



Universidad
de La Laguna



Facultad de Farmacia
UNIVERSIDAD LA LAGUNA



Alcaloides marinos en el tratamiento y prevención de la osteoporosis

María Luisa Santana Armas

Trabajo de fin de Grado- Grado en Farmacia

Tutor: Jose Javier Fernández Castro

Cotutor: Manuel Norte Martín

Abstract

Osteoporosis is a metabolic bone disease in post-menopausal women older than 50 years. Its prevalence is estimated at 200 million people in the world and it can reach 3 million in Spain; affecting as many as one-third of women over the age of 65 years [1]. This disease causes an increase in mortality and morbidity; as well as a high risk to new fractures in the short term [2].

Over time have been developed drugs as a treatment that act at different levels; however, there are limitations in the absorption, adverse effects, and difficulty in intake, which has stimulated interest for the development of new anti-osteoporotic based on new chemical structures.

This project describes transfer's trials of marine alkaloids obtained from genus *Zoanthus* that present potential activity for the prevention and treatment of osteoporosis: Zoanthamine and Norzoanthamine [3]. To realize this project, has been worked with different biodegradable systems and have been observed the curves of transfer with the aim to choose the most appropriated system to study their behavior *in vivo*. In this way, we can ensure patients a sustained therapeutic effect; getting greater tolerance to treatment for the prevention of the disease and a lower dropout rate.

Keywords: Alkaloids, *Zoanthus*, Zoanthamine, Norzoanthamine

Resumen

La osteoporosis es una enfermedad ósea metabólica significativa en mujeres post-menopáusicas mayores de 50 años. Su prevalencia estimada es de 200 millones de personas en el mundo y en España la cifra puede alcanzar los 3 millones; llegando a afectar hasta una tercera parte de las mujeres mayores de 65 años [1].

Esta enfermedad causa un incremento en la mortalidad y morbilidad; así como un riesgo elevado de padecer nuevas fracturas a corto plazo [2].

A lo largo del tiempo se han desarrollado fármacos como tratamiento que actúan a diferentes niveles; sin embargo, presentan limitaciones en la absorción, efectos adversos y dificultad en la toma, lo que ha despertado interés para el desarrollo de nuevos fármacos anti-osteoporóticos basados en nuevas estructuras químicas.

En este trabajo se exponen ensayos de cesión de alcaloides marinos obtenidos del género *Zoanthus* que presentan actividad potencial para la prevención y tratamiento de la osteoporosis: Zoanthamina y Norzoanthamina [3]. Para ello, se ha trabajado con diferentes sistemas biodegradables y se han observado las curvas de cesión con el objetivo de escoger el sistema más adecuado para posteriormente estudiar su comportamiento *in vivo*. De esta forma se podrá garantizar a los pacientes un efecto terapéutico sostenido; logrando asimismo una mayor tolerancia al tratamiento para la prevención de dicha enfermedad y una menor tasa de abandono.

Palabras clave: Alcaloides, *Zoanthus*, Zoanthamina, Norzoanthamina

Índice

1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	7
3. Material y métodos.....	8
3.1 Obtención.....	8
3.2 Elaboración de microesferas e implantes.....	10
3.3 HPLC (High- Performance liquid chromatography)	11
3.4 Obtención de curvas de cesión.....	13
4. Resultados.....	15
4.1 Métodos de análisis.....	16
4.2 Análisis de cesión de implantes.....	18
4.2.1 Implante Ia.....	18
4.2.2 Implante IIa.....	21
4.2.3 Resumen de resultados: Implantes.....	23
4.2.4 Microesfera Ia.....	24
4.2.5 Microesfera IIa.....	26
4.2.6 Resumen de resultados: Microesferas.....	28
4.3 Discusión.....	29
5. Conclusiones.....	30
6. Bibliografía.....	31

1. Introducción

El hueso es un tejido que a lo largo de la vida sufre procesos de formación y destrucción, lo que se conoce con el nombre de remodelado óseo. Entre las funciones principales del remodelado óseo se encuentran: la sustitución del tejido óseo viejo por el joven, aumento de la resistencia del esqueleto a fracturas y asegurar la disponibilidad de minerales (Ca, P, Mg, etc). Las células que participan en este proceso son principalmente los osteoclastos, encargados de la destrucción del hueso o resorción ósea, y los osteoblastos los cuales llevan a cabo la formación del hueso regenerado.

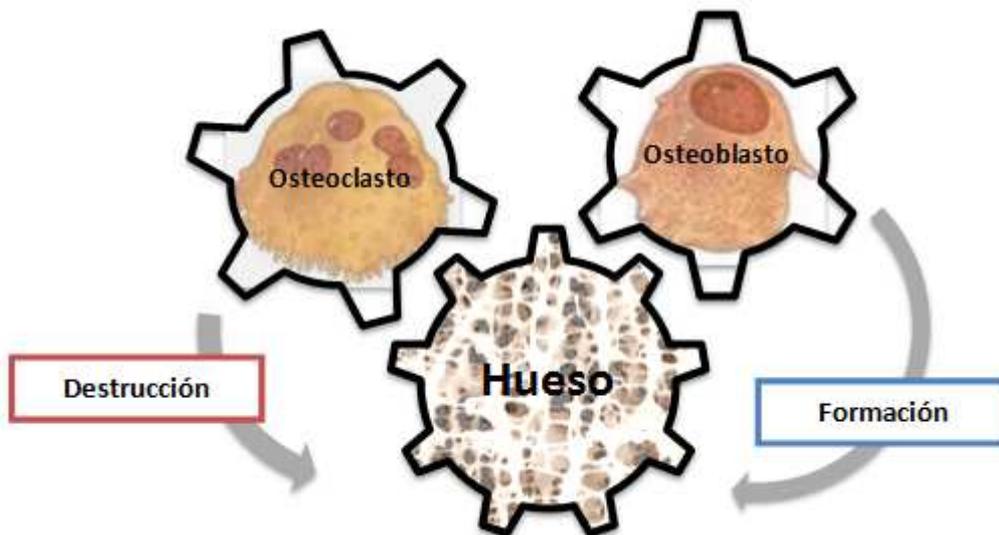


Fig 1.- Proceso general de remodelado óseo

La osteoporosis es una enfermedad con una alta prevalencia caracterizada por un desequilibrio entre la resorción ósea y la formación del hueso. Sus principales causas están relacionadas con alteraciones del metabolismo mineral, proceso de envejecimiento, factores genéticos y ambientales.

En condiciones normales, la actividad de osteoblastos y osteoclastos está compensada; sin embargo, en el caso de la osteoporosis se ve favorecido el proceso de resorción ósea, lo que provoca fragilidad, riesgo de fracturas y limita mucho la calidad de vida.

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando fármacos que actúan en diferentes niveles como pueden ser: Bifosfonatos tales como el ibandronato o alendronato (inhiben la resorción ósea), moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM)

(disminuyen el proceso de resorción), teriparatida (estimula la formación del hueso), ranelato de estroncio (aumenta la acción de osteoblastos y disminuye la resorción ósea). No obstante, estos fármacos presentan importantes inconvenientes como son: efectos adversos (osteonecrosis, tromboembolismo venoso, infarto de miocardio, hipercalcemia, náuseas y cefalea), limitaciones en la absorción, dificultad en la toma del tratamiento; así como la insuficiente adherencia terapéutica por lo que ha despertado interés para el desarrollo de nuevos fármacos anti-osteoporóticos, entre otros.

Algunos invertebrados marinos de cuerpo blando como es el caso del género *Zoanthus* producen una gran variedad de compuestos con estructuras químicas novedosas que pueden dar lugar a medicamentos potenciales [4].

Dentro del grupo de alcaloides aislados del género *Zoanthus* cabe destacar la Zoantamina ($C_{30}H_{42}NO_5$) y Norzoantamina ($C_{29}H_{39}NO_5$), compuestos con un esqueleto químico particular del cual no se conoce aún su origen biosintético, y diferenciándose estructuralmente entre ellas en la presencia o no de un grupo metilo.

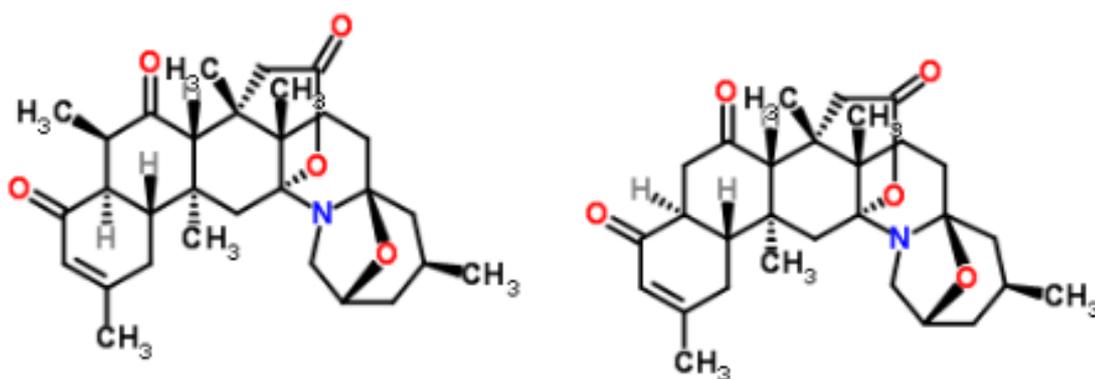


Fig 2.- Estructura de la Zoantamina y la Norzoantamina respectivamente.

Los estudios publicados a lo largo de los últimos años han demostrado que tanto la Norzoantamina como su sal hidroclicada con capaces de prevenir la osteoporosis *in vivo* en ratones ovariectomizados; considerando a éstos como modelo farmacológico para la osteoporosis de tipo post-menopáusica. Se ha propuesto que dichos ratones ovariectomizados presentaban un déficit de estrógeno lo que conllevó a la pérdida de la fuerza y masa ósea. Con la administración a dosis de 0,08-2,0 mg/kg día de Norzoantamina hidroclicada, conservaban la masa ósea en comparación con los ratones ovariectomizados no tratados. Se ha propuesto que este efecto-

antiosteoporótico radica en su habilidad para suprimir la producción de Interleucina 6 (IL-6), involucrada en el proceso de formación de osteoclastos.

Además este tratamiento mostró interesantes diferencias en comparación con el uso de estrógenos para esta enfermedad, dado a que la terapia con estrógenos provocaba un aumento dosis-dependiente en el peso uterino, mientras que en los ratones tratados con Norzoantamina no tuvo lugar este efecto colateral [5].

2. Objetivos

La finalidad de este trabajo de fin de grado se centra en:

- Estudiar el comportamiento *in vitro* de sistemas biodegradables tales como microesferas e implantes que contienen los principios activos de interés (Zoanthamina y Norzoanthamina) para llevar a cabo posteriormente ensayos *in vivo* en ratas osteoporóticas.
- Conocer de qué manera afecta la presencia de ciertos excipientes a la liberación del mismo y valorar el sistema estimando su capacidad de liberación.

3. Material y métodos

3.1 Obtención

Los ejemplares de *Zoanthus sp.* se recogieron en Punta del Hidalgo. Se procedió a la limpieza de los mismos eliminando restos de algas y epifitos presentes.

Su extracción se realizó por maceración utilizando acetona hasta cubrir todas las muestras. El proceso se repite hasta agotamiento con el fin de extraer la mayor cantidad de principios activos. Posteriormente se eliminó el disolvente, y el residuo fue liofilizado. A continuación, se realizó el mismo proceso utilizando esta vez como disolvente diclorometano (DCM).

Tras liofilizar dichos extractos obtuvimos un aceite viscoso de color verde oscuro. Para su correcta separación, el extracto crudo fue cromatografiado utilizando una columna de filtración molecular Sephadex LH-20 (600 x 70mm Θ) empleando como eluyente n-hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1), seguido de una cromatografía en gel sílice de en sistemas de media presión usando como eluyente CHCl₃:MeOH (19:1). Las fracciones seleccionadas que presentaban perfiles similares en cromatografía de capa fina fueron reunidas en un solo bloque. Para el revelado se empleó el reactivo Drangendorff (tetrayodo bismuto de potasio) que permite visualizar aquellos compuestos que presentan aminas terciarias.

Cada una de las fracciones seleccionadas fue nuevamente cromatografiada en una columna de fase reversa Lobar LiChrophed RP-8 (310 x 25mm Θ) usando MeOH:H₂O (17:3) como eluyente.

La purificación final se llevó a cabo en un cromatógrafo de alta eficacia (HPLC) equipado con una columna de fase reversa μ -Bondapak C-18 utilizando como eluyente CH₃CN:MeOH:H₂O en diferentes proporciones, separando de forma pura Zoantamina y Norzoantamina [6].

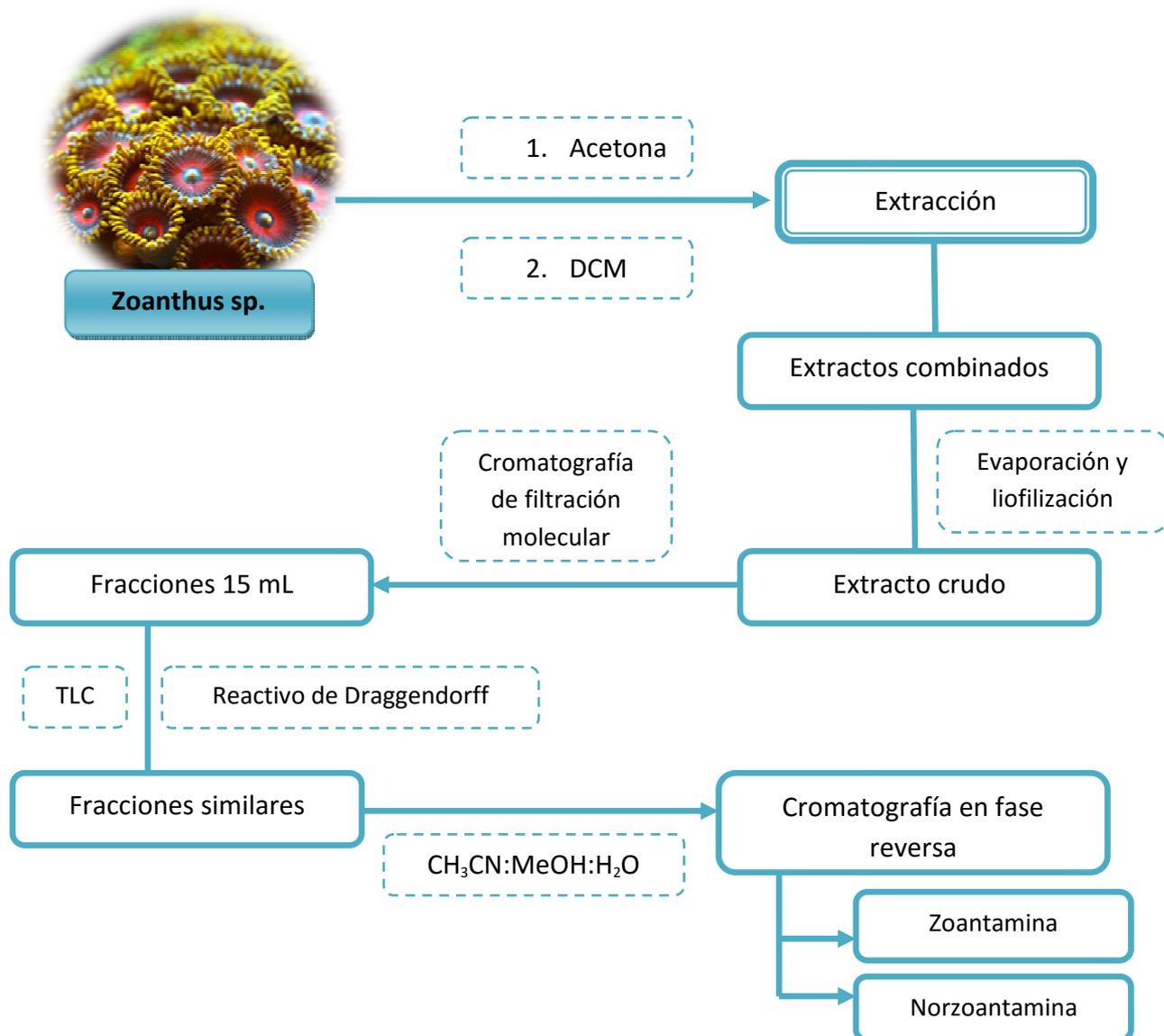


Fig 3.- Obtención de Zoantamina y Norzoantamina a partir del género *Zoanthus*.

3.2 Elaboración de microesferas e implantes

3.2.1 Microesferas

El Departamento de Tecnología Farmacéutica elaboró lotes de microesferas de empleando Poliláctico (PLA-S) y Precirol conteniendo Zoantamina (5% p/p)

- **Microesferas de PLA:** Dado al carácter lipófilo de la Zoantamina/Norzoantamina el método desarrollado para la elaboración de las mismas fue el de emulsión (O/W) extracción- evaporación del disolvente [Fig4] utilizando como emulgente el alcohol polivinílico.

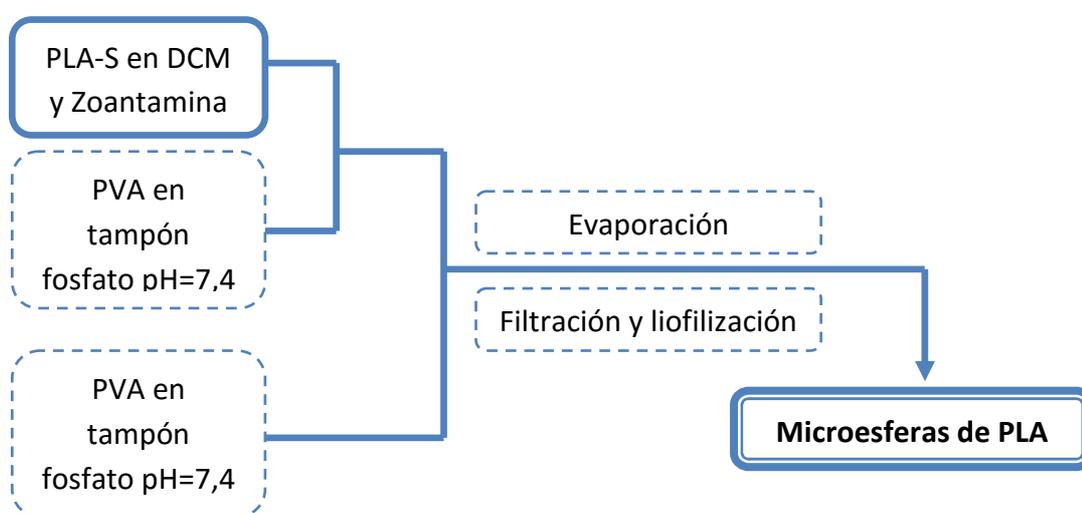


Fig4.- Elaboración de microesferas de ácido poliláctico (PLA). Emulsión (O/W) extracción- evaporación. En dicho proceso se emulsificó mediante agitación en vórtex una disolución de PLA-S en diclorometano en la que está presente la Zoantamina, junto con una fase acuosa (PVA en tampón fosfato pH=7,4) durante 1 minuto. Posteriormente se adicionó sobre 100 mL de PVA en tampón fosfato y se mantuvo en agitación magnética hasta la completa evaporación del disolvente. Finalmente las microesferas fueron separadas por filtración, se liofilizaron y se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su utilización [7].

- **Microesferas de Precirol:** Se llevó a cabo un método de fusión-emulsificación.

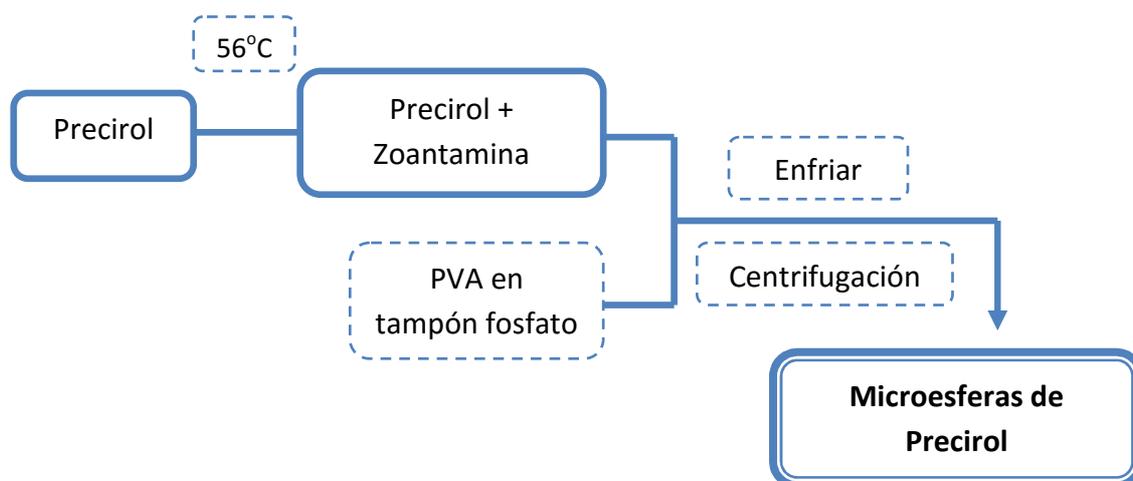


Fig5.-El Precirol se calienta hasta que funde (punto de fusión 56°C) y se le añade la zoantamina; dando lugar a la fase oleosa. Se añade sobre 10 mL de PVA previamente calentado y se emulsifica. Esta emulsión formada se enfría en un baño de hielo para que las partículas solidifiquen. Finalmente se separan por centrifugación.

3.2.2 Implantes

El método llevado a cabo fue el de extrusión. En un contenedor de teflón se vertieron los componentes de cada implante en diferentes proporciones y se disolvieron en 0,5 mL de DCM. A continuación se removió con ayuda de una espátula hasta la total evaporación del disolvente, dando lugar a una pasta que se extruyó para obtener un filamento cilíndrico.

Por último se evaporó el disolvente restante y se cortó para obtener implantes de 1 cm.

3.3 HPLC (High-Performance liquid chromatography)

Para los análisis de las muestras se utilizaron equipos de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alta eficacia equipados con columnas de fase reversa y con detectores de ultravioleta (UV) y acoplados de espectrómetros de masas de alta resolución (HPLC-HRMS).

Estas técnicas permiten separar e identificar los compuestos presentes en una muestra y empleando una columna cromatográfica que se basa en el principio de interacciones hidrofóbicas. Se emplea un disolvente polar y una fase estacionaria no polar; siendo el tiempo de retención (RT) mayor para moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas polares eluyen más rápidamente [8]. La columna será más eficaz cuanto menor sea el tamaño de partículas, presentando así una mayor resistencia.

- **HPLC acoplado a un detector UV (HPLC-UV):** Detecta compuestos que eluyen en la columna y absorben en el ultravioleta obteniendo señales más o menos amplias dependiendo de la absorción en el rango seleccionado que es capaz de absorber dicho compuesto.
- **HPLC acoplado a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-HRMS):** Detecta los iones moleculares con precisión de masas exactas. Es un método directo y útil para la detección de compuestos cuyos pesos moleculares son conocidos dado a que el espectro de masas para cada compuesto es único.

Condiciones		
Tipo	Disolventes	Flujo
HPLC - UV	AcN, EtOH y H ₂ O	1 mL/min
HPLC - HRMS	AcN, EtOH y H ₂ O y acidificar con HCOOH 0,4%	0,5 mL/min

Tabla1.- Condiciones de las columnas para HPLC con detector uv y HPLC acoplado a espectrometría de masas.

3.4 Obtención de curvas de cesión

Para obtener las curvas de calibrado, se tomó como referencia la recta de calibrado correspondiente a la calibración de Zoantamina (5 uL) desde 0,1 a 1 ppm; siendo la recta de calibrado la siguiente:

$$(1) y = 26113904x - 113501$$

Para realizar la tabla se tuvo en cuenta la recta de calibrado, la suma de las áreas (Z+NZ), la masa total de la formulación y el volumen de la alícuota (V= 0,5 mL).

Concentración (ppm): Para hallar la concentración, sustituimos la suma de las áreas en la ecuación de la recta (1);

$$y = 26113904x - 113501$$

$$x = \frac{y + 113501}{26113904}$$

Volumen de alícuota (Vm): Hace referencia al volumen extraído de la muestra, que equivale a 0,5 mL.

Masa total retirada (µg): Para hallarla, se divide la concentración entre el volumen de la alícuota.

$$M_{total\ retirada\ 1}(\mu g) = \frac{Concentración\ (ppm)}{Vm}$$

$$M_{total\ retirada\ 2}(\mu g) = \frac{Concentración\ (ppm)}{Vm} + M_{total\ retirada\ anterior}$$

Masa total cedida (µg): Es el producto de la concentración y el volumen del vial (V=3 mL). A medida que pasa el tiempo se suma la masa total cedida del anterior.

$$Masa\ total\ cedida\ 1(\mu g) = Concentración\ (ppm) \times V\ vial$$

$$Masa\ t\ cedida\ 2(\mu g) = (Concentración\ (ppm) \times V\ vial) + Mt\ cedida\ anterior$$

Porcentaje cedido (%):

$$\% \text{ cedido} = \frac{M \text{ total cedida} (\mu\text{g})}{M \text{ total formulación} (\mu\text{g})} \times 100$$

4. Resultados

En el presente trabajo se van a valorar ensayos de cesión de la molécula de interés (Zoanthamina y Norzoanthamina) que se encuentra incluida en diferentes sistemas biodegradables preparados en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la ULL en colaboración con el Grupo de Productos Marinos del Instituto Universitario Bio-Órgánica Antonio González en el marco del Proyecto de la Fundación CajaCanarias BIO17. La finalidad de última es la preparación de una formulación óptima que libere el/ los principios activos de forma continuada a lo largo del tiempo para proceder a realizar implantes óseos en ratas ovariectomizadas.

Los sistemas biodegradables trabajados son de tipo microesferas e implantes conteniendo una mezcla de Z y NZ con el fin de valorar su liberación y que presentan la siguiente composición de excipientes:

Sistema biodegradable	Composición
Microesferas Ia	PLA. Medio de cesión PVA
Microesferas IIa	Precirol ATO 5. Medio de cesión PVA
Implante Ia	PLA: Precirol ATO 5 (60:40)
Implante IIa	PLA: Precirol ATO 5 (80:20)

Tabla2.- Composición de los sistemas biodegradables.

Para comenzar a evaluar la cesión de los principios activos, cada implante y/o microesfera se introdujo en un vial de capacidad de 3 mL con una solución de tampón fosfato pH= 7,4; manteniéndose a una temperatura constante, en agitación y en ausencia de luz. Se tomaron alícuotas (V= 200µL) a diferentes tiempos y se añadió de forma simultánea 200 µL de solución tamponada tal y como muestra la **Tabla 3**.

	6 h	1 d	5 d	1w	2 w	3 w	4 w	7 w	14 w
I Ia	X	X	X	X	X	X	X	X	X
I IIa	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M Ia	X	X	X	X	X	X	X		
M IIa	X	X	X	X	X	X	X		

Tabla 3.- Toma de muestras a diferentes tiempos para cada sistema biodegradable.

Azul: I Ia. **Rojo:** I IIa. **Verde:** M Ia. **Naranja:** M IIa. h=hora; d=día; w=semana.

4.1 Métodos de análisis

Los primeros intentos de análisis se llevaron a cabo en un HPLC con detector ultravioleta dado a que la molécula era capaz de absorber en ese rango. Sin embargo, a la hora de observar los cromatogramas se observaba una gran variabilidad en los tiempos de retención observados. En todos los casos no pudo distinguirse con certeza si los picos hacían referencia al principio activo o a algún tipo de interacción con los excipientes que provocaba una variación continua en los tiempos de retención.

Para solucionarlo, se optó realizar de forma individualizada y valorar los cromatogramas de los excipientes [Fig 6 y 7]. No obstante, no hubo repetitividad en cuanto a los picos y sus tiempos ni con los excipientes, ni con los principios activos puros, por lo que se descarta la idea de separar Zoantamina y Norzoantamina con este método.

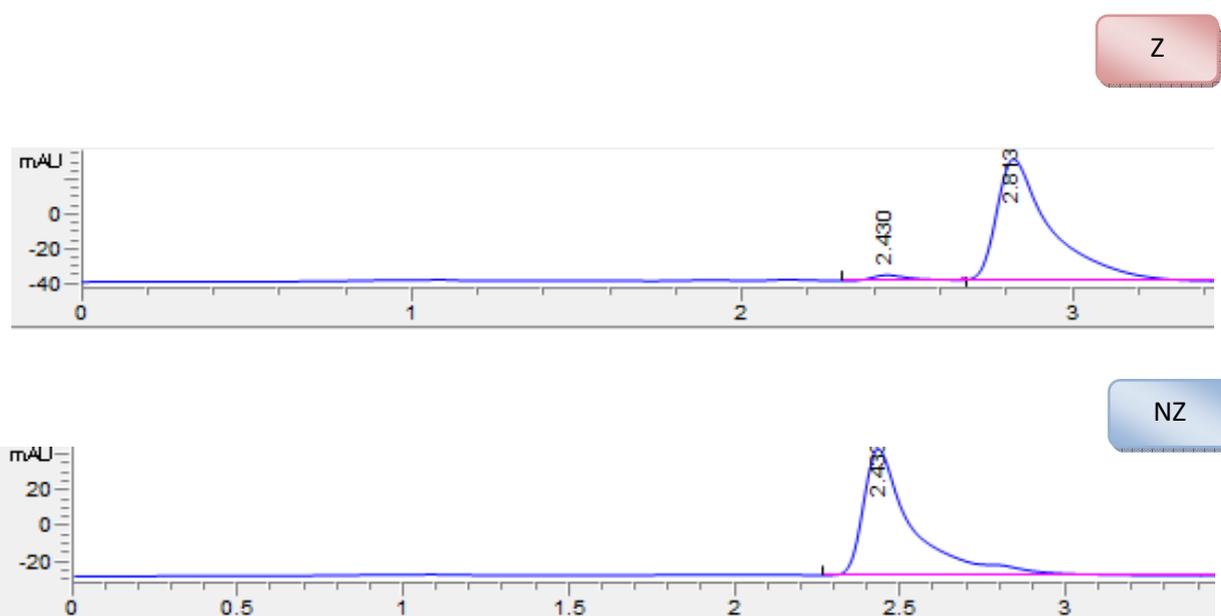
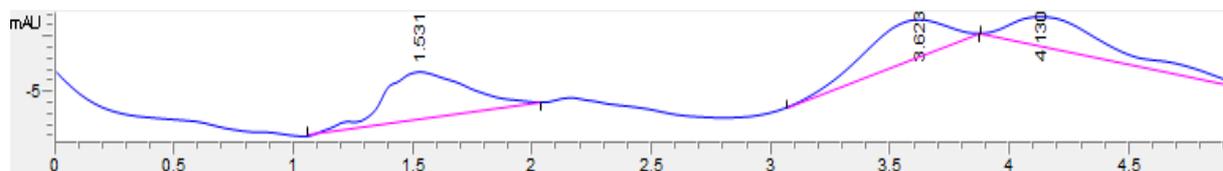


Fig 6 y 7.- Se observa el pico de absorción para las estructuras químicas: Zoantamina y Norzoantamina cuyos tiempos de retención son 2,81 y 2,43 min respectivamente.

I2a (6h)



I2a (1d)

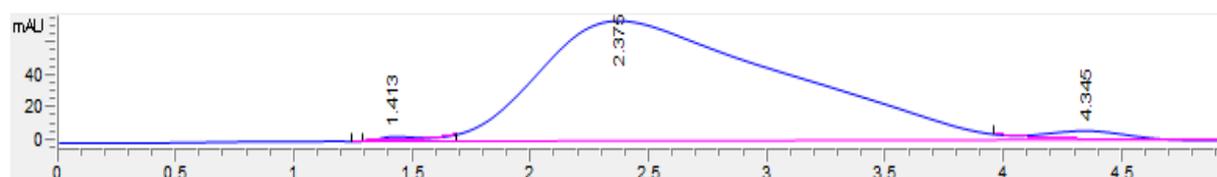


Fig 8 y 9.- Cromatogramas correspondientes al implante I2a referidos a las 6 horas y 1 día. Se aprecia una variación en el tiempo de retención, así como alguna interferencia debida posiblemente a la composición del implante.

Al no poder diferenciar entre principios activos y excipientes y la inconsistencia con los detectores de UV, se optó por utilizar un HPLC acoplado a espectrometría de masas para distinguir las dos estructuras químicas en base al peso molecular exacto de ambas. **[Fig 10]**

Estructura química	Peso molecular
Norzoantamina (C ₂₉ H ₃₉ NO ₅)	481,6324
Zoantamina (C ₃₀ H ₄₂ NO ₅)	496,6672

Fig 10.-Tabla con los pesos moleculares teóricos de ambas estructuras (Norzoantamina y Zoantamina)

En el análisis de las muestras se pudo observar la presencia de dos picos diferenciados en el cromatograma que correspondían con el peso molecular exacto de cada molécula **[Fig9]**, por lo que se consideró que dicha metodología para conocer la

cantidad de ambos compuestos presentes en los ensayos de cesión de cada una de las formulaciones.

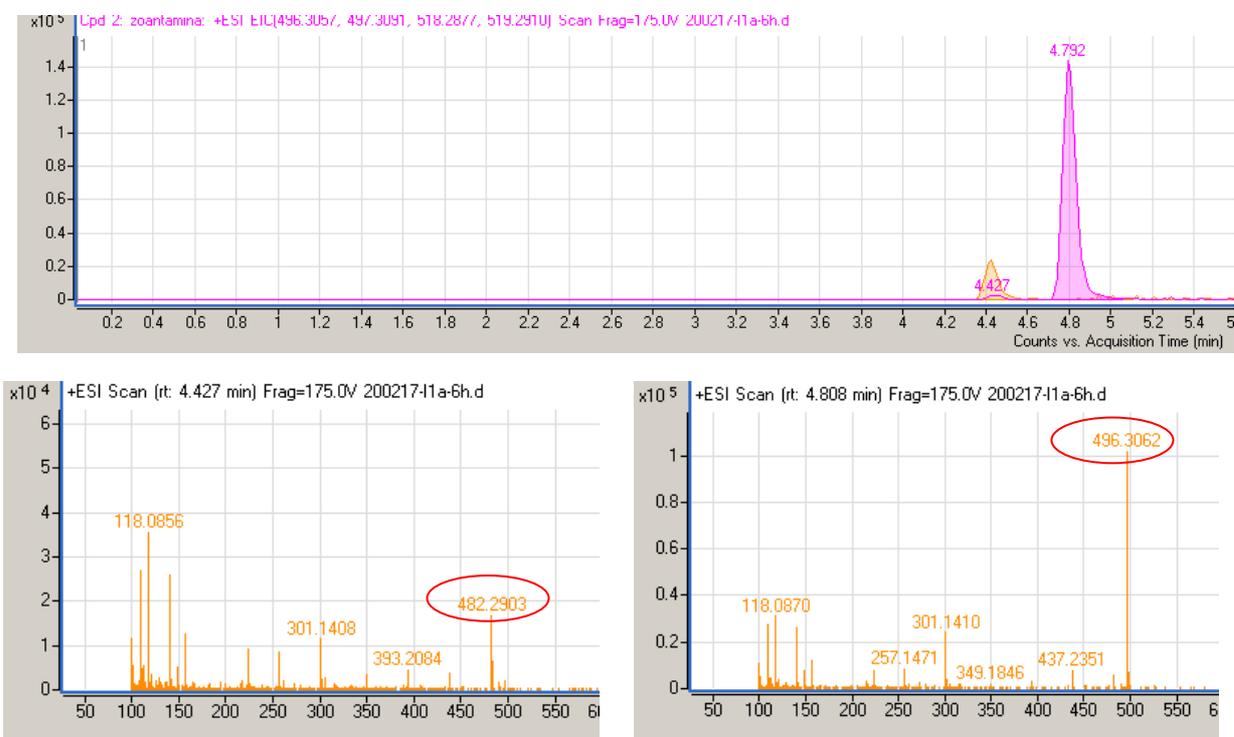


Fig 11.-Cromatogramas de la muestra: I1a6 e identificación de compuestos comparando el peso molecular teórico con el peso molecular obtenido.

4.2 Análisis de cesión de implantes

4.2.1 Implantes la

Las muestras de las disoluciones de los implantes la fueron analizados utilizando HPLC-HRMS. En los cromatogramas de la **Figura 12** se observan los dos picos característicos de los principios activos con tiempos de retención (RT) a 4,4 min para la Norzoantamina y a 4,8 min el pico característico de la Zoantamina.

Es importante destacar que en el cromatograma que representa a las 7 semanas no se detectó Zoantamina en el medio.

Finalmente, a las 14 semanas el cromatograma muestra una disminución en la cantidad de NZ y un ligero aumento en la cantidad de Z.

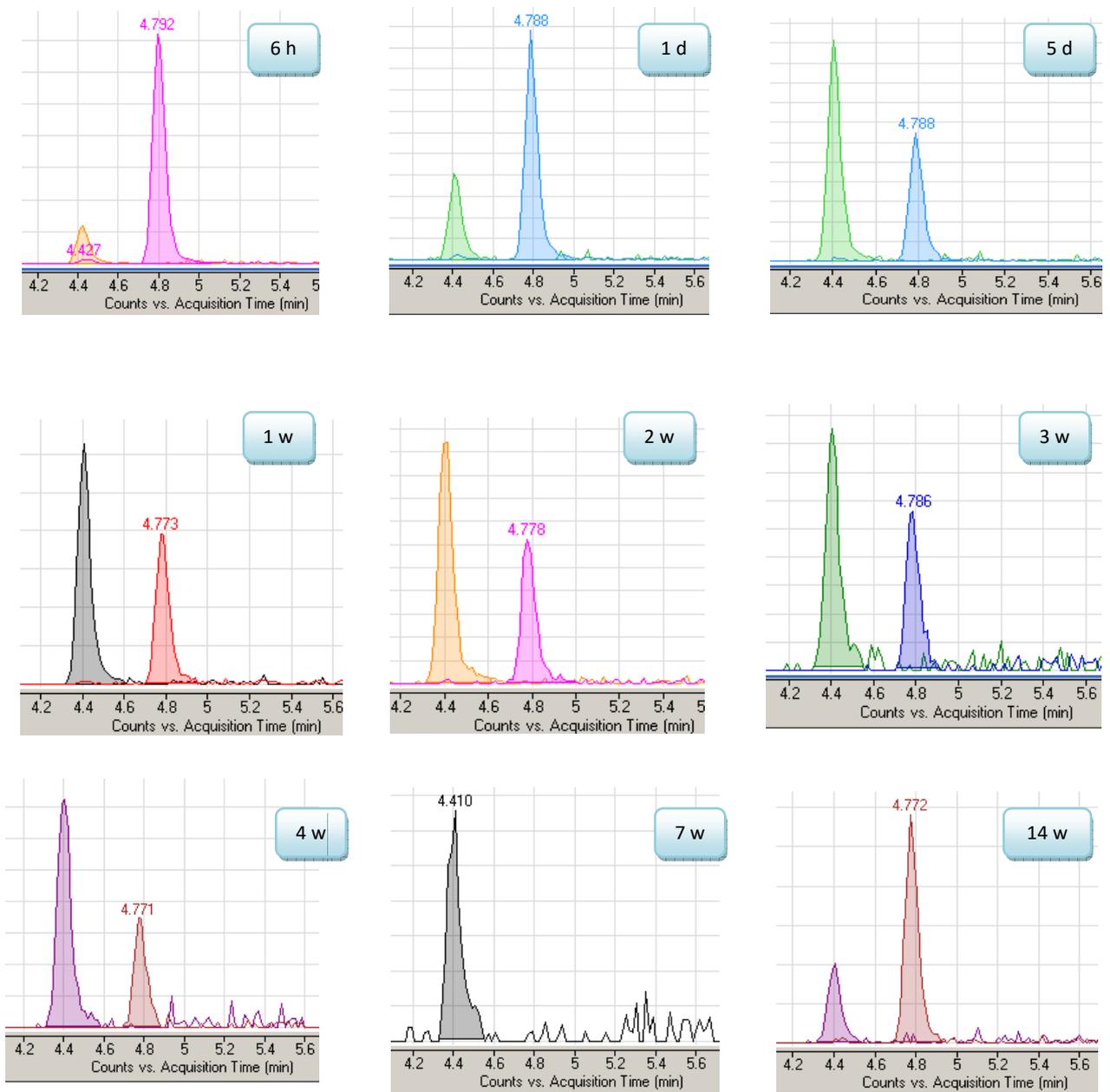


Fig 12.-Cromatogramas obtenidos del implante Ia a las 6 horas, 1 y 5 días y 1,2,3,4,7 y 14 semanas. A las 6 horas, se observa una pequeña cantidad de NZ y una gran cantidad liberada de Z. En cuanto a la muestra correspondiente a 1 día, sigue aumentando. Desde los 5 días hasta las 4 semanas, los cromatogramas presentan un patrón repetido; donde es mayoritaria la cantidad de NZ frente a la de Z.

Masa total de la formulación:

M Total formulación (μg)= 72

Suma de áreas:

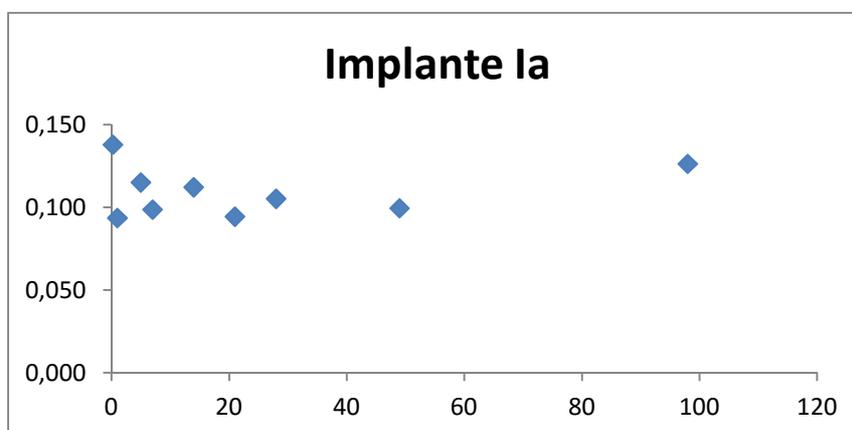
Muestra		Área	(NZ+Z)	Muestra		Área	(NZ+Z)
I1a(6h)	NZ	106130	751077	I1a(3w)	NZ	40443	65784
	Z	644947			Z	25341	
I1a(1d)	NZ	94790	329478	I1a(4w)	NZ	73150	103575
	Z	234688			Z	30425	
I1a(5d)	NZ	245257	390112	I1a(7w)	NZ	31336	31336
	Z	144855			Z	-	
I1a(1w)	NZ	12931	203410	I1a(14w)	NZ	45516	175364
	Z	79094			Z	129848	
I1a(2w)	NZ	144341	235082				
	Z	90741					

Con todos los datos anteriores, nos permite realizar las curvas de cesión de principios activos que representamos a continuación:

Tabla de resultados:

Tiempo	Días	NZ+Z	Conc (ppm)	Vm (ml)	MTotal retirada (μg)	MTotal cedida (μg)	% cedido
6 h	0,25	751077	0,033	0,5	0,0166	0,099	0,138
1 d	1	329478	0,017	0,5	0,0250	0,067	0,094
5 d	5	390112	0,019	0,5	0,0347	0,083	0,115
1 w	7	203410	0,012	0,5	0,0407	0,071	0,099
2 w	14	235082	0,013	0,5	0,0474	0,081	0,112
3 w	21	65784	0,007	0,5	0,0509	0,068	0,094
4 w	28	103575	0,008	0,5	0,0550	0,076	0,105
7 w	49	31336	0,006	0,5	0,0578	0,072	0,100
14 w	98	175364	0,011	0,5	0,0633	0,091	0,126

Curva de cesión:



4.2.2 Implantes IIa

En este caso, tanto para la NZ como la Z se observaron los mismos tiempos de retención (4,4 y 4,8 min respectivamente) a excepción de la muestra tomada a las 4 semanas, donde la NZ aparece a los 4,2 minutos y la Z a los 4,6 min.

Por otro lado se observa una mayor cantidad de NZ liberada que de Z que a su vez se ve disminuida en la muestra de las 4 semanas.

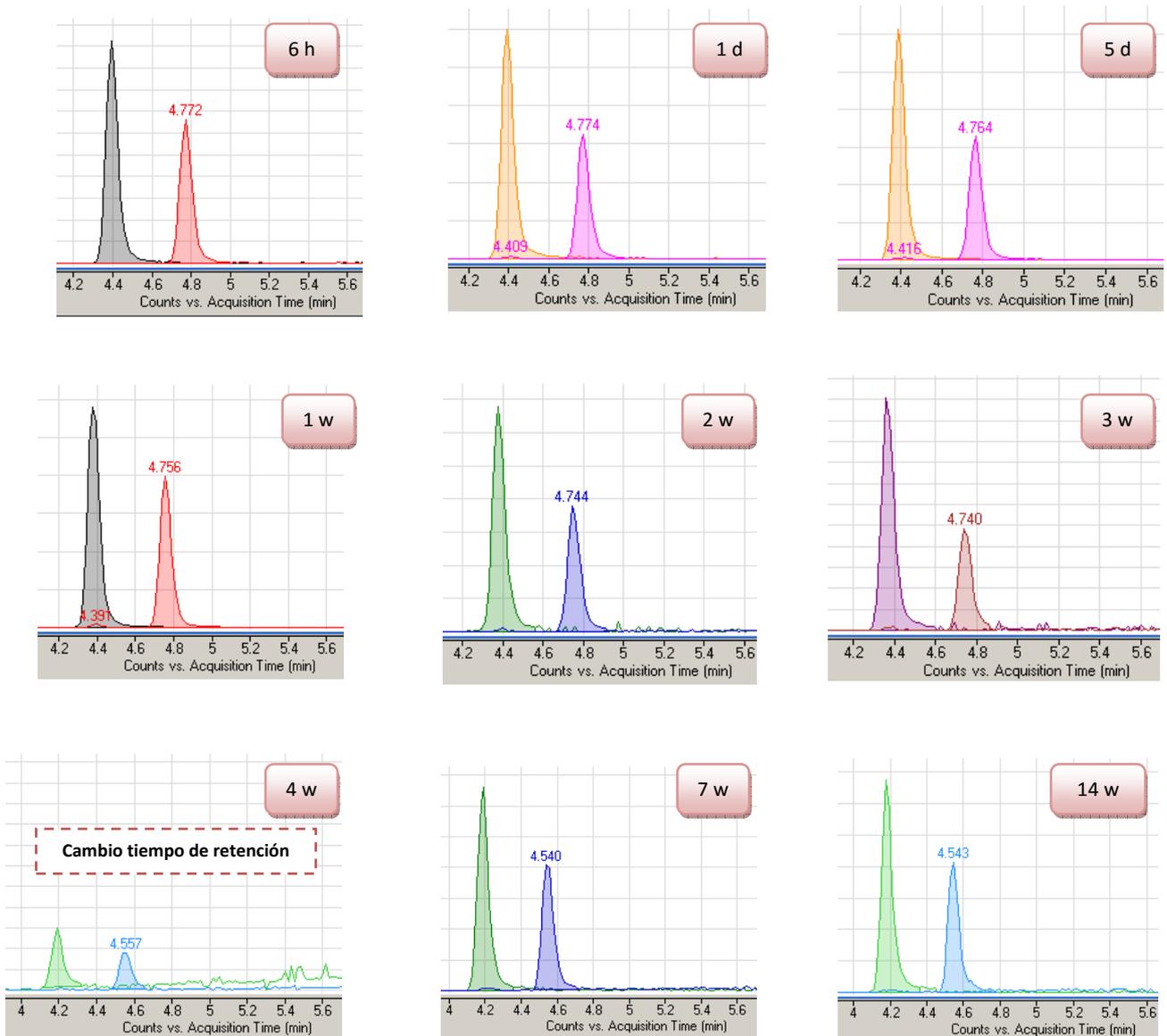


Fig 13.-Cromatogramas del implante IIa a las 6 horas, 1 y 5 días y 1,2,3,4,7 y 14 semanas.

Masa total de la formulación:

M Total formulación (µg)= 246

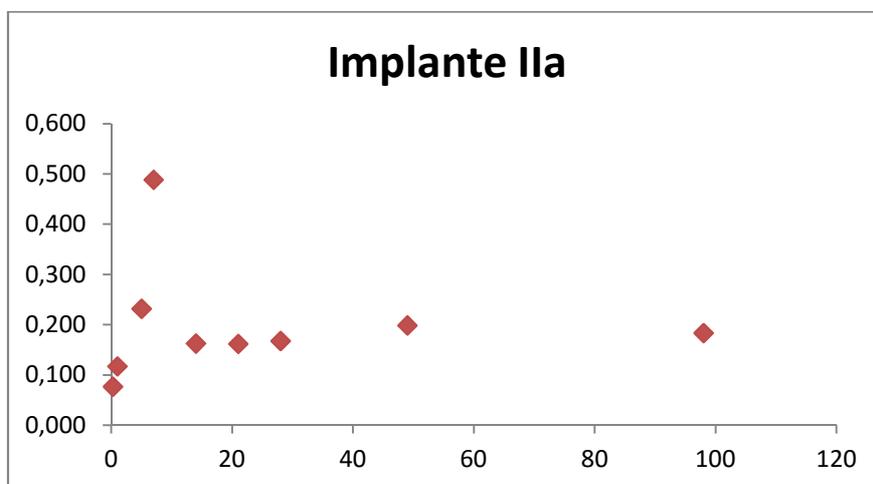
Suma de áreas:

Muestra		Área	(NZ+Z)	Muestra		Área	(NZ+Z)
I1a(6h)	NZ	929345	1527527	I1a(3w)	NZ	258104	372349
	Z	598182			Z	114245	
I1a(1d)	NZ	1384913	2119133	I1a(4w)	NZ	245114	414390
	Z	734220			Z	169276	
I1a(5d)	NZ	2726617	4204821	I1a(7w)	NZ	600656	987116
	Z	1478204			Z	386460	
I1a(1w)	NZ	5440123	8977939	I1a(14w)	NZ	483776	483776
	Z	3537816			Z	187285	
I1a(2w)	NZ	315696	490320				

Tabla de resultados:

Tiempo	Días	NZ+Z	Conc (ppm)	Vm (ml)	MTotal retirada (µg)	MTotal cedida (µg)	% cedido
6 h	0,25	1527527	0,063	0,5	0,0314	0,189	0,077
1 d	1	2119133	0,085	0,5	0,0742	0,288	0,117
5 d	5	4204821	0,165	0,5	0,1569	0,570	0,232
1 w	7	8977939	0,348	0,5	0,3309	1,201	0,488
2 w	14	490320	0,023	0,5	0,3425	0,400	0,163
3 w	21	372349	0,019	0,5	0,3518	0,398	0,162
4 w	28	414390	0,020	0,5	0,3619	0,412	0,168
7 w	49	987116	0,042	0,5	0,3830	0,488	0,199
14 w	98	483776	0,023	0,5	0,3944	0,452	0,184

Curva de cesión:



4.2.3 Resumen de resultados: Implantes

Como se puede observar en las curvas de cesión, el Implante la presenta una escasa liberación medianamente sostenida a lo largo del tiempo (% total cedido= 0,983%).

Tiempo	% cedido
6 h	0,138
1 d	0,094
5 d	0,115
1 w	0,099
2 w	0,112
3 w	0,094
4 w	0,105
7 w	0,100
14 w	0,126

Tabla 4.- Porcentaje cedido de principio activo con respecto al tiempo para el Implante la.

Por otro lado, el Implante Ila queda descartado debido a que se libera gran cantidad de principio activo desde el principio (% cedido 6h-1w= 0,914) por lo que la cesión a lo largo del tiempo se ve disminuida y para un ensayo a largo plazo como en nuestro caso no resulta eficiente.

Tiempo	% cedido
6 h	0,077
1 d	0,117
5 d	0,232
1 w	0,488
2 w	0,163
3 w	0,162
4 w	0,168
7 w	0,199
14 w	0,184

Tabla 5.- Porcentaje cedido de principio activo con respecto al tiempo para el Implante Ila.

Cabe destacar también la presencia de numerosas fluctuaciones en la cantidad liberada tanto en el implante la como en el implante Ila que puede atribuirse a la interacción de los principios activos con el soporte debido al equilibrio lactona-enamina que sufren estos alcaloides con ligeras variaciones de pH.

4.2.4 Microesferas la

Para los análisis de las preparaciones de microesferas se procedió de forma idéntica a los implantes y sus cromatogramas vuelven a presentar dos picos con tiempos de retención de 4,2 y 4,6 min correspondientes a NZ y Z. Además, predomina la cantidad liberada al medio de NZ frente a la de Z. En la muestra de las 4 semanas solo se observa un pico que se corresponde con la Z no observándose la presencia de la NZ.

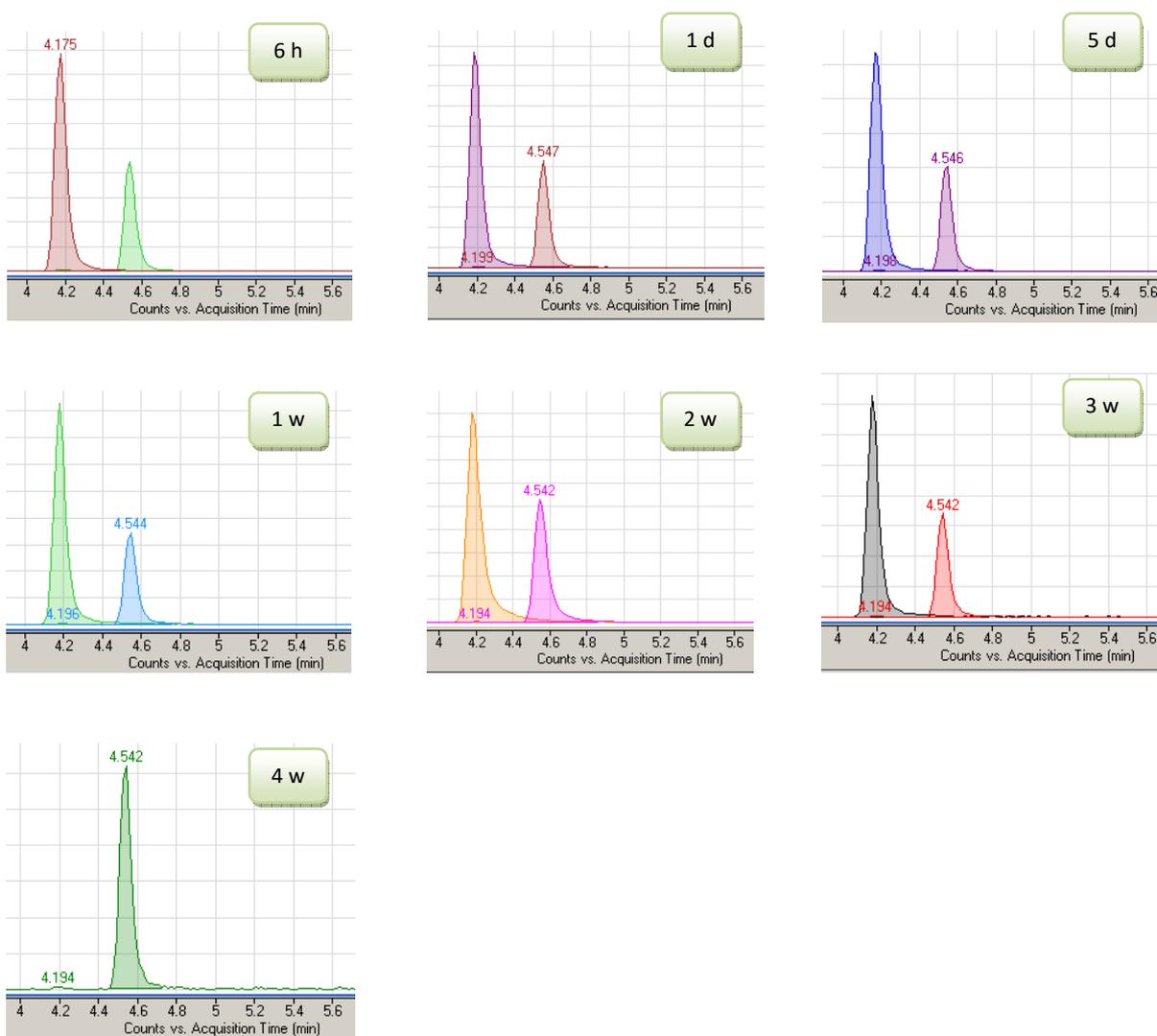


Fig 12.-Cromatogramas de la microesfera la a las 6 horas, 1 y 5 días y 1,2,3 y 4 semanas

Masa total de la formulación:

M Total formulación (µg)= 102,8

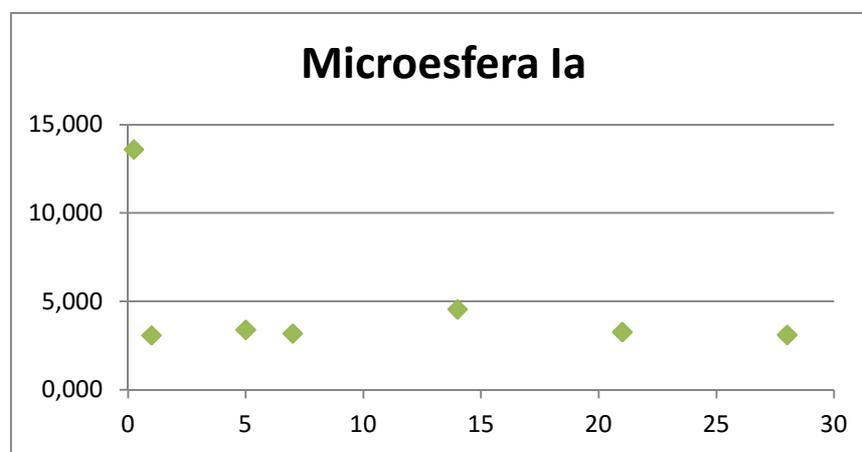
Suma de áreas

Muestra		Área	(NZ+Z)	Muestra		Área	(NZ+Z)
I1a(6h)	NZ	82267324	121575987	I1a(2w)	NZ	10899392	16764525
	Z	39308663			Z	5865133	
I1a(1d)	NZ	4886030	7179102	I1a(3w)	NZ	1643493	2398605
	Z	2293072			Z	755112	
I1a(5d)	NZ	6083474	8797385	I1a(4w)	NZ	-	554180
	Z	2713911			Z	554180	
I1a(1w)	NZ	3800070	5409381				
	Z	1609311					

Tabla de resultados:

Tiempo	Días	Área	Conc (ppm)	Vm (ml)	MTotal retirada (µg)	MTotal cedida (µg)	% cedido
6 h	0,25	121575987	4,660	0,5	2,3300	13,980	13,599
1 d	1	7179102	0,279	0,5	2,4696	3,168	3,081
5 d	5	8797385	0,341	0,5	2,6402	3,493	3,398
1 w	7	5409381	0,211	0,5	2,7460	3,275	3,186
2 w	14	16764525	0,646	0,5	3,0691	4,685	4,557
3 w	21	2398605	0,096	0,5	3,1172	3,358	3,266
4 w	28	554180	0,026	0,5	3,1300	3,194	3,107

Curva de cesión:



4.2.5 Microesferas IIa

De igual forma que en los casos anteriores, para las microesferas IIa se realiza el análisis mediante HPLC-HRMS. Así, cabe destacar que en la muestra correspondiente a las 6 horas se observa casi la misma cantidad de NZ que de Z. A medida que transcurre el tiempo, se observan cantidades muy variables de estos compuestos, habiendo alteraciones en las cantidades de NZ y Z liberadas.

Finalmente, a las 4 semanas se aprecia un importante aumento de la cantidad de Z frente a la de NZ.

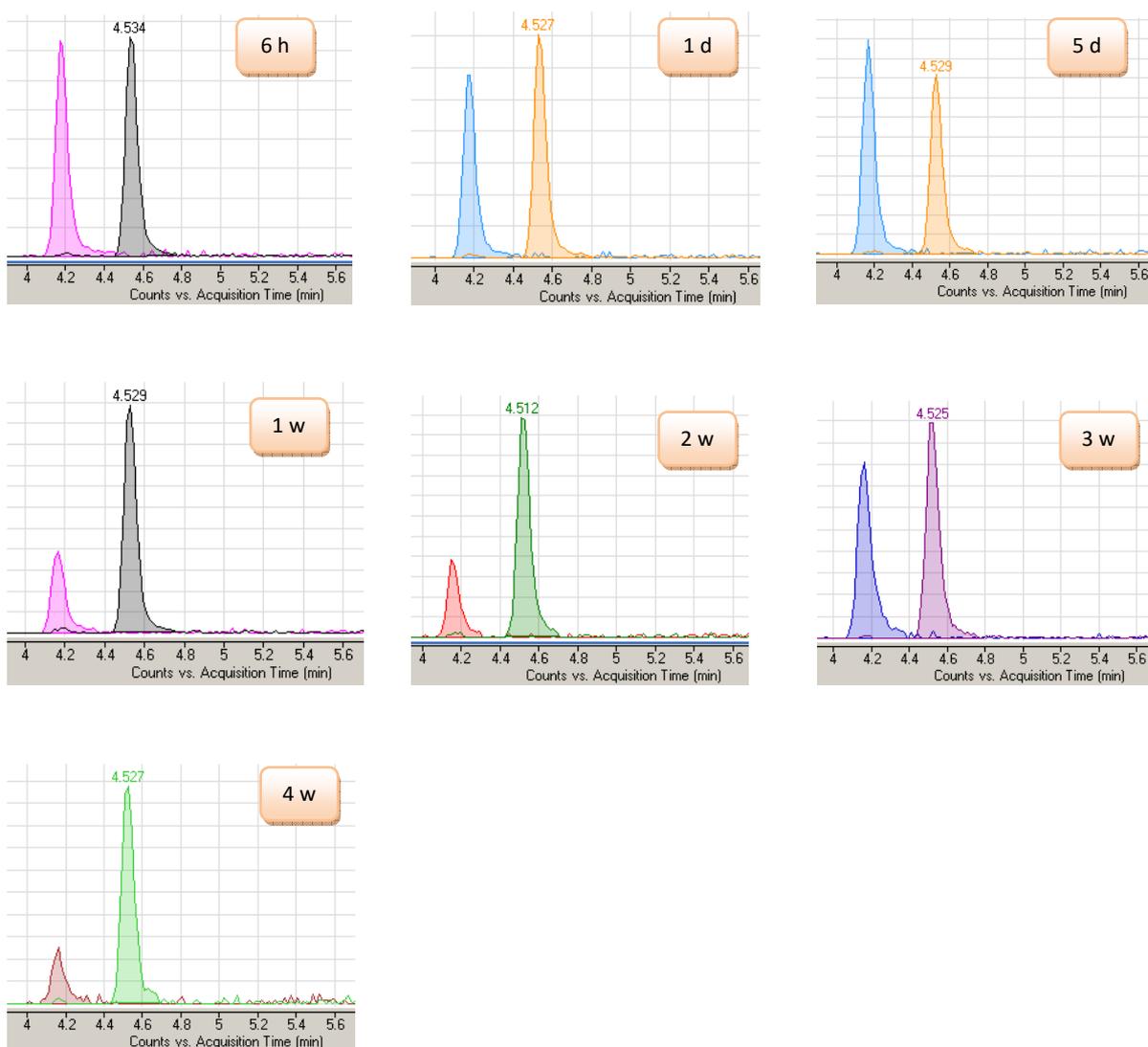


Fig 12.-Cromatogramas de la microesfera IIa a las 6 horas, 1 y 5 días y 1,2,3 y 4 semanas

Masa total de la formulación:

M Total formulación (μg)= 102,8

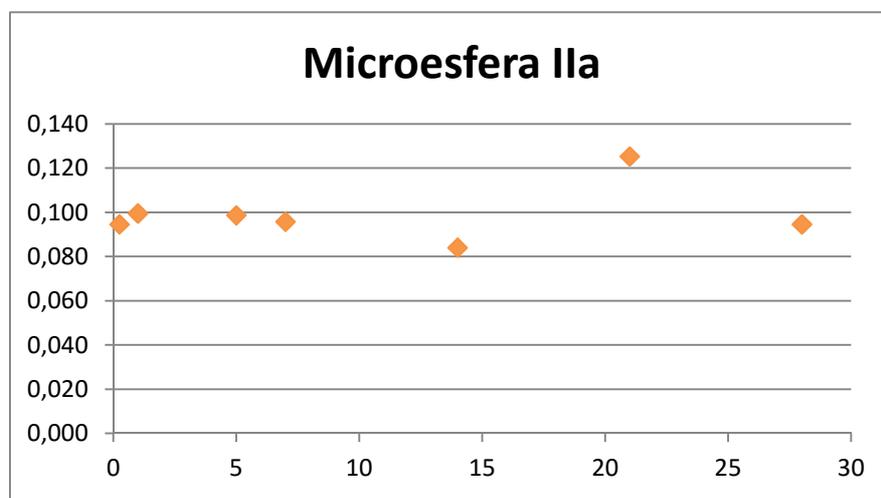
Suma de áreas

Muestra		Área	(NZ+Z)	Muestra		Área	(NZ+Z)
I1a(6h)	NZ	356981	705946	I1a(2w)	NZ	43960	178802
	Z	348965			Z	134842	
I1a(1d)	NZ	278827	612430	I1a(3w)	NZ	228294	487517
	Z	333603			Z	259223	
I1a(5d)	NZ	264221	484163	I1a(4w)	NZ	24302	121353
	Z	219942			Z	97051	
I1a(1w)	NZ	98182	358888				
	Z	260706					

Tabla de resultados:

Tiempo	Días	Área	Conc (ppm)	Vm	MTotal retirada (μg)	MTotal cedida (μg)	% cedido
6 h	0,25	705946	0,031	0,5	0,0157	0,094	0,095
1 d	1	612430	0,028	0,5	0,0296	0,099	0,100
5 d	5	484163	0,023	0,5	0,0410	0,098	0,099
1 w	7	358888	0,018	0,5	0,0501	0,095	0,096
2 w	14	178802	0,011	0,5	0,0557	0,084	0,084
3 w	21	487517	0,023	0,5	0,0672	0,125	0,125
4 w	28	121353	0,009	0,5	0,0717	0,094	0,095

Curva de cesión:



4.2.6 Resumen de resultados: Microesferas

En la curva de cesión de Microesferas la destaca la máxima liberación del principio activo a las 6 horas (% cedido= 13,599). Acto seguido se produce un rápido descenso de la liberación del mismo (% cedido= 3,081).

Tiempo	% cedido
6 h	13,599
1 d	3,081
5 d	3,398
1 w	3,186
2 w	4,557
3 w	3,266
4 w	3,107

Tabla 6.- Porcentaje cedido de principio activo con respecto al tiempo para la Microesfera Ia.

En cuanto a la curva de cesión de Microesferas IIa, observamos una liberación más gradual aunque con un mayor número de fluctuaciones.

Tiempo	% cedido
6 h	0,095
1 d	0,100
5 d	0,099
1 w	0,096
2 w	0,084
3 w	0,125
4 w	0,095

Tabla 6.- Porcentaje cedido de principio activo con respecto al tiempo para la Microesfera IIa.

4.3 Discusión

Tras estudiar y analizar los datos de los ensayos de cesión para cada uno de los sistemas biodegradables (Implante Ia, Implante IIa, Microesfera Ia y Microesfera IIa), se ha observado lo siguiente:

- En primer lugar, una cesión gradual en alguna de las formulaciones (Implante Ia y Microesfera IIa) aunque los valores de compuestos no son adecuados.
- En segundo lugar, se puede apreciar una cantidad máxima liberada de principio activo a tiempos muy cortos Implante IIa (1 semana) y Microesfera Ia (6 horas) que hacen poco adecuado estas formulaciones para ensayos con implantes óseos a largo plazo.

Sistema biodegradable	% cedido
Implante IIa	(1w)= 0,488
Microesfera Ia	(6h)= 13,599

Tabla 7.- Porcentaje cedido de principio activo para las formulaciones: Implante IIa y Microesfera Ia.

Esto puede deberse a la interacción entre el principio activo y los componentes de implantes y microesferas debido al equilibrio lactona-enamina que presentan este tipo de alcaloides.

- Por último, es de interés conocer el porcentaje total de cantidad de principio activo cedida al medio para cada una de las formulaciones; destacando la Microesfera Ia (% total= 34,159). Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente sería una formulación poco adecuada dado a que su máxima liberación tiene lugar a las 6 horas.

Sistema biodegradable	% Total
Implante Ia	0,983
Implante IIa	1,788
Microesfera Ia	34,195
Microesfera IIa	0,693

Tabla 8.- Porcentaje total cedido de cada una de las formulaciones.

5. Conclusión

Los ensayos ponen de manifiesto las formulaciones, y la composición de las mismas, realizadas hasta el momento no son las más adecuadas para realizar los ensayos de larga duración *in vivo* dado a la presencia de fluctuaciones en las cantidades cedidas de los principios activos. A la vista de los datos, estas formulaciones no nos garantizan una cesión continuada y controlada a lo largo del tiempo y por tanto se debe replantear su composición.

Para evitar estas fluctuaciones se propone la reformulación de microesferas e implantes, trabajo que se está realizando actualmente, con el fin de conseguir una cesión más estable y duradera.

7. Bibliografía

[1] Cervantes García E, Senabre Gallego JM^a, Cano Pérez C, Lorente Betoret M^a, Salas Heredia E, Barber Valdés et al. Denosumab en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. SVR [Internet]. 2016, [citado 20 mayo 2017]; 6;4:3-8. Disponible en:

<http://www.svreumatologia.com/wp-content/uploads/2016/12/svr-revistas-volumen-6-numero-4-noviembre-2016.pdf>

[2] Osteoporosis 2017. *Britannica Academic*. [Internet]. [citado 16 mayo] Disponible en:

<http://academic.ub.edu/accedys2.bbtk.ull.es/levels/collegiate/article/osteoporosis/57601s/collegiate/article/osteoporosis/57601>

[3] M.-L. Bourguet-Kondracki, J.-M. Kornprobst. Marine Pharmacology: Potentialities in the Treatment of Infectious Diseases, Osteoporosis and Alzheimer's Disease. *Adv Biochem Eng Biotechnol* [Internet]. 2005 [citado 1 febrero 2017]; 120-124. Disponible en:

<https://link.springer.com/chapter/10.1007%2Fb135824>

[4] Francisco Cen-Pacheco, Manuel Norte Martín, José Javier Fernández, Antonio Hernández Daranas. New Oxidized Zoanthamines from a Canary Islands Zoanthus sp. *Mar. Drugs*. [Internet]. 2014 [citado 1 febrero 2017]; 5188-5196. Disponible en:

<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/10/5188/htm>

[5] Douglas C. Behenna, Jennifer L. Stockdill, Brian M. Stoltz. The biology and chemistry of the zoanthamine alkaloids. *MNPs* [Internet]. 2008 [citado 30 enero 2017]; 2366-2386. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200703172/epdf>

[6] Antonio H. Daranas, José J. Fernández, José A. Gavín, Manuel Norte. New alkaloids from a Marine Zoanthid. Tetrahedron [Internet]. 1999 [citado 30 enero 2017]; 5539-5546. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402099001982?via%3Dihub>

[7] Antonio Hernández, Ricardo Reyes, Esther Sánchez, María Rodríguez-Évora, Araceli Delgado, Carmen Évora. *In vivo* osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. SFBM [Internet]. 2012 [citado 6 Marzo 2017]; 2383-2385. Disponible en:

<http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=8dec91ff-9fa7-4491-82cc-b200e1525db3%40sessionmgr4006&vid=1&hid=4114>

[8] Harris, Daniel C. Cromatografía de alta eficacia. En: Análisis químico cuantitativo. 2ª edición. Barcelona: Reverté; 2001, 224-258.