



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

**“PREPARACIÓN, Y CARACTERIZACIÓN DE CLONAZEPAM
ENCAPSULADO EN MICELAS MIXTAS Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO
EN LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS CON PENTILENTETRAZOL
EN RATONES *Swiss webster*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

DANIELA SILEM CHÁVEZ RAMÍREZ

ASESOR:

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios dador de la vida y la sabiduría, por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, y demostrarme cada día su infinita misericordia.

A mis padres.

María Magdalena Ramírez González y Daniel Chávez Hernández, por hacer mis sueños realidad con sacrificio constante y su amor infinito. Por enseñarme la importancia de ser una persona que se prepara día con día, por despertar la necesidad y el gusto por la ciencia en mí desde pequeña. A ustedes que sin esperar nada a cambio lo han dado todo por mí.

A mis hermanos.

Jabes Daniel Chávez Ramírez y Berenice Chávez Ramírez por su apoyo incondicional y su amistad invaluable. Por estar siempre ahí presentes celebrando los momentos de intensa felicidad y haciéndonos fuertes en los momentos difíciles. Quiero que siempre recuerden que nunca hay sueño imposible, siempre podemos lograr lo que deseamos. Los amo con todo mi corazón.

Al Biólogo de mi vida.

Roberto, gracias por siempre estar a mi lado, por tu amor que me ilumina y me hace sonreír todos los días. Por estar siempre en todo momento junto a mí durante la realización de este trabajo. Por reír mi risa, por compartir tu vida conmigo, por darme fuerza y motivo aun cuando el cielo toma matices grises. Este es el comienzo de muchos bellos momentos que celebraremos juntos durante nuestra vida. Te Amo, eres mi vida entera.

A mis amigos.

Edgar Santillán, Gabriela Areli, Joel Sosa, por ser más que mis amigos, por su apoyo incondicional por participar en la conclusión de este trabajo de tesis, y durante la carrera, por brindarme su bella amistad.

A mis familiares:

Tios y primos, se que hoy se alegran al ver concluida una etapa importante en mi vida-

A mis abuelas Esther González y Josefa Hernández, mujeres dedicadas al trabajo en quien veo un ejemplo de tenacidad y lucha.

Dedico finalmente este trabajo a Rosa María Ramírez González y Francisco Ramírez González, que aunque ya no estén con nosotros para ver concluido este logro, se que los llenaría de mucha alegría.

AGRADECIMIENTOS

A Dios dador de la vida y la sabiduría, por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, y demostrarme cada día su infinita misericordia.

A mis padres María Magdalena Ramírez González y Daniel Chávez Hernández, por hacer mis sueños realidad con sacrificio constante y su amor infinito. Por enseñarme la importancia de ser una persona que se prepara día con día, por despertar la necesidad y el gusto por la ciencia en mí desde pequeña. A ustedes que sin esperar nada a cambio lo han dado todo por mí.

A la UNAM mi alma mater por haberme dado las herramientas necesarias para forjarme como profesionista, por abrirme un panorama amplio de posibilidades para poder desarrollarme con éxito en la vida. Gracias por llenarme de orgullo al saber que fue preparada en la mejor universidad del país.

Al Dr. David Quintanar Guerrero por permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su tutoría y por su apoyo brindado.

A la Dra. Eva González Trujano por su apoyo y todas las facilidades brindadas para la realización de los experimentos *in vivo* en el laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

A mis profesores y amigos María Eugenia Posada, Esther Revuelta Miranda, Enrique Ángeles Anguiano , Cecilia Barba, Mauricio Vicuña, Rodolfo Cruz, Elizabeth Piñón, que me han llevado en sus hombros para que pudiera ver más lejos y convertirme en una profesional.

Al Químico Analista Edgar Santillán Gómez por brindarme su apoyo, así como reactivos y columnas cromatográficas empleadas para la realización de los experimentos referentes a la cuantificación de fármaco en micelas mixtas.

ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN

1

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
	2.1 Sistema nervioso	5
	2.1.1 Estructura	3
	2.1.2 Función	4
	2.1.3 Organización del sistema nervioso	6
	2.1.4 Sistema nervioso periférico	6
	2.1.5 Sistema nervioso central	7
	2.1.5.1 Encéfalo	7
	2.1.5.2 Corteza cerebral	7
	2.1.5.3 Sistema límbico	8
	2.1.5.4 Diencéfalo	9
	2.1.5.5 Mesencéfalo y tallo encefálico	9
	2.1.5.6 Cerebelo	9
	2.1.5.7 Cerebro composición química, estructura y función	10
	2.1.5.8 Médula espinal	11
	2.2 Neurona	12
	2.2.1 Estructura de la neurona	13
	2.2.2 Diversidad estructural de la neurona	14
	2.2.3 Mielinización	14
	2.2.4 Sustancia gris y sustancia blanca	15

2.3 Células gliales	17
2.4 Neurotransmisión en el sistema nervioso central	19
2.4.1 Canales iónicos	19
2.4.2 Potencial de membrana en reposo	20
2.4.3 Potenciales graduados	20
2.4.4 Potenciales de acción	23
2.4.4.1 Fase de despolarización	24
2.4.4.2 Fase de repolarización	25
2.5 Propagación de los impulsos nerviosos	26
2.5.1 Conducción continua y conducción saltarina	26
2.5.2 Velocidad de propagación de los impulsos nerviosos	26
2.6 Sinapsis	27
2.6.1 Sinapsis eléctrica	28
2.6.2 Sinapsis química	29
2.7 Fármacos que actúan en el sistema nervioso central	30
2.7.1 Neurotransmisores	31
2.7.2 Transmisión GABA	32
2.7.3 Barrera Hematoencefálica.	34
2.7.3.1 Estructura y función	36
2.7.3.2 Mecanismos de transporte en la barrera Hematoencefálica	36
2.7.3.3 Transporte de fármacos en BHE.	39

2.8 Epilepsia	40
2.8.1 Clasificación de las crisis epilépticas	42
2.8.2 Vías de propagación de las crisis epilépticas	44
2.8.3 Naturaleza y mecanismo de las convulsiones	45
2.8.4 Tratamiento farmacológico de la epilepsia	46
2.8.5 Fármacos antiepilépticos	48
2.8.5.1 Mecanismo de acción y clasificación	50
2.8.5.2 Antiepilépticos clásicos o de primera generación	51
2.8.5.3 Antiepilépticos de segunda generación	52
2.8.5.4 Antiepilépticos nuevos o de tercera generación	55
2.8.6 Benzodiacepinas como antiepilépticos	53
2.8.6.1 Actividad terapéutica de las benzodiacepinas	54
2.8.6.2 Mecanismo de acción y receptores para benzodiacepinas	55
2.8.6.3 Farmacocinética de las benzodiacepinas	56
2.8.7 Clonazepam fármaco anticonvulsivo	58
2.8.7.1 Dosis	58
2.8.7.2 Propiedades farmacocinéticas	58
2.8.7.1 Absorción	58
2.8.7.2.2 Distribución	59
2.8.7.2.3 Biotransformación	59
2.8.7.2.4 Eliminación	59
2.8.7.2.5 Mecanismo de acción del clonazepam	59
2.8.7.2.6 Modelos experimentales de epilepsia	60

2.8.7.3 Crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol	61
2.9 Nanotecnología aplicada a sistemas farmacéuticos	63
2.9.1 Nanotecnología	64
2.9.2 Nanomedicina	64
2.9.3 Nanotecnología farmacéutica	65
2.9.4 Aspectos sanitarios de la nanotecnología	67
2.9.5 Transportadores de fármacos submicrónicos	68
2.9.6 Nanotecnología para el transporte hacia el cerebro	69
2.9.7 Nanopartículas lipídicas	70
2.9.7.1 Transportadores lipídicos nanoestructurados	71
2.9.7.1.1 Liposomas	71
2.10 Micelas mixtas de sales biliares	72
2.10.1 Digestión	73
2.10.2 Digestión de lípidos y formación de micelas	74
2.10.2.1 Emulsificación	74
2.10.2.2 Solubilización e hidrólisis	74
2.10.2.3 Estructura de una micela mixta	75
2.10.3 Formación de micelas mixtas	78
2.10.3.1 Ácidos biliares	78
2.10.3.1.1 Glicocolato de sodio	79
2.10.3.2 Fosfolípidos	79

2.11 Métodos de producción de micelas mixtas	81
III. HIPÓTESIS	83
IV. OBJETIVOS	84
V. PARTE EXPERIMENTAL	85
5.1 Materiales y reactivos	85
5.1.1 Equipo	85
5.1.2 Material de laboratorio	86
5.1.3 Reactivos	86
5.1.4 Material biológico.	87
5.2 Metodología general	88
5.3 Pruebas preliminares	88
5.3.1 Principio activo	89
5.3.2 Solubilidad del fármaco	89
5.3.3 Solubilidad de los componentes lipícos	89
5.3.4 Espectro de absorción	90
5.3.4.1 Espectro de absorción del fármaco	91
5.4 Método de coprecipitación	91
5.4.1 Descripción del método de coprecipitación	91
5.4.1.1 Incorporación de fármaco en micelas mixtas	92
5.4.1.2 Preparación de micelas mixtas placebo	92
5.5 Caracterización de micelas mixtas	93
5.5.1 Tamaño de partícula	94

5.5.2 Potencial Z	94
5.5.3 Morfología TEM	95
5.5.4 Estabilidad de micelas mixtas de sales biliares	98
5.5.5 Porcentaje de encapsulamiento	98
5.5.5.1 Filtración en gel para eliminar fármaco libre	99
5.5.5.2 Método de cuantificación de clonazepam	103
5.5.6 Validación del método de cuantificación	104
5.5.6.1 Linealidad	104
5.5.6.2 Precisión	104
5.5.6.3 Especificidad	105
5.5.6.4 Límite de detección	105
5.5.6.5 Límite de cuantificación	105
5.6 Evaluación in vivo	106

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Selección del principio activo a utilizar	108
6.2 Selección de los componentes de la formulación para la preparación de micelas mixtas	109
6.3 Pruebas preliminares	113
6.3.1 Solubilidad	114
6.3.1.1 Solubilidad de los componentes de la formulación para determinar el disolvente a utilizar en el método de coprecipitación	114
6.3.1.2 Solubilidad del fármaco para llevar a cabo su cuantificación	114

6.3.2 Espectros de absorción de los componentes de la formulación para la cuantificación de clonazepam	115
6.4 Método de coprecipitación para la preparación de micelas mixtas de sales biliares	116
6.4.1 Velocidad de agitación	117
6.4.2 Temperatura de formación de micelas mixtas	118
6.4.3 Selección de pH óptimo para la formación de micelas mixtas	119
127	
6.4.4 Efecto de la concentración de fosfolípido y sal biliar en la formación de micelas mixtas	120
6.5 Caracterización de micelas mixtas	122
6.5.1 Tamaño de partícula	124
6.5.2 Potencial Z	127
6.5.3 Análisis morfológico de micelas mixtas encapsulada con clonazepam y placebo por microscopía electrónica de transmisión	134
6.5.3.1 Morfología de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam	134
6.5.3.2 Morfología de micelas mixtas placebo	135
6.5.3.3 Morfología de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam	136
6.6 Estabilidad de micelas mixtas	138
6.6.1 Tamaño de partícula de micelas placebo a través del tiempo	139
6.6.2 Tamaño de partícula de micelas mixtas encapsuladas con fármaco al 0.35 % a través del tiempo	140
6.6.3 Potencial Z de micelas mixtas placebo a través del tiempo	143
6.6.4 Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% a través del tiempo	144
6.7 Determinación del porcentaje de clonazepam encapsulado en micelas mixtas	141

6.7.1 Aplicación de cromatografía de exclusión molecular en la separación de fármaco libre y micelas mixtas conteniendo clonazepam	153
6.7.2 Validación de método analítico para la cuantificación de fármaco contenido en micelas mixtas	155
6.7.2.1 Linealidad y precisión del sistema	155
6.7.2.2 Límite de detección	155
6.7.2.3 Límite de cuantificación	156
6.7.2.4 Especificidad del método	156
6.7.2.5 Determinación cuantitativa de clonazepam	157
6.7.2.6 Precisión del método analítico	159
6.8 Evaluación in vivo	162
6.8.1 Evaluación de latencia a la crisis convulsiva por género	161
6.8.2 Evaluación in vivo de latencia a la crisis convulsiva al administrar micelas mixtas placebo	163
6.8.3 Evaluación dosis-respuesta	167
6.8.3.1 Evaluación de latencia a la crisis mioclónica	168
6.8.3.2 Evaluación de latencia a la crisis generalizada	169
6.8.3.3 Evaluación de la latencia a crisis tónico-clónicas	171
6.8.3.4 Efecto anticonvulsivante de clonazepam encapsulado en micelas mixtas comparado con el efecto producido con la administración de clonazepam clásico.	173
6.8.3.5 Ruta que siguen el clonazepam contenido en micelas mixtas para ejercer su efecto farmacológico.	174

VII. Conclusiones	179
VIII. Perspectivas	181
IX Referencias	183

LISTA DE ABREVIATURAS.

BHE	Barrera hematoencefálica
°C	Grados centígrados
C.V.	Coefficiente de variación
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.
mg	Miligramo
µg	Microgramo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
min	Minuto
m.p.	materia prima
Kg	Kilogramo
PTZ	Pentilentetrazol
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición química aproximada del cerebro.

Tabla 2. Estructura y Función de las Células Gliales.

Tabla 3. Resumen de la farmacología de los receptores no peptídicos en el SNC.

Tabla 4. Composición de la Membrana Basal de la Barrera Hematoencefálica.

Tabla 5. Clasificación de las crisis epilépticas.

Tabla 6. Porcentaje de Éxito de la terapia antiepiléptica.

Tabla 7. Clasificación de Fármacos Antiepilépticos.

Tabla 9. Efectos producidos tras la administración de benzodiazepinas.

Tabla 10 Propiedades farmacológicas y fisicoquímicas del Clonazepam.

Tabla 11. Modelos Experimentales de Epilepsia en Ratas y Ratones.

Tabla 12. Crisis Convulsivas observadas en el Modelo PTZ.

Tabla 14. Propiedades Fisicoquímicas de la L- α Fosfatidilcolina.

Tabla 15. Formulación para la Preparación de Micelas Mixtas Cargadas con Clonazepam.

Tabla 16 Condiciones Cromatográficas para el método de cuantificación.

Tabla 17. Sistemas propuestos para la Curva de Calibración de Clonazepam.

Tabla. 18 Solubilidad del Clonazepam en cloroformo y metanol.

Tabla 19. Solubilidad de los componentes de la formulación en solución metanol-cloroformo al 1%.

Tabla 20. Temperatura de transición para L- α Fosfatidilcolina y Glicocolato de sodio.

Tabla 21. Mecanismos y sitios involucrados en la captación de partículas.

Tabla 22. Tamaño de partícula para micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam.

Tabla 23. Tamaño de partícula de micelas mixtas placebo.

Tabla 24. Potencial Z y estabilidad de suspensiones coloidales.

Tabla 25. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam.

Tabla 26. Potencial Z de micelas mixtas placebo.

Tabla 27. Estabilidad de micelas mixtas placebo reflejada en el tamaño de partícula evaluado durante 31 días.

Tabla 28. Resultados turbidimétricos de la estabilidad de micelas mixtas placebo.

Tabla 29. Tamaño de partícula promedio de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5% a través del tiempo .

Tabla 30. Resultados turbidimétricos de la estabilidad de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5%.

Tabla 31. Potencial Z de micelas mixtas placebo en un periodo de 31 días.

Tabla 32. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5 % a través del tiempo.

Tabla 33. Características del Sephadex G-10157.

Tabla 34. Resultados obtenidos para la optimización del método de filtración en gel, Detección por UV.

Tabla 35. Resultados obtenidos para la optimización del método de filtración en gel, detección por HPLC.

Tabla 36. Resultados de los cromatogramas correspondientes a los puntos referentes a la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam.

Tabla 37. Determinación de clonazepam encapsulado.

Tabla 38. Contenido de clonazepam en micelas mixtas.

Tabla 39. Resultados latencia a la crisis mioclónica.

Tabla 40. Resultados latencia a la crisis generalizada.

Tabla 41. Latencia a crisis tónico-clónicas

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Estructura del Sistema Nervioso.

Fig. 2 División y Funciones del Sistema Nervioso Autónomo.

Fig. 3 Sistema Nervioso Central. (2009). ADAM Imágenes.

Fig. 4 Esquema de la corteza cerebral.

Fig. 5 Partes básicas que forman una neurona.

Fig. 6 Clasificación estructural de las Neuronas.

Fig.7 Distribución de las sustancias gris y blanca en el encéfalo y la médula.

Fig. 8 Distribución de cargas y iones que producen el potencial de la membrana en reposo.

Fig. 9 Generación del potencial sináptico en una neurona.

Fig. 10 Conducción continua en los axones amielínicos y mielínicos.

Fig. 11 Sinápsis Química.

Fig. 12 Mecanismo de Acción del Neurotransmisor GABA.

Fig. 13 Estructura de la Barrera Hematoencefálica

Fig. 14 Clasificación del status epiléptico.

Fig. 15 Expresión clínica de las Crisis Convulsivas. Modelos fisiopatológicos para las convulsiones focales y generalizadas primarias y secundarias

Fig 16. Estructura General de las Benzodiazepinas (R, radical; A, B y C son la distinción de anillos heterocíclicos)

Fig. 18 Estructura química del Clonazepam

Fig. 19 Ilustración que describe el modelo PTZ.

Figura. 20 Escala numérica comparativa de tamaño de diferentes cuerpos

Fig. 21 Modelos de Incorporación de Fármacos en Nanopartículas Lipídicas

Fig. 22 Micela Mixta. Las cabezas hidrofílicas de las grasas forman un centro hidrofóbico que permite el transporte de lípidos en la esfera.

Fig. 23 Emulsificación de las grasas y formación de Micelas Mixtas.

Fig. 24 Estructura de una micela Mixta en solución donde se indican sus componentes.

Fig. 25 Estructura de las moléculas anfipáticas y formación de micelas.

Fig. 26 Diagrama de fases en porcentaje molar de los constituyentes de la bilis, que posibilitan la formación de micelas mixtas.

Fig. 27 Estructura química de Ácidos Biliares.

Fig. 28 Estructura Discoidal de una micela

Fig. 30 Diagrama General del Método de Coprecipitación.

Fig. 31 Rayo que incide en partículas de diferentes tamaños. Se observa que hay áreas de luz brillante y zonas oscuras donde no se detecta la luz.

Fig.32 Luz dispersada que cae sobre el detector.

Fig. 33 Medición del Potencial Z. La magnitud del Potencial Z indica la estabilidad de un sistema coloidal.

Fig. 34 Técnica utilizada para determinar Potencial Z.

Fig. 35 Comparación entre Microscopía electrónica, TEM, y Microscopía Electrónica.

Fig.36 Administración Oral de Micelas Mixtas de Clonazepam e intraperitoneal de PTZ (80 mg/kg).

Fig. 37 Fórmula química de una molécula de glicocolato, se observa una superficie hidrófoba (color gris claro) y los grupos hidrofílicos (señalados en color gris oscuro).

Fig. 38 Barrido de Clonazepam en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. Se observa su máximo de absorción a 315 nm

Fig. 39 Barrido de l-α fosftidilcolina en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. Se observa su máximo de absorción a 315 nm.

Fig. 40 Barrido de Glicocolato de Sodio en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. No se observa señal de interferencia a 310 nm.

Fig. 41 Fosfolípido, sal biliar y fármaco liposoluble en una mezcla metanol/cloroformo al 1%.

Fig 42 Efecto de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula. Las evaluaciones se llevaron a cabo a 25°C.

Fig. 43 Degradación de Soluciones de Micelas Mixtas de Clonazepam a diferentes Concentraciones y valores de pH.

Fig. 44. Tensión superficial en función de la concentración de surfactante (fosfolípido y sal biliar).

Fig. 45 La concentración de componentes lipídicos determina la formación de micelas mixtas

Fig 47. Tamaño de partícula de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam, distribución de tamaño por volumen.

Fig 48. Tamaño de partícula de micelas mixtas placebo, distribución de tamaño por porcentaje de intensidad.

Fig. 49 Comparación del tamaño promedio de partícula entre micelas mixtas encapsuladas con clonazepam y micelas mixtas placebo,

Fig. 50 Potencial Z micelas mixtas encapsuladas con clonazepam.

Fig. 51 Potencial Z micelas mixtas placebo.

Fig.52 Potencial Z determinado a micelas mixtas con Clonazepam y micelas mixtas placebo.

Fig. 53 Comparación potencial Z promedio de micelas mixtas placebo y micelas con clonazepam.

Fig. 54 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% 100 nm 20,000 X.

Fig. 55 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% 50 nm, 30,000 x.

Fig. 56 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam. 15,000 x. A la izquierda, micelas mixtas encapsuladas de 25 nm. .

Fig. 57 Vista de una micela mixta placebo de 20 nm. Se observa una región circular hidrófila al exterior, y al centro las colas hidrófobas del fosfolípido y la sal biliar.

Fig. 58 Región de micelas mixtas placebo. Se observa una agrupación de tamaño homogéneo que oscila entre 20-22 nm.

Fig. 59 En el centro una región circular formada por micelas mixtas placebo de tamaño homogéneo. A la izquierda, un acercamiento a 60, 000 x donde se observa una micela mixta de 20 nm.

Fig. 60 Asociación micelar formada por el glicocolato de sodio y L- α Fosfatidilcolina. Se observa la formación de una partícula discoide, que responde a la morfología observada en las micrografías obtenidas.

Fig. 61 Estabilidad de micelas mixtas placebo reflejada en el tamaño de partícula evaluado durante 31 días.

Fig. 62 Estabilidad de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5, durante 31 días.

Fig. 63 Potencial Z de micelas mixtas placebo en un periodo de 31 días.

Figura 64. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35 % a través del tiempo.

Fig. 65 Estructura de gel para cromatografía de exclusión molecular.

Fig. 66 Proceso de filtración en gel para Micelas Mixtas de Clonazepam.

Fig. 67 Cromatograma que muestra la señal de fármaco en la muestra centrifugada a 1500 rpm durante 180 segundos.

Fig. 68 Curva de calibración para la cuantificación de clonazepam contenido en micelas mixtas.

Fig. 69 Cromatogramas correspondientes a la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam.

Fig. 70 Cromatograma de análisis de especificidad del método.

Fig. 71 Cromatograma de la señal de clonazepam contenido en micelas mixtas.

Fig. 72 Gráfica de determinación de clonazepam contenido en tres lotes de micelas mixtas.

Fig. 73 Cromatogramas correspondientes a la cuantificación de clonazepam en micelas mixtas .

Fig. 74. Evaluación de latencia a crisis convulsivas por género.

Fig. 75 Evaluación de latencia a las crisis convulsivas producidas en el lote administrado con micelas mixtas placebo y lote control administrado con SSF.

Figura 76. Evaluación de la latencia a crisis mioclónica mediante el modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.

Fig. 77 Evaluación de la latencia a la crisis generalizada mediante el modelo de crisis convulsivas inducido por PTZ.

Fig. 78 Evaluación de la latencia a la crisis tónico-clónica mediante el modelo de crisis convulsivas inducido por PTZ.

RESUMEN

En los últimos años la nanotecnología ha cambiado la funcionalidad de los diversos materiales para ofrecer nuevas alternativas a los retos actuales. Uno de los casos ejemplares es la medicina, donde se ha buscado diseñar nuevos tratamientos más eficaces y con menos efectos secundarios.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la eficacia anticonvulsivante de clonazepam (CLZ) encapsulado en micelas mixtas de sales biliares, administrado por vía oral en ratones *Swiss webster* a dosis de 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg, determinando la latencia a la aparición de mioclonias, convulsiones generalizadas y convulsiones tónicas inducidas por el agente pentilentetrazol administrado por vía oral a una dosis de 80mg/kg, comparando el efecto anticonvulsivante producido por una dispersión acuosa del fármaco convencional administrado vía oral a las mismas dosis.

La forma, el tamaño, el potencial zeta, la estabilidad y la concentración de clonazepam encapsulado en micelas mixtas se analizaron por microscopía electrónica de transmisión, dispersión de luz (zeta sizer) y cuantificación por HPLC.

Se obtuvieron micelas mixtas encapsuladas con clonazepam de 20 ± 2 nm de diámetro, un valor de potencial zeta a -30mV, una forma esferoide, con una concentración de fármaco de 0.136 mg/ml de suspensión y una eficacia de captura de 10.6%.

Se observó un mayor efecto anticonvulsivante al no presentarse crisis generalizada ni tónica en ratones administrados con clonazepam encapsulado en micelas mixtas a una dosis de 0,1 mg / kg, dosis diez veces menor que la indicada para la forma farmacéutica convencional.

Este transportador submicrónico de fármaco podría reducir los efectos secundarios y es una propuesta para mejorar la eficiencia de la dosis del clonazepam. Estos experimentos demuestran que las micelas mixtas ofrecen varias ventajas en el transporte de fármacos para mejorar su actividad terapéutica.

I. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del presente trabajo de investigación es aplicar la nanotecnología en el desarrollo de un sistema farmacéutico que permita retrasar y evitar la aparición de crisis convulsiva en ratones basándonos en un modelo de evaluación de latencia a crisis convulsivas producidas por pentilentetrazol, pretendiendo que un futuro pudiera utilizarse este sistema en el tratamiento de la enfermedad en seres humanos.

La nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que posibilita la fabricación de estructuras a escala nanométrica, tamaño que permite aumentar la permeabilidad, en este caso barrera hematoencefálica para llegar a cerebro.

Otra gran ventaja que ha aportado la nanotecnología a la liberación de fármacos es que se ve incrementada la efectividad del medicamento mediante el control preciso de la dosis requerida, disminuyendo así las reacciones adversas producidas al administrar fármacos en su forma farmacéutica convencional.

De acuerdo a las estadísticas, se estima que más de 40 millones de personas sufren de epilepsia, de los cuales más del 80% viven en países en vías de desarrollo. Motivados por las estadísticas relativamente altas de personas que padecen epilepsia, y el estudio de las estrategias terapéuticas desarrolladas y aplicadas hasta hoy, se desarrolló en el Laboratorio de Posgrado e Investigación en Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM un sistema farmacéutico nanotecnológico (clonazepam nanoencapsulado en Micelas Mixtas) que permite que el fármaco anticonvulsivo, logre retrasar las crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratones, observándose un mayor efecto que la forma farmacéutica convencional, específicamente en la crisis generalizada y tónica.

Por otro lado, la evaluación del efecto anticonvulsivante se realizó en colaboración en el Instituto de Psiquiatría Juan Ramón de la Fuente Muñiz, específicamente en el área de neurociencias en el Departamento de Neurofarmacología de Productos Naturales.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistema Nervioso.

2.1.1 Estructura

El Sistema nervioso consiste en una red organizada conformada por miles de millones de neuronas. Como se muestra en la Figura 1. Las estructuras que lo componen son:

1. Encéfalo.
2. Nervios (pares craneales).
3. Médula espinal.
4. Nervios raquídeos (espinales).
5. Ganglios
6. Nervios periféricos
7. Receptores sensoriales en piel.
8. Plexos entéricos en el intestino.

El *encéfalo* se encuentra en el cráneo y comprende casi 100 mil millones de neuronas. Doce pares de *nervios craneales* (derecho e izquierdo), numerados del I al XII nacen en la base del encéfalo. Un *nervio* es un haz que contiene de cientos a miles de axones, así como tejidos conectivos y vasos sanguíneos acompañantes. Cada nervio tiene un trayecto específico y se distribuye en una región corporal particular (Alcaraz, et, al., 2000).

La *medula espinal* se conecta con el encéfalo a través del agujero occipital de cráneo y la rodean los huesos de la columna vertebral. Posee cerca de 100 millones de *neuronas*. Treinta y un pares de *nervios raquídeos* emergen de la médula espinal y se distribuyen en una región específica de las mitades derecha e izquierda del cuerpo.

Los *ganglios* son masas pequeñas de tejido nervioso que contienen sobre todo cuerpos celulares de neuronas y se localizan fuera del encéfalo y la médula espinal. Se relacionan estrechamente con los nervios craneales y raquídeos. (Alcaraz, et, al., 2000).

En las paredes de órganos del aparato digestivo, los *plexos entéricos* forman una estrecha red de neuronas que participan en la regulación de dicho aparato. (Alcaraz, et, al., 2000).

Los *receptores sensoriales* son dendritas de neuronas sensoriales o células especializadas e independientes que vigilan los cambios en el medio interno o en el entorno.

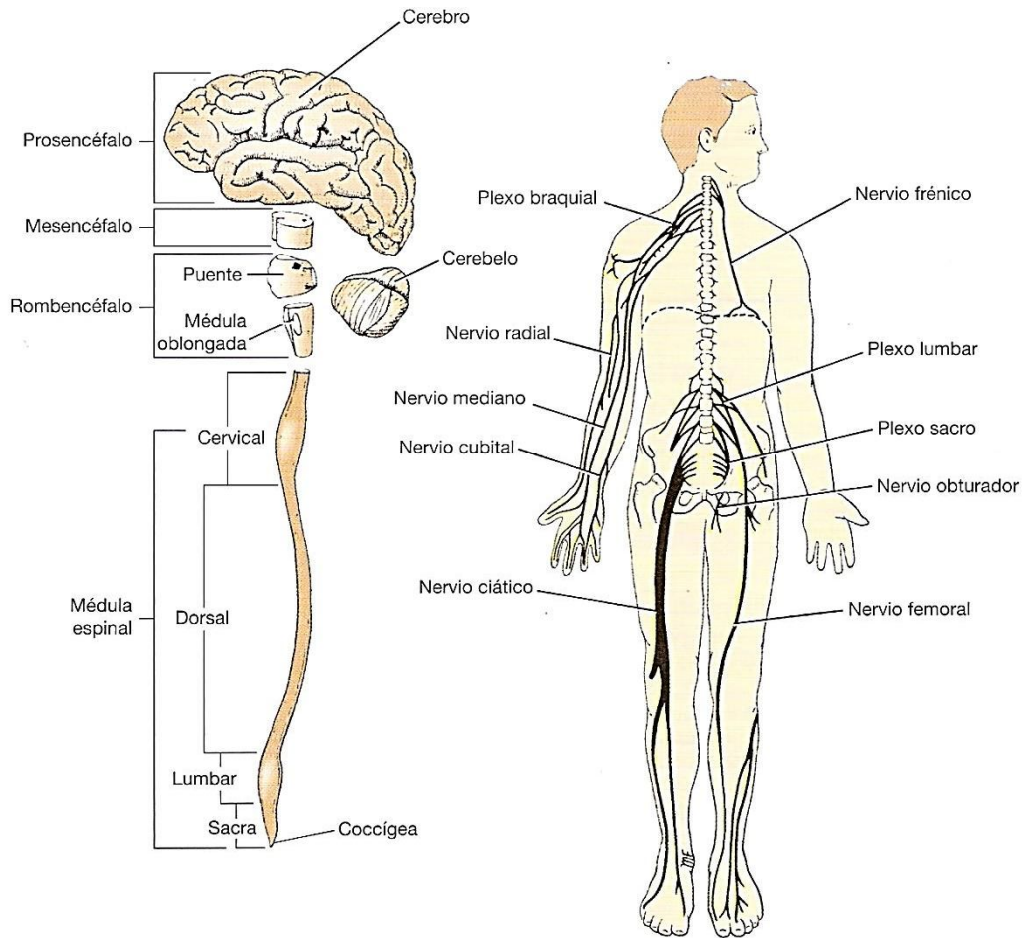


Fig.1 Estructura del Sistema Nervioso. (Brian, et., al. 2009)

2.1.2 Función.

El sistema nervioso tiene tres funciones básicas:

- *Función sensorial:* Los receptores sensoriales detectan estímulos internos, como el aumento de la acidez sanguínea, o externos, por ejemplo; una gota de lluvia que cae en el brazo.

Las neuronas que transmiten la información sensorial al encéfalo o a la médula espinal se denominan neuronas sensoriales o aferentes (Arthur, et., al, 2007)

- *Función de Integración:* El sistema nervioso integra (procesa) la información sensorial al analizarla y almacenar una parte de ella, lo cual va seguido de la toma de decisiones acerca de las respuestas apropiadas. Las neuronas que se encargan de esta función se denominan interneuronas (neuronas de asociación).
- *Función motora.* Consiste en responder a las decisiones de la función de integración. Las neuronas encargadas de esta función son neuronas motoras o eferentes, que transmiten información del encéfalo y de la médula espinal a las diversas estructuras corporales. Los órganos y las células en las cuales se distribuyen las neuronas motonas se denominan efectores.

2.1.3 Organización del Sistema Nervioso

El Sistema nervioso se encuentra organizado en dos partes:

- Sistema nervioso periférico.
- Sistema nervioso central.

2.1.4 Sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico se divide a su vez en sistema nervioso autónomo y sistema nervioso somático. (Escobar, et., al 2006)

La principal Función del sistema nervioso periférico es proporcionar respuestas en el organismo, ya sean de manera condicionada o no.

El *sistema nervioso domático* se encuentra formado por los nervios que controlan los músculos de contracción voluntaria (Escobar, et., al, 2006)

El *sistema nervioso autónomo* por su parte se encuentra dividido en sistema nervioso simpático y parasimpático. Se encuentra formado por un conjunto de nervios que regulan de forma automática o involuntaria muchas funciones corporales.

El sistema nervioso simpático proporciona respuestas de atención o alerta, mientras que el sistema nervioso parasimpático genera respuestas contrarias al Sistema Nervioso Simpático como se muestra en la siguiente figura :

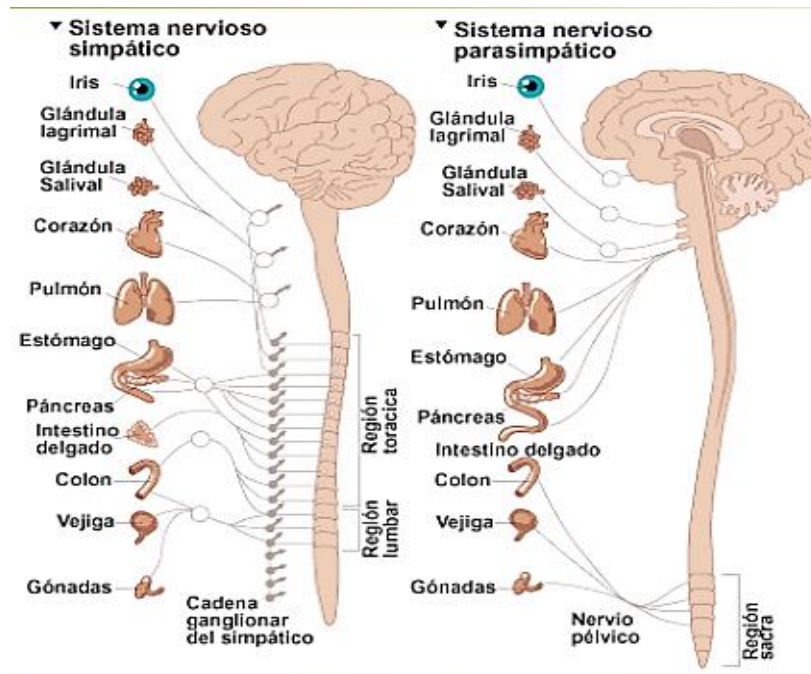


Fig. 2 División y Funciones del Sistema Nervioso Autónomo. (Escobar, et., al, 2006)

2.1.5 Sistema Nervioso Central.

El SNC es una parte del sistema nervioso que se encuentra formada por el cerebro y la espina dorsal.

Los tres niveles principales de organización del Sistema Nervioso Central son :

- Médula Espinal. Se encarga de la regulación de muchos de los patrones reflejos básicos del cuerpo.
- Encéfalo. Regula la mayor parte de las funciones automáticas complejas del cuerpo, como equilibrio, ingestión de alimentos, grandes movimientos corporales, ritmo respiratorio, etc.
- Corteza o cerebro. Alberga procesos de pensamiento y regula actividades motoras definidas.

A su vez, el SNC se compone de neuronas sensoriales que transmiten información de los receptores de los sentidos localizados principalmente en la cabeza, pared corporal y extremidades hacia el sistema nervioso central (Escobar, et., al, 2006)

También se compone de neuronas motoras con origen en el SNC que conducen impulsos sólo a los músculos esqueléticos. Estas respuestas motoras se pueden regular en forma consciente.

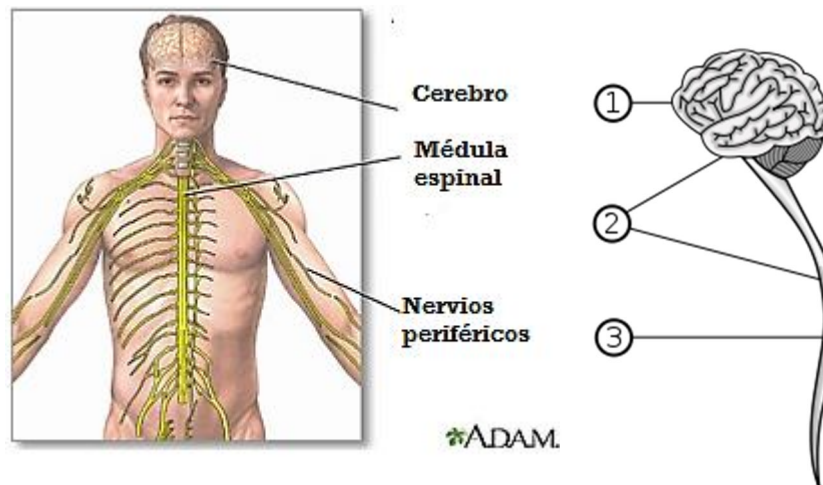


Fig. 3 Sistema Nervioso Central. (2009). ADAM Imágenes/

2.1.5.1 Encéfalo.

El encéfalo es un conjunto de sistemas neuronales interrelacionados que regulan muchas de las actividades del Sistema Nervioso Central se encuentra formado por la corteza cerebral, sistema límbico, cerebelo, Médula espinal, Mesencéfalo y tallo encefálico. (Goodman, 2010).

2.1.5.2 Corteza Cerebral

En el cerebro hay una zona conocida como corteza cerebral, un manto de tejido nervioso que cubre la superficie de los hemisferios cerebrales, formado por miles de neuronas organizadas en varias capas funcionales, formando así amplias redes de comunicación celular. Su estructura superficial presenta numerosos pliegues, y tiene un espesor de 2 a 4 mm. La corteza cerebral se divide básicamente en tres zonas:

1. Neocórtex.
2. Peleocórtex.
3. Aquicórtex.

A continuación se muestra un esquema que ilustra las zonas de la corteza cerebral de acuerdo a su clasificación filogenética. (Goodman, 2010)

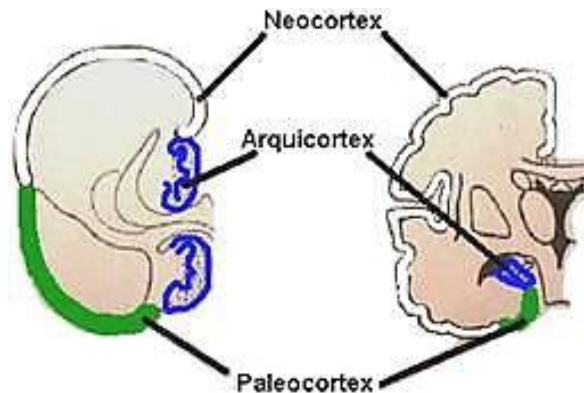


Fig. 4 Esquema de la corteza cerebral. (Goodman, 2010).

Al hablar de las capas corticales se debe tomar en cuenta que son histológica y funcionalmente diferentes y que poseen una gran variedad de neurotransmisores que permiten una manifestación de respuestas muy grande. Algunos de estos transmisores son: glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), dopamina, noradrenalina, acetilcolina, entre otros; los cuales intervienen en la generación de una respuesta determinada ante un estímulo. (Goodman, 2010).

2.1.5.3 Sistema Límbico

El sistema Límbico es un conjunto de regiones del encéfalo que comprende la formación de hipocampo, complejo amigdaloides, núcleos olfatorios, ganglios basales y algunos núcleos del diencefalo, agrupadas alrededor de bordes subcorticales de la parte central subyacente del encéfalo, a la cual se han atribuido diversas funciones emocionales y motivacionales complejas. (Goodman, 2010)

2.1.5.4 Diencéfalo.

El tálamo se encuentra en el centro del encéfalo por debajo de la corteza y los ganglios basales y por parte del hipocampo. Las neuronas del tálamo se hallan distribuidas en “cúmulos” definidos, o núcleos que son estructuras pares o de línea media. Estos núcleos actúan como comunicadores entre las vías sensoriales y la corteza, entre las regiones definidas del tálamo y el hipotálamo y entre los ganglios basales y las regiones de asociación de la corteza cerebral. (Goodman, 2010)

El *hipotálamo* es la región de integración principal de todo el sistema nervioso autónomo. Entre otras funciones regula la temperatura corporal, equilibrio hídrico, presión arterial, ciclos sexual y circadiano, secreción de la adenohipófisis, sueño y emociones.

2.1.5.5 Mesencéfalo y tallo encefálico.

Mesencéfalo, protuberancia anular y bulbo raquídeo conectan a los hemisferios cerebrales y a tálamo e hipotálamo con la médula espinal. Estas porciones a manera de puente contiene la mayor parte de los núcleos de los pares craneales, lo mismo que las principales vías de entrada y salida de las cortezas cerebrales y la médula espinal.

Estas regiones contienen al sistema activador reticular que enlaza los sucesos sensoriales y motores periféricos con los niveles superiores de la integración nerviosa que coordinan los actos reflejos esenciales como deglución y vómito, y los que abarcan a los aparatos cardiovascular y respiratorio. (Goodman, 2010)

El sistema activador reticular es esencial para regular sueño, vigilia y nivel de excitación, lo mismo que para coordinar los movimientos oculares. (Goodman, 2010).

2.1.5.6 Cerebelo

El cerebelo se origina en la parte posterior de la protuberancia anular, por detrás de los hemisferios cerebrales.

Se encuentra también muy laminado y tiene un orden citológico estricto: los lóbulos y las hojas del cerebro se proyectan hacia núcleos cerebelosos profundos específicos, que a su

vez efectúan proyecciones hacia la corteza motora y hacia los núcleos del tallo encefálico (Goodman, 2010).

Además de regular movimientos voluntarios del tronco y las extremidades, el cerebelo regula también la función visceral, la frecuencia cardiaca (Goodman, 2010).

2.1.5.7 Cerebro composición química, estructura y función.

El tejido cerebral tiene una composición química totalmente distinta a la de otros tipos de tejido como lo muestra la tabla 1. Las células del sistema nervioso contienen una gran cantidad de agua, observándose que más de la mitad de peso seco del cerebro está compuesto de lípidos.

Tabla 1. Composición química aproximada del cerebro. Goodman, 2010

Componentes	Cerebro total (%)
Agua	78
Lípidos	10
Proteínas	8
Carbohidratos	1
Sales inorgánicas	1
Otros	2

Sin embargo, las grasas sencillas (triglicéridos) se encuentran en el cerebro en baja concentración. Los tres grupos más importantes de lípidos cerebrales son el colesterol, los fosfolípidos y los glicolípidos.

El colesterol se encuentra normalmente presente en forma de colesterol libre y la mayoría se encuentra asociado con las vainas de mielina que cubren las fibras nerviosas. Los fosfolípidos son compuestos que contienen diglicéridos y ésteres fosfóricos y los glucolípidos contienen ácidos grasos, azúcar y otras sustancias. Estos compuestos también se encuentran en forma predominantes en las vainas de mielina de las fibras nerviosas (Florez, 2003)

El cerebro pesa en promedio 1350 gramos, y alcanza su máximo peso a los 25 años, decreciendo progresivamente hasta llegar a perder un 10% de su peso cuando el ser humano alcanza los 90 años.

En el cerebro se encuentran las estructuras especializadas para el funcionamiento de toda la actividad intelectual del ser humano, y se localizan en diferentes áreas de los lóbulos y hemisferios. Dichas estructuras se relacionan e interconectan con el sistema límbico (Florez, 2003)

Las diferentes zonas de la corteza cerebral corresponden a cuatro niveles funcionales:

- Las zonas primarias, en relación con el mundo exterior, corresponden a las funciones sensitivas, táctiles, visuales, auditivas o a las funciones motoras (Florez, 2003)
- Las zonas secundarias están unidas y enlazadas con las precedentes, los puntos de la corteza no corresponden ya a una superficie cutánea o a un músculo, sino a la síntesis de las sensaciones superficiales y profundas o a una función muscular, flexión, extensión, rotación de la cabeza y los ojos (Florez, 2003)
- Las zonas terciarias son también especializadas y rodean a las anteriores, su función sensitiva es la gnosia, es decir la asociación y el reconocimiento de la información procedente de diversos modos sensoriales, su función es la coordinación de gestos (Florez, 2003)
- Las zonas superiores no tiene relación con el mundo exterior y no están especializadas, sino que sus funciones son globales; en ellas se elabora el pensamiento: utilización de los recuerdos, conceptos y abstracciones, expresión verbal, gráfica y gestual (Florez, 2003)

2.1.5.8 Médula espinal.

La médula espinal se extiende desde el extremo del bulbo raquídeo hasta las vértebras lumbares inferiores. Dentro de este cúmulo de células y vías nerviosas se coordina de manera local la información sensorial proveniente de piel, músculos, articulaciones y vísceras (Goodman, 2010)

Se divide en segmentos anatómicos (cervical, torácico, lumbar y sacro) que corresponden a las divisiones de los nervios periféricos de la columna vertebral.

2.2 La neurona.

El tejido nervioso sólo tiene dos tipos principales de células: neuronas y células gliales. Las neuronas se encargan de muchas funciones especiales que se atribuyen al sistema nervioso como sensaciones, pensamiento, recuerdos, actividad muscular controlada y regulación de secreciones glandulares.

Las células gliales brindan sostén, nutrición y protección a las neuronas, además de mantener la homeostasis del líquido intersticial que baña las neuronas.

Las neuronas poseen la propiedad de excitabilidad eléctrica, es decir, de generar impulsos en respuesta a estímulos. Una vez que se generan, los potenciales se propagan de un punto a otro por la membrana plasmática, gracias a la presencia de canales iónicos específicos. (Florez, 2003)

2.2.1 Estructura de la Neurona.

La mayoría de las neuronas tienen tres partes:

1. Cuerpo celular.
2. Dendritas.
3. Axón o neurita.

El cuerpo celular contiene un núcleo, rodeado por el citoplasma, que incluye organelos tales como lisosomas, mitocondrias y Aparato de Golgi. Muchas neuronas tienen también lipofuscina, pigmento que se acumula en forma de grupos de gránulos de color pardo amarillento en el citoplasma producto de los lisosomas neuronales que se acumulan en el citoplasma (Nieuwenhuys, et., al, 2009)

El cuerpo celular también incluye grupos prominentes de retículo endoplásmico rugoso, llamados *Cuerpos de Nissl*. Las proteínas que sintetizan estos cuerpos se usan para

reponer componentes celulares, como material para el crecimiento de las neuronas y para generar axones dañados.

El citoesqueleto comprende neurofibrillas que consisten en haces de filamentos intermedios y brindan sostén y forma a la célula, y microtúbulos que ayudan a mover materiales entre el cuerpo celular y el axón.

Las neuronas pueden tener varias dendritas o un solo axón. Las dendritas son prolongaciones de las neuronas que reciben impulsos nerviosos. Por lo regular son cortas, ahusadas y muy ramificadas. En muchas neuronas, las dendritas forman un conjunto de ramificaciones que nacen del cuerpo celular. Generalmente las dendritas no están mielinizadas. Su citoplasma contiene cuerpos de Nissl, mitocondrias y otros organelos.

El segundo tipo de prolongación, el axón transmite los impulsos nerviosos hacia otras neuronas, fibras musculares o células glandulares. Un axón es una prolongación cilíndrica, delgada y larga, que se une con el cuerpo celular en una elevación cónica denominada eminencia del axón (Nieuwenhuys, et., al, 2009)

La primera parte del axón es el segmento inicial. En la mayoría de las neuronas los impulsos surgen en la unión de la eminencia con el segmento inicial, lo que se denomina zona de activación para luego ser conducidas por el axón (Nieuwenhuys, et., al, 2009)

El axón contiene mitocondrias, microtúbulos y neurofibrillas. En virtud de la ausencia de retículo endoplásmico rugoso, la síntesis de proteínas es imposible en el axón. Al citoplasma axónico se le denomina axoplasma, lo envuelve la membrana plasmática que se conoce como axolema.

A lo largo del axón, este emite rama laterales, llamadas colaterales axónicas, que en general forman un ángulo recto con el axón. Éste último y sus colaterales, llamados colaterales terminan al dividirse en muchas prolongaciones finas, las terminales axónicas. El sitio de comunicación entre dos neuronas o entre una neurona y una célula efectora es la sinapsis.

El extremo de algunas terminales axónicas se ensancha en estructuras en forma de tuberosidades denominadas bulbos terminales, mientras que los de otras presentan una cadena de protuberancias denominadas varicosidades. Ambos tipos de estructuras contienen muchos sacos membranosos diminutos, llamados vesículas sinápticas, las cuales almacenan neurotransmisores (Nieuwenhuys, et., al, 2009).

En cuerpo celular es el sitio donde la neurona sintetiza sus productos o recicla los existentes. Sin embargo, dado que algunas sustancias son necesarias en el axón o en sus terminales, hay dos tipos de sistemas transportadores de materiales entre el cuerpo celular y las terminales axónicas.

1. Transporte axónico lento: Desplaza las sustancias sólo en una dirección, del cuerpo celular hacia las terminales axónicas, para el desarrollo o regeneración de axones.
2. Transporte axónico rápido. Utiliza proteínas que funcionan como “motores” para el transporte bidireccional de materiales: hacia el cuerpo celular y de éste por la superficie de microtúbulos. Este tipo de transporte mueve diversos organelos y materiales.



Fig. 5 Partes básicas que forman una neurona. (Nieuwenhuys, et., al, 2009)

2.2.2 Diversidad Estructural en las neuronas.

Las neuronas presentan gran diversidad en su forma y su tamaño. Se clasifican en tres clases:

1. Neuronas Multipolares.
2. Neuronas Bipolares.
3. Neuronas Unipolares.

Las *neuronas multipolares* generalmente varias dendritas y un axón. La mayoría de las neuronas del encéfalo y la médula espinal son de este tipo. (Poirier, 2004)

Las *neuronas bipolares* que poseen una dendrita principal y un axón, se localizan en retina, oído interno y área olfatoria del cerebro (Poirier, 2004)

Las *neuronas unipolares* son sensoriales. En la siguiente figura se ilustra la clasificación estructural de las neuronas.

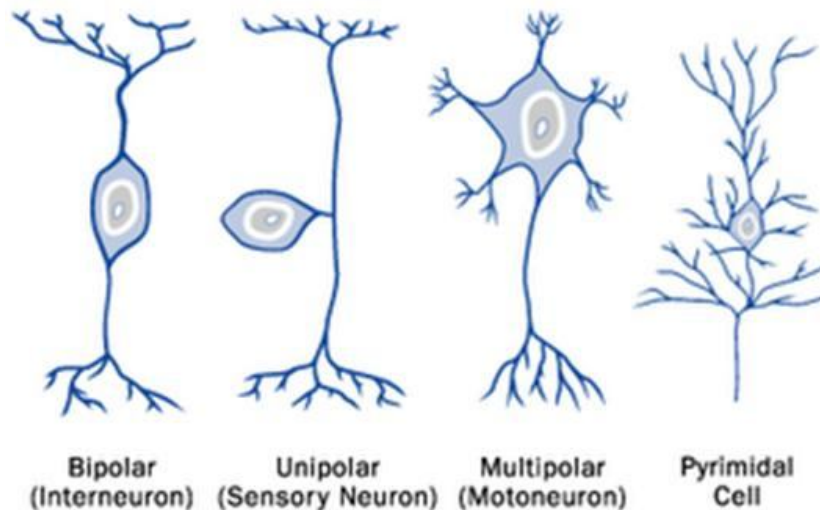


Fig. 6 Clasificación estructural de las Neuronas.(Florez, 2013)

2.2.3 Mielinización

Los axones de la mayoría de las neuronas en mamíferos se encuentran rodeados por la *vaina de mielina* que es una cubierta de lípidos y proteínas dispuestas en varias capas. La vaina aisla eléctricamente al axón y aumenta la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. Se dice entonces que están mielinizados los axones envueltos por esta vaina, mientras que los que carecen se llaman amielínicos. (Poirier, 2004)

Hay dos tipos de células gliales que producen vaina de mielina. Las células de Schwann en el sistema nervioso periférico y los oligodendrocitos en el sistema nervioso central.

Las células de Schwann del sistema nervioso periférico empiezan a formar la vaina de mielina alrededor de los axones durante el desarrollo fetal. Cada una de estas células rodea 1 mm del axón, envolviéndose varias veces alrededor de éste a manera de espiral.

En el sistema nervioso central, un oligodendrocito mieliniza partes de muchos axones, en forma muy similar a la célula de Schwann en el sistema nervioso periférico. El oligodendrocito emite unas 15 prolongaciones anchas y planas que forman la vaina de mielina a manera de una espiral que rodea los axones nerviosos centrales. (Poirier, 2004)

La cantidad de mielina aumenta desde el nacimiento hasta la madurez y su presencia acelera mucho la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. (Poirier, 2004)

2.2.4 Sustancia gris y sustancia blanca.

La denominada *sustancia blanca* consiste en un conjunto de prolongaciones mielinizadas de muchas neuronas y es el color blanco de la mielina lo que le confiere su nombre. (Poirier, 2004)

La Fig. 7 muestra la distribución de las sustancias gris y blanca en un corte transversal del encéfalo y la médula espinal, observándose que en la médula espinal la sustancia blanca rodea una parte central de sustancia gris en forma de mariposa o de letra H, mientras que en el encéfalo una capa delgada de sustancia gris cubre la superficie de las estructuras más grandes del encéfalo, cerebro y cerebelo. La sustancia gris del sistema nervioso contiene cuerpos celulares, dendritas, axones amielínicos, terminales axónicas y células gliales. Su color grisáceo, se debe a la escasez o ausencia de mielina.

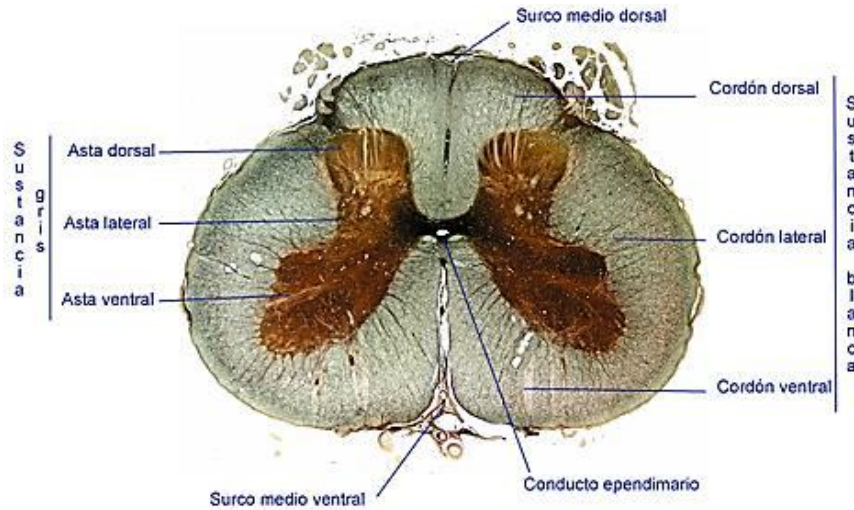




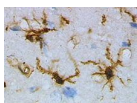
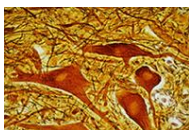

Fig.7 Distribución de las sustancias gris y blanca en el encéfalo y la médula. (Kolb, 2006)

2.3 Células gliales.

Comprenden casi la mitad de volumen del sistema nervioso central. En general, estas células son más pequeñas que las neuronas; además, su número excede el de éstas en cinco a 5^o veces. En contraste con las neuronas, no generan ni propagan potenciales de acción, pero si pueden multiplicarse y dividirse en el sistema nervioso maduro. (Poirier, 2004)

Existen seis tipos de células gliales, de las cuales solo cuatro se encuentran en el sistema nervioso central: astrocitos, oligodendrocitos, microglía, y células ependimarias, mientras que los otros dos, células de Schwann y satélite, se encuentran en el sistema nervioso periférico.

Tabla 2. Estructura y Función de las Células Gliales. (Poirier, 2004)

TIPO	ASPECTO	FUNCIONES
<p>Astrocitos</p>	<p>En forma de estrellas, con muchas prolongaciones.</p> 	<p>Ayudan a mantener el ambiente químico apropiado para que se generen los potenciales de acción neuronales; aportan nutrientes a las neuronas, captan el exceso de neurotransmisores; participan en el metabolismo de los neurotransmisores; mantienen el equilibrio adecuado de Ca^{2+} y K^+; participan en la migración de neuronas durante el desarrollo encefálico y son precursoras de la barrera hematoencefálica.</p>
<p>Oligodendrocitos</p>	<p>Más pequeños que los astrocitos y con menos prolongaciones, cuerpo celular redondo u oval.</p> 	<p>Forman una red de sostén alrededor de las neuronas del SNC y producen vainas de mielina que rodean a varios axones adyacentes de neuronas del SNC.</p>
<p>Microglía</p>	<p>Células pequeñas y con pocas prolongaciones, se derivan de células mesodérmicas que también son origen de los monocitos y macrófagos.</p> 	<p>Protege a las células del SNC contra enfermedades al fagocitar microbios invasores, eliminar los desechos de células muertas.</p>
<p>Células Ependimarias</p>	<p>Células epiteliales en una sola capa, de forma que va de cuboidea a cilíndrica; muchas poseen cilios.</p> 	<p>Revisten los ventrículos del encéfalo (espacios llenos de líquido cefalorraquídeo) producen el líquido cefalorraquídeo.</p>
<p>Células de Schwann</p>	<p>Células aplanadas que rodean a los axones del SNP</p> 	<p>Cada célula produce una parte de la vaina de mielina que rodea un axón en neuronas del SNP participan en la regeneración del sistema nervioso periférico.</p>

Células Satélite	<p>Células aplanadas que rodean los axones del Sistema Nervioso Periférico</p> <p>Células aplanadas y dispuestas alrededor del cuerpo celular de neuronas en los ganglios.</p>	<p>Cada célula produce una parte de la vaina de mielina que rodea un axón en neuronas SNP; participan en la regeneración de axones del SNP.</p> <p>Brindan sostén a neuronas en los ganglios.</p>
-------------------------	--	---

2.4 Neurotransmisión en el sistema nervioso central.

Para que las neuronas puedan comunicarse deben producirse señales eléctricas, que pueden ser de dos tipos:

- Potenciales de acción que permiten la comunicación de corta y larga distancia.
- Potenciales graduados que se usan para la comunicación a corta distancia.

La producción de ambos tipos de señales dependen de dos características básica de la membrana plasmática en células excitables: un potencial de membrana en reposo y canales iónicos específicos (Poirier, 2004)

Como en muchas otras células del cuerpo, la membrana plasmática de las células excitables posee un potencial de membrana, es decir; una diferencia de voltaje eléctrico.

Los potenciales graduados y los de acción ocurren porque la membrana plasmática de las neuronas contiene muchos tipos distintos de canales iónicos que se abren y cierran en respuesta a estímulos específicos. Dado que la bicapa lipídica de la membrana plasmática es un buen aislante eléctrico, las principales vías para que fluya la corriente a través de dicha membrana son los canales iónicos (Poirier, 2004)

2.4.1 Canales iónicos.

Cuando están abiertos, los canales iónicos permiten que iones específicos difundan a través de la membrana plasmática conforme a su gradiente electroquímico. Los iones tienden a moverse de un sitio de mayor a uno de menor concentración. (Shorvon, 2009)

Hay dos tipos básicos de canales iónicos: canales de filtración y canales de canales de compuerta. Los canales de filtración siempre están abiertos:

- Canales de Filtración.

- Canales de Compuerta.

Los *canales de filtración* siempre están abiertos. La membrana plasmática suele tener muchos más canales de filtración de iones potasio K^+ que de iones sodio Na^+ de modo que su permeabilidad a los primeros es mucho mayor que a los segundos (Shorvon, 2009)

Los *canales de compuerta* se abren y cierran en respuesta a algún tipo de estímulo. La presencia de estos canales en la membrana plasmática de neuronas y fibras musculares les confiere su excitabilidad eléctrica (Shorvon, 2009)

Estos dos tipos celulares poseen tres variantes de canales iónicos de compuerta, que difieren en el estímulo correspondiente de voltaje, de ligandos y mecánicos (Shorvon, 2009).

Canal iónico de voltaje: se abre en respuesta a un cambio de potencial de membrana (voltaje). Estos canales se usan en la generación y conducción de potenciales de acción.

Un *canal iónico de ligandos* se abre y cierra en respuesta a un estímulo químico específico. Hay una amplia variedad de ligandos químicos como neurotransmisores, hormonas y iones, que abren o cierran ese tipo de canales iónicos (Shorvon, 2009).

Un *canal iónico de compuerta mecánica* se abre y cierra en respuesta a estímulos, como las vibraciones, presión, o estiramiento de tejidos. Estos factores distorsionan la forma que tiene el canal en reposo, con lo cual lo abren (Shorvon, 2009).

2.4.2 Potencial de membrana en reposo

Este potencial se debe a la pequeña acumulación de iones con carga en el citosol, a lo largo de la cara interna de la membrana, y una acumulación similar de iones con carga positiva en el líquido extracelular, también a lo largo de la superficie externa de la membrana (Shorvon, 2009)

La separación de cargas eléctricas positivas y negativas es una forma de energía potencial, que se mide en voltios o milivoltios. Cuanto mayor sea la diferencia de carga a través de la membrana, habrá más potencial de membrana. En otras partes del citosol o del líquido extracelular, es igual el número de cargas positivas y negativas.

En las neuronas, el potencial de membrana en reposo varía de -40 a -90 mV y normalmente es de -70 mV, donde el signo de menos indica que el interior es negativo en relación con el exterior (Shorvon, 2009)

Se dice que una célula está polarizada cuando presenta potencial de membrana. La mayoría de las células corporales están polarizadas con voltaje de membrana que varía de +5 mV a -100 mV en los diversos tipos celulares (Shorvon, 2009).

En potencial de membrana en reposo se mantiene principalmente por dos factores:

1. Distribución desigual de los iones a uno y otro lado de la membrana plasmática. Las concentraciones de los aniones y cationes principales difieren dentro y fuera de las células. Los iones sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) abundan en el líquido extracelular, mientras que en el citosol el catión principal es el K^+ (iones potasio) y los dos aniones predominantes son los fosfatos orgánicos y los aminoácidos de las proteínas (Bustamate, 2007).
2. Permeabilidad relativa de la membrana plasmática a los iones K^+ y Na^+ . En una neurona o fibra muscular en reposo, la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones K^+ es 50 a 100 veces mayor que a los Na^+ (Bustamate, 2007).

Con la finalidad de mantener un equilibrio, la membrana es moderadamente permeable a los iones K^+ y Cl^- , y muy poco a los iones Na^+ . En teoría, el efecto eléctrico del flujo de salida de K^+ se cancelaría si Na^+ fluyera hacia el medio extracelular, con lo cual se intercambiarían unos cationes por otros. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana a los Na^+ es muy baja, de modo que su velocidad de entrada a la célula es muy lenta para mantener el ritmo de salida de los K^+ . (Bustamate, 2007).

El flujo de entrada de Cl^- conforme a su gradiente de concentración no puede cancelar el efecto eléctrico del flujo de salida de K^+ . Los iones cloruro que entraran a las células sólo harían que fuera más negativo su interior. Como resultado de la baja permeabilidad de la membrana a los Na^+ , así como aniones del medio intracelular, y su alta permeabilidad a los K^+ , el líquido que está a lo largo de la cara interna de la membrana plasmática se vuelve cada vez más negativo conforme ocurre el flujo de salida de K^+ (Bustamate, 2007).

La figura 8 ilustra la distribución de cargas e iones que producen el potencial de membrana en reposo. Los gradientes eléctrico y de concentración estimulan el flujo de entrada de Na^+ , la carga negativa de la cara interna de la membrana atrae los cationes y la concentración de Na^+ es mayor fuera de la célula. (Bustamante, 2007)

Aunque como se mencionó antes la permeabilidad de la membrana a los Na^+ es muy baja, su flujo lento finalmente anularía el gradiente electroquímico. La entrada lenta de Na^+ y la salida de K^+ se contrarrestan con las bombas de sodio (ATPasa de Na^+/K^+) que ayudan a mantener el potencial de membrana en reposo mediante el bombeo de Na^+ al exterior con el mismo ritmo de su flujo a la célula.

Al mismo tiempo, las bombas de sodio generan el ingreso de K^+ . Sin embargo, los iones potasio también se redistribuyen a sus gradientes eléctrico y químico, según la descripción precedente.

Las bombas de sodio extraen 3 Na^+ por cada 2 K^+ que entran a la célula de modo que son electrógenas, lo cual significa que contribuyen a la negatividad del potencial de membrana en reposo (Bustamante, 2007).

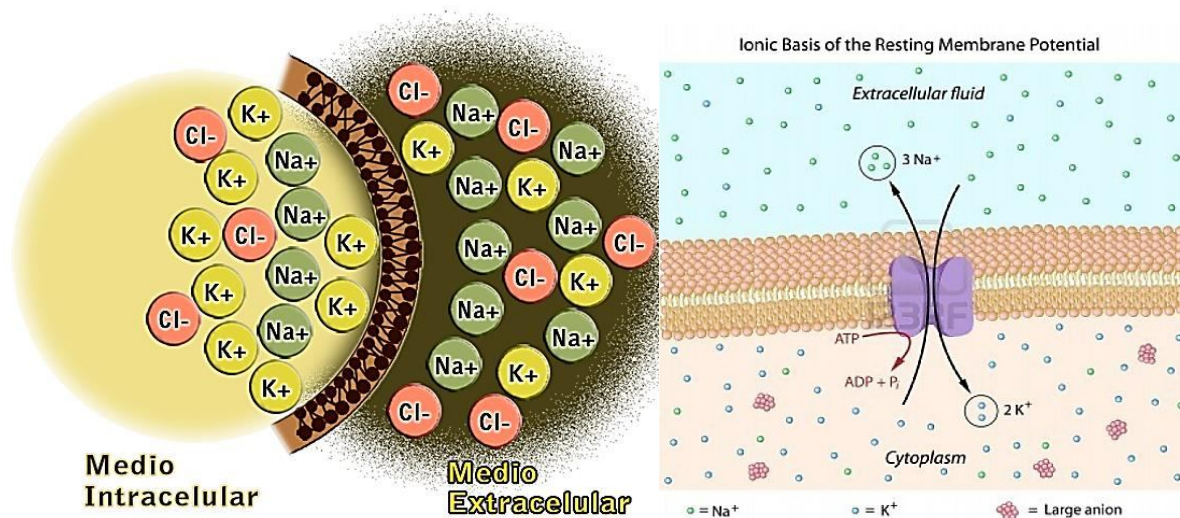


Fig. 8 Distribución de cargas e iones que producen el potencial de la membrana en reposo.(Bustamante, 2007)

2.4.3 Potenciales graduados.

Cuando un estímulo hace que los canales iónicos de ligandos o mecánicos se abran o cierren en la membrana plasmática de una célula excitable, se produce en esta un potencial graduado, es decir, una pequeña desviación respecto del potencial de membrana que vuelve a la membrana más polarizada (más negativa) o menos polarizada (menos negativa). Si la respuesta es la polarización más negativa, se habla de un potencial graduado hiperpolarizante y si la polarización es menos negativa, se trata de un potencial graduado despolarizante (Bustamate, 2007).

2.4.4 Potenciales de acción

Un potencial de acción o impulso nervioso es una secuencia de fenómenos que ocurren con rapidez, disminuyen y en última instancia invierten el potencial de membrana para luego restaurarlo a su estado de reposo.

Durante un potencial de acción, se abren y se cierran dos tipos de canales iónicos de voltaje, presentes sobre todo en la membrana plasmática de axones y terminales axónicas. Primero se abren canales que permiten la entrada de Na^+ a la célula, lo cual provoca despolarización.

Luego, se abren canales de K^+ con lo que se genera la repolarización. En total, las fases de despolarización y repolarización suelen durar 1 ms en las neuronas.

2.4.4.1 Fase de despolarización.

Durante la *despolarización* los canales de Na^+ se abren unas cuantas diez milésimas de segundo. Mientras se encuentran abiertos, unos 20 000 Na^+ fluyen a través de la y cambian significativamente el potencial de membrana. Al ocurrir esta fase el ingreso de Na^+ se vuelve tan grande que el potencial de membrana cambia de -55mV a 0 mV y llega finalmente a +30mV (Bustamate, 2007)

2.4.4.2 Fase de repolarización.

La despolarización del umbral abre los canales de Na^+ y K^+ . No obstante, los de K^+ se abren con más lentitud, por lo que esto ocurre casi al mismo tiempo que se cierran los canales de Na^+ originando así la fase de *repolarización* del potencial de acción, en el que se restaura el potencial de membrana en reposo (Bustamate, 2007)

La velocidad de entrada de Na^+ disminuye conforme se inactivan los canales para estos iones al mismo tiempo se abren los canales de K^+ y se acelera la salida de iones potasio. Estos dos fenómenos hacen que el potencial de membrana cambie de +30mV a -70mV. La repolarización también permite que los canales de Na^+ inactivados reviertan a su estado de reposo. (Bustamate, 2007)

Mientras se encuentran abiertos los canales de K^+ de voltaje, el flujo de salida de iones potasio puede ser lo suficientemente grande para producir la *fase posthiperpolarización* del potencial de acción. Durante está, la membrana es incluso más permeable que en reposo a los K^+ y el potencial de membrana se desvía hacia el potencial de equilibrio del K^+ (unos -90mV). Sin embargo, al cerrarse los canales de K^+ de voltaje, el potencial de membrana regresa a su valor de reposo, de -70mV.

La traducción de estos cambios de Potencial Eléctrico se observan en la *señal de integración* que se genera en la membrana neuronal Fig. 9, donde los potenciales locales, se suman y dan lugar al potencial de acción. Esta zona se caracteriza, por poseer una concentración elevada de canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, si la suma de los potenciales sinápticos alcanza el umbral, se produce un potencial de acción. La amplitud de este potencial de acción es de unos 100mV y dura 0.5-2mseg.

Para que ocurra la comunicación neuronal es necesaria la liberación de neurotransmisores, esto ocurre cuando la membrana se despolariza y se produce la señal de salida del mismo en las terminales del axón. La liberación del neurotransmisor depende de la entrada de Ca^{2+} e implica la generación un potencial local, llamado potencial secretor. (Bustamate, 2007)

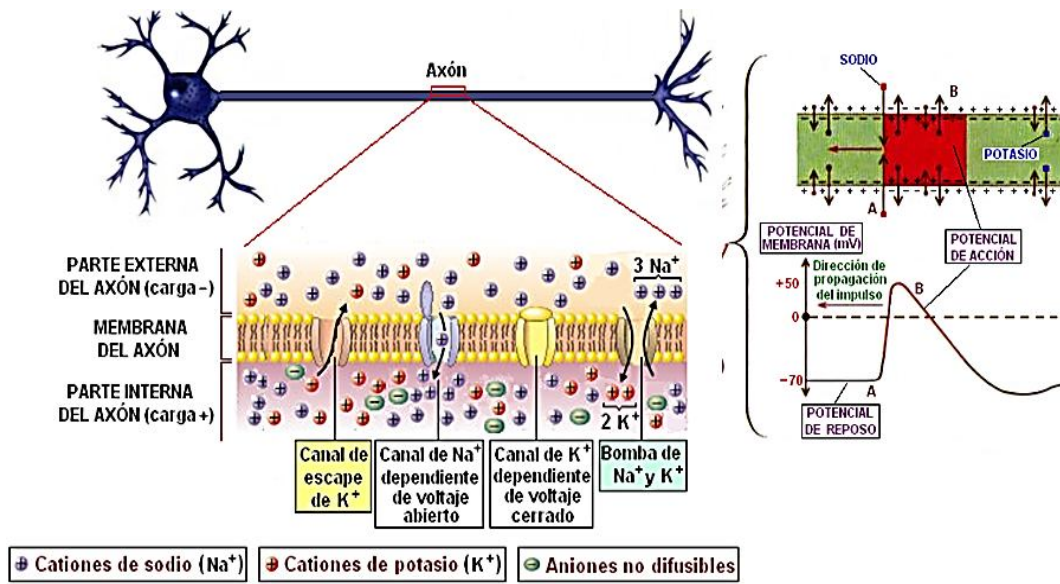


Fig.

9 Generación del potencial sináptico en una neurona. (Bustamate, 2007)

2.5 Propagación de los impulsos nerviosos.

A fin de comunicar información entre diversas partes corporales, los impulsos nerviosos deben viajar desde el sitio donde surgen, en una zona de activación, con frecuencia la eminencia axónica hacia las terminales axónicas; a esto se le denomina propagación o conducción (Bustamate, 2007).

Al ocurrir el flujo de entrada de Na^+ en la célula, aumenta la despolarización y se abren los canales de Na^+ de voltaje en porciones adyacentes de la membrana. De esta manera, el impulso nervioso se propaga por la membrana.

Se le denomina *periodo refractario* al intervalo en el que una célula excitable no puede generar otro potencial de acción.

Durante el periodo refractario absoluto, es imposible que se produzca un potencial de acción, incluso con un estímulo muy fuerte. Dicho periodo coincide con el de activación e inactivación de los canales de Na^+ (Bustamate, 2007).

2.5.1 Conducción continua y conducción saltarina.

El tipo de conducción de impulsos nerviosos recién analizado ocurre en fibras musculares y axones amielínicos. Tal despolarización paso por paso de cada porción adyacente de la membrana plasmática se le denomina conducción continua. Las corrientes iónicas fluyen por cada porción adyacente de la membrana (Braillon, 1999).

En los axones mielínicos, la conducción es distinta. En las áreas donde la vaina de mielina cubre el axolema, son pocos los canales iónicos regulados por voltaje. Sin embargo, en los nódulos de ranvier se interrumpe la vaina e mielina y tiene densidad alta de estos canales (Braillon, 1999).

Ocurre la despolarización de la membrana en los nódulos y las corrientes de Na^+ y K^+ fluyen a través de la membrana plasmática. Cuando un impulso nervioso se propaga en un axón mielínico, las corrientes que producen los iones fluyen en el líquido extracelular que rodean la vaina de mielina y en el citosol de un nódulo al siguiente. (Braillon, 1999).

El impulso nervioso en el primero genera corrientes iónicas en el citosol y líquido extracelular que abren los canales Na^+ de voltaje en el segundo nódulo. En éste, el flujo de iones desencadena un impulso nervioso que luego genera una corriente iónica que abre los mismos canales de Na^+ en el tercer nódulo, y así sucesivamente.

Cada uno se repolariza tras tu despolarización. El impulso se propaga en una mayor distancia del axón mielínico durante el lapso de 10 m/s.

Puesto que la corriente fluye por la membrana sólo en los nódulos, el impulso parece brincar de nódulo en nódulo, conforme cada uno de despolariza. Se denomina conducción saltatoria a este tipo de transmisión de impulsos y es caracterísitica de los axones mielínicos.

A continuación se ilustra la propagación de un impulso nervioso en axones mielínicos y amielínicos.

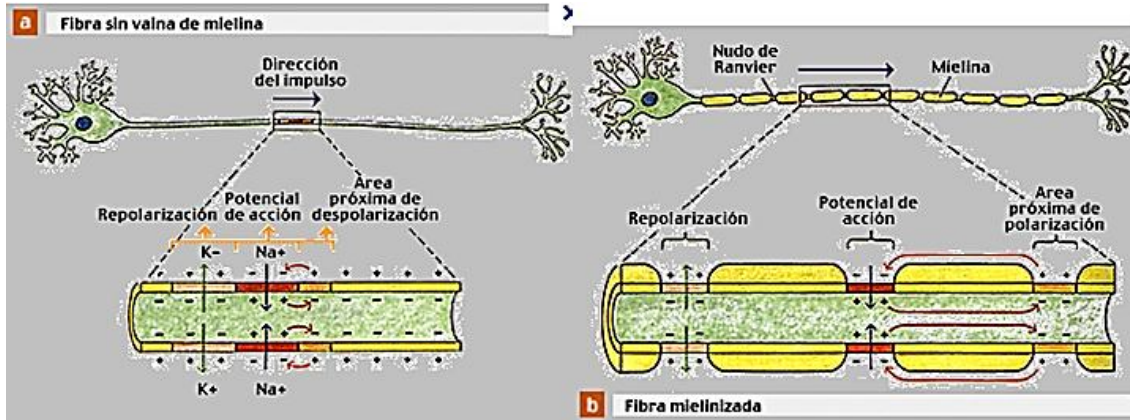


Fig. 10 Conducción continua en los axones amielínicos y mielínicos. (Cardinali, 2007)

Los axones de diámetro grande conducen los impulsos con mayor rapidez que los de diámetro pequeño. Los primeros (con diámetro de 5 a 20 μm) se llaman fibras A y siempre son mielínicos. Las fibras A conducen los impulsos con velocidad de 12 a 130 m/s.

De este tipo son los axones de neuronas sensoriales que conducen impulsos relacionados con el tacto, presión, posición de articulaciones y algunas sensaciones térmicas. (Braillon, 1999)

Las fibras B poseen axones con diámetro de 2 a 3 μm y periodo refractario absoluto un poco más prolongado que el de las fibras A. También son mielínicos, con conducción saltatoria a velocidades de hasta 15 m/s. Estas fibras transmiten impulsos sensoriales de las vísceras al encéfalo y a la médula espinal. (Braillon, 1999)

Las fibras C son las de axones con diámetro más pequeño de 0.5 a 1.5 μm y periodo refractario absoluto más prolongado. La conducción de impulsos en estas fibras tiene velocidad de 0.5 a 2 m/s. Se trata de axones amielínicos que transmiten impulsos sensoriales de calor, dolor, presión, provenientes de la piel. De este tipo de fibras son las que nacen de los ganglios autónomos y estimulan corazón, músculo liso y glándulas. (Braillon, 1999)

2.5.2 Velocidad de propagación de los impulsos nerviosos.

La velocidad de propagación de los impulsos nerviosos no se relaciona con la intensidad del estímulo que los desencadena. En vez de ello, el diámetro del axón y la presencia o ausencia de la vaina de mielina son los factores primordiales que determina la velocidad.

Además, los axones transmiten los impulsos con mayor rapidez cuando están calientes y a velocidad más baja si están fríos, de modo que el enfriamiento de un nervio puede retrasar la conducción.

2.6 Sinapsis.

Consiste en la comunicación entre neuronas para la transmisión de impulsos nerviosos. Hay dos tipos de sinapsis que difieren en su estructura y función:

- Sinápsis eléctrica.
- Sinápsis química.

2.6.1 Sinápsis Eléctrica.

En las sinápsis eléctrica las corrientes iónicas se propagan en forma directa entre células adyacentes mediante uniones de abertura o nexos (Brailon, 1999)

Cada una de estas uniones contiene aproximadamente un centenar de proteínas tubulares llamadas conexones, que forman túneles con los que se conecta el citosol de dos células.

Tanto moléculas como iones pueden fluir bidireccionalmente por estas proteínas entre las células adyacentes. En el caso de los iones, esto constituye una ruta para el flujo de corrientes. Las uniones de abertura son comunes en el músculo liso visceral (Brailon, 1999).

2.6.2 Sinápsis química

Se le denomina Sinápsis a la comunicación entre una neurona presináptica y una postsináptica de proximidad estrecha. Las neuronas están separadas por una hendidura

sináptica, por lo que ocurre una forma alterna e indirecta de comunicación en dicho espacio.

La neurona presináptica libera un neurotransmisor que difunde en la hendidura sináptica y actúa en receptores de la membrana plasmática de la neurona postsináptica, con lo que se produce un potencial postsináptico, que es un tipo de potencial graduado.

En lo esencial, el impulso eléctrico (impulso nervioso) presináptico se convierte en una señal química (neurotransmisor liberado). La neurona postsináptica recibe este mensajero químico y, a su vez, genera un impulso eléctrico (potencial postsináptico).

Una neurona postsináptica, recibe señales de muchas presinápticas, de las cuales algunas liberan neurotransmisores excitatorios y otras, neurotransmisores inhibitorios (Rudolf, 2009).

La suma de todos los efectos inhibitorios y excitatorios en un momento dado determina el efecto neto en la neurona postsináptica que puede responder de las maneras siguientes:

1. Potencial postsináptico excitatorio. Si el efecto excitatorio total es mayor que el efecto inhibitorio total y menor que el umbral de estimulación, el resultado es un PPSE subumbral. Los estímulos subsiguientes pueden generar con mayor facilidad un impulso nervioso por sumación, puesto que la neurona está despolarizada parcialmente.
2. Uno o más impulsos nerviosos. Cuando el efecto excitatorio total es mayor que el inhibitorio total y se alcanza o supera el valor de umbral de estimulación, el Potencial Postsináptico se propaga al segmento inicial del exón y se desencadenan uno o más impulsos nerviosos (Rudolf, 2009).
3. Potencial Postsináptico inhibitorio. En el supuesto que el efecto inhibitorio total sean mayor que el excitatorio, la membrana se hiperpolariza. El resultado es la liberación de la neurona postsináptica y que no se genere el impulso nervioso.

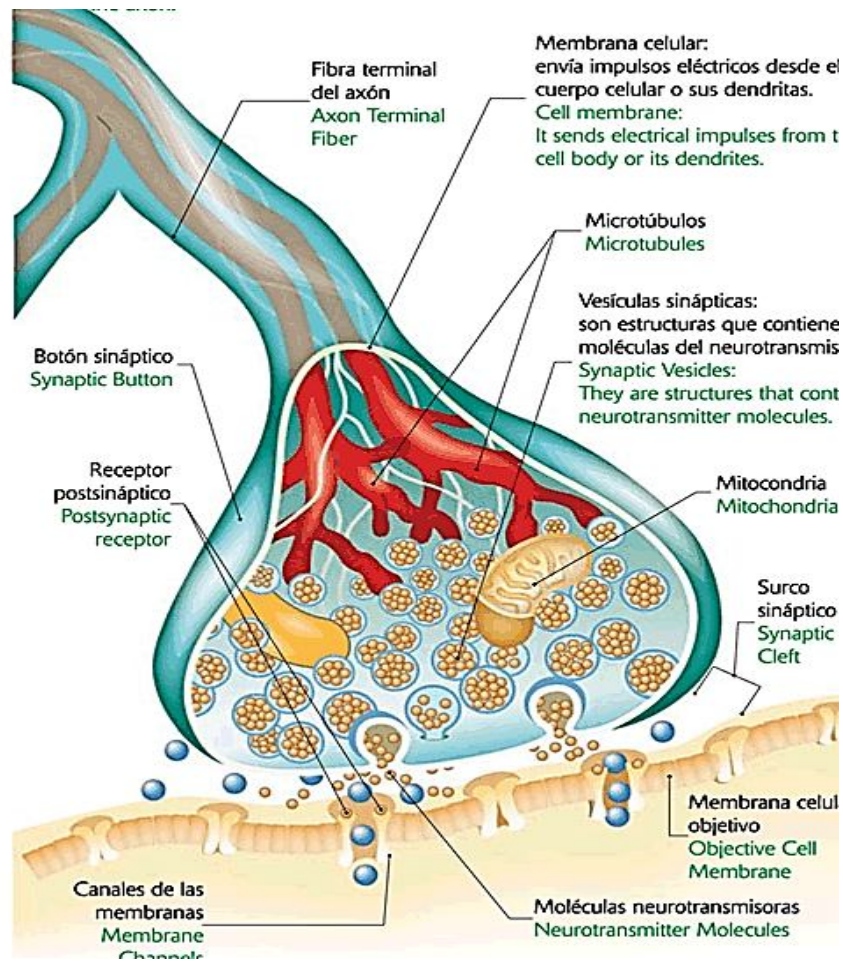


Fig. 11 Sinápsis Química. 2.4 (Escobar, et., Al. 2006)

2.7 Fármacos que actúan en el sistema nervioso central.

Los fármacos que actúan en la síntesis, almacenamiento, metabolismo y liberación de los neurotransmisores se encuentran en la categoría de los presinápticos. La transmisión sináptica puede ser disminuida por bloqueo de la síntesis o almacenamiento del transmisor (Rudolf, 2009)

Los fármacos también pueden alterar la liberación del transmisor, una vez que el neurotransmisor ha sido liberado en el espacio sináptico, deja de ejercer su efecto una vez que es captado o degradado (Rudolf, 2009)

Otro mecanismo de acción de los fármacos que actúan en el sistema nervioso central es actuar sobre el canal iónico (Rudolf, 2009)

La selectividad de la acción farmacológica se basa en el hecho de que diferentes grupos de neuronas emplean diferentes neurotransmisores, los cuales son a menudo segregados en los sistemas neuronales que ayudan extensamente a las diferentes funciones del Sistema Nervioso Central (Rudolf, 2009)

2.7.1 Neurotransmisores.

En la actualidad se sabe que unas 100 sustancias son neurotransmisores, es difícil determinar la función de cada una.

Algunos neurotransmisores se unen con sus receptores y producen rápidamente la apertura o cierre de los canales iónicos membranosos, mientras que otros actúan como mayor lentitud, gracias a sistemas de segundos mensajeros e influyen en reacciones enzimáticas en el interior de las células.

El resultado de ambos tipos de procesos puede ser la inhibición o excitación de las neuronas postsinápticas. Muchos neurotransmisores también son hormonas que las células endócrinas de órganos de todo el cuerpo liberan en el torrente sanguíneo. Así, mismo ciertas neuronas, las células neurosecretoras secretan hormonas en el encéfalo. (Rudolf, 2009)

Los efectos de los neurotransmisores en las sinapsis químicas se pueden modificar de diversas maneras:

1. Estimulación o inhibición de la síntesis del neurotransmisor.
2. Bloqueo o intensificación de la liberación del neurotransmisor.
3. Estimulación o inhibición del retiro del neurotransmisor.
4. Bloqueo o activación del sitio receptor.

Un agente que aumenta la transmisión sináptica o simula los efectos de un neurotransmisor natural es un agonista y otro que bloquea la acción de un neurotransmisor, un antagonista. (Rudolf, 2009)

La tabla 4 muestra un resumen de la farmacología general de los neurotransmisores no peptídicos en el Sistema Nervioso Central.

Tabla 4. Resumen de la farmacología de los receptores no peptídicos en el SNC.

Neurotransmisor	Anatomía	Mecanismos del Receptor
Acetilcolina	Todos los niveles: probables conexiones largas y cortas.	Excitatorio disminución de la conductancia de K^+
Dopamina	Todos los niveles: probables conexiones largas y cortas.	Excitatorio aumento de conductancia de Na^+ y cationes.
GABA	Interneuronas supraspinales; interneurona espinales relacionadas con la inhibición presináptica	Inhibitorio: Aumento de conductancia de Cl^-
		Inhibitorio: (presináptico) posiblemente disminución de conductancia de Ca^{2+} .
Glutamato/aspartato	Neuronas de relevo a todos los niveles.	Excitatorio: aumento de conductancia de Na^+ y cationes.
Glicina	Interneuronas espinales	Inhibitorio: Aumento de la conductancia de Cl^- .
Histamina	Mesencéfalo (área supramamilar) a hipotálamo y telencéfalo.	Excitatorio: disminución de la conductancia de K^+
5-Hidroxitriptamina (Serotonina)		Excitatorio: disminución de la conductancia de K^+
		Inhibitorio: aumento de la conductancia de K^+
Noradrenalina		Excitatorio: disminución de la conductancia de K^+
		Inhibitorio: aumento de la conductancia de K^+
		Excitatorio: disminución de conductancia de K^+ mediado por AMPc.

2.7.2 Transmisión GABA.

El ácido Gamma-aminobutírico (GABA) es el prototipo de los aminoácidos que ejercen una poderosa función inhibitoria en el SNC. Se encuentra ampliamente extendido por todo el SNC, desde la corteza hasta la médula espinal (Rudolf, 2009).

El GABA se identificó como constituyente químico único del cerebro en 1950, pero no se reconoció de inmediato su potencia como depresor del SNC. Inicialmente se realizaron experimentos con el receptor del estiramiento del crustáceo, el GABA imitó los efectos observados con la estimulación de los nervios inhibidores y al administrar picrotoxina se antagonizaron los efectos del GABA (Rudolf, 2009).

Kravitz y colaboradores (1963) demostraron que el GABA era el único aminoácido inhibidor que se encontraba exclusivamente en los nervios inhibidores del crustáceo y que se encuentra exclusivamente en los nerviosos inhibidores del crustáceo y que la potencia inhibitoria de los extractos se debía a su contenido de GABA. (Alcaraz, 2000)

La descarga de GABA se correlacionó, con la frecuencia de la estimulación nerviosa. Los registros intracelulares del músculo indicaron que la estimulación del nervio inhibitor y la administración del GABA producían incrementos idénticos de la conductancia de Cl⁻ en el músculo.

De esta forma se concluyó que el GABA media las acciones inhibitoras de las interneuronas locales en el cerebro, y que puede mediar la inhibición presináptica dentro de la médula espinal.

GABA media también la inhibición dentro de la corteza cerebral y entre el núcleo caudado y la sustancia gris.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC del mamífero. Se han dividido sus receptores en dos tipos principales:

- El receptor GABA_A, que es un canal de Cl⁻ de compuerta de ligando que se abre después de la descarga de GABA a través de las neuronas presinápticas.
- El receptor GABA_B, que es un miembro de la familia de receptores acoplados con proteína G que actúa tanto en las vías bioquímicas como en la regulación de los canales de iones.

El papel funcional de GABA es inhibitor. Su acción puede tener lugar en múltiples sitios de la neurona, de acuerdo con el tipo de sinapsis que se establezca. De este modo, puede producir inhibición presináptica y postsináptica. (Alcaraz, et., al, 2000)

La inhibición postsináptica conlleva la apertura del canal de Cl⁻ en la membrana postsináptica produciendo la entrada masiva de este ión e *hiperpolarización* de la célula. (Alcaraz, et., al, 2000)

En la inhibición presináptica que se aprecia en las terminaciones de las neuronas sensoriales primarias, la activación del receptor GABA_A axónico provoca un fenómeno de despolarización porque el equilibrio de Cl⁻ provoca la salida del ion en lugar de la entrada, esta *despolarización* local de la terminación nerviosa hace que disminuya la liberación el neurotransmisor, ya que en estas condiciones de despolarización es menor la entrada de Ca²⁺. (Alcaraz, 2000)

A continuación se ilustra el mecanismo de Acción del neurotransmisor GABA.

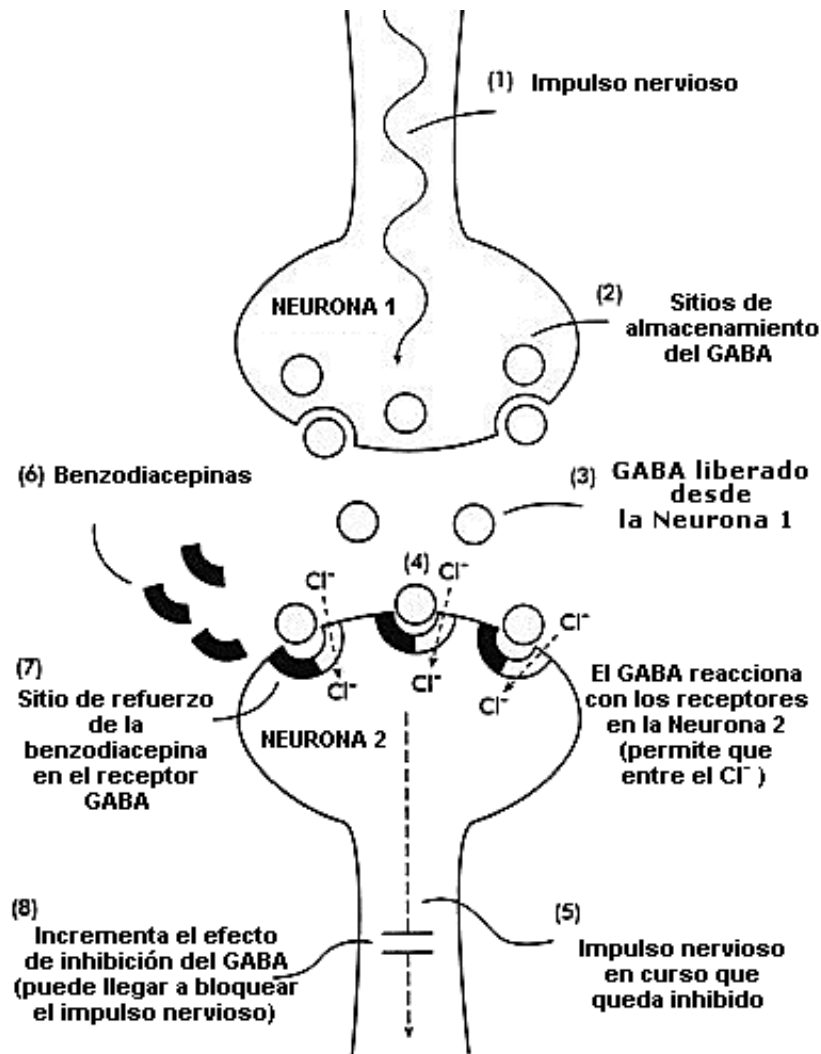


Fig. 12 Mecanismo de Acción del Neurotransmisor GABA. (Harper, et.al, 2003)

2.7.3 Barrera hematoencefálica

2.7.3.1 Estructura y Función

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura histológica y funcional que protege al Sistema Nervioso Central, se encuentra constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral y tienen una importancia capital en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y las células gliales y en el bloqueo del acceso de sustancias endógenas y exógenas. (Rudolf, 2009)

Las células endoteliales cerebrales son diferentes a las de otros órganos en dos aspectos fundamentales:

1. Presentan uniones intracelulares que evitan el paso transcápilar de moléculas polares como iones y proteínas.
2. Carecen de vesículas pinocíticas.

Como resultado de estas características anatómicas, las células endoteliales cerebrales conforman una barrera celular entre la sangre y el espacio intersticial para un adecuado funcionamiento neuronal.

La barrera hematoencefálica más que una capa pasiva de células es un complejo metabólico activo con múltiples bombas, transportadores y receptores para neurotransmisores.

Los vasos capilares en el tejido neuronal están constituidos por una capa simple de células endoteliales, asociadas a una membrana basal, y una capa casi continua de astrocito. Las células endoteliales de los capilares cerebrales tienen una alta resistencia eléctrica y presentan una relación mitocondria/citoplasma alta.

Las uniones intercelulares que constituyen la barrera hematoencefálica son extremadamente densas y complejas. Estructuralmente se encuentra formada por red de filamentos entrelazados con pocos espacios entre ellos y células endoteliales que yacen en una membrana basal cuya composición se describe en la siguiente tabla.

Tabla 5. Composición de la Membrana Basal de la Barrera Hematoencefálica. (Gert, 2003)

Composición de la membrana basal de la Barrera Hematoencefálica
Colágeno tipo IV
Laminina
Fibronectina
Proteoglicano
Heparano Sulfato

Adosados a la membrana basal se encuentran los pericitos que son células fagocíticas contráctiles que desempeñan un papel importante en la presentación de antígenos

actuando como una segunda línea de defensa. A continuación se ilustra la estructura de la Barrera Hematoencefálica. (Gert, 2003)

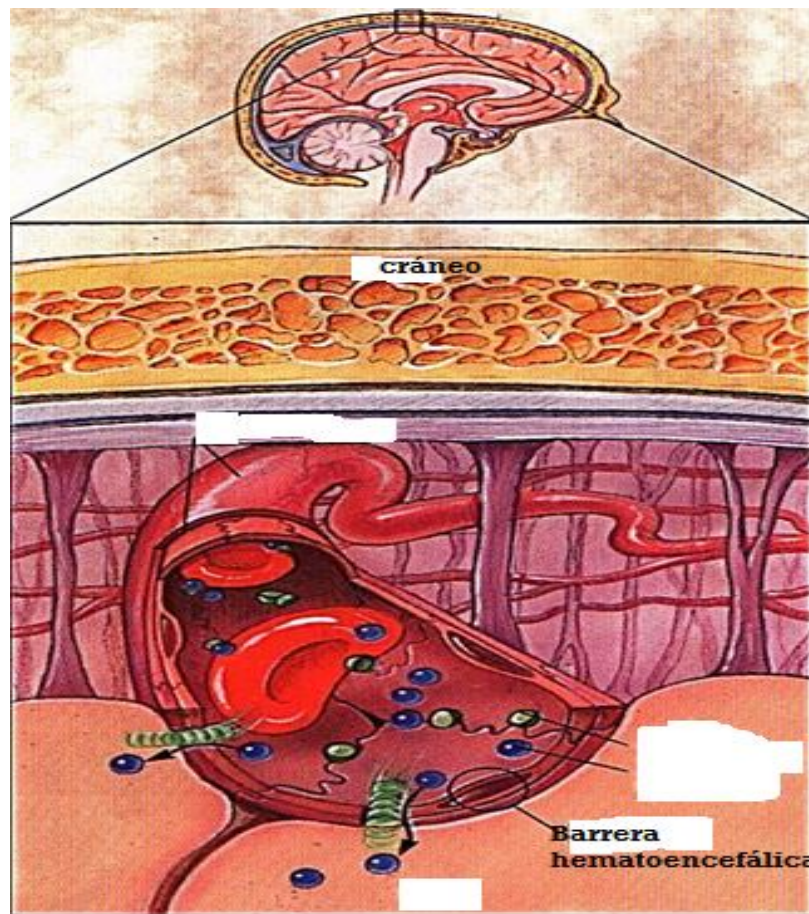


Fig. 13 Estructura de la Barrera Hematoencefálica. (Gert, et., al 2003)

2.7.3.2 Mecanismos de transporte en la barrera hematoencefálica.

El endotelio capilar que constituye la barrera hematoencefálica es permeable a ciertas sustancias necesarias para el metabolismo cerebral, tales como oxígeno, glucosa y aminoácidos esenciales. (Gert, 2003)

Para que ocurra este transporte es necesario considerar las características de la Barrera Hematoencefálica como epitelio:

- Es una lámina de células sobre la membrana basal.
- Las células están unidas por uniones gruesas.

- La permeabilidad es baja para las sustancias hidrófilas sin carga eléctrica en ausencia de transportadores de membrana.
- Existe un transporte facilitado de ciertos solutos orgánicos que presentan cinética de saturación, estereoespecificidad e interacciones competitivas entre compuestos semejantes.
- Datos que apoyan la existencia de sólidas uniones epiteliales son: alta resistencia eléctrica, permeabilidad iónica baja y baja conductancia hidráulica.

La glucosa es un sustrato energético primordial para el cerebro, por lo que requiere un sistema de transporte que le permita atravesar el endotelio fácilmente y asegure un aporte adecuado y constante de la misma (Gert, 2003).

Existen cuatro sistemas transportadores para aminoácidos en el endotelio de los capilares del sistema nervioso central. Estos sistemas de transporte tienen una baja capacidad debido a que varios de los compuestos se requieren en bajas cantidades y existen mecanismos homeostáticos que preservan su contenido sin necesidad de grandes flujos desde la sangre (Gert, 2003).

Las células endoteliales de los capilares cerebrales están dotados de una ATPasa Na^+/K^+ que transporta el sodio hacia el intersticio cerebral y al potasio en dirección opuesta, regulando la concentración extracelular de este último generada por la actividad neuronal (Gert, 2003).

La Barrera Hematoencefálica desempeña una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Debido a su composición, las sustancias liposolubles entran al cerebro por difusión a través de la lámina endotelial. (Gert, 2003).

La mayoría de los nutrientes, que suelen ser hidrosolubles requieren de mecanismos de transporte especializados para glucosa. De esta manera, existen transportadores especializados para glucosa, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos y precursores de ácidos nucleicos y aminos, que garantizan el aporte de nutrientes, hormonas y sustancias precursoras de neurotransmisores cerebrales. (Gert, 2003).

Por consiguiente la barrera hematoencefálica regula el entorno nutritivo y homeostático del sistema nervioso central permitiendo el acceso de sustancias a través de tres mecanismos:

- Rutas extracelulares.
- Difusión a través del plasma.
- Sistemas selectivos de transporte.

Las *rutas extracelulares* funcionan mediante el pasaje residual que ocurre en torno a las células endoteliales, el espacio subaracnoideo y otros puntos de posible trasvase de sustancias desde el torrente sanguíneo. La cantidad de sustancias que pasa por esta ruta es muy baja, con un riego de sangre al cerebro unidireccional y una constante de entrada de 10^{-5} a 10^{-6} mL/g/min (Gert, 2003).

La segunda ruta, representada por la difusión a través de membranas depende de las sustancias que entran en la vertiente luminal-sanguínea de las células emergiendo de la parte abluminal o cerebral (Gert, 2003).

Las propiedades de esta difusión plasmalemal dependen fundamentalmente de las características químicas de cada molécula, su liposolubilidad, sus enlaces hidrogenados, su peso molecular, carga iónica, estructura tridimensional, unión a proteínas y capacidad de autoagregación (Gert, 2003).

Las propiedades de la membrana a través de la cual pasan estas sustancias también importan, sobre todo la carga de la superficie y la fluidez de la membrana (Gert, 2003).

La tercera ruta de los sistemas selectivos de transporte, transporta la glucosa al interior del cerebro. Estos sistemas permiten el acceso de sustancias específicas al cerebro con una velocidad de 10^3 veces superior a la que les permitirían otros sistemas no saturables. (Gert, 2003)

La barrera hematoencefálica muestra una reducida endocitosis comparada con otros tejidos, no obstante, el transporte vesicular (vía receptor, por adsorción o endocitosis de fluido de fase) tiene una función importante en la liberación de diversos compuestos hacia el cerebro. (Gert, 2003)

La barrera hematoencefálica posee una permeabilidad para diversos solutos, dependientes de sus propiedades fisicoquímicas, tales como:

- Liposolubilidad.
- Unión a proteínas plasmáticas.
- Grado de Ionización a pH fisiológico.

Los solutos hidrosolubles y polares atraviesan la barrera hematoencefálica con dificultad a no ser que dispongan de transportadores especiales como en el caso de la glucosa y los aminoácidos (Gert, 2003).

La barrera hematoencefálica posee una importante regulación osmótica siendo casi libre el paso del agua, pero presentando una importante restricción al paso de cationes como el sodio o potasio, que a pesar de poseer transportadores específicos sólo logran el equilibrio con el plasma.

Los fármacos pueden ser transportados vía transporte activo primario localizado en la barrera hematoencefálica, que incluyen a la glicoproteína-P, miembros de la familia de proteínas, transportadores de ácidos monocarboxílicos y transportadores de iones orgánicos.

2.7.3.3 Transporte de fármacos en BHE.

No sólo las moléculas biológicas, sino también los fármacos están sometidos a control por la barrera hematoencefálica. Los factores a tener en cuenta para que un fármaco atraviese la BHE son:

- Tamaño molecular y su unión a proteínas plasmáticas (los fármacos más unidos a las proteínas tiene poca posibilidad de atravesar la BHE, ya que solo la fracción libre de fármaco permea a través de ésta) (Hans, 2004).
- La solubilidad en lípidos (los fármacos más liposolubles atraviesan la BHE con mayor facilidad) (Hans, 2004).
- El pH, la acidez o alcalinidad del medio influye en la disociación de fármacos (bases o ácidos débiles), los pH's plasmáticos bajos favorecen el paso de los ácidos al aumentar su concentración no iónica y viceversa con las bases. (Hans, 2004).

- Su farmacocinética, los fármacos pueden competir entre sí o con diversos sistemas de transporte.

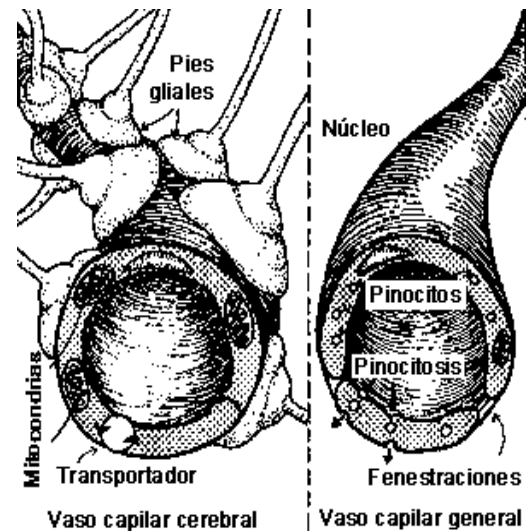
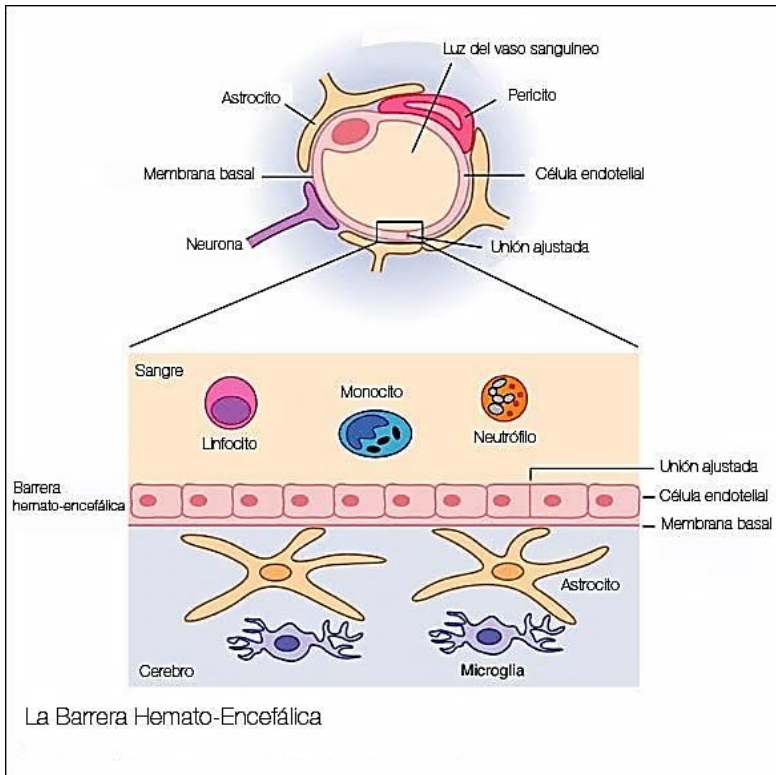


Fig. 14 Transporte de fármacos a través de la BHE. (Harper, et.,al 2003)

2.8 Epilepsia.

La **epilepsia** es una alteración neurológica con alta incidencia alrededor del mundo. De acuerdo a las estadísticas se estima que más de 40 millones de personas sufren de esta enfermedad de los cuales más del 80% viven en países en vías de desarrollo (Noboku, 2007).

El término epilepsia proviene del griego *epilenbanein* que significa “ser atacado o tomado por sorpresa” haciendo alusión a la severidad de las crisis epilépticas, siendo así una patología que afecta no solo al individuo, sino a su entorno.

Desde el punto de vista bioquímico se define la epilepsia como un trastorno de la actividad de las neuronas corticales de la corteza cerebral, que es traducido en descargas eléctricas que provocan una crisis en forma de convulsiones. (Noboku, 2007).

El cerebro está perfectamente diseñado para interpretar toda la información que llega tanto del interior como del exterior y para ordenar las respuestas adecuadas a cada situación, controlando así los movimientos del cuerpo, pensamientos y percepción del entorno. Para que esto ocurra, es necesario que exista un potencial eléctrico que permite a las neuronas comunicarse entre sí y transmitir la información a través de las fibras nerviosas al resto del organismo (Noboku, 2007).

Para que ocurra la comunicación entre neuronas y se desencadenen estas descargas eléctricas antes mencionadas, es necesario que ocurra una entrada y salida de iones en las neuronas (Noboku, 2007).

Cuando se presenta el *estado epiléptico*, ocurre una descarga eléctrica brusca en un grupo neuronal denominado foco epiléptico. Los factores que detonan dicha descarga aún no han sido conocidos por completo. La descarga eléctrica es el resultado de una despolarización intensa y mantenida que no es controlada por algún sistema inhibitorio.

Un foco eléctrico, es el resultado de una descarga controlada por los sistemas de inhibición fisiológicos. La pérdida de esta inhibición o una excitación exagerada induce un ritmo fuerte en el área epiléptogena y una expansión de la descarga hacia áreas cercanas y hacia el tronco cerebral dando lugar a crisis generalizadas y a una pérdida de conciencia. A su vez, desde el tronco se induce una retroalimentación excitatoria del foco cortical.

Existen varios tipos de estados epilépticos:

1. Parciales.
2. Generalizados.
3. Convulsivos (tónicos, clónicos, mioclónicos).
4. No convulsivos (status de ausencia).

2.8.1 Clasificación de las crisis epilépticas.

El termino convulsión se refiere a un trastorno transitorio de la conducta, causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de poblaciones enteras de neuronas cerebrales. En la epilepsia se presentan convulsiones periódicas e impredecibles que son originadas en la corteza cerebral. (Noboku, 2007)

De manera general las crisis epilépticas se han clasificado de acuerdo a su severidad en dos tipos:

1. Crisis parciales. Que se inician de manera focal en un sitio cortical.
2. Crisis generalizadas: Abarcan ambos hemisferios de la corteza cerebral.

La mayor parte de las convulsiones parciales complejas se originan en el lóbulo temporal. Son ejemplos de convulsiones generalizadas

Las manifestaciones conductuales en las crisis convulsivas dependen de las funciones que ejerza normalmente el sitio de la corteza donde se originan las convulsiones. Por ejemplo, la crisis convulsiva que afecta la corteza motora se relaciona con sacudidas clónicas de la parte del cuerpo controlado por esa región de la corteza (Noboku, 2007).

Una convulsión parcial simple se vincula con la preservación del conocimiento o estado de conciencia. Una convulsión parcial compleja conlleva un trastorno del conocimiento. La mayor parte de las convulsiones parciales complejas se originan en el lóbulo temporal (Noboku, 2007).

A continuación se muestra una tabla que describe la clasificación de las crisis convulsivas y el cuadro que se presenta en cada una.

Tabla 6. Clasificación de las crisis epilépticas.

TIPO DE CONVULSIÓN	CARACTERÍSTICAS
CONVULSIONES PARCIALES	
Parciales Simples	Diversas manifestaciones que dependen de la región de la corteza activada por la crisis convulsiva que duran aproximadamente de 20 a 60 segundos.
Parciales Complejas	Pérdida del conocimiento que dura 30s a 2 min, en muchos casos aunada a movimientos propositivos,

	como chasquear los labios o agitar la mano.
Parciales con convulsiones tonicoclónicas generalizadas de manera secundaria.	La convulsión simple o parcial compleja evoluciona hasta convulsión tónico-clónica con pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alterada con periodos de relajación (convulsiones clónicas) que en su forma característica duran uno a dos minutos.
CONVULSIONES GENERALIZADAS	
Crisis de Ausencia	Inicio repentino de pérdida del conocimiento, aunado a mirada fija e interrupción de las actividades que estaba efectuando, y que dura de manera característica menos de 30 segundos.
Convulsión Mioclónica	Contracción muscular leve (un segundo de duración) de tipo choque eléctrico, ya sea en una extremidad o generalizada.
Convulsión tónico-clónica	Lo mismo que en el caso de las convulsiones parciales con convulsiones tonicoclónicas generalizadas de manera secundaria salvo que no van precedidas por una convulsión parcial.

El estado epiléptico según su gravedad puede representar riesgo de muerte, daño neuronal y daño sistémico. Se reconocen varios tipos de estado epiléptico. Su duración oscila entre 30 minutos (Noboku, 2007).

El criterio de clasificación más conocido estima que el tiempo de inclusión de crisis debe ser a los cinco minutos de una actividad epiléptica continua, considerando que la duración de una crisis generalizada no es mayor a dos minutos.

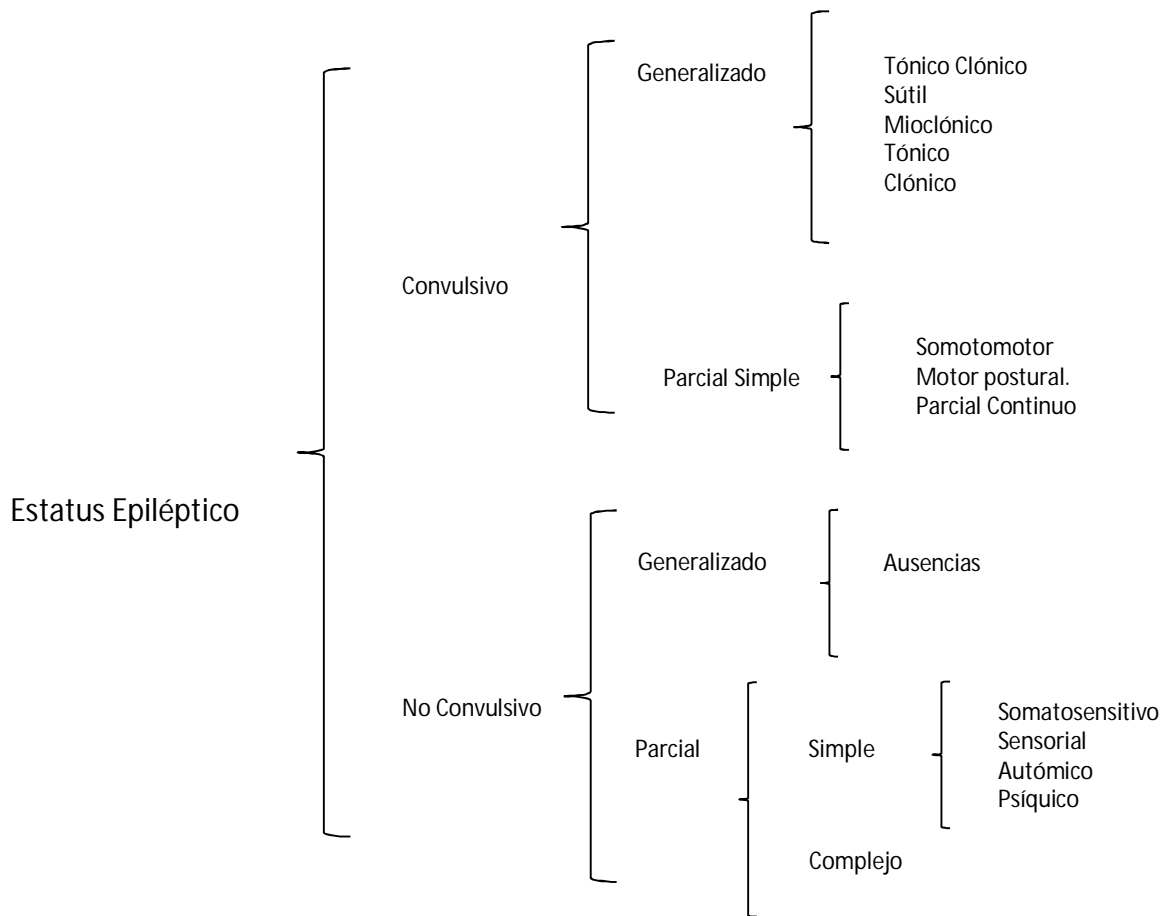


Fig. 14 Clasificación del status epileptico.

2.8.2 Vías de propagación de las crisis epilépticas.

En la siguiente imagen se muestran los circuitos involucrados en las crisis focales (A) y en las Crisis Generalizadas Primarias (B). Inicialmente la descarga se propaga por las proyecciones intrahemisféricas hacia la corteza ipsilateral (1), por las fibras comisurales hacia la corteza contralateral (2) y hacia los centros subcorticales (3).

Las crisis generalizadas de un foco se producen propagándose primero a los centros subcorticales (4) los cuales a su vez irradian rápidamente y expresan la actividad paroxística a nivel cortical en las conexiones difusas entre el tálamo y el córtex. (Noboku, 2007)

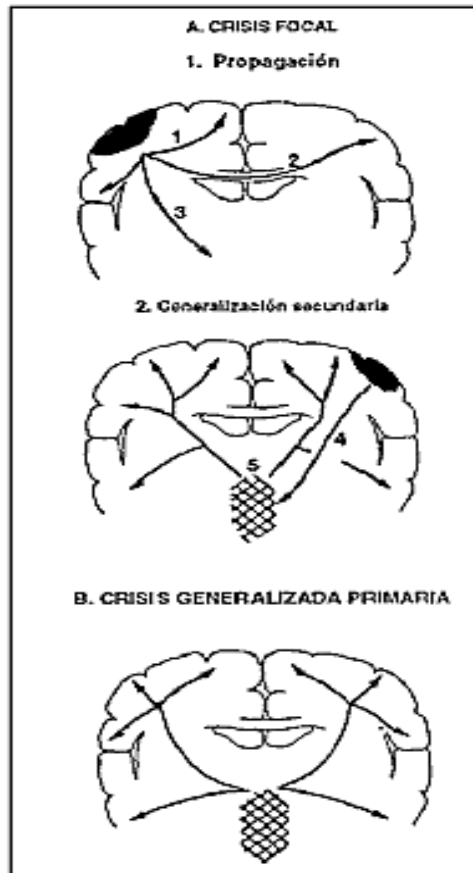


Fig. 15 Expresión clínica de las Crisis Convulsivas. Modelos fisiopatológicos para las convulsiones focales y generalizadas primarias y secundarias. (Gill, et., al. 2006)

2.8.3 Naturaleza y mecanismo de las convulsiones.

Hace más de un siglo John Hughlings Jackson, postuló que las convulsiones eran causadas por “descargas ocasionales repentinas, excesivas, rápidas y locales de la sustancia gris”, y que sobrevenía una crisis convulsiva generalizada cuando el tejido cerebral normal se veía invadido por actividad convulsiva iniciada en un foco anormal.

Esta importante deducción brindó una estructura muy valiosa a los conceptos sobre los mecanismos de la epilepsia parcial. El uso y desarrollo del Electroencefalograma en 1930 permitió el registro de la actividad eléctrica y mayor conocimiento de la epilepsia (Noboku, 2007).

De esta manera ya en 1950 se sabía que la reducción de la actividad sináptica inhibitora podía originar convulsiones; es decir se concluyó que la reducción inhibitora y el aumento de la actividad sináptica excitadora desencadenan una crisis convulsiva.

Los neurotransmisores que median de manera global la transmisión sináptica son aminoácidos, ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato, como principales neurotransmisores inhibidores y excitadores, respectivamente. (Gill, 2006)

Los estudios farmacológicos pusieron en claro que la microinyección de antagonistas del receptor GABA_A o de los agonistas en diferentes subtipos de receptores del glutamato desencadenan convulsiones en animales de experimentación *in vivo*. (Gill, 2006)

Los agentes farmacológicos que estimulan la inhibición sináptica mediada por el GABA inhiben las convulsiones en diversos modelos. Los antagonistas del receptor del glutamato, bloquean también las convulsiones en diversos modelos, entre ellas las evocadas por convulsivos químicos como el Pentilentetrazol (Gill, 2006).

Durante la época de 1960 los estudios electrofisiológicos celulares de la epilepsia se centraron en la dilucidación de los mecanismos de los mecanismos de “cambio de la despolarización” que produce una descarga de potencial de acción (Gill, 2006).

En la mayor parte de las neuronas corticales, el cambio de despolarización consiste en una gran despolarización de la membrana neuronal, aunada a una descarga de potenciales de acción (Gill, 2006).

En 1970 se llevaron a cabo estudios *in vitro* de convulsiones en tejido encefálico, realizando registros mediante electroencefalogramas, observándose que las reducciones de la función sináptica inhibitoria podían desencadenar la actividad epileptiforme (Gill, 2006).

2.8.4 Tratamiento farmacológico de la epilepsia.

Hasta hace poco tiempo, el tratamiento farmacológico de la epilepsia se sustentaba en los fármacos convencionales: fenitoína (PHT), carbamazepina (CBZ), fenobarbital (PB), benzodiazepinas (BZDs), valproato (VPA), y etosuximida (ESM). Debido a su alta biodisponibilidad, las BENZODIACEPINAS han sido utilizadas ampliamente en el tratamiento de la epilepsia.

Para el desarrollo del presente proyecto se decidió utilizar *Clonazepam* como fármaco anticonvulsivo debido a su acción prolongada con eficacia en crisis clonicotónicas y su alta potencia farmacológica (Gill, 2006).

A partir de los últimos 60 años, científicos e investigadores de todo el mundo se han centrado en el estudio e investigación de la epilepsia con la finalidad de describirla e identificar sus factores de riesgo, prevalencia, susceptibilidad a padecerla, desde la perspectiva celular y sistémica. Desarrollando así terapias que hoy en día han posibilitado el tratamiento de la enfermedad (Gill, 2006).

Recientemente se han detectado algunos factores importantes que han dificultado la realización de estudios farmacéuticos que posibiliten el desarrollo de nuevas terapias eficaces para la epilepsia, algunos que podemos mencionar son los siguientes:

- Dificultad para definir y clasificar las crisis epilépticas.
- Necesidad de diferentes tipos de estudios especializados según el enfoque de la investigación.
- Dificultad para diferenciar claramente los eventos no epilépticos.
- Falta de aplicación de nuevas tecnologías en la investigación farmacéutica.

El objetivo de los tratamientos antiepilépticos desarrollados consiste en lograr el control de las crisis epilépticas y la disminución de sus efectos adversos (Fejerman y Medina, 1986).

En la actualidad un 30% de los pacientes que padecen epilepsia que se encuentra bajo algún tratamiento no presenta un control adecuado de las convulsiones, normalmente presentan convulsiones parciales sin que se presente la generalización secundaria. (Bravo, 2005)

De este porcentaje de pacientes, un 20% responde al tratamiento, pero tiende a presentar crisis generalizadas si suspende la medicación, y otro 20% de los pacientes no logra suprimir las crisis, presentándose efectos adversos. (Bravo, 2005).

No todos los tipos de epilepsia responden al mismo medicamento e incluso existen fármacos anticonvulsivos que son eficaces en cierto tipo de crisis, pero agravan otras.

El tratamiento de la epilepsia se debe iniciar siempre con un solo fármaco, incrementando las dosis lentamente hasta un control total de la crisis o la aparición de efectos adversos (Gill, 2006).

El tratamiento farmacológico de la Epilepsia se inició a mediados del siglo XIX cuando Sir Charles Locock propone la introducción del bromuro. En 1912 se empezó a utilizar el fenobarbital como anestésico. Desde entonces, durante un cuarto de siglo fue el único fármaco utilizado como antiepiléptico hasta la introducción de la Fenitoína, a la que ha seguido un número importante de fármacos, que intentan de una forma u otra aproximarse a la del antiepiléptico ideal.

Los fármacos antiepilépticos se han desarrollado en varias etapas. Hasta 1970 se disponía de los antiepilépticos clásicos con características bien conocidas. En los últimos años se han incorporado moléculas más eficaces, con menores efectos adversos y mecanismos de acción mejor entendidos que sus predecesores, mientras que otros se encuentran en diferentes etapas de investigación clínica (Gill, 2006).

Muchos de los fármacos antiepilépticos son utilizados para el tratamiento de crisis parciales o sin generalización secundaria y otros como asociación al tratamiento preventivo en pacientes que no se controlan satisfactoriamente con los antiepilépticos convencionales (Gill, 2006).

A continuación se muestra una tabla que describe el porcentaje de éxito de las terapias antiepilépticas (Gill, 2006).

Tabla 7. Porcentaje de Éxito de la terapia antiepiléptica

Tipo de Convulsión	Supresión total (%)	Mejorías (%)
Ausencias	50	25
Tónico-Clónicas	60 a 65	20
Parcial Simple	Valor desconocido	20
Parcial Compleja	Menor a 30	Menor a 50

2.8.5 Fármacos antiepilépticos

2.8.5.1 Mecanismo de acción y clasificación.

Los medicamentos antiepilépticos son diseñados bajo dos enfoques terapéuticos básicos:

1. Impedir las génesis de la descarga epiléptica.

2. Impedir o dificultar la difusión de la descarga epiléptica.

Hasta ahora no se ha encontrado ningún fármaco eficaz que logre prevenir la génesis de las crisis. Sin embargo, algunos fármacos si logran evitar o moderar la propagación de la descarga actuando a distintos niveles (Velasco, 2003).

Las crisis convulsivas se originan por un desequilibrio entre procesos excitadores e inhibidores.

La transmisión del impulso nervioso a nivel sináptico está mediada por dos neurotransmisores principales:

- El ácido glutámico que actúa como excitador que favorece la despolarización de la neurona al abrir los canales iónicos de Na⁺.
- GABA que actúa como inhibidor al inducir la apertura de canales de Cl⁻. (Velasco, 2003)

De forma general, los antiepilépticos pueden actuar a dos niveles:

- Inhiben la acción del Ácido Glutámico.
- Favorecen la acción de GABA.

Por otra parte, el mecanismo de acción puede centrarse en la liberación del neurotransmisor a nivel presináptico o en la acción sobre los canales iónicos a nivel postsináptico (Velasco, 2003).

Los canales iónicos sobre los que es posible actuar incluyen los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, que median el ascenso de los potenciales de acción, y los canales de Cl⁻ que inducen a la hiperpolarización de la membrana (Velasco, 2003).

La activación neuronal viene dada por el potencial de membrana, y éste depende directamente de las concentraciones de iones en el espacio intra y extracelular el flujo de los mismos a través de la membrana. (Velasco, 2003)

Se han clasificado a los fármacos antiepilépticos de acuerdo a su mecanismo de acción en Fármacos Antiepilépticos de Primera, Segunda y Tercera Generación, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8. Clasificación de Fármacos Antiepilépticos.

Primera Generación	Fenitoína o difenilhidantoína (Epanutin [®] , Neosidantoína [®]) Fosfenitoína (Cereneu [®]) Fenobarbital (Gerdeal [®] , Luminal [®] , Luminaletas [®]) Primidona (Mysoline [®]) Etosuximida (Zarontin [®])
Segunda Generación	Ácido Valproico (Depakine [®]) Valpromida (Depamide [®]) Carbamacepina (Tegretol [®]) Clonazepam (Rivotril [®])
Tercera Generación	Vigabatrina (Sablilex [®]) Lamotrigina (Crisome [®] , Lamictal [®] , Labileno [®]) Felbamato (Taloxa [®]) Gabapentina (Gabatur [®] , Neurontin [®]) Tiagavina (Gabitril [®]) Topiramato (Topamax [®]) Levetiracetam (Kepra [®]) Oxcarbazepina (Trileptal [®])

2.8.5.2 Antiepilépticos clásicos o de primera generación.

Ejercen una fuerte inducción/inhibición del sistema citocromo P 450 y se unen en gran medida a proteínas plasmáticas, por lo que habitualmente precisan monitorización. Los pacientes que los consumen presentan reacciones adversas en los sistemas nerviosos central, hematológico, hepático y otros (Velasco, 2003).

Fenitoína. La utilización de Fenitoína es uno de los grandes avances de la neurología moderna, ya que controla las crisis de manera adecuada sin excesiva sedación. La Fenitoína regula el transporte de sodio, actuando sobre la ATPasa Na^+/K^+ para restablecer el desequilibrio iónico provocado por un exceso de despolarización. Se absorbe bien por vía oral, se une en parte a proteínas plasmáticas y se metaboliza en el hígado (Velasco, 2003)

Fenobarbital. Presenta efectos anticonvulsivos a dosis bajas. Su acción es menos selectiva que la de la fenitoína ya que actúa a distintos niveles. Facilita la acción del GABA uniéndose al receptor GABA_A y prolongando el tiempo en el cual se encuentra abierto el canal de cloro (Velasco, 2003).

Con concentraciones superiores, inhibe el canal de Na⁺ y los canales de Ca⁺² de tipo L Y N presinápticos deprimiendo la propagación de descargas paroxísticas y la actividad de ciertos focos epilépticos (Velasco, 2003).

Se puede administrar por vía oral o Intravenosa. El efecto indeseable más frecuente es la sedación. Produce también alteraciones óseas, ataxia y polineuropatía. Se pueden presentar también cuadros alérgicos como dermatitis y reacciones de hiperexcitabilidad, particularmente en niños (Velasco, 2003).

Se utiliza principalmente en casos de epilepsias tónico-clónicas generalizadas en convulsiones neonatales y, en epilepsias parciales, convulsiones febriles, convulsiones alcohólicas y status epiléptico (Velasco, 2003).

Etosuximida

Es un medicamento que se desarrolló específicamente para el tratamiento de epilepsias generalizadas en la variedad de ausencias. Los efectos colaterales de la administración de este medicamento incluyen molestias gastrointestinales, somnolencia, mareo y problemas de equilibrio. Algunos disminuyen a medida que se continúa el tratamiento (Velasco, 2003).

Primidona. Es un agente útil en ausencias generalizadas. Químicamente se asemeja al Fenobarbital, con el cual comparte la mayor parte de sus propiedades, ya que se metaboliza en el hígado dando lugar al propio fenobarbital y a otro metabolito activo, la feniletilmanolamida. Por ello, los efectos terapéuticos (y tóxicos) se deben en realidad a su conversión a Fenobarbital (Velasco, 2003).

2.8.5.3 Antiepilépticos de segunda generación

Los fármacos de Segunda Generación tienen una eficacia similar, mayor tolerabilidad y mejor perfil farmacocinético que los de primera generación (Velasco, 2003).

Ácido Valproico.

Es un fármaco de amplio espectro que cubre tanto crisis parciales como generalizadas. Es altamente eficaz en las ausencias y en las epilepsias mioclónicas. Se puede administrar por vía oral e intravenosa.

Su amplio espectro se puede atribuir a sus múltiples mecanismos de acción, ya que inhibe los canales de Na⁺ (afectando de forma directa la excitabilidad de la membrana). Facilita la acción de GABA aumentando su síntesis (por estímulo de la Ácido Glutámico descarboxilasa) y reduciendo su degradación (por inhibición del Ácido Succínico-Deshidrogenasa y de la GABA transaminasa). Este incremento de la concentración cerebral de GABA inhibe la generalización de las crisis y la propagación de las descargas tanto de baja como de alta frecuencia. (Velasco, 2003)

Produce efectos secundarios-dosis dependientes, como molestias gastrointestinales (sensación de ardor, náuseas, vómito, anorexia, disrrea y estreñimiento), que va decreciendo a medida que avanza el tratamiento; también produce de forma frecuente temblores. (Velasco, 2003)

2.8.5.4 Antiepilépticos nuevos o de tercera generación.

En los últimos años se ha comercializado una serie de fármaco con características farmacocinéticas y un perfil de seguridad que en principio mejoran los de los fármacos tradicionales. Se absorben en el intestino y se metabolizan por vías independientes del sistema microsomal hepático, por lo que presentan escasa interacciones significativas desde el punto de vista clínico. Los efectos adversos suelen ser tolerables y la incidencia de reacciones medicamentosas es mucha. (Velasco, 2003).

Tabla 9. Ventajas e Inconvenientes de los Antiepilépticos Nuevos o de Tercera Generación

FÁRMACO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Vigabatrina	Útil en convulsiones infantiles. Escasas interacciones. Escasos efectos adversos.	Tres dosis/día Alteraciones de la conducta. Alteraciones visuales.

Lamotrigina	Amplio espectro de acción. Útil en crisis generalizadas.	Alergia. Abundantes interacciones.
Gabapentina	Buena Tolerancia. No origina Interacciones.	Tres dosis/día Eficacia limitada
Tiagabina	Buena Tolerancia. No origina interacciones.	Tres dosis/día Eficacia limitada
Topiramato	Útil en crisis parciales. No origina interacciones.	Pérdida de Peso Nefrolitiasis

2.8.6 Benzodiazepinas como antiepilépticos.

Las benzodiazepinas fueron sintetizadas por el Químico Polaco Stembach en los Laboratorios Hoffman la Roche, en Nutley, Nueva Jersey; y comercializadas a partir de 1957.

La estructura química de las benzodiazepinas es muy similar, ya que poseen un mismo anillo heptagonal (Fig 21) mejor conocido como anillo B, el núcleo benzodiazepínico, con dos nitrógenos, que según su disposición permite distinguir entre: 1,4-benzodiazepinas (con nitrógenos en posición 1 y 4), las 1,5 Benzodiazepinas y las 3,4 Benzodiazepinas).

Todos estos compuestos presentan un mismo perfil farmacodinámico, pero sus propiedades farmacocinéticas son diferentes.

A continuación se muestra la estructura general de las Benzodiazepinas.

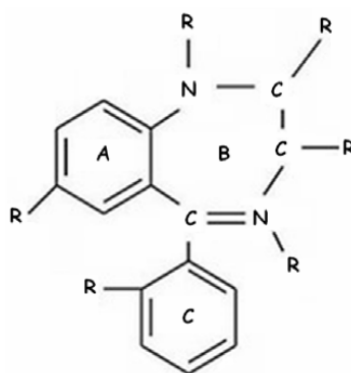


Fig 16. Estructura General de las Benzodiazepinas (R, radical; A, B y C son la distinción de anillos heterocíclicos)

2.8.6.1 Actividad terapéutica de las benzodiazepinas.

Las benzodiazepinas pueden producir efectos hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos y miorrelajantes, de acuerdo a como se describe en la siguiente tabla.

Tabla 10. Efectos producidos tras la administración de benzodiazepinas

Acción	Uso Clínico
Ansiolítico (Alivio de ansiedad)	Ansiedad y trastornos de pánico, fobias.
Hipnótico (Facilita el sueño)	Insomnio
Miorrelajante (Relajación muscular)	Espasmos musculares, trastornos espásticos.
Anticonvulsivo (Contra crisis epilépticas)	Ataques causados por intoxicación a causa de la ingestión de drogas, algunas formas de epilepsia.
Amnesia (deterioro de la memoria a breve plazo)	Premedicación antes de operaciones, sedación en intervenciones de cirugía menor.

La familia de las benzodiazepinas incluye una gran cantidad de moléculas que comparten estas propiedades terapéuticamente. Los fármacos pertenecientes a esta familia tienen propiedades anticonvulsivantes. Sin embargo, solo algunas se administran primariamente para este fin. (Velasco, 2003)

Facilitan la acción GABAérgica, fijándose al lugar benzodiazepínico del receptor GABAA y aumentando la afinidad del receptor por el GABA. En altas concentraciones inhiben los canales de Na⁺, reduciendo las descargas de alta frecuencia. En dosis altas inhiben también los canales L y N de Calcio, reduciendo la liberación de neurotransmisores. (Velasco, 2003)

El Diazepam se utiliza como fármaco de elección en casos de crisis epilépticas. La inyección intravenosa es capaz de interrumpir esta hiperactividad cerebral en la mayoría de los casos. (Velasco, 2003)

Otras benzodiazepinas usadas en la epilepsia en la variedad de ausencias y en epilepsias mioclónicas que no responden a estas sustancias son el *Clonazepam* y el *Cloracepato*, también utilizadas en neuralgias, jaquecas y tic dolorosos. (Velasco, 2003)

La principal ventaja de las Benzodiazepinas es su gran margen de seguridad terapéutica. Sin embargo, efectos secundarios como la somnolencia, la ataxia, la confusión, el vértigo,

son habituales. Además se ha establecido que su uso prolongado produce dependencia. (Velasco, 2003)

2.8.6.2 Mecanismo de acción y receptores para benzodiazepinas.

La acción molecular de las benzodiazepinas se basa en dos hechos fundamentales; facilitan la transmisión fisiológica de carácter inhibitor mediada por GABA y se fijan en el Sistema Nervioso Central a sitios específicos con una afinidad que guarda estrecha relación con su potencia farmacológica. (Velasco, 2003)

Las Benzodiazepinas facilitan la transmisión mediada por GABA, mediante una acción sinérgica ejercida a nivel postsináptico. En cuanto a los receptores específicos en el Sistema Nervioso Central para las Benzodiazepinas, éstos forman parte del complejo Ácido Gamma-aminobutírico. Las BZD potencian la acción inhibitoria medida por el GABA. Los receptores de las BZD se distribuyen por todo el cerebro y la médula espinal. (Velasco, 2003)

Todas las BZD actúan aumentando la acción de este neurotransmisor. GABA inhibe la comunicación de las neuronas. Aproximadamente el 40% de los 10000 millones de neuronas del cerebro responden a GABA, por ello podemos afirmar que el efecto que ejercen las BZD es eficaz. (Velasco, 2003)

Lo que hacen las BZD es aumentar la acción del GABA para evitar la excitación de las neuronas de la siguiente manera:

1. GABA es liberado en el espacio interneuronal.
2. El GABA reacciona con los receptores de la neurona postsináptica, la reacción producida permite la entrada de iones Cl^- en la neurona.
3. Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso.
4. Las BZD reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA.
5. Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

Las BZD también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una BZD con su receptor potencia la acción de GABA, lo cual permite que entre en las

neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el α -1) es el responsable de los efectos sedativos, el otro (α -2), es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos el (α -1, α -2, α -5) son los responsables de los efectos anticonvulsivos (Velasco, 2003).

Como resultado de este incremento de la actividad inhibitoria del GABA causada por las BZD, hay una disminución de la producción cerebral de neurotransmisores excitatorios, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetilcolina y dopamina. Esos neurotransmisores son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endócrinas, control del ritmo cardiaco y tensión sanguínea, todas las cuales pueden resultar en efectos adversos producidos por las BZD (Velasco, 2003).

2.8.6.3 Farmacocinética de las benzodiazepinas.

Las BZD se absorben por vía oral. El tiempo que tardan en alcanzar las concentraciones máximas oscila entre 30 minutos y 6 horas. La biodisponibilidad oral de las BZD fluctúa entre el 75% y 100%. Por vía intramuscular su absorción es muy irregular con el riesgo de que precipiten (Velasco, 2003).

Algunas benzodiazepinas se unen a las proteínas plasmáticas (albúmina) entre un 85 y 100% salvo en el caso de *Clonazepam* (50%) y *Alprazolam* (70%). Su metabolismo se da en mayor o menor medida por el sistema microsomal hepático. Una de las particularidades de la Biotransformación es que la mayor parte de ellas origina metabolitos activos (Velasco, 2003).

2.8.7 Clonazepam fármaco anticonvulsivo

El Clonazepam 1,4-benzodiazepina, cuya fórmula química se muestra en la figura 18 y corresponde a (5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona) que es un derivado clorado del nitrazepam en la posición 2 del anillo C. (Florez, 2003)

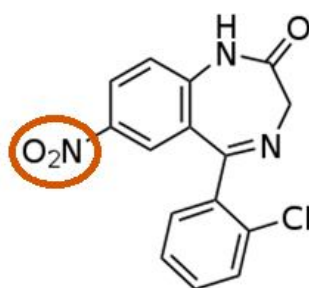


Fig. 18 Estructura química del Clonazepam

La tabla 10 resume las propiedades farmacológicas del Clonazepam. En estudios de relación estructura-actividad biológica de BZD se ha encontrado actividad biológica por el efecto en particular de la sustitución en la posición 7 del anillo A. (Florez, 2003)

Tabla 11. Propiedades farmacológicas y fisicoquímicas del Clonazepam

CLONAZEPAM	
Fórmula Química	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃
Peso Molecular	315.715 g/mol
Biodisponibilidad	90%
Metabolismo	Hepático
Vida Media	30-40 Horas
Excreción	Renal
Categoría Embarazo	D
Status Legal	Psicotrópico: Lista IV
Vías de Administración	Oral e IV

Su eficacia al ser administrado Vía Intravenosa es alta en la disminución de estado epiléptico clónico tónico en niños, y estudios recientes revelan que ha mostrado una mayor potencia farmacológica en comparación al Diazepam administrado Vía Intravenosa (Florez, 2003).

Otros estudios reportados en artículos arbitrados señalan que el Clonazepam es también efectivo en el tratamiento de epilepsia fotosensitiva y epilepsia mioclónica juvenil. Está indicado en el tratamiento de crisis mioclónicas, ausencias de tipo epiléptico, crisis convulsivas tónico clónicas y trastornos de pánico o sueño (Florez, 2003).

2.8.7.1 Dosis

Las dosis de Clonazepam deben adaptarse en forma individual para cada paciente de acuerdo a la respuesta clínica y tolerancia. Se recomienda fraccionar la dosis diaria en dos o tres tomas a fin de reducir los efectos adversos.

Para el tratamiento de la actividad Anticonvulsiva.

Adultos. La dosis inicial recomendada es de 1 a 2 mg/día, la cual es incrementada entre 0.5 a 1 mg cada 3 días hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. La dosis habitual es de 2 a 4 mg/día y la máxima de 20 mg/día (Florez, 2003).

Niños: La dosis inicial para niños de 10 a 16 años es similar a la de los adultos (1 a 2 mg/día) y la dosis habitual recomendada de 1.5 a 3 mg/día (Florez, 2003).

2.8.7.2 Propiedades farmacocinéticas

2.8.7.2.1 Absorción.

Después de la administración oral se absorbe en forma rápida y total. Las concentraciones plasmáticas máximas se registran al cabo de 1-4 horas después de la administración. La biodisponibilidad por vía oral es del 90%. Tras la administración diaria de 6 mg (3 dosis diarias), las concentraciones plasmáticas oscilan entre 25 y 75 ng/mL. Es un fármaco que se absorbe en el tracto gastrointestinal.

Las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio después de la administración de dosis repetidas pueden llegar a ser cuatro veces (dosis única diaria) u ocho veces (tres dosis diarias) superiores a las observadas tras la administración de una sola dosis (Florez, 2003).

El efecto óptimo se obtiene con concentraciones plasmáticas de 20-70ng/mL aproximadamente (Florez, 2003).

2.8.7.2.2 Distribución

El volumen medio de distribución de clonazepam se calcula en 3L/kg. Tiene una Vida Media de 30 a 40 horas. Su unión a proteínas es alta aproximadamente del 86%. Es altamente soluble en lípidos, lo cual facilita una rápida distribución y facilita el paso a través de la barrera Hematoencefálica (Florez, 2003).

2.8.7.2.3 Biotransformación

La transformación metabólica de Clonazepam se produce por hidroxilación oxidativa y reducción del grupo 7-nitro, con formación de compuestos 7-amino o 7-amino-clonazepam, con escasa actividad anticonvulsivante. Se han identificado otros cuatro metabolitos que son farmacológicamente inactivos, se glucoronidan en el hígado y se excretan por vía renal (Florez, 2003).

Su biodisponibilidad después de la administración oral es mayor del 80% observándose una mayor concentración en un periodo de 1 a 4 horas.

2.8.7.2.4 Eliminación

En un plazo de 4-10 días, se elimina por la orina el 50-70% de una dosis de Clonazepam y por las heces, el 10-30%. Estos porcentajes en forma de metabolitos libres o conjugados. Menos del 0.5% se recupera en la orina en forma de Clonazepam inalterado.

Su eliminación es lenta, ya que los metabolitos activos pueden permanecer en la sangre varios días (Florez, 2003).

2.8.7.2.5 Mecanismo de acción del clonazepam como anticonvulsivante

Como ya se mencionó antes, el cuadro epiléptico ocurre cuando se ve alterada la función primordial de la sinapsis entre las neuronas del cerebro.

El Clonazepam inactiva los canales de Na⁺ y por tanto reduce la capacidad de las neuronas para efectuar activación a frecuencias altas. El canal queda inactivado al conservarse abierto, pero queda bloqueado por la compuerta de la inactivación.

El Clonazepam regula la inhibición sináptica mediada por GABA a través de una actividad en sitios distintos de la sinapsis. La activación de éste inhibe a la célula posináptica, al incrementar el flujo de iones de Cl⁻ hacia el interior de la célula, lo cual tiende a hiperpolarizar a la neurona. (Florez, 2003).

2.8.7.2.6 Modelos experimentales de epilepsia.

Para facilitar el estudio de la epilepsia, desde las causas hasta sus consecuencias, se han desarrollado modelos experimentales basados principalmente en reproducir las crisis epilépticas en animales de experimentación (Villarejo, F. 1998).

Existen al menos tres categorías aceptadas para clasificar a los modelos experimentales de epilepsia, esto es, considerando la duración del protocolo para inducir las crisis epilépticas, la causa de la actividad epiléptica, estímulos físicos, alteraciones metabólicas, o bien el tipo de actividad epiléptica que se genera.

Tabla 12. Modelos Experimentales de Epilepsia en Ratas y Ratones.

Tipo Agente Proepiléptico	Agente Causante	Tipo de Actividad Epiléptica Generada	Tipo Protocolo (Duración)
Químico	Ácido kaínico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas status epilépticus	Agudo, Crónico.
	Pilocarpina	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas status epilépticus	Agudo, Crónico.
	Pentilentetrazol	Crisis clónico-tónicas generalizadas	Agudo
		Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas.	Crónico (kinding químico)
		Crisis Generalizadas	Agudo
	Glutamato monosódico	Crisis tónico-clónicas generalizadas.	Agudo-crónico
	Fluoroetil	Crisis tónico-clónicas generalizadas	Agudo
Toxina Tetánica	Crisis secundariamente generalizadas	Crónico	

Físico	Kinding eléctrico	Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas.	Crónica
	Generación de Postdescargas corticales.	Crisis parciales complejas o crisis mioclónicas.	Agudo
	Electrochoques	Crisis mioclónicas Crisis clónico-tónicas	Agudo
	Hipertemia	Crisis parciales complejas secundariamente complejas	Agudo Crónico
	Hipoxia	Crisis clónicos-tónicas	Agudo
Genético	Ratas generalmente propensas a crisis de ausencia GAERS (GenertiAbsenceEpilepsyRatfromStrasbourg)	Crisis de Ausencia	Descargas electrográficas tipo espiga onda espontánea
	Ratas genéticamente propensas a crisis de ausencia WAG/Rij (WistarAbsenceGlaxorat)		
	Ratas Genéticamente Propensas a la Epilepsia GPR (GeneticallyEpilepsy-ProneRats)	Crisis convulsivas primarios o	Sonido

2.8.7.3 Crisis convulsivas inducidas con Pentilentetrazol.

El modelo de crisis agudas clónico-tónicas producidas por el agente químico Pentilentetrazol, es el modelo de primera elección para la investigación efectos anticonvulsivos, el cual permite observar tres tipos de crisis convulsiva en animales de laboratorio:

1. Crisis Mioclónica
2. Crisis Generalizada.
3. Crisis Clónico-Tónica.

El Pentilentetrazol (PTZ) es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A (interacción con el sitio de unión a la picrotoxina). Las manifestaciones conductuales causadas por el PTZ lo hacen un modelo de crisis generalizadas, cuando se emplean dosis bajas (20-30 mg de peso) o crisis clónico tónicas con dosis altas 40-100 mg/Kg de peso (Villarejo, F. 1998).

Este modelo animal de evaluación de crisis convulsivas consiste en administrar vía sistémica el PTZ en una dosis suficiente para inducir crisis de tipo clónico-tónicas registrando la latencia a la primer crisis mioclónica, generalizada y/o clónico-tónica. El PTZ se administra en una dosis de 80 mg/kg, dosis a la cual se alcanza el umbral para inducir los tres tipos de crisis antes mencionadas. Las concentraciones necesarias para inducir las crisis requieren de ocupar cierto número de receptores para provocar la sincronización de actividad paroxística a nivel generalizado en el cerebro del ratón como se muestra a continuación:



Fig. 19 Ilustración que describe el modelo PTZ. (Gill et.al., 2006)

Tabla 14. Crisis Convulsivas observadas en el Modelo PTZ

Crisis Epiléptica	Descripción
Crisis Mioclónica	<p>Crisis anterior a la Generalizada. Es una manifestación del status generalizado no tónico-clónico.</p> <p>Durante este estadio se presentan movimientos rítmicos focales y multifocales.</p> <p>No hay alteración de la conciencia. Consiste en contracciones musculares repetidas y breves de extremidades.</p> <p>En los ratones se observa mediante movimientos rápidos e involuntarios en orejas y patas.</p> <p>Se observa una conducta de sobresalto y nerviosismo.</p>
Crisis Generalizada	<p>Es el segundo tipo más frecuente de Status Epiléptico. Las crisis generalmente se originan en las áreas motoras del lóbulo frontal.</p> <p>Se caracteriza por crisis somatomotoras y mioclonias que involucran la extremidad contralateral.</p> <p>Existe un aumento marcado de la actividad motora con movimientos violentos.</p> <p>Su duración es de aproximadamente dos minutos.</p>
Crisis Tónico-Clónica	<p>Se caracteriza por contracciones musculares sostenidas y de corta duración.</p> <p>Las extremidades se tensan y ocurre la abducción de las patas.</p> <p>Se observa una crisis de ausencia, en la que hay pérdida de conciencia y se produce la muerte del animal.</p> <p>Este estadio es de corta duración, apenas unos segundos.</p>

2.9 Nanotecnología aplicada a sistemas farmacéuticos.

2.9.1 Nanotecnología.

La Nanotecnología es el área encargada del saber y control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 a 100 nanómetros. En esta escala la materia o materiales muestran propiedades nuevas a nivel físico, químico y biológico (Nanobot, 2005).

La nanotecnología se orienta al estudio y fabricación de estructuras y dispositivos en una dimensión nanométrica, donde el prefijo “nano” significa 10^{-9} m (Kohler, 2008).

De acuerdo a la FDA, se denomina nanotecnología a todo aquello que abarca los siguientes tres aspectos fundamentales:

- Investigación y desarrollo de tecnología a nivel atómico, molecular o macromolecular, en un rango de longitud de escala de aproximadamente 1-100 nanómetros.
- Creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones nuevas debido a su tamaño pequeño o intermedio.
- Capacidad para controlar o manipular sobre la escala atómica.

La investigación en nanotecnología provee una comprensión fundamental de materiales y fenómenos, que facilitan la creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones nuevas debido a su tamaño extremadamente pequeño (Villarejo, F. 1998).

2.9.2 Nanomedicina

Actualmente los últimos avances en la investigación a escala atómica han supuesto el despertar de una nueva disciplina conocida como *Nanomedicina*. Esta disciplina consiste en la aplicación de técnicas pertenecientes al campo de la Nanotecnología en beneficio de la salud humana (Kohler, 2008).

La interacción entre la *Nanotecnología* y la medicina constituyen una oportunidad para llevar a cabo nuevos tratamientos farmacológicos o mejorar los que ya existen. (Kohler, 2008).

Las técnicas que forman parte de esta nueva tecnología nanométrica permiten la producción de nanoestructuras con una dimensión de una millonésima parte de un metro, las cuales siendo del mismo tamaño que las biomoléculas pueden interactuar con las células de los sistemas biológicos (Kohler, 2008).

Por este motivo, la Nanomedicina, ofrece nuevas soluciones en el diagnóstico, tratamientos inteligentes, y medicina regenerativa, actuando y estimulando los propios

mecanismos controladores y reparadores del cuerpo humano, lo cual abre las puertas a nuevas posibilidades en terapias más eficaces y con menos efectos adversos.

En la siguiente imagen se puede observar que las nanoestructuras tienen tamaños menores que las células y se encuentran en el tamaño comprendido por los principales constituyentes estructurales del organismo vivo.

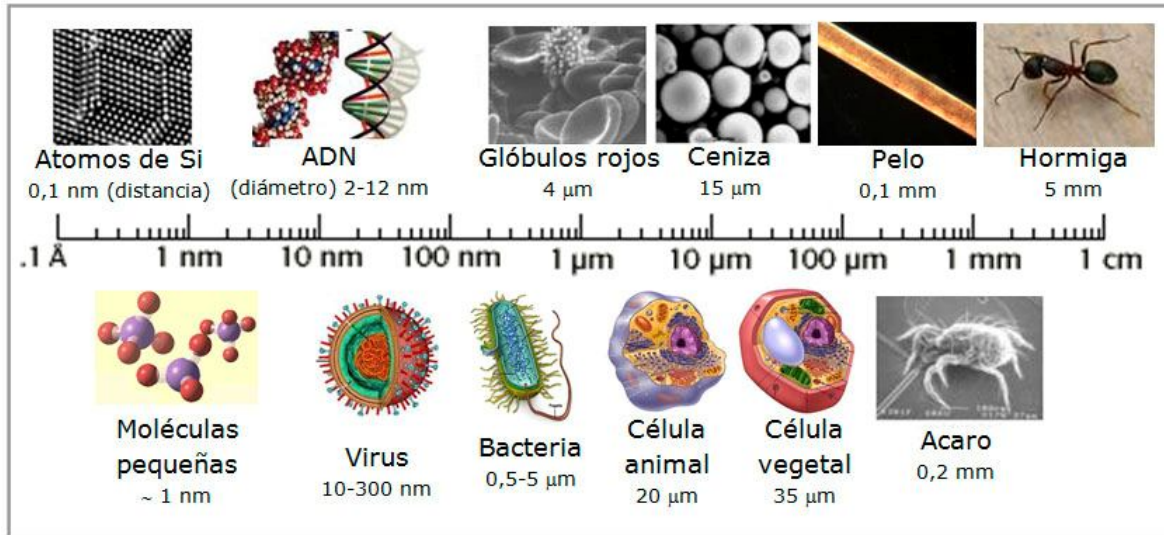


Figura. 20 Escala numérica comparativa de tamaño de diferentes cuerpos. E.Hester and Roy M. Harrison. 2007. Nanotechnology: Consequences for Human Health and the Environment.

2.9.3 Nanotecnología Farmacéutica.

Se define a la nanotecnología farmacéutica como el uso de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como para mejorar la salud (Kohler, 2008).

Las aplicaciones de la nanotecnología farmacéutica se orientan al descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos, el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos con localización o dirección específica, mediante las siguientes acciones:

- Diseño de materiales estructurados, multifuncionales, capaces de atacar enfermedades específicas.
- Diseño de materiales que contienen funciones que permitan el transporte a través de barreras biológicas.

- Diseño de plataformas nanoestructuradas para la ingeniería de tejidos.
- El diseño de tratamientos orientados físicamente para la administración local de productos terapéuticos.
- Diseño de transportadores de fármacos y sistemas de liberación de genes supramoleculares autoensambles.

Se considera, que la nanotecnología al enfocarse en lo más pequeño, es un medio adecuado para la creación o diseño de sistemas que puedan suministrar mejor los fármacos en áreas específicas del organismo. El suministro de fármacos nanoencapsulados permite una permeación más eficaz a través de las membranas celulares (Kohler, 2008).

Las estructuras nanométricas tiene la ventaja de ser capaces de atravesar barreras como la Hematoencefálica y la del tracto gastrointestinal. Se considera que los compuestos farmacéuticos formulaos como nanopartículas también pueden ser biológicamente más activos, debido a su área superficial muy grande que podría aumentar, debido a su área superficial muy grande que permite aumentar la biodisponibilidad del fármacos (Kohler, 2008).

Entre las tecnologías basadas en nanopartículas:

- Los liposomas furtivos o encubiertos que funcionan como transportadores de fármacos.
- La tecnología de nanocristales, en este caso los fármacos se reducen hasta partículas de tamaño nanométrico a través de molienda en húmedo. Estos nanocristales se formulan con estabilizadores para evitar la reaglomeración.
- Las tecnologías Nanocap System y Medicelle System, de la empresa Nanocarrier son tecnologías de nanopartículas de nanopartículas micelares basadas en polímeros. Su objetivo es mejorar la solubilidad de los fármacos, y su utilización como medio de suministro de DNA y proteínas (Jores, et. al. 2004).

2.9.4 Aspectos sanitarios de la nanotecnología.

La Agencia Sanitaria de los Estados Unidos, la FDA, explica que los materiales en nanoescala frecuentemente tienen propiedades físicas, químicas y biológicas que son diferentes que son diferentes a las mostradas por sus contrapartes de mayor tamaño.

Estas diferentes incluyen alteraciones en las propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas, una mayor integridad, estructural o alteraciones en sus propiedades químicas y de actividad biológicas.

Se considera que debido a tales alteraciones en las propiedades de los materiales en nanoescala estos pueden poseer diferentes en los temas de seguridad ya establecidos para sus contrapartes de mayor tamaño (a nivel molecular).

La FDA se encuentra estudiando continuamente como es que las propiedades pueden afectar los controles, los estándares, las especificaciones, el desempeño de los productos y si es que estas propiedades complican el desarrollo y la manufactura de estos productos (Van Amum, 2008).

Desde el punto de vista del control de la calidad, algunos parámetros de los nanomateriales que podrían influir las propiedades de los productos nanotecnológicos son:

- Tamaño de partícula y distribución.
- El área superficial.
- La hidrofobicidad, la densidad de cargas sobre la superficie.
- La pureza, la esterilidad.
- La estabilidad (agregación, adsorción de proteínas).
- Verificar si el compartimiento *in vitro* refleja el comportamiento *in vivo*.

Otros parámetros que influirían la calidad del producto terminado serían pruebas de liberación del fármaco y estudios de bioequivalencia.

Entre las consideraciones preclínicas de los medicamentos nanotecnológicos se podrían incluir estudios *in vitro*; los cuales tendrían como objetivo las barreras para la unión a los receptores, la capacidad de las células para capturar el fármaco y los estudios de citotoxicidad.

Entre los estudios con modelos in vivo, las consideraciones preclínicas incluirían estudios de la eficacia, toxicología y farmacocinética.

De esta manera se estima la relación riesgo/beneficio en los efectos agudos y crónicos de los nanomedicamentos.

2.9.5 Transportadores de fármacos submicrónicos.

La mayoría de los fármacos existentes y candidatos a fármacos tienen una escasa solubilidad en fluidos biológicos, lo cual da como resultado una biodisponibilidad baja y muy variable (Amalina, 2010).

Una de las mejores soluciones para resolver este tipo de problemas es utilizar nuevas tecnologías en la formulación de medicamentos. La Nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que posibilita la fabricación de estructuras a escala nanométrica, tamaño que permite atravesar poros y membranas celulares, en este caso barrera hematoencefálica para llegar a cerebro (Amalina, 2010).

Otra gran ventaja que ha aportado la Nanotecnología a la liberación de fármacos es que se ve incrementada la efectividad del medicamento mediante el control preciso de la dosis requerida y del tamaño, morfología y de las propiedades superficiales del compuesto (Amalina, 2010).

Los Transportadores de Fármacos Submicrónicos son solamente definidos por su tamaño menor a 1 μm , son variables en sus propiedades fisicoquímicas (estabilidad termodinámica, composición química) y el estado físico (los hay sólidos, líquidos, o dispersiones cristalinas líquidas) (Amalina, 2010).

Los ejemplos más representativos de este tipo de sistemas son:

- Nanopartículas.
- Nanoemulsiones.
- Nanocápsulas.
- Liposomas.
- Nanosuspensiones.
- Micelas.

El principal objetivo de los TSF está relacionado con:

- a) Incremento en el transporte de fármaco.
- b) Posibilidad de liberación controlada.
- c) Entrega en el Sitio de Acción.
- d) Reducción de Efectos Adversos.

En la actualidad, los transportadores coloidales de fármacos han sido de especial atención para los investigadores; estos incluyen nanopartículas, nanoemulsiones, nanosuspensiones y micelas (Amalina, 2010).

2.9.6 Nanotecnología como alternativa para el transporte de fármacos hacia el Cerebro.

Como se mencionó en el apartado correspondiente, la composición y estructura de la Barrera Hematoencefálica constituyen un impedimento para el libre paso de fármacos.

Ante esta problemática, la estrategia propuesta para lograr el paso de fármacos hacia el cerebro es el uso de acarreadores o transportadores que incorporan al fármaco dentro de ellos y por su composición afín a la BHE logran traspasar el muro que constituye la Barrera Hematoencefálica., de ahí que a estos sistemas se les denomina Caballos Troyanos (Amalina, 2010).

Considerando todo lo anterior mencionado se propone encapsular el Clonazepam en Micelas Mixtas de tipo Lipídico (Amalina, 2010).

2.9.7 Nanopartículas Lipídicas.

La nanotecnología inició su desarrollo como una estrategia para solucionar problemas de formulación asociados con fármacos que son poco solubles en agua o que son poco solubles tanto en agua como en lípidos.

Entre las ventajas de usar nanopartículas lipídicas se encuentran:

- Una mejor biodisponibilidad gracias al tamaño de partícula tan pequeño.
- Mayor velocidad de disolución.

Las nanopartículas lipídicas sólidas se desarrollaron a principios de 1990 como una alternativa a sistemas de fármacos como las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas.

Las ventajas de la utilización de NPL como transportadores de fármacos son la utilización de lípidos fisiológicos en su formulación y la posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos para su preparación.

Entre sus desventajas se encuentran el crecimiento de las partículas, una tendencia hacia una gelificación impredecible, cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de los fármacos al 100% (Amalina, 2010).

2.9.7.1 Transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC).

Estos sistemas de transporte de fármacos tienen las mismas ventajas del las SLN. Sin embargo, los NLC presentan una matriz sólida lipídica menos ordenada incorporando el fármaco entre las capas lipídicas o en las imperfecciones conocidas como depósitos amorfos del fármaco (Chávez, F. 2002).

Hay tres modelos que explican la forma de incorporar el fármaco en un SLC, a continuación una imagen que ilustra cada uno (Chávez, F. 2002).

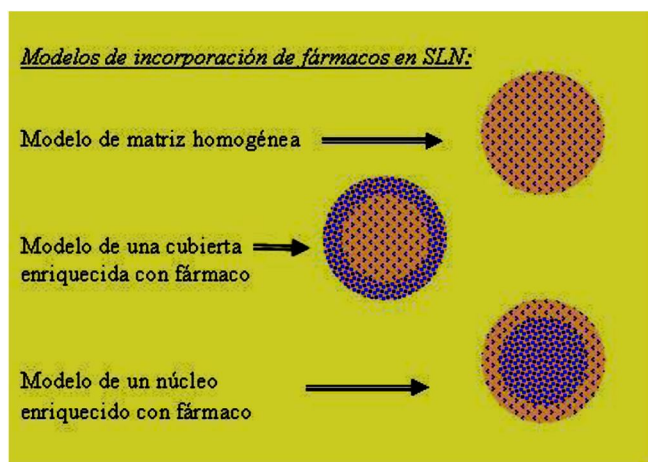


Fig. 21 Modelos de Incorporación de Fármacos en Nanopartículas Lipídicas. (Kohel, et.,al 2008)

2.9.7.1.1 Liposomas.

Las moléculas anfifílicas como los fosfolípidos forman espontáneamente membranas formadas por bicapas que pueden convertirse en vesículas. Estas vesículas son denominadas liposomas. Los liposomas se forman espontáneamente cuando ciertas mezclas de fosfolípidos se dispersan en una fase acuosa (Chávez, F. 2002).

Los liposomas son estructuras esféricas formadas por una o más capas que contienen en su interior un espacio acuoso separado del resto del medio, también acuoso, en el que se encuentran suspendidos.

La bicapa que forma la esfera sirve de barrera, por lo que se considera que es un vehículo adecuado para transportar fármacos. Esta barrera protege a los fármacos de su degradación en el medio biológico.

Al estar formados por enlaces no covalentes, los liposomas pueden manipularse con facilidad para alterar su composición química, la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas, la hidrofiliidad de su superficie y su tamaño promedio.

Los sistemas de liberación de fármacos con liposomas se han utilizado para mejorar el efecto terapéutico. Actualmente, se considera que la mayoría de las formulaciones reducen la toxicidad (Lian y Ho, 2001).

2.10 Micelas Mixtas de Sales Biliares.

2.10.1 Digestión.

La Digestión consiste en la conversión (ruptura) de grandes moléculas de nutrientes en moléculas pequeñas que sean posibles de absorber (Hammad, 1998).

Desde el punto de vista químico la digestión es un proceso de hidrólisis, en el cual se introduce una molécula de agua para romper enlaces en las moléculas por acción de enzimas específicas.

Se le denominan jugos digestivos a la mezcla de enzimas necesarias para que ocurra este proceso de digestión. Desde que el alimento es ingerido en la boca, la saliva contiene enzimas para digestión de carbohidratos y lípidos (Hammad, 1998).

En el estómago, el alimento es degradado por medio de la pepsina que permite la ruptura de proteínas. Posteriormente las secreciones pancreáticas vertidas en el duodeno y una gran cantidad de enzimas degradan proteínas, carbohidratos y grasa.

La secreción biliar es necesaria para la emulsificación de las grasas y formación de micelas para el transporte de éstas para su posterior absorción (Hammad, 1998).

Finalmente las enzimas que se encuentran en la superficie de las células intestinales se encargan de la digestión de carbohidratos y proteínas (Hammad, 1998).

2.10.2 Digestión de lípidos y formación de micelas.

La emulsificación de las grasas inicia en el estómago, este proceso permite que gotas grandes de lípidos se conviertan en gotas muy pequeñas aumentando el área superficial, sin aumentar el volumen total, esto permite una mayor actividad de la enzima lipasa (Hammad, 1998).

La función de la lipasa es actuar en la interfase agua-aceite y convierte los triglicéridos a monoglicéridos y ácidos grasos libres. Las sales biliares que están en el duodeno al pasar por un punto de concentración crítico forma micelas espontáneamente (Waiter, 1991).

Las sales biliares son moléculas anfipáticas, tienen un lado polar hidrofílico y otro hidrofóbico, de esta manera forman vesículas con el centro hidrofóbico envolviendo a los lípidos insolubles como el colesterol y transportándolos. En la pared de esta vesícula que se forma se transportan fosfolípidos que tienen un polo hidrofílico hacia afuera y otro hidrofóbico hacia adentro (Waiter, 1991).

Estas vesículas que se forman se denominan micelas, las cuales suelen ser de un tamaño nanométrico, y su función en el proceso de digestión es transportar lípidos a la membrana celular de los enterocitos para que sean absorbidos (Waiter, 1991).

Las micelas formadas tienen dos características importantes:

- Son esferas de 3 a 4 nm de diámetro, compuestas de aproximadamente 30 moléculas de sal biliar.
- Engloban la grasa pues su extremo liposoluble queda hacia el centro y el polar hacia afuera de la micela como lo ilustra la Figura 22.

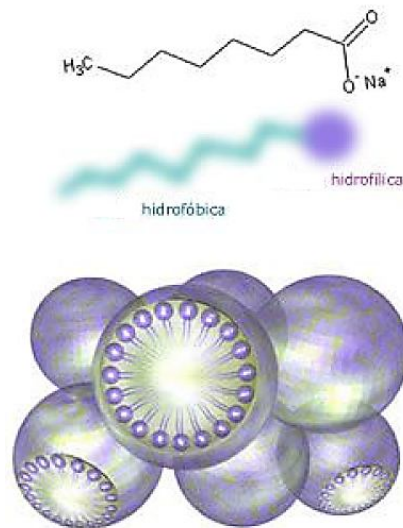


Fig. 22 Micela mixta. Las cabezas hidrofílicas de las grasas forman un centro hidrofóbico que permite el transporte de lípidos en la esfera. (Bales, et., al. 2003)

En resumen para que las grasas puedan absorberse deben pasar por tres procesos:

1. Emulsificación.
2. Hidrólisis.
3. Solubilización.

2.10.2.1 Emulsificación

Este proceso comienza en el estómago, gracias a las contracciones peristálticas ayudadas por las sales biliares en el intestino que actúan como detergentes que bajan la tensión superficial. Esto disminuye el tamaño de las gotas de grasa, aumenta su número

de mayor superficie para que actúe la enzima lipasa en la interfase grasa-agua en la luz intestinal, como se ilustra en la Figura 23.

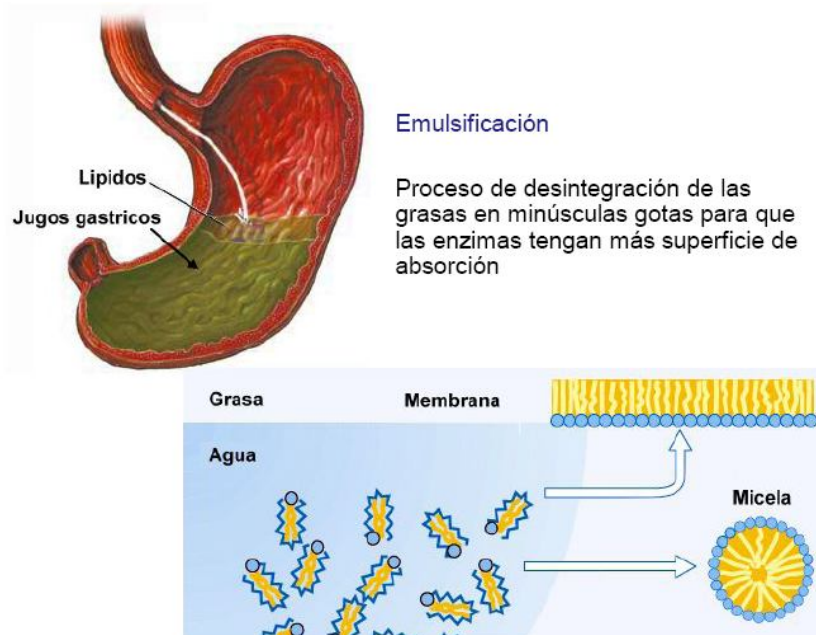


Fig. 23 Emulsificación de las grasas y formación de Micelas Mixtas. (Bales, et., al. 2003)

2.10.2.2 Solubilización e Hidrólisis.

La bilis es una solución compuesta principalmente por lípidos: Sales biliares (68%, lecitina 22%, colesterol libre 4% proteínas 4.5% bilirrubina 0.3%), se trata de un fluido complejo generado por la secreción hepática y modificado por la denominada vía biliar, en su tráfico desde el hepatocito hacia la vesícula biliar y el intestino.

La principal función de la bilis es la solubilización y el transporte de lípidos polares en forma de micelas mixtas durante el proceso digestivo, la formación de estas es posible cuando se logran producir asociaciones moleculares en las que se efectúa la unión de sales biliares y lecitina en relaciones de concentración definidas que le dan la estabilidad en solución acuosa (Waiter, 1991).

Para que se lleve a cabo la absorción de las grasas, es necesario que sean emulsificadas, por medio de las sales biliares en el intestino que actúan como tensoactivos que disminuyen la tensión superficial. Esto permite la formación de pequeñas

vesículas, lo que posibilita una mayor acción de la enzima lipasa para la ruptura de enlaces y su absorción (Waiter, 1991).

Los distintos tipos de grasas necesitan de degradación enzimática o solubilización en micelas para ser absorbidos (Waiter, 1991).

2.10.2.3 Estructura de una micela mixta.

Son pequeñas vesículas de 3-6 nm que tiene 20-40 moléculas de sales biliares que se disponen espontáneamente hacia afuera con sus lados polares y dejando un centro hidrofóbico.



Fig. 24 Estructura de una micela Mixta en solución donde se indican sus componentes. (Arunima, 2011)

2.10.3 Formación de micelas mixtas.

Se denominan micelas mixtas a las asociaciones moleculares compuestas de sales biliares, lecitina, colesterol, y se denominan liposomas si se componen de lecitina y colesterol.

Se trata de un sistema coloidal termodinámicamente inestable, en el existe una superficie de separación entre dos fases. Esta superficie de contacto entre las partículas y el medio de dispersión (área interfacial) es muy elevada, de esta manera se concentra una mayor cantidad de energía del sistema. (Antelo, 2011)

Este exceso de energía libre, asociada a la gran superficie existente entre las partículas y el medio, da lugar a que las partículas tiendan a aglomerarse, para reducir su energía libre interna (Antelo, 2011).

La capacidad de las sales biliares de solubilizar lípidos mediante la formación de micelas mixtas con el colesterol es una de las propiedades fisicoquímicas y biológicas más importantes de los ácidos biliares.

Las sales biliares y los fosfolípidos por sus propiedades anfipáticas, orientan sus regiones polares hacia la fase acuosa manteniendo sus regiones apolares alejadas del agua y verán un centro micelar hidrófobo donde se disuelve el colesterol (Antelo, 2011).

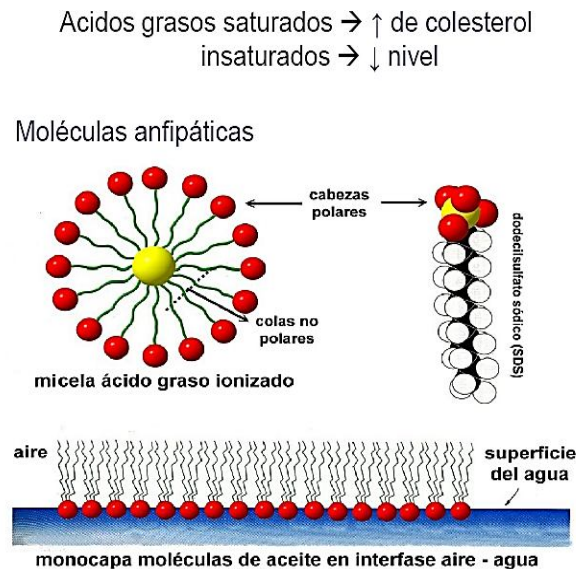


Fig. 25 Estructura de las moléculas anfipáticas y formación de micelas. (Bales, et., al. 2003)

Una vesícula está formada por fosfolípidos y surfactantes (sales biliares) que deben ser mezclados en proporciones específicas para poder formar liposomas o micelas. La naturaleza de la vesícula y sus propiedades fisicoquímicas depende del porcentaje de fosfolípidos y sales biliares que se asocien (Antelo, 2011).

De acuerdo a estudios realizados para preparar estructuras micelares como acarreador de fármacos, se reporta que al incrementar la concentración de fosfolípidos el tamaño obtenido de las micelas es cada vez menor, tendiendo a los 3nm (Antelo, 2011).

El proceso a seguir para obtener micelas mixtas consiste en preparar una emulsión con dos componentes que son solubilizados en un medio específico:

- Componente 1: Tensoactivo (sal biliar)
- Componente 2: Fosfolípido.

Al llevar a cabo el proceso de emulsificación, se forman estructura nanométricas discoidales (vesículas) compuestas de una pequeña bicapa de fosfolípidos (liposomas) o una sola capa (micelas) (Antelo, 2011).

La figura 21 muestra un triángulo de fases en porcentaje molar de los constituyentes de la bilis, al mezclar cantidades definidas de los componentes, se obtienen micelas o vesículas con características fisicoquímicas distintas. Este diagrama de fases permite conocer y determinar la proporción de componentes que debe tener una formulación si se desean obtener micelas mixtas (Antelo, 2011).

- Zona de dos fases: vesículas y micelas mixtas.
- Zona de tres fases: vesículas, micelas mixtas y colesterol cristalino.
- Zona de tres fases: colesterol cristalino y micelas mixtas.
- Zona de única presencia de micelas mixtas.

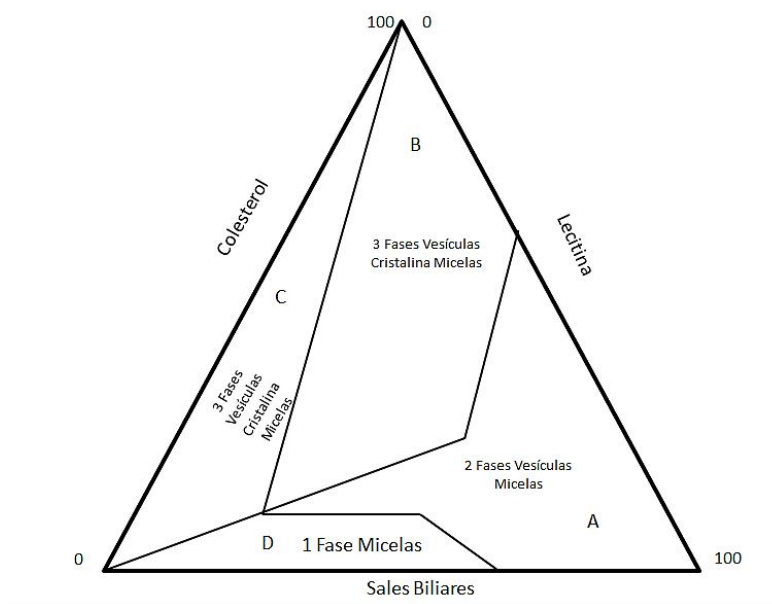


Fig. 26 Diagrama de fases en porcentaje molar de los constituyentes de la bilis, que posibilitan la formación de micelas mixtas. (Antelo, 2011)

Para obtener micelas mixtas se deben mezclar la Sal Biliar en una menor proporción y fosfolípidos en una mayor proporción (Antelo, 2011).

2.10.3.1 Ácidos biliares.

Se considera ácido biliar o sal biliar a cualquiera de los ácidos resultantes de la modificación química del colesterol que presenta una estructura que deriva del ácido colánico, un grupo estructurado de 24 átomos de carbono con un núcleo compuesto por cuatro anillos saturados y una cadena lateral alifática corta (Antelo, 2011).

Los ácidos biliares más comunes presentan como base la estructura del ácido cólico con las posiciones 3 y 7 hidroxiladas. Por lo general, con orientación alfa, el núcleo esteroide de los ácidos biliares consiste en una estructura hidrocarbonada (Antelo, 2011).

La mayoría de los ácidos biliares se encuentran en la naturaleza en forma de sus sales sódicas aunque en algunos casos pueden aparecer conjugados con aminoácidos como la glicina. Poseen una estructura tridimensional perfectamente conocida (Antelo, 2011).

Los ácidos biliares C_{24} suelen presentar con o menos frecuencia, un grupo hidroxilo adicional, ya sea en el núcleo o en la cadena lateral. La hidroxilación en la cadena lateral se produce en la posición C_{23} generando los ácidos α -hidroxi-biliares, en la C_{22} constituyen los ácidos β -hidroxi-biliares. (Antelo, 2011)

La naturaleza anfipática de los ácidos biliares se debe a que presentan una estructura convexa hidrófoba superior, cara β , en las que se sitúan dos grupos metilo C_{18} y C_{19} apolares y una zona inferior cóncava e hidrófoba superior, cara β en las que se sitúan dos grupos metilo C_{18} y C_{19} apolares, y una zona inferior cóncava e hidófila, cara α , cuyo carácter hidófilo se debe a la existencia de los grupos OH orientados hacia esa cara (Antelo, 2011).

También los confiere características tensoactivas la cadena lateral con un grupo carboxilo en el extremo en el extremo. Esta polaridad explica las tendencias de estas moléculas a autoasociarse en medio acuoso para formar las micelas (Antelo, 2011).

La figura 27 muestra la estructura química de algunos Ácidos Biliares que ilustran lo mencionado anteriormente.

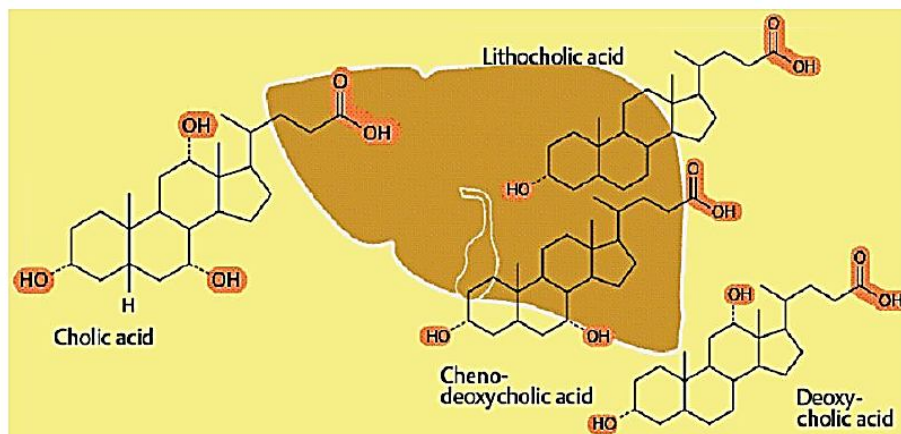


Fig. 27 Estructura química de ácidos biliares.

2.10.3.1.1 Glicocolato de Sodio

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas del Glicocolato de Sodio.

Fórmula Química	Propiedades Fisicoquímicas
	<p>Punto de Fusión: 210-215 ° C</p> <p>Posición Hidroxilada: 3a,7a,12^a</p> <p>Solubilidad en Agua: 1.67</p> <p>Índice de Refracción: 30°C</p> <p>pH óptimo para agregación: 7.6</p>

2.10.3.2 Fosfolípidos

Los fosfolípidos o Fosfoglicéridos tienen en su estructura una cadena larga hidrocarbonada, un grupo éster y un grupo fosfato.

L- α Fosfatidilcolina

La L- α Fosfatidilcolina es un glicerofosfolípido, una lipoproteína sintetizada a partir del glicerol. En el ser humano se sintetiza por dos vías diferentes: a partir de la colina procedente de la dieta (legumbres, carne, huevo, semillas etc) o a partir de la etanolamina

humana. Es una sustancia presente en todas las membranas celulares y participa de manera activa en la estructura y el transporte celular (Antelo, 2011).

Está presente en todas las membranas celulares y participa en la estructura y transporte celular. Está compuesta de colina, fosfato y dos ácidos grasos (Antelo, 2011).

En su estructura química, la L- α Fosfatidilcolina tiene una parte polar y una no polar . Es un agente tensoactivo natural y una forma de reserva de colina, componente fundamental del neurotransmisor acetilcolina (Antelo, 2011).

De forma natural, se segrega en la bilis para facilitar la emulsión, el transporte y la absorción de las grasas al ser una molécula anfipática (Antelo, 2011).

Tabla 16. Propiedades Físicoquímicas de la L- α Fosfatidilcolina.

Estructura Química	Peso Molecular	
<p data-bbox="259 1461 828 1512">L-ALPHA-PHOSPHATIDYLCHOLINE, DISTEAROYL C₄₄H₈₈NO₈P</p>	790.15	Es soluble a temperatura ambiente en cloroformo, etanol, y hexano. (100mg/ml en metanol)

2.10.3.3 Modelos de Agregación de Micelas Mixtas.

Se han aceptado dos modelos de agregación de micelas mixtas:

1. Modelo discoidal.
2. Modelo Helicoildal.

El primer modelo considera que la formación de micelas por parte de las sales biliares se debe a una interacción entre las caras hidrófobas de los esteroides. Este tipo de micelas denominadas primarias tendrían una forma de disco con la cara hidrófoba dirigida hacia el disolvente (Antelo, 2011).

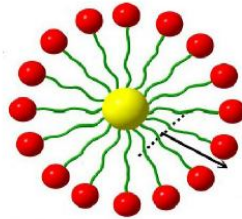


Fig. 28 Estructura Discoidal de una micela

El segundo modelo acepta que la estructura de los agregados es helicoidal, y los grupos polares se ubican en la cara lateral de la hélice, como si se tratara de una micela inversa (Antelo, 2011).

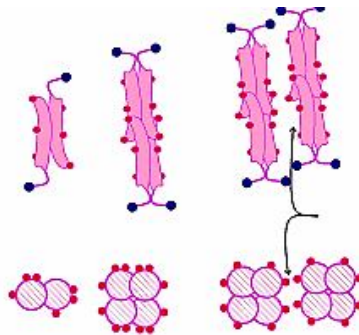


Fig. 29 Estructura helicoidal de una micela. (Antelo, 2011)

2.11 Producción de micelas mixtas.

2.11.1 Método de Coprecipitación.

El material lipofílico es disuelto en un solvente orgánico inmiscible en agua que posteriormente es emulsificado en una fase acuosa para formar una emulsión aceite/agua. Durante la evaporación del solvente mediante presión reducida se forma la dispersión de nanopartículas lipídicas sólidas.

Se ha comprobado la reproducibilidad de éste método y el diámetro de la partícula más pequeña se obtuvo utilizando sales biliares como co-surfactante. El tamaño de partícula promedio depende de la concentración de lípido en la fase orgánica, cuando se

incrementa el contenido de lípido disminuye la eficiencia de la homogeneización debido a la alta viscosidad de la fase dispersada.

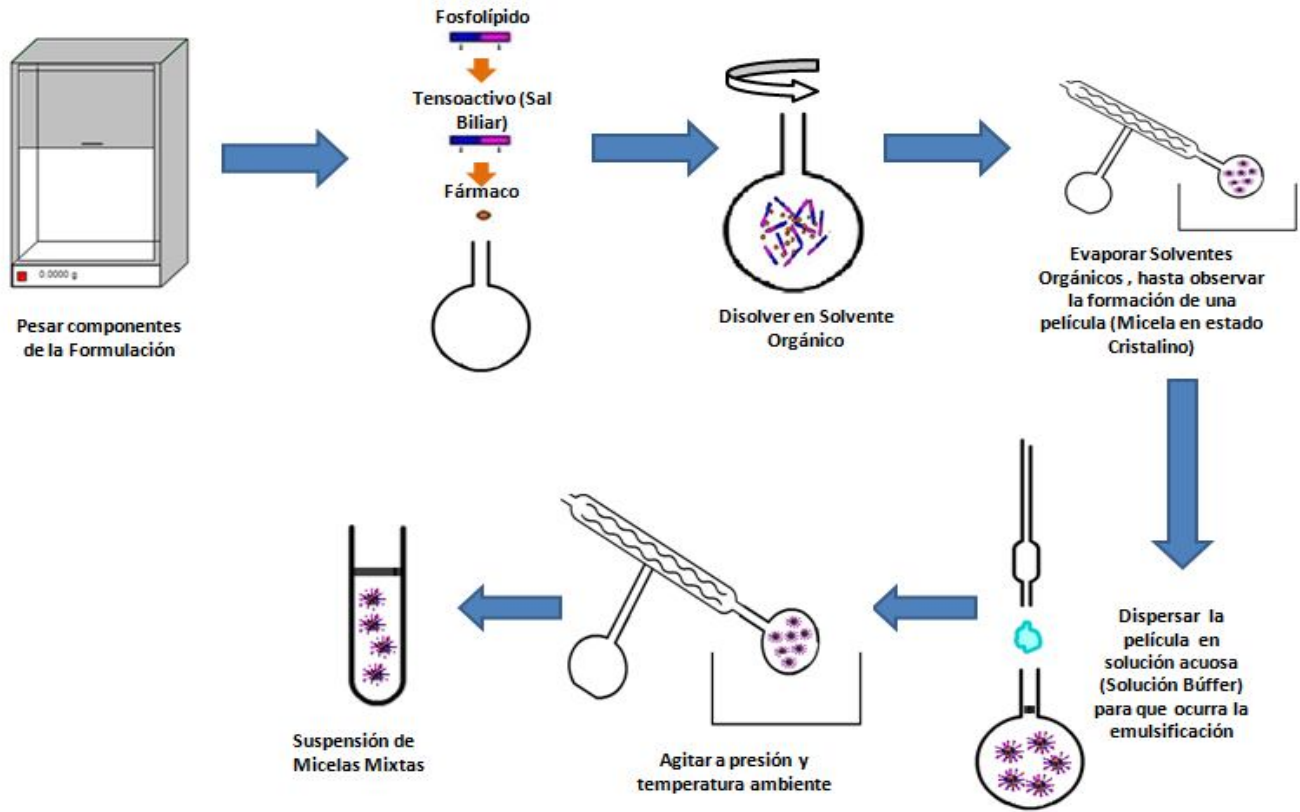


Fig. 30 Diagrama general del método de co-precipitación para la síntesis de micelas mixtas.

III. HIPÓTESIS.

El clonazepam encapsulado en micelas mixtas de sales biliares mediante el método de coprecipitación teniendo un tamaño de partícula, morfología, y estabilidad adecuados para administración por vía oral, facilitará el transporte de clonazepam a través de la barrera Hematoencefálica, aumentando su eficacia anticonvulsiva al aumentar la latencia a las crisis inducidas con PTZ en ratones.

IV. OBJETIVOS

General

Preparar y caracterizar micelas mixtas cargadas con clonazepam mediante el método de coprecipitación y evaluar su efecto en las crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol en ratones, para analizar su viabilidad como vector de transporte de éste fármaco al cerebro.

Particulares

- Optimizar el método de co-precipitación para la preparación de micelas mixtas para obtener un tamaño de partícula homogéneo y reproducible en el rango de 5-20 nm.
- Caracterizar las micelas mixtas mediante el tamaño de partícula y el análisis de su morfología en TEM, el potencial Z y su estabilidad como un transportador submicrónico de fármacos.
- Encapsular el clonazepam mediante el método de co-precipitación para elaborar una formulación alternativa para la terapéutica de las convulsiones.
- Desarrollar y validar un método analítico para el análisis de la concentración de clonazepam encapsulado en micelas mixtas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Evaluar el efecto anticonvulsivo de clonazepam encapsulado en micelas mixtas mediante su administración oral en ratones y la determinación de la latencia a las crisis convulsivas producidas por pentilentetrazol para determinar su potencial uso como transportador submicrónico de fármaco.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS.

5.1.1 Equipo

- Agitador magnético de velocidad variable (Caframo[®] RZR-1; Canadá).
- Balanza microanalítica (Mettler[®]; Suiza).
- Balanza analítica (Boeco[®] BBC 32; Alemania).
- Centrifuga (HettichZentrifugen[®] EBA 12; Alemania).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Varian Pro Star[®] 360; E.U.A.).
- Sonicator (Branson[®] Branson 5210; E.U.A.).
- Espectrofotómetro UV-Vis (Varian[®] Cary IE 95031003; Australia).
- Microscopio electrónico de transmisión (JEOL Modelo JEM-1200; E.U.A.).
- Nanosizer (Coutler[®] N4 Plus; E.U.A.)
- Parrilla de agitación magnetic (Cimarec[®], Thermoline, E.U.A.)
- Potenciómetro (Corning[®] 430; Alemania).
- Rotaevaporador (Laborota Heidolph[®] 4000; Alemania).
- Zetasizer ZEN 3600 (Malvern Instruments[®]; Inglaterra).
- Sistema de purificación de agua (Milli-Q[®]).

5.1.2 Material de laboratorio

- Barra magnética.
- Celda de cuarzo para nano sizer.
- Celda para espectrofotómetro.
- Celdas con electrodos para medir potencial Z.
- Cronómetro.
- Columna cromatográfica X-Terra C-18 RP. Tamaño de Poro de 5µm, 150 mm de largo y 4.6 mm de ancho.
- Electrodo de cobre.
- Filtro millipore, membrana hidrofóbica de 0.45µm.
- Frascos viales de 2 mL para cromatografía.

- Gradilla.
- Jaula para animales.
- Jeringa desechable de (1, 2 y 3 mL).
- Mangueras de plástico.
- Matraz alargado de fondo redondo de 25 mL.
- Matraz alargado de fondo redondo de 50 mL.
- Matraz erlenmeyer de 25 mL.
- Matraz kitazato de 1 L
- 30 Matraces volumétricos de 25 mL.
- 6 Matraces volumétricos de 5 mL.
- 4 Matraces volumétricos de 50 mL.
- Microespátula.
- Micropipeta
- Pinzas de metal de 27 cm.
- Pipeta pasteur.
- Pipeta volumétrica de (1,2,3,4,5 y 6 mL)
- Piseta de 500 mL.
- Placa con soporte de carbono.
- Probeta graduada de 50 mL.
- Vaso de precipitados de (1000, 500, 100, 50, 25 y 10 mL).
- 18 Tubos de ensaye de 25 mL.
- Tubos eppendorf de 25 mL.
- Tubos de plástico de 50 mL para Centrífuga.
- Tubos de vidrio de 5 mL con Tapón de Plástico.
- Termo.

5.1.3 Reactivos.

- Agua destilada (Milli-Q®; Francia).
- Acetonitrilo (Grado HPLC, J.T. Baker®; E.U.A. K08C81)
- Clonazepam materia prima.
- Clonazepam sustancia de referencia.
- Cloroformo R.A. (J.T. Baker®; E.U.A.)
- Fosfato monobásico de amonio (J.T. Baker®; E.U.A D16460.)

- Fosfato monobásico de potasio (Femont[®]; México FMBR).
- Glicocolato de sodio (Sigma Aldrich[®]; 67132-16)
- L- α fosfatidilcolina (Sigma Aldrich[®] México)
- Metanol R.A. (J.T. Baker[®]; E.U.A.)
- Pentilentetrazole (Sigma Aldrich[®])
- Sephadex G-10 (Sigma Aldrich[®]; G10120-100)

5.1.4 Material biológico.

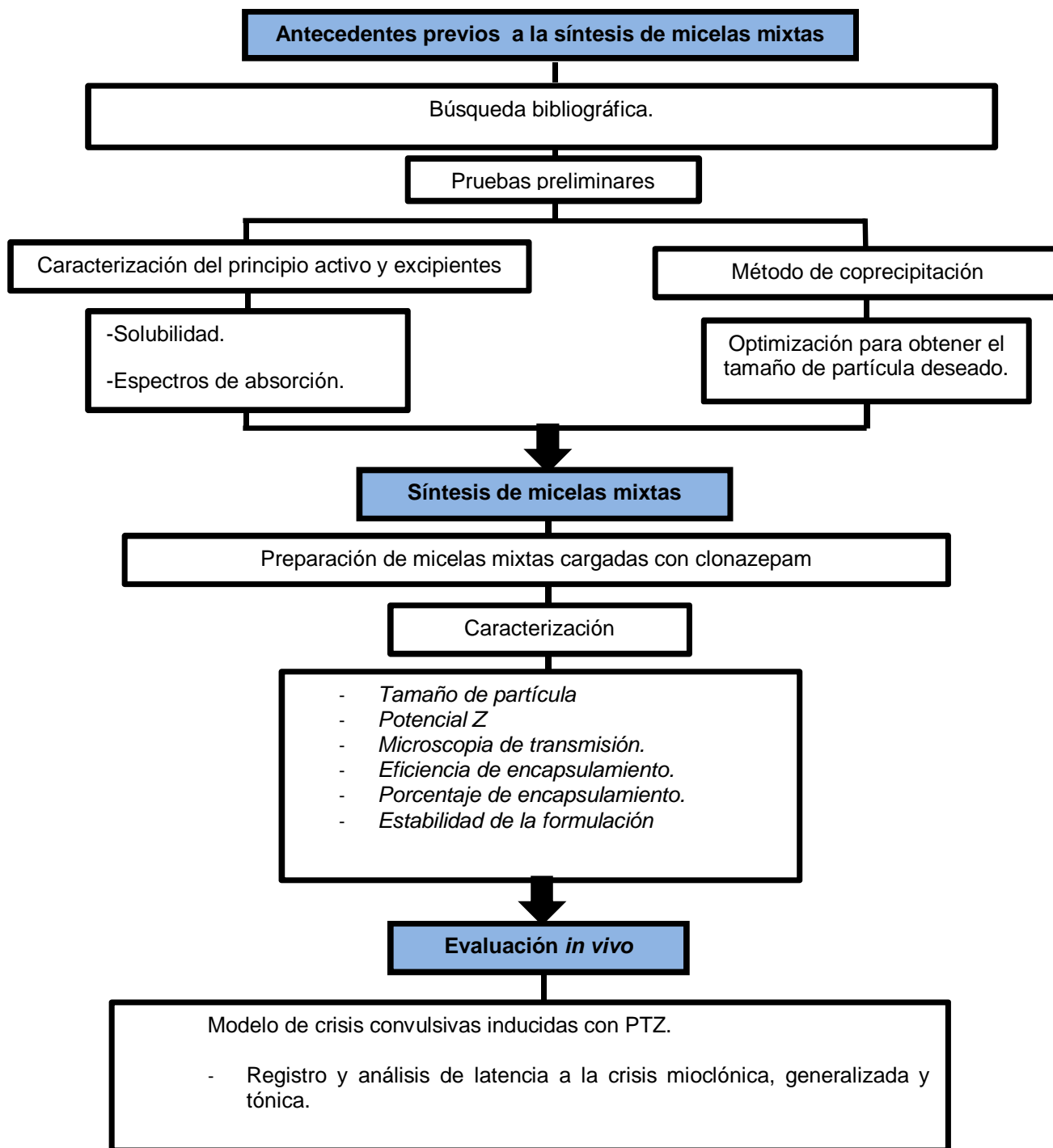
Ratones machos y hembras de la cepa *Swiss webster* (25-30 g de peso corporal), mantenidos a temperatura controlada de 25 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h se utilizaron para el desarrollo del protocolo experimental.

Las evaluación *in vivo* se realizó siguiendo los lineamientos del comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

5.2 Metodología general.

A continuación se muestra un diagrama general que describe los procedimientos experimentales efectuados. Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de las micelas mixtas conteniendo clonazepam, su caracterización y finalmente la evaluación *in vivo* del efecto anticonvulsivo

DIAGRAMA 1.- Descripción general de los procedimientos experimentales desarrollados en el protocolo



5.3 Pruebas Preliminares.

5.3.1 Principio activo

Un estudio acerca de la solubilidad de clonazepam en micelas mixtas realizado por M.A. Hamman et, al., describe que el fármaco es estable al ser encapsulado al 5% en micelas mixtas de glicocolato de sodio y I- α fosfatidilcolina, resuspendidas en solución amortiguadora de fosfatos de pH 6.5.

Considerando lo anterior y que el fármaco presenta una alta lipofiliidad se determinó encapsularlo en el interior hidrófobo de la micela, y de esta manera obtener una eficiencia de encapsulamiento aceptable.

Cabe señalar que la presencia del grupo NO₂ en la posición 7 limita en gran medida la interacción del clonazepam con los lípidos que conforman la micela, así al llevar a cabo la ruptura de la estructura micelar, el fármaco no quedará unido a los lípidos y será liberado.

Por otro lado, la alta liposolubilidad del clonazepam le permite ser de fácil absorción y de rápida distribución entre las membranas celulares y por lo tanto su paso a través de la BHE se ve facilitado.

5.3.2 Solubilidad del Fármaco.

A partir de los valores de solubilidad reportados para clonazepam se realizaron pruebas de solubilidad a 25 °C en tres diferentes disolventes orgánicos cloroformo, metanol y una mezcla metanol-cloroformo al 1% considerando que los componentes de la formulación son altamente solubles en etanol y poco solubles en cloroformo.

Asimismo, se determinó la solubilidad de clonazepam en solución diluyente acetonitrilo/solución amortiguadora de amonio pH:8 (45:55) utilizada para llevar a cabo la cuantificación de fármaco por HPLC.

5.3.3 Solubilidad de los componentes lipídicos.

A partir de los valores de solubilidad reportados para glicocolato de sodio y l- α fosfatidilcolina se determinó la solubilidad de ambos componentes lipídicos a 25°C en cloroformo, metanol y una mezcla metanol-cloroformo al 1%.

Todas las determinaciones de solubilidad se realizaron mediante el siguiente procedimiento:

1. Pesar 1 mg de clonazepam en papel encerado, con ayuda de una balanza microanalítica.
2. Agregar el sólido pesado en un tubo de ensaye de vidrio.
3. Adicionar 1 mL de solvente orgánico y agitar con vortex.
4. Si no se observa la disolución del sólido, continuar agregando cada vez 1 mL de solvente orgánico hasta observar una completa disolución.
5. Registrar los mL de solvente necesarios para disolver al principio activo.

5.3.4. Espectro de absorción.

5.3.4.1 Espectro de absorción del fármaco.

Se preparó una solución estándar de clonazepam a una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ pesando 3 mg de fármaco y llevando a volumen de 50 mL con una mezcla metanol-cloroformo al 1%.

Con la finalidad de conocer el máximo de absorbancia del clonazepam se realizó un barrido por espectrofotometría UV-Vis en una región de 250 a 400 nm.

5.3.4.2 Espectros de Absorción de los componentes Lipídicos.

Una solución estándar de glicocolato de sodio y l- α fosfatidilcolina se prepararon a una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ en solución metanol-cloroformo al 1% para llevar a cabo un barrido por espectrofotometría UV-Vis en una región de 250 a 400 nm.

5.4 Método de coprecipitación

Para la elaboración de las micelas mixtas cargadas con clonazepam se empleó el método de coprecipitación descrito por M.Hammad, et al, que describe la encapsulación de clonazepam en micelas mixtas.

5.4.1 Descripción del método de coprecipitación.

La siguiente tabla describe la formulación de micelas mixtas cargadas con Clonazepam.

Tabla 17. Formulación para la Preparación de Micelas Mixtas Cargadas con Clonazepam.

COMPONENTE	CANTIDAD	PORCENTAJE
Clonazepam	1 mg	2.50%
L- α Fosfatidilcolina	23.7 mg	59.38%
Glicocolato de Sodio	15.21 mg	38.11%
Total	39.91 mg	100 %

El glicocolato de sodio y la l- α fosfatidilcolina se pesaron en una balanza microanalítica en porcentajes de 36.2% y 56.4% con respecto al 100% de la formulación. De la misma manera se pesa 2.5% de principio activo. Todos los componentes fueron disueltos en 5 ml de una mezcla de metanol-cloroformo al 1% (v/v). Posteriormente los solventes orgánicos son evaporados a 25°C bajo condiciones de vacío en un rotaevaporador. Se observa la formación de una película, la cual es dispersa en 780 μ L de solución búffer de gsfatos 0.2 M a pH=6.5 \pm 2.

La dispersión es colocada en un rotaevaporador y se agita a 30 rpm durante 2 horas, hasta observar una solución micelar transparente y clara. Finalmente se filtra esta solución por membrana hidrofóbica de 0.22 μ m de poro.

5.4.1.1 Incorporación de fármaco en micelas mixtas.

El principio activo es incorporado junto con los componentes lipídicos en el solvente orgánico.

5.4.1.2 Preparación de micelas mixtas placebo.

Para la preparación de Micelas Mixtas placebo, se sigue el procedimiento de coprecipitación antes descrito sin la incorporación de fármaco.

5.5 Caracterización de Micelas Mixtas.

Para poder explicar el comportamiento de las micelas mixtas como transportador submicrónico de fármacos, se realizó la caracterización de las mismas en los siguientes:

5.5.1 Tamaño de Partícula.

El tamaño de partícula fue determinado mediante mediciones en Zeta Ziser ZEN 3600 (Malvern Instruments). En este equipo el tamaño de partícula es determinado al medir el movimiento browniano de la partícula en una muestra líquida usando el método de dispersión dinámica de la luz (DLS).

El movimiento browniano se define como: “El movimiento aleatorio de las partículas en un líquido debido al bombardeo por las moléculas que las rodean”. Es conocido que las partículas pequeñas se mueven rápidamente en un líquido y las partículas más grandes se mueven más lentamente. De esta manera podemos determinar las partículas en función de su tamaño.

Si una partícula pequeña es iluminada por un rayo de luz como el láser éste incidirá en todas direcciones. Si una pantalla se mantiene cerca de la partícula la pantalla se ilumina por la luz dispersada. A continuación se muestra una imagen que ilustra el fundamento de la medición efectuada para determinar el tamaño de partícula.

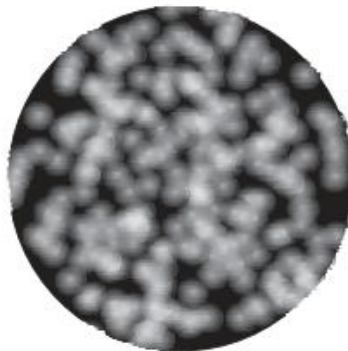


Fig. 31 Rayo que incide en partículas de diferentes tamaños. Se observa que hay áreas de luz brillante y zonas oscuras donde no se detecta la luz.

El siguiente diagrama muestra las ondas que son propagadas en las partículas. Las áreas más iluminadas son aquellas donde la luz es dispersada por las partículas llega a la pantalla con la misma fase e interfiere para formar una banda iluminada.

Las áreas oscuras son donde las inmersiones de fase se cancelan entre si, como se muestra a continuación

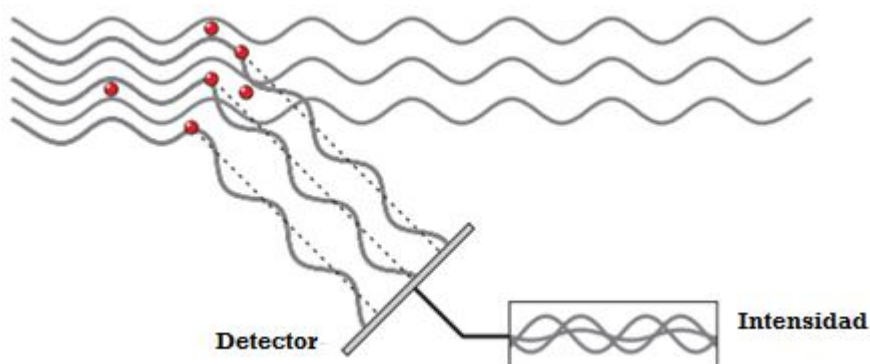


Fig.32 Luz dispersada que cae sobre el detector.

Como se menciono antes, las partículas se encuentran en movimiento constante, presentando un movimiento Browniano. La relación entre el tamaño de una partícula y su rapidez asociada al movimiento Browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein.

Como las partículas se encuentran en movimiento constante, se presentan fases de construcción o destrucción que causan las áreas oscuras y brillantes. El Zetasizer mide la tasa de fluctuación de esa intensidad y la utiliza para calcular el tamaño de partícula.

El tamaño de partícula se obtuvo de una dispersión de un haz de luz proveniente de una lámpara He/Ne con una intensidad a una longitud de 622nm. Las mediciones se realizaron con un detector ubicado a 90°C y con una temperatura de 25°C, el medio de dispersión utilizado en todas las mediciones fue solución amortiguadora de fosfatos de pH=6.5. Se realizaron las mediciones por triplicado.

Se tomó un mililitro de Solución Micelar y se efectuó una dilución con 5 ml de Solución Amortiguadora. Las determinaciones se realizaron utilizando una celda de cuarzo.

5.5.2 Potencial Z

Para la determinación de Potencial Z se utilizó el equipo Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600 cuyo fundamento radica en la aplicación de un campo eléctrico que genera un

fenómeno de migración de partículas en solución según sea la carga eléctrica que posee la partícula, moviéndose hacia el electrodo de carga opuesta, la velocidad con la que migran se mide y se expresa en unidades de campo de fuerza como su movilidad.

Las determinaciones fueron realizadas utilizando una celda de capilar doblado para la medición de potencial Z colocando aproximadamente 500 μL de solución micelar hasta llenar la celda.

El ZetaSizer calcula el potencial Z determinando la movilidad electroforética de los iones que conforman la muestra, aplicando la Ecuación de Henry. Para llevar a cabo las mediciones es necesario utilizar una celda donde se lleva a cabo electroforesis, determinando así la velocidad de las partículas utilizando velocimetría láser Doppler (LDV).

Las partículas presentan una carga eléctrica en su superficie que afecta la distribución de iones en la región interfacial, resultando en un aumento de la concentración de iones con carga opuesta a la de la partícula en estudio.

De esta forma, se observa una doble capa eléctrica que existe alrededor de cada partícula. La capa del líquido rodea la partícula como dos partes; una región interior llamada capa de Stern, donde los iones se unen fuertemente y una capa difusa exterior, región en la que no están unidos firmemente. Dentro de la capa difusa hay un límite dentro de la cual los iones y partículas forman una entidad estable, cuando una partícula se mueve, los iones dentro del ámbito se mueven con ella, pero los iones alejados no se mueven con la partícula.

Este límite se llama superficie de cizallamiento hidrodinámico o plano deslizamiento. El potencial que existe en este límite se denomina Potencial Zeta. A continuación se muestra una imagen que ilustra el fundamento de la medición de Potencial Z.

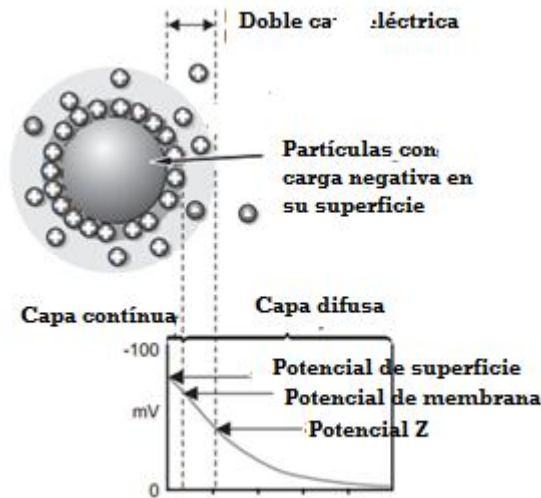


Fig. 33 Medición del Potencial Z. La magnitud del Potencial Z indica la estabilidad de un sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen una gran potencial Z negativo o positivo tienden a repelerse entre sí. De manera general, las partículas con un valor de Potencial Z más positivos que 30mV o -30mV normalmente se consideran estables.

De manera general, las partículas con un valor de Potencial Z más positivos que 30 mV o -30mV normalmente se consideran estables. El factor más importante que afecta el potencial Z es el pH.

Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de un electrolito, las partículas cargadas son atraídas hacia los electrodos, a una velocidad constante, que depende del gradiente del voltaje, la viscosidad del medio, el potencial Z y la constante dieléctrica del medio.

Conociendo la velocidad de la partícula en un campo eléctrico, podemos conocer el Potencial Z de la partícula aplicando la Ley de Henry.

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3h}$$

Donde:

- Z: Potencial Z
- U_E : Movilidad electroforética.
- ε : Constante dieléctrica.
- μ : Constante dieléctrica.
- $f(ka)$: Función de Henry. Se utilizan dos valores: 1.5 aproximación de Smoluchowski (medio acuoso, partículas grandes) ó aproximación de Huckel (medio no acuoso, partículas pequeñas)

La determinación de la movilidad electroforética se lleva a cabo en un sistema microelectroforético clásico que consiste en una celda con electrodos en cada costado terminal a la cual se aplica un potencial. Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, la velocidad con la que migran se mide y expresa en unidades de campo de fuerza como su movilidad.

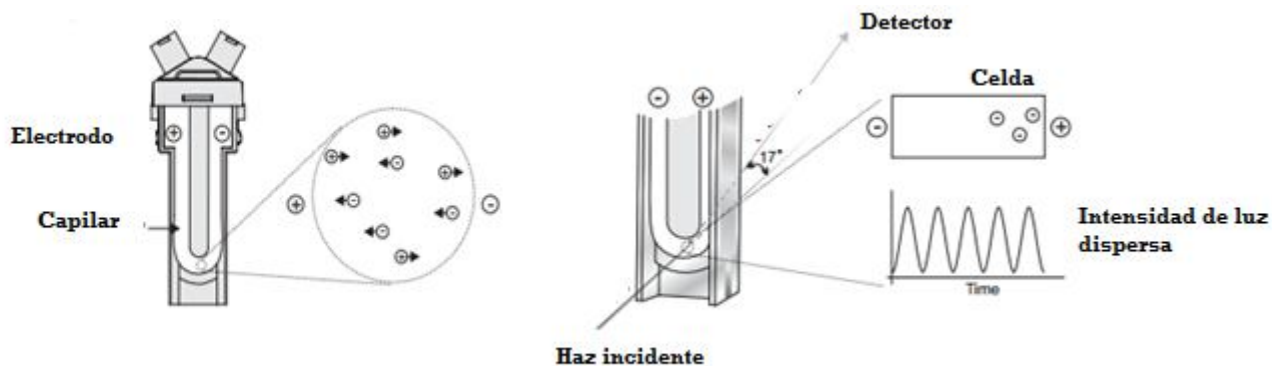


Fig. 34 Técnica utilizada para determinar Potencial Z

La esencia de un sistema clásico de microelectroforesis es una celda con electrodos en cualquiera de los extremos a los que se aplica un potencial. Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, su velocidad se mide y expresa como función de la fuerza de su movilidad.

La luz dispersada en un ángulo de 17° se combina con el haz de referencia, éste produce una señal de intensidad fluctuante, donde la tasa de variación es proporcional a la velocidad de las partículas. Un procesador de señal digital se utiliza para extraer las frecuencias características de la luz dispersada.

5.5.3 Morfología observada con microscopía electrónica de transmisión.

La observación de micelas mixtas en microscopía de Transmisión se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Materiales en la UNAM a cargo del Dr. Enrique Lima.

Se analizaron dos muestras de micelas mixtas: placebo y cargadas con clonazepam, las cuales se dejaron equilibrar durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron aproximadamente 50 µl de muestra, los cuales fueron aplicados a una película de carbono perforado en una rejilla de cobre. Una vez realizado esto, se colocó la placa en un baño de etano líquido llevando a cabo así la evaporación

del búffer de fosfatos. El rápido cambio de temperatura asegura la vitrificación, es decir; no hubo cambio en las estructuras micelares, ni en los arreglos moleculares.

Para la observación de las muestras, se colocó la placa de carbono en la cámara del microscopio electrónico de transmisión para su observación directa, controlada por el técnico, a 120 Kv. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEDL Modelo JEM-1200 Ex ElectronMicroscope.

Este tipo de Microscopía nos permite observar imágenes por medio de electrones que atraviesan la muestra como lo hace la luz en un microscopio óptico pero con mayor poder de resolución, lo que nos permite observar detalles muy pequeños de la muestra.

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones proveniente de un cañón de electrones atraviesa una muestra ultradelgada. El haz se enfoca sobre un área pequeña de la muestra mediante un condensador electromagnético que dirige el haz de electrones en una línea recta para iluminar la muestra.

El TEM contiene lentes electromagnéticos para controlar la intensidad del haz de electrones, el enfoque y los aumentos. En lugar de colocar la muestra en un portaobjetos de vidrio suele utilizarse una rejilla de cobre. El haz de electrones atraviesa primero la muestra y después las lentes electromagnéticas del objetivo, con lo cual aumenta el tamaño de la imagen. Por último, los electrones son enfocados por las lentes electromagnéticas proyectoras sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica.

La imagen final, denominada microfotografía electrónica de transmisión aparece en forma de zonas claras y oscuras de acuerdo con el número de electrones absorbidos por las diversas áreas de la muestra. Utilizando TEM podemos observar objetos separados por una distancia de 2.5 nm y aplicarlos de 10, 000 a 100,000 X. Dado que la mayoría de las muestras son muy delgadas, el contraste entre sus ultraestructuras y el fondo es débil.

La microscopía electrónica de transmisión tiene una alta resolución y es extremadamente útil para examinar capas distintas de una muestra. Sin embargo, no se logra observar un aspecto tridimensional. Por otro lado, la muestra debe ser fijada, deshidratada y observada en condiciones de vacío estricto.

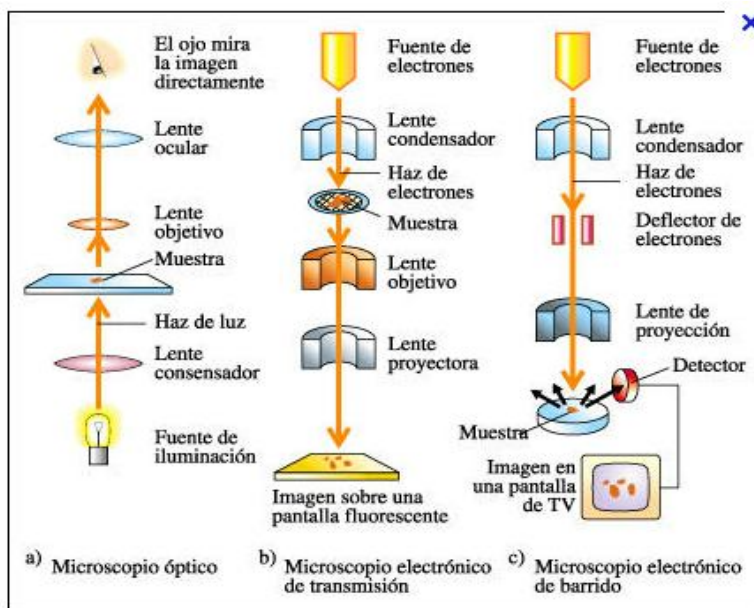


Fig. 35 Comparación entre Microscopía electrónica, TEM, y Microscopía Electrónica

5.5.4 Estabilidad de micelas Mixtas de sales biliares.

Se efectuó la preparación de un lote de micelas mixtas de 22 nm, determinando el tamaño de partícula inicial.

Se realizó una evaluación de tamaño de partícula del lote durante 30 días, realizando mediciones periódicas que nos permitieron conocer si las micelas se agregan al mantenerse a una temperatura de 5°C, suspendidas en una solución amortiguadora de fosfatos pH:6.5.

El tamaño de partícula fue determinado mediante mediciones en ZetaZiser ZEN 3600 Malvern Instruments.

5.5.5 Porcentaje de encapsulamiento de clonazepam en micelas mixtas.

Con la finalidad de establecer una concentración para la evaluación *in vivo* fue necesario determinar el porcentaje de encapsulamiento de clonazepam en micelas mixtas.

5.5.5.1 Filtración en gel para eliminar fármaco libre.

Al llevar a cabo la incorporación de fármaco en las micelas mixtas no todo se encapsula, existe una fracción libre que queda en el medio acuoso en el que se encuentran suspendidas las micelas.

El método de cuantificación no sería exacto si este fármaco libre no es eliminado. Para este fin se recurre a la cromatografía de exclusión molecular, mediante la cual las micelas son separadas del fármaco libre por diferencia de peso molecular.

Una vez separadas, las micelas fueron filtradas, posteriormente se efectúa la ruptura de la estructura micelar, liberándose el clonazepam encapsulado para ser cuantificado.

Con la finalidad de conocer la velocidad y el tiempo de centrifugación que garantizara la separación de la micela y el fármaco libre se realizaron detecciones de clonazepam por UV y HPLC, centrifugando a 3500 rpm durante ciclos de 60 s.

Metodología para la detección de clonazepam y optimización del método de Filtración en Gel.

1. Pesar aproximadamente exacto 0.3 mg de clonazepam con una balanza microanalítica, en un vaso de precipitados de 5 mL.
2. Adicionar 1mL de metanol y agitar mecánicamente hasta observar completa disolución.
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL .
4. Enjuagar el residuo del vaso de precipitados con solución diluyente.
5. Llevar al aforo con solución diluyente en el caso de detección por HPLC y con solución metanol-cloroformo al 1% en el caso de detección por UV.

Se prepararon 8 muestras de las cuales se tomaron 500 μ L, centrifugando a distintas rpm hasta observar alguna señal de clonazepam.

5.5.5.2 Método de cuantificación de clonazepam encapsulado en micelas mixtas.

Debido a la alta sensibilidad de los métodos cromatográficos y a la naturaleza lipofílica del clonazepam se utilizó un método con HPLC fase reversa para llevar a cabo la cuantificación de clonazepam nanoencapsulado, sabiendo que éste se encontraría en solución al momento de romper la estructura micelar posterior a la cromatografía de exclusión.

Las Condiciones Cromatográficas del método de cuantificación fueron las siguientes:

Tabla 18. Condiciones Cromatográficas	
Longitud de Onda	310 nm
Columna	X-Terra RP 18 tamaño de poro de 5µm, 150 mm de largo y 4.6 mm de ancho.
Flujo	1 ml/min
Volumen Inyectado	100 µL
Tiempo de Corrida	5 min.
Fase Móvil	Acetonitrilo-agua (45:55)
Diluyente	Acetonitrilo-búffer de Amonio 1N pH=8

Preparación de la fase móvil.

- Adicionar en un vaso de precipitados de 2 L, 550 mL de H₂O desionizada 450 mL de ACN grado HPLC.
- Medir los reactivos con probeta graduada de 1000 mL.
- Mezclar bajo agitación magnética.
- Esperar a que la temperatura de la fase móvil se encuentre a 25°C.
- Filtrar con membrana millipore de 45 µm hidrofílica.
- Desgasificar durante 20 minutos.

Preparación de la solución búffer de amoniaco pH=8

- Pesar aproximadamente exacto 6.6 mg de fosfato dibásico de amonio anhidro en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Adicionar agua destilada y agitar mecánicamente hasta observar completa disolución.
- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 1L y adicionar 900 mL de agua destilada.

- Ajustar el pH con ácido fosfórico 1N o con hidróxido de sodio 1N a un pH de 8 +0.3.
- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 1L y aforar con agua destilada.
- Etiquetar perfectamente.

Preparación de solución de NaOH 1N

- Pesar aproximadamente exacto 2.17 mg de NaOH en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Adicionar agua destilada y agitar mecánicamente hasta observar completa disolución.
- Adicionar la solución anterior en un matraz volumétrico de 50 mL.
- Enjuagar 3 veces el vaso de precipitados con agua destilada y adicionar el volumen en el matraz volumétrico de 50 mL.
- Llevar al aforo con agua destilada.
- Etiquetar la solución.

Preparación de solución diluyente.

- Adicionar en un vaso de precipitados de 2 L, 550 mL de solución amortiguadora de Amoniaco pH=8 y 450 mL de acetonitrilo grado HPLC.
- Medir los reactivos con probeta graduada de vidrio de 1000 mL.
- Esperar que la solución tenga una temperatura de 25°C.
- Filtrar con membrana millipore de 45µm.

Se construyó una curva de calibración a partir de una solución Stock de clonazepam S.R. utilizando seis diferentes concentraciones como se describe a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 19. Sistemas propuestos para la Curva de Calibración de Clonazepam.

Sistema	Concentración
1	2.4
2	4.8
3	7.2

4	9.6
5	12
6	14.4

Preparación de la solución stock

1. Pesar 3 mg de clonazepam sustancia de referencia en un vaso de precipitados de 50 mL.
2. Adicionar 1 mL de metanol y disolver bajo agitación magnética.
3. Adicionar la solución anterior en un matraz volumétrico de 50 mL.
4. Llevar a volumen con solución diluyente.
5. Etiquetar perfectamente.

Preparación de las soluciones para la curva de calibración a diferente concentración.

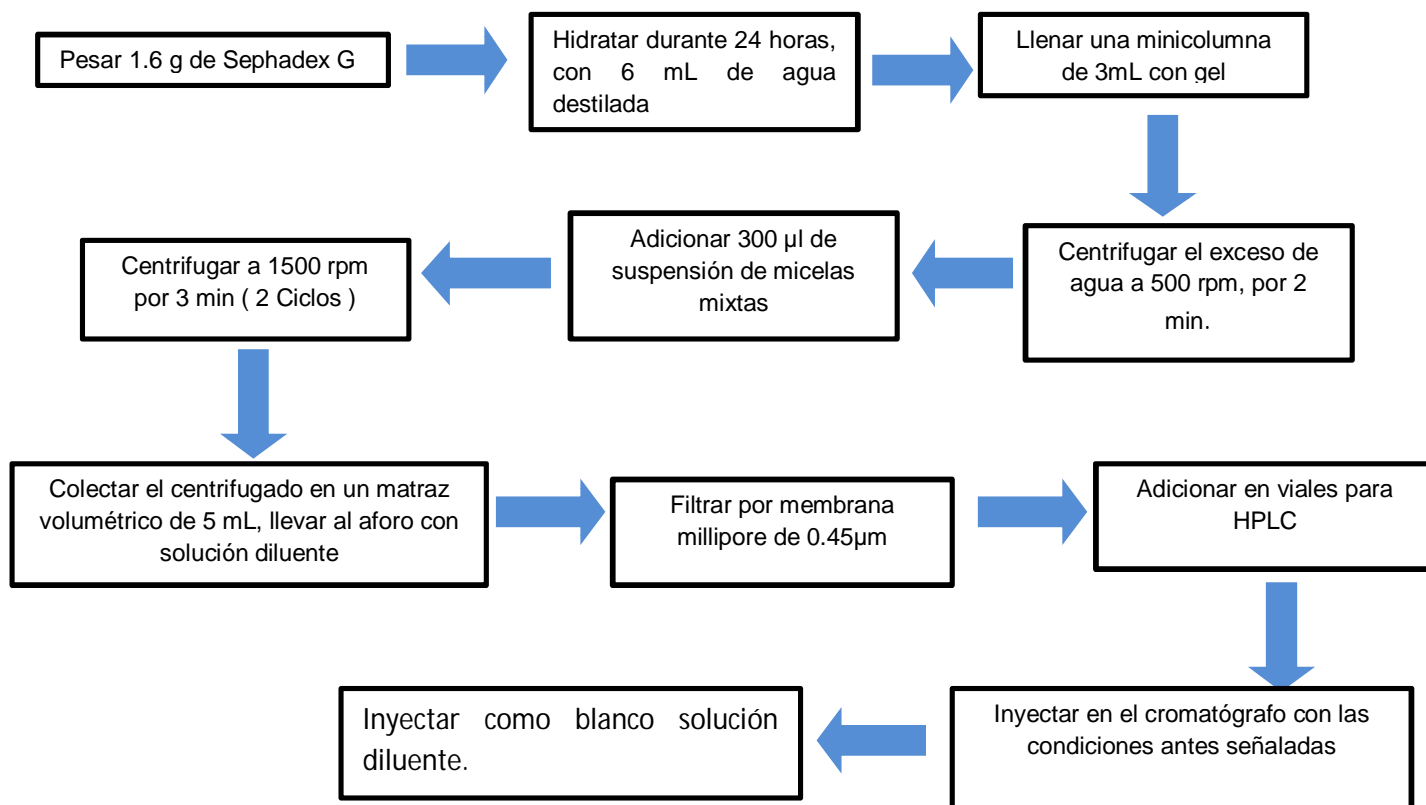
1. Tomar 1 mL de la solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
2. Llevar al aforo con solución diluyente.
3. Tomar 2 ml de Solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
4. Llevar al aforo con solución diluyente.
5. Tomar 3 ml de solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
6. Llevar al aforo con solución diluyente.
7. Tomar 4 ml de solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
8. Llevar al aforo con solución diluyente.
9. Tomar 5 ml de solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
10. Llevar al aforo con solución diluyente.
11. Tomar 6 ml de solución Stock, adicionar en un matraz volumétrico de 25 mL.
12. Llevar al aforo con solución diluyente.

Realizar la curva de calibración por triplicado. Filtrar todas las soluciones con membrana millipore de 0.45µm. Adicionar en viales para HPLC e inyectar en el cromatógrafo.

Cuantificación de Clonazepam.

Una vez que se obtuvo la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam, obteniendo un C.V. menor al 2% y un r^2 aproximado a 1, se llevó a cabo la cuantificación de la muestra analítica como se describe a continuación.

Procedimiento General para Cuantificación de Clonazepam.



5.5.6 Validación del Método de Cuantificación.

El método analítico propuesto debió ser validado para justificar que la cuantificación realizada es confiable y se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la USP. Los parámetros evaluados se mencionan a continuación:

1. Linealidad.
2. Especificidad.
3. Límite de Detección.
4. Límite de Cuantificación.

5. Precisión.

5.5.6.1 Linealidad. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determinó mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes concentraciones (Aguilar 2009).

El análisis de linealidad del sistema se realizó mediante una curva de calibración con seis diferentes concentraciones, partiendo de una solución Stock de concentración 60µg/ml (Aguilar 2009).

Se evaluaron los seis puntos por triplicado y se calculó el coeficiente de variación y r^2 . El análisis de linealidad del método se realizó cuantificando cinco muestras de Micelas Mixtas a diferentes concentraciones, evaluando las tres cuantificaciones por triplicado. (Aguilar 2009)

Se evaluaron los cinco puntos por triplicado, se calculó el coeficiente de variación y r^2 .

1. Tomar una alícuota de 1 mL de un lote de micelas mixtas.
2. Filtrar en gel a 3500 rpm durante dos ciclos de 60 segundos.
3. Tomar 300µL de filtrado y colocar en un vaso de precipitados de 10 mL.
4. Adicionar un mL de metanol, para romper la estructura micelar.
5. Adicionar la solución anterior en un matraz volumétrico de 5 mL.
6. Llevar al aforo con solución diluyente.
7. Leer bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas por HPLC.

5.5.6.2 Precisión.

Grado de concordancia entre los resultados el test individual cuando el procedimiento es aplicado repetidas veces para una muestra homogéneas. Generalmente la precisión de un método se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 2% (Aguilar 2009).

En este caso particular se analizó la precisión del sistema y del método mediante análisis matemáticos observándose que el grado de concordancia entre los resultados de las muestras analizadas no fuera mayor al 2% (Aguilar 2009).

5.5.6.3 Especificidad.

Para realizar el análisis de especificidad se preparó una muestra de l- α fosfatidilcolina y glicocolato de sodio con una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron barridos de las muestras a 310 nm, descartando así una interferencia de los componentes de formulación.

Así mismo, se prepararon muestras de micelas mixtas conteniendo clonazepam para descartar la aparición de alguna señal por parte de los componentes de la formulación.

De la misma forma se realizó análisis estadístico a la curva de calibración por HPLC para verificar que a 310 nm no se observara señal relacionada con la presencia de los componentes lipídicos.

5.5.6.4 Límite de Detección.

Para un resultado analítico se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco a la presencia real del analito. La señal del fondo es producida por el blanco y exhibe ruido. El límite de detección corresponde a una señal k veces la desviación del ruido de fondo.

Para fines prácticos se calculó utilizando la siguiente relación matemática, de acuerdo a los datos de la curva de calibración del sistema.

$$\text{LD} = 3.3(\text{D.E.} / m)$$

5.5.6.5 Límite de Cuantificación.

Es considerado como el límite de concentraciones más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. Se define como la cantidad del analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco.

Para fines prácticos se calculó utilizando la relación

$$\text{L.C.} = 10(\text{D.E.}/m)$$

5.6 Evaluación *In Vivo*.

Para la evaluación de la actividad anticonvulsiva de clonazepam cargado en micelas mixtas se utilizó la vía esofágica (A) y 30 min después se indujeron las crisis con la administración intraperitoneal del agente convulsivante PTZ 80 mg/kg (B), siguiendo el protocolo del diagrama que se muestra en la figura 37.



Fig.36 Administración oral de micelas mixtas de clonazepam e intraperitoneal de PTZ (80 mg/kg).

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO DE MICELAS MIXTAS CARGADAS CON CLONAZEPAM

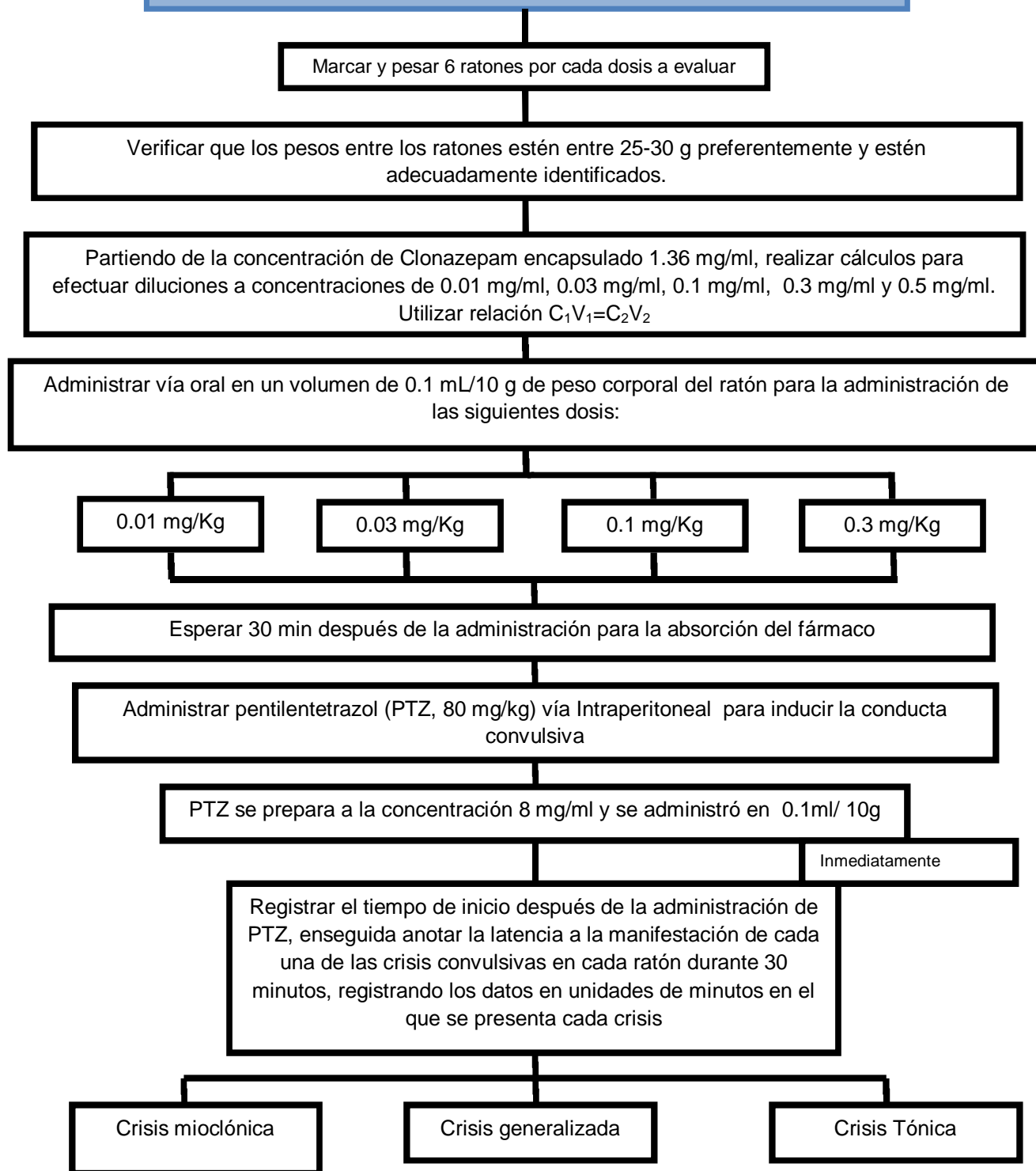


Fig. 37 Evaluación del efecto anticonvulsivo de micelas mixtas cargadas con clonazepam.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección del principio activo a utilizar

El Clonazepam es un fármaco que posee propiedades fisicoquímicas que posibilitan su estabilidad al ser encapsulado en micelas mixtas de sales biliares y debido a sus propiedades farmacológicas resulta ser ampliamente utilizado en el tratamiento de las crisis epilépticas. A continuación se describen las características principales que determinaron la elección de Clonazepam como principio activo modelo.

1. **Lipofilia.** El Clonazepam al ser un fármaco lipofílico es viable para su encapsulación en el interior hidrófobo de micelas mixtas de sales biliares, observándose así porcentajes altos referentes a la eficiencia de encapsulamiento y capacidad de carga del fármaco (M.A. Hammad and Muller, 1998).

La lipofilia del Clonazepam favorece su paso a través de la BHE con una concentración lineal entre el cerebro y la concentración en plasma, por ello resulta ser un fármaco de fácil absorción y rápida distribución (Ned H. 1994).

2. **Estabilidad en micelas mixtas de sales biliares.** El Clonazepam es altamente estable al ser encapsulado al 5% en micelas mixtas de glicocolato de sodio y L- α fosfatidilcolina resuspendidas en solución amortiguadora de Fosfatos de pH 6.5. La presencia del grupo NO₂ en la posición 7 en la estructura química del Clonazepam limita en gran medida la interacción del fármaco con los lípidos que conforman la micela (M.A. Hammad and Muller, 1998).
3. **Biodisponibilidad en sistema nervioso central.** Su biodisponibilidad después de la administración oral es mayor del 80% observándose una mayor concentración plasmática en un periodo de 1 a 4 horas (Noboku, 2007).
4. **Selectividad.** El Clonazepam tiene mayor afinidad por los receptores GABA que el Diazepam (fármaco anticonvulsivante de primera elección), además de unirse a

las subunidades del receptor GABA_A en forma exclusiva respecto del resto de las benzodiazepinas logrando así una mayor potencia farmacológica (Noboku, 2007).

5. **Reducción de efectos adversos.** El Clonazepam no bloquea los receptores de dopamina por lo tanto no se presenta el efecto secundario de disnesia (temblores) producido por la administración de otros fármacos anticonvulsivantes de la familia de las benzodiazepinas. Asimismo, no tiene acción anticolinérgica, no altera la presión arterial o la función cardiovascular, y no se reporta toxicidad renal relacionada con su administración (Ned H, 1994).

6.2 Selección de los componentes de la formulación para la preparación de micelas mixtas.

Se determinó utilizar L- α fosfatidilcolina y glicocolato de sodio como biosurfactantes en la síntesis de micelas mixtas por las siguientes razones:

1. De acuerdo al modelo de agregación de micelas mixtas de Mazer, al encontrarse en un medio acuoso, la fosfatidilcolina y el glicocolato de sodio crean un centro micelar hidrófobo debido a sus propiedades anfipáticas. Por lo tanto, el clonazepam al ser un fármaco con naturaleza lipófila se encuentra embebido dentro de la matriz de la micela mixta.
2. La L-alfa fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en los mamíferos, se sintetiza a partir de la colina procedente de la dieta mediante una serie de reacciones donde la fosfatidiletanolamina es convertida a fosfatidilcolina por la acción de la enzima fosfatodilentanolamina metiltransferasa (ver Fig.33).

La importancia de este fosfolípido recae en la formación de micelas mixtas para digestión de grasas así como el control y regulación de muchas rutas metabólicas involucradas en la síntesis de lípidos, siendo también un componente principal de la membrana celular. Esta última característica la convierte en un excelente biosurfactante, ya al ser un componente de las micelas mixtas facilitará el transporte del fármaco a través de la membrana hematoencefálica (Berg, J, 2008).

Se reporta La composición de la fosfatidilcolina es aproximadamente 33% de ácido palmítico, 11% de ácido esteárico, 35% de ácido oleico y 2% de ácido araquidónico,

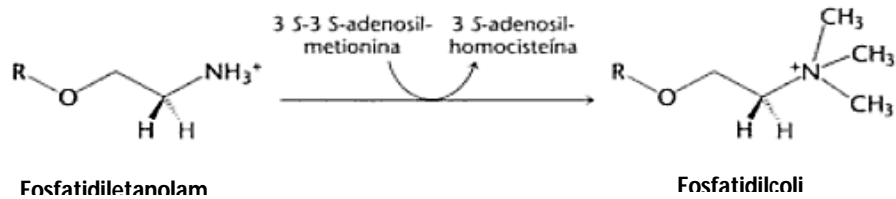


Fig. 38 Síntesis de Fosfatidilcolina

La estructura química de la fosfatidilcolina consta de dos partes como se muestra en la fig 24, una cabeza donde se encuentran los grupos iónicos fosfato y colina, y en la cola dos cadenas no polares de ésteres de ácidos grasos.

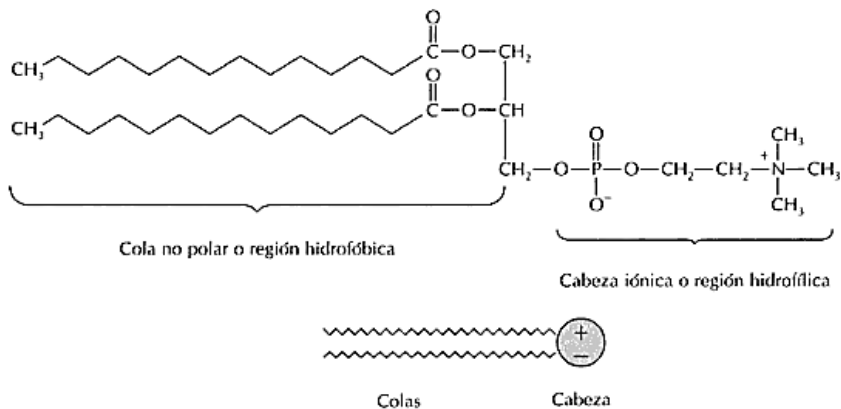


Fig. 39 Estructura química de fosfatidilcolina

3. Por otro lado, el glicocolato de sodio cumple un papel importante también en la digestión de lípidos, ya que al ocurrir el proceso de emulsificación con la fosfatidilcolina da lugar a la producción de micelas mixtas donde se almacenan y disuelven triacilglicerolos los cuales son transportados al intestino para su absorción, esta última propiedad es posible debido a su estructura química anfipática similar a la fosfatidilcolina, con grupos hidrófilos y un cuerpo no polar como se muestra en la siguiente figura.

4.

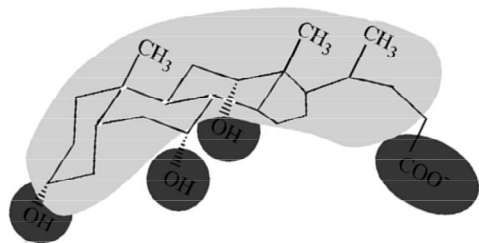


Fig. 40 Fórmula química de una molécula de glicocolato, se observa una superficie hidrófoba (color gris claro) y los grupos hidrofílicos (señalados en color gris oscuro). (P. Garidel, 2007)

Al encontrarse en un medio acuoso, la parte polar de la molécula se orienta hacia el exterior, y la parte hidrófoba se asocia a la porción lipófila del glicocolato de sodio formando la estructura característica de las micelas.

El estudio de las propiedades fisicoquímicas en disolución acuosa del glicocolato de sodio muestra que el cambio de grupo carboxílico en la posición 24 no compromete la capacidad de formación de micelas, siendo la única diferencia que se observa cuando pasa a ser catiónico a pH fisiológico (Queijo, A).

6.3 Pruebas preliminares.

6.3.1 Solubilidad.

6.3.1.1 Solubilidad de los componentes de la formulación para determinar el disolvente a utilizar en el método de coprecipitación.

La fase inicial de la preparación de micelas mixtas consiste en la formación de una película lipídica formada por la disolución de fosfatidilcolina y glicocolato de sodio en un disolvente orgánico. Es también en esta primera etapa del proceso cuando el fármaco es incorporado para ser encapsulado dentro de las micelas formadas por el fosfolípido y la sal biliar.

Por ello es importante considerar que tanto el fármaco como el fosfolípido y la sal biliar sean solubles en el mismo disolvente orgánico a temperatura ambiente, pues resulta más fácil y práctico el proceso de elaboración.

Tomando como base el método utilizado por M. Hammad, et. al, para la preparación de micelas mixtas de sales biliares, conociendo que el clonazepam es identificado como un fármaco muy poco soluble en agua, ligeramente soluble en etanol y poco soluble en cloroformo, y sabiendo que la l-alfa fosfatidilcolina y el glicocolato de sodio son solubles en cloroformo, metanol y hexano a temperatura ambiente, se realizaron pruebas de solubilidad para confirmar la información reportada y de esta manera elegir el disolvente idóneo para la solubilizar a todos los componentes de la formulación.

Tabla. 20 Solubilidad del Clonazepam en cloroformo y metanol.

Disolvente	Cloroformo	Metanol
Clonazepam en disolvente orgánico puro a 25^o C	Ligeramente Soluble	Soluble
L-α Fosfatidilcolina en disolvente orgánico puro a 25^o C	Muy soluble	Ligeramente soluble
Glicocolato de Sodio en disolvente orgánico puro a 25^o C	Ligeramente soluble	Soluble
Fármaco, sal biliar y fosfolípido en solvente orgánico a 25^oC	Muy Soluble	Soluble

Los resultados de la tabla anterior indican que los componentes de la formulación no son totalmente solubles en un mismo disolvente, por ello se preparó una solución metanol-cloroformo al 1%, y se realizaron pruebas de solubilidad del fármaco, la sal biliar y el fosfolípido, obteniendo los resultados indicados en la tabla 34.

Tabla 21. Solubilidad de los componentes de la formulación en solución metanol-cloroformo al 1%.

Disolvente	Mezcla metanol-cloroformo al 1%
Clonazepam en disolvente orgánico puro a 25^o C	Soluble
L-α Fosfatidilcolina en disolvente orgánico puro a 25^o C	Soluble
Glicocolato de Sodio en disolvente orgánico puro a 25^o C	Soluble
Fármaco, sal biliar y fosfolípido en solvente orgánico a 25^oC	Soluble

Todos los componentes de la formulación resultan ser totalmente solubles en la mezcla metanol cloroformo al 1% razón por la cual fue seleccionado para llevar a cabo la fase de disolución de los componentes y formación de la película lipídica.

6.3.1.2 Solubilidad del fármaco para llevar a cabo su cuantificación.

Para conocer la cantidad de clonazepam encapsulado dentro de la micela mixta se desarrolló un método analítico por HPLC en fase reversa, el cual fue validado. Uno de los parámetros que debe de cumplir un método para asegurar su validación es la exactitud, es decir; se debe demostrar que al aplicar el método analítico se está cuantificando del 98-100% del analito en la muestra, esto reduce errores y es una prueba fehaciente de que los resultados son confiables.

Para lograr esta exactitud el fármaco debe encontrarse solubilizado en el medio en el cual se va a cuantificar. En este caso, para la preparación de la muestra, se rompe la micela mixta y el fármaco es liberado en una solución metanol-cloroformo al 1%, posteriormente se toma una muestra y se lleva a un volumen con solución diluyente, para poder ser inyectada en el cromatógrafo.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el fármaco inicialmente se encuentra encapsulado en la micela mixta, la cual a su vez se encuentra suspendida en una solución acuosa (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5) que también contiene fracciones de fármaco libre que no fue encapsulado.

Partiendo de este hecho el fármaco para poder ser cuantificado debe ser primero liberado, esto se logró por medio de cromatografía de exclusión molecular para separar el fármaco libre de las micelas.

El fármaco es atrapado en gel y solo las micelas son liberadas al pasar por la columna de exclusión. Esto permite que al tener solo la estructura micelar esta se pueda romper al solubilizar los componentes lipídicos que contienen la micela. De acuerdo a la tabla 34, los componentes lipídicos son solubles en una mezcla metanol-cloroformo al 1%, esta misma mezcla es utilizada para solubilizar los componentes de la micela y liberar el fármaco que está contenido dentro de ellas.

Para efectuar la cuantificación fue necesario elegir la solución diluyente que mantuviera soluble al clonazepam y que asegurara que al ser arrastrado por la fase móvil (no polar) a través de la columna cromatográfica fuera detectado para su determinación.

La solución diluyente utilizada consiste de una mezcla acetonitrilo-solución amortiguadora 45:55. La elección de la solución diluyente se realiza en función de la fase móvil, Agua:ACN 55:45% que fue utilizada para cuantificar clonazepam por HPLC reportada por M. Hammad et. al,

Para desarrollar el método de cuantificación se consideró todo lo antes mencionado y fue necesario realizar pruebas de solubilidad del fármaco en solución diluyente, y en la fase móvil obteniéndose los siguientes resultados:

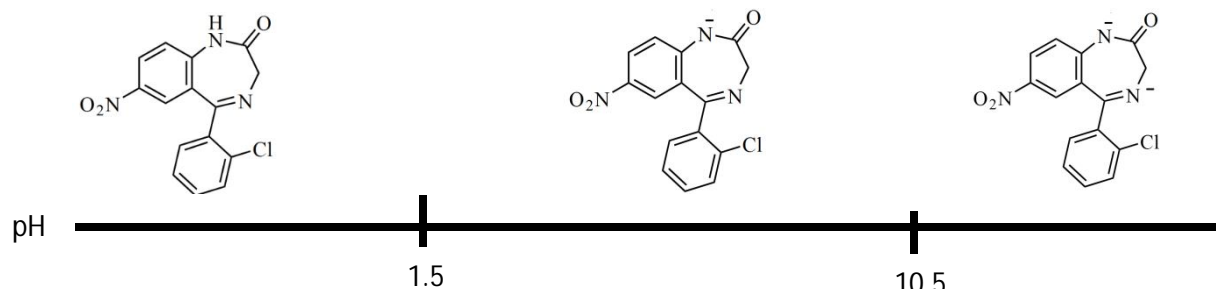
Fármaco	Solubilidad en diluyente ACN-Búffer amoniaco (45:55) pH=7. ^a	Solubilidad en fase móvil ACN-H2O (45:55) ^b
Clonazepam	Soluble	Ligeramente soluble

a. Temperatura 25°C 25 rpm agitación durante 1 min

b. Temperatura 25°C 25 rpm agitación durante 1 min

El clonazepam resulta ser soluble en la solución diluyente, esto se explica a la presencia del búffer de amoniaco pH 8 en la mezcla, cuya función es mantener un pH alcalino, asegurando que el fármaco siempre se encuentre en su forma ionizada y de esta forma llevar a cabo la cuantificación de manera exacta.

A continuación se muestra la escala de zonas de predominio del clonazepam la cual se construye considerando sus valores de pKa y su basicidad.



La escala anterior explica el comportamiento del fármaco al encontrarse en un medio con diferentes valores de pH, observándose que al encontrarse en solución amortiguada a pH 8, el clonazepam se encuentra soluble (no ionizado), por ello no se precipita y es fácilmente eluído por la fase móvil, reflejándose en el tiempo de retención bajo obtenido al efectuar la cuantificación, y en la exactitud demostrada en el método.

Se reporta en el método desarrollado por M. García et, al. para la determinación de Clonazepam en tabletas y en el método utilizado por Leyva G, 2006 para la cuantificación de clonazepam en nanopartículas lipídicas, que al preparar las muestras a temperatura ambiente y sin protección de la luz se observa una disminución en la concentración de fármaco debida a su degradación hidrolítica, por este motivo, en todas las muestras se protegió de la luz solar al fármaco, cubriendo los matraces e inyectando al cromatógrafo utilizando viales de color ámbar.

6.3.2 Espectros de Absorción de los componentes de la formulación para la cuantificación de clonazepam.

Para realizar la cuantificación de fármaco por el método de HPLC descrito en la parte experimental, fue necesario realizar barridos de los componentes de la formulación para seleccionar la longitud de onda de detección del clonazepam y asegurar que los lípidos no interfieren en la cuantificación.

Los resultados se muestran a continuación:

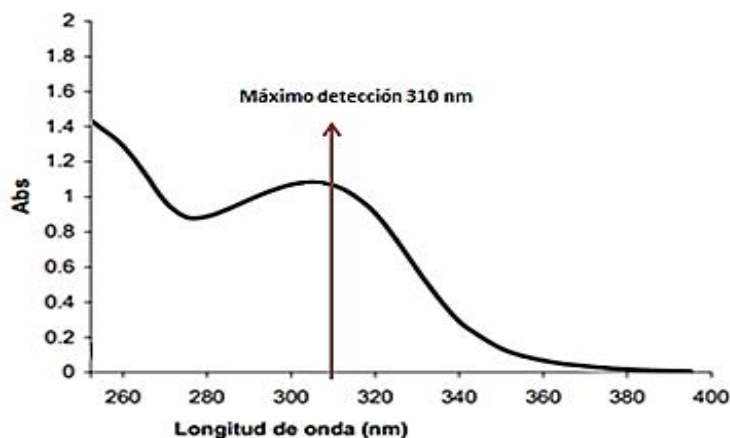


Fig. 41 Barrido de Clonazepam en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. Se observa su máximo de absorción a 315 nm.

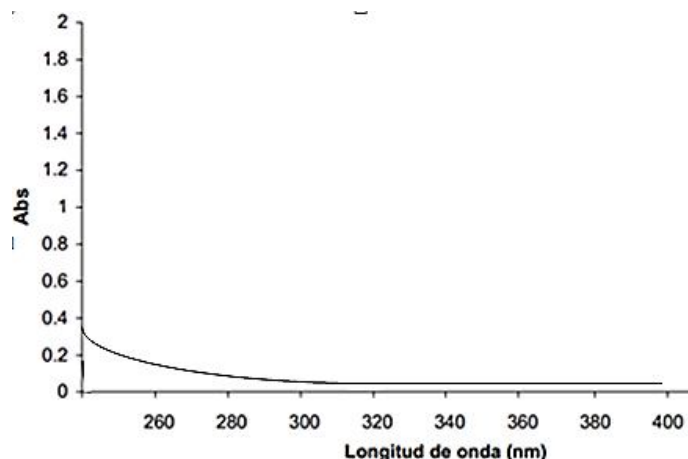


Fig. 42 Barrido de Glicocolato de Sodio en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. No se observa señal de interferencia a 315 nm.

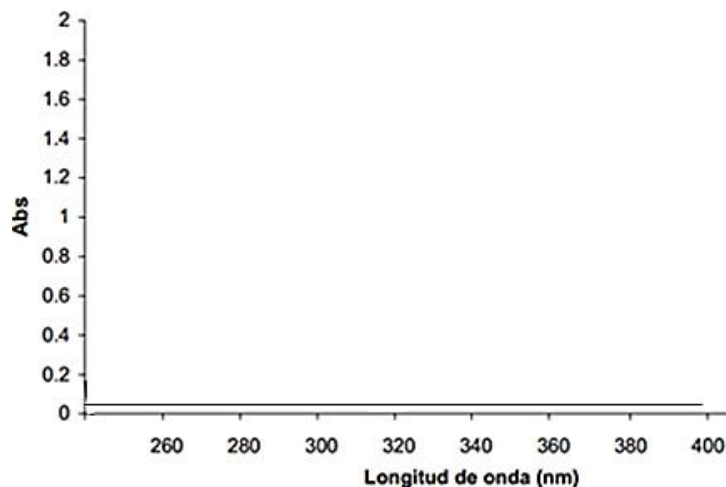


Fig. 43 Barrido de Glicocolato de Sodio en una solución Metanol-Cloroformo al 1%. Concentración 60µg/ml. No se observa señal de interferencia a 310 nm

La figura 41 muestra el espectro de absorción de clonazepam, observándose que a 310 nm presenta su longitud de máxima absorción, este resultado determinó la longitud de detección de clonazepam para el método por HPLC, así como las condiciones para la optimización del método de cromatografía de exclusión utilizado para la separación de micelas mixtas y fármaco libre.

Se observa también que a la longitud de detección del fármaco, no existe ningún tipo de interacción con el fosfolípido ni con la sal biliar, al no presentarse ningún tipo de señal analítica emitida por los componentes antes mencionados, lo que es un buen indicio de especificidad del método.

6.4 Método de coprecipitación para la preparación de micelas mixtas de sales biliares.

El método de coprecipitación llevado a cabo para la obtención de micelas mixtas, fue modificado del método descrito por Almong et. al., 1990 el cual consiste en la preparación de una suspensión acuosa de fosfolípidos estructurados en una capa (micela), en la cual se encuentra embebido el principio activo.

La formación de la película de lípidos representa la primera etapa de preparación de micelas mixtas, se requiere del uso de disolventes orgánicos (solución metanol/cloroformo al 1%), con la finalidad de solubilizar los componentes lipídicos que forman la estructura micelar.

Una vez que los lípidos son disueltos, se adiciona a la mezcla el clonazepam disuelto en la solución metanol/cloroformo al 1%.

Lo que se busca al adicionar el clonazepam en último lugar es que los componentes hidrófobos interactúen primero de manera homogénea formando una capa de lípidos en la superficie, el fármaco al ser de naturaleza lipídica queda por debajo de ésta, como se muestra en la siguiente figura.

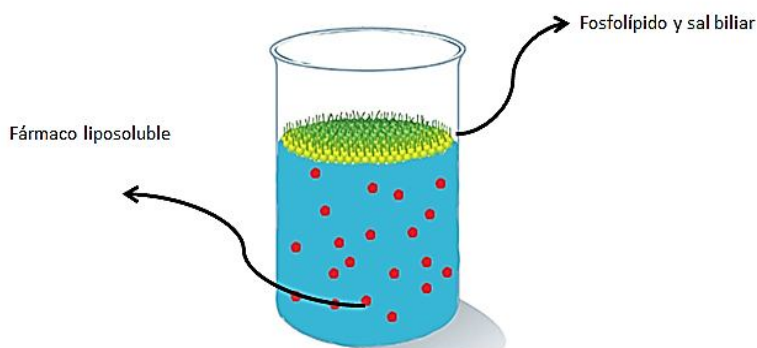


Fig. 44 Fosfolípido, sal biliar y fármaco liposoluble en una mezcla metanol/cloroformo , al 1%.

Una vez que se tienen en solución los componentes de la formulación, se sometió la mezcla a evaporación del disolvente orgánico para la obtención de un film lipídico, el cual es hidratado con solución acuosa (búffer de fosfatos pH 6.5)

En la etapa de incorporación de la fase acuosa al sistema, ocurre la formación de micelas y el fármaco es encapsulado dentro de ellas.

6.4.1 Velocidad de agitación.

La velocidad de agitación es un factor importante que se encuentra relacionado con la disminución de la tensión superficial, factor que se ve reflejado en el tamaño de partícula obtenido.

Para determinar la velocidad de agitación óptima se prepararon e hidrataron películas lipídicas, las cuales fueron sometidas a diferente velocidad de agitación en rotaevaporador, determinando el tamaño de partícula obtenido como se muestra a continuación:

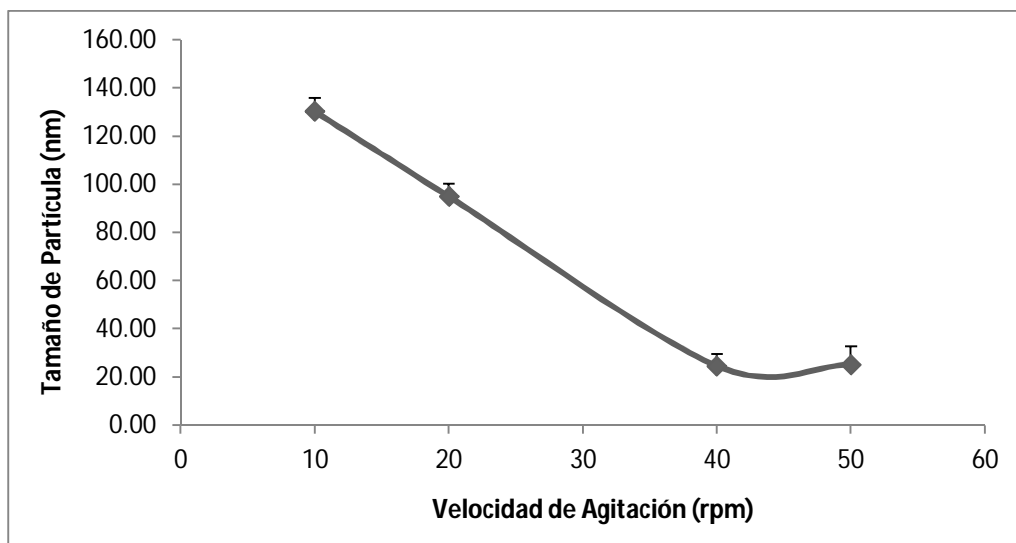


Fig 45 Efecto de la velocidad de agitación en el tamaño de partícula. Las evaluaciones se llevaron a cabo a 25°C.

La figura anterior señala que al aumentar la velocidad de agitación el tamaño de partícula obtenido es menor, observándose que a baja velocidad de agitación en rotaevaporador se forma un agregación micelar, que es fácilmente observada al tornarse más turbia la suspensión.

Al suministrar energía en forma de agitación, se produce una marcada disminución de la tensión superficial, el fosfolípido y la sal biliar se asocian entre ellos formando capas esféricas donde queda atrapado el fármaco.

6.4.2 Temperatura de formación de micelas mixtas.

El proceso de evaporación de disolvente orgánico e hidratación del sistema se realizó a 25 °C, por encima de la temperatura de transición de fase de la fosfatidilcolina y el glicocolato de sodio, evitando así la coexistencia de liposomas en suspensión, de acuerdo al modelo propuesto por Helenius y Simos para la formación de micelas.

Se considera que si se lleva a cabo todo el proceso de coprecipitación por debajo de la temperatura requerida para transición a micelas mixtas, en la etapa II coexisten estructuras formadas por una y dos capas lipídicas (liposomas) (López, et. al 1998).

En la siguiente tabla se menciona la temperatura de transición de vesículas a micelas mixtas para el fosfolípido y la sal biliar utilizados en la formulación:

Tabla 22. Temperatura de transición para L- α Fosfatidilcolina y Glicocolato de sodio. (Gruyter, W 1997)

Componente	Temperatura de Transición
L-α Fosfatidilcolina	21° C
Glicocolato de Sodio	19 °C

Como se señala, ambos componentes de la formulación, presentan temperaturas de transición por debajo de la temperatura a la cual se llevó a cabo todo el proceso, esto se ve reflejado en el tamaño de partícula menor a 50 nm y la morfología esferoide de las micelas obtenidas, como se describe más adelante.

6.4.3 Selección del pH óptimo para la formación de micelas mixtas.

Con la finalidad de determinar el pH óptimo requerido para que las micelas mixtas conserven su estabilidad se consideró el resultado del trabajo de M.H Mamadd et, al. en el cual se describe el efecto del pH sobre la estructura y estabilidad de micelas mixtas de clonazepam como se muestra a continuación:

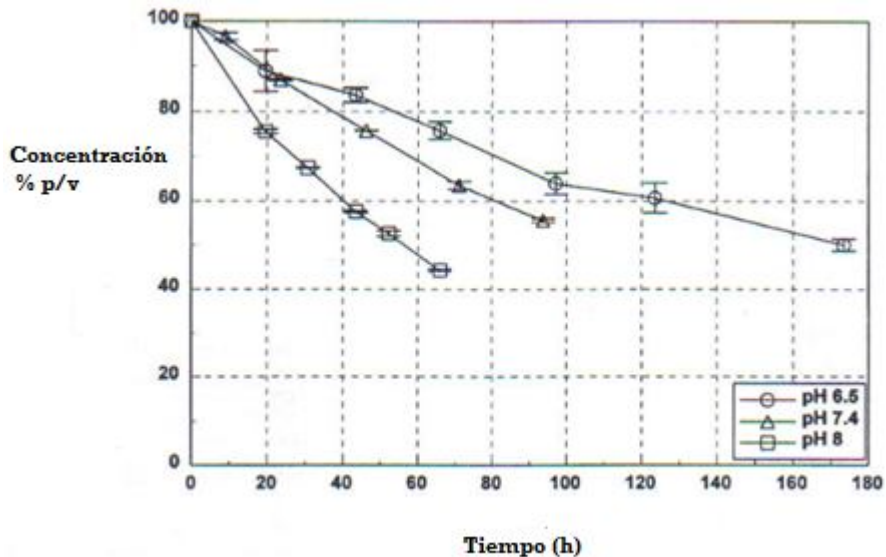


Fig. 46 Degradación de Soluciones de Micelas Mixtas de Clonazepam a diferentes Concentraciones y valores de pH. M.A. Hammad and Muller, 1998).

Los resultados reportados muestran que clonazepam se degrada al aumentar el pH en un tiempo de 180 horas, observándose una menor degradación en un pH de 6.5. De ahí parte la determinación de suspender las Micelas Mixtas en un Búffer de Fosfatos de pH=6.5 0.2M

6.4.4 Efecto de la concentración de fosfolípido y sal biliar en la formación de micelas mixtas.

Como se mencionó anteriormente, cuando se adiciona el buffer de fosfatos de pH 6.5, las moléculas de fosfolípido y sal biliar se estructuran en función de su lipofilicidad, formando una capa continua de aproximadamente 5nm de ancho (Faustino, C. et, al. 2011).

Una vez que se forma la capa lipídica, ocurre una asociación de las moléculas individuales de la sal biliar y el fosfolípido, que fueron adicionados en una concentración superficie; es decir se encuentran en una concentración micelar crítica.

De acuerdo al modelo de agregación de micelas mixtas propuesto por Helenius y Simos, la CMC (concentración micelar crítica) se ve influida por la estructura de los biosurfactantes involucrados en la formulación. En este caso la L-alfa fosfatidilcolina y el

glicocolato de sodio presentan una cadena hidrocarbonada larga correspondiente a la parte hidrófoba, esto se traduce en una alta CMC que posibilita la formación de micelas.

Al ser la concentración micelar crítica alta, la superficie está ocupada por una capa monomolecular de surfactante, y la tensión superficial disminuye linealmente con el logaritmo de la concentración; según la isoterma de Gibbs que se muestra en la Fig.33.

El agua atrae los grupos polares del lípido y la sal biliar, pero repele sus colas de hidrocarburo. En consecuencia, el glicocolato de sodio y la fosfatidilcolina se concentran formando una estructura con una capa de lípidos. Los grupos de las cabezas polares están en la interfase situada entre el medio acuoso (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5) y el lípido, y las colas hidrófobas forman un centro donde se encapsula el clonazepam.

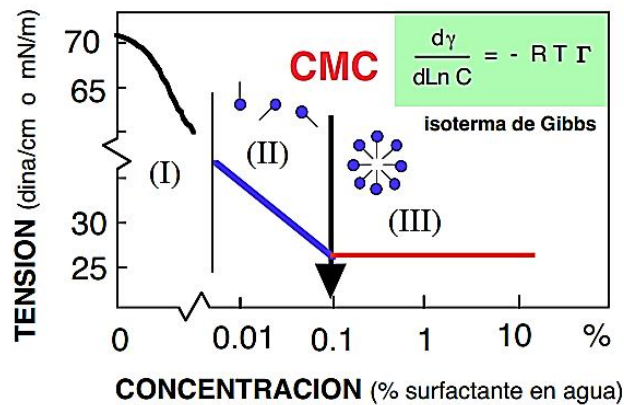


Fig. 47. Tensión superficial en función de la concentración de surfactante (fosfolípido y sal biliar). La siguiente figura indica la variación de la tensión superficial en función de la concentración de fracciones de biosurfactante. A partir del valor que corresponde al agua pura (72 mN/m), se observa una disminución de la tensión superficial con el aumento de concentración de surfactante, en esta primera zona (I), la gran mayoría de las moléculas de surfactante se adsorben en la superficie agua-aire, y la concentración superficial crece rápidamente.

La fase acuosa se satura en moléculas individuales y se observa un cambio a la zona marcada con el número III en el diagrama, en la cual la tensión superficial permanece constante, las interacciones hidrófobas entre moléculas de sal biliar y fosfolípido se tornan altas respecto a las interacciones hidrofílicas para que se forme de manera espontánea la asociación micelar.

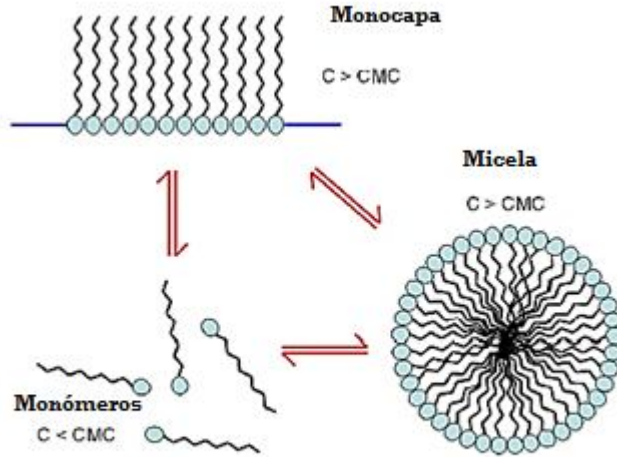


Fig. 48 La concentración de componentes lipídicos determina la formación de micelas mixtas
 En la siguiente figura se observa que la estructura micelar satisface la doble afinidad de las moléculas de L- α fosfatidilcolina y glicocolato de sodio.



Fig 49. Micela: agregado de moléculas de surfactante

Las estructuras formadas al final del proceso, son micelas mixtas cuyo diámetro es aproximadamente de 20 nm, por lo cual se obtiene una solución transparente.

6.5 Caracterización de micelas mixtas.

Una vez que las micelas mixtas fueron preparadas por el método de coprecipitación, se realizó la caracterización de las mismas, con la finalidad de conocer su capacidad para actuar como transportador submicrónico de fármacos.

6.5.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es una propiedad que nos permitió determinar si el clonazepam encapsulado en micelas mixtas es viable para su paso a través de la barrera hematoencefálica considerando que el paso de sustancias a través de esta depende de la liposolubilidad y el tamaño de partícula obtenido.

Otro parámetro importante que podemos conocer en función del tamaño de partícula de la micela mixta es la capacidad para que sean absorbidas en la pared intestinal al ser administradas por vía oral, considerando que los procesos mediante los cuales las micelas mixtas pueden alcanzar su sitio blanco implican atravesar blancos intravasculares, los cuales presentan endotelios con tamaño de poro de alrededor de 100 a 200 nm que pueden ser atravesados por partículas menores a ese tamaño como por ejemplo, la mucosa intestinal con tamaño de poro de 50 nm, (Roerdink et al., 1984).

En la actualidad se conocen principalmente tres mecanismos por los cuales podrían llegar las micelas mixtas a su sitio de acción si son administradas por vía oral, cada mecanismo posible depende en gran medida del tamaño de partícula:

1. Endocitosis
2. Fagocitosis
3. Ingreso trans-paracelular.

Cualquiera que sea el mecanismo de absorción de las micelas mixtas, es necesario que el tamaño de partícula sea menor a 100 nm, como se expresa en la siguiente tabla (Hodges et, al., 2000)

Tabla 24. Mecanismos y sitios involucrados en la captación de partículas.

SITIO	MECANISMO	TAMAÑO DE PARTÍCULA
Enterocitos	Endocitosis	Menor a 200 nm
Macrófagos intestinales	Fagocitosis	Menor a 50 nm
Células M (Placas de Peyer)	Ingreso trans-paracelular	Menor a 100 nm

Los resultados del tamaño de partícula obtenido para micelas mixtas con clonazepam encapsulado se muestran a continuación:

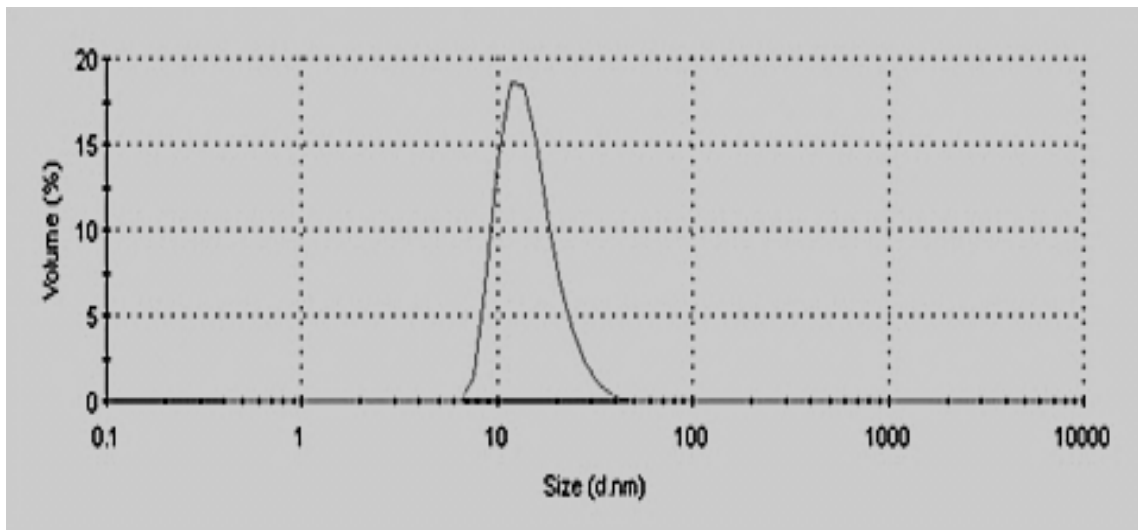


Fig 50. Tamaño de partícula de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam, distribución de tamaño por volumen.

Tabla 25. Tamaño de partícula para micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam.

	Tamaño Promedio (nm)	Porcentaje de Área Total (%)	Índice de polidispersión
Lote 1	18.13	86.2	0.344
Lote 1	21.21	96.6	0.281
Lote 1	21.26	92	0.237
Lote 2	21.74	96.4	0.233
Lote 2	21.74	95.2	0.214
Lote 2	22.88	95.6	0.202
Lote 3	23.49	95.1	0.22
Lote 3	23.84	94.8	0.223
Lote 3	24.36	95.3	0.234
Promedio	22.07	94.13	0.24
Error STD	0.63	3.25	0.04

a) Se realizaron 9 mediciones a un tres lotes de micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam con un tamaño de partícula promedio de 22 nm

De manera general, el lote preparado de micelas mixtas con Clonazepam encapsulado presenta un tamaño submicrónico, como se observa en la fig 47, donde todas las partículas obtenidas son menores a 70 nm. El lote preparado resulta homogéneo al no presentar un índice de polidispersión mayor a 0.5.

Para lograr el control en el diámetro de las micelas y su homogeneidad, se lleva a cabo filtración a través de membrana con tamaño de poro de 22 μm ., una vez que estas son suspendidas en agua.

Con la finalidad de conocer la diferencia existente entre la formulación de micelas mixtas con principio activo y la formulación placebo, se realizó la determinación de tamaño de partícula a 3 lotes diferentes de micelas mixtas placebo, obteniéndose una distribución normal como se muestra a continuación.

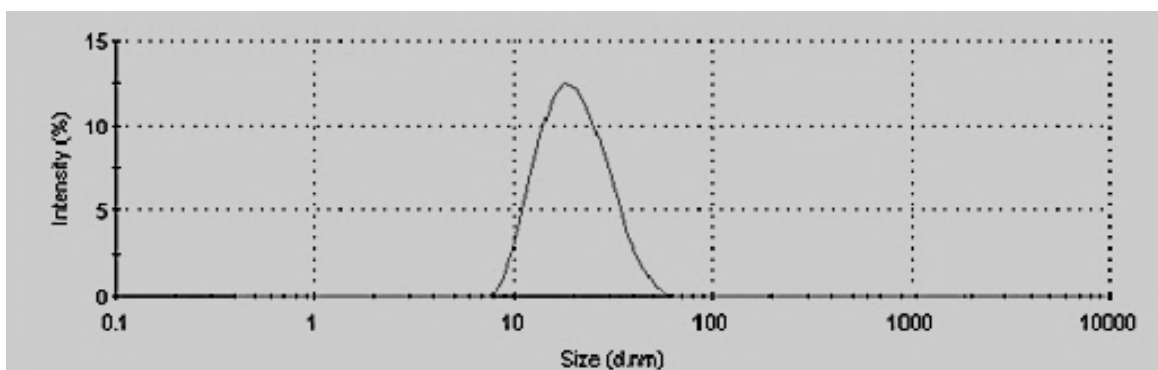


Fig 51. Tamaño de partícula de micelas mixtas placebo, distribución de tamaño por % de intensidad.

Tabla 26. Tamaño de partícula de micelas mixtas placebo

	Tamaño Promedio (nm)	Porcentaje de Área Total (%)	Índice de polidispersión
Lote 1	22.17	82.3	0.292
Lote 1	21.3	76.5	0.289
Lote 2	21.21	74.5	0.286
Lote 2	21.1	81.2	0.279
Lote 2	21.01	78.3	0.276
Lote 3	21.71	77.3	0.284
Lote 3	22.28	77.2	0.282
Lote 3	22.24	76.9	0.28
Lote 3	22.47	76.8	0.27
Promedio	21.72	77.89	0.28
Error STD	0.19	2.42	0.01

En la figura 48 se observa el tamaño promedio de partícula obtenido para micelas mixtas placebo, el cual oscila entre 21.72 nm. Los lotes son homogéneos, ya que el índice de polidispersión es menor a 0.5.

Al realizar una comparación entre el tamaño de partícula de micelas mixtas placebo y micelas encapsuladas con Clonazepam, se obtuvieron los siguientes resultados:

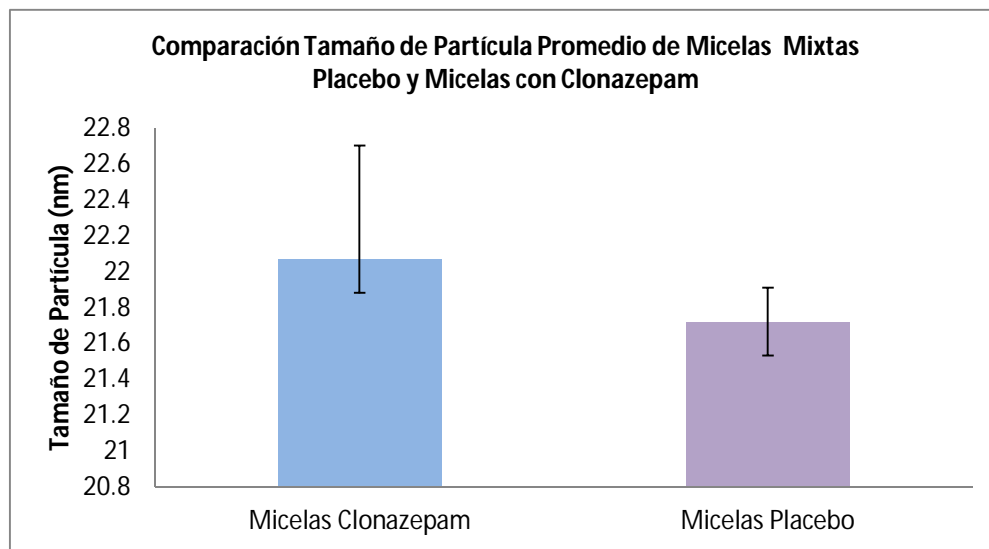


Fig. 27 Comparación del tamaño promedio de partícula entre micelas mixtas encapsuladas con clonazepam y micelas mixtas placebo.

E clonazepam encapsulado en micelas mixtas presenta una mayor desviación estándar lo cual es indicativo de que los lotes aumentan su índice de polidispersidad. El índice de polidispersidad indica que tan homogénea es la dispersión; así para considerar que una población es monodispersa su índice de polidispersión debe encontrarse en un rango de 0 a 0.5.

Para conocer si hay diferencia significativa entre el tamaño de partícula de micelas mixtas placebo y micelas encapsuladas con clonazepam se realizó una prueba estadística t, como se muestra a continuación.

$t = 75.500$	Valor P = 0.353
Grados de libertad = 8	Nivel de confianza = 95%

Grupo	Media	75%	25%
Tamaño de partícula micelas mixtas con clonazepam	22.07	21.25	23.58
Tamaño de partícula micelas mixtas placebo	21.72	21.18	22.25

Para la prueba t-student con un nivel de confianza del 95% se obtuvo que no existe variación significativa entre el tamaño de partícula de micelas mixtas placebo y micelas mixtas cargadas con clonazepam.

Sin embargo, se observa que el tamaño de partícula de micelas mixtas con fármaco es relativamente mayor al de micelas mixtas placebo. Rupp, C. et. al, al encapsular diazepam en micelas mixtas, señala que al incrementar la proporción de principio activo encapsulado, el tamaño de partícula aumenta.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la filtración de micelas por membrana de poro 0.22 μm determina el tamaño de partícula obtenido e influye en la homogeneidad del sistema. El número de veces que se repite la operación determina la lamelaridad y la dispersión de tamaños en la suspensión final de micelas.

Cabe señalar que el tamaño de las micelas mixtas es similar al tamaño de micelas mixtas de sales naturales puras, esto se debe a la proporción de ácido biliar en la formulación, sabiendo que al aumentar la fracción de sales biliares el tamaño de partícula aumenta. (Mazer et al., 1980)

El tamaño de partícula de 22 nm es favorable para el ingreso de las micelas mixtas por la pared intestinal mediante endocitosis. Asimismo el tamaño de partícula favorece el paso a través de la barrera BHE (Eldridge et al, 1990)

6.5.2 Potencial Z.

Una vez que se obtuvo la talla de partícula de las micelas mixtas, fue necesario determinar el potencial Z de la partícula con la finalidad de analizar su estabilidad al encontrarse en suspensión y al ser administrada como nanotransportador de fármacos.

Es necesario que la suspensión de micelas mixtas se mantenga estable, es decir; sin presentar aglomeración entre las partículas. Para entender la propiedad que permite que las partículas se mantengan separadas, se estudia cada micela como una partícula aislada que está inmersa en un líquido (solución amortiguadora de fosfatos), la cual está rodeada por una doble capa eléctrica. La primera capa corresponde a la carga en la

superficie de la partícula. La segunda capa está formada por el exceso de iones de igual signo y de signo contrario en la solución acuosa (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5).

Físicamente el potencial Z es un parámetro físico que caracteriza la carga electrostática de las partículas, que a su vez, es el origen del movimiento de éstas hacia el polo de carga opuesta. De acuerdo con la teoría de Helmholtz hay una atracción entre las partículas y esta depende de la concentración de iones en el sistema. De esta manera, se juzga la estabilidad de las suspensiones coloidales de acuerdo al valor de potencial Z medido en mV, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 28. Potencial Z y estabilidad de suspensiones coloidales.

Valores de potencial Z	Características de la suspensión
+3 a 0 mV	Aglomeración máxima y precipitación
-1 a -5 mV	Excelente aglomeración y precipitación.
-5 a -10 mV	Buena aglomeración y precipitación.
-11 a -20mV	Comienzo de la aglomeración (agregados de 2 a 100 coloides)
-21 a -30 mV	Ligera estabilidad
-31 a -40 mV	Sin agregados. Estabilidad media.
-41 a -50 mV	Buena estabilidad.
-51 a -60 mV	Estabilidad muy buena
-61 a -80 mV	Excelente estabilidad
-81 mV y en adelante	Estabilidad máxima.

Se determinó el potencial Z a cuatro lotes de micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 29. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam al 0.35%.

Lote	Potencial Z (mV)
Lote 1	-29.65
Lote1	-29.24
Lote 1	-29.82
Lote 2	-30.12
Lote 2	-30.16
Lote 2	-30.35
Lote 3	-30.14
Lote 3	-30.11
Lote 3	-30.14
Lote 4	-30.23
Lote 4	-30.21
Lote 4	-30.32
Promedio	-30.04
Desviación STD	0.32

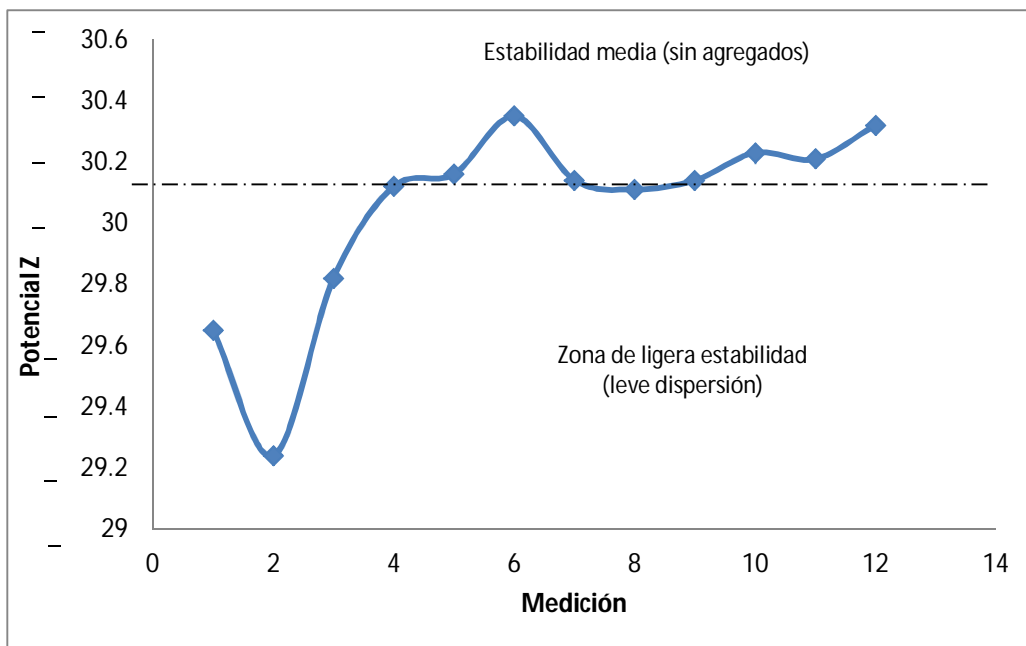


Fig. 52 Potencial Z micelas mixtas encapsuladas con clonazepam

La figura 50 muestra los registros de potencial Z para micelas mixtas encapsuladas con conazepam, observándose que éstas presentan una estabilidad media sin presencia de agregados, resultado que concuerda con el índice de polidispersidad reportado en la determinación de tamaño de partícula.

En este caso, se considera que la suspensión micelar no tiene una carga eléctrica neta, por tanto, la carga primaria de las partículas debe equilibrarse con la disolución acuosa, logrando una fuerza repulsiva suficiente para lograr una estabilidad media del sistema. Sin embargo, al aumentar la concentración de alguno de los componentes lipídicos ocurriría una concentración de iones, lo cual provocaría un apantallamiento de la carga de la partícula que podría traducirse en una disminución de la barrera del potencial ocurriendo una agregación crítica.

Se determinó también el potencial Z de micelas mixtas placebo con la finalidad de conocer su estabilidad al ser suspendidas en medio acuoso, los resultados se muestran a continuación:

Tabla 30. Potencial Z de micelas mixtas placebo.

Lote	Potencial Z (mV)
Lote 1	-31.83
Lote1	-31.74
Lote 1	-31.71
Lote 2	-31.96
Lote 2	-31.92
Lote 2	-31.89
Lote 3	-31.73
Lote 3	-31.68
Lote 3	-31.69
Lote 4	-31.63
Lote 4	-31.59
Lote 4	-31.61
Promedio	-31.75
Desviación STD	0.12

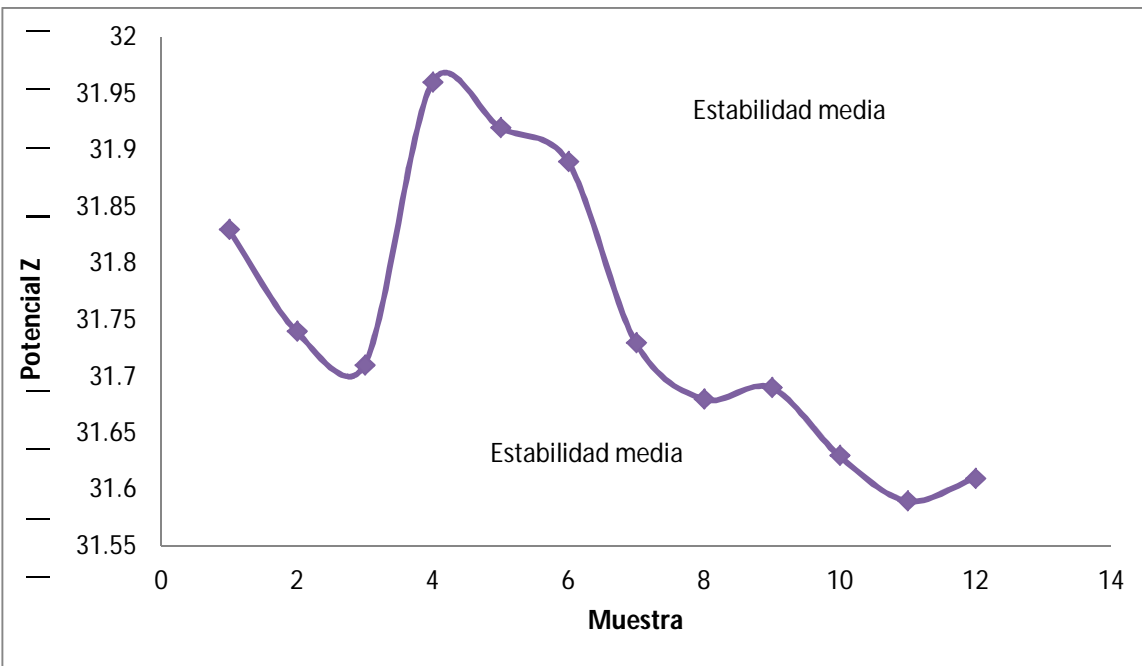


Fig. 53 Potencial Z micelas mixtas placebo.

La figura 53 muestra que las micelas mixtas placebo presentan una estabilidad intermedia, sin presencia de agregados en solución acuosa, las partículas se estabilizan por la composición hidrófila externa.

Se podría presentar la ionización de grupos OH⁻ o de COOH⁻ que constituyen a los componentes lipídicos que forman al glicocolato de sodio, aportando carga negativa a la partícula. Por otro lado, la L- α fosfatidilcolina, componente mayoritario de la formulación presenta un sal cuaternaria de amonio en su estructura, la cual aporta cargas positivas a la micela.

Se observa así un sistema micelar en el que las cargas negativas estabilizan a las cargas positivas para evitar su agregación, presentándose así una densidad de carga negativa reflejada en el potencial Z promedio obtenido.

Con la finalidad de conocer si el fármaco encapsulado en las micelas mixtas provoca cambios en la estabilidad del sistema, se realizó un análisis estadístico del potencial Z obtenido para micelas mixtas placebo y micelas encapsuladas con Clonazepam, como se muestra en la siguiente figura.

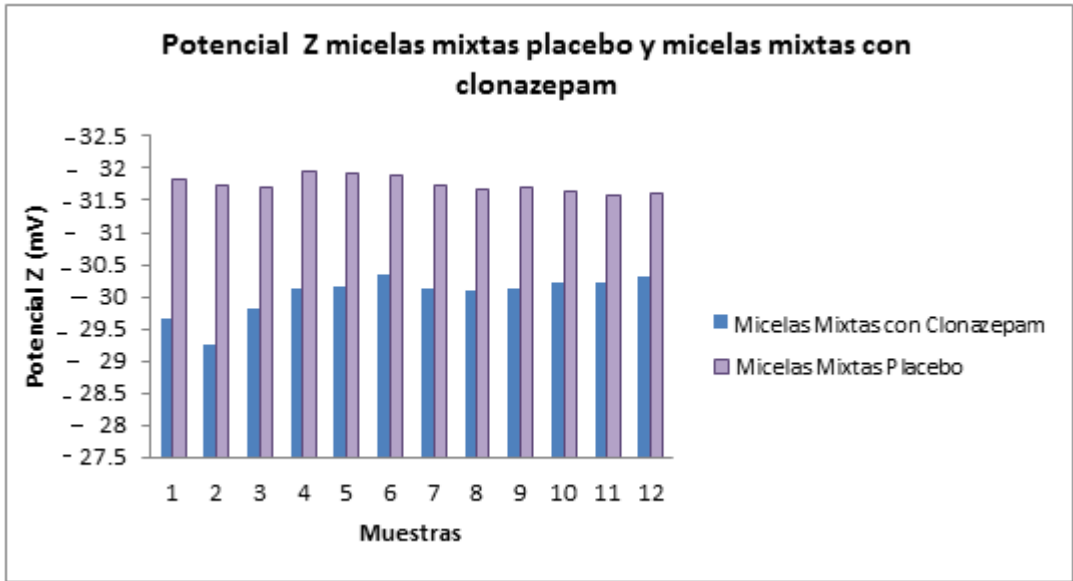


Fig.54 Potencial Z determinado a micelas mixtas con Clonazepam y micelas mixtas placebo

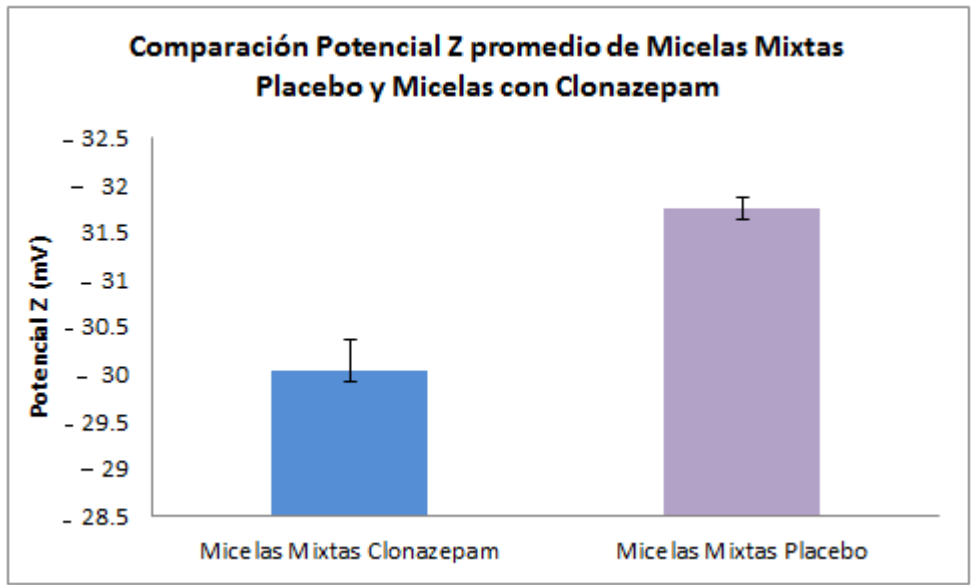


Fig. 55 Comparación potencial Z promedio de micelas mixtas placebo y micelas con clonazepam

De acuerdo a las figuras 54 y 55 las micelas mixtas presentan un valor de potencial Z relativamente mayor al de las micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam. Sin embargo, esta diferencia resulta ser estadísticamente significativa como se describe a continuación, al aplicarse un análisis estadístico de comparaciónn Mann Whitney, obtencieno un valor de P menor a 0.001

Pese a tener un valor de potencial Z con una diferencia estadística significativa, las micelas mixtas encapsuladas con fármaco mantienen una estabilidad media al igual que las micelas mixtas placebo. Como regla, si queremos asegurar que exista repulsión y por ende estabilidad en la dispersión entre las partículas debemos asegurarnos que el potencial z sea mayor a +30mV o menor a -30mV. (Radomska, A. 2007) En el caso de micelas mixtas encapsuladas con Clonazepam no se observa una disminución en el valor de potencial Z, o presencia física de aglomeración en solución.

Cabe señalar que la estabilidad de las micelas se puede ver influida por cambios en la concentración de componentes lipídicos y cambios de pH. Se observa también que no existe un cambio importante en el tamaño de partícula como consecuencia de la disminución de los mecanismos de estabilización de las micelas mixtas, ya que este permanece constante en las mediciones realizadas.

6.5.3 Análisis morfológico de clonazepam encapsulado y micelas mixtas placebo por microscopía electrónica de transmisión.

El análisis morfológico de micelas mixtas mediante TEM permitió confirmar que las partículas presentan una forma esférica respondiendo al modelo de agregación en forma de esfera propuesto por Kawamura, et. al, como se puede observar en las siguientes micrografías:

6.5.3.1 Morfología de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam.



Fig. 56 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% 100 nm 20,000 X

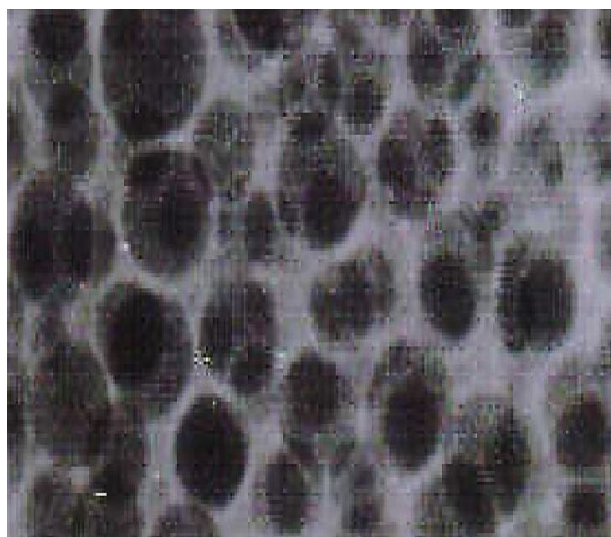


Fig. 58 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% 50 nm, 30,000 x

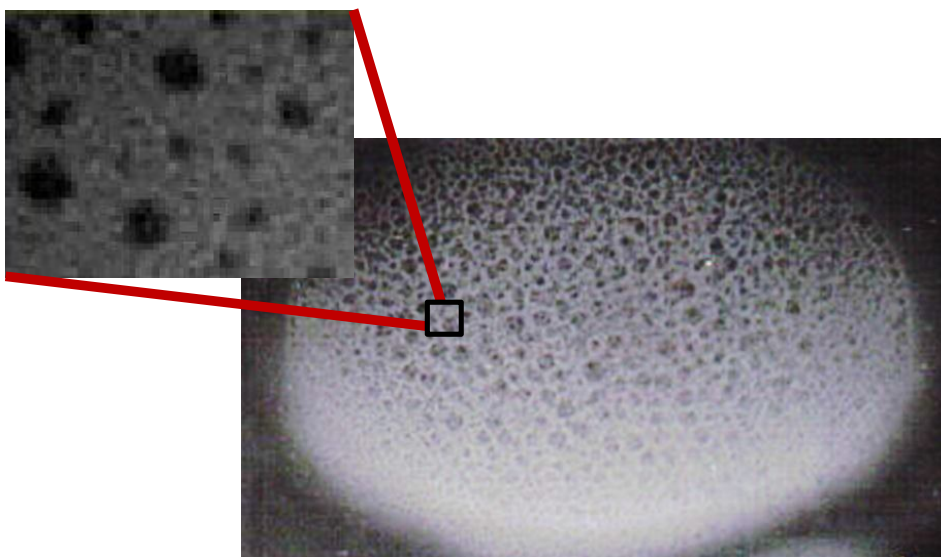


Fig. 58 Micelas mixtas micelas mixtas encapsuladas con clonazepam. 15,000 x. A la izquierda, micelas mixtas encapsuladas de 25 nm.

6.5.3.3 Morfología de micelas mixtas placebo.



Fig. 59 Vista de una micela mixta placebo de 20 nm. Se observa una región circular hidrófila al exterior, y al centro las colas hidrófobas del fosfolípido y la sal biliar.



Fig. 60 Región de micelas mixtas placebo. Se observa una agrupación de tamaño homogéneo que oscila entre 20-22 nm.

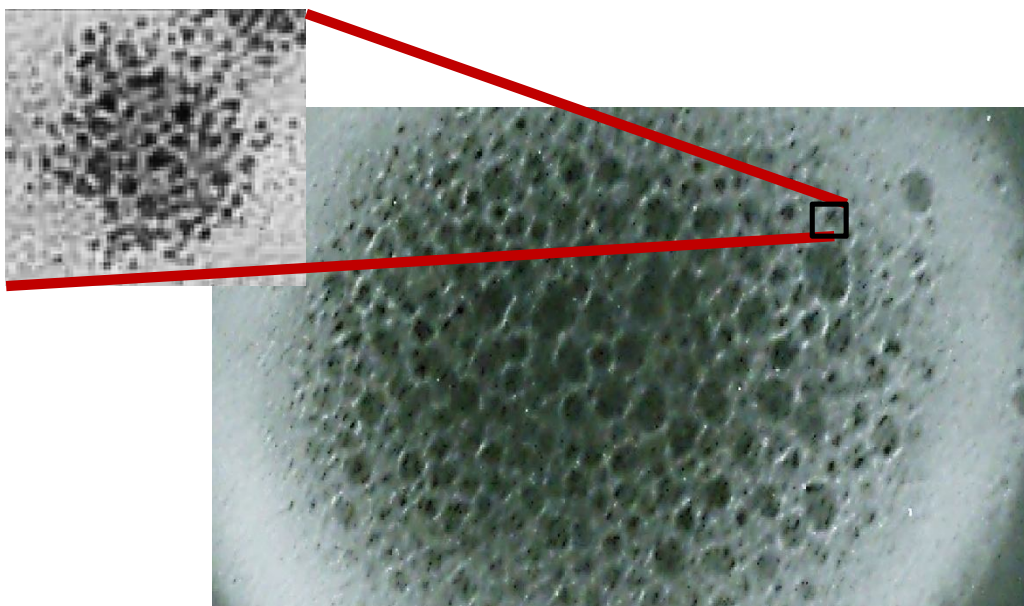


Fig. 61 En el centro una región circular formada por micelas mixtas placebo de tamaño homogéneo. A la izquierda, un acercamiento a 60, 000 x donde se observa una micela mixta de 20 nm.

Las figuras 56 a 58 muestran micrografías del acarreador lipídico encapsulado con clonazepam al 0.35% y micelas mixtas placebo preparadas por el método de precipitación.

De manera general, se observa que no existe una diferencia significativa entre el tamaño de partícula entre las micelas mixtas con fármaco encapsulado y las micelas que no

contienen clonazepam. Se observa también que las partículas presentan una forma esferoide, termodinámicamente estable y no hay una diferencia notable entre la forma de micelas mixta placebo y micelas mixtas encapsuladas con fármaco.

Los estudios realizados por Kawamura, et. al; indican que las micelas mixtas presentan una forma de disco con cara hidrófoba de las sales biliares orientada hacia el interior de la micela y la cara hidrófila dirigida hacia el disolvente (Fig. 45). Tal modelo está de acuerdo con la morfología que presentan las micelas mixtas placebo y encapsuladas y concuerda con el estudio de fluorescencia de sondas solubilizadas en el interior de agregados micelares realizada por Jover et, al., el cual describe que fármacos liposolubles se encuentran embebidos dentro de la matriz de la partícula como se observa en el acercamiento realizado en la figura xx a micelas mixtas encapsuladas con clonazepam.

Por otro lado se comprueba lo descrito por Coello, et. al, quien menciona que los componentes de los agregados micelares se orientan alternativamente hacia arriba y hacia abajo. Dos grupos carboxílicos deben estar orientados en la misma dirección, la ubicación de un contraión (normalmente Na⁺) entre dos grupos carboxilato permite reducir las repulsiones electrostáticas, como se muestra en la siguiente figura:

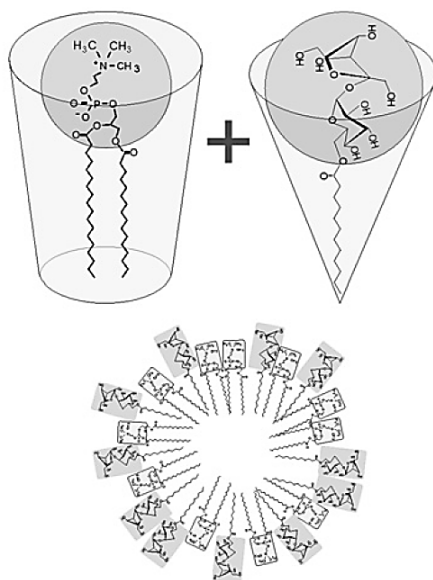


Fig. 60 Asociación micelar formada por el glicocolato de sodio y L- α Fosfatidilcolina. Se observa la formación de una partícula discoide, que responde a la morfología observada en las micrografías obtenidas.

Se presenta entonces, una capa de fosfatidilcolina cuando esta es dispersada con dímeros de sal biliar formando el cuerpo del disco mientras que un anillo de sales biliares rodean el perímetro del cuerpo micelar y reduce la exposición de la cadena hidrocarbonada a la solución acuosa donde están suspendidas.

En la figura 59 y 61 se observa una región ovoide donde se encuentran juntas las micelas mixtas, rodeada por un borde que separa una región de otra. Esto se produce porque las micelas discoideas aumentan su tamaño de partícula cuando ya no hay suficiente sal biliar para estabilizar los bordes, entonces forma solo una capa lipídica y las micelas pasan a ser vesículas al disminuir el radio hidrodinámico. (Long, M. et. al., 1994)

Estudios realizados con SANS (difusión de neutrones a bajo ángulo) muestran que al preparar soluciones concentradas de fosfatidilcolina y sales biliares se obtienen agregados con forma de cilindros, no discos (Hjelm et al., 1988,1990, Long et al, 1994) en los cuales las moléculas de fosfatidilcolina se orientan de manera radial a lo largo de la interfase (Hjelm et al, 1992).

El tamaño y forma de la micela depende de las propiedades de las cadenas hidrocarbonadas, de esta forma, las micelas pueden ser esféricas, elipsoidales o similares a un disco plano (Bergethon, 1998), aunque la forma más común es la esférica.

El análisis morfológico de micelas mixtas por TEM confirma que éstas son estructuras estables, mantenidas por las fuerza hidrofóbicas de las cadenas hidrocarbonadas y las interacciones de las cabezas hidrofílicas con el agua. De las interacciones de las cadenas hidrocarbonatadas resulta la menor área posible de estas las que esté en contacto con el agua, quedando así el agua excluída del interior de éstas.

Se comprueba entonces que las micelas están estabilizadas por las interacciones no covalentes (predominantemente hidrofóbicas), lo cual le confiere tres consecuencias farmacológicamente significativas:

- 1) Presentan una tendencia inherente a ser extensas, favoreciendo una capacidad de carga de fármaco aceptable.

- 2) Se cierran sobre sí mismas, de manera que no existen bordes con cadenas hidrocarbonatadas expuestas, y por lo tanto, forman el compartimento donde el fármaco es transportado.

- 3) Son autosellantes, es decir; se cierra sobre sí misma estructura esférica que separa el compartimento interno del medio acuoso externo, esto impide la salida de fármaco. (Berg, 2008)

6.6 Estabilidad de micelas mixtas.

Una vez caracterizadas las micelas mixtas encapsuladas y placebo, resultó importante evaluar el tamaño de partícula y el potencial Z como una medida de posible cambio estructural reflejado en la estabilidad de la formulación a través del tiempo.

Se realizaron determinaciones de tamaño de partícula y potencial Z siguiendo la metodología mencionada en el apartado referente al desarrollo experimental, durante un mes, buscando indicios de agregación (aumento de tamaño de partícula) o disminución de potencial Z, indicadores de inestabilidad en el sistema.

6.6.1 Tamaño de partícula de micelas mixtas placebo a través del tiempo.

Los resultados referentes a la estabilidad de micelas mixtas placebo relacionados al tamaño de partícula, muestran que hay un aumento considerable en el diámetro de las partículas producto de una posible agregación molecular.

Tabla 31. Estabilidad de micelas mixtas placebo reflejada en el tamaño de partícula evaluado durante 31 días.

DÍA	Tamaño de partícula promedio (nm)	Error STD	Índice de polidispersión
1	20.59	0.13	0.241
3	19.53	0.11	0.283
5	21.38	0.05	0.294
7	25.48	0.1	0.281
11	26.28	0.07	0.298
13	26.4	0.16	0.297
15	27.53	0.14	0.315
17	29.52	0.09	0.398
19	24.83	0.15	0.384
21	39.5	0.31	0.345
23	45.6	0.19	0.356
25	56.7	0.17	0.314
27	65.5	0.15	0.312
29	70.37	0.14	0.432
31	72.49	0.4	0.412

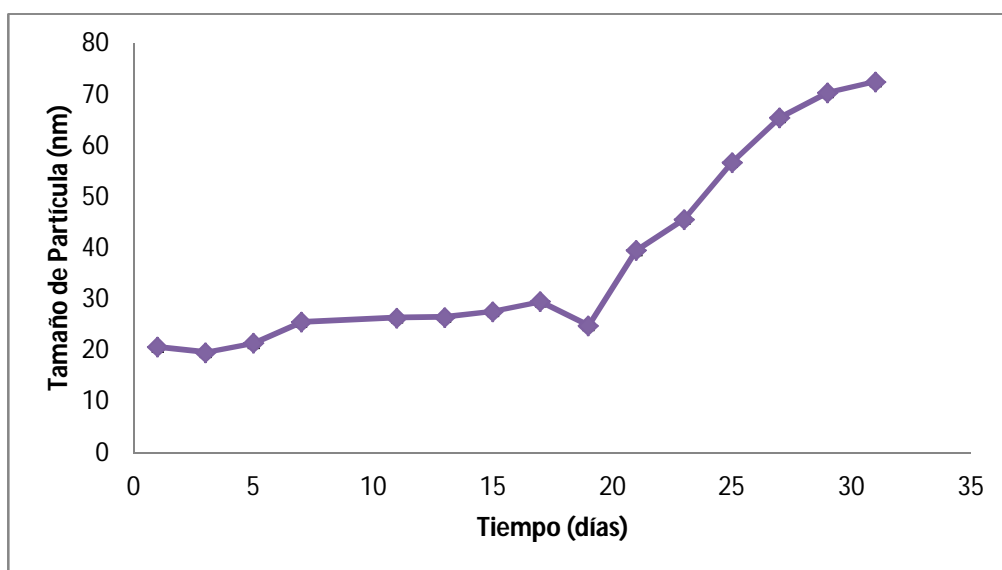


Fig. 62 Estabilidad de micelas mixtas placebo reflejada en el tamaño de partícula evaluado durante 31 días.

Como se describe en la figura 62, las micelas mixtas placebo aumentan su tamaño promedio alrededor de tres veces al ser mantenidas a 5°C durante 31 días. Cabe señalar que el índice de polispersión registrado nos habla de una homogeneidad entre las partículas, por lo cual se descarta la posibilidad de la formación de agregados o precipitación.

Es importante señalar que cada vez que se realizaron las determinaciones de tamaño de partícula, se filtró la suspensión de micelas por membrana de poro 0.22µm, lo cual favorece la reducción de diámetro de partícula y la ruptura de posibles agregados en suspensión. Así mismo, se registró la turbidez de la suspensión micelar con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos en el análisis de estabilidad. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 32. Resultados turbidimétricos de la estabilidad de micelas mixtas placebo.

Día	Turbidez
5	-
10	-
15	+
20	++
25	++
30	++

Escala: nada (-), poco (+), regular (++), mucho (+++)

De acuerdo a los resultados descritos en la tabla 28, las micelas mixtas no tienden a agregarse en un periodo de un mes, sin embargo, se presenta un aumento ligero en el tamaño de partícula, considerando lo anterior se puede decir que el sistema es estable a pH 6.5 y 5°C.

6.6.2 Tamaño de partícula de micelas mixtas encapsuladas con fármaco al 10.5% a través del tiempo.

Se realizaron determinaciones de tamaño de partícula a micelas mixtas encapsuladas con fármaco, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 33. Tamaño de partícula promedio de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35% a través del tiempo.

DÍA	Tamaño de Partícula Promedio (nm)	Error STD	Índice de Polidispersión
1	21.6	0.09	0.21
3	20.2	0.12	0.26
5	23.7	0.12	0.27
7	26.5	0.12	0.28
9	25.5	0.23	0.29
11	37.3	0.12	0.32
13	50.5	0.12	0.38
15	71.4	0.12	0.32
17	82.1	0.12	0.37
19	97.3	0.21	0.29
21	120.3	0.19	0.31
23	145.5	0.15	0.45
25	151.5	0.09	0.38
27	152.7	0.2	0.42
29	161.3	0.21	0.58
31	160.4	0.09	0.62

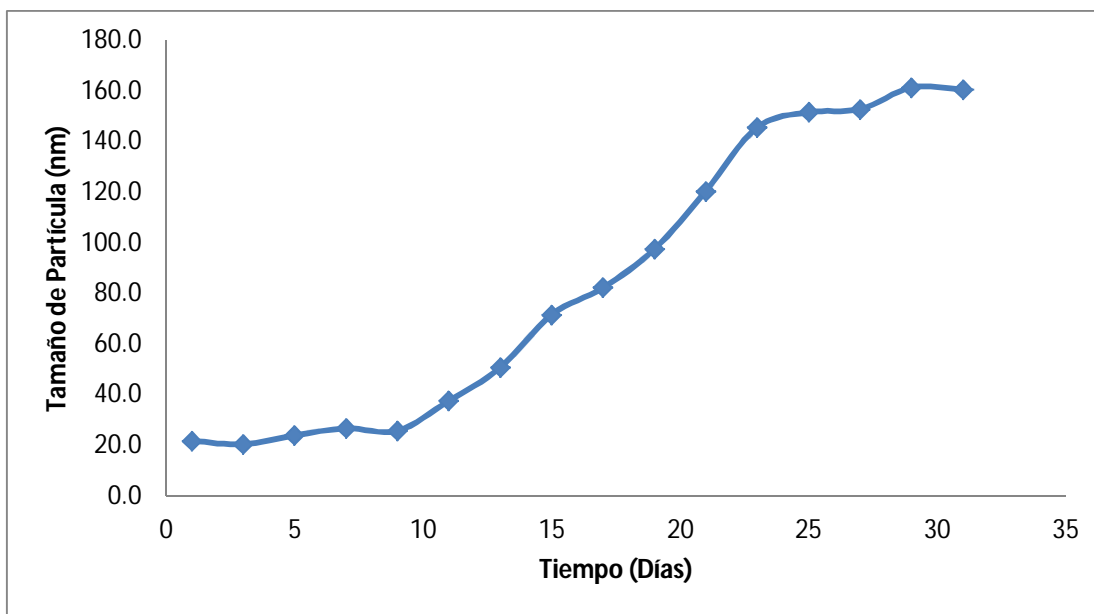


Fig.

63 Estabilidad de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5, durante 31 días.

Los resultados expuestos en la tabla 33 y en la figura 63 muestran que las micelas mixtas encapsuladas con clonazepam tienden a incrementar considerablemente su tamaño de partícula.

El índice de polidispersión reflejado en las diferentes determinaciones nos indica que el lote evaluado es homogéneo pese a haber aumentado el tamaño de partícula. Esto puede deberse al filtrado por membrana 0.22 μm que se realiza previo a cada medición. Normalmente, un aumento en el tamaño de partícula se atribuye a la formación de agregados provocada por una inestabilidad del sistema por factores como:

- Aumento en la concentración micelar crítica.
- Cambios de pH.

Cabe señalar que no todo el fármaco se encuentra encapsulado en las micelas mixtas, existe una fracción que se encuentra de forma libre en solución, cabe la posibilidad que estas partículas se encuentren formando agregados en el sistema.

Es importante considerar que al ser homogéneo el sistema, probablemente no existe una alta interacción entre las moléculas que forman a la micela y el fármaco, o exhiben propiedades diferentes inherentes a la molécula de cada tipo (interacciones entre grupos) que provoquen una asociación entre micelas y fármaco libre.

De manera general, a partir del día 20 el tamaño promedio de partícula muestra un aumento importante. Experimentalmente se observó la formación de precipitado en las formulaciones. A continuación se muestran los resultados:

Tabla 34. Resultados turbidimétricos de la estabilidad de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5%.

Día	Turbidez
5	-
10	-
15	+
20	++
25	+++
30	+++

Escala: nada (-), poco (+), regular (++) , mucho (+++)

Se puede proponer que la fracción dispersa de fármaco además de formar aglomerados en solución y sedimentar (precipitados), aumenta la concentración de fármaco en el medio disperso.

La micela mixta es mantenida por un mecanismo de estabilidad debido a la repulsión de cargas, pero el fármaco libre estaría disminuyendo la efectividad de la capa de Stern de ofrecer el mecanismo de estabilidad por cargas.

Las muestras que habían formado precipitado y que fueron filtradas resuspendían fácilmente pero al cabo de aproximadamente 3 minutos volvían a sedimentar, esto resultó ser un fenómeno irreversible.

6.6.3 Potencial Z de micelas mixtas placebo a través del tiempo.

Se realizaron determinaciones a un lote de micelas mixtas placebo durante 31 días, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 35. Potencial Z de micelas mixtas placebo en un periodo de 31 días.

Día	Potencial Z	Error STD
1	-36.17	0.15
3	-32.37	0.15
5	-34.43	0.19
7	-29.50	0.12
9	-35.40	0.23
11	-23.17	0.18
13	-20.30	0.12
15	-19.30	0.12
17	-18.50	0.06
19	-20.47	0.12
21	-19.26	0.19
23	-17.60	0.12
25	-19.34	0.15
27	-18.33	0.15
29	-19.40	0.06
31	-17.40	0.12

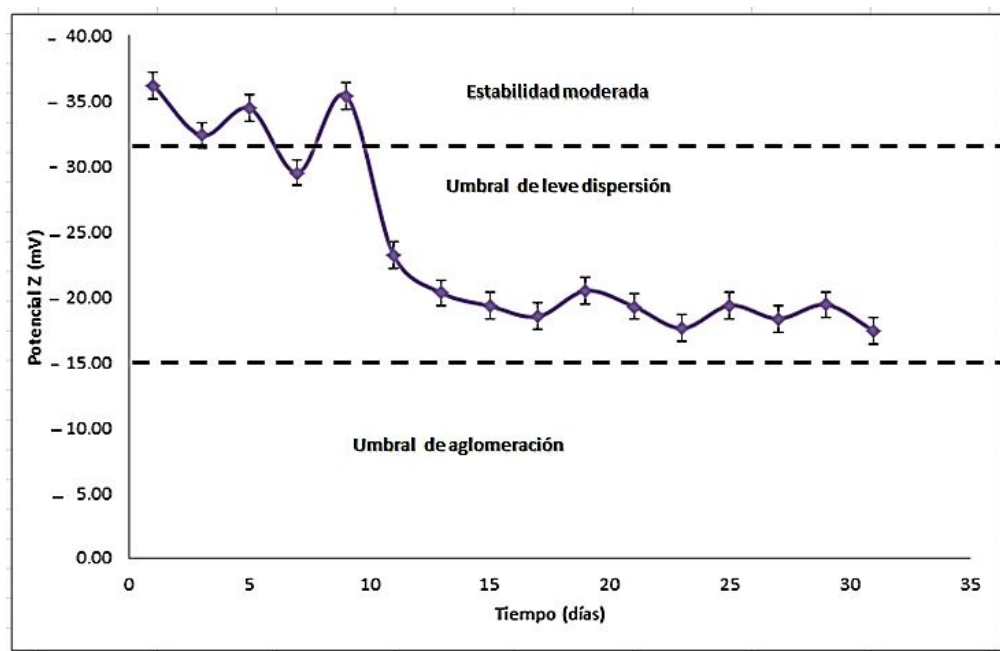


Fig. 64 Potencial Z de micelas mixtas placebo en un periodo de 31 días.

De acuerdo a los resultados de la fig. 35 y la tabla 64, las micelas mixtas placebo mantienen un potencial Z que determina una estabilidad moderada en suspensión, resultado que concuerda con la determinación de tamaño de partícula, donde no se presenta la presencia de aglomerados.

Pese a aumentar el tamaño de partícula de las micelas mixtas placebo, el sistema se mantiene con una estabilidad moderada durante un mes, por lo cual se descarta la posibilidad de una agregación micelar considerable.

6.6.4 Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35 % a través del tiempo.

Como se demostró anteriormente, las micelas mixtas placebo no presentan asociación entre las partículas producto de una disminución en el potencial Z. Sin embargo, las micelas mixtas encapsuladas con clonazepam si presentan una aglomeración después de las dos primeras semanas de haber sido preparadas y mantenidas a 5°C como se muestra a continuación:

Tabla 36. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 10.5 % a través del tiempo.

Día	Potencial Z	Error STD
1	-40.03	0.07
3	-37.63	0.18
5	-36.53	0.09
7	-36.47	0.23
9	-40.07	0.15
11	-35.60	1.95
13	-29.15	0.13
15	-25.70	0.06
17	-22.27	0.09
19	-18.23	0.12
21	-17.73	0.12
23	-15.45	0.08
25	-13.61	0.06
27	-11.44	0.08
29	-10.33	0.06
31	-8.46	0.08

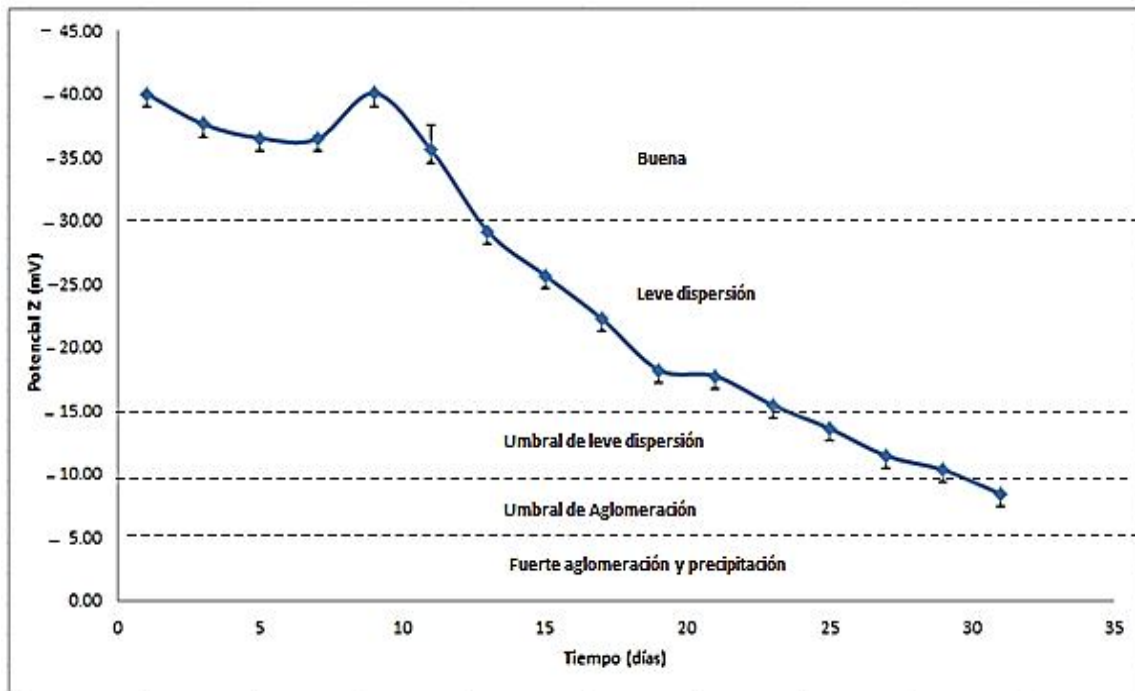


Figura 65. Potencial Z de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam al 0.35 % a través del tiempo.

De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, las micelas mixtas encapsuladas con fármaco presentan una buena estabilidad durante los 15 primeros días posteriores a

su preparación. Sin embargo, a partir del día 25 se presenta una aglomeración entre las partículas, pese a ser filtradas las muestras antes de las mediciones.

Los resultados descritos en la figura 57 concuerdan con los resultados del análisis cualitativo donde se observa a simple vista la presencia de agregados, por lo tanto aumenta también el tamaño de partícula.

6.7 Determinación del porcentaje de clonazepam encapsulado en micelas mixtas.

6.7.1 Aplicación de cromatografía de exclusión molecular en la separación de fármaco libre y micelas mixtas conteniendo clonazepam.

Al encapsular el fármaco en las micelas mixtas, se propone que una fracción de clonazepam se encuentra libre en suspensión y otra se encuentra encapsulada. Resulta entonces necesario separar esta fracción de fármaco libre, para facilitar la cuantificación exacta de fármaco encapsulado en micelas mixtas y la administración vía oral como se menciona en el apartado referente a evaluación *in vivo*.

Bloois et, al. reporta la cuantificación de clonazepam en micelas mixtas separando la fracción de fármaco libre mediante ultracentrifugación, especificando realizar la separación a 13,000 rpm durante 5 minutos.

Sin embargo, al realizar la separación mediante ultracentrifugación se presentaron resultados poco exactos de porcentaje de fármaco encapsulado, ya que no se logró recuperar todo el clonazepam contenido en el acarreador lipídico, por la posible ruptura de estructuras micelares.

Fue necesario entonces recurrir a la cromatografía de exclusión molecular, este método también conocido como filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas en función de su tamaño.

En la técnica propuesta, la fase estacionaria es un gel que se introduce en una columna que sirve como soporte comatográfico. Este gel está constituido por partículas esféricas que tienen poros de tamaño determinado.

Las moléculas de tamaño pequeño difunden a través de los poros de las partículas de gel y por ello son retardadas en su paso por la columna. Las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas de gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se conoce como “volumen vacío” de la columna. Se dice entonces que son excluidas en gel.

Se consideraron los siguientes parámetros:

1. Intervalo de Fraccionamiento: como valores externos (máximo y mínimo) de poros moleculares entre los cuales el gel tiene capacidad de separar. Sabiendo que las micelas mixtas encapsuladas con fármaco tienen un tamaño promedio de 22 nm.
2. Volumen de elución: El volumen necesario para eluir las micelas mixtas de la columna.
3. Volumen de Exclusión: Volumen al que eluyen las micelas mixtas.

Un gel es una red tridimensional cuya estructura está entrecruzada al azar como se muestra en la siguiente figura:

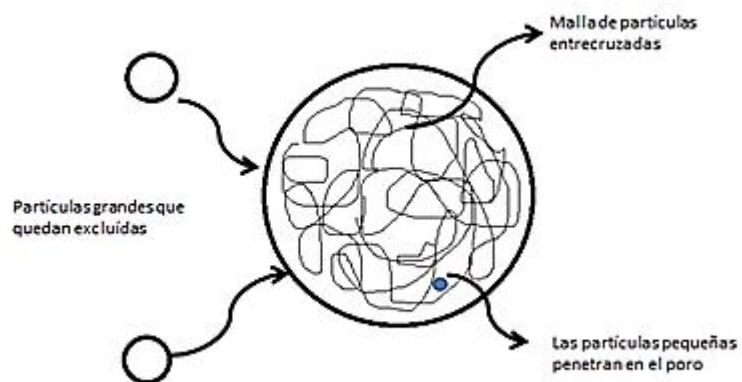


Fig. 66 Estructura de gel para cromatografía de exclusión molecular.

Los gels normalmente utilizados son de tres tipos:

1. Dextrano.
2. Agarosa.
3. Poliacrilamida.

El gel de dextrano (polímero ramificado) se comercializa con el nombre de Sephadex, existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos entre 1 y 20000 Daltons. Esos geles se identifican con una denominación de 6-10 hasta 6-200 lo que se refiere a la capacidad de retención del agua del gel multiplicada por 10. Para fines de esta investigación se realizó Sephadex G 10 con las siguientes características:

Tabla 37. Características del Sephadex G-10

Tipo	P.M. Límite de Fracción	Agua Retenida	Volumen de gel hidratado mg/g de gel seco
G-10	Hasta 700 polisacáridos	1.0 g/g de gel seco	2

Una vez analizadas las propiedades fisicoquímicas del clonazepam y su peso molecular (315.715 g/mol), se deduce que las micelas mixtas encapsuladas serán las primeras en eluir, logrando así su separación del fármaco libre en suspensión.

Por otro lado, la naturaleza anfipática de las micelas mixtas y su peso molecular mayor, posibilitan ocupen el segundo lugar en el orden de elución.

De acuerdo a la metodología descrita en el apartado referente a filtración en gel, se sugiere que las columnas conteniendo suspensión micelar se centrifuguen con la finalidad de lograr una rápida separación de micelas y fármaco libre.

Para comprobar la hipótesis planteada acerca de la separación de fármaco libre y micelas mixtas encapsuladas con fármaco se determinó la velocidad de centrifugación y número de centrifugaciones necesarias para separar el clonazepam libre de las micelas mixtas. Los pasos a seguir se ilustran en la siguiente figura:

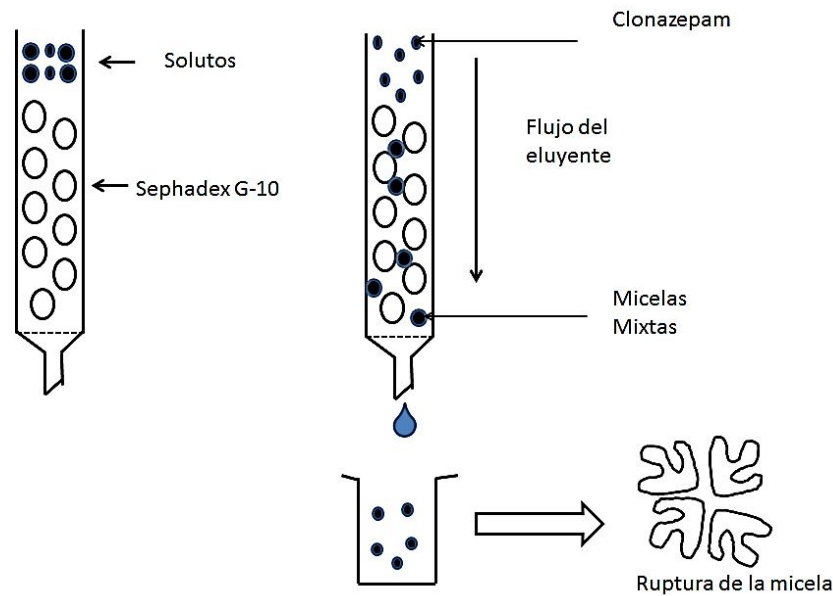


Fig. 67 Proceso de filtración en gel para Micelas Mixtas de Clonazepam.

Como se ilustra en la figura 66 una vez que la micela es filtrada se lleva a cabo la ruptura de la misma para liberar el fármaco encapsulado y cuantificarlo por HPLC. Las pruebas preliminares para la detección de la señal analítica se realizaron mediante espectrofotometría UV y se comprobaron por HPLC.

Para llevar a cabo la ruptura de las estructuras micelares y liberar el fármaco contenido en ellas se utilizó solución metanol-cloroformo al 1%, sabiendo que la 1- α Fosfatidilcolina y el glicocolato de sodio son muy solubles en esta mezcla de disolventes.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado de metodología referente a filtración en gel para micelas mixtas con clonazepam, se prepararon 8 muestras de las cuales se tomaron 500 μ L, centrifugando a distintas revoluciones por minuto hasta observar alguna señal de Clonazepam.

Se determinó identificar las condiciones espectrofotométricas y cromatográficas en las cuales no se presentara señal analítica de clonazepam, una vez que se recibe la señal del fármaco se infiere que este ya fue excluido de la columna y que no se trata de fármaco encapsulado sino de fármaco libre.

El fármaco encapsulado en las micelas mixtas es excluido dentro de la micela y no presenta ningún tipo de señal en forma de absorbancia o área bajo la curva, ya que se encuentra embebido dentro de la matriz del acarreador lipídico.

Tabla 38. Resultados obtenidos para la optimización del método de filtración en gel, Detección por UV.

Número de Ciclos	Muestra	Absorbancias		
		1	2	3
1 Ciclo	1	0.0057	0.0059	0.0051
1Ciclo	2	0.0069	0.0079	0.0078
2 Ciclos	3	0.0016	0.0015	0.0018
2 Ciclos	4	0.0020	0.0022	0.0023
3 Ciclos	5	0.0659	0.0659	0.0689
3 Ciclos	6	0.0668	0.0673	0.0687
4 Ciclos	7	0.1014	0.1057	0.1045
4Ciclos	8	0.1011	0.1036	0.1047

Por otro lado, se prepararon muestras para ser detectadas por HPLC comprobando los resultados obtenidos por espectrofotometría, como se describen en la siguiente tabla:

Tabla 39. Resultados obtenidos para la optimización del método de filtración en gel, detección por HPLC.

Número de ciclos	Tiempo	Observaciones
1 Ciclo	60s	No se observa señal correspondiente a la presencia de Clonazepam en la muestra filtrada.
2 Ciclos	120s	No se observa señal correspondiente a la presencia de Clonazepam en la muestra filtrada.
3 Ciclos	180s	Se observa señal analítica de Clonazepam. Tiempo de retención: 4.155 min. Área bajo la curva: 641,023.42
4Ciclos	24 s	Se observa señal analítica de Clonazepam. Tiempo de retención: 4.115 minutos. Área bajo la curva: 1,703,471.63

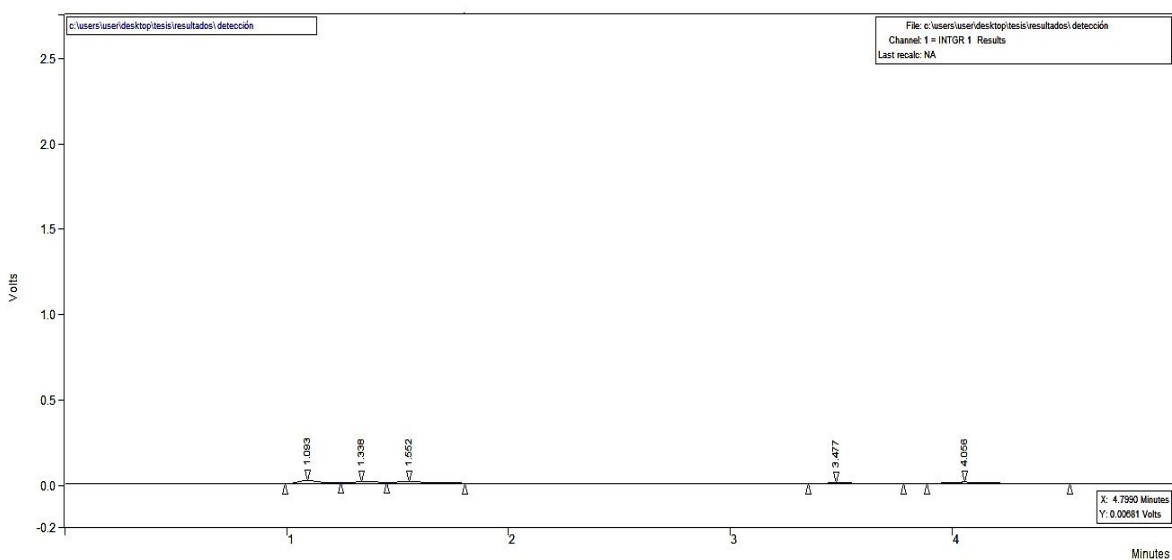


Fig. 68 Cromatograma que muestra la ausencia de señal de fármaco en la muestra centrifugada a 1500 rpm durante 120 segundos.

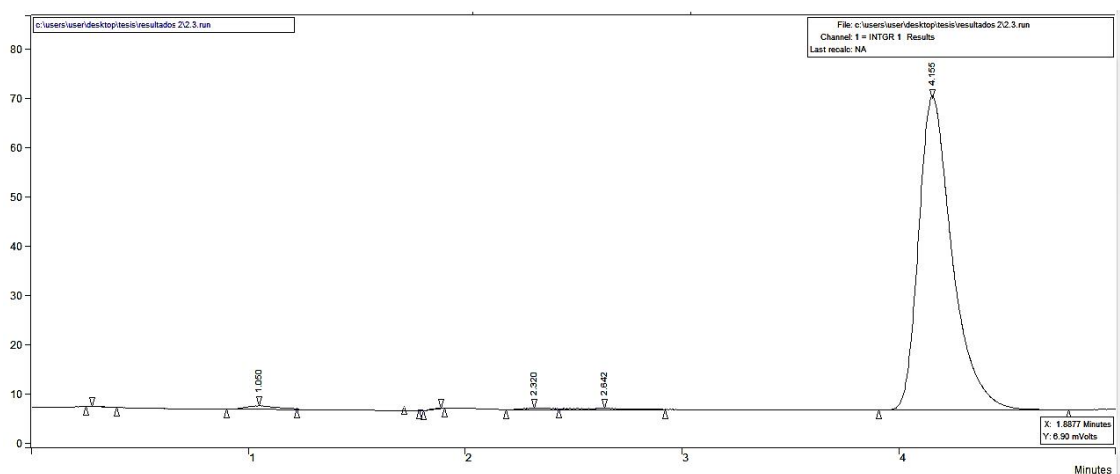


Fig. 69 Cromatograma que muestra la señal de fármaco en la muestra centrifugada a 1500 rpm durante 180 segundos.

Se concluyó que las condiciones de tratamiento de la muestra son 1500 rpm durante 2 ciclos de 60 segundos. Al realizar las determinaciones bajo estas condiciones a una longitud de onda de 310 nm, no se observa señal del clonazepam, las micelas son filtradas y el fármaco es retenido en la columna.

Una vez determinadas las condiciones de separación del fármaco, se procedió a desarrollar un método para cuantificar el clonazepam encapsulado en las micelas mixtas.

6.7.2 Validación de método analítico para la cuantificación de fármaco contenido en micelas mixtas.

Debido a la alta sensibilidad de los métodos cromatográficos y a la naturaleza lipofílica del Clonazepam se utilizó un método con HPLC fase reversa para llevar a cabo la cuantificación de Clonazepam encapsulado en micelas mixtas, sabiendo que éste se encontraría en solución al momento de romper la estructura micelar posterior a la cromatografía de exclusión.

En la USP se reporta que para llevar a cabo la cuantificación de Clonazepam en una forma farmacéutica sólida se debe preparar un sistema cromatográfico como se enuncia a continuación:

Cromatógrafo de líquidos con un detector UV

Longitud de onda: 254 nm

Columna L7 de 4.6 mm x 15 cm.

Velocidad de Flujo: 1ml/min

Fase Móvil: Mezcla filtrada y desgasificada de Solución Amortiguadora, Metanol y Tetrahidrofurano en una proporción (60:52:13).

La Solución Búffer debe ser de Amonio a un pH de 8.

Diluyente: debe utilizarse una mezcla de Agua:Metanol:Tetrahidrofurano (60:52:13).

Inicialmente se realizó la cuantificación reproduciendo el método farmacopéico. Sin embargo, se observó que la presión en el cromatógrafo era demasiado alta para llevar a cabo la cuantificación y la respuesta analítica manifestaba un tiempo de retención de 6 minutos.

Para dar solución al problema anterior se decidió utilizar un método que no involucrara tetrahidrofurano en la fase móvil ni en la solución amortiguadora.

De acuerdo a lo propuesto por M.A. Hammad y Muller, se determinó que a 310 nm, se puede llevar a cabo la cuantificación de Clonazepam, utilizando una fase móvil Agua-acetonitrilo (55:45 v/v) con un flujo de 1ml/min y una columna C-18 de tamaño de poro de 5µm, 150 mm de largo y 4.6 mm de ancho.

La solución diluyente consistió de una mezcla de Búffer de Amoniac de pH=8 y Acetonitrilo (55:45 v/v), la columna utilizada fue una X-Terra C-18 RP.

Al reproducir estas condiciones se obtuvieron respuestas analíticas con un tiempo de retención promedio de 3.8 min.

Una vez filtrada la micela, esta se destruye con una solución de metanol-Cloroformo al 1% y se libera el clonazepam, del cual se toma una muestra que es llevada a volumen con solución diluyente, para ser inyectado. De esta manera, el Clonazepam será eluido rápidamente ya que es de polaridad baja. Se utiliza un Búffer de Amonio de pH=8 para asegurar que la molécula se encuentre en su forma no ionizada y sea capaz de mantenerse estable en solución.

6.7.2.1 Linealidad y precisión del sistema

Se preparó una curva estándar como se describe en el apartado referente a metodología para preparación de curva de calibración para la cuantificación de clonazepam.

Tabla 40. Resultados de los cromatogramas correspondientes a los puntos referentes a la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam.

Concentración µg/mL	Área bajo la curva	Tiempo de Retención	Área bajo la curva/concentración
2.408	308291.51	3.221	128028.04
4.816	616463.33	3.335	128003.18
7.224	913662.27	3.359	126475.95
9.632	1221183.44	3.257	126783.99
12.04	1512515.94	3.421	125624.25
14.448	1849791.66	3.356	128030.98
		Promedio	127157.73
		Desviación STD	1018.91
		Coefficiente de variación	0.801

Cabe señalar que la curva estándar se realizó por sextuplicado, los resultados expresados de área bajo la curva son el resultado promedio de las seis curvas de calibración

reproducidas, donde se obtiene un coeficiente de variación menor a 2%, lo cual es indicador estadístico de precisión en el sistema.

Por otro lado, la linealidad del sistema quedó demostrada al realizar análisis de regresión lineal a la curva de calibración preparada, siendo el factor de correlación lineal muy cercano a la unidad $r^2=0.9997$, como se describe a continuación:

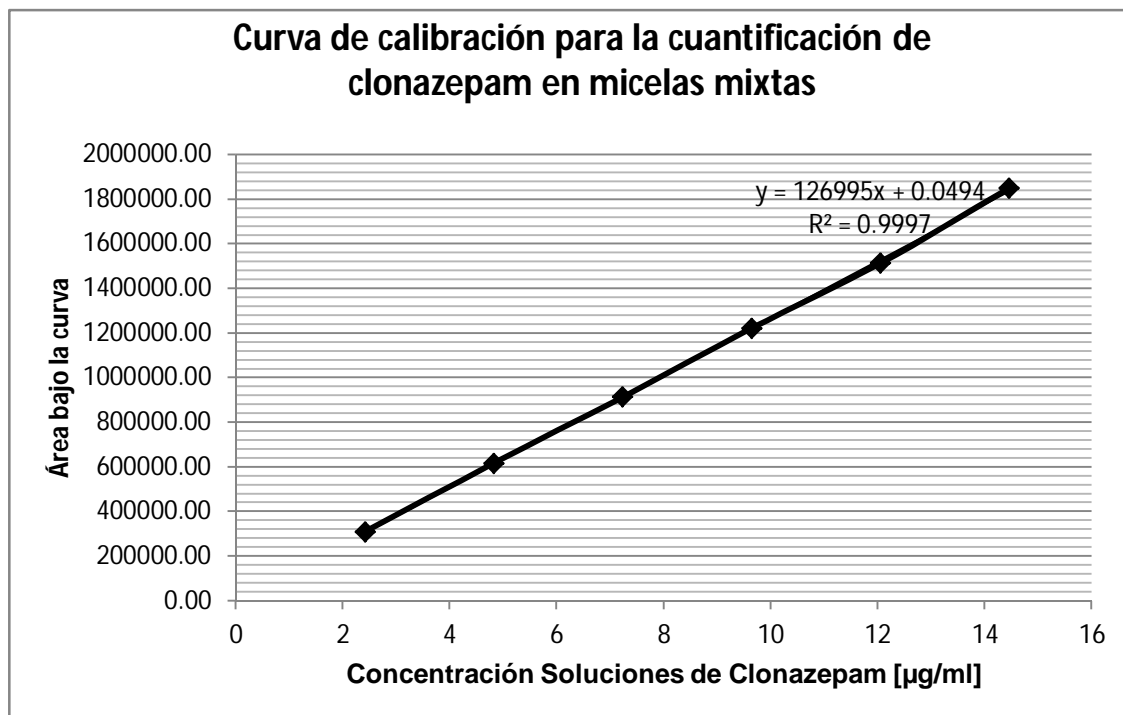


Fig. 70 Curva de calibración para la cuantificación de clonazepam contenido en micelas mixtas.

En la siguiente figura se presentan los cromatogramas correspondientes a los puntos que conforman a la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam en micelas mixtas.

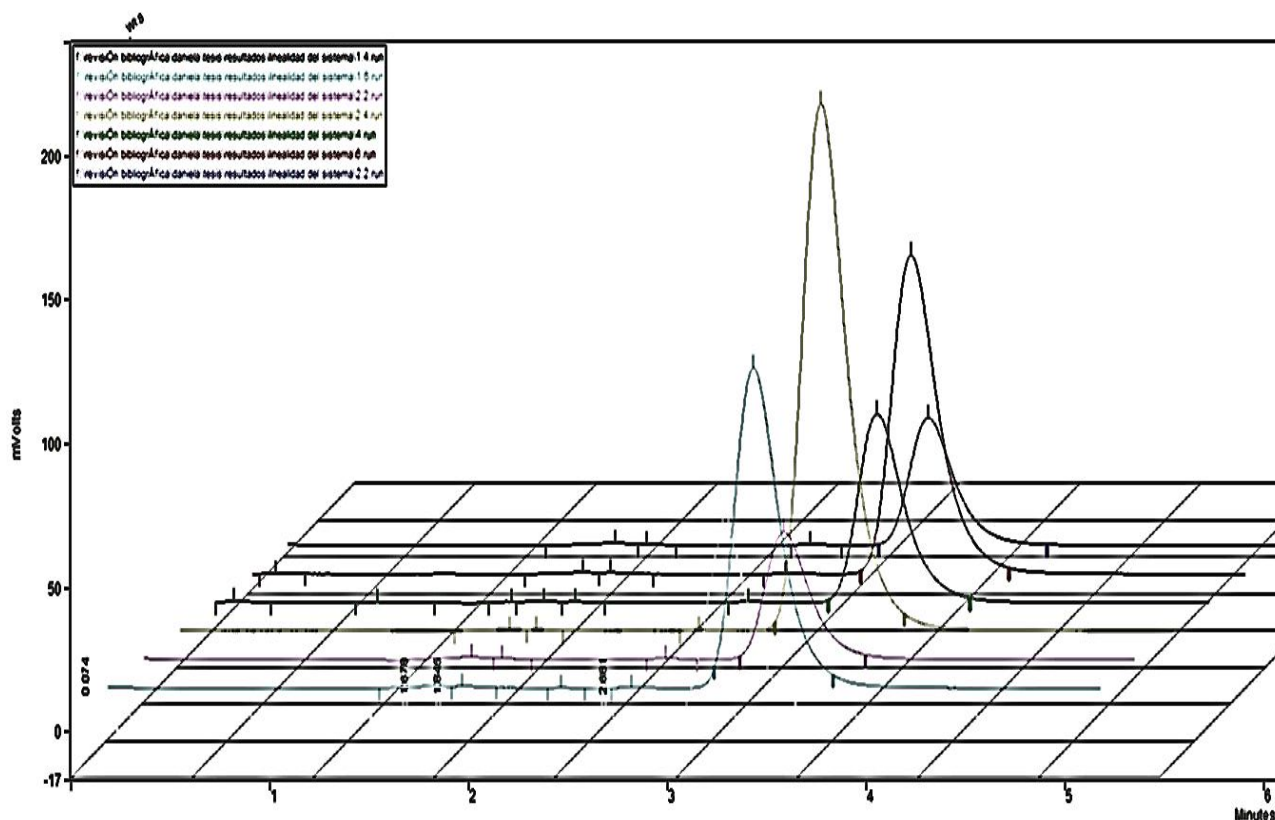


Fig. 71 Cromatogramas correspondientes a la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam.

6.7.2.2 Límite de detección.

Es la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por el método analítico propuestos,

$$LD = 3.3(1819.91/126995)$$

Límite de detección: 0.048 µg/mL

De acuerdo al límite de detección calculado, la cuantificación de clonazepam se realiza de manera confiable, al no presentarse ningún tipo de señal analítica por parte del blanco utilizado (solución diluyente).

6.7.2.3 Límite de cuantificación

Se realizó el cálculo del límite de cuantificación de método de acuerdo a lo

$$L.C.= 10(1819.91/126995)$$

Límite de detección: 0.143 µg/mL

El resultado anterior expresa la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que podría discriminarse de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente. Tanto el límite de detección como el límite de cuantificación nos permiten determinar que bajo las condiciones experimentales propuestas para la determinación de clonazepam contenido en micelas mixtas, el analito será detectado y cuantificado de manera confiable.

6.7.2.4 Especificidad del método.

Para demostrar la especificidad del método de cuantificación de clonazepam en micelas mixtas prepararon muestras placebo, y se siguió el método de cuantificación de fármaco en micelas mixtas, desde el proceso de filtración hasta la detección por HPLC, buscando alguna señal que pudiera interferir con el área bajo la curva de clonazepam. El proceso se llevó a cabo por triplicado. En la siguiente figura se muestra un cromatograma correspondiente a una muestra placebo de micelas mixtas. No se observa ninguna señal de interferencia de los componentes lipídicos en el tiempo de retención donde aparece la señal analítica de clonazepam.

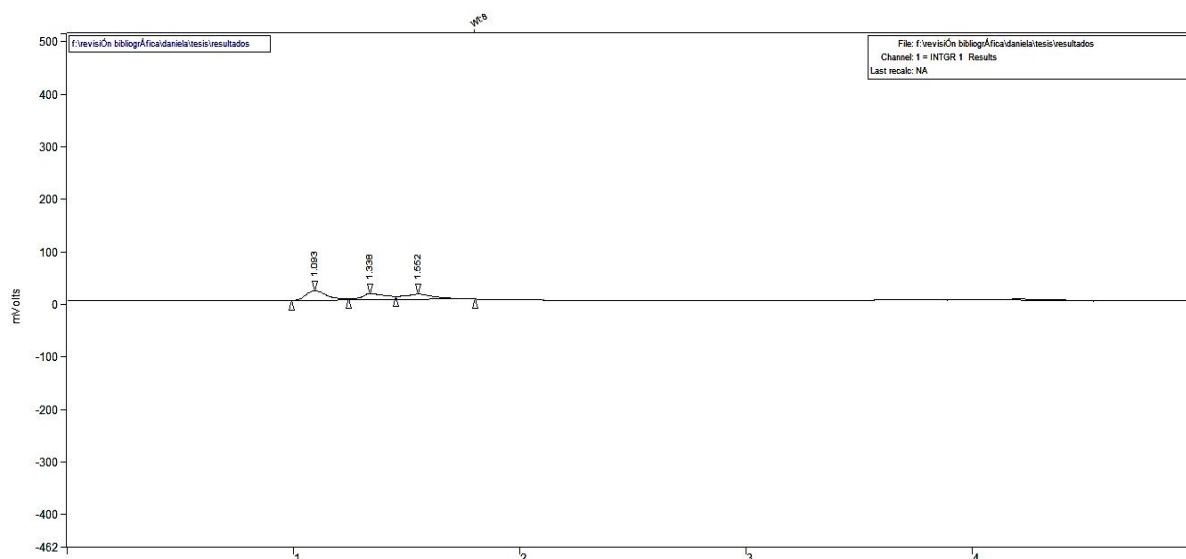


Fig. 72 Cromatograma de análisis de especificidad del método.

Por otro lado, se observa en la figura 69 que la curva de calibración para la cuantificación de clonazepam tiene intercepto en 0.04, lo cual estadísticamente indica que no hay presencia de interferencias en el sistema.

6.7.2.5 Determinación cuantitativa de clonazepam contenido en micelas mixtas.

Se determinó la cantidad de fármaco contenido en las micelas mixtas por medio de HPLC, para establecer una concentración para la administración y la evaluación in vivo. Después se procedió a calcular la eficiencia de encapsulamiento, las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

Ecuación 1. Porcentaje de fármaco encapsulado.

$$\% \text{ Clonazepam cargado en micelas mixtas} = \frac{\text{Cantidad de fármaco encapsulado (mg)}}{\text{cantidad de micelas mixtas (mg)}} \times 100$$

Ecuación 2. Eficiencia de encapsulamiento.

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento} = \frac{\% \text{ de fármaco encapsulado}}{\% \text{ de fármaco inicial}} \times 100$$

Siguiendo la metodología correspondiente se analizaron muestras de micelas mixtas encapsuladas con clonazepam. Una vez separado el fármaco libre y liberado el clonazepam contenido en la estructura micelar, se llevó a cabo la detección de la señal analítica de clonazepam como se muestra a continuación:

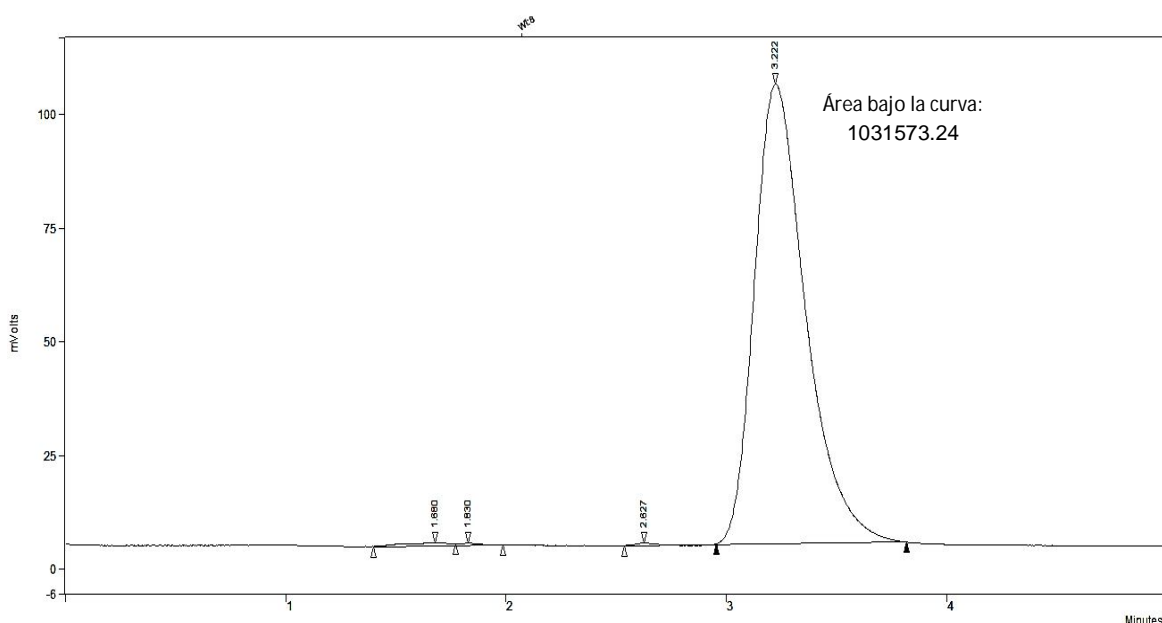


Fig. 73 Cromatograma que muestra la señal de clonazepam contenido en micelas mixtas.

La respuesta analítica (área bajo la curva) es interpolada en la curva estándar para estimar el resultado de concentración, se multiplica por el factor de dilución y se obtiene el resultado de fármaco contenido en micelas mixtas expresado en mg por ml de suspensión.

$$\text{Interpolación de clonazepam en suspensión} = \frac{\text{Área bajo la curva} - 0.0494}{126995}$$

$$\text{Sustituyendo el área obtenida en la ecuación} = \frac{1031573.24 - 0.0494}{126995} = 8.1229 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Concentración Interpolada} = 8.1229 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Factor de dilución (5 ml)/(0.3 ml)} = 16.66 \text{ ml}$$

$$\text{Concentración de clonazepam en suspensión micelar} = \frac{8.1229 \mu\text{g} * 5 \text{ mL}}{\text{ml} * 0.3 \text{ mL}} = 0.1353 \text{ mg de clonazepam/ ml}$$

$$\text{Clonazepam cargado en micelas mixtas} = \frac{0.1353 \text{ mg}}{38.21 \text{ mg}} * 100 = 0.35 \%$$

$$\text{Eficiencia de Encapsulamiento} = \frac{0.1353 \text{ g de clonazepam encapsulados}}{1.2821 \text{ g de clonazepam inicial}} * 100 = 10.55\%$$

De la misma manera que se ilustra en el ejemplo anterior, se prepararon tres lotes de micelas mixtas, y se realizó la determinación por triplicado para garantizar que el método de cuantificación fuera reproducible. Todos los lotes fueron preparados con la siguiente formulación:

COMPONENTE	CANTIDAD	PORCENTAJE
Clonazepam	1 mg	2.50%
L- α Fosfatidilcolina	23.7 mg	59.38%
Glicocolato de Sodio	15.21 mg	38.11%
Total	39.91 mg	100 %

Tabla 41. Determinación de clonazepam encapsulado.

Lote	Concentración de clonazepam encapsulado $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de clonazepam encapsulado (%)	Eficiencia de Encapsulamiento (%)
1	0.1353	0.35	10.6
1	0.1385	0.36	10.8
1	0.1348	0.35	10.5
Promedio	0.136	0.353	10.63
Error STD	0.001	0.00	0.09
2	0.1259	0.33	9.81
2	0.1247	0.33	9.72
2	0.1278	0.33	10
Promedio	0.13	0.33	9.84
Error STD	0.001	0.00	0.08
3	0.1321	0.35	10.3
3	0.1342	0.35	10.5
3	0.1356	0.36	10.6
Promedio	0.13	0.35	10.47
Error STD	0.001	0.00	0.09

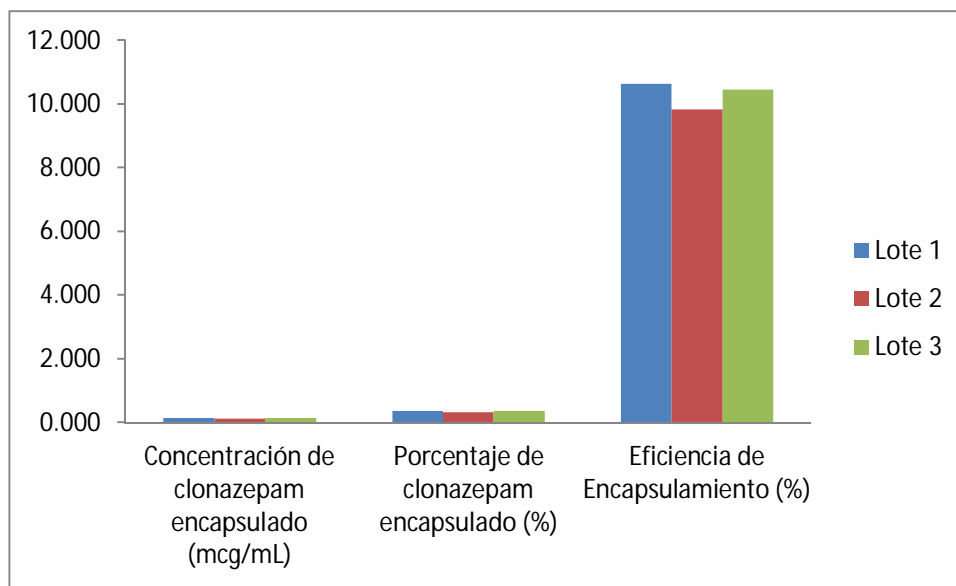


Fig. 74 Gráfica de determinación de clonazepam contenido en tres lotes de micelas mixtas.

Se observa que el porcentaje de encapsulamiento determinado referido como % p/p es considerado según la cantidad inicial de clonazepam puesta en la formulación, y es distinto a la eficiencia de encapsulamiento.

La figura 72 muestra que no hay una diferencia significativa entre los resultados referentes a la determinación de clonazepam contenido en los tres lotes evaluados de micelas mixtas.

Letellier, P. et. al., y Mayafre, A., refieren que una de las desventajas principales de los acarreadores lipídicos es su retransformación estructural al momento de evaporar los disolventes orgánicos y recristalizar en fase sólida, se plantea que en los proceso de obtención de acarreadores lipídicos de talla submicrónica el componente lipídico (que no es completamente puro, comúnmente suele ser una mezcla de diversos constituyentes grasos) cristaliza en una forma termodinámicamente no estable. De esta manera, se podría estar presentando la fuga de fármaco y una disminución en la cantidad de clonazepam encapsulado. Se observa que al cuantificar clonazepam en diferentes lotes de micelas mixtas únicamente se logró retener entre 0.12 y 0.13 mg de clonazepam, la ventaja que se puede tomar de este tipo de fármacos es su alta potencia de acción terapéutica, ya que la mayoría de las formulaciones disponibles comercialmente se encuentra en cantidades de 0.5 a 1 mg.

6.7.2.6 Precisión del método analítico.

Con la finalidad de determinar la precisión del método analítico, se prepararon seis muestras de micelas mixtas a las que se les determinó el contenido de clonazepam, siguiendo el método analítico antes señalado, los resultados fueron los siguientes.

Tabla 42. Contenido de clonazepam en micelas mixtas.

Muestra	Área bajo la curva	Tiempo de retención	Concentración de clonazepam encapsulado (mcg/mL)	Concentración/Área bajo la curva
1	1032571.36	3.412	8.13	127007.5474
2	1031475.12	3.516	8.12	127028.9557
3	1033329.14	3.218	8.14	126944.6118
4	1032560.41	3.315	8.13	127006.2005
5	1032126.17	3.437	8.13	126952.7884
6	1032458.23	3.519	8.13	126993.6322
		Promedio	8.13	126988.96
		Desviación STD	0.006	33.28
		Coefficiente de variación	0.078	0.026

Se observa que el método analítico utilizado resulta ser preciso al no observarse un coeficiente de variación mayor al 2%

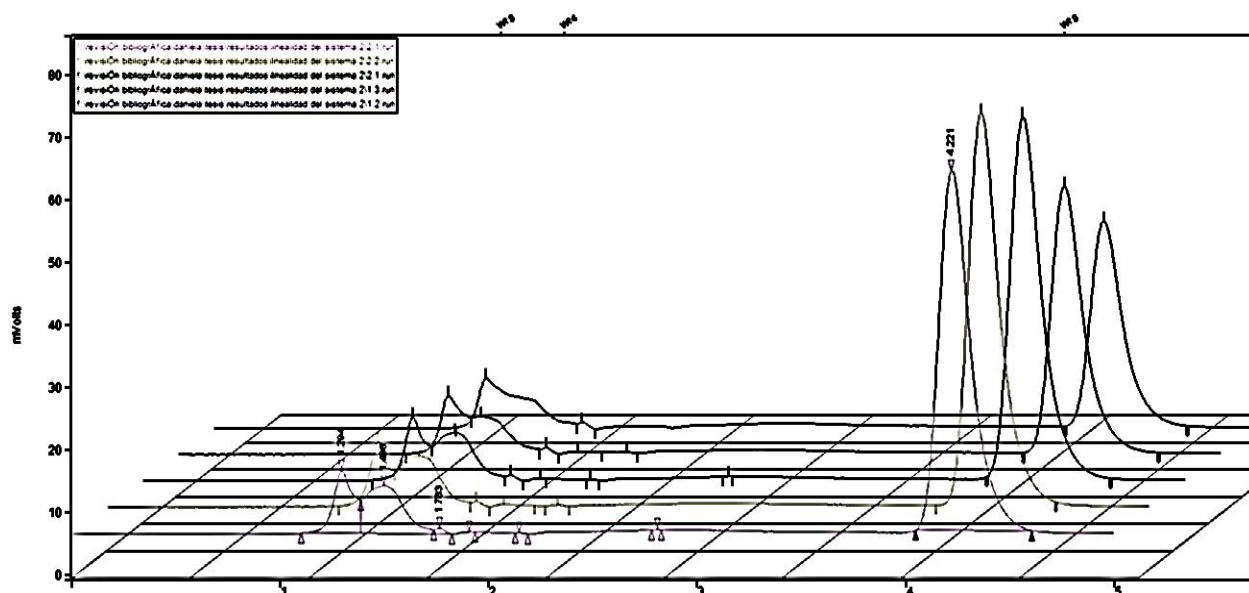



Fig. 75 Cromatogramas correspondientes a la cuantificación de clonazepam en micelas mixtas.

6.8 Evaluación in vivo.

La evaluación del efecto anticonvulsivante de las micelas mixtas conteniendo el clonazepam se realizó mediante el modelo de inducción de crisis convulsivas que consiste en la administración de Pentilentetrazol y medición de la latencia a cada una de las crisis convulsivas.

El principal indicativo de un efecto anticonvulsivo en este modelo es el registro de un aumento en el tiempo en el que se presentan las crisis convulsivas, las cuales se caracterizan por un comportamiento específico que es observado en el animal.

Descripción del comportamiento del ratón al inducir crisis epilépticas con PTZ.

Crisis Epiléptica		Descripción
Crisis Mioclónica		<p>Crisis anterior a la Generalizada. Es una manifestación del status generalizado no tónico-clónico.</p> <p>Durante este estadio se presentan movimientos rítmicos focales y multifocales.</p> <p>No hay alteración de la conciencia. Consiste en contracciones musculares repetidas y breves de extremidades.</p> <p>En los ratones se observa mediante movimientos rápidos e involuntarios en orejas y patas.</p> <p>Se observa una conducta de sobresalto y nerviosismo.</p>
Crisis Generalizada		<p>Es el segundo tipo más frecuente de Status Epiléptico. Las crisis generalmente se originan en las áreas motoras del lóbulo frontal.</p> <p>Se caracteriza por crisis somatomotoras y mioclonias que involucran la extremidad contralateral.</p> <p>Existe un aumento marcado de la actividad motora con movimientos violentos.</p> <p>Su duración es de aproximadamente dos minutos.</p>

Crisis Tónico- Clónica



Se caracteriza por contracciones musculares sostenidas y de corta duración.

Las extremidades se tensan y ocurre la abducción de las patas.

Se observa una crisis de ausencia, en la que hay pérdida de conciencia y se produce la muerte del animal.

Este estadio es de corta duración, se presenta a

La evaluación del acarreador lipídico conteniendo al clonazepam se realizó administrando dosis tres veces por debajo de la dosis terapéutica (1-1.5 mg/kg), suponiendo que las micelas mixtas mejorarían el paso del clonazepam a través de la barrera hematoencefálica y por lo tanto se observaría un efecto semejante al terapéutico a una dosis menor.

Cabe señalar que las crisis convulsivas son inducidas por la administración de PTZ vía intraperitoneal en una dosis de 80mg/Kg, ya que es a esta dosis que el agente químico presenta su mayor potencia al inducir convulsiones en ratones (Luszczki, et., al. 2006).

6.8.1 Evaluación de latencia a la crisis convulsiva por género.

Uno de los factores más importantes a considerar en la evaluación del efecto producido por un fármaco es la variabilidad biológica, y el sexo de los sujetos de investigación. Por ello fue necesario realizar un análisis de actividad convulsiva a ratones machos y hembras de 30 a 35 g de peso, a los cuales se les administró PTZ en una dosis de 80 mg/kg de peso vía I.P., observándose que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la latencia a las crisis dependiente del sexo de los animales utilizados en la experimentación, como se muestra en la siguiente gráfica.

Tabla 43. Evaluación de controles por género.

Sexo	Latencia promedio a la crisis mioclónica (min)	Latencia promedio crisis generalizada (min)	Latencia promedio a crisis tónica (min)
Machos	0.81	0.93	4.93
Hembras	0.78	1.32	2.93

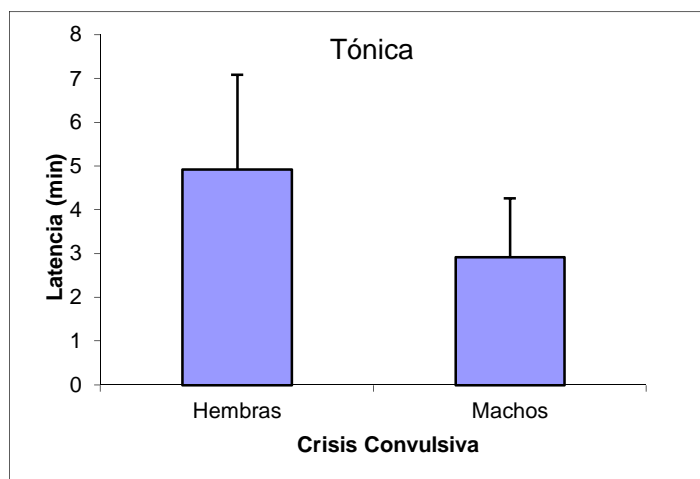
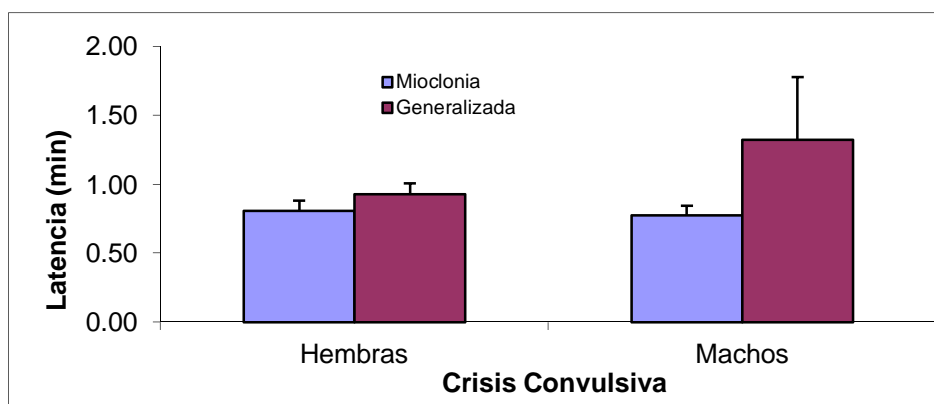


Fig. 76. Evaluación de latencia a crisis convulsivas por género.

Se realizó un análisis estadístico aplicando una prueba t-student obteniéndose los siguientes resultados:

t = 0.419 11 g.l., P = 0.683	Crisis mioclónica
t = -0.920 11 g.l., P = 0.377	Crisis generalizada
t = 0.753 11 g.l., P = 0.467	Crisis tónica

Se concluye que no hay una diferencia significativa entre los resultados de latencia a las crisis convulsivas dependiente del sexo, por lo tanto se utilizaron ratones machos y hembras indistintamente para llevar a cabo la experimentación.

6.8.2 Evaluación in vivo de micelas mixtas placebo.

Se evaluó el efecto producido por micelas mixtas placebo a una dosis de 0.3 mg/Kg de peso en ratones hembra de 30-35 g de peso a los cuales se les administró PTZ treinta minutos después de administrado el tratamiento.

Los resultados obtenidos de la latencia a las crisis convulsivas muestran que no hay diferencia significativa entre el lote control y el lote administrado con micelas mixtas placebo, en las crisis mioclónicas y generalizadas, por lo cual se infiere que el acarreador lipídico sin fármaco no presenta ningún tipo de efecto que retrase la latencia a las crisis convulsivas.

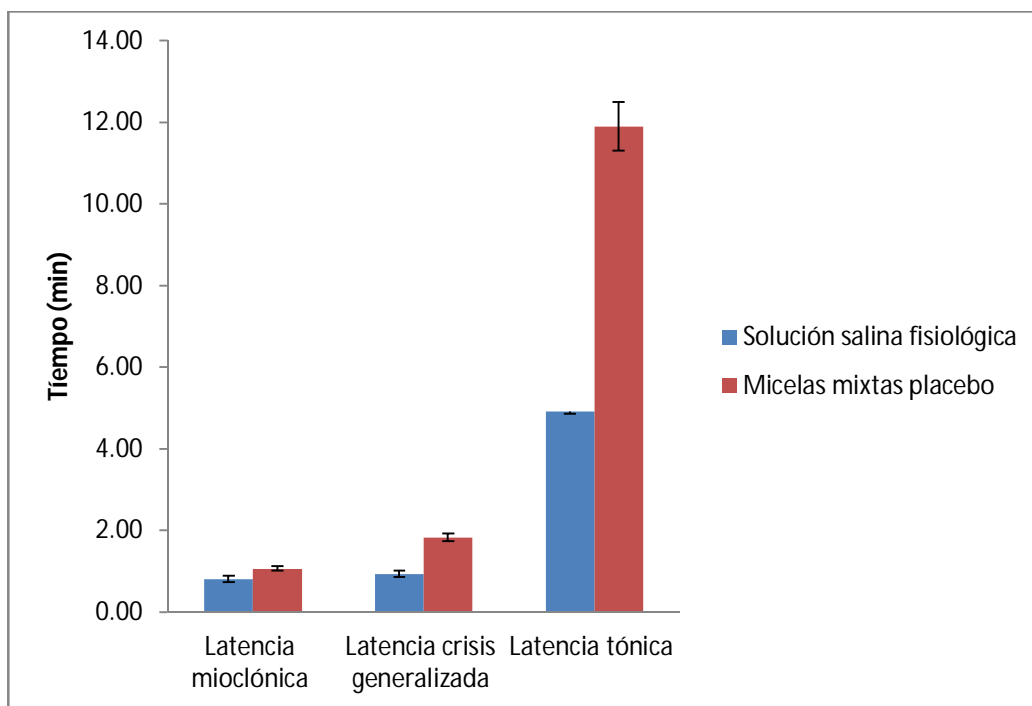


Fig. 77 Evaluación de latencia a las crisis convulsivas producidas en el lote administrado con micelas mixtas placebo y lote control administrado con SSF.

En la figura 77 se observa que en la latencia a presentar la crisis tónica es mayor en el grupo administrado con micelas mixtas, para tener un resultado más exacto se realizó una prueba estadística t-student en la cual se comprobó que no hay diferencia significativa entre la latencia a la crisis mioclónica y generalizada entre el grupo control y el grupo administrado con micelas mixtas placebo. Sin embargo, se afirma con un 95% de

confianza que hay una diferencia estadísticamente significativa a la latencia a la crisis tónica producida por la administración de micelas mixtas placebo.

Prueba t-student para evaluar diferencia entre el grupo administrado con micelas mixtas y el grupo control administrado con SSF.

Latencia mioclónica	t=2.145, 12 g.l., (P=0.053)	No hay diferencia significativa
Latencia Crisis generalizada	t=1.753, 12g.l. (P=0.0105)	No hay diferencia significativa
	t=2.262, 12g.l.,(P=0.043)	No hay diferencia significativa

El lote administrado con micelas mixtas placebo observa una mayor latencia a la crisis tónica. Para que se presente una crisis epiléptica, debe ocurrir una descarga eléctrica brusca en un grupo neuronal, provocada por una despolarización intensa de la membrana. En el caso del lote control, no hay ningún tipo de agente inhibidor que evite o merme la salida brusca de iones, la pérdida de esta inhibición o una excitación exagerada induce una expansión de la descarga hacia el tronco cerebral dando lugar a crisis generalizadas y a una pérdida de conciencia. A su vez, desde el tronco se induce una retroalimentación excitatoria del foco cortical, manifestándose así una latencia corta a la presencia de cada una de las crisis epilépticas.

La evaluación a cada uno de los lotes se realizó durante 30 minutos, observándose que todos los animales administrados murieron después de haber presentado la crisis epiléptica tónica.

En el caso del lote administrado con micelas mixtas placebo, se observa una mayor latencia a la crisis tónica comparada con la que presenta el lote control administrado con SSF.

Es importante considerar que la l- α fosfatidilcolina es un componente presente en la formulación que promueve la producción de colina en el cerebro, el cual es componente principal de la membrana celular, y estimula los procesos sinápticos. Este fosfolípido podría estar funcionando como neuroprotector que retrasa unos segundos la crisis tónica pero no la evita. (Hoft J.T., 1996)

6.8.3 Evaluación dosis-respuesta.

Para la evaluación del potencial uso de clonazepam encapsulado en micelas mixtas en las crisis convulsivas, se administró la formulación a dosis menores a la dosis terapéutica administrada para la forma farmacéutica convencional, de acuerdo a la metodología señalada en el apartado referente a administración para la evaluación in vivo.

Para contrastar el efecto producido por fármaco contenido en el acarreador lipídico se una solución acuosa de clonazepam m.p. vía oral en las mismas dosis que fueron administradas las micelas mixtas cargadas con clonazepam.

Es importante mencionar que las micelas mixtas fueron filtradas para eliminar el fármaco libre y solo administrar el fármaco contenido en el acarreador lipídico y que los lotes evaluados fueron conformados por seis ratones cada uno.

Se realizó la evaluación de la latencia a las crisis mioclónicas, generalizadas y tónico clónicas al administrar dosis de clonazepam encapsulado en micelas mixtas en dosis de .01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg en ratones *Swiss webster*, realizando una comparación con el lote control al cual le fue administrada SSF a las mismas dosis, el lote blanco al que se le administraron micelas mixtas placebo. Para tener una mayor aproximación de los resultados obtenidos se evaluó el efecto producido por el clonazepam clásico vía oral, para ello se preparó una dispersión de clonazepam m.p. en agua a pH= 7, la cual fue administrada a las mismas dosis a las que se administró el fármaco encapsulado en micelas mixtas.

6.8.3.1 Evaluación de latencia a la crisis mioclónica.

Tabla 44. Resultados latencia a la crisis mioclónica.

Dosis	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
Clonazepam clásico	1.56 min	1.68 min	1.8 min	30 min (no se presenta muerte del animal)
Micelas mixtas encapsuladas con clonazepam	1.16 min	1.27 min	1.9 min	30 min (no se presenta la muerte del animal)
Lote control SSF	0.81 min	0.71 min	0.93 min	0.48 min
Micelas mixtas placebo.	1.02 min	1.07 min	1.15 min	1.21 min

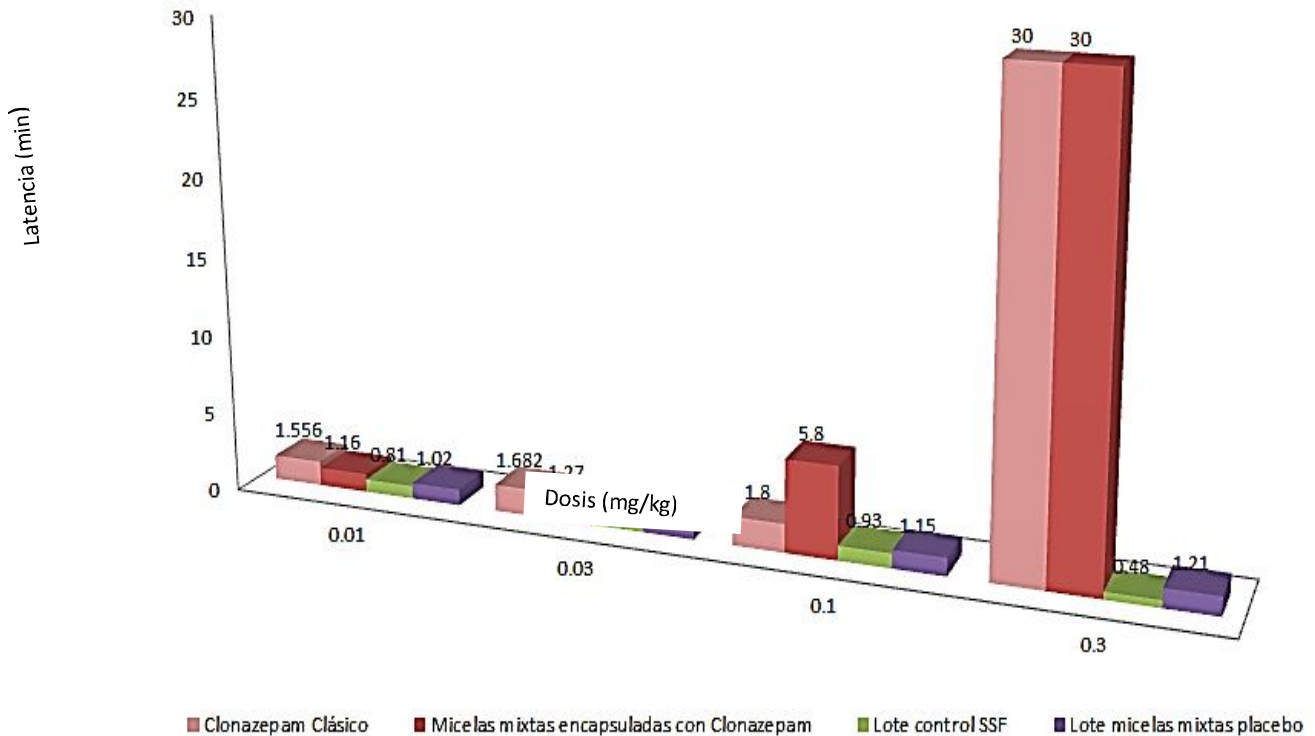


Figura 78. Evaluación de la latencia a crisis mioclónica mediante el modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.

Los resultados de la latencia a la crisis mioclónica a las dosis de 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, y 0.1 mg/kg muestran que el clonazepam clásico administrado vía oral resulta ser relativamente más eficaz que el tratamiento con clonazepam encapsulado en micelas mixtas, al observarse una mayor latencia a la crisis. Sin embargo al realizar una comparación con los lotes control, la diferencia entre la latencia a las miclonias no resulta ser estadísticamente significativa.

Por otro lado, al administrar clonazepam encapsulado en micelas mixtas a una dosis de 0.1 mg/kg, se presenta un efecto anticonvulsivante más prolongado al verse retrasada la latencia a la crisis mioclónica en comparación con el tratamiento clásico.

Finalmente al administrar clonazepam nanoencapsulado en una dosis de 0.3 mg/kg la latencia a la crisis micolónica se prolonga hasta por 30 minutos que dura la evaluación e incluso no se observa la presencia de movimientos rítmicos focales.

Se puede decir que el clonazepam encapsulado en micelas mixtas produce un mayor efecto anticonvulsivante a las crisis mioclónicas al ser administrado a una dosis de 0.1 mg/kg en comparación con el clonazepam clásico. Presentándose una mayor latencia a las miclonias a una dosis diez veces menor a la dosis terapéutica de la forma farmacéutica convencional.

6.8.3.2 Evaluación de latencia a la crisis generalizada.

Tabla 45. Resultados latencia a la crisis generalizada.

Dosis	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
Clonazepam clásico	7.4 min	7.5 min	7.9 min	30 min (no se presenta muerte del animal)
Micelas mixtas encapsuladas con clonazepam	8.04 min	10.7 min	30 min (no se presenta la muerte del animal)	30 min (no se presenta la muerte del animal)
Lote control SSF	0.83 min	0.93 min	1.3 min	1.2 min
Micelas mixtas placebo.	1.53 min	1.73 min	1.89 min	2.13 min

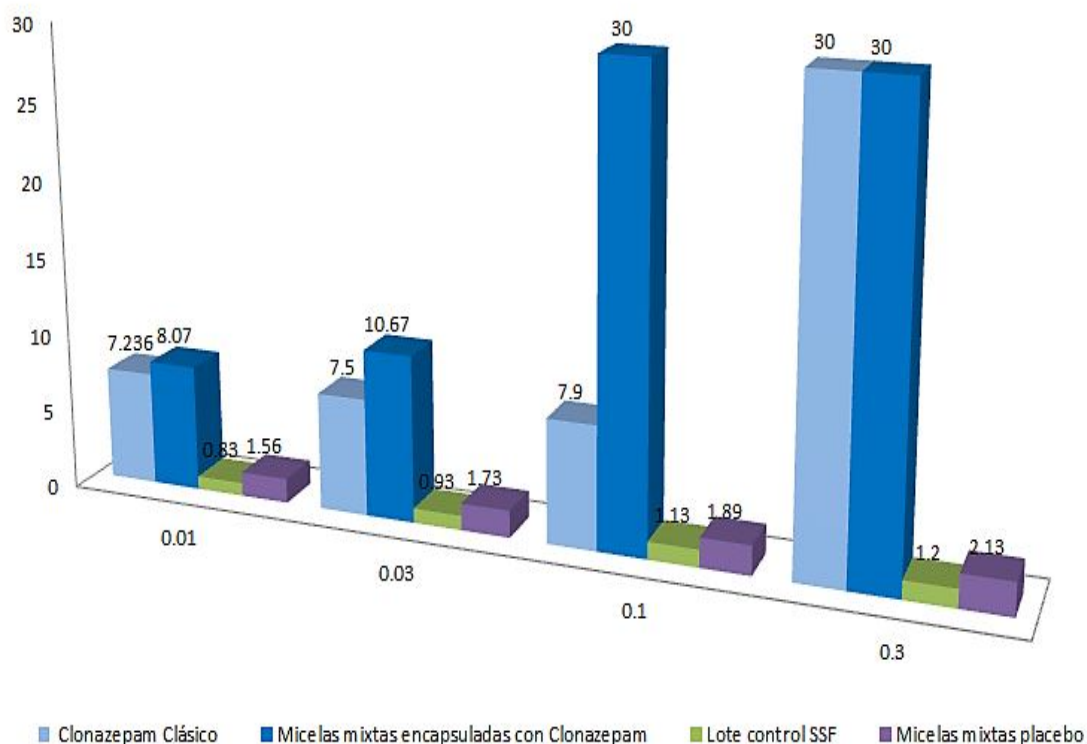


Fig. 79 Evaluación de la latencia a la crisis generalizada mediante el modelo de crisis convulsivas inducido por PTZ.

La figura 79 muestra que en el lote administrado con clonazepam a partir de una dosis de 0.01 mg/kg observó una mayor latencia a la crisis generalizada comparado con el lote administrado con clonazepam clásico.

Se presenta también un aumento en la latencia a la crisis generalizada, al administrar el tratamiento de clonazepam contenido en micelas mixtas a una dosis de 0.03 mg/kg en comparación con el clonazepam clásico. Es importante mencionar que el tiempo que dura la actividad motora característica de las crisis generalizadas en los ratones se ve disminuida en el lote administrado con el fármaco contenido en el acarreado lipídico a la dosis antes mencionada.

Se puede decir que se hay un efecto anticonvulsivante atenuado al administrar el fármaco contenido en el acarreador lipídico a una dosis diez veces menor que la dosis terapéutica indicada para la forma farmacéutica convencional, los biológicos administrados con clonazepam encapsulado en micelas mixtas a una dosis de 0.1 mg/kg no presentan pérdida de consciencia, ni muerte al final de la evaluación.

Al administrar clonazepam encapsulado en el acarreador lipídico a una dosis de 0.1 mg/kg no se presentan las crisis convulsivas generalizadas en los animales evaluados. Se promueve la llegada del fármaco a su lugar de acción debido al tamaño y composición de las micelas mixtas que lo contienen, aumentando su absorción intestinal y su paso por la barrera hematoencefálica, potenciando así la acción GABAérgica al inhibirse los canales de Na⁺, reduciéndose las descargas eléctricas que provocan la crisis generalizada

6.8.3.3 Evaluación de latencia a crisis tónico-clónicas.

Tabla 46. Latencia a crisis tónico-clónicas.

Dosis	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
Clonazepam clásico	12.81 min	30 min	30 min (no se presenta muerte del animal)	30 min (no se presenta muerte del animal)
Micelas mixtas encapsuladas con clonazepam	16.4 min	30 min	30 min (no se presenta muerte del animal)	30 min (no se presenta la muerte del animal)
Lote control SSF	3.6 min	4.9 min	5.8 min	7.3 min
Micelas mixtas placebo.	11.12 min	11.92 min	13.12 min	14.5 min

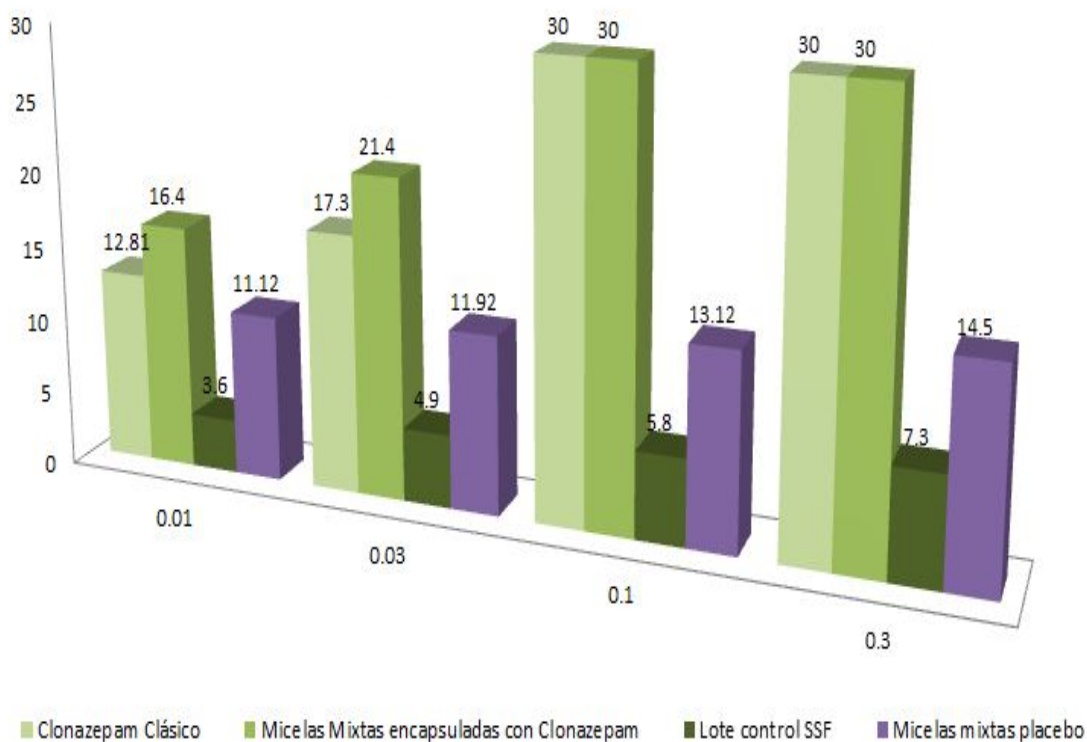


Fig. 80 Evaluación de la latencia a la crisis tónico-clónica mediante el modelo de crisis convulsivas inducido por PTZ.

Se observa que al administrar clonazepam encapsulado en micelas mixtas se presenta un efecto anticonvulsivante atenuado en las crisis convulsivas clónico-tónicas, comparado con el clonazepam clásico.

Como se describe en las figuras 67 y 68, el lote administrado con clonazepam contenido en micelas mixtas a un dosis de 0.1 mg/kg presenta una mayor efecto anticonvulsivante respecto al clonazepam clásico. Los biológicos que recibieron la administración de clonazepam a dosis de 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg no presentan crisis generalizadas ni tónico-clónicas.

No se produjo la muerte ni pérdida de consciencia bajo la administración de clonazepam encapsulado en micelas mixtas a partir de una dosis de 0.1 mg/kg de peso.

6.8.3.4 Efecto anticonvulsivante de clonazepam encapsulado en micelas mixtas comparado con el efecto producido con la administración de clonazepam convencional.

De acuerdo a los resultados referentes a la evaluación *in vivo* del efecto anticonvulsivante de clonazepam encapsulado en micelas mixtas, se puede decir que el fármaco produce un mayor efecto al ser administrado contenido en el acarreador lipídico en una dosis de 0.1 mg/kg.

El fármaco ejerce su mayor potencia farmacológica al ser administrado encapsulado en micelas mixtas a una dosis diez veces menor que la dosis terapéutica señalada para la forma farmacéutica convencional y cuando es administrado en su forma clásica en una dosis de 0.3 mg/kg, evidenciando que las micelas mixtas resultan tener un potencial uso como transportador submicrónico de fármaco.

En las figuras 67 y 68 puede observarse como también las micelas mixtas con clonazepam a una dosis de 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg presentan su mayor efecto anticonvulsivante y evitan la muerte que sucede a las crisis clónico tónicas.

Se puede observar también en la figura 66 que cuando se administraron micelas mixtas con clonazepam a dosis de 0.01 y 0.03 mg/kg se logró un efecto que retardó la crisis mioclónica logrando un efecto anticonvulsivante, pero no fue sostenido.

Por otro lado, a dosis de 0.01 y 0.03 mg/kg el lote administrado con la dispersión acuosa de clonazepam y el lote administrado con micelas mixtas que contienen fármaco presentan una latencia a las crisis convulsivas mioclónicas similar al del lote control, a partir de lo cual puede decir que no existe un efecto atenuado en las crisis mioclónicas cuando el fármaco es administrado de esta manera, aún si el efecto registrado correspondiera a un efecto efectivamente anticonvulsivo, significaría que el clonazepam es absorbido por su forma no ionizada.

6.8.3.5 Ruta que siguen el clonazepam contenido en micelas mixtas para ejercer su efecto farmacológico.

Todos los resultados analizados muestran que el clonazepam encapsulado en micelas mixtas al ser administrado vía oral a una dosis de 0.1 mg/kg muestra un efecto anticonvulsivante atenuado comparado con el clonazepam administrado en su forma clásica, infiriéndose así el potencial uso de micelas mixtas como transportadores de fármacos.

Se podría decir que el fármaco llega al cerebro debido a la composición de su acarreado y al tamaño de partícula que promueven su absorción en intestino y su paso a través de la barrera hematoencefálica. (Hildebrand et al., 2004).

Resulta indispensable conocer el comportamiento del sistema frente a tensoactivos naturales como las sales biliares. Se propone que una vez que ingresa en el organismo por la boca, las micelas mixtas se encuentran con enzimas como la amilasa y la lipasa lingual, sin embargo, el corto tiempo de residencia prácticamente impide que ejerzan alguna acción sobre la misma.

En el estómago, por el contrario, se enfrenta a una gran dilución debida a la secreción de ácido clorhídrico del epitelio estomacal, llevando el pH a valores tan bajos como 1 o 2.

La principal secreción enzimática en este compartimento es la pepsina, una proteasa con alta actividad a pH ácido, también se observa la presencia aunque en menor concentración de lipasa gástrica. (Susuki, 2000)

En el tránsito desde el estómago hasta el intestino se produce un gran cambio de pH, desde 1 hasta 5 y 7, dependiendo de la zona y las condiciones fisiológicas. La alcalinización está dada por la secreción de bicarbonato principalmente, el cual proviene del páncreas, al duodeno que es la primera porción de intestino delgado. (Susuki, 2000)

Se podría pensar que estos cambios de pH podrían estar provocando una degradación del sistema farmacéutico, la forma de comprobar esta hipótesis sería someter las micelas mixtas a condiciones de pH ácido a una temperatura de 37°C. En la actualidad no se han realizado estudios para comprobar que los cambios de pH gástrico no afectan a las

micelas mixtas. Sin embargo, se ha estudiado cómo varía el pH interno cuando vesículas con distinta composición fosfolipídica son sometidas a gradientes de protones que simulan los hallados en el TGI, observándose que los sistemas lipídicos agregaban luego de la incubación a pH 2, pero no se evidenciaba un alto porcentaje de reacciones de oxidación ni hidrólisis, ni siquiera después de 24 horas (Norris y Powell, 1990; Barreto y Lichtenberger, 1992).

Considerando los resultados de los estudios realizados, podríamos inferir que las micelas mixtas no son degradadas a pH gástrico, pero podríamos aceptar la idea de que alguna fracción de fármaco podría estar saliendo del sistema.

El intestino delgado es la zona donde se lleva a cabo la digestión de numerosas sustancias cuya función es la digestión de diversos tipos de alimentos para facilitar su absorción. Cuando el sistema terapéutico (micelas mixtas) llega al duodeno, se encuentra con enzimas que degradan lípidos (lipasas), hidratos de carbono (amilasas) proteínas (quimiotripsina) etc. (Susuki, 2000) Lichtenberg, D.; Robson, R.J. and Dennis, E.A., 1983. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta*, 737: 285-304.

La lipasa gástrica, presenta en el estómago, es incapaz de digerir los fosfolípidos. Por el contrario, las fosfolipasas presentes en las secreciones pancreáticas son un factor de inestabilización de los liposomas ya que hidrolizan fosfolípidos para dar ácidos grasos. En este caso, se supone que una fracción de fármaco contenido en micelas mixtas sale del sistema y es absorbido en el intestino. Por otro lado, se puede inferir que al estar unidos covalentemente los componentes de las micelas, no hay una expulsión de fármaco, ya que no se presenta una interacción con enzimas. (Shen et al, 2001)

Al llegar al intestino, las micelas mixtas son sometidas a la acción de las sales biliares, sin afectar su estructura, de acuerdo a los estudios realizados por O' Connor et al, y Muller y Schuster, donde se observó que cuando la concentración de sales biliares en el lumen del intestino excede la concentración micelar crítica, se favorece la incorporación de sustancias como micelas mixtas de tamaño promedio de 20 nm. Esta teoría de la acción favorable de las sales biliares en la absorción intestinal de sustancias incorporadas a

acarreadores lipídicos fue postulada por otros grupos de investigación (Nagata et, al., 1992).

Las micelas son transportadas hacia el intestino delgado donde se produce la absorción de sistemas terapéuticos nanométricos. El epitelio del intestino delgado tiene la capacidad de estar plegado y formar vellosidades, que son proyecciones de tejido hacia el lumen, cubiertas por enterocitos y células productoras de mucus.

Debido a que el lumen del TGI está expuesto a microorganismos potencialmente patógenos, existen mecanismos de defensa específicos que se especializan en capturar material particulado del lumen intestinal y transportarlo al tejido linfoide subyacente. Este epitelio está formado por enterocitos intercalados con algunas células escamosas conocidas como células M que desempeñan un papel fundamental en la fagocitosis de material particulado como las micelas mixtas.

Si bien la captación de micelas mixtas por las células M es muy eficiente, esta ruta no resulta adecuada cuando el objetivo es la absorción del fármaco vía intestinal, ya que las micelas captadas serían mayormente fagocitadas antes de llegar a la circulación.

Suponiendo que las micelas mixtas son transportadas a través de un epitelio polarizado vía paracelular o transcelular, diríamos que éstas podrían ingresar a los enterocitos por diversos mecanismos, mayormente por endocitosis.

Teniendo en cuenta la ruta transcelular un sistema particulado podría ingresar a los enterocitos por distintos mecanismos. Una vez en el interior de los enterocitos, se ha propuesto que las micelas mixtas seguirían la ruta endosomal, siendo degradadas en los lisosomas donde liberarían su contenido, de esta manera el fármaco capaz de atravesar la membrana endolisosomal podría alcanzar el citoplasma y luego atravesar la membrana plasmática serosal para acceder a circulación.

Al atravesar la membrana endolisosomal, podrían alcanzar el citoplasma y luego atravesar la membrana plasmática serosal para acceder a la circulación. Otra posibilidad

es que las micelas mixtas pudieran atravesar la célula sin desintegrarse y alcanzar la circulación intactas.

Finalmente las micelas mixtas que pasaron casi intactas por la pared intestinal (efecto de caballo troyano) hacia el torrente sanguíneo son distribuidas por todo el organismo y llegan a estar en contacto con la barrera Hematoencefálica.

El fármaco atrapado en micelas es muy probable que sea liberado al torrente sanguíneo y viaje como fracción libre y unido a proteínas. De esta manera, una aportación al efecto terapéutico final observado es por el fármaco libre (unido a proteínas y completamente libre) en el torrente sanguíneo es como queda dispuesto después de la administración en la forma convencional (clonazepam clásico) y la segunda vía en la que el fármaco contenido en micelas mixtas se encuentra en el torrente sanguíneo y dispuesto como parte de una distribución corporal para atravesar la BHE.

Mientras las pequeñas moléculas de fármaco entran a las células por difusión, los fármacos incluidos en acarreadores submicrónicos e fármacos interactúan con la membrana celular y después son endocitados en vesículas. La micela mixta es degradada y el fármaco es liberado.

Para el incremento observado del efecto terapéutico en los lotes administrados con micelas mixtas que contienen clonazepam se proponen los siguientes mecanismos:

1. La micelas mixtas cruzan el endotelio capilar cerebral que forma la BHE por difusión pasiva o mediado por receptores específicos.
2. Las micelas mixtas penetran los capilares fenestrados de los órganos circunventriculares.
3. El fármaco es endocitado por las células M intestinales.

En este caso, el mecanismo atribuido como paso en la BHE es un efecto atribuido a lipoproteínas de baja densidad. La glicoproteína P es una de las que constituyen al grupo de proteínas que muestran resistencia al paso de fármacos en la BHE y que modula a bombas de transporte activo primario. Las micelas mixtas conteniendo clonazepam podrían atravesar la BHE vía transporte activo primario.

En el caso de acarreadores de fármacos de carácter lipídico se ha reportado una mayor absorción de la apolipoproteína A que la apolipoproteína B, de esta maera las mielas mixtas son transportadas por el torrente sanguíneo sin sufrir degradación y en la BHE existen receptores para apolipoproteína A que aumentan el posible paso de las micelas mixtas con la adsorción de apolipoproteína A, dándose el efecto de caballo troyano. (Gessner, A. 2001)

Con lo antes mencionado, se puede observar que no existe un mecanismo predominante para el paso de micelas mixtas conteniendo fármaco hacia el cerebro a través de la BHE. Sin embargo se pueden proponer dos vías viables para que ocurra este proceso:

1. Las micelas mixtas transportan al fármaco, cuando llegan a la BHE y entran en contacto con las membranas celulares (con su alta adhesión) son endocitadas. En el interior de las células son degradadas y el fármaco empieza a liberarse. Se supone que una parte del fármaco es degradado, la fracción libre puede atravesar por difusión la membrana celular y fluir al medio cerebral.

2. La apolipoproteína A o en todo caso la apolipoproteína B pueden recubrir a las micelas mixtas que contienen al fármaco para que pasen intactas por el proceso digestivo, una vez que esto ocurre, estarían viajando por la circulación general y al entrar a la BHE, los receptores para apolipoproteína A y B son reconocidos y atraviesan la BHE en forma enmascarada. En el interior del cerebro las apolipoproteínas son catalizadas y las micelas mixtas son degradadas liberando el fármaco.

VII. CONCLUSIONES

- Se preparó y caracterizó a clonazepam en micelas mixtas mediante el método de coprecipitación, al obtener lotes de tamaño nanométrico que oscila entre 20-22 nm de manera reproducible.
- Con el método de coprecipitación se incorporó el clonazepam en micelas mixtas, al obtener un porcentaje de encapsulamiento de fármaco entre 0.35% con una eficiencia de atrapamiento de 10.5%, que permitió tener la cantidad suficiente de fármaco como para administrar una dosis que produjera un efecto anticonvulsivante.
- Las micelas mixtas obtenidas presentaron un tamaño de partícula promedio de 20 ± 2 nm, las micrografías por TEM mostraron partículas esféricas, corroborando el tamaño submicrónico para la formulación conteniendo clonazepam y para la formulación placebo.
- Con la determinación de potencial Z se evaluó la estabilidad de micelas mixtas conteniendo fármaco observándose un umbral de leve dispersión.
- El comportamiento obtenido entre micelas mixtas encapsuladas con clonazepam y micelas mixtas placebo no resulta estadísticamente significativo en las evaluaciones de tamaño de partícula y potencial Z.
- Las pruebas de estabilidad hasta por un mes mediante la determinación de tamaño de partícula y potencial zeta demostraron un incremento de aproximadamente 60 nm en el caso de micelas mixtas que contienen clonazepam y una disminución del potencial zeta de -8.5 mV aproximándose a un umbral de aglomeración.
- Se cuantificó clonazepam contenido en micelas mixtas mediante un método validado por HPLC que demostró ser específico, lineal y preciso, obteniéndose así resultados confiables.

-
- Con las evaluaciones *in vivo* se registró un efecto anticonvulsivante administrando por vía oral micelas mixtas con clonazepam en dosis diez veces menores a la dosis terapéutica. Las micelas mixtas mejoraron la absorción intestinal del clonazepam al observarse un efecto terapéutico atenuado que detiene la aparición de crisis convulsivas generalizadas y tónicas al ser administrado en dosis de 0.1 mg/kg, en comparación de cuando se administra en dispersión acuosa. Se logró mejorar el paso de clonazepam a través de la BHE.

VIII. PERSPECTIVAS.

El presente estudio es una prueba preliminar para encaminar la nanotecnología aplicada a sistemas farmacéuticos en la investigación de nuevas terapias que sigan dando respuesta a enfermedades que hasta ahora no han encontrado respuesta en la medicina convencional.

1. A partir de este estudio se abren nuevas opciones de investigación encaminadas a evaluar el efecto terapéutico *in vivo* de otros fármacos que podrían encapsularse en micelas mixtas, como hipoglucemiantes, ansiolíticos, e incluso anticancerígenos, con diferentes tipos de lípidos, o con una combinación de ellos para mejorar el encapsulamiento del fármaco.
2. Sería conveniente seguir estudios de estabilidad por más tiempo apegados a la Norma Oficial Mexicana 077. De la misma manera, es importante investigar y describir la ruta seguida por las micelas mixtas por el tracto intestinal mediante estudios de estabilidad donde se simulen los diferentes tránsitos de pH a través del TGI a 37°C.
3. Se debe estudiar la región cerebral donde ejerce su mayor efecto el clonazepam encapsulado en micelas mixtas, se propone realizar un estudio con marcadores fluorescentes.
4. De la misma manera, sería importante ampliar la información obtenida con evaluaciones con electroencefalogramas.
5. Se propone realizar un estudio de cuantificación de la cantidad de fármaco que llega al cerebro, mediante el desarrollo de un método analítico biológico que nos permita relacionar el porcentaje de fármaco con el efecto anticonvulsivo producido.
6. Se sugiere realizar la encapsulación a diferentes concentraciones de clonazepam en micelas mixtas y de esta manera conocer su capacidad de carga óptima. Así se podría aumentar el encapsulamiento de fármaco evaluando diferentes tipos de lípidos que se asocien formando micelas o la combinación de ellos.

7. Se propone realizar estudios de permeabilidad mediante el modelo de intestino invertido donde sea posible determinar si la micela mixta es capaz de atravesar el epitelio intestinal y llegar a torrente sanguíneo intacta.
8. Se debe estudiar el paso de las micelas mixtas conteniendo fármaco en barrera hematoencefálica *in vitro*, para determinar el mecanismo de penetración de fármaco en este tipo de acarreadores lipídicos.
9. Se deben realizar estudios de farmacocinética y perfiles de liberación del fármaco contenido en micelas mixtas.
10. Sería conveniente determinar el grado de encapsulamiento de otros fármacos anticonvulsivantes y compararlos con clonazepam. De la misma manera podría utilizarse el modelo de crisis convulsivas para evaluar su efecto *in vivo*.
11. Se propone evaluar el efecto del fármaco contenido en micelas mixtas mediante su administración por vía oral e intravenosa, para determinar cual sería la vía de administración más viable para observar un mayor efecto farmacológico.
12. Sería conveniente realizar estudios de toxicidad *in vivo* e *in vitro*, con placebos y micelas mixtas conteniendo el fármaco, considerando que en el proceso de elaboración se utilizan disolventes orgánicos tóxicos.
13. A futuro sería conveniente evaluar el escalamiento del proceso de elaboración y estudios de costo-beneficio para su preparación comercial.

IX. REFERENCIAS.

1. Aguilar, G., et al., *Validación de métodos analíticos*. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos. 2009
2. Alcaraz Víctor, *Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo*, UNAM 2000.
3. Alfonso Velasco Martín, *Farmacología fundamental*. Mc. Graw Hill-Interamericana, USA, 2003.
4. Almog, S., T. Kushnir, et al. "*Kinetics and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles.*" *Biochemistry* 25(9): 2597-2605., 1986.
5. Antelo Queijo Álvaro, *Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares*, Universidad de Compostela, 2011.
6. Amalina B, Ebrahim Attia, Zhan Yuin Ong , et, al., *Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery*, Department of Chemical Engineering and Institute for Soldier Nanotechnologies, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA , 2010.
7. Appleton Richard, Tony Marson. *Epilepsy The Facts*, Oxford University Press, 2009.

8. Arthur C. Guyton, *Fisiología humana*. Nueva Editorial Interamericana, México, Sexta edición, 2007.
9. Arunima Chaudhuri., *Structural transition in micelles: novel insight into microenvironmental changes in polarity and dynamics*. Centre for Cellular and Molecular Biology, Council of Scientific and Industrial Research, Uppal Road, Hyderabad 500 007, India, 2011.
10. Bales, B.L., Zana, R., *Characterization of micelles of quaternary ammonium surfactants as reaction media: dodecyltrimethylammonium bromide and chloride*. J. Phys. Chem. B 106 (8), 2003, pp. 1926–1939.
11. Berg Mark, Stryer Lubert., *Biochemistry*, Reverte, México, 2008.
12. Bjorklund Ruth., *Epilepsy. Health Alert*. Marshall Cavendish, 2006.
13. Bryan Kolb, Ian Q. *Neuropsicología Humana*, Ed. Médica Panamericana, 2006.
14. Bruce M., *Fisiología*. Elsevier España, 2009.
15. Bustamente Zulueta Ernesto, *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano*. Universidad de Antioquía, 2007.
16. Caitlin Tynan, et., al, *Epilepsy and Sleep Division*. Columbia University., Oxford University Press, New York, 2011.

17. Cardinali Daniel, *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Editorial Médica Panamericana, 2007.
18. Chávez Monroy F., "*Estudios de la liberación de sustancias lipofílicas en sistemas nanoencapsulados*", Tesis de licenciatura. UNAM, FES-Cuautitlán, 2002.
19. Chistoph A., *Analytical Methods in supramolecular chemistry*. Ed. John Wiley, 2011.
20. Coello, A., F. Meijide, et al., "*Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution.*" *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(1): 9-15., 1996.
21. De Jaeghere, F., Doelker, E., y Gurny, R., *Nanoparticles. An Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 2, Ed. John and Sons, Inc USA. 1999.
22. Dexler K. *Nanotechnology (Engines of creation)*, Anchor Books, New York, 1990.
23. Escobar Martha., *Sistema Nervioso*, Universidad del Valle, 2006.
24. Flórez, Jesus, *Farmacología Humana*. 4a edición, Masson Salvat Edición, Barcelona, 2003.
25. Graham Scambler, *Epilepsy. Experience of Illnes Series*. Routledge 1989.

26. Gabriel A. Silva, *Neuroscience nanotechnology; progress, oportunities and challenges*. *Neruroscience*, 7 2006.
27. Garidel A. Hildebrand K., *Membranolytic activity of bile salts: Influence of biological membrane properties and composition*. *Molecules* 12, 2007.
28. Garzón Serra, M.L. *Las nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapéuticos*. Departamento de Sistemas biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. 2005.
29. Gert Luurtsema, Elizabeth C.M. de Lange, Adriaan A. Lammertsma, Eric . F. Franssen, *Transport across the blood-brain barrier; estereoselectivity and PET-Tracers*. *Mol. Imag.Bio*, 5, 2004.
30. Gill Parkinson, Mike Johnson, *Epilepsy, Special education needs*, Continuum international publishing group, 2006.
31. Goodman Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10^a ed. McGraw-Hill Interamericana. México, 2005.
32. Gruyter, W *Encyclopedia - Biochemistry and Molecular Biology*. Berlín-Nueva York, 1997
33. Hans Leenarnas, Ebba Lundgren, *Intestinal and blood-brain drug transport; beyond involvement of a single transport function*. *Drug Dis. Today Tech.*, 2004.
34. Hans, J., *Aplications of supramolecular chemistry*, CRC Press, 2012.

35. Harper, Harold Al., *Manual de química fisiológica*. El manual moderno S.A., México 2003.
36. Helenius, A. and Simons, K., *Solubilization of membranes by detergents*. *Biochim Biophys Acta*, 415: 29-79. (1975)
37. Hildebrand, A., P. Garidel, et al., *Thermodynamics of demicellization of mixed micelles composed of sodium oleate and bile salts*. *Langmuir* 20(2): 320-328. 2003.
38. Hiroshi M, *Phenomenological approaches in the thermodynamics of mixed micelles with electric charges*. The micelar Gibbs-Duhem relation, 813-0011 Japan, 2010.
39. Hofmann AF, Small DM, *Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function*. *An. Rev Med.* 1967; 18:333–376.
40. Hoff JT. *Cerebral protection*. *Journal of Neurosciences*. 1996; 65(5):579-91
41. Jason D. Huber, Richard D. Egleton, Thomas P. Davis, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier*. *Trends Neurosciences*, 2001.
42. Kohler Michael., *Nanotechnology*, John Wiley and sons, 2008
43. Kreuter J. et al; *Colloidal Drug Delivery Systems*; Kreuter, Marcel Dekker, Inc.; N. York., USA, 353 págs, 1994.

44. Letellier, P. *Thoughts on the ideal behavior of mixed micelles and the appropriate application of regular solution theory (RST)*. Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, CNRS, UPR15 LISE, Université Pierre et Marie Curie, France, 2010.
45. Leyva, G. , *Evaluación de nanoesferas lipídicas como vector de fármacos ansiolíticos*. TESIS UNAM 2006.
46. Li, L. y Tian, Y., *Zeta Potential*. Enciclopedia of Pharmaceutical Technology. USA. Marcel Dekker, Inc.
47. Lichtenberg, D.; Robson, R.J. and Dennis, E.A., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta*, 737: 285-304. 1983.
48. Long Michelle, et. al., *Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions*. Department of chemical engineering, University of Delaware, Washington, 2000
49. Luszczki J, Ratnaraj N., *Characterization of the anticonvulsant, behavioral and pharmacokinetic interaction profiles of stiripentol in combination with clonazepam, ethosuximide, phenobarbital, and valproate using isobolographic analysis*. *Epilepsia*, 47 (11) 1841 - 1854, 2006.

50. Manasi Karkare, *Nanotechnology: Fundamentals and applications*, I.K. International, 2008.
51. María Zaida Urbán Morlan, *Desarrollo de un método para la cuantificación de tensoactivos no iónicos de tipo poloxámeros mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2002.
52. M.A. Hammand, B.W. Muller, *Increasing Drug Solubility by means of bile Salt-Phosphatidylcholine based mixed micelles*. Christian Albrechts University. Kiel, Germany. 1998.
53. M.A. Hammad, B.W. Muller, *Solubility and stability of clonazepam in mixed micelles*. Christian Albrechts University. Kiel, Germany. 1998.
54. Mary Luckey., *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*. Cambridge university press, 2008.
55. Mazer, N. A., G. B. Benedek, et al. *Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions*. *Biochemistry* 19(4), 1980.
56. M.G. Braillon, *El sistema nervioso central*, Colección medicina series, Ediciones Morata, Barcelona, 1992.
57. Mustafa M.A., Gregor C., *The vesicle-to-micelles transformation of phospholipid-cholate mixed aggregates A state of the art analysis including membrane curvature*

effects. Advanced Treatments Institute, Tassilostr. 3, 82131, Gauting, Germany., 2010.

58. Nagata, M.; Yotsuyanagi, T. and Ikeda, K. *Bile salt-induced disintegration of egg phosphatidylcholine liposomes: a kinetic study based on turbidity changes*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 38: 1341-1344. (1990)

59. Ned. H Cassem. *Psiquiatría de enlace en el Hospital General*. Ediciones Días de santos, 3ra. Ed, 1994.

60. Nanoseries, *Marlvern Instrument. User Manual*. England, 2003.

61. Nicholas Bodor, Peter Buchwald, *Recent advances in the targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems*. Adv. Drug. Deliv, Rev., 36 (2000).

62. Noboku, M., *Manual de Epilepsia*. 3ra. Ed , Barcelona, 2007.

63. Nieuwenhuys K. *El sistema nervioso central humano*, Ed. Médica Panamericana, 2009.

64. O'Connor, C.J.; Wallace, R.G.; Iwamoto, K.; Taguchi, T. and Sunamoto., *Bile salt damage of egg phosphatidylcholine liposomes*. Biochim Biophys Acta, 817: 95-102. 1985.

65. Popovich N.G., Ansel H.C. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. Fifth edition. Lea and Febiger. Philadelphia, 1995.
66. Poirier, J. *El sistema nervioso*, Editorial Siglo XXI, México, 2004.
67. Praveen Ballabh, Alex Braun, and Maiken Nedergaard, *The blood brain barrier: an overviewed structure, regulation and clinical implications*. Neu. Dis., 2004.
68. P.R. Lockman, R.J. Mumper, M.A. Khan, D.D. Allen, *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. Drug Dev. Ind. Pharm., 28 (2002).
69. Q. Ashton., *Issues in Pharmacology, Pharmacy, Drug Research and Drug Innovation*, Scholar editions, 2002.
70. Riley Joelle., *El Sistema Nervioso*. Ediciones Lerner, 2006.
71. Rolland A. *Pharmaceutical particle carriers. Therapeutic applications, Gruds and the pharmaceutical Sciencies*. Vol 61, Marcel Dekker, Inc. New York, 1993.
72. Rudolf Nieuwenhuys, *The human central nervous system*, Ed. Medica Panamericana, 2009.
73. Rupp Christopher, Hartwig Steckel, Bernd W. Muller., *Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactans with different molecule structures*. Departament of pharmaceutics and biopharmaceutics, Christian Albrecht University Kiel, 2009.

74. Rupp Christopher, Hartwig Steckel, Bern W. Muller. *Solubilization of poorly water-soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine. Departament of pharmaceutics and biopharmaceutics, Christian Albrecht University Kiel, 2010.*
75. Salager Jean. *Surfactantes en solución acousa.* Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química. 1993.
76. Shorvon Simon, *Epilepsy*, Oxford Neurology Library, Onel Series, Oxford University Press, 2009.
77. Suzuki, H. and Y. Sugiyama., "*Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine.*" European Journal of Pharmaceutical Sciences. (2000)
78. Thomas R. Browne, Gregory L. Holmes, *Handbook of Epilepsy*, Jones and Bartlett Learning, 2008
79. Toral María Teresa, *Fisicoquímica de superficies y sistemas disperses.* Ediciones Urmo, Bilboa. 1990.
80. Villarejo Francisco., *Tratamiento de la Epilepsia.*, México, 1998.
81. Wade A., Weller P.J. *Handbook of pharmaceutical Excipients*, 2A. Edición, Amer. Pharm, Ass: Washington and pharmaceutical Press. London 1994.

82. Waite, Anne, *Intermediate Structures in the Cholate-Phosphatidylcholine Vesicle-micelle Transition*, Department of Physiology and Biophysics; U.S.A, 1991.
83. Y. Moroi., *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*, Language of Science, Springer, 1992.
84. Yoon S., *Self Assembly and Nanotechnology*, Ed. John Wiley, 2008.