la liberación del principio activo encapsulado, se ha llevado a cabo idéntico estudio estadístico para cada fórmula, excipiente y tiempo. Tanto en la suspensión, el gel o la crema, los valores obtenidos en cada fórmula para cada intervalo de tiempo han resultado ser estadísticamente diferentes.

Los valores obtenidos muestran una liberación total del corticoide, en forma libre (2mg/100ml) desde el gel de Carbopol, a las 8 horas de iniciado el estudio. En el caso de la crema , a las 8 horas la liberación es del 98.5%, completándose a las 24 horas (cuadro XXXVII).

En cambio, resulta evidente el efecto reservorio determinado por los liposomas, ya que las suspensiones de vesículas lipídicas liberan más lentamente al corticoide encapsulado, no llegando al 100% ni siquiera a las 2 semanas (cuadro XLI).

Al incorporar los liposomas portadores de acetónido de triamcinolona a excipientes, aumenta la retención del fármaco, de tal manera que si en forma de suspensión liposomal se alcanzan valores de liberación del 96% (fórmula 3) a los 14 días, estos se reducen significativamente para los liposomas incluidos en excipientes. Las diferencias observadas y referidas a % de corticoide liberado por las suspensiones de liposomas respecto a los liposomas incorporados al gel o a la crema, se resumen en el cuadro XLII .

CUADRO XLII

Días	Fórmula	1	4	2	5	3	6
0	Gel	11.35	10.25	20.49	17.57	35.14	36.59
	Crema	12.81	11.71	21.96	19.03	38.06	39.52
7	Gel	1.47	5.85	8.79	13.19	19.02	24.89
	Crema	7.32	7.31	19.03	17.58	32.20	35.13
14	Gel	9.86	4.41	2.93	5.85	16.10	20.46
	Crema	18.64	10.25	14.23	13.17	27.80	30.7

En las primeras horas de liberación sigue este orden: suspensión > crema > gel. A partir de las 8 horas la liberación desde el gel continúa siendo menor que sin excipientes pero aumenta con respecto a la crema.

Este orden de liberación del AT ha sido comprobado y tiene una base estadística. Para ello se ha comparado cada fórmula de un determinado excipiente con idéntica fórmula pero de los

otros dos excipientes, siendo observadas diferencias significativas en todos los casos excepto a las 24 horas de la fórmula 5, donde los resultados son similares en el gel y la crema.

El efecto de retención determinado por excipientes ha sido observado para otros principios activos en diferentes estudios. Así, tras 24 horas de incubación a 37°C, el fármaco liberado por los liposomas era del 40%, mientras que cuando los liposomas se incorporaron en gel era del 20%. Estos resultados muestran el efecto protector de la matriz de hidrogel en los liposomas alcanzando una mejora adicional a su estabilidad (BRANDL y cols., 1997).

En animales de experimentación se han obtenido concentraciones de fármaco 4 veces superiores en dermis y epidermis tras administración tópica de liposomas portadores de acetónido de triamcinolona incorporados a un gel de Carbopol (MEZEI y cols., 1990). Experiencias similares se obtuvieron para hidrocortisona (KIM y cols., 1996).

A la hora de seleccionar un excipiente también se considera de gran importancia la agradabilidad y sensación detectada por el paciente en el momento de su aplicación, ya que por muy eficaz que sea el producto, si no es agradable al tacto, no se utilizará para el tratamiento o no tendrá gran viabilidad comercial.

Concretamente el gel de Carbopol pertenece al grupo de excipientes menos oclusivos y menos hidratantes, pero útiles dada la lipofilia del fármaco. Además posee las características mencionadas con anterioridad.

El uso de geles liposómicos ha atraído la atención, dada su capacidad para prolongar el contacto del fármaco con la superficie cutánea, sin inducir efectos locales adversos sobre el epitelio (RICHARDSON y cols., 1996).

Por otro lado, son varias las referencias encontradas de otros autores que al igual que nosotros se decidieron por una crema (TAGAWA y cols., 1985). En una patente francesa, de Pola Chemical Industries (FR2, 1988), se describen productos cosméticos para la hidratación de la piel, constituidos por una emulsión de fase externa acuosa formada por carboximetilcelulosa y una dispersión de liposomas.

Analizando la incidencia de los componentes de la formulación en la liberación del agente encapsulado, el colesterol actuaría como cementante, incrementando la rigidez de las bicapas lipídicas. Esta propiedad se manifiesta con una menor liberación de principio activo a lo largo del tiempo, en comparación con las formulaciones que no lo contienen (cuadro XLI).

La inclusión de colesterol hace que los liposomas encapsulen menos principio activo, esto repercute en los datos de liberación en las primeras horas y en las que el % de AT libre es

mayor, lógico pues captaron menos que las fórmulas sin colesterol. A medida que nos acercamos a las 8 horas los datos empiezan a ser similares y a partir de las 24 horas los datos experimentales se invierten porque desde este momento se ponen de manifiesto las características del colesterol en la fluidez de membrana impidiendo la salida del corticoesteroide.

Los resultados obtenidos muestran como la incorporación de liposomas a los excipientes seleccionados permite combinar el efecto controlador de la acción desempeñado por estos vectores con la mejora en la aplicación tópica aportada por el excipiente, dada su capacidad bioadhesiva. Asimismo, el diferente grado de retención del fármaco manifestado por las bases tópicas empleadas (mayor para la crema, con respecto al gel), permite elegir formulaciones con diferente velocidad de liberación. Si se desea un efecto más rápido, pero controlado, podrían utilizarse los liposomas en forma de aerosol de aplicación tópica, dadas sus propiedades reservorio comprobadas.

CONCLUSIONES

IV.- CONCLUSIONES

Composición del liposoma y grado de captación

1. Se constata la formación de liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona en todas las formulaciones ensayadas, tras su caracterización mediante

microscopía electrónica de transmisión (TEM), en donde se aprecia la formación de múltiples bicapas concéntricas de fosfolípidos alternando con compartimentos acuosos.

2. La elevada capacidad de incorporación de acetónido de triamcinolona por parte de los liposomas elaborados con fosfatidilcolina de huevo es probablemente consecuencia de gran variedad de ácidos grasos insaturados en la composición de dicho fosfolípido. Esto favorece la fluidez de las bicapas y por tanto la encapsulación de principio activo lipofílico.
3. La fórmula elaborada con fosfatidilcolina y fármaco en relación molar 1: 1 aporta un mayor rendimiento económico, al conseguirse una elevada captación de principio activo (90.4%) con menor concentración de fosfolípido.
4. La incorporación de colesterol a las formulaciones a concentraciones del 50% con respecto a las cantidades de fosfatidilcolina, disminuye el porcentaje captado de principio activo con valores medios que oscilan entre el 9.69% y el 14.01%. No obstante la tasa de encapsulación sigue siendo bastante elevada y comprendida entre valores medios del 75.63% y el 80.72% de captación.

Estudio de Estabilidad

5. Los datos aportados por el estudio de estabilidad ponen de manifiesto la influencia de la temperatura de conservación sobre la integridad del sistema. Así, los liposomas mantenidos a baja temperatura (4-6°C) poseen una estabilidad mayor, que las muestras conservadas a temperatura ambiente (20-25°C), con menor difusión prematura del principio activo captado a través de la pared.
6. Del análisis de la influencia de los componentes básicos sobre la estabilidad se deduce que las fórmulas elaboradas con mayor concentración fosfolipídica (3 y 6) presentan una cantidad más elevada de agente libre al final del estudio. Así mismo los liposomas con colesterol (fórmulas 4, 5 y 6) pierden menor cantidad de corticoide retenido, en

comparación con aquellos que no lo incorporan en su formulación (fórmulas 1, 2 y 3), tanto a temperatura ambiente como de refrigeración.

7. En todas las series destaca la formulación PC: CH: AT en relación molar 1: 0.5: 1 (fórmula 4) conservada en frío, por su capacidad de retención del acetónido de triamcinolona, con pérdidas a los 90 días del 1.33% a 4%; frente a la fórmula 1 que, aunque presenta mayor grado de captación, sus pérdidas son más elevadas.
8. La combinación del antioxidante y el conservador en la serie IV, revelan un incremento de la estabilidad del sistema, respecto al resto de las series, con porcentajes medios de captación que oscilan entre el 89.11% y el 66.29% y pérdidas comprendidas entre el 4% y el 9.31%, a temperatura de refrigeración (4-6°C) y en ausencia de luz.

Caracterización

9. El diámetro medio de los liposomas formados ha sido muy reducido, generalmente inferior a 1 μ m. Sin embargo se constata un incremento del tamaño transcurridos 30 días desde su elaboración, aunque la estructura multilaminar se sigue manteniendo con el paso del tiempo en la mayor parte de las fórmulas ensayadas.
10. La técnica de caracterización revela la agregación progresiva de las vesículas lipídicas a lo largo del periodo de estudio (90 días). La pérdida de individualidad contribuye a la modificación de las características de permeabilidad de la pared, constatándose una liberación creciente de agente retenido por el vector. No obstante, el grado de agregación fue sensiblemente inferior tras adición de colesterol a la matriz liposomal en todas las series.
11. Las fórmulas conservadas a temperatura de refrigeración se destruyen con menor facilidad que las mantenidas a 25°C (cuyo crecimiento es más elevado); y si además incorporan vitamina E oleosa en las bicapas, los liposomas mantienen una estructura más definida.
12. La adición conjunta de conservador y antioxidante a la composición del liposoma podría ser la causa de que las vesículas conserven un mayor grado de individualidad y una forma más esférica durante el periodo de estudio.

Liberación “in vitro” de acetónido de triamcinolona encapsulado y libre desde excipientes

13. Los estudios de liberación “in vitro” ponen de manifiesto el efecto reservorio determinado por los liposomas, ya que las suspensiones de vesículas lipídicas liberan más lentamente al corticoide encapsulado, no llegando al 100% a las dos semanas.
14. Al incorporar los liposomas portadores de Acetónido de Triamcinolona a excipientes, aumenta la retención del fármaco, con respecto a la suspensión liposomal.
15. De los dos excipientes utilizados, se ha comprobado como la crema es la que menos cantidad de fármaco libera siendo el gel el excipiente que presenta menor retención.
16. La presencia de colesterol en la formulación determina un incremento en la rigidez de las bicapas lipídicas. Esta propiedad se manifiesta con una menor liberación de agente encapsulado a lo largo del tiempo.
17. La incorporación de liposomas a los excipientes seleccionados permite combinar el efecto controlador de la acción desempeñada por estos vectores con la mejora en la aplicación tópica aportada por el excipiente, dada su capacidad bioadhesiva. Asimismo, el diferente grado de retención del fármaco manifestado por las bases tópicas empleadas, permite elegir formulaciones con diferente velocidad de liberación.

BIBLIOGRAFIA

V.- BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, W. y DOWNING, D.T. Interactions between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 1021, 119-125, 1990.

ALEMDAR, A.Y., BAKER, K.A. SADI, D., Mc ALISTER, V.C. y MENDEZ, I. Liposomas traocolimus administered systemically and within the donor cell suspension improves xenograft survival in hemiparkinsonian rats. *Exp-Neurol*, 172(2): 416-424, 2001.

ALLEN, T.M., HANSEN, C., MARTIN, F., REDEMANN, C. y YAU-YOUNG, A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1066, 29-36, 1991.

ALONSO, M.J. Sistemas sólidos coloidales (nanopartículas y nanocápsulas) constituidos a base de polímeros acrílicos. En: VILA, J.L., SEIJO, B., ALONSO, MJ. y TORRES, D. (eds.). *Modernos métodos de administración de medicamentos*. Madrid: Farmaindustria, 123-180 (1990).

ALONSO, MJ. Nuevas estrategias encaminadas a la formulación de macromoléculas en partículas biodegradables, V Congreso de la SEFIG,1-2 (2001).

ALSINA, MA., EGLA, MA., GARCIA, ML. y VALLS, O. Las nanopartículas com vectores medicamentosos. *Farm. Clin*; 5: 595-606 (1988).

ALVING, C.R. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol. Today*, 2,101-107 (1986).

ALVING, C. R. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 307 (1992), LOPEZ-BERENSTEIN, G. y FIDLER, I. Eds. *Liposomes in the therapy of infectious diseases.* (1989).

AMARI, S., ORTA, V. y ROIG, N. Derivados del aceite de oliva: nuevos componentes de aplicación en formulaciones cosméticas. *NCP documenta*, N° 236, pp 11-13 (1998).

AMMOURY, N., FESSI, H., DEVISSAGUET, JP., ALLIX, M., PLOTKINE M. y BOULU, RG. Effect on cerebral blood flow of orally administered indomethacin loaded poly (isobutylcyanoacrylate) and poly (DL-lavtyde) nanocapsules. *J. Pharm Pharmacol*; 42: 558-561 (1990).

ANONIMO. LANCET. Aplicación tópica de endonucleasa T4 tipoV en liposomas sobre el cancer cutáneo en el xeroderma pigmentosum. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica.* 357, 926-929 (2001).

ARANCIBIA, A. Microcápsulas, en “ *Farmacotécnia Teórica y Práctica* “. HELMAN,J. Tomo VI. C.E.C.S.A. México, 1793-1805 (1981).

ARNDT, K.A. Manual of dermatologic the therapeutics with essentials of diagnosis. Boston (1989)

ASH, M. y ASH, I. Eds. Handbook of pharmaceutical additives. Aldershot: Gower, 583, (1995).

BAILEY, A. L. y CULLIS, P. R. Membrane fusion with cationic liposomes: Effects of target membrane lipid composition. Biochemistry, Vol. 36, Issue 7, pp 1628-1634 (1997).

BANGHAM, A.D. STANDISH M. M. y WATKINS J.C. Diffusion of swollen lipids. J. Mol. Biol., 13, 238-252 (1965).

BANGHAM, A. D. HILL M.W. y MILLER N.G.A. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes In “ Methods in membrane biology “, publié par Korn E.D. Plenum Press, New York, 1,1-68 (1974).

BAREN-HOLZ,Y., AMSELEM, S. y LICHTENBERG, D. A new method for preparation of phospholipid vesicles. FEBS Lett., 99, 210-214 (1979).

BARRY, B.W. Dermatological formulations. Percutaneous absorption. M. Dekker. Nueva York, 145-150 (1983).

BARZA, M., STUAR, M., y SZOKE, F. Effect of size and lipid composition on the pharmacokinetics of intravitreal liposomes. Inves. Ophthalmol Vis. Sci., 38, 893, (1987).

BATZRI, S. y KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. Biochim. Biophys. Acta, 455, 322-331 (1976).

BEAN, H.S. y HEMAN-ACKAHL, J. Pharm. Pharmacol., 16:58t (1964).

BEHL, C. R., BELLANTONE, N. H. y FLYNN, G. L. Influence of age on percutaneous Absortion. New York. M. Dekker, pp 183-212 (1985).

BERNARD, E., DUBOIS, J.-L. y WEPIERRE, J. Importance of sebaceous glands in cutaneous penetration of an antiandrogen: Target effect of liposomes. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 86, 573-578 (1997).

BERROCAL, M. C., BUJAN, J., GARCIA – HONDUVILLA, N., ABEGER, A. Comparison of the effects of dimyristoyl and soya phosphatidylcholine liposomes on human fibroblasts. Drug Deliv, 7, 37-44 (1998).

BETAGERI, G. V., JENKINS, S. A. y PARSONS, D. L. Liposome drug delivery system. Ed. Technomic, pp 6-7 (1993).

BILL, A. Aqueous Humor Dynamics in Monkeys. Exp Eye Res, 11, 195-206 (1971).

BLANK, I.H. J. Soc. Cosmetic Chemists, 11,59 (1960).

BOUWSTRA, J., HOFLAND, H.E.J., SPIES, F., GOORIS, G.S. y JUNININGER, H.E. Changes in the structure of the human stratum corneum induced by liposomes., In, BRAUN-FALCO, O., KORTING, H.C., MAIBACH, H.I. (Ed.), Liposomes Dermatics, 121-136, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (1992).

BRANDL, M., TARDI, C., DRECHSLER, M., BACHMANN, D. RESZKA, R., BAUER, K.H. y SCHUBERT, R. Trhee- dimensional liposome networks: freeze fracture electron

microscopical evaluation of their structure and in vitro analysis of release of hydrophilic markers. *Adv. Drug Deliv. Rev* 24, 161-164 (1997).

BRIZ, O., BRAVO, P., RODRÍGUEZ, R. I., SERRANO, M. A. GA y RCIA, J. J. Evaluación in vitro de una nueva estrategia farmacológica para superar la resistencia de neoplasias hepáticas al tratamiento antitumoral con cisplatino. *Mapfre Medicina*, 10, pp 81-86 (1999).

BULA, D y GHALY, E. S. Liposome Delivery Systems Containing Ibuprofen. *Drug development and industrial pharmacy*, 21, 1621-1629 (1995).

CALVIÑO, J., LENS, X. M., ROMERO, R., GALBAN, C., NOVOA, D., MARDARAS, J., ARCOCHA, V. y SANCHEZ – GUISANDE, D. Utilidad de la anfotericina B liposomal (AmBisome®) en la aspergilosis invasiva. *Editorial*, Vol. 19, Número 4 (1999).

CANTO, G. S., DALMORA, S. L. y OLIVEIRA, A. G. Piroxicam Encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti-inflammatory effect. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 25, No. 12, (1999).

CASTELLI, F., CONTI, B., MACCARRONE, D.E., CONTE, U. y PUGLISI, G. Comparative Study in Vitro Release of Antiinflammatory Drugs from Polylactide-Co-Glycolide Microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol 176, iss1, pp 85-86 (1998).

Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid (2001).

CEVC, G. y BLUME, G. Lipid vesicles penetrate intact into skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta*, 1104, pp 226-232 (1992).

CEVC, G., BLUME, G. y SCHATZLEIN, A. Transfersomers mediated Transepidermal Delivery Improves the Regio-Specificity and Biological-Activity of Corticosteroids in-Vivo. *Journal of controlled release*, 45, 211-226 (1997).

CLARKE, E. G. C. Isolation and Identification of drugs. *The Pharmaceuticals Society of Great Britain*, 2, 580-581 (1986).

CORAN, D., GRUENBERG, J., KNUPFER, A. L. BURI, P. y DESHUSSES, J. Interactions liposomes/trypanosomes. 2éme Congres International de Technologie Pharceutique. Tomo IV,20-27, BULA,D. y GHALY, E.S. Liposome Delivery Systems Containing Ibuprofen. *Drug development and industrial pharmacy*, 21 (14),1621-1629 (1980).

CORTESI, R. Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. *Journal of Microencapsulation*, Vol. 16, No. 2 (1999).**COUVREUR, P., KANTE, B. y ROLAND, M.** Les Vecteurs Lysosomotropes. *J.Pharm. Belg.*,35 , 51-60 (1980 a).

COUVREUR, P., KANTE, B., LENAERTS,V., GUIOT, P. y ROLAND , M. Tissue Distribution of 3H-actinomycin D Adsorbed on Polybutilcianoacrylate Nanoparticles. *Int.J.Pharm.*,7 , 45-53 (1980 b).

CROMMELIN, D. J. A., SLAATS, N. y VAN BLOOIS, L. Preparation and characterizacion of doxorubicin-containing liposomes. *Int. J.Pharm.*,16 ,79-92 (1983).

DAFTARI, G.S. y TAYLOR, H.S. Efficient liposome mediated gene transfection and expresión in the intac human uterus. *Hum. Gene. Ther.* 12(17):2121-2127 (2001).

DAVIS, S. S. Hunt for the “heineken factor”. *Pharm.Int.*, 3, 41-45 (1981).

DEAMER, D. W. y BANGHAM, A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim.Biophys. Acta*, 443, 629-634 (1976).

DEASY, P. B. “Microencapsulation and Related Drug Processes”. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* vol.20. M.Dekker, Inc. New York, pág.1-26, (1984 a).

DEASY, P. B. Developements in Micro and Nanoencapsulation. *Manuf. Chem.*,55, 47-48 (1984 b)

DE GIER, J., MANDERSLOOT, J. G. y VAN DEENEN, L. L. M. The Role of Cholesterol in Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 173, 143-145 (1969).

DELGADO, G. A Phase I/H Study of intraperitoneally administered doxorubicin entrapped in cardiolipid liposomes in patients with ovarium cancer. *Amer J Obst gy necol*, 160 (4) : 812-819 (1989).

DEMPSKI, RE., PORTNOFF, JB. y WASE, AW. In vitro release and in vivo penetration studies of a topical steroid from nonaqueous vehicles. *J. Pharm. Sci* 58: 579 (1969).

DIEPOL, R., KREUTER, J., HIMBER, J., GURNY, R., LEE, VHL., ROBINSON, JR. y SAETTONE, MF. Comparison of different models for the testing of pilocarpine eyedrops using conventional eyedrops and a novel depot formulation (nanoparticles). *Gaefe’s Arch Clin Exp Ophtalmol*; 227: 188-193 (1989).

DOMENECH, J., MARTINEZ, J., PLA, J. M. Absorción percutánea. *Procesos y dispositivos. Biofarmacia y Farmacocinética*, Vol. II, cap 18, pp 407-419 (1998).

DOUSSET, N. y DOUSTE-BLAZY, L. Méthodes de Préparation des Liposomes in “Les Liposomes:Applications Therapeutiques”. PUISSIEUX,F. y DELATTRE,J. Ed.Technique et Documentación (Lavoisier). París, pág.41-67, (1985).

DU PLESSIS, J., EGBARIA, K. y WEINER, N. Influence of formulation factors on the deposition of liposomal components into the different strata of the skin. J. Soc. Cosmet. Chem., 43, pp 93-100 (1992).

DUFOURC, J. Phyco-chimie des Phospholipides In “Les liposomes, applications thérapeutiques” , Puisieux F. et Delattre J. (Eds), Technique & Documentation, París, pág. 1-10, (1985).

EDMAN, P. y SJOHOLM, I. Acrylic Microspheres in vivo VIII: Distribution and Elimination of Polyacryldextran Particles in Mice. J.Pharm.,Sci., 72 , 796-799 (1983 a).

EDMAN, P. y SJOHOLM, I. Acrylic Microspheres in vivo VI: Antitumor Effect of Microparticles with Immobilized L-Asparaginasa Against 6C3HED Lymphoma. J. Pharm., Sci, 72, 654-658 (1983 b).

EDMAM, P., SJOHOLM, I. y BRUNK, U. Characterization of Polyacryl Starch Microparticles as Carriers for Proteins and Drugs. J.Pharm.,Sci.,73, 153-156 (1984).

EGBARIA, K., RAMACHANDRAN, C. y WEINER, N. topical application of liposomally entrapped cyclosporin evaluated by in vitro diffusion studies with human skin. Skin Pharmacol., 4, pp 21-28 (1990).

EGBARIA, K., RAMACHANDRAN, C., y WEINER, N. Topical application of liposomally entrapped cyclosporine evaluated by in vitro diffusion studies with human skin. Skim Pharmacol, 4, 21-28 (1991).

ELIAS, P. M. Arch. Dermatol. 270, pp 95-117 (1981).

ELIAS, P. M. “ Epidermal Lipids, Barrier Function and Desquamation”. J. Invest. Dermat, 80, 445-495 (1983).

ELIAS, P. M. Epidermal barrier function: Intercelular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. J. Control. Release, 15, pp 199-208 (1991).

ELLIS, M., WATSON, R., McNABB, A., LUKIC, M.L. y NORK, M. Massive intracerebral aspergillosis responding to combination high dose liposomal amphotericin B and cytokine therapy without surgery. Journal of medical microbiology. 51 (1): 70-75 (2002).

ERDOGAN S., OZER, A.Y. y HINCAL, A.A. Comparative studies on the formulation, characterization, stability and in vitro release of iopromide liposomes and niosomes. Pharma Sciences, 8 (2) 133-137 (1998).

FAIRBROTHER, J. E. Laser Light Sattering Techniques. Pharm.J.,223,651 (1979).

FANG, J. Y., LIN, H. H., HSU, L. R., TSAI, Y. H. Characterizacion and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. Chem. Pharm. Bull. 45, pp 1504-1509 (1997).

FANG, J.Y., HONG, C.T., CHIU, W.T. y WANG, Y.Y. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. J. Control Release 60(1) 1-10 (1999).

FARR, S. J., KELLAWAY, I. W., CARMANMEAKIN, B. comparison of Solute partitioning and Efflux in Liposomes by a Conventional and Aerosolized Method. Int. J. Pharm., 59, pp 39-46 (1989).

FILIPEK, J., UHRIKOVA, D., SLOSARCIK, P. y BALGAVY, P. Effect of cholesterol on egg yolk phosphatidylcholine peroxidation in multilamellar liposomes. *Pharmazie* 56(12):953-957 (2001).

FIORENTINI, D., CIPOLLONE, M., GALLI, M.C., PUGNALONI, A., BIAGINI, G. y LANDI, L. Characterization of large unilamellar vesicles as models for studies of lipids peroxidation initiated by azocompounds. *Free Radic. Res.* 21 pp.329-339 (1994).

FLEISHER, D., NIEMIEC, S. M., OH, C. K., HU, Z., RAMACHANDRAN, C. y WEINER, N. Topical Delivery of Growth-Hormone Releasing Peptide Using Liposomal Systems an in Vitro Study Using Hairless Mouse Skin. *Life Sci.*, 57,1293-1297 (1995).

FLOREZ, J., ARMIJO, J. A. y MEDIAVILLA, A. *Farmacología Humana. Tomo II. Ed. Científicas Técnicas.* Barcelona, pág. 1087-1088, 1993.

FOLDVARI, M., GESZTES, A. y MEZEI, M. "Dermal Drug Delivery by Liposome Encapsulation: Clinical and Electron Microscopic Studies." *J. Microencapsulation*, 7,. 479-489 (1990).

FOLDVARI, M. Effect of vehicle on topical liposomal drug delivery: petrolatum bases. *J. Microencapsul.* 13, 589-600 (1996).

FOLDVARI, M. y MORELAND, A. Clinical observations with topical liposome-encapsulated interferon alpha for the treatment of genital papilloma virus infections. *J. Liposome Res.* 7, pp 115-126 (1997).

FOULI, A. M., EL SAYED, A. A. y BADAWI, A. A. Release of Drugs from Microcapsules Methacrylate Polymers. *Int.J.Pharm.*,14,95-102 (1983).

FOUNTAIN, M. W., WEISS, S. J., FOUNTAIN, A. G., SHEN, A. y LENK, R. P. Treatment of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in vitro and in vivo by stable pleurilamillar vesicles encapsulated aminoglycoside. *J. Infect Dis* , 152, 529-536 (1985).

FRESNO, M. G., RAMÍREZ, A., y JIMÉNEZ, M. M. *Ciencia y Tecnología Fca.* Vol. 11, (1), pp 3-18 (2001).

FRIEDMAN, T., FELGNER, P. L., BLAESE, M. R., HO, P. Y. y SAPOLSKI, R.M. Avances en la terapia génica. *Investigación y Ciencia*, Agosto, 1997, pág. 43-69.

FROKJER, S., HJORTH, E. y WORTS, O. Stability and Storage of Liposomes, in "Optimization of Drug Delivery". **BUNDGAARD, H. HANSEN, A. B. y KOFOD, H.** Alfred Benzon Symposium Series vol. 17. Munksgaard. Copenhagen, pág. 384-397 (1982).

FR2, 614, 787, Pola Chemical Industries Inc., (1988).

FUKUZAWA, K., INOKAMI, Y., TOKUMURA, A. y SUZUKI, A. Rate constants for quenching singlet and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes. *Lipids*, 33, 751-756 (1998).

GABIZON, A., GOREN, D., HOROWITH, A. T., TZEMACH, D. y LOSSOS, A. Long-Circulating Liposomes for Drug-Delivery in Cancer-Therapy-A Review of Biodistribution Studies in Tumor-Bearing Animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* ,24, 337-334 (1997).

GABRIJEIDEIE, V., SENTJURE, M. y KRISTL, J. Evaluation of liposomes as drug carriers into the skin by one dimensional EPR imaging. *Int. J. Pharm.*, 62, pp 75-79 (1990).

GALIANO, P., RUGGIERO, G. y MENOZZI, M. Dermatiti superficili micotiche trátate con una nuova crema als 2% miconazola in liposomi. *Dermatol Oggi*, 5, pp 60-63 (1990).

GARCIA, M., NAGY, I. B., ALSINA, M. A., MEZO, G., REIG, F., HUDECZ, F. y HARO, I. Análisis of the interaction with biomembrane models of HAV-VP (101-121) séquense conjugated to synthetic branched Caín polypeptide carriers with poly (L-Lysine) backbone. *Langmuir*, 14 (7), pp 1861-1869 (1998).

GEMMEL, D.H.O. y MORRISON, J. *Pharm. Pharmacol.*, 9, 641, 1957.

GHAHARY, A., SHEN, Q. O., ROGERS, J.A., WANG, R.J., FATHIAFSHAR, A., SCOTT, PG. y TREDGET, EE. Liposomoe-associated interferon—Alpha-2b. Fuctions as an anti- fibrogenic factor for human dermal fibroblasts. *Journal of investigate dermatology*, 109, 55-60 (1997).

GIOMINI, M., GIULIANI, A. M., GATTEGNO, D. y CONTI, F. Un Nuovo Tipo di Transportadori di Sostanze Biologicamente Active: I Liposimi. *Il farmaco ed. Pr.*, 34, 3-14 (1979).

GOLDEN, M., McKIE, J. E. y POTTS, R. O. Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 76, N° 1 (1987).

GOMEZ-FERNANDEZ, J.C. y GOÑI, F. M. Fluidez de las Membranas Celulares. *Inv.Cien.*, 79, 14-23 (1983).

GONZALEZ, J., MEDINA, MM., CEREZO, A. y SÁNCHEZ, J. Elaboración y caracterización de microesferas de albúmina sérica humana como nuevo sistema de transporte y liberación de fármacos. *Farm. Hosp.* 16:263-267 (1992).

GONZALEZ-ROTHI, R.J., SUAREZ, S., HOCHHAUS, G., SCHREIER, H., LUKYANOV, A., DERENDORF, H. y COSTA, TD. Pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetonide phosphate. *Pharm. Res.* 13: 1699-1703 (1996).

GOODMAN-GILMA, A. Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Iberoamericana , 178-179. Brecos Anes, (1996).

GORDON, R. E., MAYER, P. R. y KILDSIG, D. O. Lyophilization, a means of increasing shelf-life of phospholipid bilayer vesicles. *Drug Dev. Indust. Pharm.*, 8, 465-473 (1982).

GRASS, G. M. y ROBINSON, R. J. Mechanism of Corneal Drug Penetration II: Ultrastructural Analysis of Potential Pathways for Drug Movement *J. Pharm Sci*, 77, 15-23 (1988).

GREEN, K. L. y FOONG, W.C. The stability of methotrexate liposomes in rheumatoid synovial fluid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 93 (1982).

GREGORIADIS, G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett.*, 36, 292-296 (1973).

GREGORIADIS, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *New Engl. J. Med.*, 295, 704-710 (1976).

GREGORIADIS, G. Liposomes: European research . *Science*, 201, 211-213 (1978).

GREGORIADIS, G. Liposomes as drug carriers. *Pharm. Int.*, 4, 33-37 (1983).

GREGORIADIS, G. "Immunological Adjuvants , a Role for Liposomes". *Inmunol. Today* , 11, 89-97 (1990).

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems, Trends in Biotechnology, 13: 527-537, (1995).

GREGORIADIS, G., Mc CORMACK, B., OBRENOVIC, M., SAFFIE, R., ZADI, B., y PERRIE, Y. Vaccine entrapment in liposomes, Methods, 2: 156-162, 19 (1), (1999).

GUIOT, P. y COUVREUR, P. Quantitative Study of the Interaction Between Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles and Mouse Peritoneal Macrophages in Culture. J. Pharm. Belg., 38, 130-134 (1983).

GURNY, R., GONZALES, M. A., BANKER, G. S. y KILDSIG, D.O. The Determination of the entrapment efficiency for a molecular dispersion system. Drug Dev. Ind. Pharm. , 5, 437, (1979).

GUTCHO, M. H. "Microcapsules and Microencapsulation Techniques". Chemical Technology Review No. 73. Noyes Data Corporation. New Jersey , pág 259-261 (1979).

GUZMAN, M., ABEGER, A. y SELLES, E. Sistemas transportadores de fármacos: Liposomas. Farm. Clin. 4, pp 111-129 (1987).

GUZMAN, M. "Los liposomas, vehículos de medicamentos cardiotónicos. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia de Alcalá de Henares, (1995).

GYVES, J. W. ENSMINGER, W. D., VAN-HARKEN, D., NIEDERHUBER, J. y STELSON, P. Clin. Pharmacol. Ther., 34, 259-265 (1983).

HADGRAFT, J.: Variables associated with a kinetic analysis of skin penetration. Pharmacology and the skin. Basilea, karger, pp 154-162 (1987).

HALLER, P. H. Empleo y Utilidad de los Lípidos y Fosfolípidos en Cosmética. NCP 146, 14-18 (1987).

HALLIWELL, B. y GUTTRIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219 pp. 1-14 (1984).

HANEL, H., BRAUN, B. y NEDJEKO, J. Comparative activity of a liposomal and a conventional econazole preparation for topical use according to a guinea pig tinea model. BRAUN-FALCO, O. y KORTING, H. C., eds. Liposomes dermatics, pp 251-257 (1992).

HANIN, I. y PEPEU, G. Eds. Phospholipids: biochemical, pharmaceutical and analytical considerations. Nueva York: Plenum Press, (1990).

HARRIS, M. S. Preparation and Release Characteristics of Potassium Chloride Microcapsules. J. Pharm.Sci., 70, 391-394 (1981).

HARRIS, L., BATIST, G., BELT, R., ROVIRA, D., NAVARI, R., AZARNIA, N., WELLES, L. y WINER, E. Liposome encapsulated doxorubicin compared with conventional

doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. Cancer. 94(1):25-36 (2002).

HARSANYI, B. B., HILCHIE, J. C. y MEZEI, M. Liposomes as Drug Carriers of Oral Ulcers. J. Dent. Res. 65, pp 1.113-1.141 (1986).

HAUSER, H. Methods of preparation of lipid vesicles: Assessment of their suitability for drug encapsulation, 11: 274-277 (1982).

HAYAT, M. A. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Book. Third Edition. Macmillan press published, 251-253 (1989).

HEATH, T.D., LOPEZ, N.G. y PAPAHA DJOSPOULOUS, D. The effect of liposome size and surface charge on liposome mediated delivery of methotrexate- γ -aspartate to cells in vitro. Biochim. Biophys. Acta 820 pp. 74-84 (1985).

HILL, K. J. KASZUBA, M. CREETH, J. E. y JONES, M. N. Reactive Liposomes Encapsulating a Glucose Oxidase-Peroxidase System with Antibacterial Activity. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes. 1326, 37-46 (1997).

HINKLE, G. H., BORN, G. S., KOESSLER, W. V. y SHAW, S. M. Preferential Localization of Radiolabeled Liposomes in Liver. J. Pharm Sci. 67, 795-798 (1978).

HOFLAND, H.E.J., BOUWSTRA, J.A., SPIES, F., BODDE, H.E., NAGELKERKE, J.F., CULLANDER, C. y JUNGINGER, H.E. Interactions between non-ionic surfactant vesicles and human stratum corneum in vitro. J. Liposome Res. 5, 241-263 (1995)

HOLGADO, M.A., FERNANDEZ-AREVALO, M. y RABASCO, A.M. Sistemas de liberación controlada (II). Métodos de obtención farmacocinéticos. Ind. Farm. V(2):67-79 (1990).

HU, Z., NIEMIEC, S. M., RAMACHANDRAN, C., WALLACH, D. F. H. y WEINER, N. Topical Delivery of Cyclosporine-A from Nonionic . Liposomal Systems-An in-Vivo in-Vitro correlation . STP Pharma Sciences, 4, 466-469 (1995).

HUANG, C. H. Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 344-352 (1969).

HUI, YN., LIANG, HC., CAI, YS., KIRCHHOF, B. y HEIMANN, K. Corticosteroids and daunomycin in the prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy induced by macrophages. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:109-114 (1993).

HUNT, C. A. y TSANG, S. α -Tocopherol Retards Autoxidation and Prolongs the Shelf life of Liposomes *Int. J. Pharm.*, 8, 101-110 (1981).

HWANG, B. Y., CHUNG, S. J., LEE, M. H. y SHIM, C. K. In vitro skin permeation of Nicotine from Proliposomes. *Journal of Controlled Release*, Vol. 49, 177-184 (1997).

IDSON, B. Vehicle effects in percutaneous absorption. *Drug metab. Rev.* 14, 207-222 (1983).

ISHIZAKA, T., ARIIZUMI, T., NAKAMURA, T. y KOISHI, M. Preparation of Serum Albumin Microcapsules. *J. Pharm. Sci.*, 74, 342-344 (1985).

ISHIZAKA, K., TSUJINO, R., HAMADA, M., TOYADA, N. y IWASAKI, Y.: Stabilized liposomes with phospholipid polymers and their interactions with blood cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2002)

JACOBS, M., MARTIN, G.P. y M.C. Effects of phosphatidylcholine on the topical bioavailability of corticosteroids assessed by human skin blanching assay. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 829-833 (1988).

JAYARAMAN, S. C., RAMACHANDRAN, C. y WEINER, N. Topical Delivery of Erythromycin from Various Formulations-An in-Vivo Hairless Mouse Study. *J. Pharm. Sci.*, 85, 1082-1084 (1996).

JIA, L., GARZA, M., WONG, H., REIMER, D., REDELMEIER, D., CAMDEN, JB. y STEVE, D. Pharmacokinetic comparison of intravenous carbendazim and remote loaded carbendazim liposomes in nude mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 28, 1, 65-72 (2002).

JULIANO, R. L. "Drug Delivery Systems".Oxford University Press.New York, pág. 3 (1980).

JULIANO, R. L. Liposomes as a Drug Delivery Systems.*Trends in Pharmacol. Sci.*, 39-41 (1981).

JULIANO, R. L. Liposomes as drug carriers in the therapy of infectious diseases.*Horiz in Biochem and Biophy*, 9, 249-279 (1989).

JUNINGER, H. E., HOFLAND, H. E. J., BOUWSTRA, J. A. Liposomes and noisomes: Interactions with human skin. *Cosmet. And toiletries*, 106, pp45-50 (1991).

KANKE, M., SMECINSKI, I. y DE LUCA, P. P. J. Parenter. *Sci. Technol.*, 37, 210-217 (1983).

KATAHIRA, N., MURAKAMI, T., SHIZUKA, K., YATA, NOBORU. y TACAÑO, M.: Enhancement of Topical Delivery of a Lipophilic Drug from Charged Multilamellar liposomes. *Journal of drug targeting* (1998).

KATO, A., ISHIBASHI, Y. y MIYAKE, Y. Effects of egg lecitin yolk lecitin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39, 399-400 (1987).

KAWASHIMA, Y., LIN, S.Y., KASAI, A., TAKENAKA, H. y HIROSE, H. Drug Release Properties of the Microcapsules of Adriamycin Hydrochloride with Ethylcellulose Prepared by a Phase Separation technique. *Dev. Ind. Pharm.*, 10, 467-479 (1984).

KELLEY, I. W. Liposome model membranes for modern medicine. *Manuf. Chem. Aerosol News*, 51, 43-44 (1980).

KENNDY, FP. Recent developments in insulin delivery techniques. Current status and future potential. *Drugs* 2: 213-227 (1991).

KIDRIC, J. Application of NMR Spectroscopy to Model Membrane Systems. *Farm. Vestr.*, 31 (3), 223-231 (1980).

KIM, S. y MARTIN, G. M. Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 646: 1-9 (1981).

KIM, M. K., CHUNG, S. J., LEE, M. H., CHO, A. R. y SHIM, C. K. Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *Journal of controlled release*, Vol. 46 (3) pp 243-251 (1997).

KIM, C. K., HAIDER, Kh., CHOI, S. H., CHOI, E. J., AHN, W. S. y KIM, Y. B. Non-viral vector for efficient gene transfer to human ovarian adenocarcinoma cells. *Gynecologic oncology*, Vol. 84, 1, pp 85-93 (2002).

KIMURA, T., NAGAHARA, N., HIRABAYASHI, K., KUROSAKI, y NAKAYAMA, T. Enhanced percutaneous penetration of flufenamic acid using lipid disperse systems containing glycosylceramides. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, pp 454-457 (1989).

KIRBY, C. Application of liposomes, *Biotechnology*, 2, 979, (1984).

KLEGERMAN, M.E., HAMILTON, A.J., HUANG, S-L., TIUKINHOY, SD., KHAN, A.A., Mc DONALD, R.C. y Mc PERSON, D.D. Quantitative immunoblot assay for assessment of liposomal antibody conjugation efficiency. *Analytical Biochemistry*, vol.300,1,pp.46-52 (2002).

KORTING, H. C., SCHMID, M. H., HARTINGER, A., MAIERHOFER, G., STOLZ, W. y BRAUN-FALCO, O., Evidence of the phagocytosis of intact oligolamellar liposomes by human keratinocytes in vitro and consecutive intracellular disintegration. *J. Microencapsul.*, 10, pp 233-228 (1993).

KOST, J. y LANGER, R. Magnetically modulated drug delivery systems. *Pharm. Int.* , 7, 60-63 (1986).

KREUSCHNER, K. Different Liposome Preparation Techniques, in “Liposomes as Drug Carriers”. SCHMIDT, K. H. Ed, Kurzt-Deuts. Biblio. Stuttgart, pp 8-25 (1986).

KREUTER, J. Physicochemical Characterization of Polyacrylic Nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 14, 43-58 (1983).

KULKARNI, S.B. y VARGHA-BUTLER, E.I. Study of liposomal drug delivery systems. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 4, Issue 2, 77-85, (1995).

KUNIKAZU, M., KAZUO, M., y MOTOHARU, I. Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int. J. Pharm.*, 15, 201(1): 37-49 (2000).

LASCH, J. y WOHLRAB W. Dermatológica 174, 18 (1987).

LASCH, J., LAUB, R. y WOLHRAB, W. How deep do intact liposomes penetrate into human skin. J Control. Release, 18, pp 55-58 (1991).

LASIC, D. D. Liposomes: Preparation and characterization. Farm Vestr., 31, 183-186 (1980).

LASIC, D. D., SENTJURC, M., NEMEC M., SRAMEL, V. y SCHARA, M. Incorporation of the biologically active materials into liposomes. Farm. Vestr., 31, 219-222 (1980).

LASIC, D. D. Liposomes: From physics to applications. Elsevier (1993).

LAUTENSCHIAGER, H. “ Liposomes in Dermatological Preparations”. Coms & Toil., 105, 63-72 (1990).

LAVERMAN, P., ZALIPSKY, S., OYEN, W. J., DAMS, E. T., STORM, G., MULLAH, N., CORSTENS, F. H. y BOERMAN, O. C. Improved imaging of infections by avidin-induced clearance of ^{99m}Tc-biotin-P.E.G. liposomes. J. Nucl Med., 41, 912-918 (2000).

LAW, S. L., HUANG, K. J. y CHIANG, C. H. Acyclovir-containing liposomes ocular delivery. Journal of Controlled Release, Vol. 63, 135-140 (2000).

LEHNINGER, AL. Bioquímica. Barcelona: Omega, 293-297 (1988).

LEL'SKY, V.M., ZAVEDEIA, T.L., BOHATYR'OVA, O.V. y KOLESNIKOVA, S.V. Effects of ionol, alpha-tocopherol, and lipin on the processes of peroxidation in the syndrome of prolonged crush. Fiziolohichniy Zhurnal, Vol. 46 (6) pp.22-27 (2000).

LEYH, D., COUVREUR, P., LENAERTS, V., ROLAND, M. y SPEISER, P. Etude du Mecanisme de Dégradation des Nanoparticules de Polycyanoacrylate d'alkile. Labo Pharma Probl. Tech., 32, 100-104 (1984).

LIEB, L. M., RAMACHANDRAN, C., EGBARIA, K. y WEINER, N., Topical delivery enhancement with multilamellar liposomes into pilosebaceous units: I. In vitro evaluation using fluorescent techniques with the hamster ear model. J Invest. Dermatol., 99, pp108-113 (1992).

LIN, H. H., KO, S. M. HSU, L. R. y TSAI, Y. H. The preparation of norfloxacin-loaded liposomes and their in-vitro evaluation in pig's eye. Pharm. Pharmacol. 48, pp 801-805 (1996).

LOPEZ – BERENSTEIN, G. Liposomes as carriers of antifungal drugs. Ann NY Acad Sci., 544, 590-597(1988).

LOPEZ – GARCIA, F., VAZQUEZ – AUTON, JM., GIL, F., LATOORE, R., MORENO, F., VULLALAIN, J. y GOMEZ – FERNÁNDEZ, JC. Intra-articular therapy of experimental arthritis with a derivate of triamcinolone acetone incorporated in liposomes. J. Pharm Parmacol 45, 576-578 (1993).

LONGER, MA. y ROBINSON, JR. Sistemas de liberación sostenida de drogas. En: Remington. Farmacia. Buenos Aires: Panamericana, 2240-2264 (1987).

MAES, D. Marenus, K. y Smith, W. P. "New Advances in Phoprotection". Cosm. & Toil, 105, 45-52 (1990).

MAGGI, G. C., SASSI, A. y BONNET, J. P. Microencapsulation et problèmes Therapeutiques des ans 80. II Congres International de Technologie Pharmaceutique. Tomo II. París, 1980, pág 19.

MAIBACH, H.I. In vivo percutaneous penetration of corticosteroids in man and unresolved problems in their efficacy. *Dermatologica (Supl. I)* 152, 11-25, 1976.

MAIERHOFER, G. Introducción a una Nueva Tecnologia y Descripción de Técnicas Preparativas. *Farm. Clín.*, 5, 658-680 (1988).

MARGEL, S. y HIRSH, J. Chelation of Mercuri by Polymercaptal Microspheres: New Potential Antidote for Mercury Poisoning. *J. Pharm. Sci.*, 71 , 1030-1034 (1982).

MARKELLO, T. y LICHTEMBERG, M Structural characteristics of phospholipids multilamellar liposomes. *J. Pharm. Sci.*, 73, 122-125 (1984).

MARTI, E., CEMELI, J. y DEL POZO, A. Aplicación de técnicas biofísicas no invasivas en la determinación de la capacidad de hidratación cutánea de liposomas PML. *Ciencia Pharm.* 8 (1): pp 31-37 (1998).

MASINI, V., BONTE, F., MEYBECK, A. y WEPIERRE, J. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretionin in liposomes or gel j. *Pharm. Sci.* 82, pp 17-21 (1993).

MATTENBERGER-KREBER, L. *Experientia*, 32, 1522 (1976).Ref. SCHNEIDER.

MAYHEW, E., NICKOLOPOULOS, G. T., KING, J. J. y SICILIANO, A.A. A Practical Method for the Large Scale Manufacture of Liposome. *Pharm. Manufact.*, 2, pp 18-21 (1985).

Mc DONALD, R.C., Mc DONALD, R.I., Menco, B.Ph. M., TAKESHITA, N.K., SUBBARAO, N.K. y HU, L. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061 pp.279-303 (1991).

Mc MULLEN, J. N., NEWTON, D.W. y BECKER, C.H. Pectin-gelatin complex coacervates part 2. Effect of microemulsulates sulfamerazine on size, morphology, recovery and straction of water dispersible microglobules. *J. Pharm. Sci.*, 73, 1799-1803 (1984).

MEDINA, M. M., CEREZO, A. y SANCHEZ-MORCILLO, J. Los liposomas: Revisión bibliográfica. *Farm. Clin.*, 1, 204-219 (1983).

MEDINA, M. M. CEREZO, A., SANCHEZ –MORCILLO, J. y FERNÁNDEZ-FELJOO, M. A. Liposomas transportadores de mebendazol: Elaboración y estudio de la estabilidad y liposomas transportadores de vitamina B₆ : Elaboración y caracterización. XXIX Congreso de A.E.F.H. Tomo I. Alicante, pag. 383-391, 399-408 (1984).

MEDINA, M. M., CEREZO, A. y SANCHEZ-MORCILLO, J. Elaboración, caracterización y estudio de la estabilidad de los liposomas. *An.Real Acad. Farm.*, 52, 251-264 (1986).

MEDINA, M. M., CEREZO, A. y SANCHEZ-MORCILLO, J. Preservation of liposomes through freezing study as cryoprotective effect developed by various saccharides. 5ème Congrès International de Technologie Pharmaceutique . Vol.II .París, pág 238-246 (1989).

MERKLE, H. P. *Pharm. Int.*, 5, 88-91 (1984).

MEZEI, M. y GULASEKHARAM, V. Liposomes , a Selective Drug Delivery Sistem for the Topical Route of Administration. I, Lotion Dosage form. *Life Sci.*, 26, 1473-1477 (1980).

MEZEI, M. y GULASEKHARAM, V. Liposomes, a Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration. II, Gel Dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 473-474 (1982).

MEZEI, M. “ Liposomes as a Skin Drug Delivery Systems”, in *Topics in Pharmaceutical Sciences*. D.D. Breimer and P. Speiser, Eds., Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, pág.345-358 (1985).

MEZEI, M. Multiphase liposomal drug delivery system. Brevet U.S. N°4, 761,228, (1988).

MEZEI, M. Administration of drug with multiphase liposomal drug delivery system. Brevet U.S., 4, 897,269 (1990).

MEZEI, M. Liposomes as a skin drug delivery system. Breimer DD, ed. *Pharmaceutical sciences*. pp 345-358 (1992).

MEZEI, M. y SVEINSSON, S. J. In vitro oral mucosal absorption of liposomal triamcinolone acetonide. *Pharm Res.*, 9, 1359-1361 (1992)

MEZEI, M. Techniques for the estudy of liposome-skin interaction., In: GREGORIADIS, G., (ED), *liposome technology* ., 91-106, CRC press, Boca Raton , Florida (1993).

MICHELLAND-HENRY, S., POLY, P.A., PUISIEUX, F., DELATTRE, J. y LIKFORMAN, J. Etude du comportement des liposomes lors d`expériences de congélation/décongélation et de lyophilisation, influence des cryoprotecteurs. 3ème Congrès International de Technologie Pharmaceutique, Paris, APGI, 1, 223-233 (1983).

MONTAGNA, W. *The Structure and Function of Skin* 2nd. Ed. Academy Press N.Y. pp 154-454 (1961).

MORA, M. y CASADO, F. Sistemas modelo y metodologías para el estudio de peroxidación lipídica y para la evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales. NPC, N° 261, pp 5-10, (2002).

MOTYCKA, S., NEWTH,C.J.L. y NAIRN, J.G. Preparation and Evaluation of Microencapsulated and Coaled ion-Exchange Resin Beads Containing Theophylline. J. Pharm. Sci., 74, 643-646 (1985).

MOUFTI, A., WEINGARTEN, C., DESJEUX, J. F., LUONG, T. T. y DURANG,G. Administration orale de liposomes d'insulina. Etude de l'influence du mode d'administration. II Congès International de Technologie Pharmaceutique. Tomo IV. París,1980, pág. 9-19.

NAKANISHI, N. y NOGUCHI, A. Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivate. Science Direct, 197-207 (2001).

NICOLAU, C. Les liposomes: Agents Therapeutiques de Demain. La Recherche, 12, 748-749 (1981).

NISHIHATA, T., KOTERA, K. NAKANO, Y. y YAMAKAZI, M. "Rat Percutaneous Transport of Diclofenac and Influence of Hydrogenated Soya Phospholipids". Chem. Pharm. Bull., 35, 3807-3812 (1987).

NIXON, J. R. y HASSAN, M. The Effect of Preparative Technique on the Particle Size of Thiabendazole Microcapsules. J. Pharm. Pharmacol., 32, 856-857 (1980).

NIXON, J. R. In vitro and In vivo Release Microencapsulated Chlorothiazide. J. Pharm. Sci., 70, 376-378 (1981).

OLSON, F., HUNT, C.A., SZOKA, F. C., VAIL, W. J. y PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion Through Polycarbonate Membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 9-23 (1984).

OSTRO, M. J. y CULLIS, P. R. Use of liposomes as injectable drug delivery system. *Am J Hosp. Pharm.*, 46, pp 1576-1587 (1989).

PAPAHAADJOPOULOS, D., VAIL, W. J., JAKOBSON, K. y POSTE, G. Colcheate Lipid Cylinders: Formation by fusion of Unilamellar Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 483-491 (1975).

PAPAHAADJOPOULOS, D., ALLEN, T. M., GABIZON, A. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeut efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 88, 11460-11464 (1991).

PATEL, H. M. Liposomes as controlled release system. *Biochem. Soc. Trans.*, 13, 513-516 (1985).

PAVELIC, Z., SHALKO-BASNET, N. y SCHUBERT, ROLF. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 219, Issues 1-2, pp 139-149 (2001).

PECAR, S. Liposomes in ERS Spectroscopy. *Farm. Vestr.*, 31 (3), 237 (1980).

PEER, D. y MARGALIT, R. Physicochemical evaluation of a stability-driven approach to drug entrapment in regular and in surface-modified liposomes. *Arch Biochem Biophys*, 383, 185-190 (2000).

PEREZ – CULLELL, N., CODERCH, L., DE LA MAZA, A., PARRA, J.L. y ESTERLICH, J. Influence of the fluidity of liposome compositions on percutaneous absorption. *Drug Delivery*, Vol. 7, No. 1 (2000).

PERRETT, S., GOLDING, M. y WILLIAMS, W. P. A simple method for preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 154-161 (1991).

PHILLIPS, M.I. Gene therapy for hypertension: sense and antisense strategies. *Expert-opin-biol-ther.* 1(4):655-662 (2001).

PIETERSZ, G.A., APOSTOLOPOULOS, V., Mc KENZIE, IF., Generation of cellular immune responses to antigenic tumor peptides, 1: S Cryz, SS Davis, G Gregoriadis, JA Grimaud, P Kourilsky, ME Selkirk, M slaoui, GL Smith, *Vaccine delivery systems*, *Vaccine* 14: 7, 665-690 (1996).

PIGDEON, CH. y HUNT, A. Calculation Number and Surface Area of Liposomes in any Suspension. *J. Pharm. Sci.*, 70, 173-176 (1981).

PIPAN, N. Internalization of liposomes. *Farm. Vestr.*, 31, 218-222 (1980).

PONS GIMIER, JL y PARRA, J. *Ciencia cosmética. Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos*, Madrid (1995).

POSTE, G. y PAPAHAADJOPOULOS, D. Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells. Influence of vesicle lipip composition on mechanism of vesicle incorporation into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1603-1607 (1976). Ref. de Gimini y cols.

POTS, R. O. stratum corneum hidratação: experimental techniques and interpretation of results. J. Soc. Cosmet. Chem. 37, pp 9-33 (1986).

POULSEN, B.J., YOUNG, E. y COQUITA, V. J. Pharm. Sci. 57, 928 (1968).

PRINGENT, D. y ALOUF, J. E. Labo. Pharma. Probl. Tech., 281, pp 910-913 (1978).

PUISIEUX, F. Les Liposomes: Classification et Obtention. Labo Pharma Probl. Tech., 281, 899-904 (1978).

PUISIEUX, F., POLY, P. A. y SALIN-DROUIN, D. Les liposomes, formes pharmaceutiques du futur. Labo Pharma Probl. Tech., 30, 133-151 (1982).

PUISIEUX, F. Les liposomes. Ann. Pharm. Farn., 41 (1), 3-13 (1983).

PUISIEUX, F. Vecteurs micro et nanoparticulaires, in “Formes pharmaceutiques nouvelles.” Technique et Documentation (Lavoisier). Paris, pág 465-481 (1985).

PUISSIEUX, F. y DELATTRE, J. Les liposomes. Ed. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris, (1985).

PUISIEUX, F. y POLY, P. A. Problèmes technologiques posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses, encapsulation, stérilisation, conservation In “Les liposomes, applications thérapeutiques” Puisieux F. y Delattre J. (Eds). Technique & Documentation, Paris, (1985).

QUIGLEY, J. W. y BUCKS, D. A. Reduced Skin irritation with tretinoin containing polyolprepolymer-2, a new topical tretinoin delivery system: a summary of preclinical and clinical investigations. J. Am Acad. Dermatol. 38 (4) 5510 (1998).

RAJA NARRES, R.A. y UDUPA, N. Niosome encapsulated bleomycin. *Pharma Sciences* 6 (1) 61-71 (1996).

RAMBOURG, R., LEVY, J., PUISIEUX, F. y LEVY, M. C. II Congres International de Technologie Pharmaceutique. Tomo III. París, pág. 5-14 (1980).

RANG, H. P., DALE, M. M. y RITTER, J. M. *Pharmacology*. Ed. Churchill-Livingstone. Third Edition, 256-321, (1995).

RANGELOVA, D. S., ZHELEV, Z., BAKALOVA, R. A., TIURIN, V. A., DENISOVA, N. A., SERBINOVA, E. A., PARKER, L. y KAGAN, V. E. Intermembrane transport and antioxidant action of alpha-tocopherol in liposomes, *Biull Eksp Biol Med*, 109:37-39, 1990.

RAK, J., VITKOVA, M., CHALABALA, M. y HELIOVA, M. Study on Drug Microforms part II. Biopharmaceutical evaluation ethylcellulose microcapsules with sulphamethoxydiazine. *Farm. Obz.*, 53, 445-454 (1984).

RATCLIFFE, J. H., HUNNEYBALL, I. M. WILSON, C. G., SMITH, A. y DAVIS, S.S. *Microsphere Systems for Intraarticular Drug Administration in "Microspheres and Drug Therapy"*. Elsevier Science Pub. B.V. Amsterdam. Pág. 345-346 (1984).

Real Farmacopea Española. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, secretaría general técnica, en colaboración con el Boletín Oficial del Estado, 1714-1715, Madrid (1997).

RECASENS, M. M. Tesis Doctoral: "Fotoenvejecimiento: prevención y recuperación con sustancias encapsuladas en liposomas aplicadas tópicamente". Univ. Autónoma, Barcelona (1995).

RECASENS, M. M., TRULLAS, C., COLL, J., PELEJERO, C. y SABES, M. Estudio comparativo de la eficacia fotorreparadora de la vitamina A palmitato en dos formas galénicas: crema y liposomas. *Industria Farmacéutica*, pp 65-69 (1998).

REVILLA, R., RUIZ, F. y MACIAS, M. Manual de Biofarmacología y Farmacología. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid (1980).

REYNOLDS, J. E. F. Martindale, The Extra Pharmacopoeia. 29 Ed. The Pharmaceutical Press . London, 1989, pág. 426-429.

RICHARDSON, J.L., WHETSTONE, J., FISHER, A.N., WATTS, P., FARRAJ, N. F., HINCHCLIFFE, M., BENEDETTI, L. y ILLUM, L. Gamma-scintigraphy a: novel method to study distribution and retention of a bioadhesive vaginal delivery in sheep. *J. Control. Release* 42, pp 133-142 (1996).

RIVAS, I. P., GIL-ALEGRE, ME., CAMACHO, MA. y TORRES-SUAREZ, A. I. Elaboración de microcápsulas del insecticidacipermetrina mediante polimerización interfacial. V Congreso de la SEFIG, pag 73-74 (2001).

ROLLAND, A., COLLET, B., LE VERGE, R. y TOUJAS, L. Blood clearance and organ distribution of intravenously administered polymetacrylic nanoparticles in mice. *J. Pharm. Sci*; 78: 481-484 (1989).

ROWE, Tc., MEZEI, M. y HILCHIE, J. *The Prostate*, 5, 346-347 (1984).

RYMAN, B. E. Advances in new drug delivery systems: the liposomes. *Labo Pharma Probl. Tech.*, 298, 363-364 (1980).

SADZUKA, Y., HIRAMA, R. y SONOBE, T. Effects of intraperitoneal administration of liposomes and methods of preparing liposomes for local therapy, *Toxicology Letters*, Volume 126, 2: 25, 2002.

SAINZ, MC., ELORZA MA., ELORZA, B. y CHANTRES, JR. Liposomas: Estado en cuestión III. Aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. *Ind. Farm*, IV (1), pp 107-112 (1989).

SANTOS, B. y GUERRERO, MD. Investigación y desarrollo de nuevos sistemas de administración de medicamentos. *Administración de Medicamentos*, pp. 329-340 (1994).

SANTUCCI, E., CARAFA, M., COVIELLO, T., MURTAS, E., RICCIERI, FM., ALHAIQUE, F., MODESTI, A. y MODICA, A. Vesicles from polysorbate 20 and cholesterol. A simple preparation and a characterization. *Pharma Sciences* 6 (1) 29-32 (1996).

SATLAC, A. Liposomes: New Potential form of Drug. *Farm.Vestr.*, 31, 197-202 (1980).

SCHAFFER-KORTING, M., KORTING, H. C. y BRAUN-FALCO, O. "Liposome preparation: a step forward in topical drug therapy of skin disease. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 21, 1271-1275 (1989).

SCHEUPLEIN, R. J. Properties of the Skin as a membrane. *Adv. Biol. Skin*, 12, pp 125-152 (1972).

SCHINDLER, H. "Exchange and Interactions Between Lipid Layers at the Surface of Liposome Solution". *Biochim. Biophys. Acta*, 555, 316-336 (1979).

SCHNEIDER, M. Progrès Récents dans la Préparation de Liposomes. *Labo Pharma Probl. et Techniques*, 281, 907 (1978).

SCHNEIDER, M., MATTENBERGER-KREBER, L. y LAMY, B. Non publié. Ref. de Schneider, M (1978).

SCHRAMLOVA, J., BLAZEK, K. BARTACKOVA, M., OTOVA, B., MARDESICOVA, L., ZIZKOVSKY, V., HULINSKY, V., y HULINSKA, D. Electron-Microscopic Demonstration of the Penetration of Liposomes Through Skin. *Folia Biologica*, 43, 165-169 (1997).

SCHREIER, H. y BOUWSTRA, J. Liposomes and niosomes as drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *J. Control. Rel.* 30, pp 1-15 (1994).

SEFTON, M.V., BROWN, L.R. y LANGER, R.S. Ethylene-Vinyl Acetate Copolymer Microspheres for Controlled Release of Micromolecules. *J. Pharm. Sci.*, 73 1859-1861 (1984).

SEIJO, B. Los liposomas. En: Vila JL., Seijo B, Alonso MJ, Torres D (eds.). *Modernos métodos de administración de medicamentos*. Madrid: Farmaindustria, 39-122 (1990).

SEIJO, B., GUTIERREZ, C. y VILA, J.L. Nuevas perspectivas en el desarrollo de liposomas: Aplicaciones terapéuticas. *Farm. Clin.* 8, pp 601-613 (1991).

SEIJO, B., GUTIERREZ DE RUBALCAVA, C., y VILA JATO, J.L. Liposomas para la administración tópica. *Industria farmacéutica*. 85-91 (1992).

SENTJURC, M. *Farm. Vestr.*, 31, 211-217 (1980).

SEVANIAN, A. y HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* 5 pp.365-390 (1985).

SHAO, J., y MA, J.K.H. Characterisation of mannosylphospholipid liposome system for drug targeting to alveolar macrophages. *J. Drug Deliv. Target. Ther. Agents* 4 pp.43-48 (1997).

SHARATA, H .H. y KATZ, K. H. Liposomes. *International Journal of Dermatology*, 35, 761-769 (1996).

SKALKO, N., CAJKOVAC, M. y JALSENJAK, L. Liposomes with metronidazole for topical use: the choice of preparation method and vehicle. *Liposome Res.* 8, pp 283-293 (1998).

STOYE, I., SCHRÖDER, K. y MÜLLER-GOYMANN, C. C. Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles-physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 46 (2), pp 191-200 (1998).

STRAUSS, G. “Liposomes: from Theoretical Model to Cosmetic Tool” *J.Soc. Cosmet. Chem.*, 40, 51-60 (1989).

STRIASNE, S .J. “Human Skin: Moisturizing Mechanism and Natural Moisturizers”. *Cosm. & Toil.*, 93, 37-41 (1978).

STRYER, L. “Bioquímica.” *Introducción a las Membranas Biológicas.* Ed. Reverté, Barcelona, pág. 227 (1976).

SUAREZ, S., GONZALEZ-ROTHI, R. J., SCHREIER, H. y HOCHHAUS, G. Effect of dose and release rate on pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetate phosphate. *Pharm. Res.* 15 (3), pp 461-465 (1998).

SUD, I. J., CHOU, D. L. y FEINGOLD, D. S., Effects of free fatty acids on liposome susceptibility to imidazole antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, pp 706-711 (1979).

SUZUKI, K. y SAKON, K. "The Application of Liposomes to Cosmetics". *Cosm. & Toil.*, 105, 65-78 (1990).

SZOKA, F. y PAPAHAJIOPOULOS, D. Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 4194-4198 (1978).

TAGAWA, M., SHINOZAKI, K., KURATA, Y., MATSUMOTO, K. y TABATA, Y. Applications of Hydrogenated Lecithin for Cosmetics, *JFSCC* 1, pág. 335 (1986).

TARDI, M., DRECHSLER, M., BACHMANN, D., RESZKA, R., BAUER, K. H., y SCHUBERT, R. Three-dimensional liposome networks: freeze fracture electron microscopical evaluation of their structure and in vitro analysis of release of hydrophilic markers. *Adv. Drug Delv. Rev.* 24, pp 161-164 (1997).

The United States Pharmacopoeia (USP 23). United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, MD, pág 1575, (1995).

TORRADO, J.J. y CADORNIGA, R. Nuevos sistemas de administración de medicamentos. Vectorización. *CIF*;8: 242-248 (1989).

TOUITOU, E., DAYAN, L., BERGELSON, L., GODIN, B. y ELIAZ, M. Ethosomes- novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, Vol 65(3), pp 403-418 (2000).

TURPEIN, M.: Influence of age and severity of dermatitis on the percutaneous absorption of hydrocortisone in children. *Br. J. Dermatol.* 118, pp 517-522 (1988).

USTER, P. S. Liposome-base vehicles for topical delivery. *Liposome Technology*, 16, pp 327-347 (1987).

VALENTA, C., WANKA, M. y HEIDLAS, J. Evaluation of a novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *J. Control. Rel.* 63, pp 165-173 (2000).

VALERO, J., ANGUELA, N., EGEA, M^a A., GAMISANS, F. y GARCIA, M^a L. Asociación de triamcinolona a polialquilcianoacrilatos. *Industria Farmacéutica*, 87-91, (1994).

VALJAKKA-KOSKELA, R., KIRJAVAINEN, M., MÖNKKÖNEN, J., URTTI, A. y KIESVAARA, J. Enhancement of percutaneous absorption of naproxen by phospholipids. *Int. J. Pharm.* 175, pp 225-230 (1998).

VAN HAL, D., VAN RENSEN, T., JUGENGER, H. y BOUWSTRA, J. Difusión of estradiol from non ionic surfactant vesicles through human stratum corneum in vitro. *Pharma Sciences* 6 (1) 72-78 (1996).

VASILJEVA, O.V., LYUBITSKY, O.B., KLEBANOV, G.I. y VLADIMIROV, Y.A. Effect of the combined action of flavonoids, ascorbate and alpha-tocopherol, on peroxidation of phospholipid liposomes, induced by Fe²⁺ ions. *Membrane and Cell Biology*, vol.14, issue 1 pp.47-56 (2000).

VASSON, M. P., COLOMBAT, A., MADELMONT, J. C., MOREAU, M. F., GODENECHÉ, D. y DELATTRE, J. Etude comparative de l'encapsulation dans les liposomes de nitroso-ureas. Premier Congrès Européen de Biopharmacie et Pharmacocinetique. Vol. I. Clermont-Ferrand, 1981, pág. 381.

VELASCO, A., LORENZO, P., SERRANO, J. y ANDRÉS, F., Farmacología. Ed. Interamericana McGraw-Hill 16ª ed, 431-436, (1993).

VEMURI, S. y RHODES, C. T. Encapsulation of a Water Soluble Drug in a LIPOSOME preparation: Removal of Free Drug by Washing. Drug Development and Industrial Pharmacy, 21 (11), 1329-1338 (1995).

VERMOMORKEN, A. J. , HUKKELHOVEN, M. W., VERMEESCH-MARKLAG, A. M., GOSS, C. M., WIRTZT, P. y ZIEGENMEYER, J. The use of liposomes in the topical application of steroids. J. Pharm, 36, pp 334-336 (1984).

VIRTANEN, J. A., RUONALA, M., VAUHKONEN, M. y SOMERHARJU, P. Lateral organization of liquid-crystalline cholesterol-dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. Evidence for domains with hexagonal and centered rectangular cholesterol superlattices. Biochemistry, 34, pp 11568-11581 (1995).

VORA, B., KHOPADE, AJ. y JAIN, NK. Proniosoma based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception. J. Control. Rel. 54, pp. 11568-11581 (1998).

WADE, A. y WELLER, P.J. Handbook of pharmaceutical excipients. Londres: The Pharmaceutical Press, 1994; 267-268 (1994).

WANG, Q., CAO, X., WANG, J., ZHANG, W., TAO, Q. y YE, Y. Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy. *Chinese-medical-journal*, 113 (3): 281-285 (2000).

WEINER, N. D., BRUNING, W. C. y FELMEISTER, A. J. *Pharm. Sci.* 62, 1202 (1973).

WEINER, N. Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in cutaneous herpes guinea pig model. *Antimicrob agents chemoter*, 33, 1217-1221 (1989).

WERTZ, PH. W. y DOWNING, D. T.: Stratum Corneum: Biological and Biochemical Considerations. *Transdermal Drug Delivery*. M Dekker Inc, pp 1-22 (1989)

WESTER, R. C., MAIBACH, H. I. y BUCKS, D. A. W. In vivo percutaneous absorption of paraquat from hand leg, an forearm of humans. *J. Toxicol. Environ Health*, 14, pp 759-762 (1984).

WESTERHOF, W. "Possibilities of liposomes as dynamic dosage form in dermatology". *Med. Hypothesis*, 16, pág. 283-288 (1985).

WILSCHUT, J. Preparation and properties of phospholipid vesicles in "Methodology of liposomes", Leserman L.D. et Barbet J. (Eds). INSERM, Paris, pág. 9-24 (1982).

WOLHRAB, W., LACHMANN, U. y LASCH, J. Penetration of lecithin form hydrocortisone-containing liposomes into human skin. *Dermatol. Monatsschr.*, 175,344-347 (1989).

YAMAUCHI, R., OZAKI, K., MAKOTO, S. y KATO, K. Iron catalyzed reaction products of α -tocopherol with 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-sn-phosphatidylcholine (13S)-hydroperoxide. *Chemistry and Physics of Lipids* (2002).

YATVIN, M. B., y LELKES, P. I. Clinical prospects for liposomes. Med. Phys., 9, 149-175 (1982).

YU, H. y LIAO, H. M. Triamcinolone Permeation from Different Liposome Formulations Through Rat Skin in-Vitro. Int J. Pharm. Vol. 127, 1-7 (1996).

ZALIPSKY, S., HANSEN, C. B., OAKS, J. M. y ALLEN, T. M. Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of Poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 85, No. 2 (1996).

ZELLMER, S., REISSIG, D. y LASCH, J. Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. Journal of Controlled Release, Vol. 55, 271-279 (1998).

ZHENG, J. M., GU, X. G. y KOO, H. C. Observation of liquid crystal properties of polyphase liposome 139. Yao Hsueh Pao, 942-945 (1982).

ZIEGENMEYER, J. The influence of the vehicle on the absorption and permeation of drugs. En: Dermal and transdermal absorption. Stuttgart, 76-80 (1982).

