IX Congreso de la Sociedad Española de

Farmacia Industrial y Galénica

Universidad de Navarra

Pamplona – 1, 2 y 3 de febrero de 2009

PRESENTACIÓN

Pamplona, 1 de Febrero de 2009

Estimados amigos y compañeros,

Nos es muy grato recibiros en la Universidad de Navarra con motivo del **IX Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica.**

Tanto el comité organizador como el científico han trabajado con esmero para conseguir un programa científico competitivo y de interés en el campo de la Tecnología Farmacéutica, Biofarmacia y Farmacocinética, y buscando en todo momento la mayor participación posible de todos los que trabajamos en esta área de investigación y desarrollo.

Confiamos además que el debate sobre las expectativas de la Sociedad en relación a la formación de nuevos Profesionales desde nuestra Área de Conocimiento nos ayude a mejorar el carácter formativo de nuestra docencia.

Por último, esperamos que durante estos días podamos aprender, compartir nuevas ideas y proyectos, además de disfrutar del ambiente de esta ciudad.

Bienvenidos a Pamplona,

El Comité Organizador

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Miguel Sanz Sesma
Presidente del Gobierno de Navarra

Excmo. Sr. D. Ángel José Gómez Montoro
Rector de la Universidad de Navarra

Excma. Sra. Dña. Yolanda Barcina Angulo
Alcaldesa de Pamplona

Excma. Sra. Dña. María Kutz Peironcely
Consejera de Salud del Gobierno de Navarra

Excmo. Sr. D. Luis Montuenga Badía
Vicerrector de Investigación de la Universidad de Navarra

Ilma. Sra. Dña. Iciar Astiasarán Anchia
Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra

Sr. D. Pedro Capilla Martínez
Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

Sra. Dña. Mª Pilar García Ruiz
Presidenta del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Navarra

Sr. D. Juan Manuel Irache Garreta
Presidente de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica

COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTE HONORÍFICO

D. Daniel Fos

PRESIDENTE

D. Ignacio Fernández de Trocóniz

SECRETARIA

Dña. Conchita Tros de Ilarduya

TESORERA

Dña. Mª Jesús Garrido

VOCALES:

Dña. María Blanco

Dña. Carmen Dios

Dña. Socorro Espuelas

D. Joaquín Giráldez

Dña. María del Mar Goñi

D. Juan Manuel Irache

D. Fernando Martínez-Galán

Dña. Cristina Martínez

Dña. María Jesús Renedo

Dña. Pilar Ygartua

Dña. Arantza Zornoza

COMITÉ CIENTÍFICO

PRESIDENTE

D. Ángel Concheiro (Universidad de Santiago de Compostela)

SECRETARIO

D. Manuel Guzmán (Universidad de Alcalá de Henares)

VOCALES

D. Fernando Caro (Universidad San Pablo-CEU)

Dña. Helena Colom (Universidad de Barcelona)

Dña. Rosa Jiménez-Castellanos (Universidad de Sevilla)

D. Matías Llabrés (Universidad de La Laguna)

D. José Luis Pedráz (Universidad del Pais Vasco)

D. José Esteban Peris (Universidad de Valencia)

Dña. Adolfina Ruiz (Universidad de Granada)

Dña. Amparo Sánchez (Universidad de Salamanca)

Dña. Ana Isabel Torres (Universidad Complutense de Madrid)

Dña. Conchita Tros de ILarduya (Universidad de Navarra)

PROGRAMA DEL IX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FARMACIA INDUSTRIAL Y GALÉNICA

Domingo 1 de Febrero

16:00 Entrega de documentación

16:30 Sesión inaugural

- Ilma. Sra. Dña. Iciar Astiasarán Anchía
Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra

- Sr. D. Rafael Muguerza Eraso
Director del Servicio de Innovación y Sociedad de la Información (Departamento de Innovación, Empresa y Empleo)

- Sr. D. Guillermo García del Barrio
Director del Instituto Científico y Tecnológico, Universidad de Navarra

- Sr. D. Ignacio Fernández de Trocóniz Fernández
Presidente del IX Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG)

17:00 Conferencia Plenaria 1: Sr. D. Paolo Colombo (University of Padova, Italy)
"Assemblage of modules for drug release control and combination products"
Moderadora: Dña. Rosa Jiménez-Castellanos

18:00 Entrega del II Premio de Investigación SEFIG

19:00 Vino español

Lunes 2 de Febrero

9:00 Sesión I: Nuevas estrategias para la liberación de medicamentos

Conferencia Plenaria 2: Sr. D. José Martínez Lanao (Universidad de Salamanca)
"Portadores biológicos para la vectorización de fármacos"
Moderadores: D. Angel Concheiro y D. Juan José Torrado

10:00 Comunicaciones orales

10:00 **Hidrogeles microparticulados con afinidad por sales biliares**

F. Yañez, I. Chianella, S.A. Piletsky, A. Concheiro y C. Alvarez-Lorenzo

10:15 **Liberacion de VEGF a partir de células microencapsuladas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

A. Portero, R.M. Hernández, G. Orive, D. Antequera, C. Spuch, E. Carro, J.L. Pedraz

10:30 ***Micropartículas de PLGA cargadas con agentes neuroprotectores (GDNF y BDNF). Un tratamiento potencial para el glaucoma***

P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina Martínez, B. Tucker, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell.

10:45 **Patches for transdermal delivery of sumatriptan succinate: *in vitro* and *in vivo* physical characterization**

C. Balaguer-Fernández, C. Padula, M.A. Calatayud-Pascual, A. Femenía-Font, V. Merino, F. Marra, S. Nicoli, P. Santi, A. López-Castellano.

11:00 **Atomización mediante flow focusing: aplicaciones farmacéuticas**

Lucía Martín-Banderas, Mª José Cózar-Bernal, Elena de Castro-Hernández, A. Rodríguez-Gil, María Flores-Mosquera, Josefa Álvarez-Fuentes, Mª Ángeles Holgado, Alfonso Gañán-Calvo, Mercedes Fernández-Arévalo

11:15 **Pseudopolirrotaxanos de Pluronic y ciclodextrinas: propiedades e interés farmacéutico**

Luis Nogueiras-Nieto, Carmen Alvarez-Lorenzo, Isabel Sandez-Macho, Angel Concheiro, Francisco J. Otero-Espinar

11:30 Café/sesión de pósters

12:00 Mesa redonda

- Sr. D. José Martínez Lanao (*moderador)* (Universidad de Salamanca)
- Sr. D. Paolo Colombo (University of Padova, Italy)
- Sr. D. Manfred Ogris (Ludwig-Maximilians University, Munich)

13:30 Almuerzo

15:30 Sesión II: Vehiculización de fármacos y genes terapéuticos en terapia antitumoral

Conferencia Plenaria 3: Sr. D. Manfred Ogris (Department of Pharmacy, Center of Drug Research, Ludwig-Maximilians University, Munich)
"Macromolecular drug carriers for targeting of therapeutic nucleic acids to tumors"
Moderadores: D. Antonio Rabasco y Dña. Conchita Tros de Ilarduya

16:30 Comunicaciones orales

16:30 **Evaluación de la capacidad de transfección "in vivo" de nanopartículas sólidas lipídicas tras su administración en ratones por vía intravenosa**

A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, MA Solinís, AR Gascón, E. Echevarría, JM Rodríguez, J.L. Pedraz

16:45 **Diseño de nanopartículas de poli(ε-caprolactona) como sistemas transportadores de Tegafur**

J.L. Arias, M.A. Luque-Ramos, M. López-Viota, V. Gallardo

17:00 **Evaluación y caracterización in-vitro del efecto antitumoral de derivados del platino administrados bajo diferentes formas farmacéuticas**

D. Moreno, S. Zalba, I. Navarro, C. Tros de ILarduya, MJ Garrido

17:15 **Utilización del plásmido TK-GFP-luciferasa en el estudio de la bioseguridad de microsistemas celulares administrados por diferentes vías**

E. Santos, G. Orive, R.M. Hernández, R. Catena, A. Calvo, J.L. Pedraz

17: 30 **Poly (anhidride) nanoparticles for oral delivery of paclitaxel**

Maite Agüeros, Paloma Areses, Miguel Angel Campanero, Gemma Quincoces, Ivan Peñuelas, Juan Manuel Irache

17:45 Café/sesión de pósters

18:30 Asamblea general SEFIG

Martes 3 de Febrero

9:00 Sesión III: Biofarmacia y Farmacocinética

Conferencia Plenaria 4: Sr. D. Alexander Staab (Head of Modelling and Simulation , Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. Germany) "Implementation of pharmacometrics/modelling and simulation in clinical drug development: General aspects and the Boehringer Ingelheim experience"
Moderadores: D. José Esteban Peris y D. Ignacio Fernández de Trocóniz

10:00 Comunicaciones orales

10:00 **Modelado del transporte del derivado de vinblastina KAR-2 en rata y en células CACO-2**

Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Oltra-Noguera D, Ovadi, J, Merino V, Bermejo M

10:15 **Administración pulmonar de vancomicina en forma de vesículas lipídicas**

Jesús Valle, M.J. de, González López, F., Sánchez Navarro, A.

10:30 **Modelización farmacocinética-farmacodinámica de la eficacia antitumoral del cisplatino administrado mediante nanopartículas poliméricas en un modelo xenograf**

D. Moreno, I.F. Trocóniz, S. Zalba, I. Navarro, MJ Garrido

10:45 **Transporte de cortisol a través de un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica.**

C. Navarro, I. Gonzalez-Alvarez, V. Merino, M. Manku, VG. Casabó, M. Bermejo

11:00 Café/sesión de pósters

11:45 Mesa redonda

- Sr. D. Vicente Casabó (*moderador*) (Universidad de Valencia)
- Sra. Dña. Alicia Rodríguez (Universidad del Pais Vasco (UPV)-Vitoria)
- Sr. D. José Domenech (Universidad de Barcelona)

13:15 Almuerzo

15:30 Sesión IV: Docencia

Mesa redonda: "Formación Académica de los alumnos de Farmacia: Presente y Futuro"

- Sr. D. José B. Fariña (Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna) (*moderador)*

- Sra. Dña. Teresa Sánchez (Agencia Nacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación, ANECA)

- Sr. D. Pere Berga (Representante del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

- Sr. D. José Carlos Montilla (Comisión Nacional de Especialización en Farmacia Industrial y Galénica)

- Sr. D. Víctor Jiménez (Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario, Universidad de Valencia)

17:30 Café /sesión de pósters

18:00 Acto de clausura

- Excmo. Sr. D. Luis Montuenga Badía
Vicerrector de investigación de la Universidad de Navarra

- Excmo. Sr. D. José María Roig Aldasoro
Consejero de Innovación, Empresa y Empleo del Gobierno de Navarra

- Excma. Sra. Dña. Yolanda Barcina Angulo
Alcaldesa de Pamplona

- Sr. D. Enrique Ordieres Sagarminaga
Presidente de Laboratorios CINFA

- Sr. D. Juan Manuel Irache Garreta
Presidente de la SEFIG

21:00 Cena de gala

SUMARIO

PONENCIAS

P-01 ASSEMBLAGE OF MODULES FOR DRUG RELEASE CONTROL AND COMBINATION PRODUCTS
Paolo Colombo 25

P-02 PORTADORES BIOLÓGICOS PARA LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS
José Martínez Lanao 27

P-03 MACROMOLECULAR DRUG CARRIERS FOR TARGETING OF THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS TO TUMORS
Manfred Ogris 29

P-04 IMPLEMENTATION OF PHARMACOMETRICS/MODELLING AND SIMULATION IN CLINICAL DRUG DEVELOPMENT: GENERAL ASPECTS AND THE BOEHRINGER INGELHEIM EXPERIENCE
Alexander Staab 31

COMUNICACIONES ORALES

CO-01 HIDROGELES MICROPARTICULADOS CON AFINIDAD POR SALES BILIARES
F. Yañez, I. Chianella, S.A. Piletsky, A. Concheiro y C. Alvarez-Lorenzo. 35

CO-02 LIBERACION DE VEGF A PARTIR DE CELULAS MICROENCAPSULADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
A. Portero, R.M. Hernández, G. Orive, D. Antequera, C. Spuch, E. Carro, J.L. Pedraz. 37

CO-03 MICROPARTÍCULAS DE PLAGA CARGADAS CON AGENTES NEUROPROTECTORES (GDNF Y BDNF). UN TRATAMIENTO POTENCIAL PARA EL GLAUCOMA
P. Checa-Casalengua, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina Martínez, B. Tucker, M.J. Young, R. Herrero-Vanrell. 39

CO-04 PATCHES FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF SUMATRIPTAN SUCCINATE: *IN VITRO* AND *IN VIVO* PHYSICAL CHARACTERIZATION
C. Balaguer-Fernández, C. Padula, M.A. Calatayud-Pascual, A. Femenía-Font, V. Merino, F. Marra, S. Nicoli, P. Santi, A. López-Castellano. 41

CO-05 ATOMIZACION MEDIANTE FLOW FOCUSING: APLICACIONES FARMACÉUTICAS
Lucía Martín-Banderas, Mª José Cózar-Bernal, Elena de Castro-Hernández, A. Rodríguez-Gil, María Flores-Mosquera , Josefa Álvarez-Fuentes, Mª Ángeles Holgado, Alfonso Gañán-Calvo, MercedesFernández-Arévalo. 43

CO-06 PSEUDOPOLIRROTAXANOS DE PLURONIC Y CICLODEXTRINAS: PROPIEDADES E INTERÉS FARMACÉUTICO
Luis Nogueiras-Nieto, Carmen Alvarez-Lorenzo, Isabel Sandez-Macho, Angel Concheiro, Francisco J. Otero-Espinar 45

CO-07 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN "IN VIVO" DE NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS TRAS SU ADMINISTRACIÓN EN RATONES POR VÍA INTRAVENOSA
A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, M.A. Solinís, AR Gascón, E. Echevarría, JM Rodríguez, J.L. Pedraz 47

CO-08 DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO SISTEMAS TRANSPORTADORES DE TEGAFUR
J.L. Arias, M.A. Luque-Ramos, M. López-Viota, V. Gallardo 49

CO-09 EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN-VITRO* DEL EFECTO ANTITUMORAL DE DERIVADOS DEL PLATINO ADMINISTRADOS BAJO DIFERENTES FORMAS FARMACÉUTICAS
Daniel Moreno, Sara Zalba, Iñigo Navarro, Conchita Tros de Ilarduya, María J Garrido 51

CO-10 UTILIZACIÓN DEL PLÁSMIDO TK-GFP-Luciferasa EN EL ESTUDIO DE LA BIOSEGURIDAD DE MICROSISTEMAS CELULARES ADMINISTRADOS POR DIFERENTES VÍAS
E. Santos, G. Orive, R.M. Hernández, R. Catena, A. Calvo, J.L. Pedraz 55

CO-11 POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR ORAL DELIVERY OF PACLITAXEL
M. Agüeros, P. Areses, M.A. Campanero, G. Quincoces, I. Peñuelas, J.M. Irache 57

CO-12 MODELADO DEL TRANSPORTE DEL DERIVADO DE VINBLASTINA KAR-2 EN RATA Y EN CÉLULAS CACO-2.
Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Oltra-Noguera D, Ovadi, J, Merino V, Bermejo M 59

CO-13 ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE VANCOMICINA EN FORMA DE VESÍCULAS LIPÍDICAS
Jesús Valle, M.J. de, González López, F., Sánchez Navarro, A. 61

CO-14 MODELIZACIÓN FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA DE LA EFICACIA ANTITUMORAL DEL CISPLATINO ADMINISTRADO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EN UN MODELO XENOGRAF
D. Moreno, I.F. Trocóniz, S. Zalba, I. Navarro, MJ Garrido 63

CO-15 TRANSPORTE DE CORTISOL A TRAVÉS DE UN MODELO *IN VITRO* DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.
C. Navarro, I. Gonzalez-Alvarez, V. Merino, M. Manku, VG. Casabó, M. Bermejo 65

POSTERS

TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

PO-01 LUCIFER YELLOW FRENTE A MANITOL COMO MARCADORES DE LA INTEGRIDAD DE LAS MONOCAPAS CACO-2 PARA ENSAYOS DE PERMEABILIDAD
Centelles A, Gonzalez-Alvarez I, Merino V, Bermejo MV 71

PO-02 APLICACIÓN DEL MÉTODO BOOTSTRAP A LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE FÁRMACOS: PREPARADOS COMERCIALES DE INSULINA HUMANA
Oliva, A., Fariña, J.B., Llabrés, M. 73

PO-03 MÉTODO CAPILAR PARA EL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE ELEMENTOS FINITOS
M. Llabrés, A. Santoveña, Mateu, V. 75

PO-04 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE BUENA COMPRESIBILIDAD DE DISGREGANTES A TRAVÉS DE LA METODOLOGÍA SEDEM
Johnny E. Aguilar Díaz, E Garcia-Montoya, P.Pérez-Lozano, M. Miñarro, JR Ticó, JM Suñé-Negre 77

PO-05 THE "MOZART EFFECT" IN CANCER THERAPY
Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Alonso V, Bermell MA, Bermejo MV 79

PO-06 HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF NADOLOL AFTER *IN VITRO* TRANSDERMAL DIFFUSION STUDIES
M.A. Calatayud-Pascual, C. Balaguer-Fernández, A. Femenía-Font, V. Merino, A. López-Castellano 81

PO-07 COMPRIMIDOS IMPLANTABLES DE hGH: CORRELACIÓN IN VITRO-IN VIVO.
Santoveña A, Fariña JB, Llabrés M, Zhu Y, Dannies P 85

PO-08 ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE VEHICULOS TRANDERMICOS: GEL PLURONIC Y PLO (Pluronic Lecithin Organogel)
Clares, B., Ruiz, Mª A., Gálvez, P., y Gallardo, V. 87

PO-09 DESARROLLO DE PARCHES TRANSDÉRMICOS DE NORTRIPTILINA CON DIFERENTES MATRICES POLIMERICAS
J. J. Escobar-Chávez, V. Merino, M. Merino-Sanjuán, A. Nácher, A. Ganem-Quintanar, O. Díez-Sales, M. Herráez 89

PO-10 DRUG RELEASE KINETICS AND FRONTS MOVEMENT STUDIES FROM MATRICES COMBINING SWELLABLE AND INERT POLYMERS: EFFECT OF HPMC WITH DIFFERENT DEGREES OF SUBSTITUTION
J.J. Escudero, C. Ferrero, M.R. Jiménez-Castellanos. 91

PO-11 LIPID NANOPARTICLES OF EDELFOSINE: A STRATEGY TO IMPROVE ITS ORAL BIOAVAILABILITY
A. Estella-Hermoso de Mendoza, MA. Campanero, F. Mollinedo, MJ. Blanco-Príeto 93

PO-12 MODELIZACION DE LA MICROESTRUCTURA DE PELETS A PARTIR DE DATOS DE POROSIMETRIA DE INTRUSION DE MERCURIO
A. Gómez-Carracedo, C. Alvarez-Lorenzo, R. Martínez-Pacheco, A. Concheiro, J.L. Gómez-Amoza 95

PO-13 SIMULACION DEL PROCESO DE CAPTACION DE AGUA EN PELETS MATRICIALES A BASE DE EUDRAGIT SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS POST-ELABORACION
L.C.L. Sá Barreto, L. Alonso, R. Martínez-Pacheco, J.L. Gómez-Amoza 99

PO-14 DESARROLLO DE UNA VACUNA INTRANASAL FRENTE A A LA DISENTERÍA BACILAR MEDIANTE NANOPARTÍCULAS
A.I. Camacho, Maria Luisa Araújo, J.M. Irache, C. Gamazo 101

PO-15 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y DE LA PRESENCIA DE PVP EN LA LIBERACIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE COMPRIMIDOS MATRICIALES LIPÍDICOS
M. M. Puebla González, M. V. Margarit Bellver, M. T. Marín Boscá 103

PO-16 APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS COMO MÉTODO DE ESTABILIZACIÓN DE GELES NATURALES DE A. VERA L.
Hernández, B., Llabrés, M., Fariña, J.B., Pagán, R.., Somolinos, M. 105

PO-17 DESARROLLO DE COLOIDES MAGNÉTICOS DE ETILCELULOSA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS ANTITUMORALES
M. López-Viota, J.L. Arias, V. Gallardo, M.A. Ruiz 107

PO-18 PREPARACIÓN DE SISTEMAS COLOIDALES POLIMÉRICOS COMO VEHÍCULOS DEL ALCALOIDE CANTHIN-6-ONE
G. Cebrián, J.L. Arias, E. Poupon, M.A. Ruiz 109

PO-19 CHARACTERIZATION OF OCULAR INSERTS BASED ON SODIUM HYALURONATE/HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE.
M. Cabrioulu, S. Mura, V. Merino, M. Merino-Sanjuán, A. Nácher, M. Manconi, A. M. Fadda, O. Díez-Sales 111

PO-20 MICROENCAPSULATION OF PURIFIED HUMAN BIOACTIVE RECOMBINANT GDNF
E. Ansorena, E. Garbayo, J.L. Lanciego, M.S. Aymerich, M.J. Blanco-Príeto 113

PO-21 ESTUDIO PRELIMINAR DE ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE UNA MEZCLA INTRAVENOSA PARACETAMOL-TRAMADOL
V. Merino-Bohórquez, M.J.Cózar-Bernal, S. Salas, J. Alvarez-Fuentes, M. Cameán, M. D. Guerrero, M.A. Holgado, M. Fernández-Arévalo 115

PO-22 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEO POR HPLC DE PARACETAMOL Y TRAMADOL
V. Merino-Bohóquez, M.J.Cózar-Bernal, S. Salas, J. Alvarez-Fuentes, M. Cameán, M.D. Guerrero, M.A. Holgado, M. Fernández-Arévalo 117

PO-23 DEVELOPMENT OF PLGA-NANOPARTICLES OF DOXEPIN HYDROCHLORIDE
X. Garcia, E. Escribano, J. Doménech 119

PO-24 EFECTOS DE UN CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO EN LA BIODISTRIBUCIÓN DEL HIERRO EN UN FOCO INFLAMATORIO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN RATÓN
E. Escribano, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, J. G. Valdivia, C. I. Marquina, J. Queralt 121

PO-25 IMPLANTACIÓN DE NORMAS ISO/GLP: IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS EN UN LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO
V. Daza , T. Gonçalves, I. Caraballo 123

PO-26 ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE NANOPARTÍCULAS DE INSULINA-PLGA PARA ADMINISTRACIÓN ORAL
J. Álvarez-Fuentes, M.J. Cózar-Bernal, L. Martín-Banderas, M.A. Holgado, M. Fernández-Arévalo 125

PO-27 ENSAYOS REALIZADOS A DESHIDRATADOS VEGETALES PARA SU POSIBLE UTILIZACIÓN EN FORMAS GALÉNICAS
M.D. Romero, B. Clares, M.A. Ruiz, J. Alcalá, P. García, V. Gallardo 127

PO-28 EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN PARA PRESERVAR MIOBLASTOS MICROENCAPSULADOS
A. Murua, G. Orive, R.M. Hernández, J.L. Pedraz 129

PO-29 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE RASAGILINA MESILATO EN MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE PLGA.
M. Fernández, E. Barcia y S. Negro 131

PO-30 HIGH PRESSSURE HOMOGENISATION METHOD TO PRODUCE NANONSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLCs) TO ENHANCE ORAL BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE COMPOUNDS
A.Beloqui, M.A.Solinís, A.R. Gascón, J.L. Pedraz 133

PO-31 CRITICAL POINTS OF HYDROPHILIC MATRICES BASED ON HYPROMELLOSE K100 LV CR
C. Cifuentes, T. Gonçalves, A. R. Rajabi-Siahboomi and I. Caraballo. 135

PO-32 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA LÁGRIMA ARTIFICAL PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE OJO SECO
Vicario de la Torre M., Benítez del Castillo, J. M., Vico E., Guzmán M., de las Heras B., Herrero-Vanrell R., Molina-Martínez I.T. 139

PO-33 GM-AOT MICROPARTICLES TO TREAT INTRACELLULAR PATHOGENS
D. González, E. Imbuluzqueta, G. Pérez, E. Elizondo, N. Ventosa, J. Veciana, C. Gamazo, M. J. Blanco-Príeto 141

PO-34 SOLUBILITY BEHAVIOUR OF ALLOPURINOL IN AMPHIPROTIC AND AMPHIPROTIC-APROTIC MIXTURES
A. B. Sánchez, M.A. Peña, P. Bustamante, B. Escalera 143

PO-35 RELEASE OF P-AMINOBENZOIC ACID AND NAPROXEN FROM EUDRAGIT RS PO MATRICES AS RELATED TO POLARITY
N. Aragón, P. Bustamante, B. Escalera, M. A. Peña. 145

PO-36 THERMOGRAMS OF THE SOLID PHASES OF THEOPHYLLINE AFTER EQUILIBRATION WITH ETHANOL-WATER
M.A. Peña., P. Bustamante, A. Reíllo 147

PO-37 "NEUROFUZZY LOGIC": UNA HERRAMIENTA UTIL EN EL DESARROLLO DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN
Mariana Landín, R.C. Rowe y P. York 149

PO-38 POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES AS MUCOSAL ADJUVANTS FOR BRUCELLOSIS VACCINATION
R. Da Costa Martins, C. Gamazo, C. Vauthier, J.M. Irache 151

PO-39 ESTABILIDAD Y EFICACIA DEL INSECTICIDA CIPERMETRINA INCORPORADO EN MICROCÁPSULAS DE POLIUREA
C. Martín Sabroso, P. Rivas Esteban, D. Tavares Silva Fernandes, M.E. Gil-Alegre, A.I. Torres-Suárez 153

PO-40 MODIFIED GENTAMICIN TO TREAT INTRACELLULAR INFECTIONS
E. Imbuluzqueta, C. Gamazo, D. González, E. Elizondo, N. Ventosa, S. Sala, J. Veciana, M.J. Blanco-Prieto 155

PO-41 IN VITRO AND IN VIVO TOXICITY STUDIES OF POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR ORAL DRUG DELIVERY
P. Ojer, A. López de Cerain, J.M. Irache 157

PO-42 ESTUDIO COMPARATIVO DE CARBOXIMETIL ALMIDON SODICO RETICULADO Y QUITOSANO-SILICE COMO AGENTES DISGREGANTES EN PELETS DE CELULOSA MICROCRISTALINA-HIDROCLOROTIAZIDA ELABORADOS POR EXTRUSION-ESFERONIZACION
Álvaro Goyanes, Consuelo Souto, Ramón Martínez-Pacheco 159

PO-43 INFLUENCIA DE LOS ANTIÁCIDOS EN LA ESTABILIDAD DE OMEPRAZOL
M. López-Viota, J. L. Arias, M.A, Ruiz, V. Gallardo 161

PO-44 ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES
C. Gutiérrez Millán, M.L. Sayalero Marinero, J.M. Lanao 163

PO-45 HIDROGELES DE POLOXAMER DE GELIFICACIÓN *IN SITU* PARA CESIÓN CONTROLADA DE PROTEÍNAS
A. Rey-Rico, C. Alvarez-Lorenzo, L. Balsa, M. Silva, J. Couceiro, y A. Concheiro 165

PO-46 HIDROGELES DE CICLODEXTRINAS Y POLISACÁRIDOS COMO VEHÍCULOS DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS
E. López-Montero, C. Alvarez-Lorenzo, J.F. Rosa dos Santos, A. Concheiro, J.J. Torres-Labandeira 167

PO-47 FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL DE POLIETILENO Y POLIPROPILENO CON CICLODEXTRINAS PARA DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS MEDICADOS
C. A. B. Nava-Ortiz, G. Burillo, E. Bucio, C. Alvarez-Lorenzo y A. Concheiro 169

PO-48 EFECTO DE LA HIDROFOBICIDAD SOBRE EL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE UN SISTEMA DISPERSO DE HIDROXIPROPILCELULOSA
J. Álvarez, M.D. Moya y M.J. Lucero 171

PO-49 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE HCMMA
C. Claro-Cala, M.R. Jiménez-Castellano 173

PO-50 DESARROLLO DE NUEVAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN PARA USO PEDIÁTRICO/VETERINARIO
B. Clares, V. Gallardo, M.E. Ibáñez, M.E. Morales, M.A. Ruiz 175

PO-51 ESTUDIO DE LA SELECCIÓN DE MATERIALES UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE UNA PLANTA HIGH CONTAINMENT
Johnny Edward Aguilar Díaz, Montse Montaner, Eva Planas, Lorena Terres, Immaculada Gomez, Elias Benito 177

PO-52 EVOLUTION OF SIZE, SIZE DISTRIBUTION AND Z-POTENTIAL OF DISPERSED PHASE DROPLETS IN O/W EMULSIONS THROUGH AGEING
Mª. E. Franco Gil, A. Mª. Rodríguez Bayón 179

PO-53 HIDROGELES A BASE DE GOMAS NATURALES PARA LA LIBERACIÓN COLÓNICA DE FÁRMACOS
Gago Guillan M., Otero Espinar F.J. 183

PO-54 EVALUACIÓN *IN VITRO/IN VIVO* DE UNA FORMULACIÓN DE LIBERACIÓN SOSTENIDA DE LOVASTATINA OBTENIDA MEDIANTE GRANULACIÓN POR FUSIÓN.
Ochoa, L., Igartua, M., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Solinis, M.A. y Pedraz, J.L. 185

PO-55 PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MICORENCAPSULACIÓN DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716*
M.E. Morales Hernández, M.J. Martin Villena, F. Lara Villoslada, V. Gallardo Lara y M.A. Ruiz Martínez. 187

PO-56 UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL DE ELABORACIÓN PROPIA
M.I. Soriano, J.B. Fariña, A. Oliva 189

PO-57 ESTUDIO FARMACÉUTICO DE FORMULACIONES GENÉRICAS DE PARACETAMOL
H. Ossété. S. Torrado-Susana, S. Torrado-Santiago, M.P. Ballesteros y J.J. Torrado 191

PO-58 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD Y DE LA COMPATIBILIDAD PRINCIPIO ACTIVO-EXCIPIENTE PARA EL DESARROLLO DE MICROESFERAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE CANNABINOIDES
D. Hernán, J. Molpeceres, M.R. Aberturas, C. Martín, M.E. Gil, A.I. Torres 193

PO-59 LIBERACIÓN *IN-VITRO* DE LIDOCAÍNA BASE DESDE PREPARACIONES TÓPICAS AL 5% FORMULADAS CON DISTINTOS DISOLVENTES EMOLIENTES
E. Blanca, M. D. Contreras 195

PO-60 BIODEGRADABLE MICROSPHERES FOR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) DELIVERY IN ISCHEMIC PATHOLOGIES
F. R. Formiga, B. Pelacho , E.Garbayo, G. Abizanda, F. Prosper and M.J. Blanco-Prieto 197

PO-61 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIHEXADECILFOSFATO (DHP) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LIPOSOMAS DE SUCCINATO DE SUMATRIPTÁN ELABORADOS POR DISTINTAS TÉCNICAS
M.L. González-Rodríguez, W. Dhrimeur, S. Villasmil, S. Salas, A.M. Rabasco 199

PO-62 INTERACCIÓN DE SUMATRIPTAN CON LOS COMPONENTES DE UNA FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON ESTEARILAMINA Ó CON DIHEXADECILFOSFATO: ESTUDIO MEDIANTE DSC Y ^{31}PNMR
M.L. González-Rodríguez, S. Villasmil, W. Drhimeur, A.M. Rabasco 201

PO-63 MICROGRANULOS DE PECTINA CONTENIENDO FORMULACIONES MULTIPARTICULARES CON BUDESONIDA: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU EFICACIA APLICANDO EL MÉTODO BOOTSTRAP
Manuel Guzmán, Susana Sánchez, Raquel Gragera 203

PO-64 PROPIEDADES VISCOSIMÉTRICAS DE FORMULAS AR EN NUTRICIÓN INFANTIL
Morales, M.E., López, G., Lara-Villoslada, F., Infante, D, Ruiz, M.A. y Gallardo, V. 205

PO-65 DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN FORMULACION DE EMULSIONES: INVESTIGACION DE UNA NUEVA VARIABLE RESPUESTA
H. Sekkat, M. D. Contreras Claramonte, M. D. Mingorance Álvarez 207

PO-66 LIBERACIÓN CONTROLADA DE DICLOFENACO SODICO EN COMPRIMIDOS ELABORADOS CON UNA POLIESTERAMIDA NO HINCHABLE
Rodríguez Galán I.C., Margarit M.V. , Rodríguez Galán A. , Morales M.L., Bouzas P.R. y Hernández P.J. 209

PO-67 *IN VITRO* GENE TRANSFER TO ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS BY IMPROVED TRANSFERRIN- LIPOPLEXES AND POLYPLEXES. PRELIMINARY STUDIES: CYTOTOXICITY AND TRANSFECTION
S. Olmedillas, A. Liras, I. Miguéliz, D. García-Olmo, M. García Arranz and C. Tros de Ilarduya 211

PO-68 LIBERACIÓN *IN VITRO* DE CICLOSPORINA A DESDE NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA FORMULADAS CON DIFERENTES DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS
M. Pecchio, J.M. Irache, M.J. Renedo, M.C. Dios-Viéitez 215

PO-69 ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS BIODEGRADABLES CON NALOXONA PARA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL: SELECCIÓN DEL POLÍMERO
L. Bautista Chávez, C. Martín Sabroso, J.I. Espada García, M.E. Gil Alegre, A.I. Torres Suárez. 217

PO-70 IMPROVEMENT OF GENE TRANFER TO TUMORAL CELLS BY TRANSFERRIN DENDRIPLEXES
G. Navarro, C. Tros de Ilarduya, M.Ogris, E.Wagner 219

PO-71 NORTRIPTYLINE STRATUM CORNEUM PENETRATION PROFILE FROM HPMC PATCHES
A. Melero, T.M. Garrigues, M. Alós, A. Martín-Villodre, U.F. Schaefer, C.M. Lehr. 221

PO-72 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE RASAGILINA MESILATO PARA EL TRATAMIENTO DEL PARKINSON
M. Fernández, S. Negro, A. Fernández y E. Barcia 223

PO-73 PRELIMINARY STUDIES ON DRUG DELIVERY OF LOW TEMPERATURE PLASMA TREATED TEXTILE SUPPORTS
C. Canal, J.M.Canal, A.Navarro, M.J.Garcia-Celma 225

BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA

PO-74 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR VANCOMYCIN QUANTIFICATION AND ITS APPLICATION TO A PHARMACOKINETIC STUDY
Jesús Valle, M.J. de, González López, F., Sánchez Navarro, A. 229

PO-75 COMPARACIÓN DEL FACTOR RAZA Y GÉNERO EN LA RATA COMO MODELO ANIMAL DE ABSORCIÓN INTESTINAL
Oltra-Noguera D, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Casabo VG, Bermejo M 231

PO-76 BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE LEUCINA TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL DE DIETAS DE NUTRICIÓN ENTERAL
S. Miralles Arnau, M. Merino-Sanjuán, A. Nácher, N.V. Jiménez Torres. 233

PO-77 BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE TAURINA TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL DE DIETAS DE NUTRICIÓN ENTERAL
S. Miralles Arnau, A. Nácher, M. Merino-Sanjuán, N.V. Jiménez Torres. 237

PO-78 ESTUDIO IN VIVO DE LA DISTRIBUCIÓN TISULAR Y LA CAPTACIÓN POR MACRÓFAGOS DE ZIDOVUDINA UTILIZANDO ERITROCITOS PORTADORES
Elsa Briones Cuesta, Clara Isabel Colino Gandarillas, José Martínez Lanao. 241

PO-79 VALIDACIÓN Y FUNCIÓN DEL ERROR DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA MONITORIZACIÓN DE NIVELES PLASMÁTICOS DE CARVEDILOL EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA
A.J. Braza, P. Modamio, C.F. Lastra, J. Sebarroja, E.L. Mariño 243

PO-80 PRECLINICAL STUDY OF A NEW SUSTAINED RELEASE FORMULATION OF MORPHINE: DISCREPANCIES BETWEEN THE *IN VITRO* DRUG RELEASE AND THE *IN VIVO* ABSORPTION PROFILE
A. Araíco, F. Torres-Molina, J. Cárcel-Trullols, A. Saadeddin, J.E. Peris 245

FARMACIA CLÍNICA Y FARMACOTERAPIA

PO-81 MEDICAMENTOS BIOSIMILARES: REQUERIMIENTOS DE FARMACOVIGILANCIA Y GESTIÓN DE RIESGOS
L. Zúñiga, B. Calvo 249

PO-82 EVOLUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA REALIZADA EN EL ESTADO ESPAÑOL DESDE LA PERSPECTIVA DE UNA CRO
B. Nicolás, P. Modamio, C.F.Lastra, E.L. Mariño 251

DOCENCIA

PO-83 THE PHARMACY CURRICULUM OF THE UNIVERSITY OF FLORIDA (USA)
M. Martone, D. Nobel, J. Sebarroja, P. Modamio, C.F. Lastra, E.L. Mariño 255

PO-84 PHARMACY EDUCATION AT THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN (USA)
A. Garcia, C. Simister, J. Sebarroja, P. Modamio, C.F. Lastra E.L. Mariño 257

PO-85 TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA: GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO MEDIANTE UNA INNOVACIÓN DOCENTE BASADA EN EL DESARROLLO DE UN TRABAJO GRUPAL.
M. Fernández Arévalo, M.J. León Wasmer 259

PO-86 VALORACIÓN DE LA FORMACIÓN RECIBIDA Y DE LAS COMPETENCIAS PROFESIONALES DEL FARMACÉUTICO. PUNTO DE VISTA DEL ALUMNO.
Begoña Calvo, Enrique Etxebarría 261

CONFERENCIAS PLENARIAS

ASSEMBLAGE OF MODULES FOR DRUG RELEASE CONTROL AND COMBINATION PRODUCTS

Paolo Colombo

Department of Pharmacy, University of Parma, Italy

The purpose of the presentation will be the illustration of the concept of module assembling for drug delivery control and combination products manufacturing. By focusing the drug release from hydrophilic matrices to be used as modules, the delivery kinetics of differently shaped surfaces of the module and different drugs' release obtained by assembling several modules in one system were studied.

The studied modules are disc tablets with one base convex and the other concave. Modified release matrices or immediate release tablets have been formulated. The matrix surfaces were partially coated with an impermeable film to study the swelling and drug release from the convex or concave surfaces.

The shape of module surface influences the release rate when the modules are swellable matrices. The observed different release kinetics was linked to the modified swelling of the differently shaped surfaces. Matrices stacked with the convex base inserted in the concave showed release profiles dependent on the ratio Area/Volume. The Area/Volume ratio of systems was correlated to mean dissolution time.

Two to six unit modules could be assembled in order to create different shaped systems having different release kinetics or containing different drugs. The assembling is driven by the geometry of the faces and the most recent technique is the assemblage byclicking complementary faces.

Staked matrices mainly exhibited anomalous release kinetics. When the concave bases of two modules were stuck together, an assembled floating system was obtained.

The module assemblage in combined structures allows to obtain different drug release behaviour in dependence on the geometry of the assembled system. Different drug release kinetics maintaining the same unit dosage form could be obtained according to the assemblage performed.

PORTADORES BIOLÓGICOS PARA LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS.

José Martínez Lanao

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. 37007. Salamanca.

Sistemas poliméricos constituidos por micropartículas y nanopartículas juegan actualmente un papel importante en el campo de los sistemas de liberación y vectorización de fármacos. No obstante, existen vectores o portadores biológicos de fármacos que constituyen una interesante y prometedora alternativa a este tipo de sistemas. Los portadores biológicos presentan como ventaja fundamental su alta biocompatibilidad biológica, así como su capacidad como sistemas de liberación prolongada y su alta selectividad a diferentes órganos, tejidos y células del organismo, pudiendo vehiculizar fármacos, sistemas enzimáticos y material genético. En el campo de los portadores biológicos de fármacos y alternativamente a las lipoproteínas de baja densidad y los péptidos de origen natural, deben destacarse las células y las células *ghosts* como los eritrocitos y otro tipo de células sanguíneas, los *ghosts* bacterianos, los vectores virales, las células madre manipuladas genéticamente y las células tumorales, entre otros.

En esta ponencia se analizarán los principales portadores biológicos, sus ventajas e inconvenientes, sus métodos de obtención y sus principales aplicaciones terapéuticas.

Los eritrocitos autólogos son utilizados como portadores de sustancias bioactivas desde los años 70 pudiendo vehiculizar selectivamente la sustancia encapsulada al sistema retículo endotelial (SER) del hígado, bazo y médula ósea. Existen diferentes métodos de obtención de eritrocitos portadores, como los métodos osmóticos o la electroporación siendo la diálisis hipotónica el método más utilizado. Los eritrocitos presentan potenciales aplicaciones terapéuticas con fármacos como los antineoplásicos, enzimas como la L-asparraginasa o material genético como los oligonucleótidos antisentido.
Los ghosts bacterianos son producidos mediante la lisis de bacterias pero manteniendo su morfología celular y las estructuras antigénicas de la superficie de la bacteria. Los ghosts bacterianos pueden obtenerse a partir de bacterias Gram (-) como *Escherichia coli, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumonia* o *Vibrium cholerae* entre otras, y permiten la encapsulación de fármacos, antígenos y ADN y su captación selectiva por diferentes tejidos y células como macrófagos, tumores o células endoteliales. Los ghosts bacterianos presentan potenciales aplicaciones terapéuticas en el campo de las vacunas veterinarias o la terapéutica antineoplásica o como portadores de ADN y ARN con aplicaciones terapéuticas.

Virus atenuados o modificados como adenovirus, lentivirus, poxvirus y otro tipo de virus pueden utilizarse como portadores de material genético. Su principal ventaja radica en su alta eficacia de transducción in vivo. Los vectores virales como portadores de material genético presentan potenciales aplicaciones terapéuticas en campos como terapéutica del cancer, enfermedades cardiovasculares, fibrosis quística o terapéutica anti-HIV.

Además de las ya conocidas aplicaciones de las células madre para la clonación terapéutica y la regeneración de tejidos, este tipo de células pueden utilizarse en el campo de la terapia génica recurriendo a células madre hematopoiéticas procedentes de la médula ósea, sangre periférica o cordón umbilical del paciente que son manipuladas genéticamente para introducir un transgene terapéutico y vehiculizarlo selectivamente. Esta técnica tiene aplicaciones potenciales en campos como la terapéutica antineoplásica, HIV, enfermedades cardiovasculares, epilepsia o enfermedades neurodegenerativas.

MACROMOLECULAR DRUG CARRIERS FOR TARGETING OF THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS TO TUMORS

Manfred Ogris

Groupleader Vectorology
Department of Pharmacy, Ludwig Maximilians Universität München, Germany

An important issue for successful cancer therapy is the systemic delivery of therapeutic drugs into target cells achieving a high level of selectivity by avoiding toxic side effects. Features like elevated expression of distinct receptors on tumour cells, proliferating tumour endothelium and a leaky vasculature allows selective treatment of solid tumor tissue with nucleic acid based drugs. We and others have developed polymer based delivery systems for nucleic acids forming so called 'artificial viruses'. Polycations bind and condense nucleic acids by electrostatic interaction, hydrophilic shielding domains protect the system after systemic application from unspecific interaction with blood components, targeting ligands allow cell specific binding and internalization into target cells, and membrane active peptides derived from toxins or viruses have a favourable influence on intracellular trafficking. With the help of live cell imaging important steps like cell binding, intracellular trafficking and endosomal release of such carriers are revealed. In vivo imaging allows studying the biodistribution and bioactivity of macromolecular drug carriers in real time and helps to develop improved tumor targeted formulations. Therapeutic concepts are applied in different tumour models in mice: local application of synthetic, double stranded RNA leads to eradication of intracranial glioblastoma, systemic application of small interfering RNA induces selective apoptosis in subcutaneous tumors after systemic vector application.

IMPLEMENTATION OF PHARMACOMETRICS/MODELLING AND SIMULATION IN CLINICAL DRUG DEVELOPMENT: GENERAL ASPECTS AND THE BOEHRINGER INGELHEIM EXPERIENCE

Staab, A.

Teamleader Pharmacometrics, Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Birkendorfer Str. 65, 88400 Biberach/Riß, Germany

The pharmaceutical industry currently faces the challenge that productivity has stagnated and development costs have continued to soar. Full exploitation, integration and evaluation of the generated data/information during drug development via appropriate techniques such as pharmacometric analyses (modelling and simulation), will be necessary to gain knowledge that allows to efficiently select the most promising molecules and to develop them into successful medicines, thus, increasing the probability of technical success for a development candidate [1].
For a successful integration of pharmacometrics into the drug development process the following key challenges need to be tackled:
The cultural/organisational challenge: Often in the different disciplines studies to evaluate the pharmacology, toxicology, ADME characteristics, safety and efficacy of a drug are planned, conducted and assessed in isolation. The development of models that integrate the knowledge available across the different disciplines and in published literature in a quantitative way is missing. The consequent application of these models in decision making could help to streamline the development process. A change in mindset in the development teams to use pharmacometrics to gain knowledge and make more informed decisions instead of regarding pharmacometrics as purely supportive is needed. An organisational structure that supports the inter-disciplinary dialogue or cross-functional meetings should be established. Furthermore, with pharmacometric methods and (mechanistic) drug-disease models getting more complex, teams specialised in pharmacometric support are needed.
The infrastructure challenge: Pharmacometric results need to be delivered in short time frames when decisions are being made. Thus, the often computational resource intensive and not very user-friendly programmes used in the pharmacometric field need to be implemented in an environment enabling fast and convenient pharmacometric analyses. Furthermore, a database containing all data obtained in clinical studies (including pharmacokinetic and biomarker data) should be established and a process should be developed that allows to provide high quality ready to use data sets close to database lock. In addition standard globally harmonized processes covering planning, performing and reporting of pharmacometric analyses need to be implemented.
The resource challenge: There is a lack of trained and experienced pharmacometricians. Thus, a concept needs to be developed to deal with this shortage.
At BI we addressed the above mentioned challenges as follows:
The cultural/organisational challenge: A clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic plan was implemented as a tool to discuss, streamline and agree within the relevant disciplines on activities regarding pharmacokinetics as well as pharmacodynamic investigations including the pharmacometric activities. To efficiently support pharmacometric activities we formed a team of pharmacokineticists concentrating on pharmacometric analyses. The pharmacometricians specialise in a therapeutic area, for which we started to build a "modelling platform" consisting of models that can be used across projects in the respective therapeutic area.
The infrastructure challenge: To allow efficient and convenient use of NONMEM, the standard software for modelling in the pharmaceutical industry, a linux-grid architecture was developed and additional tools were implemented facilitating convenient use of NONMEM and evaluation of results. The clinical database was extended to hold also pharmacokinetic as well as biomarker data and a SAS template programme was developed to generate NONMEM datasets. The SAS template programme covers most standard cases and needs only small adjustments to generate the data set for a particular study. A globally harmonized process for pharmacometric activities was developed guaranteeing high quality planning and documentation of pharmacometric analyses.
Resource challenge: To cope with the shortage of staff we focus our pharmacometric activities on selected therapeutic areas and outsource work-packages to external organisations (CROs, university). To reduce the shortage of trained pharmacometricians in the future a graduate training program "Pharmacometrics & Computational Disease Modelling" was initiated together with universities.

[1] U.S. Food and Drug Administration. Challenge and opportunity on the critical path to new medical products. March 2004. Available at: http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.html

COMUNICACIONES ORALES

HIDROGELES MICROPARTICULADOS CON AFINIDAD POR SALES BILIARES

F. Yañez,[1] I. Chianella,[2] S.A. Piletsky,[2] A. Concheiro[1] y C. Alvarez-Lorenzo[1]
[1]Dept. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España. [2]Cranfield Univ, Bedford MK45 4DT, England.
e-mail: carmen.alvarez.lorenzo@usc.es

Introducción

El tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia plantea importantes problemas. Como consecuencia de ello, se está dedicando un gran esfuerzo al desarrollo de sistemas "trampa" que actúen en el intestino como "secuestrantes" iónicos o hidrofóbicos de los lípidos o de sus transportadores, los ácidos biliares (1). El objetivo del trabajo fue sintetizar nuevos polímeros capaces de captar ácido cólico (**Figura 1**) acudiendo a un diseño racional, que evite los inconvenientes del método empírico de prueba y error. Para ello, se aplicó una técnica de modelización (2) que permite seleccionar los monómeros con mayor afinidad por el ácido cólico. Con ellos se prepararon hidrogeles altamente reticulados por procedimientos convencionales y aplicando la técnica de imprinting molecular (3) y se evaluó su capacidad para extraer colato sódico de un medio acuoso.

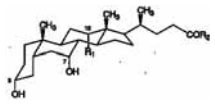


Figura 1. *Estructura del ácido cólico (R_1=R_2=OH).*

Materiales y Métodos

Materiales

Ácido cólico, colato sódico, etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), 1,1′-azobis (isobutironitrilo) (AIBN), fosfato de etilenglicol metacrilato (EGMP) y 2-(dietilamino)etil metacrilato (DEAEM) de Sigma-Aldrich (UK). N-(3-aminopropil) metacrilamida (APMA·HCl) de Polysciences Inc. (Alemania).

Modelización computacional.

Se estudiaron las interacciones en DMSO (dimetilsulfóxido) entre el ácido cólico y los monómeros de una amplia biblioteca utilizando la plataforma Silicon Graphics OctaneTM, el sistema operativo IRIX 6.5 (Silicon Graphics USA), el software SYBYL 6.9TM (Tripos Inc. USA) y el algoritmo LEAPFROGTM (30000 iteraciones).

Síntesis de los entramados poliméricos

Se mezcló el reticulante EGDMA (2.5-3 g) con los monómeros funcionales EGMP (262 mg), DEAEM (272 mg) ó APMA (262 mg), y se añadieron 3 ml de DMSO y 30 mg de AIBN. Para preparar sistemas imprinted, se incorporaron 150 mg de ácido cólico (relación molar molécula molde: monómero funcional 1:4). Se polimerizó a 70 ºC durante 24 h. Los polímeros se pulverizaron, se tamizaron y se recogió la fracción granulométrica correspondiente al intervalo 37-125 µm. Para eliminar las moléculas molde, los entramados poliméricos se sometieron a reflujo con metanol (500 ml) y finalmente se desecaron.

Isotermas de adsorción de colato sódico

Los polímeros (1.5 mg) se cargaron en columnas de ultracentrífuga (Pierce Centrifuge Columns 0.8 ml, ThermoScientific USA) con 500 µl de disolución de colato sódico (0.1-1.0 mM). Las columnas se introdujeron en viales Eppendorf, se sometieron a agitación durante 12 h y se centrifugaron 2 min a 600 rpm. La concentración de colato sódico en el filtrado se determinó espectrofotométricamente (4). El análisis por regresión lineal de los perfiles log B (cantidad de colato sódico adsorbido, µmol/g entramado) frente a log F (concentración de equilibrio, moles/l) permitió estimar los parámetros del ajuste a la ecuación de Freundlich (5):

$$Log\ B = m \cdot log\ F + log\ a$$

La distribución de afinidad de los lugares de adsorción se obtuvo introduciendo los parámetros *m* y *a* en la ecuación:

$$N(K) = 2.303 \cdot a \cdot m \cdot (1-m^2) e^{-2.303 \cdot m \cdot logK}$$

fijando como límites:

$$K_{min} = 1/F_{max} \quad y \quad K_{max} = 1/F_{min}$$

Extracción de colato sódico del medio acuoso

Se empaquetaron 20 mg de polímero en cartuchos de 1 ml (Filtration tubes 57023, Supelco USA) para extracción a vacío (VisiPrep 12-vial vacuum manifold, Supelco USA). Para acondicionar los polímeros se hicieron pasar 2 ml de agua, NaOH 0.1%, ác. fórmico 0.1M y metanol. A continuación, se pasaron alícuotas de 1 ml de disolución de colato sódico 0.2 mM (1 ml/min) hasta completar 30 ml y se determinó la cantidad de colato sódico extraída.

Resultados y Discusión

La modelización computacional permitió seleccionar tres monómeros funcionales: APMA·HCl, EGMP y DEAEM, con energías de interacción con colato sódico medias-altas y superiores a las obtenidas con el reticulante EGDMA. Se prepararon entramados poliméricos control y otros con cada monómero funcional, y para todos ellos se ensayaron las posibilidades que ofrece la incorporación del ácido cólico en el momento de la síntesis, de manera que sus moléculas puedan actuar como moldes (sistemas MIP). Los monómeros se diluyeron con DMSO para formar poros que faciliten la difusión del colato sódico.

Las isotermas de adsorción se ajustaron al modelo de Freundlich y se estimaron la homogeneidad de los puntos de unión y su afinidad por el absorbato, cuando *m* está comprendida entre 0 y 1 (5). Los valores de *m* mayor que 1 de los entramados control indican que no existen puntos de unión específicos (**Tabla 1**). El monómero funcional incrementó la heterogeneidad de los puntos de unión. Los entramados con EGMP presentaron menos puntos disponibles para la adsorción y una constante de afinidad menor. En los sistemas MIP se incrementó el número de puntos de unión con alta afinidad. Los entramados con APMA mostraron el número más alto de puntos de unión de alta afinidad y no se detectó efecto imprinting.

***Tabla 1**. Resultados del ajuste de las isotermas al modelo de Freundlich.*

Entramado	*m*	*Log a*	r^2
EGMP-NIP	0.8107	4.824	0.969
EGMP-MIP	0.7172	4.6384	0.983
DEAEM-NIP	0.7347	5.031	0.987
DEAEM-MIP	0.6405	4.606	0.978
APMA-NIP	0.3056	3.577	0.781
APMA-MIP	0.3670	3.833	0.682
CONTROL-NIP	1.6172	7.990	0.986
CONTROL-MIP	1.3963	7.296	0.993

Los entramados poliméricos con monómero funcional presentaron una capacidad de extracción superior a la de los sistemas control (**Figura 2**). La capacidad de saturación más alta y los niveles de colato sódico remanente más bajos se obtuvieron usando APMA.

Agradecimientos

MEC (SAF2008-01679), FEDER y Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR). F. Yañez agradece al MEC una beca FPI y una ayuda para una estancia en la Universidad de Cranfield (UK).

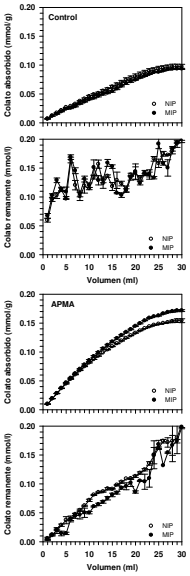


***Figura 2.** Colato sódico extraído por partículas control (A) o con APMA (B) y concentración remanente en medio acuoso.*

Conclusiones

La selección de monómeros por modelización computacional permite incrementar la afinidad de entramados acrílicos por colato sódico y su capacidad para actuar como secuestrantes. El imprinting molecular mejoró ligeramente la eficacia de los sistemas.

Bibliografía

(1) Dhal et al. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**: 8593-8604, 2005.
(2) Piletsky et al. *Analyst* **126**: 1826-1830, 2001.
(3) Alvarez-Lorenzo et al. *J. Control. Release* **113**: 236-244, 2006.
(4) Fini y Zuman. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **58**: 53-61, 1993.
(5) Rampey et al. *Anal. Chem.* **76**: 1123-1133, 2004.

LIBERACION DE VEGF A PARTIR DE CELULAS MICROENCAPSULADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A. Portero[1], R.M. Hernández[1], G. Orive[1], D. Antequera[2], C. Spuch[2], E. Carro[2], J.L. Pedraz[1]
[1]Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Paseo de la Universidad nº7, Vitoria-Gasteiz, 01006, España
[2]Grupo de Enfermedades Neurodegenerativas, Laboratorio de Neurociencias, Centro de Investigación, Hospital "12 de Octubre", Madrid, España

Introducción: La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más devastadoras que se conocen. Se caracteriza por la aparición de placas de β-amiloide extracelulares, de ovillos neurofibrilares intracelulares y muerte neuronal (1). Algunos trabajos (2,3) han relacionado la enfermedad de Alzheimer con una alteración del sistema vascular cerebral, llegando a proponer que dicha alteración impide la correcta eliminación de los péptidos de β-amiloide haciendo que estos se acumulen provocando la formación de placas y la muerte neuronal. De hecho en la enfermedad de Alzheimer, se ha visto que los vasos sanguíneos cerebrales se degeneran (4).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es uno de los factores angiogénicos más potentes que se conocen. Recientemente, se ha descubierto que también presenta funciones neuroprotectoras y neurogénicas (5).

La liberación sostenida en el cerebro de un factor angiogénico podría aumentar la densidad de los vasos sanguíneos y con ello mejorar el aclaramiento de los péptidos de β-amiloide disminuyendo la cantidad de placas y mejorando las funciones cognitivas afectadas. Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de la liberación continua de VEGF mediante la tecnología de microencapsulación de células.

Material y Métodos: En este estudio se han utilizado fibroblastos BHK modificados genéticamente para secretar VEGF. Los fibroblastos se encapsularon mediante un goteador electrostático en cápsulas alginato-poly-*L*-lisina-alginato (APA) (alginato de baja viscosidad rico en acido gulurónico, FMC Biopolymer, Norway) siguiendo el procedimiento de Lim y Sum con ligeras modificaciones (6).

El diámetro y la morfología de las microcápsulas se estudiaron mediante un microscopio óptico invertido (Nikon TMS) equipado con una cámara.

La cantidad de VEGF secretado por las células encapsuladas se determinó mediante una técnica de ELISA (Amersham Biotrak Vascular Endothelial Growth Factor, human Elisa System). Se colocaron alrededor de 100 cápsulas en una placa de 24 pocillos con 500 µl de medio de cultivo. La placa se mantuvo durante 24 horas en cultivo y transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes para analizar la cantidad de VEGF que contenían.

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratones transgénicos APP/PS1. El grupo control recibió cápsulas con células no transfectadas y el grupo experimental recibió cápsulas con células secretoras de VEGF. En el cortex de cada ratón se implantaron alrededor de 40 microcápsulas (7). Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio siguiendo la normativa comunitaria.

El análisis histológico se realizó 15, 30 y 90 días después de la implantación de las cápsulas, se sacrificaron los animales para realizar un análisis inmunohistoquímico en el cual se analizó la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un doble marcaje con lectina y anti-BrdU.

Tres meses después de la implantación se realizó un test de reconocimiento de objetos (ORT) para valorar la memoria a corto plazo. En este ensayo se utilizaron ratones C57 como control positivo. Este estudio consta de dos fases: una primera fase en la que el animal se familiariza con un objeto y una segunda fase en la que el animal tiene acceso al objeto que ha reconocido y a otro nuevo, midiéndose el tiempo que pasa explorando cada objeto.

Resultados y discusión: Todas las microcápsulas presentan una forma esférica y uniforme tal y como se puede apreciar en la figura 1.

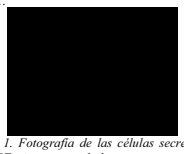


Figura 1. Fotografía de las células secretoras de VEGF microencapsuladas.

La cantidad de VEGF secretado *in vitro* por las células encapsuladas fue progresivamente aumentando lo cual demuestra la buena adaptación de las células a las microcápsulas. Las cantidades de VEGF secretadas fueron las siguientes:

Tabla I. Cantidad de VEGF secretada "in vitro" (pg/100 microcápsulas/24 horas) a los diferentes tiempos estudiados. Valores medios ± SD.

	Día 1	Día 7	Día 21
Media	3006,09	3684,31	5485,99
DS	411	683,42	619,74

En los estudios inmunohistoquímicos realizando una doble tinción con BrdU (para detectar las células en proliferación) y lectina de tomate (marcador específico para células de los vasos sanguíneos) se observó un aumento significativo de la densidad de los vasos sanguíneos en el cortex cerebral de los ratones tratados con VEGF respecto a los ratones control, lo cual pone de manifiesto la funcionalidad del VEGF secretado a partir de las células microencapsuladas (figura 2).

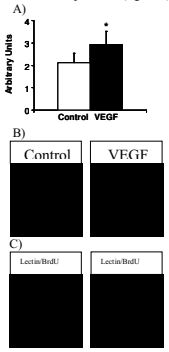


Figura 2. A: Densidad vascular en ratones tratados y control. B: Tinción con lectina en ratones tratados y control. C: Doble tinción en ratones tratados (imágenes a distinto aumento).

En el test de reconocimiento de objetos (ORT), tal y como puede observarse en la figura 3, los ratones tratados con las microcápsulas productoras de VEGF obtuvieron un valor significativamente superior del índice de reconocimiento al que presentaban los ratones control e incluso ligeramente superior al de los ratones C57.

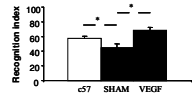


Figura 3. Test de comportamiento en ratones APP/PS1. Valores medios ± SD (p<0,05).*

Discusión y conclusiones: En este estudio se han implantando en el cortex de ratones APP/Ps1 células secretoras de VEGF encapsuladas en microcápsulas APA.

La densidad vascular detectada en el cortex de los ratones transgénicos tratados con las microcápsulas productoras de VEGF resultó ser significativamente superior a la que presentaban los ratones control, lo cual pone de manifiesto que el VEGF secretado por las células encapsuladas es funcional *in vivo* y que la formulación utilizada en este estudio es capaz de producir una liberación contínua durante prolongados periodos de tiempo lo cual podría permitir reducir el número de administraciones.

Los resultados obtenidos en el test de reconocimiento de objetos podrían indicar que el efecto angiogénico del VEGF mejora algunas de las funciones cognitivas como la memoria a corto plazo no obstante, esta mejora podría deberse también al efecto neuroprotector del VEGF y no solo al efecto angiogénico.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que la liberación sostenida de VEGF a nivel de cortex cerebral puede constituir una herramienta eficaz para combatir algunos síntomas de la enfermedad de Alzheimer, asimismo es importante destacar que la inmovilización de células en microcápsulas biocompatibles es una aproximación tecnológica eficaz para conseguir dicha liberación sostenida.

Referencias:

(1) Pereira, PA *y cols., Curr. Drug. Targets., CNS Neurol. Disord.*, **4:** 383-403, 2005.
(2) Iadecola, C *y cols., Nat. Rev. Neurosci.,* **5:** 347-360, 2004.
(3) Zlokovic, BV *y cols., Adv. Drug. Deliv. Rev.,* **54:** 1553-1559, 2003.
(4) Zlokovic, BV *y cols., Trends Neurosci.,* **28:** 202-208, 2005.
(5) Storkebaum, E *y cols., Bioessays,* **26:** 943-954, 2004.
(6) Lim, F *y cols., Science,* **210:** 908-909, 1980
(7) Hernández, RM *y cols.,* P200802217.

Acknowledgments:
A. Portero agradece a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) la beca concedida.
Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por el Ministerio Ciencia e Innovación (SAF2008-03157) y los fondos FEDER.

MICROPARTÍCULAS DE PLAGA CARGADAS CON AGENTES NEUROPROTECTORES (GDNF Y BDNF). UN TRATAMIENTO POTENCIAL PARA EL GLAUCOMA.

P. Checa-Casalengua[1], I. Bravo-Osuna[1], I.T. Molina Martínez[1], B. Tucker[2], M.J. Young[2], R. Herrero-Vanrell[1].
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 España.
[2]Departamento de Oftalmología, Harvard Medical School, Schepens Eye Research Institute, 20 Staniford Street, Boston, MA 02114.

Introducción

El glaucoma es una neuropatía degenerativa que constituye una de las primeras causas de ceguera en los países desarrollados. La ceguera asociada al glaucoma es debida a daños en el axón del nervio óptico, que provoca muerte gradual de las células ganglionares de la retina (CGR). Estudios preliminares llevados a cabo en animales de experimentación con GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de la línea celular Glial) y BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) han ofrecido resultados prometedores en la protección de estas células (1,2), debido a que dichos factores interfieren en un paso esencial del proceso de apoptosis (3).

El tratamiento más eficaz para las patologías que afectan al segmento posterior del ojo es el depósito directo de la sustancia activa en el lugar de acción, eliminando efectos secundarios sistémicos (4). Sin embargo, las inyecciones intraoculares no están exentas de problemas y se asocian con efectos adversos tales como cataratas, desprendimiento de retina, endoftalmitis y hemorragias vítreas. Son necesarias, por tanto, formas de administración capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas del fármaco, por periodos prolongados de tiempo, evitando así las inyecciones sucesivas. Los sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada son una alternativa muy interesante, ya que se pueden administrar como una inyección convencional, desapareciendo del lugar de acción una vez ejercido el efecto. Después de su administración, las micropartículas forman un agregado en la cavidad vítrea capaz de controlar la liberación del fármaco durante semanas (5) sin producir daño tisular (6).

El objetivo del presente trabajo ha sido el desarrollo y la caracterización de una formulación de microesferas elaboradas con ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLAGA) cargadas con GDNF y BDNF.

Materiales y Métodos

Elaboración de micropartículas:

Las micropartículas (MPs) de PLAGA cargadas con GDNF y BDNF fueron preparadas usando una modificación de la técnica de evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A previamente descrita (7). La fase oleosa está compuesta por 1ml de una solución de PLAGA/ CH_2Cl_2 20% p/v, en la cual se adicionaron 40 µg de GDNF y 20 µg de BDNF. Una vez preparada, la fase oleosa fue emulsificada en 5ml PVA 2% p/v a 5,000rpm durante 1min. Después de 3h de maduración en 100ml PVA 0.1% p/v, las MPs fueron recogidas, lavadas y separadas en tres fracciones granulométricas (> 53 µm, 40-53 µm y 2-40 µm). Finalmente, las microesferas fueron congeladas en una mezcla de MeOH/hielo, liofilizadas y conservadas en condiciones de vacío a 4ºC antes de su uso.

Caracterización de las micropartículas:

La *morfología* de las micropartículas se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokio, Japón). Para ello, previamente a la observación, se sometieron las muestras a un recubrimiento con oro coloidal aplicado en atmósfera de argón.

La determinación del *tamaño de partícula* de la formulación y su distribución se llevó a cabo utilizando un equipo Beckman Coulter LS series (Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

Los *estudios de liberación in vitro* se realizaron con dos replicados de una muestra de MPs (5 mg) que fueron suspendidos en 1.5 ml de PBS pH 7.4 conteniendo albúmina sérica bovina (ASB) 1% Pm 66 kDa como transportador y 0.02% de azida sódica como conservante. En todos los casos se emplearon Eppendorf® "low binding". Las muestras se introdujeron en un baño termostatizado con agitación constante de 100 rpm a 37ºC. La toma de muestras se realizó a intervalos de tiempo pre-establecidos (1h, 24h y una vez por semana durante 12 semanas), mediante extracción del volumen de medio de

cesión y posterior reposición del mismo. Alícuotas procedentes de este sobrenadante se diluyeron, en los casos en que fue necesario, con reactivo diluyente contenido en el kit ELISA, (enzymo-linked inmunosorbent assay) obteniendo así, una concentración de proteína dentro del rango de la curva de calibración empleada (15-1000 pg/ml).

Resultados y Discusión

Las micropartículas elaboradas en este trabajo fueron esféricas, pudiéndose apreciar la presencia de algunos poros en la superficie de las mismas (Figura 1). La fracción granulométrica mayoritaria se encontró en el rango de 2-40 µm.

Figura 1. Microfotografía de las MPs de PLAGA cargadas con GDNF y BDNF.

La distribución del tamaño de partícula, dentro de la fracción seleccionada (2-40 µm), da lugar a curvas bimodales con una moda predominante próxima a los 20 µm.

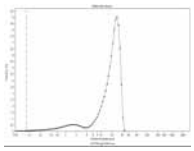


Figura 2. Distribución de tamaño obtenida en la fracción 2-40 µm.

El rendimiento de producción de las micropartículas es del 81,5% y las eficacias de encapsulación de 33,0 ± 10,0% para GDNF y 25,9 ± 4,8% para BDNF.

Tal y como se observa en los perfiles de liberación (Figura 3), se produce un efecto *burst* inicial en las primeras 24 horas del ensayo con valores de 45,7 ± 8,6 ng GDNF/mg MPs y 11,2 ± 1,3 ng BDNF/mg MPs. Seguidamente, se produce una liberación constante de las proteínas durante 7 semanas con una velocidad de 0,13 ng/mgMP/día para GDNF y 0.10 ng/mgMP/día para BDNF. Después de 7 semanas de ensayo, las MPs liberan cantidades de 0,017 ngGDNF/mg MP/día y 0,004 ng BDNF/mg MP/día hasta el final del ensayo después de 12 semanas.

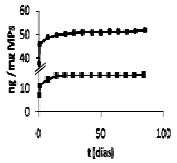


Figura 3. Perfiles de liberación acumulados para GDNF (●) y BDNF (■) expresados en ng/mg MPs (n = 2).

Conclusiones

Las MPs de PLAGA desarrolladas en este trabajo poseen un tamaño susceptible de ser inyectado por vía intraocular y permiten controlar la liberación *in vitro* de los distintos factores neurotróficos (GDNF y BDNF) durante un período de tiempo de 12 semanas. Estos sistemas reafirman la prometedora posibilidad de utilizar la liberación de agentes neuroprotectores en el vítreo como una modalidad en el tratamiento de glaucoma.

Referencias

(1) García M et al., I*nvest Ophthalmol Vis Sci.* **43:** 3735-3743, 2002
(2) Mittal S et al., *Neuroreport.***5 :** 2577-2582, 1994
(3) Wordinger et al., *Molecular Vision.* **9:** 249-256, 2003
(4) Ruíz-Moreno JM et al., *Exp Eye Res* **84:** 342-348, 2007
(5) Khoobehi et al., *Ophthalmic Surg.* **22(3):** 175-180, 1991
(6) Herrero-Vanrell and Refojo A*dv. Drug Deliv. Rev.* **52(1):** 5-16 :2001
(7) Martínez-Sancho et al., *J. Microencapsulation* **20(6):** 799-810, 2003

Agradecimientos

El estudio ha sido financiado por BIOAVAN-PROFIT SINGULAR (PSS-300-100), Ministerio de Educación y Grupo GR-UCM 920415 (CCG07-UCM/MAT-2594).

PATCHES FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF SUMATRIPTAN SUCCINATE: *IN VITRO* AND *IN VIVO* PHYSICAL CHARACTERIZATION

C. Balaguer-Fernández[1], C. Padula[2], M.A. Calatayud-Pascual[1], A. Femenía-Font[1], V. Merino[3], F. Marra[2], S. Nicoli[2], P. Santi[2], A. López-Castellano[1].
[1]Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Spain.
[2]Dipartimento Farmaceutico, Facoltà di Farmacia, Università di Parma, Italy.
[3]Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Spain.

Introduction:

Transdermal administration offers advantages respect other routes of administration. Avoids gastrointestinal incompatibility and first pass metabolism with the consequent reduction of bioavailability of drug and reduces the frequency of dosing improving patient compliance.

Sumatriptan is a 5-HT_1 receptor agonist used in antimigraine therapy. This drug, is available to administrate orally, intranasal or by subcutaneous injection and has an absolute bioavailability of approximately 14%, 15% and 96%, respectively. Oral and intranasal administration produces a low bioavailability of the drug due to pre-systemic metabolism and incomplete absorption and, parenteral administration is associated with numerous inconveniences for the patient. For these reasons, a new administration of sumatriptan, such as transdermal route, could be a good alternative in the treatment of migraine.

We have obtained occlusive bioadhesive patches that include sumatriptan succinate. Those are not adhesive in the dry state but are bioadhesive in the presence of water (1,2). In order to analyse the possibility of using them for the migraine treatment, the aim of the work presented was to characterize the transdermal patches physical parameters such as moisture uptake, mechanical properties and *in vivo* bioadhesion.

Materials and Methods:

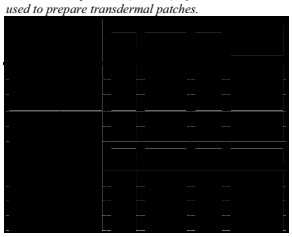
Sumatriptan succinate used in the preparation of the transdermal patches was obtained from a commercial source (Imigran®). All films contained Azone® as chemical enhancer.

Methylcellulose (MC), polyvynilpirrolydone (PVP), polyvynilalcohol (PVA) or polyvynilpirrolydone-polyvynilalcohol (PVP-PVA) (1:2 w/w) mixture was employed.

For the preparation of the patches (table 1), polymers were hydrated and dissolved in water (~ 60°C). Plastoid® adhesive solution (E35L/E35 H) was added, followed by the solution of sumatriptan succinate in water and plasticizer [1,2- propilenglycol/sorbitol 70% (w/v)] containing the penetration enhancer Azone®. The mixture obtained was coated on backing membrane (ScotchpackTM 9733) using a film casting knife. Wet film thickness was 600 µm. Transdermal patches dried overnight at room temperature, in the dark.

In vivo bioadhesivity measurement

Table 1. *Composition (%, w/w) of the wet mixtures used to prepare transdermal patches.*



Moisture uptake studies

To calculate moisture uptake, dried and weighed sumatriptan succinate transdermal patches (without occlusive layer) with uniform dimensions (1cm^2), were exposed to 75% relative humidity (100 mL of saturated solution of sodium chloride) in a desiccator until a constant weight film (n=3).

Water absorption capacity was obtained as the increase of weight after the assay with respect to initial weight:

Moisture uptake (%) = [(final constant weight – initial weight) / initial weight] 100

Mechanical properties measurements

Mechanical properties of patches were evaluated using an electronic dynamometer (Acquati, Milano, Italy) equipped with a 5-Kg load cell. Strips (n=3) of 10 mm by 100 mm size were held between the two clamps of the dynamometer. During measurement, the patches were pulled at a rate of 30 mm/s.

Two parameters, the force and elongation, at the point at which the films broke were measured. Measurements were run three times for each patch. The tensile strength and elongation at break were calculated as:

Tensile strength (N/mm^2) = Breaking force (N)/ Cross sectional area of sample (mm^2)

Elongation at break (%) = [Increase in length at breaking point (mm)/ Original length (mm)] 100

Bioadhesive strength of sumatriptan transdermal patches was evaluated *in vivo* using a modificated ASTM quick stick test (PSTC-5) (3).

Strips (25x70 mm) were applied to the dorsal part of the hand of three volunteers after wetting the skin with known amount of water (15µL/cm^2). Final contact area was 7.5 cm^2. After 30 minutes, strips were fixed to the upper clamp of an electronic dynamometer equipped with a load cell, and pulled at 300 mm/min.

The maximum force of adhesion (peak detachment force) (N) and the work of adhesion (mJ) were obtained.

Results and Discussion:

Values of moisture uptake (%) obtained for the different transdermal patches are represented in Figure 1. As expected, the use of different polymers in transdermal patches formulation affect in the moisture uptake. Results of statistical analysis performed showed that the percentage of moisture uptake produces statistically significant modifications in films formulated with PVP polymer (ANOVA, Scheffe, p<0.05).

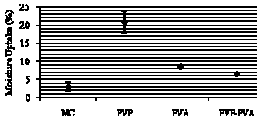
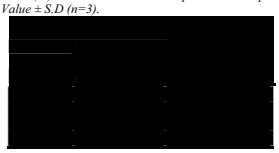


Figure 1. *Water absorption capacity (%) obtained with different transdermal patches formulated. Value ± S.D (n=3).*

In reference to mechanical properties obtained from the sumatriptan transdermal patches formulated, these are shown in table 2. Tensile measure can be reflected by tensile strength (N/mm^2) and elongation at break (%) parameters.

Table 2. *Tensile strength (N/mm^2) and elongation at break (%) values determinate with patches developed. Value ± S.D (n=3).*



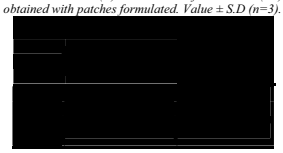
Respect to tensile strength parameter (traction breaking force) the highest value was obtained for the transdermal patch formulated with methylcellulose.

It can be observed that the use of MC in patch formulation produces a statistically significant difference respect to films formulated with PVP or PVA-PVP mixture (ANOVA, Dunnet, p<0.05).

Elongation at break (elasticity) of the patches results in the 28-42 % range. In this case there are no statistically significant differences among the films studied (ANOVA, T3 Dunnet, p<0.05).

Table 3 shows the values of bioadhesive measurements obtained as peak detachment force (N) and work of adhesion (mJ) for the transdermal patches. All patches elaborated were studied but PVP patches did not detach from the skin during the time of analysis.

Table 3. *Force (N) and work of adhesion (mJ) obtained with patches formulated. Value ± S.D (n=3).*



Statistical analysis performed with peak detachment force refers significant differences among all films studied (ANOVA, Scheffe, p<0.05). Respect to work of adhesion parameter the statistical analysis did no demonstrate differences among patches (ANOVA, T3 Dunnet, p<0.05).

Conclusions: PVP has the maximum value of water absorption capacity. In the other hand, the use of PVP produces a reduction in tensile strength parameter. This is traduced in a decrease in strength of patches obtained with this polymer.

Combination of the polymers PVP-PVA leads the highest skin adhesion in terms of peak detachment force. However, all patches were still attached to the skin surface for minimum 8 hours.

References:

(1) Femenía-Font et al., J Pharm Sci. 95 (7): 1561-1569, 2006.

(2) Balaguer-Fernández et al., J Pharm Sci. 97 (6): 2102- 2109, 2008.

(3) Padula et al. 32 Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. Miami Beach (USA), 2005.

Acknowledgments:

Authors thank Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060108) and University CEU Cardenal Herrera for their financial support.

ATOMIZACION MEDIANTE FLOW FOCUSING: APLICACIONES FARMACÉUTICAS

Lucía Martín-Banderas [1,2], Mª José Cózar-Bernal[1], Elena de Castro-Hernández[3], A. Rodríguez-Gil[4], María Flores-Mosquera [2], Josefa Álvarez-Fuentes[1], Mª Ángeles Holgado[1], Alfonso Gañán-Calvo[2,3], Mercedes Fernández-Arévalo[1]
[1]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, c/ Prof. García González nº 2, Sevilla.
[2]Ingeniatrics Tecnologías, S.L., Avd. Américo Vespucio 5-4, 1ª p., mód. 12 Sevilla, [3] Dpto. de Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos, Universidad de Sevilla, [4] Dpto. Genética, Universidad de Sevilla.

Introducción

La tecnología de atomización **Flow Focusing** (FF) se basa en el enfocamiento de dos o más fluidos inmiscibles (ver figura 1) de forma que se genera un microchorro estable que por inestabilidad capilar rompe en gotas monodispersas (1).

Figura 1*. Nebulizador FF simple, mod. Avant (Ingeniatrics Tecnologías)*

La posibilidad de utilizar múltiples configuraciones permite adaptar esta tecnología a diferentes procesos donde se requiera generar gotas de forma controlada. Sus aplicaciones son múltiples y en campos tan diferentes como la *automoción* (mayor rendimiento en la inyección de combustible), *medioambiente, nuevos materiales, alimentación* (nuevas texturas, sabores, diseño de nutracéuticos), *ingeniería química* (reactores de mayor eficiencia), *análisis químico* (introducción de muestras), *biotecnología* (nano- y microparticulas a la carta) o *domésticas* (humidificación, refrigeración).

El presente trabajo se centra en sus aplicaciones **farmacéuticas**, en concreto en la encapsulación de diferentes sustancias, en su empleo como herramienta de micronizado o para la generación de micelas.

Materiales y Métodos

FF en procesos de micro-encapsulación

En los últimos años la tecnología FF ha sido validada como una herramienta útil, de bajo coste y alternativa en los actuales procesos de microencapsulación. Se han encapsulado *fármacos* (2) de diferente naturaleza como son sulfato de gentamicina (SG) (Sigma-Aldrich), altamente hidrosoluble o lidocaína (LDC) (Sigma-Aldrich), liposoluble o *proteínas* (3), GFP (*green fluorescent protein*) (Biomedal S.L.), utilizada como modelo. En todos los casos con una alta eficacia de encapsulación.

El polímero de elección en estos casos fue PLGA (Resomer®, Böehringer), en concentraciones inferiores al 5% p/v en acetato de etilo (EA) (Panreac).

En los casos de SG y GFP se utilizaron dos tipos de nebulizadores: simple y concéntrico, éstos permiten obtener partículas de diferente estructura interna, microesferas y cápsulas verdaderas, respectivamente. La atomización en estos casos se llevó a cabo en una cámara termostatizada, recogiéndose en la parte inferior las partículas en forma de polvo seco.

Por otra parte también ha sido posible la *encapsulación de microorganismos* (4) de forma efectiva. Se han encapsulado bacterias (*E. coli*, ~10^5 cfu/mL) (Biomedal) y levaduras (*S. cerevisiae*), utilizando un nebulizador concéntrico. La atomización se llevó de igual modo que los casos anteriores.

En la actualidad se están desarrollando equipos basados en la tecnología FF para el aislamiento y análisis acelerado de microorganismos mediante su *microencapsulación individualizada.*

Para el diseño y desarrollo de sistemas de diagnóstico *multiplex*, se han encapsulado *fluoróforos* (5) en matrices de poliestireno en el intervalo de tamaño de 1 -25 µm de diámetro. En este caso, el fluido empleado como enfocante no fue gas sino un líquido lo que permite obtener estrechas distribuciones de tamaño de partícula (CV <10%).

Con objeto de dar un valor añadido a este tipo de partículas, se han elaboraron partículas conteniendo *material paramagnético* (6). En este caso, se partió de una suspensión estable de magnetita en medio orgánico empleándose Aerosil® 200 Pharma (Degussa) como agente suspensor.

FF para la inyección de muestras en equipos analíticos

Se han diseñado y fabricado diferentes nebulizadores para su adaptación en equipos de espectrometría atómica para la inyección de muestras líquidas (7).

Resultados y Discusión

A continuación, se muestran de forma resumida y a modo de ejemplo algunos resultados obtenidos referentes a la microencapsulación de sustancias mediante FF.

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula fue determinado mediante microscopía óptica utilizando un programa de análisis de imagen (Image J).

En la tabla 1, quedan recogidos algunos de los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula.

Tabla 1. *Tamaños de microesferas obtenidos para las condiciones indicadas (nebulizador FF simple, gas-líquido)*

SG	33.33	4	12	60	22.81 ± 7.18
			5	50	11.21 ± 3.48
			2	170	6.69 ± 1.23
LDC	0.06 – 0.5	2,5	5	100	7.9 – 8.5 CV ~ 15%
GFP	2.88	4	2.5	100	7.53 ± 1.15
			5		10.84 ± 1.15
			10		13.66 ± 3.03

A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en función de las diferentes variables: caudal de líquido (GFP), concentración de fármaco (LDC) o presión de gas (SG). Como puede verse, en todos los caso se obtuvo una estrecha distribución de tamaños.

Estructura de la partícula

Respecto a la estructura de la partícula esta se determinó mediante microscopía láser confocal (CLSM). En la figura 2, se muestran imágenes de esferas elaboradas a partir de una disolución del material encapsulado (Fig. 2a) o una emulsión (Fig. 2b), empleando un nebulizador simple y cápsulas con núcleo-corteza (nebulizador concéntrico) (Fig. 2c).

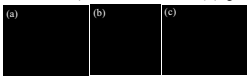


Figura 2*. Ejemplos de estructuras de partículas obtenidas en función de la configuración FF empleada:*(a) Esferas: disolución (fluoróforos / PS); (b) Esferas: emulsión w/o (GFP / PLGA); (c) Cápsulas: levaduras / PLGA

Aspecto y Morfología

El aspecto y morfología de las partículas fue determinada mediante SEM.
En la figura 3, se recogen algunos ejemplos de las partículas obtenidas.

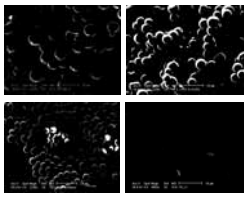


Figura 3*. Ejemplos de microesferas obtenidas conteniendo diferentes sustancia:s (a) SG; (b) LDC; (c) fluoróforos, (d) magnetita*

Como puede observarse, en todos los casos se obtuvieron partículas esféricas, no agregadas con superficie lisa. En el caso de partículas paramagnéticas (Fig. 3d) la superficie de la partícula fue variable en función del contenido en magnetita.

Conclusiones

Mediante este trabajo se recogen algunas de las posibles aplicaciones que presenta Flow Focusing en el campo farmacéutico. Gracias a la posibilidad de controlar tanto el tamaño como la estructura de la gota/partícula es posible adaptar la tecnología a los diferentes procedimientos de micro-encapsulación. Por otro lado, debido a la suavidad de las condiciones de funcionamiento es posible trabajar con sustancias lábiles, por ejemplo microorganismos, sin afectar a sus propiedades.
En resumen, se trata de una técnica de bajo coste, versátil, que se presenta como una alternativa real para la producción de microparticulas poliméricas monodispersas de morfología controlable.

Bibliografía

(1) A. M. Gañan-Calvo. Phy REv Lett 80(2) 285-8, 1998. (2) L. Martín-Banderas y cols. Small 1 (7), 688-692, 2005; M.A. Holgado y cols. Int J Pharm 358, 27-35, 2008. (3) V. Merino y cols. VII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 69-70. 2006. (4) L. Martín-Banderas y cols. Biospain 2006. (5) L. Martín-Banderas y cols. Adv Mat 18. (5), 19-26, 2006. (6) L. Martín-Banderas y cols. VIII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. Alcalá de Henares, 2008. (7) B. Almagro Fernández y cols. J Anall Atomic Spectrometry 19(10) 1340-46, 2004.

Agradecimientos

Parte del trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos: PTR1995-0858-OP (Program PETRI, MCyT); DPI2002-04305-C02-02 y DPI2000-0392-P4-03, MCyT; EU Sixth Framework Programme. Agradecimientos a Biomedal S.L., Sevilla, por la donación de *E. coli* y GFP.

PSEUDOPOLIRROTAXANOS DE PLURONIC Y CICLODEXTRINAS: PROPIEDADES E INTERÉS FARMACÉUTICO

Luis Nogueiras-Nieto,[1] Carmen Alvarez-Lorenzo,[1] Isabel Sandez-Macho,[2] Angel Concheiro,[1] Francisco J. Otero-Espinar[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica and [2]Departamento de Quimica Fisica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España.
e-mail francisco.otero@usc.es

Introducción

Las ciclodextrinas (CD) y la solubilización micelizar son dos técnicas muy útiles para incrementar la solubilidad y la estabilidad de fármacos. No obstante, cuando ambos componentes se incorporan conjuntamente en determinadas proporciones se puede producir un efecto antagónico, como consecuencia de la competición del tensoactivo con el fármaco por la unión a la CD. Esta interacción dificulta la formación de micelas, incrementando la concentración crítica micelar aparente (CMC). Los copolímeros anfifílicos pueden penetrar en la cavidad de las CDs formando complejos supramoleculares, conocidos como pseudopolirrotaxanos, que ofrecen un gran potencial en biomedicina. No obstante, las consecuencias de la formación de estos complejos supramoleculares sobre el comportamiento de sistemas de liberación de medicamentos ha sido escasamente estudiada (1,2). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las interacciones entre el Pluronic PF 127 con la hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) y la metil-β-ciclodextrina MβCD, y evaluar en qué mediad la presencia conjunta de estos excipientes puede altaerar la capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión con moléculas pequeñas y la gelificación *in situ* del Pluronic.

Materiales y Métodos

Materiales

Pluronic® F-127 y naranja de metilo de Sigma-Aldrich. HPβCD (D.S. 0.65, Kleptose HPB®), MβCD, (D.S. 0.57, Kleptose Crysmeb®) de Roquette Laisa España. Agua ultra-pura obtenida por ósmosis reversa (MilliQ®, Millipore).

Isotermas π-A

Las isotermas se registraron en una balanza de superficie de barrera simple NIMA 611 con un área de 550 cm^2. La disolución de Pluronic se depositó con una jeringa sobre la subfase (agua o disoluciones de CD).

RMN-H y modelo molecular

Los espectros de las disoluciones con relación molar PF127:CD de 1:0,10:90,5:95, 2:98, 1:99 y 0:1 en D_2O se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AMX a 500 MHz. El modelo molecular construido con el software ChemDraw Ultra 11 (Cambridge Solf Co.,USA) se optimizó empleando la subrutina MM+ del HyperChem 7.0. (Hypercube Inc, USA).

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se observaron en un microscopio de transmisión PHILIPS CM-12 TEM (FEI Company) tras tinción con ácido fosfotúngstico.

Desplazamiento del naranja de metilo

Se añadieron diferentes volúmenes de PF127 ($1 \cdot 10^{-4}$ M) a disoluciones acuosas de naranja de metilo ($4 \cdot 10^{-4}$ M) y HPβCD o MβCD ($4 \cdot 10^{-3}$ M). El desplazamiento del colorante por el PF127 de la cavidad de la CD se cuantificó midiendo los cambios de absorbancia a 460 nm (HP 4250A, Agilent, Alemania).

Reometría

Los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de las disoluciones de PF127 (10-20%) con o sin MβCD (5% p/v) se determinaron en un reómetro Rheolyst AR-1000N (TA Instruments, GB) con un analizador de datos AR2500.

Resultados y discusión

Las isotermas π-A (**Figura 1**) muestran una interacción atractiva entre PF127 y las CDs. A medida que se reduce el área disponible, las CDs se van orientando con su eje paralelo a la interfase, lo que favorece la formación de los pseudorrotaxanos. El área ocupada por el complejo macromolecular es menor que la suma de las áreas de cada componente por separado.

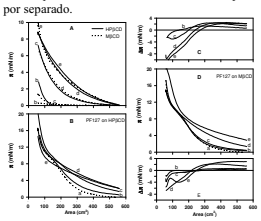


Figura 1.*- Isotermas -A obtenida en ausencia de PF127 cuando las disoluciones de CD se usan como subfases (A) PF127 en agua (línea de puntos) o con HPβCD en subfase (B), exceso de presión superficial para las isotermas PF127 en empleando HPβCD en la subfase (C), PF127 en agua (línea punteada) o con MβCD en la subphase (D), exceso de presión superficial para las isotermas PF127 en empleando MβCD (E). La concentración de CD fue 0% (a), $1.1 \cdot 10^{-5}$ % (b), $1.1 \cdot 10^{-4}$ % (c), 10^{-2}% (d), y 0.1% (e).*

Los espectros de ^{1}H-RMN mostraron desplazamientos en las señales de los protones H_3, H_4 y H_5 orientados hacia el interior de la cavidad de la MβCD y en la de los grupos metilo de los bloques PPO. Estos sugiere las cadenas del copolímero se introducen en la CD. La variación de en función de la proporción MβCD/PF127 sugiere que cada unímero de PF127 interacciona simultáneamente con 20-30 moléculas de CD. Empleando técnicas de modelización molecular se construyó la estructura tridimensional más probable del pseudo-polirrotaxanos MβCD/PF127 (**Figura 2**).

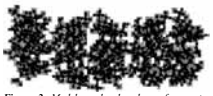


Figura 2. *Modelo molecular de un fragmento de PF127 (12 unidades de PO) complejado con M CD.*

Las microfotografías de TEM (**Figura 3**) de mezclas 50:50 de PF127 al 5% y HPβCD o MβCD al 10% mostraron la formación de estructuras nanotubulares con un grosor estimado de 25-26 nm. Los nanotubos observados podrían estar formados por asociación de miles de pseudopolirrotaxanos apilados. El grosor de la estructura central de los nanotubos, 13-15 nm, está directamente relacionado con el número de CD que forman el pseudopolirrotaxano. Puesto que el diámetro de cada ciclodextrina es 0.7 nm, una longitud de 113-15 nm requiere 18,5-20 unidades de CD, en concordancia con los resultados de H^1-RMN.

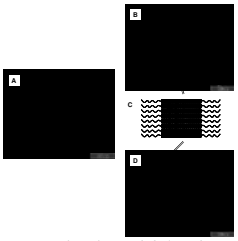


Figura 3. *Microfotografías TEM de disolución de PF127 al 5% (A) y su mezcla con disolución de HP CD (B) o M CD (C) al 10% (relación molar* 1:23 PF127: CD).

La incorporación de PF127 provocó el desplazamiento del naranja de metilo de las cavidades de las CD (**Figura 4**). El efecto fue más relevante en el caso de la MβCD, lo que revela una mayor afinidad del PF127 por esta CD. La caracterización reológica evidenció cambios notables en la temperatura de gelificación del PF127 en presencia de CDs.

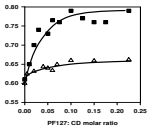


Figura 4. *Cambios inducidos por el PF127 en la absorbancia de disoluciones del naranja de metilo:M CD (cuadrado) o naranja de metilo:HP CD (triangulos).*

Las CDs a las proporciones molares estudiadas no impidieron la formación de gel, pero incrementaron la temperatura de gelificación. Asumiendo que los unímeros de PF127 incorporados a los pseudopolirrotaxanos no participan en la gelificación, es posible estimar la concentración de PF127 que no interacciona con las CDs a partir de los cambios en la temperatura de gelificación. Por este procedimiento se confirmó que la estequiometría de los pseudopolirrotaxanos de MβCD:PF127 es 20:1.

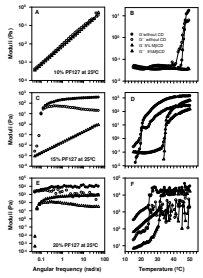


Figura 5. *Módulos elástico (G') y viscoso (G'') de las disoluciones de PF127) al 10 (A,B), 15% (C,D) y 20% (E,F) conteniendo o no 5% M CD en function de la frecuencia angular a 25ºC (A, C y E) y en función de la temperatura a 0.5 rad/s (B,D y F).*

Conclusiones

La interacción de PF127 con MβCD y HPβCD conduce a la formación de pseudopolirotaxanos solubles en agua que experimentan procesos de agregación para dar lugar a nanotubos. Este proceso afecta considerablemente a la capacidad de las CDs para formar complejos con otras moléculas y a la temperatura de gelificación del PF127.

Bibliografía

1) Rodríguez-Perez et al. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 3179, 2006.
2) Nogueiras Nieto et al. *6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.* Barcelona 2008.

Agradecimientos: Roquette Laisa España, MEC (SAF2008-01679) FEDER, y Xunta de Galicia (PGIDT07CSA002203PR).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN "IN VIVO" DE NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS TRAS SU ADMINISTRACIÓN EN RATONES POR VÍA INTRAVENOSA

A. del Pozo-Rodríguez[a], D. Delgado[b], MA Solinís[b], AR Gascón[b], E. Echevarría[c], JM Rodríguez[c], J.L. Pedraz[b]
[a] Farmacia y Tecnología Farmacéutica, CIBER-bbn, Facultad de Farmacia, Univ. del País Vasco. Vitoria
[b] Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Vitoria.
[c] Laboratorio de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Vitoria.

Introducción: El ADN plasmídico desnudo (pADN) es una potente herramienta para la terapia génica, pero es rápidamente eliminado de la circulación sanguínea tras su administración intravenosa (1). En consecuencia, la administración local es la vía de administración preferida para este tipo de terapia, lo que limita seriamente la aplicación del pADN como medicamento. Por eso, es necesario el desarrollo de sistemas de administración de pADN, que permitan su aplicación utilizando las vías sistémicas convencionales en la práctica clínica.

La administración de genes usando lípidos catiónicos es una interesante alternativa a los vectores virales. Estos lípidos catiónicos combinados con otro lípido sólido dan lugar a la formación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs) que condensan mediante interacciones electrostáticas el ADN cargado negativamente.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de transfección de los sistemas SLN-ADN "in vivo" tras su administración intravenosa en ratones Balb/c, utilizando el plásmido pCMS-EGFP que codifica la proteína verde fluorescente (EGFP).

Material y Métodos: Los vectores SLN-ADN se obtuvieron poniendo en contacto el plásmido pCMS-EGFP con una suspensión acuosa de SLNs compuestas por Precirol ATO® 5, DOTAP y Tween-80. La relación SLN:ADN, expresada como relación DOTAP:ADN (w/w) fue 5:1.

Antes de la evaluación de los vectores "in vivo", se caracterizaron "in vitro". Para ello, en primer lugar se midieron el tamaño y carga superficial de los mismos utilizando el equipo Malvern Zetasizer 3000.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de los vectores para proteger el ADN de la enzima DNasa I. Las muestras se pusieron en contacto con la enzima a una concentración final de 1 U DNasa I/2.5µg ADN. También se estudió la topología del ADN unido a las SLNs, utilizando para ello SDS al 1% que permite soltar el plásmido de las nanopartículas. Posteriormente las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

También se estudió la capacidad de transfección y la viabilidad celular "in vitro" en cultivos de células HEK293 a diferentes tiempos (desde 1h hasta 7 días).

Para el estudio "in vivo" se administró un volumen de 100 µL de una solución de complejos SLN-ADN (60 µg ADN) a través de la vena de la cola del ratón. 3 y 7 días después de la administración se sacrificaron los ratones, y se extrajo el hígado, los pulmones y el bazo, se congelaron inmediatamente en N2 líquido, sumergidos en medio de congelación de tejidos (Jung, Leica), y posteriormente, se obtuvieron finas secciones en un criostato (Cryocut 3000, Leica).

Para detectar la proteína EGFP en las secciones, se llevó a cabo el marcaje con inmunofluorescencia. Las secciones teñidas se montaron con Fluoromount G y se analizaron utilizando un microscopio invertido con dispositivo para la detección de fluorescencia (modelo EclipseTE2000-S, Nikon).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS 14.0 para realizar un test t-Student, considerándose las diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$.

Resultados y Discusión: La Tabla 1 resume el tamaño de partícula, el potentcial zeta y el índice de polidispersión (I.P.) de las SLNs y los vectores SLN-ADN.

Tabla 1. *Tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta de las SLNs y los vectores SLN-ADN.*

Media (D.E.) para n=6.* p<0.01 respecto a las SLNs

El tamaño de los vectores SLN-ADN (276 nm), es suficientemente pequeño para ser administrados por vía intravenosa.

El gel de electroforesis, que se presenta en la Figura 1, muestra las bandas correspondientes al ADN previamente liberado de los vectores SLN-ADN tratados con DNasa I (línea 3) y no tratados (línea 4). La aparición de la banda correspondiente al ADN lineal (L) en las muestras tratadas con DNasa I indica que las nanopartículas sólo son capaces de proteger el ADN parcialmente.

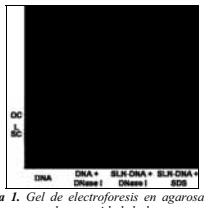


Figura 1. *Gel de electroforesis en agarosa en el que se muestra la capacidad de los vectores para proteger el plásmido frente a la enzima DNasa I, y la topología del ADN unido a las SLNs.*

Los niveles de transfección "in vitro" en los cultivos de células HEK293 se midieron a diferentes tiempos entre 1 h y 7 días. Como se ve en la Figura 2, la proteína verde fluorescente (EGFP) se detectó desde las 24 h, con un 14% de células transfectadas, hasta los 7 días, con el 40% de las células transfectadas. Estos niveles de transfección se obtuvieron en presencia de suero (10% en el medio de cultivo).

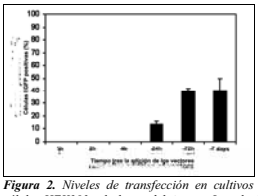


Figura 2. *Niveles de transfección en cultivos de células HEK293 a lo largo del tiempo. La relación DOTAP:ADN expresada como DOTAP:ADN fue 5:1. Las barras de error representan D.E. (n=3).*

Tras la administración intravenosa en ratones se detectó EGFP en el hígado y en el bazo a los 3 y 7 días tras la administración, siendo más abundante la presencia de la proteína a los 3 días. La transfección de células del bazo y el hígado puede ser útil si estos tejidos son la diana de la terapia génica, por ejemplo, en el caso de las vacunas de ADN, para el tratamiento de tumores en esos órganos o para la excreción al torrente sanguíneo de proteínas ausentes en el organismo.

En las muestras de pulmón no se detectó EGFP. Sin embargo, existen trabajos en la bibliografía en los que se muestra la transfección a nivel pulmonar con sistemas catiónicos (2). La acumulación en los pulmones de estos sistemas se relaciona con la formación de agregados cuando interaccionan con componentes sanguíneos. La ausencia de expresión de EGFP a nivel pulmonar podría explicarse por la incorporación en las SLNs de cadenas de PEG (presentes en el Tween-80), que evitarían la interacción con componentes sanguíneos, como las proteínas plasmáticas, mediante estabilización estérica (3). De hecho, las partículas fueron capaces de transfectar las células HEK293 "in vitro", a pesar de la presencia de un 10% de suero en el medio de cultivo.

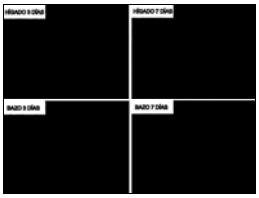


Figura 3. *Imágenes de secciones de hígado y bazo que mostraron EGFP a los 3 y 7 días tras la administración de los vectores SLN-ADN.*

Además, las cadenas de PEG evitan la formación de agregados, puesto que impiden la unión de una molécula de ADN a más de una nanopartícula (4), manteniéndose un tamaño de partícula inferior a 300nm, lo que les hace adecuadas para la administración intravenosa.

Conclusiones: Los vectores elaborados con SLNs compuestas por Precirol ATO® 5, DOTAP y Tween-80 son capaces de transfectar tanto "in vitro" como "in vivo", dando lugar a la expresión de la nueva proteína durante al menos 7 días en el hígado y en el bazo tras una administración intravenosa.

Referencias:
1. Liu F, et al. J Gene Med. 2007; 9: 613-619.
2. Kichler A, et al. J Gene Med. 2004; 6: S3-S10.
3. Harvie P, et al. J Pharm Sci. 2006; 89: 652-663.
4. Liu F, et al. Pharm Res. 1996; 13: 1642-1646.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (IT-407-07). Ana del Pozo-Rodríguez agradece al Ministerio de Educación y Ciencia de España por la beca predoctoral otorgada. Los autores quieren agradecer a Gontzal García (departamento de Neurociencias) su ayuda en el marcaje con inmunofluorescencia.

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO SISTEMAS TRANSPORTADORES DE TEGAFUR

J.L. Arias, M.A. Luque-Ramos, M. López-Viota, V. Gallardo
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja, s/n. 18071 Granada
e-mail: jlarias@ugr.es

Introducción

Las enormes posibilidades que ofrecen los materiales poliméricos en el diseño de sistemas transportadores de fármacos son bien conocidas desde tiempo atrás. Los principales beneficios que ofrecen estos sistemas son su capacidad para mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco vehiculizado (incrementando su acumulación en el lugar de acción), la protección que ofrecen a éste frente a fenómenos de biodegradación, y su propia biodegradabilidad y baja o nula toxicidad.

La poli(ε-caprolactona) (PCL) es un polímero semicristalino biodegradable y biocompatible, que se caracteriza por una baja temperatura de transición vítrea. Debido a su lenta biodegradación, la PCL y sus copolímeros presentan enormes posibilidades como sistemas transportadores de fármacos de liberación sostenida. Esto ha hecho que se utilice ampliamente en la preparación de micro-(nano-)partículas e implantes (1, 2).

En el presente trabajo investigamos el diseño de nanopartículas de PCL como sistemas de transporte de fármacos anticancerígenos. Nos centramos en la optimización del proceso de vehiculización del antineoplásico Tegafur (o Ftorafur). Analizamos la capacidad de absorción/adsorción de éste por el polímero y su posible mejora mediante la modificación de las condiciones de preparación. Finalmente, realizamos un análisis preliminar del proceso de liberación *in vitro*.

Materiales y Métodos

Materiales

El agua utilizada fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, Francia). Los reactivos empleados son de calidad analítica (Panreac, España), excepto la PCL, el tensioactivo Pluronic® F-68 y el Tegafur (Sigma-Aldrich, Alemania).

Preparación de las nanopartículas de PCL

La preparación de las partículas de PCL se realizó mediante el método de emulsión O/A (3) (150 ± 25 nm, Figura 1). Brevemente, se disolvió el polímero (0.2 g) en 20 mL de diclorometano. La fase orgánica se emulsionó en 40 mL de fase acuosa [Pluronic® F-68 2 % (w/v)] bajo agitación mecánica (15000 rpm) y durante 1 hora. Tras lograr la completa evaporación del disolvente, el proceso de limpieza del polímero se realizó mediante ciclos repetidos de centrifugación y redispersión del sedimento en agua (hasta que el sobrenadante tuvo una conductividad < 10 $\mu S \cdot cm^{-1}$).

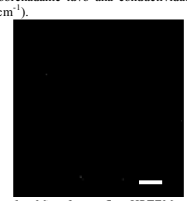


Fig. 1. *Microfotografía HRTEM de las nanopartículas de poli(ε-caprolactona). Longitud de barra: 200 nm.*

Análisis de la adsorción/absorción y liberación *in vitro* de Tegafur

Mediante un método espectrofotométrico UV-Vis previamente validado (4, 5) (λ = 271 nm; ε = 8070 ± 140 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) se determinó por triplicado la incorporación del antineoplásico a nivel superficial o en la matriz polimérica. El proceso de adsorción de Tegafur también se analizó cualitativamente mediante electroforesis (4, 5). La liberación *in vitro* de fármaco desde el coloide polimérico se determinó empleando el mismo procedimiento espectrofotométrico (37.0 ± 0.5 ºC; solución buffer NaOH-KH_2PO_4 de pH = 7.4; condiciones *sink*).

Resultados y Discusión

Adsorción de Tegafur en los nanocoloides

La concentración de anticancerígeno en el medio de contacto ejerce un efecto positivo sobre la eficiencia de adsorción. Como puede apreciarse en la Figura 2, la adsorción de Tegafur se incrementa notablemente con la cantidad de antineoplásico en solución, sugiriéndose la saturación de este proceso a concentraciones superiores a las investigadas. Los datos parecen ajustarse a una isoterma de adsorción de Langmuir (Γ_{max} = 210 ± 20 $\mu mol/m^2$; k = 115 ± 15 L/mol).

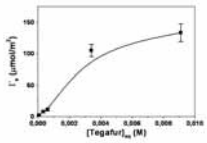


Fig. 2. *Densidad de adsorción de anticancerígeno en función de la [Tegafur] en el equilibrio.*

Los resultados del estudio electroforético respaldan la existencia de adsorción superficial de Tegafur en las partículas de PCL (Figura 3): u_e tiende a alcanzar valores absolutos cada vez menores al incrementarse la concentración de fármaco en el medio. La carga negativa de las partículas tiende a ser cada vez menor al producirse la adsorción del antitumoral. Esto puede deberse a la existencia de una interacción electrostática entre el polímero con carga negative y las especies positivas procedentes de la protonación del grupo –NH de la molécula de Tegafur. La presencia de NaCl apantalla este proceso, lo que hace que en este caso la reducción de u_e no sea tan marcada.

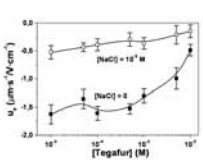


Fig. 3. *Movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de PCL en función de la [Tegafur] en el equilibrio, en presencia y en ausencia de NaCl 10^{-3} M.*

Absorción de Tegafur

La absorción de Tegafur aumenta con la concentración de éste en el medio de síntesis de las nanopartículas de PCL y, como puede apreciarse en la Figura 4, existe una tendencia a la saturación del proceso a concentraciones superiores. La incorporación de Tegafur en la matriz polimérica permite incrementar la vehiculización del antitumoral en comparación con el método de adsorción en superficie.

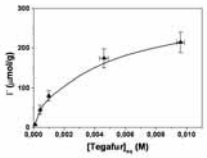


Fig. 4. *Densidad de absorción de Tegafur en función de la [antineoplásico] en el equilibrio.*

Liberación *in vitro* de Tegafur

El estudio de la liberación *in vitro* de Tegafur revela un proceso bifásico de cesión del antitumoral desde los nanocoloides de PCL: una primera etapa de liberación rápida del Tegafur vehiculizado superficialmente (≈ 70 % en 9 h.), seguida de una fase más lenta que resulta de la degradación polimérica (≈ 30 % en 39 h.).

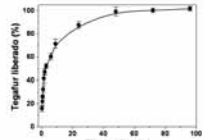


Fig. 5. *Liberación de Tegafur desde PCL en función del tiempo a pH = 7.4.*

Conclusiones

Se han identificado las condiciones ideales para la preparación de un sistema coloidal que permite el transporte y la liberación controlada del antineoplásico Tegafur. El proceso de absorción de fármaco descrito, permite obtener una mayor vehiculización de anticancerígeno y un perfil de liberación bifásico adecuado para su utilización en terapia antitumoral.

Bibliografía

(1) Ge, H., et al. J. Appl. Polym. Sci. 75, 874-882. 2000.
(2) Sinha, V.R., et al. Int. J. Pharm. 278, 1-23, 2004.
(3) Yang, J., et al. Int. J. Pharm. 324, 185-190, 2006.
(4) Arias, J.L., et al. Int. J. Pharm. 337, 282-290. 2007.
(5) Arias, J.L., et al. J. Control. Release 125, 50-58. 2008.

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN IN-VITRO DEL EFECTO ANTITUMORAL DE DERIVADOS DEL PLATINO ADMINISTRADOS BAJO DIFERENTES FORMAS FARMACÉUTICAS

Daniel Moreno[1], Sara Zalba[1], Iñigo Navarro[2], Conchita Tros de Ilarduya[1], María J Garrido[1]
[1]Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. [2] Departamento de Química (sección química analítica). Universidad de Navarra. (Pamplona).

Introducción

El cisplatino, es un agente anti-neoplásico utilizado en una amplia variedad de tumores sólidos. Sin embargo, la presencia de importantes efectos adversos, especialmente la neurotoxicidad, ha supuesto una limitación en su uso [1]. De aquí que son varias las estrategias que se han ido desarrollando para intentar disminuir estos efectos adversos. Entre ellas destacamos su encapsulación en sistemas tales como, microesferas y liposomas. Las características físico-químicas de este agente son un freno importante para conseguir buenos niveles de encapsulación y una liberación sostenida en el tiempo [2].

Por otro lado, está descrito que su efecto antitumoral está directamente relacionado con el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (AUC), sin embargo, datos de la literatura apuntan a que para una misma AUC, el régimen de administración determina el efecto ya que un régimen continuado de bajas dosis resultó más efectivo para inducir apoptosis que un régimen de dosis única y elevada. Este efecto antitumoral va directamente unido a su mecanismo de acción, el cual es independiente del ciclo celular, pero dependiente de la activación de la vía de las caspasas, "caspasa-3".
Por tanto, el objetivo es desarrollar, evaluar y caracterizar *in-vitro* el efecto antitumoral del cisplatino, administrado bajo distintas formas farmacéuticas.

Material y métodos

Desarrollo de formulaciones para el cisplatino

Las partículas desarrolladas se prepararon siguiendo el método de evaporación del disolvente tras la formación de una doble emulsión (A/O/A) y utilizando como polímero el PLGA, y en concreto el Resomer 502H. Se desarrollaron 2 protocolos [3].

Protocolo 1: Una solución acuosa de cisplatino (2.5 mg/ml) se emulsionó con una solución de PLGA (100 mg) disuelto en diclorometano mediante una sonda de ultrasonidos. Esta primera emulsión fue transferida a una solución acuosa de polivinilalcohol (PVA) al 9 % (p/v) saturada con cisplatino y homogenizada mediante sonda de ultrasonidos.

Protocolo 2: Una solución de cisplatino en Tris-HCl (1.67 mg/ml) se emulsionó con una solución de PLGA (100 mg) disuelto en triclorometano mediante una sonda de ultrasonidos o Ultra-Turrax, dependiendo del tamaño buscado. Esta primera emulsión fue transferida a una solución acuosa de PVA al 9 % saturada con cisplatino y homogenizada mediante Ultra-Turrax.

En todos los casos, la mezcla A/O/A se dejó en agitación a Tª ambiente durante 3 h para la completa evaporación del disolvente y transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron, se lavaron con agua y se liofilizaron. Las partículas se guardaron a -80 ºC para su posterior caracterización.

Caracterización de las partículas.

- *Estudios físico-químicos*

El tamaño y el potencial zeta se determinaron por difractometría de láser en un Zetasizer Nano Series. Aquellas partículas con tamaños superiores a 1 m, se cuantificaron en el Mastersizer (lente 300 RF). Los datos de tamaño de partícula fueron contratados mediante SEM (microscopía electrónica de barrido)

- *Estudios de liberación in-vitro*

La carga de cisplatino fue cuantificada mediante HPLC [3]. Para ello, 5 mg de partículas fueron resuspendidas en 1 ml de NaOH (1 N) y tras 12 h en agitación, se centrifugaron y el sobrenadante analizado.
Por otro lado, 5 mg de partículas se resuspendieron en 1 ml de PBS y la mezcla se dejó en agitación constante a 37 ºC. A cada tiempo establecido (entre 0 y 35 días) las muestras fueron centrifugadas a 18.000 g / 10 min. y los sobrenadantes utilizados para análisis. La técnica cromatográfica fue lineal entre 0.1 - 100 g/ml, el límite de detección estuvo en 0.2 g/ml y la precisión [expresada como CV (%)] fue < 10%.

Estudios in-vitro

Células DHD/K12PROb, procedentes de carcinoma de colon de rata, fueron sembradas en placas y tratadas con distintas

concentraciones de cisplatino libre y encapsulado (2,5 - 50 M) y oxaliplatino (0,1 - 40 M) durante distintos tiempos de exposición (3 - 144 h). A cada tiempo se cuantificó:

- *Viabilidad celular* mediante un colorante vital denominado rojo neutro, que permite cuantificar las células vivas.
- *Ciclo celular* mediante marcaje con ioduro de propicio y utilizando citometría de flujo.
- *Caspasa-3 activada (marcador apoptótico)* utilizando el Caspase-Glo® 3/7 Luminometric Assay Kit (Promega).
- *Niveles de VEGF (marcador angiogénico)* utilizando el Mouse VEGF Inmunoassay Kit (R&D Systems).

Resultados y Discusión

Las partículas obtenidas mediante los distintos protocolos difirieron de forma estadística en el tamaño y la cantidad de cisplatino encapsulado. El potencial zeta resultó negativo en todos los casos. Para las tres formulaciones desarrolladas, las poblaciones fueron homogéneas y las partículas redondas con tamaños medios de 200 nm para las nanopartículas A (protocolo 1), 500 nm para las nanopartículas B (protocolo 2) y de aproximadamente 9 m en el caso de las micropartículas (protocolo 3). Los diferentes tamaños influyeron de forma significativa en los perfiles de liberación así, las NPA de menor tamaño presentaron un efecto burst del 50 % a las 24 h, seguido del 35 % para las NPB y menor al 20 % para las MP. Este aspecto condicionó la viabilidad celular ya que se encontró una correlación entre la cinética de liberación y el parámetro IC_{50} o concentración de fármaco que inhibe el 50 % del crecimiento celular. En el caso del oxaliplatino, éste mostró una mayor citotoxicidad durante todos los tiempos de exposición, con una IC_{50} menor al cisplatino.

Por otro lado, el análisis de las distintas fases del ciclo celular mostró que, la acumulación típica de células en fase G2/M tras el tratamiento con cisplatino, se cumplía únicamente cuando la dosis utilizada estaban por debajo de 10 M para el agente libre, mientras que a dosis superiores, estas células eran capaces de saltar este "checkpoint", acumulándose en G0/G1 y entrando directamente en apoptosis. Esta dualidad desaparece para los tratamientos con cisplatino vehiculizado donde, incluso la mayor concentración, produjo acumulación celular en fase G2/M (figura 1).

Cuando se cuantificaron los niveles de caspasa-3, se encontró un perfil de activación dosis-tiempo dependiente en todos los casos y al igual que para el ciclo, se observó una dualidad en el comportamiento del cisplatino. Así, concentraciones menores a 10 M del compuesto libre, producían una activación mas gradual en el tiempo con un máximo entre 72 y 144 h, mientras que para concentraciones altas,

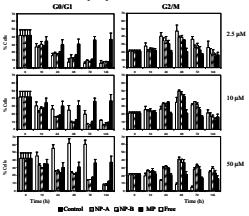


***Figura 1**. Análisis del ciclo celular para el cisplatino libre y vehiculizado tras distintas concentraciones y tiempos de exposición.*

se producía una rápida e intensa activación a las 24 h relacionada con los efectos adversos, principalmente en riñón. En el caso de las distintas formulaciones, la activación fue gradual con un máximo en todos los caso a las 72 h (figura 2). Estos datos corroboran, al menos *in-vitro*, la hipótesis de partida sobre la activación más efectiva de apoptosis tras una liberación continuada y a dosis bajas.

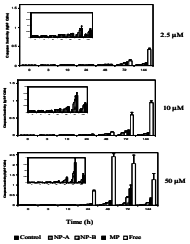


***Figura 2**. Niveles de caspasa-3 activa por numero de células tras el tratamiento con cisplatino libre y vehiculizado tras distintas concentraciones y tiempos de exposición.*

En el caso del oxaliplatino, la distribución de células en las distintas fases presentaba diferencias significativas con respecto al cisplatino. Cabe resaltar la acumulación de células en fase S, seguida de una acumulación

mas tardía en fase G2/M. La activación de caspasa-3 fue significativamente menor aún cuando su efecto citotóxico fue mayor. Este dato apuntó a que la caspasa-3 no parecía ser el único de los efectores apoptóticos que el oxaliplatino activaba. Por tanto, este derivado platínico de tercera generación presento un distinto mecanismo de acción con respecto al cisplatino.

Por ultimo, la cuantificación de los niveles de VEGF expresados por las células tras los distintos tratamientos, demostraron ser un excelente marcador del efecto antiproliferativo.

Conclusiones

A la vista de estos resultados podemos decir que, la encapsulación del cisplatino supuso un aumento de la eficacia de este agente, al menos en ensayos *in-vitro*.

Bibliografía

1. Fuertesa MA, Castillab J, Alonso C, Pérez JM. Curr Med Chem 10: 257, (2003).
2. Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP, Chabot F, Veillard M. J Control Release 7: 217, (1988).
3. Moreno D, Tros C, Bandrés E, Buñuales M y cols. Eur J Pharm Biopharm 68: 503, (2008)

Agradecimientos

Este trabajo ha sido en parte financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PCT-090100-2007-27) y la Universidad de Navarra. Moreno D y Zalba S han sido financiados por el Gobierno de Navarra (Dpto. educación y Dpto. de industria, respectivamente).

UTILIZACIÓN DEL PLÁSMIDO TK-GFP-LUCIFERASA EN EL ESTUDIO DE LA BIOSEGURIDAD DE MICROSISTEMAS CELULARES ADMINISTRADOS POR DIFERENTES VÍAS

E. Santos[1], G. Orive[1], R.M. Hernández[1], R. Catena[2], A. Calvo[2], J.L. Pedraz[1]
[1]Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad del País Vasco (UPV-EHU), Paseo de la Universidad nº7, Vitoria-Gasteiz, 01006, Spain.
[2]División de Oncología. CIMA Universidad de Navarra, Pamplona, Spain.

Introducción: La microencapsulación de células es una tecnología terapéutica con un gran potencial para el tratamiento de varios desordenes crónicos sin necesidad de inmunosupresión (1).

Sin embargo, desarrollar un sistema que nos permita conocer en todo momento la localización exacta de las células microencapsuladas, así como su estado de actividad funcional ha representado un gran reto para los distintos grupos de investigación que trabajan en este campo. Además, la falta de control sobre dichos aspectos representa un problema importante a la hora de asegurar la bioseguridad de esta aproximación biotecnológica (2).

El objetivo de este estudio es la puesta a punto de un método de monitorización *in vivo* mediante el cual se pueda conseguir un exhaustivo control sobre las células encapsuladas e implantadas en distintos lugares del organismo. Para ello, se encapsuló una línea celular de mioblastos C2C12 transfectados con un vector que codifica para los genes timidín quinasa (TK), proteína verde fluorescente (GFP) y luciferasa (3), y se implantó en ratones inmunocompetentes por vía subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e intracraneal (i.c.). Paralelamente, como control, se realizó el implante de las mismas células (a una dosis equivalente) sin encapsular.

Material y Métodos: Los mioblastos C_2C_{12} derivados del músculo esquelético de ratón C3H y genéticamente modificados para expresar TK, GFP y luciferasa (clon TGL 2B7) fueron encapsulados en microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) (alginato de baja viscosidad y alto contenido en ácido gulurónico, FMC Biopolymer, Norway) utilizando para ello un goteador electroestático y siguiendo el procedimiento descrito por Lim & Sun's (4) con algunas modificaciones.

La presencia de GFP en el vector posibilita la detección, mediante FACS, de las células que han sido transfectadas.

Para la administración *in vivo* los ratones C57 fueron anestesiados con una mezcla de xilacina y quetamina mediante administración intraperitoneal. A cada ratón le fue inoculada una dosis de 200 µL de microcápsulas en PBS (400 µL de volumen final) bien por vía s.c. o por vía i.p., empleando para ello un catéter (Nipro 20 gauge; Nissho Corp.). A los grupos control de ambas vías se les inoculó el mismo número de células sin encapsular.

Para la vía i.c. los ratones fueron anestesiados mediante isofluorano inhalado. Una vez realizada la craneotomía se les administró a nivel de corteza cerebral (bilateralmente) entre 20 y 30 micropartículas por orificio. A los ratones control se les administraron el mismo número de células sin encapsular.

Los días 1 y 30, tras la implantación, se les administró a los ratones una dosis de luciferina (3 mg en 100 µL volumen) mediante inyección i.p., y se determinó la emisión de fotones mediante una cámara luminométrica (Xenogen). Los ratones fueron afeitados en la zona de implante antes de proceder a la captación de fotones (5). El tiempo de captura fue de 2 minutos a alta resolución, en un área de 2 cm. Las intensidades de emisión fueron determinadas mediante el software Igor Pro 2.2.

Resultados y Discusión: El diseño experimental se centró en el seguimiento de los implantes realizados utilizando las tres vías de administración, empleando para ello una cámara luminométrica. Tal y como se ha comentado anteriormente para cada vía de administración se disponía de dos grupos a los que se les administró el mismo número de células, ya sea encapsuladas o sin encapsular.

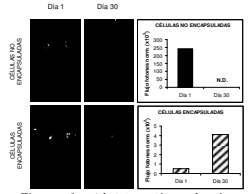


***Figura 1.** Administración subcutánea. Imágenes de la cámara luminométrica (izqda) y sus valores numéricos (dcha) para células*

encapsuladas y no encapsuladas los días 1 y 30 post-implante.

Los resultados muestran claramente como en el caso de las administraciones de las células sin encapsular se obtiene una emisión de una gran cantidad de fotones el primer día que posteriormente va decayendo hasta valores indetectables el día 30.

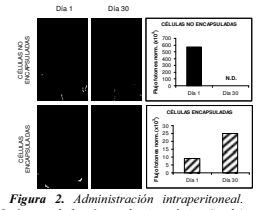


***Figura 2.** Administración intraperitoneal. Imágenes de la cámara luminométrica (izqda) y sus valores numéricos (dcha) para células encapsuladas y no encapsuladas los días 1 y 30 post-implante.*

Sin embargo, las células encapsuladas muestran un comportamiento bastante diferente. La emisión de fotones no solo persiste a lo largo de los 30 días, sino que además se incrementa de forma considerable respecto al primer día. El comportamiento de las células encapsuladas y sin encapsular es similar para todas las vías de administración estudiadas: s.c. (Fig. 1), i.p. (Fig. 2) e i.c. (Fig. 3).

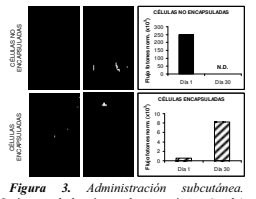


***Figura 3.** Administración subcutánea. Imágenes de la cámara luminométrica (izqda) y sus valores numéricos (dcha) para células encapsuladas y no encapsuladas los días 1 y 30 post-implante.*

La desaparición de la señal luminométrica el día 30 en el caso de las células sin encapsular puede deberse a que la respuesta inmune del huésped es capaz de eliminar por completo las células alogénicas implantadas.

Al inicio del experimento (t = 1 día) podemos observar una mayor emisión de fotones por parte de los injertos con células sin encapsular con respecto a las células encapsuladas. Esto se debe principalmente a que las células encapsuladas presentan un retraso en la emisión que podría ser causado por el tiempo que la luciferina necesita para poder difundir a través de la matriz. Hay que añadir, además, que el organismo necesita al menos una semana para crear una red vascular madura y funcional que pueda suplir por completo la demanda de nutrientes y oxígeno que exige el injerto, facilitando de esta forma un mayor aporte de luciferina a las células encapsuladas, y justificándose por tanto el aumento de la señal de emisión al final del experimento (30 días).

Se ha detectado una menor señal en la vía intracraneal debido al reducido número de cápsulas implantadas.

Conclusiones: Este estudio se centra en la necesidad de encontrar un método que permita una fácil monitorización de las células encapsuladas *in vivo* tras su implantación en distintas zonas del organismo. Con este propósito, se administraron por vía s.c., i.p. e i.c. las microcápsulas de APA que contenían mioblastos C_2C_{12} modificados con el triple vector TK-GFP-luciferasa y se compararon con el mismo tipo de células sin encapsular.

Los resultados demuestran claramente la eficacia de este método de monitorización *in vivo* para células encapsuladas e implantadas utilizando tres de las vías de administración más habituales.

Estos datos indican que la incorporación del triple vector TK-GFP-luciferasa puede representar una importante mejora en la monitorización y bioseguridad de la microencapsulación celular para las distintas vías de administración. Estos avances suponen un gran paso adelante para acercar esta tecnología a futuros ensayos clínicos.

Referencias:

(1) Murua, A *y col., Biomacromolecules*, **8** : 3302-3307, 2007
(2) Cheng, D *y col., J Biomed Mater Res*, doi:10.1002/jbm.a.31716, 2008
(3) Ponomarev, V *y col., Eur J Nucl Med Mol I* **31(5)** : 740-751, 2004
(4) Lim, F, Sun A. *Science* **210**: 908-909, 1980
(5) Blum, J *y col., Biomaterials* **25**: 5809-5819, 2004

Agradecimientos:

E. Santos agradece al "Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación)" por su beca predoctoral.

POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR ORAL DELIVERY OF PACLITAXEL

M. Agüeros[1], P. Areses[2], M.A. Campanero[1], G. Quincoces[2], I. Peñuelas[2], J.M. Irache[1*]
[1] Dpto de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Navarra. Irunlarrea s/n. 31008 Pamplona.
[2] Unidad de Radiofarmacia, Departamento de Medicina Nuclear, Clínica Universitaria de Navarra, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona.

Introduction
Paclitaxel (PTX) is a potent anticancer agent approved for the treatment of a large number of solid tumors. However, till now, no commercial formulations for the oral administration of this drug are available. This fact can be related with the low oral bioavailability of paclitaxel (less than 10%), mainly due to its low aqueous solubility, P-glycoprotein efflux and first pass metabolism by cytochrome P450 located in the gut and the liver (CYP2C8 and CYP3A4).
The aim of this work was to develop new formulations and strategies for the oral delivery of paclitaxel. For this purpose, the association between cyclodextrins and bioadhesive nanoparticles have been studied. Recently, Gantrez AN or poly(anhydride) has been proposed as a new polymer to prepare bioadhesive nanoparticles for oral drug delivery (1) that would permit to establish adhesive interactions with the gut mucosa inducing their immobilisation at the gut surface and thus increase the residence time of the pharmaceutical device in close contact with the absorptive membrane. On the other hand, the use of cyclodextrins would increase the loading capability of the nanoparticles (2) and inhibit or decrease the activity of cytochrome P450 and P-glycoprotein.

Materials and methods
Gantrez® AN 119 [poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)] was gifted by ISP (Spain). β-cyclodextrin (CD) was provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) by RBI (Massachusetts, USA) and 6-monodeoxy-6-monoamino-β-cyclodextrin (NHCD) was purchased from Cyclolab, (Hungary).

Nanoparticles preparation
Nanoparticles were prepared by solvent displacement method. The inclusion complexes (PTX-cyclodextrin) prepared in a molar ratio 1:1, were incubated for 30 minutes, under magnetic stirring at room temperature, in 5 ml of acetone containing 100 mg Gantrez® AN. Then, the nanoparticles were formed by the addition of an ethanol/water mixture (1:1 v/v) and the organic solvents were eliminated by evaporation under reduced pressure (Büchi R-144, Switzerland).
The resulting carriers were purified by centrifugation at 17,000 rpm for 20 min twice and then, the formulations were freeze-dried (Genesis 12EL, Virtis, USA) using sucrose (5% w/w) as cryoprotector.

Characterization of nanoparticles
Size and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy (PSC) and electrophoretic laser Doppler anemometry, respectively, using a Zetamaster analyser system.
The morphological characteristics of the complexes and nanoparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM) as well as by transmission electron microscopy (TEM).
Similarly, the amount of PTX loaded into nanoparticles was calculated by HPLC-UV. Finally, the yield of the process was calculated by gravimetry.

Pharmacokinetic studies
The pharmacokinetic study was performed by the oral administration to rats of a single dose of 10 mg/kg of PTX included in different formulations. Besides, commercial Taxol was administered by i.v. route to rats at the same dose (10 mg/kg). Then, blood samples of 300 µl were collected at different times up to 30h. The amount of paclitaxel was determined in plasma by HPLC-UV detection after liquid-liquid extraction. The pharmacokinetic analysis of concentration-time data, obtained after the administration of the different PTX formulations, was analyzed using a noncompartimental model using WinNonlin 5.2 software (Pharsight Corporation, Mountain View, EEUU).

Results and discussion
Nanoparticles characterization
All the PTX-cyclodextrin nanoparticles displayed sizes of about 300 nm, slightly higher than control ones (PTX-NP) without cyclodextrins (200 nm). Concerning the PTX content, it is interesting to note that, the amount of PTX entrapped in the nanoparticles depends on the type of oligosaccharide used (table 1).

Table 1. Physico – chemical characteristics of PTX-CD poly(anhydride) nanoparticles (mean±SD, n=10).

	Size (nm)	Zeta pot. (mV)	Yield (%)	PTX content (µg/mg NP)
NP	179±2	-48.1±0.8	91.3±3.1	-
PTX-NP	204±4	-38.3±2.1	51.2±6.6	0.3±0.1
PTXCD-NP	298±6	-39.3±5.2	63.3±2.9	40.5±5.1
PTX-HPCD-NP	307±7	-42.1±1.4	58.6±4.4	171.1±13.4
PTX-NHCD-NP	310±6	-34.5±3.9	59.5±4.6	99.3±10.1

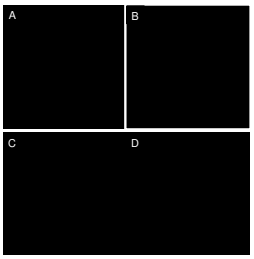
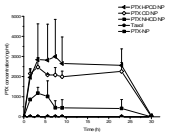


Figure 1. 1A: Transmission electron microscopy of conventional nanoparticles containing PTX (PTX-NP). 1B: Scanning electron microscopy (SEM) of nanoparticles containing β-CD and PTX (PTX-CD-NP). 1C: SEM of nanoparticles containing HPCD and PTX (PTX-HPCD-NP). 1D: SEM of nanoparticles containing NHCD and PTX (PTX-NHCD-NP).

Pharmacokinetic studies
When commercial Taxol® was administered to rats by the oral route (Figure 2A), no PTX plasmatic levels were found. Similar results were obtained with the different complexes between PTX and CD, HPCD or NHCD (data not shown). On the contrary, when PTX-CD complexes were included into poly(anhydride) nanoparticles formulations, these formulations displayed sustained plasmatic PTX levels for at least 24 h (Figure 2A). In any case, the PTX-CD-NP y PTX-HPCD-NP formulations allow us to obtain 3-4 fold higher plasmatic levels than PTX plasmatic levels obtained with PTX-NHCD-NP. Figure 2B shows the drug concentration time-profile corresponding to mean of 6 animals after intravenous administration of Taxol® solution at the same dose of 10 mg/kg.
(A)



(B)

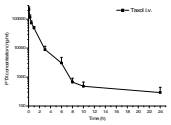


Figure 2. (A) Paclitaxel plasmatic levels after the oral administration of a single dose of 10 mg/kg of PTX loaded in CD-poly (anhydride) nanoparticles (n=6). (B) Plasma paclitaxel concentration-time profiles after the intravenous administration of a 10 mg/kg dose of Taxol® (n=6).

Table 2. Pharmacokinetic parameters of the different formulation tested.

Formulation	AUC (ng h/ml)	C_{max} (ng)	T_{max} (h)	MRT (h)	$T_{1/2\,z}$ (h^{-1})	F
Taxol® (iv)	79212	216674	0.06	2.63	4.54	1
PTX-NP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
PTX-CD-NP	65965**	2469	4.90	13.72	1.48	0.79
PTX-HPCD-NP	67127**	2842	6.17	11.09	1.32	0.80
PTX-NHCD-NP	14612	1470	4.66	9.97	0.89	0.17

** $p< 0.01$ PTX-OH β-CD-NP and PTX-β-CD-NP vs. PTX-NH β-CD-NP. Test U - Mann Whitney.

In summary, the obtained pharmacokinetics parameters showed in this work demonstrates the high capability of poly (anhydride) nanoparticles associated to cyclodextrins to enhance the oral bioavailability of paclitaxel, especially for PTX-CD-NP and PTX-HPCD-NP formulations which reached an oral bioavailability close to 80%.

Acknowledgements
"Asociación de Amigos", "Fundación Universitaria de Navarra", "Gobierno de Navarra" (Dpto. Educación), ISP Corp., "Ministerio de Ciencia y Tecnología" (SAF2008-02538).

References
[1] P. Arbós et al. J Control Release. 88(2); p.345 (2003).
[2] F. Kihara et al. Bioconjugate Chem.14; p.342 (2003).
[3] S. Yang et al. Pharm Res. 21(2); p.261 (2004).

MODELADO DEL TRANSPORTE DEL DERIVADO DE VINBLASTINA KAR-2 EN RATA Y EN CÉLULAS CACO-2.

Gonzalez-Alvarez I[3], Gonzalez-Alvarez M[1], Oltra-Noguera D[1], Ovadi, J[2], Merino V[1], Bermejo M[3]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia.
[2]Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.
[3]Depto. de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández, Elche.

Introducción: Los bis-indoles, grupo al que pertenece la Vinblastina, se utilizan en la terapia contra el cancer por su capacidad de inhibir la división incontrolada de las células tumorales. No obstante su uso presenta la doble dificultad de su falta de especificidad para células en división y la baja biodisponibilidad oral. Entre los nuevos derivados de la Vinblastina se encuentra el compuesto KAR-2 cuyo mecanismo de acción se basa en su capacidad para unirse a la tubulina, presentando menor citotoxicidad que la Vinblastina pero conservando su potencia antitumoral. El objetivo del estudio ha sido la caracterización biofarmacéutica de KAR-2 en comparación con la Vinblastina a fin de caracterizar su mecanismo de absorción intestinal y determinar la posibilidad de su administración por vía oral.

Materiales y Métodos: Los estudios de absorción in vitro de Vinblastina y KAR-2 se realizaron en monocapas Caco-2 en dirección apical basal (A-B) y basal apical (B-A). Las concentraciones de Viblastina abarcaron el ámbito de 5µM a 1000µM, y las de KAR-2 desde 25 a 500 µM.

La absorción in situ se caracterizó en rata Wistar con un método de perfusión sin recirculación basado en la técnica de Doluisio. Las concentraciones de perfusión oscilaron entre 5-100 µM para Vinblastina y 0.5-500 µM para KAR-2

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida HPLC de fase inversa con detección fluorescente para determinar las cantidades y concentraciones de fármaco en las mismas. Los valores de permeabilidad aparente a cada concentración inicial y para cada compuesto se determinaron a partir de las concentraciones remanentes en lumen o a partir de las cantidades acumuladas en compartimento receptor. De esa forma el parámetro cinético es el mismo y permite su modelado conjunto y el establecimiento de hipótesis sobre las diferencias entre ambos sistemas experimentales y el escalado entre ambos.

Las permeabilidades aparentes a las distintas concentraciones mostraron diferencias significativas en ambos sistemas experimentales así pues los valores de permeabilidad y concentración se utilizaron para ajustar diferentes modelos cinéticos de complejidad creciente La selección del mejor modelo cinético se realizo en base a los valores de AIC. Modelos de complejidad creciente se compararon mediante la prueba F de Snedecor para contrastar la significación estadística de los modelos más complejos.

Modelos y ecuaciones que incluyen absorción/secreción saturable en combinación con difusión pasiva se utilizaron para describir los datos experimentales. El ajuste no lineal se desarrollo con el programa Winnonlin 5.2 (Pharsight Corp, Palo Alto, USA).
Modelo de absorción de KAR-2
Línea celular

$$\text{Apical -Basal} \quad P_{app} = P_{dif} + \frac{V_{m_in}}{K_m + C}$$

$$\text{Basal - Apical} \quad P_{app} = P_{dif} + \frac{V_{m_out}}{K_m + C}$$

Rata

$$P_{app}^{Rat} = S_F \cdot (P_{dif} - \frac{E_f \cdot V_{m_in}}{K_m + C}) - \frac{V_{m_efflux}}{K_{m_efflux} + C}$$

Modelo de absorción de Viblastina
Línea celular

$$\text{Apical - Basal} \quad P_{app} = P_{dif} - \frac{V_{m_efflux}}{A \cdot (K_m + C)}$$

$$\text{Basal - Apical} \quad P_{app} = P_{dif} + \frac{V_{m_efflux}}{K_m + C}$$

Rata

$$P_{app}^{Rat} = S_F \cdot (P_{dif} - \frac{V_{m_efflux}}{A \cdot (K_m + C)})$$

Papp: permeabilidad aparente a cada concentración inicial;
Pdif: Componente difusional;
Vm-in: Velocidad máxima en la dirección apical basal;
Vm-out: Velocidad máxima en la dirección basal-apical;
Km: Constante de Michaelis-menten;
Sf: factor de corrección del área (para considerar la presencia de pliegues y villi en la rata).

Ef: Factor de corrección para la diferente expresión del portador de absorción en rata versus células;
Vm-efflux Velocidad máxima del sistema de secreción en la rata;
Km-efflux constante de Michaelis Menten del transportador de secreción
A: factor de corrección para la concentración intra-extracelular (el lugar de unión del transportador de secreción es intracelular)

Resultados y Discusión:

Los experimentos en la línea celular Caco-2 y los de perfusión in situ en rata han mostrado que Vinblastina y KAR-2 son ambos sustratos de transportadores de secreción pero con diferente afinidad. Por otro lado el componente difusional de KAR-2 es superior al de Vinblastina.

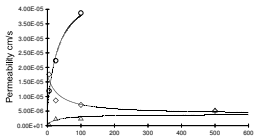


Figura 1. *Valores de permeabilidad de Vinblastina A-B y B-A en células caco-2 (Δ y ◊) y en rata (○)*

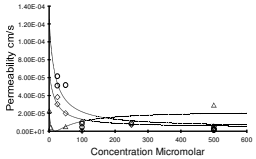


Figura 2. *Valores de permeabilidad de KAR-2 A-B y B-A en células caco-2 (◊ y ○) y en rata (Δ)*

La información inicial del modelado independiente de los datos permitió finalmente su modelado conjunto incluyendo los factores de escalado adecuados. El modelo se validó internamente mediante la selección del mejor modelo cinético en base a los índices de bondad de ajuste. El modelo unificado permite demostrar que las características biofarmacéuticas de KAR-2 son más favorables en comparación con las de Vinblastina. Por otro lado el proceso de modelado en si mismo ha mostrado la ventaja de maximizar la cantidad de información que puede extraerse de los datos experimentales en comparación con el mero análisis comparativo

Conclusiones:

1. Vinblastina presenta en el modelo Caco-2 el patrón habitual de un sustrato de Glicoproteína P.
2. KAR-2 muestra un perfil diferente consistente con la existencia de un transportador de absorción aunque la contribución de un transportador de secreción como Mrp2 en rata no puede descartarse.
3. KAR-2 presenta un perfil de absorción más favorable, a la concentración mayor su permeabilidad es similar a la de Vinblastina pero con una afinidad por la Glicoproteína P apenas relevante.
4. El proceso de modelado ha permitido establecer hipótesis sobre la naturaleza, localización y relevancia de los transportadores y aunque estos resultados aislados no permiten identificar la proteína transportadora la metodología puede utilizarse como complementaria a las técnicas de biología molecular a fin de apoyar hipótesis y diseñar experimentos concluyentes.

Agradecimientos:
-Ministerio de Educación y Ciencia: SAF2006-2749-E; AE 2007-005
- Conselleria de Cultura, Educación y Ciencia y Conselleria de Empresa Universidad y Ciencia, Generalitat Valenciana: ACOMP2007/180; ACOMP2006/156
- Comisión Europea: Network of Excellence BIOSIM: LSHB-CT-2004-005137 WP 14 y 15.
-Pharsight Corporation por la licencia académica de Winnonlin 5.2.

ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE VANCOMICINA EN FORMA DE VESÍCULAS LIPÍDICAS

Jesús Valle, M.J. de, González López, F., Sánchez Navarro, A.
Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca
Licenciado Méndez Nieto, s/n 37007
e-mail: asn@usal.es

Introducción:

Los liposomas constituyen una interesante alternativa para la liberación pulmonar de fármacos debido a su biodegrabilidad e inocuidad al incluir en su composición fosfolípidos análogos a los que forman parte del surfactante pulmonar. Esto podría también contribuir a incrementar el tiempo de permanencia del fármaco dentro del pulmón como consecuencia de la interacción de los liposomas con los fosfolípidos endógenos (1). Numerosos fármacos presentan buena actividad *in vitro*, pero no son efectivos por su toxicidad sistémica y/o pobre penetración en los pulmones, como es el caso de vancomicina que alcanza bajos niveles en tejido y secreciones pulmonares (del orden del 15-30% de los correspondientes en plasma) cuando accede desde la sangre (2, 3). Para estos casos estaría plenamente justificacada la administración pulmonar.

El presente estudio tiene por objeto caracterizar la disposición de vancomicina en pulmón cuando se administra en forma de liposomas por vía pulmonar.

Materiales y Métodos:

Materiales

L-α-Fosfatidilcolina de yema de huevo (Sigma-Aldrich, Alemania), colesterol de lanolina (Sigma-Aldrich, Alemania) vancomicina Clorhidrato 500 mg (Combino Pharm, Barcelona), cloruro sódico 0.9% (Baxter, Valencia), tiobarbital Braun 0.5 g (Braun, Barcelona), heparina sódica 5% (Mayne Pharma, Madrid), tampón fosfato pH=7,4 y triton X-100 (Merck, Alemania).

Elaboración de las vesículas lipídicas

Las vesículas lipídicas se prepararon mediante el método clásico de evaporación del disolvente e hidratación de los fosfolípidos. Se partió de la disolución del material lipídico en una mezcla de cloroformo y metanol.

La mezcla se preparó en un balón de vidrio sumergido en un baño de agua a 40ºC; se conectó a un rotavapor (60 rpm durante 30 minutos) para la evaporación de los disoventes. Trascurrido este tiempo se disminuyó la temperatura a 25ºC, manteniendo el vacio durante 24 horas. Posteriormente se hidrataron los fosfolípidos adicionando la disolución de vancomicina (5mg/ml) y 1 g de esferas de vidrio y colocando el recipiente de nuevo en el rotavapor a 40ºC a una velocidad de 60 rpm durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se mantuvo la mezcla en reposo durante 10 minutos para completar la formación de los liposomas y posteriormente se sometió a sonicación durante 15 minutos.

Administración inhalatoria de vancomicina

El estudio fue llevado a cabo utilizando 30 ratas Wistar macho distribuidas en tres grupos.

Grupo I (n=10): administración de vancomicina incorporada en vesículas lipídicas.

Grupo II (n=10): administración de vancomicina incorporada en vesículas lipídicas con un periodo de "wash-out" de 10 minutos .

Grupo III (n=10): administración de una solución acuosa de vancomicina.

Se realizó una traqueotomía y canulación de la tráquea, conectando la cánula a un sistema de ventilación artificial en funcionamiento (Respirator TSE "Advanced" Model). Una vez realizada la traqueotomía, el pulmón se mantuvo mecánicamente ventilado durante el resto del proceso (Volumen tidal= 2ml y 60 respiraciones por minuto).

Inmediatamente se administró el fármaco a través de la vía pulmonar colocándose en el depósito correspondiente del dispositivo de nebulización (Ultrasonic Aerosol Generator 700700-UV TSE system) la disolución acuosa de vancomicina (5mg/ml) o el antibiótico incorporado en las vesículas lipídicas. El equipo de nebulización permaneció conectado al resto del equipo a través del sistema de ventilación artificial, de tal modo que el producto nebulizado accedió a los pulmones a través de la cánula traqueal durante 20 minutos.

Se recogieron muestras de sangre al terminar la nebulización de vancomicina (Grupos I y III) y 10 minutos después (Grupo II), mediante una punción en el ventrículo izquierdo, con una aguja y jeringa previamente heparinizadas. Después se recogió una muestra de tejido pulmonar que fue procesada mediante homogenización (Homogenizator PRO 250 Scientific Inc.) con 50mM de tampón fosfato pH=7,4/0,1% de Triton X-100. La

determinación de las concentraciones del antibiótico en las muestras se llevó a cabo mediante una técnica de HPLC desarrollada por Jesús Valle MJ. y cols. (4).

Resultados y Discusión:

La figura 1 muestra los valores medios de los coeficientes de reparto tejido pulmonar/plasma de vancomicina tras su administración por vía inhalatoria, cuando ésta es incorporada en forma de vesículas lipídicas y cuando es administrada en disolución. La tabla 1 incluye las correspondientes concentraciones medias del fármaco en plasma y tejido para las diferentes condiciones experimentales ensayadas.

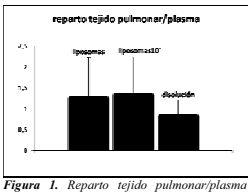


Figura 1. *Reparto tejido pulmonar/plasma para los 3 grupos experimentales (p>0.05).*

Tabla 1*. Concentraciones de vancomicina en plasma y tejido pulmonar.*

Grupo I	0.67±0.44	0.85±0.25
GrupoII	0.62±0.20	0.72±0.32
Grupo III	0.72±0.33	0.56±0.14

Se comprobó que la administración de vancomicina incorporada en las vesículas lipídicas produce un mayor reparto del fármaco entre los tejidos-fluidos pulmonares y el espacio vascular que cuando se inhalaba en disolución y se demuestra la mayor capacidad de transferencia de vancomicina entre los espacios pulmonares cuando se incorpora a los liposomas.

Cuando vancomicina se administra por inhalación en forma de liposomas su acceso a la circulación sistémica es más restringido que cuando se administra en disolución, aunque las diferencias no presentan significación estadística. Por el contrario los niveles alcanzados en tejido pulmonar resultaron ser superiores a los que se alcanzaron cuando se recurrió a la administración en disolución (0.85±0.25 y 0.72±0.32 *versus* 0.56±0.14, *p>0.05*).

Estos resultados ponen de manifiesto el interés de los estudios destinados a potenciar la vía pulmonar, no sólo para nuevos productos de origen biotecnológico, sino para todos aquellos fármacos cuya biofase se localice a este nivel.

Conclusiones:

- Tras al administración pulmonar la capacidad de transferencia de vancomicina a los espacios y fluidos pulmonares es superior cuando se formula en liposomas que cuando se hace en disolución; su acceso al espacio sistémico, por el contrario, no se incrementa para las vesículas lipídicas.
- La incorporación de vancomicina a los liposomas produce un mantenimiento de las concentraciones del fármaco en tejido y fluido pulmonar más prolongado que la disolución, lo que demuestra que este tipo de formulación favorece la permanencia del fármaco en el espacio pulmonar.
- La formulación de vancomicina en liposomas parece una alternativa óptima para su administración pulmonar. Debido a la composición de las vesículas lipídicas formuladas su compatibilidad es muy elevada pudiendo, incluso, facilitar la reparación del surfactante pulmonar en pulmones dañados.

Agradecimientos:

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación financiado por la Junta de Castilla y León. Ref.: SA011A08. (Orden EDU/1490/2003).

Bibliografía :

(1) Grenha A et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **69**: 83-93, 2008

(2) Gilbert BE. *Spring*, **9**: 111-122, 1996

(3) Cruciani M et al. *J. Antimicrob. Chemother*., **38**: 865-869, 1996

(4) Jesús Valle MJ et al. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **48**: 835-839, 2008

MODELIZACIÓN FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA DE LA EFICACIA ANTITUMORAL DEL CISPLATINO ADMINISTRADO MEDIANTE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EN UN MODELO XENOGRAF

D. Moreno[1], I.F. Trocóniz[1], S. Zalba[1], I. Navarro[2], MJ Garrido[1]
[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra. [2] Departamento de Química (sección Química Analítica), Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra.

Introducción

El Cisplatino, sólo o en combinación, es un agente antineoplásico muy utilizado en una amplia variedad de tumores sólidos. Su severa nefrotoxicidad debido a la necesidad de administrar altas dosis por vía intravenosa, preferentemente, para evitar en parte los fenómenos de resistencia, ha supuesto una limitación para su uso[1]. Con el fin de evitar estos efectos, se han desarrollado diversos tipos de formulaciones para tratar de dirigir de forma más específica la liberación del compuesto. Dentro de estas formulaciones, los nanotransportadores parecen jugar un papel importante ya que parecen ser capaces de aprovechar el desorden vascular del área tumoral, para acceder así, más fácilmente al propio tumor[2]. Aunque hay algunos trabajos en la literatura donde se demuestra la eficacia de algunas de estas formulaciones, sin embargo hasta el momento no hay ningún trabajo donde se describa su relación cinética-dinámica. Desde este punto de vista, desarrollar un modelo para estas nanopartículas englobando cisplatino, resultaría muy interesante porque nos permitiría caracterizar su eficacia medida como respuesta antitumoral y reducción de toxicidad, en función de la mejor exposición del organismo al compuesto. Además, ayudaría a establecer un régimen de administración más seguro y efectivo.

Por tanto, el objetivo es desarrollar un modelo farmacocinético-farmacodinámico capaz de describir y predecir le eficacia antitumoral de nanopartículas poliméricas de cisplatino en un modelo xenograf de ratón.

Material y métodos

Formulación

Siguiendo el método de evaporación del disolvente tras la formación de una doble emulsión (A/O/A) y utilizando como polímero el PLGA (Resomer 502H), se desarrollaron nanopartículas englobando cisplatino[3].

Se caracterizaron mediante:

Estudios físico-químicos: el tamaño y el potencial zeta se determinaron por difractometría de láser en un Zetasizer Nano Series.

Estudios de liberación in-vitro

Para cuantificar la cantidad de Cisplatino encapsulado, y los perfiles de liberación en el tiempo, se desarrolló una técnica analítica por HPLC[3].

Animales e implantación tumoral

Se utilizaron ratones inmunodeprimidos o "athymic nude mice", a los que se les inoculó de forma subcutánea $2x10^6$ DHD/K12PROb células (adenocarcinoma de colon de rata). Estos animales fueron divididos en dos grandes grupos para los siguientes estudios:

- *Estudio cinético*: 5mg/kg de cisplatino base se administró semanalmente durante tres ciclos consecutivos a tres grupos. Grupo 1 y 2 recibieron CIS en solución vía i.v. e i.p., respectivamente, y el grupo 3 recibió CIS-NP por vía i.p. Las muestras sanguíneas se obtuvieron a lo largo de 168 h tras la administración. Los niveles plasmáticos de cisplatino se midieron mediante una técnica de absorción atómica.
- *Estudio dinámico*: los animales se dividieron en 4 grupos cada uno de los cuales recibió el siguiente tratamiento por vía i.p.: I-control o salino, II- NP vacías, III- 5mg/kg de cisplatino en solución y IV- 5mg/kg de CIS-NP.

A todos los animales se les evaluó diariamente el tamaño tumoral y el peso corporal. Además, en el estudio dinámico se extrajeron muestras sanguíneas para medir los niveles plasmáticos de BUN (urea nitrogenada en sangre) y VEGF (factor de crecimiento vasculo-endotelial).

Análisis de datos

El programa NONMEM (versión VI)[4] se utilizó para analizar todos los datos siguiendo un método secuencial. Primero se describió la farmacocinética del cisplatino mediante modelos compartimentales y posteriormente, se realizó el análisis de la respuesta antitumoral, evolución temporal del tamaño tumoral.

Resultados y discusión

Las partículas obtenidas tuvieron un tamaño de 450 nm aprox. con un potencial negativo, y la polidispersión de la formulación fue menor del 0.3%. La eficacia de encapuslación estuvo dentro de los niveles descritos anteriormente por nuestro grupo y otros autores, para otras

formulaciones de CIS, y fue del 12%. Su perfil de liberación presentó una curva trifásica, de características similares a las obtenidas con este tipo de polímero.

Farmacocinética-Farmacodinamia

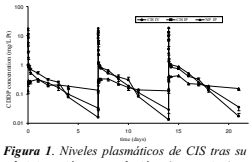


Figura 1*. Niveles plasmáticos de CIS tras su administración en solución (i.v. e i.p.) y encapsulado (i.p.), durante tres ciclos consecutivos.*

El análisis simultáneo de los niveles plasmáticos de CIS tras su administración en solución por vía i.v. e i.p., siguieron un modelo tricompartimental, donde la velocidad de absorción para la vía i.p. fue descrita con una constante de primer orden y la biodisponibilidad (F) del CIS no cambió. Sin embargo, los niveles plasmáticos de CIS tras su administración en NP vía i.p., siguió una cinética monocompartimental donde la velocidad de absorción fue de orden cero. El aclaramiento plasmático (CL) fue similar para ambos análisis y estuvo asociado a una variabilidad inter-animal del 47 y 18 %, respectivamente, mientras que el volumen de distribución del compartimento central (V) aumentó en relación a su administración en NP.

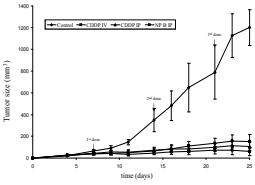


Figura 2*. Evolución del tamaño tumoral para los diferentes grupos de tratamiento.*

El CIS inhibió el crecimiento tumoral desde el primer ciclo, tal y como se representa en la figura 2. Paralelamente, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Los perfiles temporales del volumen tumoral de los distintos grupos, se analizaron simultáneamente mediante el modelo publicado por Bueno y cols. (2008)[4].

Este modelo basado en la ecuación de Gompertz, fue capaz de describir las dos fases del crecimiento observadas, una primera lineal que va desde que es palpable el tumor hasta el día 10, seguida de otra exponencial.

La toxicidad medida como niveles sanguíneos de BUN (urea nitrogenada sanguínea) aumentaron de forma estadística en los grupos tratados con CIS en solución, mientras que la administración de NP no indujeron ningún incremento en este parámetro. Finalmente, los niveles plasmáticos de VEGF reflejaron que, este marcador era un buen factor de seguimiento del tratamiento aunque no necesariamente, de pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1 Fuertesa MA, Castillab J, Alonso C, Pérez JM. Curr Med Chem 10: 257, (2003).

2 Kim JH, Kim YS, Park K, Lee S y cols. J Control Release 127: 41, (2008).

3 Moreno D, Tros C, Bandrés E, Buñuales M y cols. Eur J Pharm Biopharm 68: 503, (2008).

4 Bueno L, de Alwis DP, Pitou C, Yingling J y cols. Eur J Cancer 44: 142, (2008).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido en parte financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PCT-090100-2007-27) y la Universidad de Navarra. Moreno D y Zalba S han sido financiados por el Gobierno de Navarra (dpto educación y dpto de industria, respectivamente).

TRANSPORTE DE CORTISOL A TRAVÉS DE UN MODELO *IN VITRO* DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

C. Navarro[1], I. Gonzalez-Alvarez[2], V. Merino[1], M. Manku[3], VG. Casabó[1], M. Bermejo[2]

[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España
[2]Depto. de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández, Elche. [3]Laxdale Limited, Reino Unido.

Introducción: El transporte a través de la barrera hematoencefálica es un factor relevante en la acción farmacológica de muchas sustancias endógenas y fármacos, cuyo sitio de acción está localizado en el cerebro. Algunos transportadores de secreción, como la glicoproteína-P, pueden afectar a la permeabilidad a través de dicha barrera de estas sustancias, incluyendo las hormonas esteroideas. Parece ser que una hiperactividad de la glicoproteína-P está relacionada con la resistencia de la supresión del eje hipotalámico-pituitario-adrenal por glucocorticoides. Esta resistencia a los glucocorticoides es una de las anomalías biológicas mejor descritas en ciertos tipos de depresión. Algunos ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) han mostrado eficacia clínica en este grupo de pacientes así como una reducción de la actividad del eje adrenal en modelos animales. Algunos modelos en cultivos celulares, como las células MDCK y MDCK-MDR1, reproducen ciertas propiedades de la barrera hematoencefálica, como marcadores celulares morfológicos, enzimáticos o antigénicos, que también se encuentran en células endoteliales cerebrales y han sido ampliamente descritos como un modelo adecuado para esta barrera. La propuesta de este estudio fue evaluar la influencia de un ácido graso poli-insaturado, el ácido eicosapentaenoico (EPA) en el transporte del cortisol a través de la barrera hematoencefálica mediante estudios *in vitro* en el modelo celular descrito así como desarrollar un modelo matemático general para estimar los parámetros cinéticos relacionados con la permeabilidad del cortisol.

Materiales y Métodos: Ambas líneas celulares fueron sembradas y crecidas en forma de monocapas celulares en membranas de policarbonato, hasta su confluencia durante 7-9 días. La integridad de la monocapa se evaluó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial antes y después del experimento. Una vez se administró el fármaco, se tomaron cuatro muestras durante 90 minutos, y posteriormente se analizaron mediante CLAR. Los estudios de transporte se realizaron en ambas direcciones: desde la cámara apical hacia la basolateral y desde la cámara basolateral hacia la apical. Las concentraciones iniciales de cortisol fueron 2, 20, 200 y 2000 uM, mientras que las de EPA fueron 10, 20, 50 y 200 uM siendo la concentración de cortisol 20 uM en presencia de todas las concentraciones de EPA.

Resultados y Discusión: Los experimentos *in vitro* mostraron diferencias significativas entre las permeabilidades A-B y B-A de cortisol ($p<0.05$) así como un proceso de permeabilidad dependiente de la concentración (Figura 1).

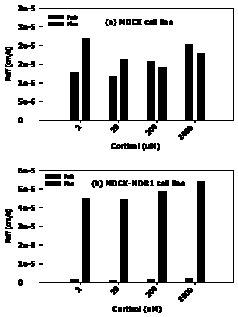


Figura 1. *Valores de permeabilidad de cortisol a las diferentes concentraciones estudiadas en ambas líneas celulares, (a) MDCK y (b) MDCK-MDR1.*

El mejor modelo cinético corresponde a un modelo de tres compartimentos (apical, celular y basal) con un transportador de secreción situado en la cara apical de la membrana y cuyo punto de unión se encuentra en la parte exterior de la membrana. Dado que las células MDCK-MDR1 son un clon transfectado de las células MDCK donde la glicoproteína-P está sobreexpresada, se consideró que cada una de las líneas celulares tendría un valor diferente en la velocidad máxima del transportador mientras que el resto de parámetros se

mantuvieron comunes. Los parámetros correspondientes a este modelo se muestras en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros cinéticos in vitro obtenidos en las líneas celulares MDCK y MDCK-MDR1.

Parámetros	Valores (CV %)	
	MDCK	MDCK-MDR1
Vol. celular (mL)	$4.00 \cdot 10^{-1}$ (17.78)	
P_{AC} (cm/s)	$1.06 \cdot 10^{-4}$ (9.36)	
P_{CB} (cm/s)	$1.38 \cdot 10^{-3}$ (46.09)	
Vm (nmol/s·cm^2)	$6.21 \cdot 10^{-4}$ (39.77)	$3.40 \cdot 10^{-3}$ (19.97)
Km (μM)	$1.61 \cdot 10^{+1}$ (37.52)	

Por otra parte, los experimentos en presencia de EPA mostraron diferencias significativas en los valores de permeabilidad a las concentraciones más altas de EPA ($p<0.05$) pero sólo en la línea celular MDCK, no viéndose afectados los valores de permeabilidad en las células MDCK-MDR1 (Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Resultado de la comparación múltiple de las permeabilidades apical-basal y basal-apical para las distintas concentraciones de EPA ensayadas en la línea celular MDCK.

Pab	**0**	**10**	**20**	**50**
10	NS	-	-	-
20	NS	NS	-	-
50	S	NS	S	-
200	S	S	S	NS
Pba	**0**	**10**	**20**	**50**
10	NS	-	-	-
20	NS	NS	-	-
50	S	NS	NS	-
200	S	S	S	S

Tabla 3: Resultado de la comparación múltiple de las permeabilidades apical-basal y basal-apical para las distintas concentraciones de EPA ensayadas en la línea celular MDCK-MDR1.

Pab	**0**	**10**	**20**	**50**
10	NS	-	-	-
20	NS	NS	-	-
50	NS	NS	NS	-
200	NS	NS	NS	NS
Pba	**0**	**10**	**20**	**50**
10	NS	-	-	-
20	NS	NS	-	-
50	NS	NS	NS	-
200	NS	NS	NS	NS

El cortisol es transportado activamente por la glicoproteína-P en ambas líneas celulares, pero el transportador sólo muestra saturación a las concentraciones ensayadas en MDCK. El ácido graso EPA actúa como inhibidor de la secreción a través de la glicoproteína-P en la línea celular MDCK, mientras que en la línea celular transfectada, la concentración de EPA no es suficientemente alta para mostrar algún efecto. Esto significa que la secreción a través de la glicoproteína-P podría ser el factor dominante para el transporte de cortisol a través de la barrera hemaoencefálica, puesto que las concentraciones fisiológicas de cortisol se encuentran en el ámbito más bajo de las concentraciones ensayadas en este estudio.

Referencias:

(1) Veronesi B. Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. Neurotoxicology.1996;17(2):433-43.
(2) C.M. Pariante et al. Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? Psychoneuroendocrinology. 29:423-447 (2004).

Agradecimientos:
- MDCK and MDCK-MDR1 cells were provided by Dr. Michael M. Gottesman, Chief, Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute.
-This work is supported by Biosim EU grant: LSHB-CT-2004-005137

LUCIFER YELLOW FRENTE A MANITOL COMO MARCADORES DE LA INTEGRIDAD DE LAS MONOCAPAS CACO-2 PARA ENSAYOS DE PERMEABILIDAD

Centelles A, Gonzalez-Alvarez I, Merino V, Bermejo MV
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia.

Introducción y objetivos

Las monocapas celulares Caco-2 resultan un buen sistema para el estudio de la permeabilidad intestinal, sin embargo, los coeficientes de permeabilidad aparentes (Papp) presentan una gran variabilidad tanto inter como intralaboratorio. La variación de la permeabilidad paracelular, como consecuencia de daños en la membrana, es una de las posibles causas de dicha variabilidad (1), pues una monocapa bien formada constituye una barrera polarizada y selectiva, con un mínimo flujo paracelular. El Lucifer Yellow (LY) atraviesa la membrana a través de los espacios intercelulares (*tight junctions*) de ésta (2), de modo que el estudio de su valor de permeabilidad permite evaluar el estado de la monocapa. El manitol como sustancia hidrofílica y de bajo peso molecular también se utiliza con el mismo propósito pero presenta la desventaja de su determinación analítica, que requiere el marcaje con radioactividad (3). Por tanto, el objetivo de este trabajo es verificar el uso del Lucifer Yellow como índice de integridad de la monocapa (4). En este caso la permeabilidad de LY se ha utilizado para establecer a qué concentración un fármaco empieza a alterar la integridad de la barrera y de ese modo, establecer el límite máximo de concentración para los estudios sobre la permeabilidad del mismo. Este mismo tipo de estudios se realizó en un segundo laboratorio usando manitol como marcador paracelular a fin de comparar los resultados de ambos métodos.

Materiales y Métodos

Los estudios de permeabilidad se realizaron en dos clones celulares, ATCC/Caco-2 y TC7/Caco-2. Las células se cultivaron y crecieron en membranas de policarbonato hasta alcanzar la confluencia durante 19-21 días. Se ensayaron soluciones de Lucifer Yellow (1mg/ml) adicionadas de dos compuestos, Ácido Acetilsalicílico (AAS) y Paracetamol (PC), a dos concentraciones, 1mM y 0.1mM. Los estudios de transporte se llevaron a cabo en dirección apical-basal. La valoración de las muestras se realizó por cromatografía líquida de alta resolución y detección por fluorescencia Los valores de permeabilidad se obtuvieron por regresión lineal de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo.

Resultados y Discusión

En la línea Caco-2 no se observa un aumento de la permeabilidad del indicador LY en presencia de los compuestos a la concentración de 1mM, por lo que dicha concentración no interfiere en la integridad de la monocapa (Figura 1).

En los estudios con el clon TC7 se observa que la adición de Paracetamol 1mM resulta tóxica para la monocapa celular produciendo cambios en la absorción del LY (Figura 2), por tanto se repitieron los ensayos utilizando una concentración 10 veces inferior. En este caso, los resultados no mostraron diferencias significativas en los valores de permeabilidad de LY obtenidos en solución libre y en presencia de los compuestos de modo que para PC la concentración no tóxica fue 0.1mM (Figura 3).

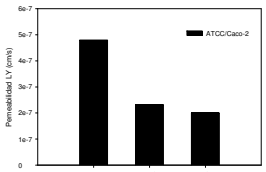


Figura 1. Permeabilidad de LY obtenida en ausencia y presencia de compuestos (1mM) en células Caco-2.

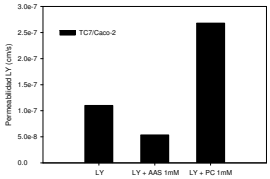


Figura 2. Permeabilidad de LY obtenida en ausencia y presencia de compuestos (1mM) en células TC7.

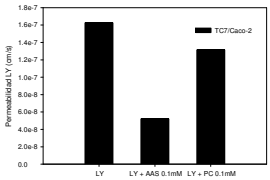


Figura 3. Permeabilidad de LY obtenida en ausencia y presencia de compuestos (0.1mM) en células TC7.

Se observan diferencias en magnitud entre los valores de Papp de LY en la línea Caco-2 frente a la línea TC7. En esta última los valores de Papp son inferiores y a su vez es más sensible a la presencia de concentraciones elevadas de fármaco. Hay que remarcar que para utilizar LY como indicador de integridad celular debe caracterizarse previamente su valor de permeabilidad promedio en la línea celular en estudio.

Los resultados de experimentos similares realizados con manitol en el Instituto Superior de Sanidad (ISP, Roma, Italia) establecieron las mismas concentraciones tóxicas de PC y AAS confirmando la utilidad de ambos marcadores.

Conclusiones

Los ensayos de cálculo de permeabilidad de Lucifer Yellow son un buen sistema para determinar la concentración tóxica de un compuesto ya que permite controlar la alteración de la vía paracelular indicadora de la integridad de la barrera. El método del Lucifer Yellow es una buena alternativa al manitol cuando la valoración analítica de este último presente dificultades

Agradecimientos.

Este trabajo se ha financiado parcialmente con fondos del Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-06191-C02-01/ALI) y con un contrato de investigación en colaboración con el Instituto Superiore de Sanitá (Roma) (Study Contract CCR.IHCP.C431224.X0).

Bibliografía

1. Saitoh R, Sugano K, Takata N, Tachibana T, Higashida A, Nabuchi Y, Aso Y. Correlation of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. Pharmaceutical Research. 2004;Vol.21,No.5:749-755.
2. Konishi Y, Hagiwara K, Shimizu M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002; 66 (11), 2449-2457.
3. Seki H, Harada S, Hosoya O, Morimoto K, Juni K. Evaluation of the establishment of a tight junction in Caco-2 cell monolayers using a pore permeation model involving two different sizes. Biol. Pharm. Bull. 2008; 31(1):163-166.
4. Tsukazaki M, Satsu H, Mori A, Sugita-Konishi Y, Shimizu M. Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004; 315: 991-997.

APLICACIÓN DEL MÉTODO BOOTSTRAP A LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE FÁRMACOS: PREPARADOS COMERCIALES DE INSULINA HUMANA

Oliva, A., Fariña, J.B., Llabrés, M.
Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia.
Universidad de La Laguna, 38200, La Laguna, Tenerife

Introducción

Actualmente, en la caracterización físico-química de fármacos se incluyen los estudios de estabilidad. Los estudios en condiciones no isotérmicas fueron desarrollados para reducir los esfuerzos experimentales requeridos en los ensayos isotérmicos y permitir que los parámetros cinéticos sean estimados mediante una única serie de datos de concentración de fármaco frente al tiempo obtenido mientras la temperatura cambia con el tiempo. El método Monte Carlo o también llamado "Bootstrap", proporciona un método para evaluar la exactitud de los parámetros estimados a partir de datos experimentales. La idea básica del bootstrap es tratar los datos muestrales como si constituyesen la población, es decir se utilizan como el universo del que se extraerán muestras con reemplazamiento. Para cada remuestreo se calculará el valor del estimador bootstrap que se utilizará para estimar la variabilidad muestral y posteriormente generar una estimación empírica de la distribución muestral del estadístico en cuestión (1).
El objetivo de este trabajo fue evaluar la fiabilidad de los parámetros: energía de activación (Ea), factor de frecuencia (A), concentración inicial de fármaco (Co) y del plazo de validez ($t_{90\%}$) estimados en condiciones no isotérmicas aplicando el método bootstrap. Para ello se utilizó un preparado comercial de insulina humana como fármaco modelo.

Materiales y Métodos

Materiales
Se utilizó un preparado comercial de insulina humana de acción rápida. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.
Método analítico
Se utilizó un equipo de cromatografía de Waters (Milford, MA, USA) en una columna Protein-Pack C-18 y un detector UV-Vis. El control, adquisición y análisis de datos se realizó utilizando el programa Millenium 32®. La fase móvil fue una mezcla 2,5M de ácido acético, 4 mM de L-arginina/acetonitrilo (96:4, v/v) a un flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda fue de 280 nm siendo el volumen de inyección de 50µL. El método analítico fue validado de acuerdo con las normas propuestas por la Guía ICH (2).

Ensayos acelerados no isotérmicos
Se utilizó una estufa Heraeus (Modelo BR6000) que permite el control de temperaturas a través de una interfase RS232. La variación de la temperatura de la estufa así como la adquisición de datos de la evolución de ésta con el tiempo se realizó utilizando un PC con un programa desarrollado en TestPoint ®4.0. Así, la temperatura inicial fue de 30ºC y la final de 70ºC, con una velocidad media de calentamiento de 0,251ºC/h.
Análisis de datos
El método de la integral propuesto por Yoshioka y col. (3) se utilizó para estimar los parámetros de Arrhenius. El programa estadístico R® (4) fue utilizado para estimar por un método iterativo no lineal los parámetros Ea, A, y Co así como para obtener los diferentes intervalos de confianza del 95% bootstrap: básico, percentil y el corregido para el sesgo y acelerado (Bca) para los parámetros estimados y del plazo de validez.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se recogen los valores de los parámetros estimados Co, Ea, A y del plazo de validez a una temperatura de 25ºC para el preparado comercial de insulina humana.

Tabla 1. Valores estimados y sus respectivos intervalos de confianza del 95% bootstrap para los parámetros cinéticos y el plazo de validez.

Parámetro	Estimado	Básico	Percentil	BCa
Co (%)	99.40	99.12-99.67	99.14-99.69	99.14-99.69
Ln A (h^{-1})	27.94	24.28-31.43	24.44-31.56	24.42-31.56
Ea (Kcal/mol)	22.9	20.46-25.19	20.57-25.29	20.56-25.29
$t_{90\%}$ (días)	191.4	122.4-286.9	127.6-299.1	127.0-297.0

La Ea estimada es similar a la encontrada en la bibliografía para este tipo de preparados, observándose diferencias inferiores al 10% (5). El plazo de validez estimado, asumiendo una cinética de primer orden, fue de 191.4 días, un valor ligeramente mayor que el obtenido en condiciones isotérmicas (199.1 días) (5), pero en cualquier caso muy superior al declarado por el fabricante, 28 días.
Para comprobar la fiabilidad de los parámetros estimados, un total de 9999 muestras bootstrap fueron calculadas, cuyos intervalos de

confianza se encuentran recogidos en la Tabla 1. La Figura 1 muestra los histogramas de las muestras bootstrap así como la distribución normal de los cuantiles para los parámetros estimados: Co, A y Ea, respectivamente. Como puede observarse, la distribución empírica de los citados parámetros sigue una distribución normal. Además, no se observan diferencias entre los diferentes tipos de intervalos de confianza, presentando límites muy similares.

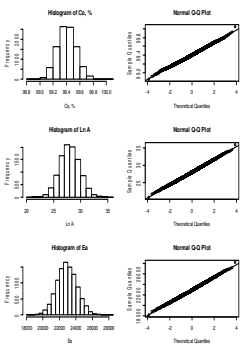


Figura 1. *Histogramas de las 9999 remuestras bootstrap y distribución normal de los cuantiles correspondientes a la concentración inicial de fármaco (superior), factor de frecuencia (medio) y la energía de activación (inferior).*

El método bootstrap también fue aplicada al plazo de validez ($t_{90\%}$) para estimar sus intervalos de confianza y confirmar si sigue una distribución normal. El histograma y la distribución normal de los cuantiles se recogen en la Figura 2. En principio, cabría esperar una distribución normal, pero se observa que la distribución se encuentra sesgada a la derecha (Fig. 2 superior), lo que sugiere una distribución logarítmico-normal, dato que queda reflejado en la Figura 2 inferior. En este último caso, considerando una distribución log-normal, los intervalos de confianza asintóticos y los estimados por el método bootstrap son muy similares.

Conclusiones

La técnica bootstrap constituye un excelente método para estimar la fiabilidad de los parámetros cinéticos estimados en estudios de estabilidad de una forma rápida y sencilla, proporcionando información sobre la distribución empírica del parámetro a estimar sin tener que conocer a priori el tipo de la misma.

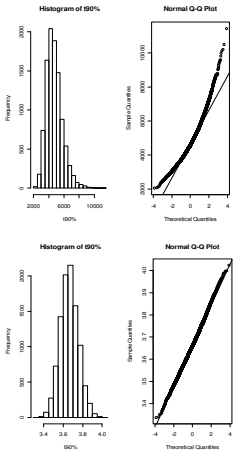


Figura 2. *Histogramas de las 9999 remuestras bootstrap y distribución normal de los cuantiles correspondientes al plazo de validez estimado asumiendo una distribución normal (superior) y una distribución log-normal (inferior).*

Bibliografía

(1) Efron, B., Tsibirani, R. J. An introduction to the Bootstrap. N.Y., Chapman & Hall, 1993.

(2) ICH, Validation of Analytical Procedures: Methodolgy (ICH-Q2B), November, 1996.

(3) Yoshioka, S., Aso, Y., Uchiyama, M. J. Pharm. Sci., 76: 794-798, 1987.

(4) Statistical Data Analysis R version 2.7.1, Auckland, USA, 2008 (http://www.R-project.org)

(5) Oliva, A. Fariña, J.B., LLabrés, M. Int. J. Pharm., 143: 163-170, 1996.

MÉTODO CAPILAR PARA EL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE ELEMENTOS FINITOS

M. Llabrés, A. Santoveña, Mateu, V.
Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica
Universidad de La Laguna. 38200 La Laguna, Tenerife

Introducción

El desarrollo y aplicación de modelos teóricos basados en la transferencia de materia por difusión está limitado por la inexistencia de soluciones explícitas salvo en casos relativamente sencillos. No debe extrañarnos que aún hoy día el texto de Crank (1989), impreso por primera vez en 1956, continúe siendo un libro de referencia. El desarrollo y difusión de la inversión numérica de la transformada de Laplace permite simplificar la simulación con estos modelos (Llabrés, 2007), pero no abordar el estudio de sistemas caracterizados por una geometría compleja. El estudio de modelos más complejos sólo es abordable con métodos numéricos basados en la discretización del sistema: diferencias finitas y elementos finitos entre otros (Myers, 1971). El análisis de elementos finitos (FEA) suele explicarse utilizando como modelo las fuerzas en los nodos de un truss (Brauer, 1993). Al tratarse de sistemas discretos se obvia el primer problema que se nos plantea en el FEA, la discretización del sistema. Hoy día es un aspecto resuelto gracias a la contribución del análisis variacional (Myers, 1971)

El campo de aplicaciones del análisis de elementos finitos es muy amplio, tanto que hoy día se considera una herramienta básica en ingeniería. Su aplicación en áreas de interés en tecnología farmacéutica también es relevante. Algunos ejemplos: física de la compresión, disolución controlada por difusión, cesión de fármacos desde matrices, flujo de fluidos en tumores y cesión a partir de hidrogeles.

La divulgación del análisis de elementos finitos ha sido posible gracias al gran aumento de la capacidad de cálculo de los ordenadores personales (los casos sencillos implican la resolución de un sistema de ecuaciones lineales con algunos centenares de incógnitas) y de aplicaciones informáticas capaces de automatizar la denominada forma débil del modelo matemático. Comsol Multiphysics es un programa para el estudio de sistemas en el que intervengan simultáneamente el transporte de masa, calor y momento. Está dotado de una interfaz gráfica potente que le da al programa una gran versatilidad.

En esta comunicación se expone el estudio de un sistema para la determinación del coeficiente de difusión en un medio continuo basado en el método del capilar (Cusller, pag 139). Este método se basa en medir la evolución de la concentración media de la molécula que difunde desde el interior de un capilar hacia un recipiente que contiene el mismo medio de difusión que el capilar (ver figura). El método, que se caracteriza por su sencillez y exactitud, tiene un inconveniente: el modelo matemático asume que la longitud del capilar es tal que su diámetro es despreciable. Esta condición impone disponer de métodos analíticos muy sensibles; en la práctica, marcar la molécula con algún radioisótopo. El método propuesto se basa en construir un sistema análogo utilizando un capilar de longitud y diámetro finitos.

Modelo

El modelo geométrico consta de dos parte. El capilar (50 mm de longitud y 2 mm de diámetro) y el recipiente receptor (40 mm de longitud y 10 mm de diámetro) tal como se muestran en la figura. Estas dos partes se corresponden con sendos subdominios del modelo en los que son de aplicación la ecuación de Fick en estado no estacionario:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (D \nabla c) = 0$$

Donde c es la concentración, t el tiempo, D el coeficiente de difusión y ∇ el operador nabla. En el subdominio 1 la concentración a t = 0 se fijó en 100 mol/m^3 mientras que en el subdominio 2 se fijo en cero. La condición de contorno para la frontera entre el extremo del terminal sumergido en la fase receptora y esta, es la de continuidad, es decir,

$$\vec{n}(N_1 - N_2) = 0$$

$$N_i = -D \nabla c_i$$

Siendo $\vec{n}$ el vector normal a la superficie que separa ambos dominios. Para las restantes fronteras la condición de contorno es la de aislamiento:

$$\vec{n} N_i = 0$$

Aunque el modelo es axisimétrico no hemos incluido esta condición por ser relativamente sencillo y no afectar significativamente al tiempo de ejecución del programa.

Una vez definido geométricamente y físicamente el modelo, la etapa siguiente es llamar al algoritmo de generación y refinamiento de la malla. En la figura 1 se muestra la geometría del modelo y la malla una vez refinada. Obsérvese como a la salida del capilar el número de nodos es muy elevado porque se espera que el gradiente de concentración sea más alto debido a la difusión

en dos direcciones; sin embargo, el número de nodos en el interior del capilar es mucho menor porque predomina la difusión en una única dirección.

Figura 1. Geometría del sistema y mallado

La resolución del modelo se realizó en modo tiempo dependiente para poder calcular la concentración media en el subdominio 1 a lo largo del tiempo. La figura siguiente muestra el estado a los 70.000 s y 120.000 s (aproximadamente 33,3 horas). En la generación de la figura se han incluido dos variables: la concentración (escala de color) y el flujo (flechas). Obsérvese que la concentración de substancia en el extremo del capilar es próxima a la inicial y que el flujo se encuentra ya totalmente desarrollado en el extremo opuesto. La integración de los subdominios permite calcular la concentración media en cada uno de ellos. En la figura 3

Figura 2. Concentración y flujo a los 70.000 s

Figura 3. Concentración y flujo a los 120.000 s

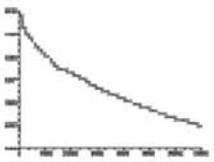


Figura 4. Concentración media en el capilar en función del tiempo

Bibliografía

Crank, J. The Mathematics of Diffusion, 2nd ed. Oxford Sci. Pub., Clarendon, 1989

Brauer, J. R. Finite Element Analysis, 2nd ed. Marcel Dekker, NY, 1993

Llabrés, M. Comunicación SEFIG, Vitoria, 2009

Myers, G. E. Analytical Methods in Conduction Heat Transfer. McGraw, NY, 1971

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE BUENA COMPRESIBILIDAD DE DISGREGANTES A TRAVÉS DE LA METODOLOGÍA SEDEM

Johnny E. Aguilar Díaz[1], E García-Montoya[2], P.Pérez-Lozano[2], M. Miñarro[2], JR Ticó[2], JM Suñé-Negre[2]
[1]Garantía de Calidad Novartis Farmacéutica, SA. Doctorando en Farmacia y Tecnología Farmacéutica
[2]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
Universidad de Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona.
e-mail: encarnagarcia@ub.edu

Introducción

Habitualmente las actividades de desarrollo farmacéutico suelen dividirse en dos grupos, el desarrollo de la formulación y el desarrollo del proceso de elaboración, aunque se llevan a cabo a la vez. Tras el estudio preliminar de las características físico-químicas del principio activo (solubilidad, polimorfismo, granulometría, impurezas, etc.) o fase de preformulación, empieza la fase de formulación, es decir, los estudios exigidos para que de la combinación entre principio activo y excipientes resulte un producto viable con las características requeridas. En la formulación de formas farmacéuticas sólidas debe conocerse el perfil reológico de la sustancia activa y de los excipientes, para tal fin es útil la herramienta SeDeM que es una nueva metodología galénica aplicable a los estudios de preformulación de comprimidos y que básicamente consiste en la determinación de una serie de parámetros que convenientemente analizados proporcionan la información necesaria del perfil o aptitud de las sustancias pulvurentas, sean principios activos, excipientes o mezcla de principio activo más excipientes, respecto a su aptitud para ser utilizado en compresión directa, este perfil o aptitud orientará al formulador sobre la mayor o menor capacidad que tiene la sustancia para ser comprimida. En este estudio se propone determinar el perfil de 24 disgregantes que servirán para determinar el perfil de los mismos y que posteriormente podrán ser utilizados para estudiarlos en combinación con un API adecuado y poder obtener comprimidos por compresión directa.

Materiales y métodos

Materiales

24 Disgregantes de diferentes familias químicas.

Métodos

Los parámetros estudiados para la determinación del índice de buena compresibilidad a través de la metodología SeDeM en los distintos disgregantes están listados en la Tabla Nº 1.

Tabla Nº1: Parámetros requeridos por la metología SeDeM

Dimension	Bulk density	Da	g/ml	Da = P / V_a
	Tapped density	Dc	g/ml	Dc = P / V_c
Compre-ssibility	Inter-particle Porosity	Ie	-	Ie = (Dc − Da) / (Dc x Da)
	Carr Index	IC	%	IC = (Dc - Da) * 100
	Cohesion Index (*)	Icd	N	(experimental)
Flowability/ Powder Flow	Hausner Ratio	IH	-	IH = Dc / Da
	Angle of repose	(α)	°	tg α = h / r
	Powder Flow	t"	s	Experimental
Lubricity / Stability	Loss on drying	%HR	%	Experimental
	Higrosco-picity	%H	%	Experimental
Lubricity / Dossage	Particles <50 µ	% Pf	%	Experimental
	Homogenity Index (**)	(Iθ)	-	* Iθ = Fm / (Fmn + Δ) * 100

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla Nº 2. En la Fig Nº 1 en donde se puede observar que el Pharmabust C1 es el único disgregante con un perfil superior al mínimo requerido por la metodología SeDeM, lo que indica que es idóneo para ser utilizado en la obtención de comprimidos por compresión directa.

El buen índice de compresibilidad de este excipiente, es debido a que se trata de un excipiente coprocesado para mejorar sus propiedades disgregantes.

Con respecto a los demás disgregantes se observa que todos tienen valores inferiores a 5 que es el valor mínimo requerido por la metodología SeDeM, lo cual es lógico ya que estos excipientes son utilizados en porcentajes bajos dentro de las formulaciones de comprimidos y nunca como diluyentes.

Tabla Nº2 Resultados de los 24 disgregantes analizados

Pharmaburst C1 Lot 04K111	Plasdone S630 Lot 6272473
Brencel-DIS Lot 28-2921	Kollidon VA 64 fine Lot 55470188QO
Glycolys Lot int- S12	Kollidon CL Lot 91861609T0
AQUASORB A500 Lot 51514	Poliplasdone XL Lot 03500142748
Cekol 30000A Lot NNP53812	Poliplasdone XL10 Lot 03500129655
Nymcel ZSB16 Lot NN1C2152	Rxcipients FM1000 Lot 195107
Nymcel ZSB10 Lot NN1C2851	Veegum Lot 9E609
Nymcel ZSD16 Lot NN143051	Alginic Acid DC Lot 560811
Nymcel ZSX Lot NN152551	Alginic Acid H/FD Lot 610321
Nymcel ZSX-W Lot NN144050	Kelacid Lot 05-GU-235
ALMIDON DE MAIZ B Lot 385-124	Lycatab C Lot 05-GU-235
Starch 1500 Lot ref4220	Fecula NP Supra Bact Lot A394

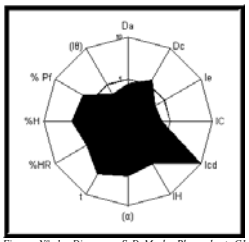


Figura Nº. 1: Diagrama SeDeM de Pharmabust C1 (IGC=5,52)

Conclusiones

Para el diseño de comprimidos a través de compresión directa el siguiente paso sería seleccionar un API al cual se determinará el Índice de buena compresibilidad a través de la metodología SeDeM para evaluar la combinación adecuada de excipient y API para obtener comprimidos por compresión directa.

De acuerdo a los resultados obtenidos detallados en la Tabla Nº 2 se concluye que:

a) La metodología SeDeM es una herramienta útil e innovadora para determinar la aptitud de excipientes como por ejemplo los disgregantes para evaluar su capacidad de obtener comprimidos por compresión directa.

b) Todos los disgregantes analizados presentan valores de IGC inferiores a 5, excepto Pharmabust C1 el cual es un excipiente coprocesado, cuyas propiedades disgregrantes han sido mejoradas, y presenta un índice de compresibilidad superior a 5.

c) El diagrama SeDeM es una herramienta que puede ser utilizada en para la determinación del Espacio del Diseño de una formulación acorde a la ICH Q8.

Bibliografía

1. J.M. Suñé, M. Roig, R. Fuster, C. Hernández, R. Ruhí, E. García, M. Miñarro, P. Pérez, J.R. Ticó, Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM, Cien. Tecnol. Pharm. 3 (2005) 125-136.
2. P. Pérez, J.M. Suñé, M. Miñarro, M. Roig, R. Fuster, E. García, C. Hernández, R. Ruhí, J.R. Ticó, A new expert systems (SeDeM Diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. Eur J. Pharm. Biopharm. 64, (2006), 351-359.
3. J.M. Suñé, M. Roig, R. Fuster, C. Hernández, R. Ruhí, E. García, M. Miñarro, P. Pérez, J.R. Ticó, Application of the SeDeM Diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation, Eur J. Pharm. Biopharm. 69, (2008), 1029-1039.

THE "MOZART EFFECT" IN CANCER THERAPY

Gonzalez-Alvarez I[1], Gonzalez-Alvarez M[2,3], Alonso V[2], Bermell MA[2], Bermejo MV[1]

[1]Department of Engineering. Division of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology. University Miguel Hernandez , Elche.

[2]Department of Didàctica de l'Expressió Musical, Plàstica i Corporal. E.U. Magisteri University of Valencia.

[3]Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology. University of Valencia.

Introduction:

Music therapy is an easy, inexpensive way to help cancer patients cope with the emotional upset often caused by high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. According to researchers from New York's Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, patients who were visited by a trained music therapist reported less anxiety and better overall mood than patients who did not receive music therapy (X). Some research groups have worked over groups of children affected of cancer disease and the therapy has allowed an increase of quality life and the self stem of these patients (X). It is clear that music has a beneficial effect at emotional level that produces an improvement at physic level.

Appart from the effects over the mood, it has been postulated that music could have some effect on the progression of the disease by affecting the tumor itself. The objective of this study has been to determine if the classical music has an effect over the tumoral mass.

Materiales and Methods:

Cellular growth of lymphoma cells has been studied in the absence and in the presence of different musical stimuli. In this study different music styles were compared: Haydyn and Mozart and Chill out music

The effect of the sound treatment was examined by the colorimetric determination of cell viability using the MTT assay. This assay measures the amount of MTT reduction by mitochondrial dehydrogenase and assumes that cell viability (corresponding to the reductive activity) is proportional to the production of purple formazan that is measured spectrophotometrically. For these reason this method provide a useful tool to evaluate the cellular proliferation. Results demonstrate that music produce decrease of viability of tumoral cells. However, because of the nature of this assay it is not possible to determine the cellular death mode (necrosis or apoptosis).

Results and Discussion:

Results demonstrate that music produce decrease of viability of tumoral cells by inhibition to the growing and by producing cellular death following an apoptosis route.

Figure 1 and 2 represent optic density versus exposition time. The different colors refer to the differences between music exposure and amount of cells seeded.

As can be seen in Figure 1 results indicate that exposure periods of 24 hours produce an increase of the cellular proliferation.

After 48 hours the quantity of cells from the cultures exposed to classical music have decreased. It is not possible to observe an important effect on the cultures exposed to other kind of music: heavy music, Gregorian chant, techno (Figure 2) or chillout (Figure 1).

At 72 hours is evident that the exposition to any musical stimuli produces a decrease of the cellular proliferation. The most effective music is the classical music which leads to a viability reduction of even 40% (Figure 1).

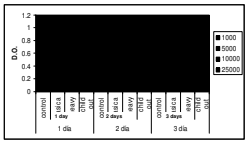


Figure 1. *Influence of the classical music (Haydn y Mozart), heavy music and chill out*

Gregorian music has an important impact over the cells growth whereas techno music produce less effect (Figure 2)

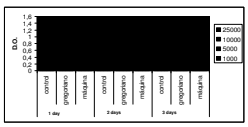


Figure 2. *Influence of techno music and Gregorian chant.*

Conclusions:

- These assays indicate that the results are influenced for the quantity of seeded cells and the exposition time to the musical stimuli
- Our research determine that classical music can be a powerful tool on cancer therapy (combined with chemotherapy) because of their benefits at psychological and over all at physic level

References

(1) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods*. **65**, 55-63 1983.
(2) Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger C., *J. Immunol. Methods,* **184**, 39-41 1995.

Acknowledgements

This work has been finance by the Network of Excellence BioSim (LSHB-CT-2004-005137)

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF NADOLOL AFTER *IN VITRO* TRANSDERMAL DIFFUSION STUDIES

M.A. Calatayud-Pascual[1], C. Balaguer-Fernández[1], A. Femenía-Font[1], V. Merino[2], A. López-Castellano[1].

[1]*Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Spain.*

[2] *Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Spain.*

Introduction: Nadolol is a beta-blocker and this group of medicines is commonly used as a migraine preventive treatment. Nadolol is available under oral dosing form, with a bioavailability of about 30%. For this reason, the development of new pharmaceutical formulations for alternative routes of administration, as the transdermal, becomes a target of interest. Different analytical methods have been described for the determination of nadolol. They include HPLC with UV/Visible detection [1, 2], fluorescence detection [3-5], MS [6] and colorimetric detection [7]. We have tested some of them, but they had too many interferences from endogenous compounds present in the skin, and thus were not considered suitable for the purpose of our research. In this work, we report the validation of a rapid and sensitive HPLC method with ultraviolet detection for the quantitative determination of nadolol after *in vitro* transdermal permeation studies.

Materials and Methods:

Preparation of standard solution: Nadolol was provided by Sigma-Aldrich Química, S.A. A 16.7 mM nadolol stock solution was prepared in isotonic buffer [NaCl (150 mM)-Hepes (20 mM), pH 7.4]. Six standard solutions (167, 83.5, 16.7, 1.67, 0.835 and 0.167 µM) were prepared by further dilution from the stock solution in isotonic buffer. These standard fresh solutions were used for the calibration curves.

Instrumentation and chromatographic conditions: The apparatus used for HPLC analysis was a Waters system equipped with a quaternary pump and a diode-array detector. Computerized data acquisition and treatment were performed with Millennium Chromatography Software. A mixture of monobasic ammonium phosphate water solution (0.05 M, pH 4.9)-acetonitrile (80:20, v/v) was used as mobile phase at a flow of 1 mL/min. Separation was carried out at ambient temperature on a 250 mm x 4 mm, reverse-phase column packed with 5 µm C18 silica particles (Kromasil® C_{18}). Absorbance was measured at 269.0 nm. Aliquots of 50 µL were injected.

Validation: The validation of the analytical method was carried out with six different concentrations of nadolol (167, 83.5, 16.7, 1.67, 0.835 and 0.167 µM). Calibration curves were obtained by the least square linear regression analysis of the peak area obtained as a function of the concentration of nadolol. An average curve was built using all the data from the calibration curves obtained. The specificity of the method was investigated by analyzing 10 blank samples. Their composition was the same isotonic buffer used to prepare the standard solutions for calibration [NaCl (150 mM)-Hepes (20 mM), pH 7.4]. The linearity of the curves was evaluated with the correlation coefficient. The slope and the intercept of each calibration curve were statistically compared with zero. Accuracy of the method was defined as the relative error of known concentration solutions. To be acceptable, measures should be within ± 15% at all concentrations [8, 9]. Precision of the method was tested as within-day and between-day reproducibility of the assay. Precision of the method was expressed as the residual standard deviation (R.S.D) of replicate measurements. To be acceptable, the R.S.D should be lower than 15% at all concentrations analyzed [8, 9]. The limit of detection (LOD) was established at the sample concentration, resulting in a peak three-times higher than background (10 blank samples analysis) [8, 9]. The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration, which can be determinated with an accuracy and precision below 20% [8, 9].

Stability: Six groups of 83.5 µM nadolol saline-buffer solution were stored in different conditions to determine the stability of the compound in aqueous solution.

Application of the method to in vitro transdermal permeation of nadolol: Pig ears were collected immediately after animal death and the portions of dermatomed skin were stored until use at -80 ºC. Transdermal permeation of nadolol was investigated at 37 ºC. Experiments were performed using Franz type diffusion cells (n=7). Nadolol is freely soluble in water. 1 mL of 16.7 mM nadolol solution prepared in a isotonic buffer NaCl (150 mM)-HEPES (20mM) pH 7.4 was placed in the donor compartment [10]. The donor diffusion area was 0.567 cm^2. The receptor compartment (4.2 mL volume) was filled with the same isotonic buffer pH 7.4. Manually 200 µL samples from the receptor chamber were taken during 30 h. The sample volume taken was replaced with buffer pH 7.4. The drug contained in each sample taken has been considered in order to calculate the accumulative amount of nadolol

in the receptor compartment. At the end of the *in vitro* transdermal diffusion experiments the amount of nadolol retained in the skin was extracted by shaking the skin during
12 h with 3 mL of the isotonic buffer (pH 7.4) and determinated by the HPLC method. The transdermal flux (J) of nadolol was estimated from the slope of the linear region (steady-state portion) of the plot of the accumulated amount of nadolol (µg/cm^2) against time (hours).

Results and Discussion: In this work, a specific and sensitive HPLC method to determine nadolol is described. Since nadolol spectra showed two maximum peaks of absorbance at 220.1 and 269.8 nm, we have selected 269 nm for the detection because there were too much interferences from skin at the retention time of nadolol at 220.1 nm. The retention time was 3.45±0.05 minutes. A representative chromatogram of the samples obtained from transdermal diffusion studies is shown in Fig. 1.

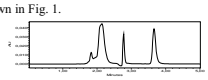


Fig 1. Chromatogram of a nadolol sample, obtained from in vitro transdermal permeation experiments.

The method exhibited linearity between the response (y) and the corresponding concentration of nadolol (x) over the 0.167-167 µM range of concentrations assayed. The results of the least square linear regression analysis showed a significant correlation coefficient (r≥ 0.99).
Table 1 summarizes the relative error values of the standards. Accuracy was within acceptable limits.
The results of the between-day and within-day precision determined are shown in Table 2 and were below 15% in all cases.
The limit of detection and the limit of quantification of nadolol were 0.085 and 0.167 µM, respectively.

Table 1. Accuracy of the HPLC method for determining nadolol concentrations in saline-buffered samples, pH 7.4 (n=5).

	Between-day (n=5)		Within-day (n=5)	
Real concentration (µM)	Concentration found (µM)	Accuracy (%)	Concentration found (µM)	Accuracy (%)
0.17	0.17	3.79	0.18	6.72
0.84	0.82	2.20	0.85	2.19
1.67	1.79	7.19	1.88	12.6
16.7	16.6	0.56	16.0	4.46
83.5	83.9	0.48	83.7	0.21
167	167	0.11	167	0.01

Table 2. Between- and within-day variabilities of the HPLC method for determining nadolol concentrations in saline- buffered samples, pH 7.4.

	Between-day variability (n=5)		Within-day variability (n=5)	
Real concentration (µM)	Concentration found (µM)	R.S.D. (%)	Concentration found (µM)	R.S.D. (%)
0.17	0.17	3.33	0.18	8.98
0.84	0.82	10.4	0.85	3.86
1.67	1.79	14.7	1.88	5.85
16.7	16.6	6.08	16.0	0.46
83.5	83.9	1.20	83.7	0.28
167	167	0.26	167	0.19

The results obtained in the stability test are shown in Table 3. The samples stored at ambient temperature showed the biggest degradation of nadolol in saline-buffered solution (pH 7.4.). On the other hand, the compound stored at -20ºC and -80ºC (darkness) suffered no detectable degradation, since it kept the same concentration during 120 days of the study.
The potential use of this method has been demonstrated by the study of *in vitro* transdermal diffusion of nadolol. The accumulated amounts of nadolol in receptor compartment (µg/cm^2) are plotted against time (hours) in Fig. 2. The amount of nadolol retained in skin was 108.18±31.38 µg/cm^2.The transdermal flux, estimated from the slope of the linear region (steady-state portion) of the plot, was found to be 13.9 ± 0.36 µg/(cm^2·h) (mean ± S.D.; n=7).

Table 3. Stability of nadolol in different condition. Recovery after storage (%) ± S.D. (%) (n=6).

Days	1	10	15	30	60	120
Light (24ºC)	99.9 ± 0.18	99.7 ± 0.07	99.6 ± 0.06	99.5 ± 0.03	99.3 ± 0.13	98.4 ± 0.03
Darkness (24ºC)	99.9 ± 0.15	99.9 ± 0.03	99.8 ± 0.08	99.8 ± 0.08	99.7 ± 0.06	99.5 ± 0.10
Darkness (37 ºC)	100 ± 0.27	101 ± 0.05	---	102 ± 0.06	---	---
Darkness (4 ºC)	100 ± 0.13	---	100 ± 0.05	100 ± 0.14	---	---
Darkness (-20 ºC)	---	100 ± 0.00	100 ± 0.09	100 ± 0.09	100 ± 0.03	100 ± 0.04
Darkness (-80 ºC)	---	100 ± 0.01	100 ± 0.20	100 ± 0.09	100 ± 0.03	100 ± 0.04

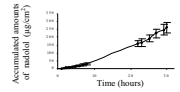


Fig. 2. Accumulated amount of nadolol found in the receptor chamber versus time. Error bars represents standard deviation.

Conclusions: A simple chromatographic method has been validated for the rapid and precise determination of nadolol. The results of the validation of the HPLC method prove the method as satisfactory, since the limit of quantification, the specificity of the method and its accuracy and reproducibility allow to quantify the amount of nadolol contained in the samples obtained from the *in vitro* transdermal permeation experiments.

References:

1. Patel BR. et al. J. Pharm. Sci. 70(3) :336-8, 1981.
2. Delamove M. et al. Forensic. Sci. Int. 141(1):23-31, 2004.
3. Hoshino M, et al. J Chromatogr. B. Biomed. Appl. 661(2):281-9, 1994.
4. Srinivas NR. et al. Biomed. Chromatogr. 9(2) :75-9, 1995.
5. Belas FJ. et al. Biomed Chromatogr. 9(3):140-5, 1995.
6. Maurer HH, et al. J Chromatogr A. 26;1058(1-2):169-81, 2004.
7. Amin AS, et al. J Pharm Biomed Anal. 7;30(4):1347-53, 2002.
8. D.R. Jenke, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 19: 719-736, 1996.
9. D.R. Jenke, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 19: 737-757, 1996.
10. A. Femenía-Font, et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 61:50-55, 2005.

Acknowledgments: The authors wish to thank Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060108), Ministerio de Educación y Ciencia and the University CEU Cardenal Herrera for the financial support.

COMPRIMIDOS IMPLANTABLES DE hGH: CORRELACIÓN IN VITRO-IN VIVO.

Santoveña A[1], Fariña JB[1], Llabrés M[1], Zhu Y[2], Dannies P[2].
[1]Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, La Laguna 38200, Tenerife, Spain. [2]Department of Pharmacology, Yale School of Medicine, New Haven; Connecticut, USA.

Introducción. La liberación de hormona de crecimiento humana (hGH) desde diferentes tipos de sistemas de cesión controlada (1-3) ha sido y continúa siendo ampliamente estudiada. La inclusión de hGH en comprimidos biodegradables para administración parenteral no es una práctica común, a pesar de las ventajas que su elaboración presenta; preparación directa, ausencia de contacto con disolventes y agitación mecánica, alta eficacia de incorporación, etc… Recientemente, se ha estudiado el efecto celular causado tras la expresión de hGH y del32-71GH (proteína secretada en la deficiencia de hormona de crecimiento humana tipo II) por adenovirus en líneas celulares de cáncer de ovario (4). En éste trabajo se ha estudiado el perfil de cesión de hGH desde comprimidos implantables con el objeto de conocer el efecto que su liberación prolongada provoca en el desarrollo tumoral de cáncer de ovario en ratones.

Materiales y Métodos. hGH (lote ID 274881) y Poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) Resomer® RG 504 50:50 fueron suministrados por Lilly SA y Boehringer Ingelheim respectivamente. Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

Se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) Waters formado por una bomba (600 E), un inyector automático (717 plus), un detector UV dual (2487) a 214 nm, con programa de adquisición de datos Millenium^{32}, como fase estacionaria una columna Protein Pak 125 (300 x 7,8 mm) y como fase móvil una mezcla acetonitrilo/agua (30/70 v/v) con 0,05% de ácido trifluoroacético a un flujo de 1 ml/min.

Los pesos moleculares en peso (Mw) y en número (Mn) de PLGA y de los comprimidos fueron determinados por cromatografía de permeación en gel (GPC) relativa a patrones de poliestireno (2800-700000 Da) empleando un sistema Waters. Se empleó tetrahidrofurano (THF) como fase móvil a 0,9 ml/min. La degradación del PLGA se expresó mediante la determinación del índice de degradación (ID) de acuerdo con ID = Mn^0/Mn^t -1, donde Mn^0 es el Mn inicial y Mn^t al tiempo t.

Se elaboraron tres formulaciones de hGH mediante compresión directa en una prensa hidráulica Carver a temperatura ambiente, bajo condiciones asépticas y con diferentes combinaciones de carga de hormona y polímero, y máxima fuerza de compresión en el tiempo, empleando para ello un molde cilíndrico de 6 mm de diámetro (tabla 1).

Tabla 1.- Características de las formulaciones elaboradas con 0,1 Tn de fuerza máxima aplicada F: formulación; h: hGH; Pol: PLGA; t: tiempo; Cdo.: contenido declarado; P: peso; E: espesor.

F	h (mg)	Pol (mg)	t (s)	Cdo. (%)	P (mg)	E (mg)
A	0,8	20	30	75	20	0,8
B	1,6	80	30	75	84	3,2
C	0,8	80	60	112	73	3,1

El contenido de hormona en los comprimidos (n = 10) se determinó disolviendo cada uno en THF. La estabilidad de la hGH en THF ya ha sido estudiada en trabajos anteriores (5).

Para estudiar la cinética de cesión, cada comprimido se introdujo en viales con 1 ml de tampón fosfato isotónico pH 7,4 (Sörensen) en un baño termostatizado a 37ºC durante 15 días.

Los estudios in vivo se realizaron bajo condiciones estériles en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Yale, empleando ratones hembras CB17 SCID que fueron tratados convenientemente de acuerdo con los Protocolos de Cuidado y Empleo de Animales de Experimentación. Cada comprimido fue implantado en la cavidad peritoneal del ratón cuatro días después de ser inyectados con células SKOV3.ip1. Los niveles séricos de hGH fueron determinados tras sangrado de los vasos orbitales del ojo y mediante inmunoensayo (Immulite Growth Hormone, Siemens). Para la realización del análisis farmacocinético poblacional se empleó un modelo de tanques en serie (6). Los parámetros farmacocinéticos se estimaron empleando un modelo no lineal de efectos mixtos (7). Se estudiaron diferentes niveles de correlación in vitro-in vivo (8).

Resultados y Discusión. Las características de cada formulación se resumen en la tabla 1. La cesión in vitro de hGH desde los comprimidos implantables (figura 1) muestra el mismo perfil de liberación, una cesión inicial rápida seguida de un estancamiento. Estos resultados muestran como la cesión de principio activo disminuye a medida que más cantidad de polímero, menos carga de hormona y más fuerza de compresión

se aplica en el tiempo. Al comprobar el ID del polímero, se comprueba cómo el aumento de la degradación del peso molecular del polímero no coincide con un cambio en la liberación de hGH.

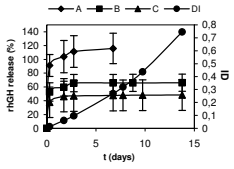


Figura 1.- Cesión in vitro de hGH e ID del PLGA (segundo eje) con el tiempo.

La figura 2 muestra las predicciones poblacionales, entre grupos y concentraciones observadas de hormona con respecto al tiempo para cada ratón.

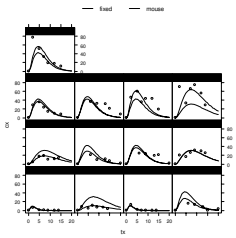


Figura 2.- Concentraciones plasmáticas de hGH de cada ratón durante 15 días (puntos), valores predichos para cada uno (línea rosa) y para cada grupo estudiado (línea azul).

Las concentraciones plasmáticas muestran una curva extravasal con diferentes concentraciones máximas. El análisis estadístico de los resultados obtenidos no revela diferencias significativas entre formulaciones ($p > 0,05$). Para establecer el nivel C IVIVC realizamos la regresión lineal entre la dosis de hormona (X_0) y el área bajo la curva (ABC). Éste modelo de correlación posee un valor r de 0,97, pero no pasa por el origen. Esto indica que la respuesta farmacocinética entre ABC y X_0 no es lineal, probablemente por la alta dosis de principio activo administrada en cada formulación.

Conclusiones: Se elaboraron tres formulaciones de comprimidos implantables, con diferentes combinaciones de hGH-PLGA y máxima fuerza aplicada en el tiempo. Estas formulaciones poseen la principal ventaja de una fácil elaboración que contribuye a mantener la estabilidad del principio activo durante la misma, así como durante su cesión prolongada en el tiempo. El modelo no lineal de efectos mixtos permite ajustar los datos in vivo a un único modelo de tanques en serie, con la dosis de hormona como el único parámetro que afecta a la evolución de la concentración plasmática en el tiempo. Aunque se obtuvo una buena correlación in vitro-in vivo, la evolución entre los parámetros farmacocinéticos y de disolución no resultó lineal, debido a las altas dosis de hormona suministradas en cada implante. Éste nivel C de correlación no refleja en su totalidad los complejos mecanismos de cesión y absorción del principio activo, pero puede emplearse como primer paso en el proceso global de obtención de resultados in vitro-in vivo de formas farmacéuticas útiles en la investigación de nuevos tratamientos contra el cáncer de ovario en ratones .

Bibliografía:

(1) Vlugt-Wensink KD, de Vrueh R, Gresnigt MG, Hoogerbrugge CM, van Bunl-Offers SC, de Leede LG, Sterkman LG, Crommelin DJ, Hennink WE, Verrijk R. Preclinical and clinical in vitro in vivo correlation of an hGH dextran microsphere formulation. Pharm. Res. 24, 2239-2248, 2007.
(2) Santoveña A, García JT, Fariña JB, Llabrés M. A linear mixed-effects statistical model for in- vivo evaluation of recombinant human growth hormone implants in hypophysectomized rats. J. Pharm. Pharmacol. 59, 1313-1317, 2007.
(3) Okumu FW, Dao Le N, Fielder PJ, Dybdal N, Brooks D, Sane S, Cleland JL. Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER. Biomaterials 23, 4353-4358, 2002.
(4) Patel y Dannies, datos no publicados.
(5) Santoveña A, García JT, Oliva A, Llabrés M, Fariña JB. A mathematical model for interpreting in vitro rhGH release from laminar implants. Int. J. Pharm. 309, 38-43, 2006.
(6) Faddy M J. A structured compartmental model for drug kinetics. Biometrics 49, 243-248, 1993.
(7) Pinhero JC, Bates DM. Linear mixed-effects models. In: Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New York, 2000.
(8) USP Pharmacopeia 30, Vol.1, p. 536, Rockville, 2006.

Agradecimientos:

Los autores agradecen a Alison Kay, Vicente Hernández y Carmen Bueno de Lilly S.A. el suministro de Hormona de Crecimiento Humana Recombinante y a Patricia Donovan y Julia Merk, de la Universidad de Yale, el desarrollo de la técnica de implantación de los comprimidos.

ESTUDIO MICROBIOLOGICO DE VEHICULOS TRANDERMICOS: GEL PLURONIC Y PLO (Pluronic Lecithin Organogel)

Clares, B., Ruiz, Mª A., Gálvez, P., y Gallardo, V.
Dpto de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

Introducción: En el desarrollo de nuevas formulaciones transdérmicas, el éxito depende no solo de la correcta elección de los activos y excipientes seleccionados, sino de la estabilidad de los mismos (1). En este sentido la estabilidad microbiológica de las formas dermofarmacéuticas resulta imprescindible como garantía de calidad, ya que debido a la naturaleza de sus componentes son susceptibles de contaminación. Los microorganismos dan lugar a diversas alteraciones indeseables que pueden conducir no sólo a una disminución de la estabilidad sino a una infección por microorganismos patógenos y a la producción de sustancias metabólicas tóxicas. Así pues, el control microbiológico exige un mayor rigor en determinadas formas tópicas, especialmente en vehículos de liberación transdérmica de fármacos, tales como geles hidrófilos de Pluronic y organogeles PLO (Pluronic Lecithin Organogel) que, debido a su alto contenido acuoso, constituyen excelentes medios de cultivo microbiológicos.
Estos excipientes pueden facilitar el paso de principios activos a través del estrato corneo, aumentando la disponibilidad y el tiempo de permanencia de un fármaco, lo que supone un riesgo no sólo por su composición sino por su lugar de acción (2,3). Sin embargo, hasta el momento, no existen evidencias científicas sobre la estabilidad microbiológica de estos vehículos lo que limita la evaluación exacta de posteriores ensayos biofarmacéuticos. Por tanto nuestro objetivo ha sido el desarrollo y estudio microbiológico de dos formulaciones transdérmicas: gel pluronic y PLO con el objeto de discriminar la necesidad o no de incorporar un conservante que asegure la estabilidad de las fórmulas objeto de ensayo.

Material y Métodos: Las diferentes formulaciones estudiadas en la elaboración de las formas transdérmicas, así como las concentraciones de los componentes figuran en la Tabla 1.
Para cada formulación se han elaborado seis fórmulas que difieren en la concentración del conservante.
El conservante seleccionado, Microcare MTI®, es una mezcla de Methylisothiazolinone Iodopropynyl butylcarbamate, activo frente a bacterias gram +, gram -, hongos y levaduras. Es soluble en agua, por lo que se añade en la fase acuosa a las siguientes concentraciones: 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% y 0.9%.

Tabla 1. Composición del Gel Pluronic y PLO

FORMULA		COMPONENTES	%
PLO	Fase Oleosa	Lecitina de Soja	10
		Palmitato isopropilo	10
	Fase Acuosa	Gel Pluronic F-127 c.s.p 100 ml (Pluronic F127® 20% Agua destilada c.s.p 100ml)	

Cada una de las muestras se prepara por triplicado, sometiéndose a diferentes temperaturas: 4ºC, 40ºC y Tª ambiente, protegidas de la luz. El periodo de estudio ha sido de 30 días, determinándose a intervalos de 15 días la presencia de microorganismos en ambas formulaciones transdérmicas. Para ello se procede a las siembras en medio TSA (Tristona Soja Agar) para la detección de bacterias y en medio Saburaund para la detección de hongos y levaduras, incubándose a 37º C - 48 horas y 22º C - 5 días, respectivamente (RFE 2.6.12) (4). La determinación del recuento de microorganismos totales se realiza por recuento en placa Tinción de gram y posterior identificación con API selectivos APY CORYNE 20900 (corynebacterias), APY STAPH 20500 (estafilococos), API 20C AUX 20210 (levaduras) y API 50CH 50300 - API 50CHB/E 50430 (Bacilus).

Resultados y Discusión: Los resultados obtenidos en las formulaciones objeto de ensayo se compararon con los valores límites hasta ahora detallados en la RFE para formulaciones farmacéuticas de uso tópico <100 UFC (RFE 5.1.4): Aerobios Mesófilos (AER) y Mohos y Levaduras (H y L) (RFE 2.6.12); Escherichia coli: Ausencia; Staphylococcus aureus: Ausencia; Pseudomonas aeruginosa: Ausencia; Candida albicans: Ausencia (RFE 2.6.13).
Los datos de las tablas 2 y 3 ponen de manifiesto la acción antibacteriana y antifúngica del conservante empleado. Transcurridos 15 días y conservadas a 4ºC, ninguna de las formulaciones estudiadas necesitan conservador. Sin embargo a 25 y 40ºC se empieza a obtener resultados microbiológicos positivos. Por tanto se deduce la necesidad de incorporar 0.1% del conservante tanto en el hidrogel como el organogel. Asimismo

y tras la falta de efectividad de la primera concentración de conservante estudiada, se realiza un barrido de concentraciones crecientes de conservante (0,3%; 0,5%; 0,7%; 0,9%).
Tabla 2. Recuento microbiológico Gel Pluronic

HIDROGEL			% CONSERVANTE					
Tiempo (días)	Tª °C	M.O.	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
1	4	A.	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	25	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	40	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		H	NC	NC	NC	NC	NC	NC
15	4	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	25	A	CTO	845 UFC	789 UFC	57 UFC	5 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	908 UFC	73 UFC	14 UFC	NC
	40	A	CTO	CTO	1142 UFC	148 UFC	16 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	1031 UFC	141 UFC	28 UFC	NC
30	4	A	CTO	CTO	51 UFC	41 UFC	NC	NC
		HL	CTO	CTO	63 UFC	39 UFC	NC	NC
	25	A	CTO	CTO	1684 UFC	1004 UFC	4 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	1495 UFC	1352 UFC	2 UFC	NC
	40	A	CTO	CTO	2103 UFC	1214 UFC	28 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	2004 UFC	1565 UFC	10 UFC	NC

Tabla 3. Recuento microbiológico PLO

PLO			% CONSERVANTE					
Tiempo (días)	Tª °C	M.O	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
1	4	A.	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	25	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	40	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
15	4	A	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		HL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	25	A	CTO	964 UFC	814 UFC	33 UFC	NC	NC
		HL	CTO	CTO	1122 UFC	66 UFC	NC	NC
	40	A	CTO	CTO	1244 UFC	112 UFC	7 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	1422 UFC	129 UFC	21 UFC	NC
30	4	A	CTO	CTO	50 UFC	38 UFC	NC	NC
		HL	CTO	CTO	78 UFC	28 UFC	NC	NC
	25	A	CTO	CTO	2145 UFC	1014 UFC	1 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	1789 UFC	1159 UFC	3 UFC	NC
	40	A	CTO	CTO	2187 UFC	1203 UFC	2 UFC	NC
		HL	CTO	CTO	1845 UFC	1265 UFC	5 UFC	NC

Se confirma el poder inhibitorio total del conservante empleado al 0.9% tanto para el hidrogel como para PLO, pero, también podemos afirmar, que las fórmulas estudiadas cumplen los requisitos de la legislación vigente cuando se adiciona cantidades inferiores de conservante: 0,7% en todos los casos ensayados y 0,5% para las fórmulas conservadas a 4 y 25ºC tras 15 días o 4ºC transcurridos 30 días desde su elaboración.
Paralelamente se realizó el control microbiológico de la fase oleosa, no observando contaminación alguna a lo largo de todo el ensayo. En los controles microbiológicos de las diferentes especies patógenas, los resultados fueron ausencia total para cada uno de ellos.

Conclusiones
La estabilidad microbiológica del gel Pluronic y PLO se mantiene inalterada durante quince días a 4°C. Sin embargo para optimizar la estabilidad de ambas formulaciones en el periodo de estudio ensayado, la cantidad mínima necesaria de Microcare MTI® fue 0,3% en refrigeración y 0,7% cuando las fórmulas se almacenan a 25 y 40ºC.

Bibliografía
(1) Ruiz MA, Clares B, Morales ME, Gallardo V, Pharmaceutical Development and Technology, 12: 637-644, 2007.
(2) Hoffman SB, Yoder AR, Trepanier LA, J Vet Pharmacol Ther., 25 (3):189-93, 2002.
(3) Murdam S, Hospital Pharmacist, 12:267- 270.
(4) Real Farmacopea Española, 3ª Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, pp. 165-170, Madrid (2005).

Tª (Temperatura); MO (Microorganismos); A (Aerobios); HL (Mohos y Levaduras); UFC (Unidades formadoras de colonias)
*NC: no crecimiento; CTO: >13000 UFC

DESARROLLO DE PARCHES TRANSDÉRMICOS DE NORTRIPTILINA CON DIFERENTES MATRICES POLIMERICAS.

J. J. Escobar-Chávez [1,2], V. Merino[1], M. Merino-Sanjuán[1], A. Nácher[1], A. Ganem-Quintanar[2], O. Díez-Sales[1], M. Herráez[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, Burjassot, Valencia, España 46100.
[2]División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1º de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 54704.

Introducción
El consumo de tabaco es una de las principales causas de muerte en el mundo, responsable de la muerte de 1 de cada 10 adultos. Los riesgos de muerte asociados con enfermedades cardiovasculares y pulmonares se reducen, si los fumadores interrumpen su consumo [1-3]. Un estudio mostró que la combinación de nicotina transdérmica y clorhidrato de nortriptilina por vía oral (NTP-HCL) reduce significativamente los síntomas por deshabituación tabáquica, representando una importante e interesante opción para fumadores cuando la monoterapia con nicotina transdérmica no permite obtener resultados favorables [4]. El objetivo de este estudio ha sido el desarrollo y caracterización de diferentes parches transdérmicos con nortriptilina, con el fin de buscar formas de administración alternativas que potencien un mayor cumplimiento de la terapia antitabaco.

Material y Métodos
Preparación de parches: Los parches adhesivos se prepararon utilizando dos tipos de polímeros formadores de matriz, etil vinil acetato (EVA) y poliisobutileno (PIB). En cada uno de los sistemas matriciales, cuya composición se muestra en las Tablas 1 y 2, se incorporó NTP a la concentración del 2% p/p. Los componentes se mezclaron y se mantuvieron en agitación durante 12 h, posteriormente fueron sometidos a sonicación y vertidos en placas de vidrio de 1 mm de altura, dejándose secar 48h a temperatura ambiente.

Tabla 1. Composición de parches con matriz polimérica de EVA.

Componentes	Concentración, (% p/p)		
	Parche I	Parche II	Parche III
EVA	**6**	**6**	**6**
TEC (Tri-etil citrato)	**8**	**8**	**8**
Ciclohexano	**85.2**	**78.4**	**75.2**
PEG400ME	**--**	**--**	**5**
1-Dodecanol	**--**	**5**	**5**
Pluronic®F-127	**--**	**1.8**	**--**
Alcohol etílico	**0.8**	**0.8**	**0.8**

Tabla 2. Composición de parches con matriz polimérica de PIB.

Componentes	Concentración, (% p/p)		
	Parche I	Parche II	Parche III
PIB	**6**	**6**	**6**
Ciclohexano	**94**	**87.2**	**84**
PEG400ME	**--**	**--**	**5**
1-Dodecanol	**--**	**5**	**5**
Pluronic®F-127	**--**	**1.8**	**--**

Estudio microscópico: Los parches elaborados se observaron al microscopio de luz polarizada con objeto de identificar, en su caso, la formación de cristales durante el almacenamiento y conservación.

Estudios de permeación in vitro por difusión pasiva: Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron celdas de difusión tipo Franz. En el dador se colocaron los parches desarrollados, cubiertos con película oclusiva (3M® Scotchpak® 9733) y en el receptor solución tamponada de HEPES pH = 5.5; la membrana utilizada fue piel humana completa procedente de la zona abdominal. Las muestras se tomaron a diferentes intervalos de tiempo para completar 32h. El contenido de NTP se valoró mediante HPLC. A partir de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo se calculó el flujo de paso de NTP a través de la piel.

Resultados

Microscopia polarizada. Durante el estudio microscópico, realizado inmediatamente después de la elaboración de los parches y a los 30 días de almacenamiento, no se observó la formación de cristales en los parches con matriz de EVA. Sin embargo, la presencia de cristales es evidente en los parches con PIB trascurridos 30 días desde su elaboración. En la Figura 1, se muestran los parches de NTP con PF-127+1-dodecanol y cada una de las matrices usadas para elaborarlos.

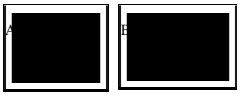


Figura 1. Fotografías a 20 aumentos de los parches, transcurridos 30 días desde su elaboración: A) Parche PF-127-PIB, B) Parche PF-127-EVA.

Estudios de permeación in Vitro. Los perfiles de permeación de NTP obtenidos a partir de los diferentes parches se muestran en la Figura 2. A título de comparación, en la figura se incluyen los valores de flujo que se obtuvieron previamente, a partir de parches que se elaboraron con una matriz de quitosano, empleando los mismos promotores.
Los parches preparados con la matriz de EVA retienen en gran medida la NTP y dificultan su liberación.
Independientemente de la naturaleza de la matriz, los parches que contienen los promotores Pluronic® F-127 + 1-Dodecanol, mostraron el valor de flujo de NTP más alto. El máximo valor de flujo lo presentó el parche con la matriz de PIB y dichos promotores (35.8 ± 1.8 μg/h/cm^2), comparado con todos los demás parches formulados. El principal problema de estos sistemas es el valor del periodo de latencia (t_{lag}), alrededor de 18h.

Conclusiones
A pesar de que se observa cristalización de la NTP en los parches con PIB, éstos permiten un mayor paso de NTP a través de la piel. La adición de promotores de permeación incrementa, en todos los casos, la permeación de NTP a través de la piel. La combinación de Pluronic® F-127 y 1-dodecanol como promotores de penetración es la que proporciona mejores resultados.

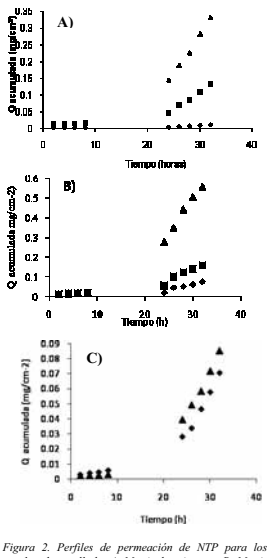


Figura 2. Perfiles de permeación de NTP para los parches desarrollados A: Matriz de quitosano, B: Matriz de PIB y C: Matriz de EVA. ▲(parches con PF-127+1-dodecanol),■(parches con PEG400ME) y ♦ (parches control).

Referencias
1)http://www.cdc.gov/Tobacco/sgr/sgr_1964
2) Peto R, et al., *BMJ.* 321:323–329, (2000).
3) Anthonisen NR, et al., *Ann. Intern Med.* 142:233–39, (2005).
4) Prochazka AV, et al., *Arch Intern Med.* 158:2035–39, (1998).

Agradecimientos
Los autores agradecen a Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència (Generalitat Valenciana) por el apoyo financiero (GV06/163).
José Juan Escobar-Chávez agradece la beca PROFIP/UNAM.

DRUG RELEASE KINETICS AND FRONTS MOVEMENT STUDIES FROM MATRICES COMBINING SWELLABLE AND INERT POLYMERS: EFFECT OF HPMC WITH DIFFERENT DEGREES OF SUBSTITUTION

J.J. Escudero, C. Ferrero, M.R. Jiménez-Castellanos.
Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González nº 2, 41012 Sevilla, Spain.

Introduction

HPMCs are cellulose ethers frequently used to provide a controlled release of drugs from matrix tablets (1). The possibility of modulation of theophylline release by mixing HPMC of different viscosity grades with a new generation of inert copolymers was demonstrated in a previous work (2). Both the swelling characteristics and the porous structure of the matrices were found to have a dominant role in the drug release mechanism.

The aim of the present work is to evaluate the technological properties and drug release behaviour of matrix tablets combining HPMC of different substitution degrees (hydrophilic polymer), and hydroxypropylcellulose-methyl methacrylate -HCMMA- (inert polymer). Attention will be focused on the influence of a) polymer type, b) ratio of two polymers in the tablets; c) substitution degree of HPMC.

Materials and methods

- Materials:

HPMC (Methocel® K4M, E4M and F4M, Colorcon) was selected as swellable polymer. The copolymer synthesised by free radical copolymerisation of methyl methacrylate (MMA) and hydroxypropylcellulose (HC) was selected as inert polymer. The product (HCMMA) was dried either in a vacuum oven (OD) or freeze-dried (FD) (3). The OD product was crushed in a knives mill to obtain powdery samples.

Anhydrous theophylline was chosen as model drug and Stearic acid was selected as lubricant.

- Methods:

- Matrix tablet preparation: Theophylline (24% w/w) and excipients (75% w/w of HCMMA:HPMC at 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 or 0:100 ratios) were mixed for 15 min using a double-cone mixer at 50 r.p.m. After the addition of stearic acid (1% w/w), the mixing procedure was continued for a further 5 min. The mixtures were compressed in an instrumented single- punch tablet machine equipped with 12 mm flat
faced punches, to obtain tablets weighing 500 mg and with a crushing force of 70-80 N.

- Mercury porosimetry measurements:

Mercury porosimetry runs were undertaken using an Autopore IV 9510 porosimeter (working pressures: 0.1-60000 psi) with a 3cc penetrometer. A quantity of sample was included in order to obtain 20-90% of mercury intrusion.

- Drug release study: Release experiments (three tablets) were performed in an automatic dissolution apparatus 2 during 24 h. Deionized water (900 ml) at 37±0.5ºC was used as dissolution medium and tablets were tested at 50 r.p.m. In order to obtain a rigorous radial release, the tablets were locked between two transparent Plexiglass® discs (4). Drug release data ($M_t/M_\infty \leq 0.6$) were analysed according to Higuchi (5), Korsmeyer (6) and Peppas and Sahlin equations (7).

- Fronts movement study: Methylene blue (0.004% w/v) was added to the dissolution medium in order to improve the visualisation of the different fronts. The experiment was carried out, in duplicate, in the same conditions as the radial release studies. At defined time intervals the devices were removed from the dissolution apparatus and photographed. The photos were analysed using Corel Draw® X3 Software (8).

Results and discussion

Concerning tablet elaboration, HPMC derivatives (100%) showed higher plasticity and easier tablet elaboration than HCMMA. Between the commercial polymers, HPMC E4M presented the worse compression characteristics. The isodiametrical shape of HPMC E4M particles, less prone to fragmentation, could explain these results (9).

The combination of two polymers in the mixtures decreased the applied pressure and increased the plasticity values compared with HCMMA 100%. In the mixtures with OD-HCMMA, the plasticity parameter increased its value until 50:50 ratio, keeping then constant. However, similar values were found for mixtures with FD-HCMMA at all ratios. Mixtures with FD-HCMMA needed less pressure and were more plastic than OD-HCMMA mixtures. At same percentage, HPMC E4M mixtures showed worse compression characteristics than HPMC
K4M and F4M, in agreement with their individual behaviour.

Mercury porosimetry measurements revealed that, in general, the matrices presented mesopores. K4M and F4M 100% matrices presented higher porosity, mean pore diameter and median pore diameter than HCMMA ones. HPMC E4M showed lower porosity than FD-HCMMA and higher than the OD derivative. When HCMMA percentage decreased, the porosity of the tablets increased.

Higher percentages of drug release were observed for OD-HCMMA matrices compared with FD tablets (Fig. 1). HPMC E4M showed a release

profile between OD and FD-HCMMA, whereas HPMC K4M and F4M tablets displayed the lowest release. It seems apparent that the ratio between methoxyl and hydroxypropyl substitution in HPMC may not always be representative of the drug release behaviour.

As the content of HCMMA in the mixtures was reduced, the ability to control drug release increased, mainly from 75:25 to 50:50 ratio (Fig. 1). Mixtures with HPMC E4M and K4M behaved similarly and the major differences were seen for mixtures with HPMC F4M, which always presented the slowest theophylline release, in agreement with its lowest hydrophilicity. The differences were more noticeable at higher proportions of HCMMA, showing the highest release OD-HCMMA with E4M and K4M.

Data fitting to kinetic equations revealed a drug release mechanism controlled mainly by diffusion for HCMMA 100% matrices; however, HPMC 100% and the mixtures showed a drug release mechanism that combine diffusion and relaxation. K4M and F4M types showed similar k_d values. However the latest showed the slowest k_r value in agreement with the slowest theophylline release. E4M showed the highest k_r value according to its worse compression properties, because the methoxyl substituent content may have an indirect influence over the particle characteristics of the powders, which in turn may affect their compaction behaviour, and subsequent drug release (10). In the mixtures, the k_d values remained more or less similar to HPMC 100%. The most important changes were found in k_r values. All mixtures with F4M did not modify this parameter respect to F4M 100%, in concordance with the lowest theophylline release. In general, the mixtures with E4M presented similar k_r values to E4M 100%, but mixtures with K4M showed the highest k_r values, which decreased when HCMMA proportion decreased.

Fronts movement kinetics for HCMMA 100% were described in a previous paper (2). No important differences could be seen in the erosion fronts for the three swellable matrices tested. Similarly to Ford et al. (11), differences were not found in water uptake of HPMC K4M,

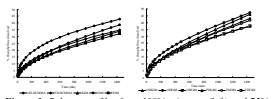


Figure 1: *Release profiles from 100% mixtures (left) and 75% HCMMA:25% HPMC mixtures (right).*

E4M and F4M. The diffusion front was different for HPMC K4M, which moved outwards slowly with time. For the different mixtures HCMMA-HPMC, there were no changes in water uptake fronts compared to HPMC 100% matrices. Erosion fronts increased for all mixtures when the proportion of HCMMA decreased. The highest differences were observed for the 75:25 proportion (Fig. 2). Concerning the substitution degree, the lowest advance of erosion front in E4M mixtures was in agreement with its highest release. Only K4M mixtures showed a diffusion front that moved outwards, whereas E4M and F4M diffusion front moved inwards, that implies that the formation of clear gel was quicker in the latters.

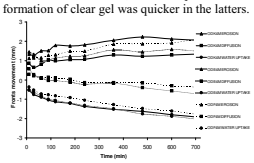


Figure 2*: Fronts movement from ODHCMMA:HPMC (75:25).*

Conclusion

The results of this study confirm the possibility of modulation of theophylline release by mixing two polymers with different release mechanism. For this modulation, these mixtures need either above 50% of HCMMA or high hydroxypropyl groups differences of HPMC in the mixtures (F4M or E4M/K4M).

Acknowledgements

This work has been supported by a F.P.I. grant from the Spanish Government and was part of a project (MAT2004-01599) from the Spanish Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

(1) Melia C-D, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 8: 395-421, 1991
(2) Escudero J et al., Int. J. Pharm., 351: 61-73, 2008.
(3) Castellano I et al., Carbohyd. Polym. 34: 83-89, 1997.
(4) Bettini R et al., Eur. J. Pharm. Sci., 2: 213-219, 1994.
(5) Higuchi T, J. Pharm. Sci., 52(12): 1145-1149, 1963.
(6) Korsmeyer R-W et al., Int. J. Pharm., 15 : 25-35, 1983.
(7) Peppas N-A and Sahlin J, Int. J. Pharm., 57: 169-172, 1989.
(8) Ferrero C et al., J. Control. Rel., 92: 69-82, 2003.
(9) Bonferoni M-C et al., STP Pharma Sci. 6: 277-284, 1996.
(10) Gustafsson C-H et al., Eur. J. Pharm. Sci., 9: 171-184, 1999.
(11) Ford J-L, Int. J. Pharm., 179: 209-228, 1999.

LIPID NANOPARTICLES OF EDELFOSINE: A STRATEGY TO IMPROVE ITS ORAL BIOAVAILABILITY

A. Estella-Hermoso de Mendoza[1], MA. Campanero[2], F. Mollinedo[3], MJ. Blanco-Prieto[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, University of Navarra, E-31008, Spain
aestella@alumni.unav.es
[2]Servicio de Farmacología Clínica, Clínica Universitaria, E-31080 Pamplona, Spain
[3]Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca E-37007 Salamanca, Spain

Introduction: Edelfosine is the prototype of the group of phospholipid analogues called alkyl lysophospholipids (ALP) which represents a promising class of antitumor agents [1], with limited side effects but presenting a low oral bioavailability and low edelfosine tissue levels after oral administration to rats [2].

In an attempt to increase the bioavailability of drugs, delivery systems have been developed, such as lipid nanoparticles [3-5]. These lipid nanoparticles have shown to increase the oral absorption of different drugs and to provide of a sustained release of drugs over the time [4, 6].

Therefore, the aim of this work was to study the pharmacokinetic behaviour of edelfosine in mice and to develop lipid nanoparticles made of Compritol® or stearic acid as candidates to improve oral edelfosine absorption.

Materials and Methods:

Animals

Female BALB/c mice were obtained from Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, Spain). Animals, kept and handled according to institutional guidelines complying with Spanish legislation.

An edelfosine solution (200 µg) was administered to mice (n=6) by oral or intravenous route. Blood samples were collected at 1, 2, 5, 8 and 24 h after administration in EDTA surface–coated tubes and then centrifuged at 10,000 x *g* for 10 min (4ºC) to separate the plasma. After centrifugation, the plasma obtained was stored at −80°C until analysis.

Quantification was achieved by using a slightly modified HPLC–MS method previously developed [7].

Pharmacokinetic analysis

The plasma concentration data were analyzed by non-compartimental and compartimental analysis using WinNonlin Professional Edition Version 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA, USA).

Preparation of lipid nanoparticles

Lipid nanoparticles were prepared by the simple emulsion solvent evaporation method. Briefly, edelfosine was dissolved in an organic solvent like chloroform (TCM) containing the lipid Compritol® or stearic acid, and emulsified by sonication (60 seconds) with an 1 % aqueous solution of stabilizing agent Tween® 80. The resulting emulsion was magnetically stirred for 45 minutes and then subjected to rotavapor for 15 minutes, to completely evaporate the organic solvent. Particles were centrifuged at 4500 x *g* for 10 minutes using an Amicon Ultra–15 filter device and washed twice with distilled water. The obtained particular suspension was fast frozen under –80ºC for at least 3 hours, freeze-dried and stored at 4ºC.

Characterization of lipid nanoparticles

Size of particles was measured by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK). Surface charge was measured using the same equipment described previously with a combination of laser Doppler velocimetry. For edelfosine quantification, 10 mg of nanoparticle freeze-dried powder were dissolved in 1 ml of chloroform and then mixed with 3 ml of ultra pure water. The mixture was vortexed for 1 minute and then centrifuged at 9500 x *g* for 10 minutes. The supernatant was analysed as described above [7].

Results and Discussion: Pharmacokinetic analysis of edelfosine in blood plasma showed a C_{max} of 50.7±28.1 µg/ml and a C_{min} of 2.5±1.3 µg/ml, 24 hours after intravenous administration of a single dose of 200 µg [8]. The AUC value associated to this profile was 125.44 µg·h/l.

Edelfosine exhibited biexponential elimination, with a $t_{1/2\alpha}$ value of 0.286 hours, indicating a rapid distribution to central compartment tissues whereas a slower distribution to deep compartments was appreciated ($t_{1/2\beta}$ value of 22.3 hours). Mean residence time of free edelfosine was 7.2 hours.

Figure 1 depicts the concentration of edelfosine in mouse plasma plotted against time.

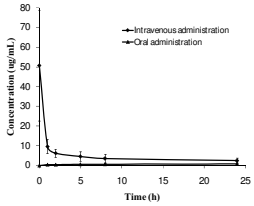


Figure 1. *Time-concentration curve data of edelfosine after administration of 200 µg of edelfosine (n=6, Mean ± S.D.).*

The steady state volume of distribution (V_{ss}) of the drug was 1.29 l/kg, approximately twofold that of the total body water of a mouse, suggesting a moderate extravascular distribution of the drug.

Edelfosine showed very low clearance values in mice compared to its respective liver and kidney blood flow. It is interesting to note that this value of 0.056 L/h/kg is translated barely to 1% of the liver blood flow, suggesting a much lower hepatic intrinsic clearance value.

Regarding the oral route, very low concentration of edelfosine could be found in plasma 24 h after oral administration of 200 µg of an edelfosine solution (Fig. 1). The AUC value associated to this profile was 13.01 µg·h/l. The bioavailability (F) of edelfosine was 10.37 %.

In order to increase this bioavailability lipid nanoparticles containing edelfosine were prepared by the simple emulsion solvent evaporation method [5].

Table 1. *Characterization of lipid nanoparticles prepared by simple emulsion solvent evaporation method.*

Lipid	Size (nm)	Zeta Potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
Stearic acid	312 ± 7.51	-32.4	17.10
Compritol	372 ± 18.84	-32.3	84.35

Table 1 shows that all particles presented a homogenous size and negative surface charge. Size was confirmed with Atomic Force Microscopy imaging (Fig. 2). The highest encapsulation efficiency was achieved with Compritol® nanoparticles.

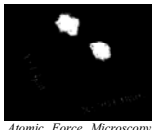


Figure 2. *Atomic Force Microscopy image of Compritol® lipid nanoparticles.*

The high encapsulation efficiency obtained with Compritol® nanoparticles in comparison to the stearic acid nanoparticles is likely to be due to the partially amorphous state of the Compritol® in the formulation, which allows more edelfosine to be incorporated among lipid chains. This statement could be deduced from DSC and X-ray diffractometry studies [5] .

Conclusion: Edelfosine presents a very low bioavailability at a single oral dose of 200 µg. Consequently, lipid nanoparticles containing edelfosine were developed and are under *in vivo* evaluation. Nanoparticles were administered orally and intravenously to mice, and bioavailability of the vectorized drug will be determined.

References:

[1] C. Gajate, F. Mollinedo, *Curr Drug Metab.* 3 (2002) 491-525.
[2] J. Kotting, *et al., Prog Exp Tumor Res.* 34 (1992) 131-142.
[3] R. Cavalli, *et al., J Pharm Sci.* 92 (2003) 1085-1094.
[4] W. Mehnert, K. Mader, *Adv Drug Deliv Rev.* 47 (2001) 165-196.
[5] A. Estella-Hermoso de Mendoza, *et al., Eur J Pharm Biopharm.* 68 (2008) 207-213.
[6] K. Manjunath, V. Venkateswarlu, *J Drug Target.* 14 (2006) 632-645.
[7] M.J. Blanco-Prieto, *et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 810 (2004) 85-92.
[8] A. Estella-Hermoso de Mendoza, *et al., Clin Cancer Res* (2008, accepted)

Acknowledgements: The authors thank "Fundación Caja Navarra", the "Ministerio de Ciencia e Innovación" (PCT-090100-2007-27, SAF2007-61261) and the "Gobierno Vasco, Departamento de Educación (BFI06.37)" for their finantial support.

MODELIZACION DE LA MICROESTRUCTURA DE PELETS A PARTIR DE DATOS DE POROSIMETRIA DE INTRUSION DE MERCURIO

A. Gómez-Carracedo, C. Alvarez-Lorenzo, R. Martínez-Pacheco, A. Concheiro, J.L. Gómez-Amoza

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario Sur s/n. 15782 Santiago de Compostela
e-mail: joseluis.gomez.amoza@usc.es

Introducción

La microestructura condiciona en gran medida las propiedades de los pelets y depende tanto de las características de las materias primas, como del procedimiento y las condiciones de elaboración (1). Para caracterizar la estructura microporosa, resulta muy útil la porosimetría de intrusión de mercurio (PIM), que permite estimar la porosidad, caracterizar la distribución de tamaños de poro y obtener información acerca de la conectividad de los poros o la tortuosidad (2, 3). Las herramientas computacionales permiten modelizar la topología interna de los materiales sólidos porosos (2).

En este trabajo se caracterizó por PIM la microestructura de pelets de celulosa microcristalina (MCC)-carbopol, elaborados utilizando diferentes procedimientos de secado, y se modelizó la geometría del entramado poroso, utilizando el programa Pore-Cor™. Finalmente, se analizó la utilidad de la aproximación computacional para predecir las propiedades de cesión de fármaco a partir de los pelets.

Materiales y Métodos

Materiales

MCC (Avicel® PH101 FMC, Princenton, New Jersey USA), carbomer (Carbopol® 974P, Lubrizol Corp. Wickliffe, Ohio USA), lactosa anhidra (Fagron Ibérica, España), fosfato dicálcico dihidratado (DCP, Merk, España) y teofilina anhidra (Sigma-Aldrich, España).

Elaboración y caracterización de los pelets

Se elaboraron pelets por extrusión-esferonización de mezclas de teofilina (20%), carbopol 974P (48%), MCC (24%), lactosa (8%) (código L) y otros de composición similar reemplazando la lactosa por DCP (código F). Porciones del material esferonizado se secaron: a) en estufa de aire caliente (40ºC, 24 h) –lotes L1 y F1-, b) por liofilización previa congelación lenta (-30ºC, 24 h) -lotes L2 y F2- o c) por liofilización previa congelación rápida por inmersión en nitrógeno líquido (-196ºC) –lotes L3 y F3. En un trabajo anterior se describe detalladamente la metodología utilizada para caracterizar la granulometría, la distribución de tamaños de poro, el volumen poroso y los perfiles de cesión de teofilina (3).

Modelización de la estructura microporosa

Se utilizó el software Pore-Cor™ (Environmental and Fluid Modelling Group, University of Plymouth, UK) para modelizar la estructura porosa como una serie de celdas unidad interconectadas. Cada celda unidad está constituida por 1000 nodos (10x10x10 nodos en las dimensiones x, y, z). En cada nodo se posicionan poros cúbicos, que se conectan entre sí por poros cilíndricos de menor tamaño (estrangulamientos). A partir de las curvas acumuladas de PIM correspondientes a los espacios vacios intragranulares y haciendo uso de un algoritmo simplex (2), se estimaron y optimizaron simultáneamente la conectividad (número medio de estrangulamientos por poro), el sesgo de poro (*pore skew* o factor de escala que adapta el tamaño de los poros y de los estrangulamientos para ajustarlos a la porosidad experimental) y el nivel de correlación (que ajusta la autocorrelación local entre poros y estrangulamientos y que varía entre 0 –estructura aleatoria- y 1 –ordenación en la celda unidad). Estos parámetros permiten generar una celda unidad con unas propiedades de percolación próximas a las reales estimadas a partir de los datos de PIM.

A partir de las estructuras modelizadas se estimaron los siguientes parámetros:

- Diámetro de penetración: valor más alto del diámetro de los estrangulamientos que permite acceder a todos los poros situados en una celda unidad.
- Tortuosidad: relación entre la distancia que hay que recorrer para atravesar una celda unidad en la dirección del eje z y el tamaño de la celda unidad. Para cada celda, se simularon 100 recorridos.
- Permeabilidad: aptitud de un material para ser atravesado por un fluido. Se simula el paso de líquido a través de la celda unidad en la dirección del eje z.

Resultados y discusión

En la figura 1 se presentan curvas de intrusión acumuladas de los pelets L2, obtenidas a partir de los datos de PIM y simuladas utilizando el programa de modelización.

***Tabla 1**. Valores de los parámetros que definen las celdas unidad de los pelets estimados utilizando el software Pore-Cor™ y tiempos medios de disolución de teofilina obtenidos a partir de los perfiles de cesión de los pelets.*Datos tomados de (4).*

Lote	Diámetro de penetración, µm	Conectividad	Sesgo de poro	Nivel de correlación	Permeabilidad, cm^2	Tortuosidad	Tamaño celda unidad, µm	TMD* (h)
L1	$1.20 \cdot 10^{-2}$	2.72	1.39	0.07	$9.021 \cdot 10^{-17}$	2.8	2.95	0.14
L2	2.94	3.53	1.98	0.33	$9.118 \cdot 10^{-11}$	2.9	113.33	0.05
L3	1.30	3.09	1.30	0.33	$2.902 \cdot 10^{-12}$	2.7	72.60	0.07
F1	$9.97 \cdot 10^{-3}$	2.84	1.53	0.04	$1.352 \cdot 10^{-16}$	2.8	2.77	0.15
F2	1.79	3.28	1.27	0.18	$7.458 \cdot 10^{-11}$	2.7	71.25	0.04
F3	1.49	3.23	1.29	0.18	$7.905 \cdot 10^{-13}$	3.2	118.79	0.06

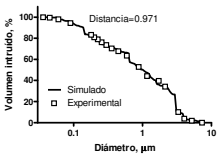


***Figura 1.-** Curvas acumuladas de distribución de tamaños de poro para los pelets L2 obtenidas por PIM y simulada utilizando el programa Pore-Cor™.*

Valores de distancia en torno a 1 son indicativos de un buen grado de ajuste entre los datos experimentales y los simulados. Con las formulaciones restantes se obtuvieron curvas similares. Los valores de conectividad de los pelets desecados por liofilización fueron superiores a 3, claramente mayores que los de los pelets desecados en estufa. Esto indica que los pelets desecados por liofilización cuentan con una mayor variedad de caminos de comunicación entre poros. El diámetro de penetración de los pelets liofilizados fue mayor que 1 micra, mientras que el de los pelets secados en estufa fue 100 veces más bajo. Estos resultados explican que, en términos comparativos y tomando como referencia los pelets liofilizados, la permeabilidad de los pelets desecados en estufa sea prácticamente nula (Tabla 1). Las distribuciones de tamaños de los poros y de los estrangulamientos (figura 2) y las microestructuras simuladas (figura 3) correspondientes a las celdas unidad de los pelets reflejan las diferencias comentadas.

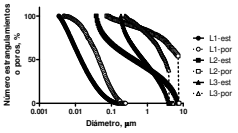


***Figura 2.-** Simulación de las curvas acumuladas de poros y estrangulamientos de los pelets con lactosa.*

Los niveles de correlación para los pelets desecados en estufa fueron próximos a cero, lo que indica que los poros se distribuyen aleatoriamente. En cambio, los pelets liofilizados presentaron valores cuatro veces superiores, lo que indica una cierta ordenación espacial, que se plasma en que los poros de mayor tamaño se sitúan, de manera preferente, en las zonas exteriores de la celda unidad, lo que debe facilitar la penetración del medio de disolución hacia el interior del pelet. Los pelets liofilizados previa congelación lenta fueron más permeables porque, aunque su porosidad es más baja, los diámetros de penetración son mayores. Esto explica que los pelets liofilizados previa congelación lenta cedan la teofilina más rápidamente. Se ha encontrado una estrecha relación entre la permeabilidad y los tiempos medios de disolución (Figura 4).

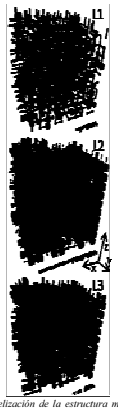


***Figura 3.-** Modelización de la estructura microporosa de los pelets indicados. Los poros se muestran en color gris.*

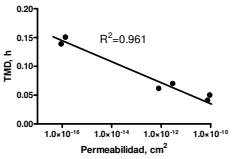


***Figura 4.-** Dependencia semi-log del tiempo medio de disolución respecto de la permeabilidad de los pelets.*

Conclusión

La modelización de la microestructura es una aproximación útil para evaluar los cambios derivados de la composición y/o las condiciones de elaboración sobre las propiedades de los pelets.

Agradecimientos

Xunta de Galicia (Proyecto 07CSA006203PR).

Referencias

(1) Gómez-Carracedo y col., Eur. J. Pharm. Biopharm. 67, 236 (2007).
(2) Laudone y col., Chem. Eng. Sci., 63, 1987 (2008).
(3) Gómez-Carracedo y col., Acta Mater., en prensa.
(4) Gómez-Carracedo y col., Eur. J. Pharm. Biopharm. 69, 675 (2008).

SIMULACION DEL PROCESO DE CAPTACION DE AGUA EN PELETS MATRICIALES A BASE DE EUDRAGIT SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS POST-ELABORACION

L.C.L. Sá Barreto, L. Alonso, R. Martínez-Pacheco, J.L. Gómez-Amoza

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario Sur s/n. 15782 Santiago de Compostela
e-mail: joseluis.gomez.amoza@usc.es

Introducción

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la estructura microporosa de pelets de estructura matricial sobre la liberación de fármaco en estos sistemas (1). Prueba de ello es la fuerte incidencia de distintos tratamientos post-elaboración que modifican, de forma notable, la microporosidad de los pelets (2-3).

El objetivo de este estudio es evaluar, a través de un programa de simulación, el alcance del proceso de captación de agua por parte de la estructura microporosa de pelets matriciales sobre el proceso de cesión de ClH de propranolol a partir de pelets elaborados con dos variedades de Eudragit (L o S) como excipiente base y sometidos a tratamiento térmico o de exposición a vapores orgánicos.

Materiales y Métodos

Materiales

Celulosa microcristalina MCC (Avicel® PH101 FMC, Princenton, New Jersey USA), Eudragit L100 y Eudragit S100 (Degussa, Alemania), propranolol ClH (Roig-Farma S.A., España).

Elaboración y caracterización de los pelets

Se elaboraron pelets por extrusión-esferonización (Caleva 35, 60 rpm, malla de 1 mm; Caleva 120, 1200 rpm, 10 min) de la siguiente composición: MCC (65%), propranolol ClH (5%) y Eudragit L100 (lotes L) o Eudragit S100 (lotes S) (30%). Las masas extruídas se secaron en estufa (40ºC, 24 h). Muestras de los pelets se expusieron a vapores de acetona en un desecador, a temperatura ambiente, durante 5 h (subíndice a) o a un calentamiento a 105ºC durante 20 min en una termobalanza Shimadzu EB-280 (subíndice t).

La caracterización morfológica (diámetro de Feret y circularidad) de los pelets se llevó a cabo por microscopía óptica (Olympus SZCTV). Los estudios de disolución de propranolol ClH se realizaron de acuerdo con las indicaciones recogidas en la USP 32 para este fármaco. En todos los casos se ensayaron muestras de pelets conteniendo 80 mg de principio activo y la determinación de la concentración de fármaco disuelto se llevó a cabo por espectrofotometría directa a 290 nm (Agilent 8453). Los perfiles de disolución se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de Weibull $D=1-exp(-a \cdot t^b)$, en la que D representa la fracción de dosis disuelta y a y b los parámetros de escala y de forma, respectivamente. A partir de los valores estimados de estos parámetros, se calculó el tiempo medio de disolución (TMD) de acuerdo con la expresión $TMD=a^{(-1/b)} \cdot \Gamma(1/b+1)$, en la que Γ representa la función gamma.

La estructura microporosa de los pelets se evaluó por porosimetría por intrusión de mercurio (PIM) en el intervalo de presiones comprendido entre 0.004 y 172 MPa.

Modelización de la estructura microporosa

Se utilizó el software Pore-Cor™ (Environmental and Fluid Modelling Group, University of Plymouth, UK) para modelizar la estructura porosa como una serie de celdas unidad interconectadas. Cada celda unidad está constituida por 1000 nodos (10x10x10 nodos en las dimensiones x, y, z). En cada nodo se posicionan poros cúbicos, que se conectan entre sí por poros cilíndricos de menor tamaño (estrangulamientos). A partir de las curvas acumuladas de PIM correspondientes a los espacios vacios intragranulares y haciendo uso de un algoritmo simplex (4), se estimaron y optimizaron simultáneamente la conectividad (número medio de estrangulamientos por poro), el sesgo de poro (*pore skew* o factor de escala que adapta el tamaño de los poros y de los estrangulamientos para ajustarlos a la porosidad experimental) y el nivel de correlación (que ajusta la autocorrelación local entre poros y estrangulamientos y que varía entre 0 –estructura aleatoria- y 1 –ordenación en la celda unidad). Estos parámetros permiten generar una celda unidad con unas propiedades de percolación próximas a las reales estimadas a partir de los datos de PIM.

Para la estimación de la velocidad de penetración de agua en las estructuras simuladas se utilizó el software Pore-Cor™. Para ello, se estimó, a distintos tiempos, la distancia recorrida por el frente líquido de acuerdo con la ecuación de Bosanquet (5):

$x_2^2 - x_1^2 = (2\beta/\alpha) \cdot (t - (1/\alpha) \cdot (1 - exp(-\alpha t)))$, donde

$\alpha = (8 \cdot \eta)/(\rho \cdot r^2)$ y $\beta = (P_e \cdot r + 2 \cdot \gamma \cdot cos\ \theta)/(r \cdot \rho)$

Expresiones en las que x_1 y x_2 representan las posiciones del frente de líquido inicial y tras un tiempo t, respectivamente, P_e la presión externa aplicada a la entrada del tubo capilar, η, ρ y γ la viscosidad dinámica, densidad y tensión superficial del líquido, respectivamente, θ el ángulo de contacto líquido-sólido y r el radio del poro. En todos los casos, se asumió que η=0.001 Pa·s, ρ=998 kg·m^{-3}, γ=72.75 dina·cm^{-1} y θ=50º.

Conocida la posición del frente de líquido a los distintos tiempos, se calcularon los volúmenes de agua presentes en el interior de los espacios vacíos para las distintas celdas unidad. La representación de estos volúmenes a los diferentes tiempos simulados se ajustó a la clásica ecuación de potencia:

$v = k \cdot t^n$, en la que k y n representan los factores de escala y de forma, respectivamente.

Resultados y discusión

En todos los casos, los pelets presentaron una granulometría y morfología adecuadas (diámetros de Feret y circularidades de 947.5 y 871.8 µm y de 0.98 y 0.97; para los lotes L y S, respectivamente). Las distribuciones de tamaños de poro (Figura 1) muestran que los pelets elaborados con Eudragit S100 son más porosos que los elaborados con la variedad L100. La

exposición de los pelets a vapores de acetona durante 5 h provoca una importante reducción en el volumen correspondiente a los espacios vacíos intragranulares. Por el contrario, estas modificaciones son de escasa magnitud cuando los pelets se someten a un tratamiento térmico a 105ºC durante 30 min.

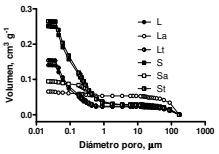


Figura 1.- *Curvas acumuladas de distribución de tamaños de poro para los pelets correspondientes a los lotes indicados.*

Las diferencias en la microestructura de los pelets se reflejan en las velocidades de disolución de propranolol (Figura 2). Los pelets elaborados con la variedad S100 liberan el fármaco a mayor velocidad que los que contienen Eudragit L100 y, al igual que sucedía con la microestructura, sólo la exposición de los pelets a vapores de acetona provoca una ralentización importante en el proceso de disolución (los *TMD* se incrementan en más de cuatro veces como consecuencia de un cambio en el tipo de cinética por la que se rige el proceso).

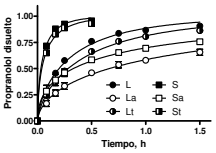


Figura 2.- *Perfiles de disolución de propranolol ClH y ajuste a la ecuación de Weibull correspondientes a los pelets indicados.*

A partir de las microestructuras estimadas con el software Pore-Cor™ se simuló el proceso de captación de agua por parte de los pelets asumiendo que, durante el proceso, no tienen lugar cambios estructurales derivados de procesos de hinchamiento, erosión y/o disolución.
A título de ejemplo, en la Figura 3 se presenta la microestructura de los pelets correspondiente al lote S transcurridos 1 y 1000 µs del proceso de humectación, y en la Figura 4 los volúmenes de agua captada, a distintos tiempos, por los diferentes lotes de pelets. De su observación se desprende las grandes diferencias existentes, entre los distintos lotes de pelets, tanto en los volúmenes como en la las velocidades de captación de agua.

Figura 3.- *Modelización de la estructura microporosa de los pelets del lote S. En claro las zonas humectadas al cabo de 1µs (izquierda) y 1000 µs (derecha).*

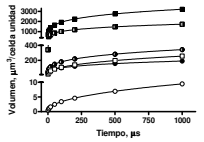


Figura 4.- *Volúmenes de agua captada por los pelets de los lotes indicados estimados por simulación con el software Pore-Cor™ y ajuste a la ecuación $V=k \cdot t^n$.*

La estrecha relación existente entre los valores del exponente *n* y los tiempos medios de disolución de propranolol ClH (Figura 5) permite concluir que, en este tipo de pelets, el proceso de disolución se encuentra limitado por el mecanismo y la velocidad de captación de agua por parte de los pelets.

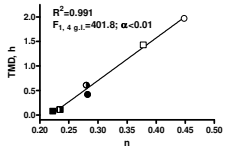


Figura 5. *Relación entre los valores del exponente n de la ecuación de potencia y los tiempos medios de disolución.*

Conclusión
La simulación del proceso de penetración de agua en la microestructura de los pelets constituye una aproximación útil para evaluar los cambios derivados de la composición, de las condiciones de elaboración y de los tratamientos post-elaboración sobre las propiedades de cesión de los pelets.

Agradecimientos
Xunta de Galicia (Proyecto 07CSA006203PR). Evonik Industries por el suministro de las variedades de Eudragit.

Referencias
(1) Gómez-Carracedo y col., Eur. J. Pharm. Biopharm. 67, 236 (2007).
(2) Azarmi y col., Int. J. Pharm. 246, 171 (2002)
(3) Rao y col., Indian J. Pharm. Sci., 66, 202 (2004)
(4) Laudone y col., Chem. Eng. Sci., 63, 1987 (2008)
(5) Schoelkopf y col., J. Colloid Interf. Sci., 227, 119 (2000)

DESARROLLO DE UNA VACUNA INTRANASAL FRENTE A A LA DISENTERÍA BACILAR MEDIANTE NANOPARTÍCULAS

A.I. Camacho[1], Maria Luisa Araújo[2], J.M. Irache[1] C. Gamazo[2]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, [2]Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra

Introducción

La shigelosis es una enfermedad entérica invasiva aguda causada por *Shigella spp*. Los casos de Shigelosis en el mundo se estiman en 164.7 millones (163,2 millones en los países en desarrollo), que causan aproximadamente 1,1 millones de muertes (el 61% en niños menores de 5 años).
Recientemente, la OMS ha dado prioridad a los programas de desarrollo de vacunas efectivas frente a la Shigelosis (OMS, 2005), ya que, hasta la fecha, ninguna de las propuestas ha tenido un éxito significativo.
El objeto de nuestro trabajo es el empleo de extractos subcelulares de *Shigella* capaces de inducir una respuesta inmunitaria eficaz. La vacuna se basará en el empleo de adyuvantes bioadhesivos nanoparticulado para administración nasal.

Materiales y Métodos

Se están utilizando distintas cepas de *Shigella spp*, procedentes de centros hospitalarios (Laboratorio Nacional de Referencia de Majadahonda, Clínica Universitaria, Hospital de Navarra, Clínica Universitaria de Navarra).
Por motivos de seguridad, se empleó BEI (*Binary ethyleneimine*) como agente inactivante. El BEI produce por ciclación a partir de BEA (*bromoethylamine hydrobromide*) en solución alcalina (NaOH) (22 ºC, en agitación, 1 h).
Las condiciones generales para todas las extracciones fueron: crecimiento en TSB, 37 ºC, 125 rpm, 6h.
Para la extracción de proteínas Ipa (factores de virulencia esenciales para la bacteria), *Shigella* fue incubada en las condiciones descritas y se ajustó su densidad óptica (DO_{600nm}) a 0,125. A continuación se añadieron el inductor de secreción, rojo congo, y el deoxicolato (DOC), que favorece la secreción. Las condiciones elegidas para ello fueron las siguientes: rojo congo (35 µg/mL) y DOC (0,1%(w/v)), 30 min, 37 ºC, 135 rpm. Posteriormente las muestras fueron procesadas y analizadas por SDS-PAGE e *immunoblotting*, empleando anticuerpos monoclonales específicos frente a IpaB e IpaC (cedidos por A. Phalipon, Institute Pasteur, Paris)
Para la obtención de vesículas de membrana externa (OMVs), *Shigella* fue incubada en TSB, a 37 ºC, en agitación a 125 rpm, durante 24 h. Las células fueron recogidas por centrifugación (6000g, 20 min) y lavadas con solución salina.
El sobrenadante se filtró con un sistema de filtración tangencial con un tamaño de poro de 300 kDa. La fracción retenida, que contenía las OMVs, se sometió a un proceso de congelación y descongelación a -20 ºC con objeto de promover la fusión y agregación de las vesículas. Éstas se recogieron por centrifugación a 40000 g, 1h.

Resultados y Discusión

Los métodos de extracción parecen ser eficaces para nuestro objetivo. La secreción de proteínas se optimizó al añadir al rojo congo, inductor del sistema de secreción tipo III (TTS3) de *Shigella*, una sal biliar, el DOC, que, aunque no es inductor del TTS3, favorece su secreción. Los distintos extractos antigénicos (Fig 1) fueron analizados mediante western blot frente a distintos sueros.
Los distintos extractos subcelulares inmunogénicos han sido encapsulados en nanopartículas de Gantrez. El Gantrez AN es un copolímero entre metil vinil éter y anhídrido maleico (PMV/MA)(Fig 2).

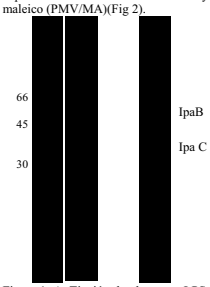


Figura 1. A. Tinción de plata para LPS y proteínas de la fracción de OMVs; B. Tinción plata para proteínas de extracción de proteínas ipa

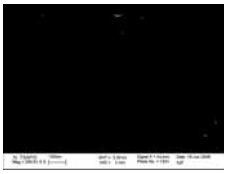


Figura 2. Micrografía SEM de nanopartículas de Gantrez.

Conclusiones

Los resultados preliminares han confirmado la afinidad del extracto de proteínas Ipa y de OMVs por el polímero y su efectiva encapsulación en las nanopartículas resultantes. En cualquier caso, es necesario profundizar en la caracterización físico-química de las formulaciones obtenidas así como en su evaluación biológica.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la "Asociación de amigos de la Universidad de Navarra"

Referencias

Schroeder GN. *Clin Microbiol Rev*. 21(1), 134-56 (2008)
Ogawa M. *Nat Rev Microbiol*. 6(1), 11-16 (2008)
Phalipon A., Sansonetti PJ *Immunol Cell Biol*. 85(2), 119-129 (2007)
(4)Gómez S. *J Nanosci Nanotechnol*. 6(9-10), 3283-9 (2006)
Sansonetti PJ. Ann N Y Acad Sci. 1072, 307-312 (2006)

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y DE LA PRESENCIA DE PVP EN LA LIBERACIÓN DE TEOFILINA A PARTIR DE COMPRIMIDOS MATRICIALES LIPÍDICOS.

M. M. Puebla González, M. V. Margarit Bellver, M. T. Marín Boscá.
Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
Email: mtmarin@ugr.es/ mdmpg@correo.ugr.es

Introducción: El Behenato de Glicerilo (Compritol®), material céreo utilizado como lubricante en comprimidos, se está utilizando últimamente como agente matricial para preparar comprimidos de liberación controlada [1-3].
En este estudio pretendemos evaluar el efecto de la presencia y cantidad de un agente acelerador de la disolución sobre la liberación de fármaco a partir de matrices lipídicas y sobre la erosión que sufren las distintas formulaciones.
También se investiga la influencia que tiene sobre estos aspectos, el tratamiento térmico de algunos comprimidos seleccionados, tras su elaboración.

Materiales y Métodos: Las formulaciones estudiadas se componen de los siguientes materiales: teofilina anhidra y lactosa proporcionadas por Guinama, Compritol® 888 ATO (C-888), PVP (Kollidon® 25) amablemente suministrados por Gattefossé S. A. y BASF, respectivamente; estearato magnésico (Est. Mg.) y talco adquiridos a través de Guinama S. A.
En la tabla 1 se recoge la composición de las formulaciones estudiadas.

Tabla 1. *Composición (mg) de las formulaciones estudiadas.*

Fórmulas / Materiales	A	B	C	D	E	F
Teofilina	**250**	**250**	**250**	**250**	**250**	**250**
Compritol ®	**60**	**60**	**60**	**60**	**60**	**60**
Lactosa	**160**	**160**	**110**	**110**	**10**	**10**
Kollidon®25	**--**	**--**	**50**	**50**	**150**	**150**
Talco	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Est. Mg.	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**

Se usa una cantidad de C-888 fija de 60mg como componente principal de las matrices.
Como acelerador de la disolución se estudia el Kollidon® 25 en porcentajes del 10 y 30%. El peso total de los comprimidos se mantiene constante en 500± 2mg.
Las mezclas se comprimen a 7 tons de presión durante 3 minutos usando una prensa hidráulica (Specac).
Cada formulación (A, C y D) se prepara por duplicado de forma que los comprimidos de las homólogas (B, D y F) se tratan térmicamente durante 30 minutos a 80ºC de temperatura. Después de sacar los comprimidos de la estufa se dejan enfriar a temperatura ambiente. Los ensayos de disolución se realizan al menos 24h después del tratamiento [4].
Éstos se llevan a cabo automáticamente usando el método II de paletas de la USP con 1000ml de tampón fosfato a un pH de 6.8 como medio de disolución. La temperatura se mantiene a 37ºC y la velocidad de las paletas a 100 rpm. Cada formulación se analiza por sextuplicado durante 8 horas. Las muestras se toman en intervalos de tiempo previamente determinados usando filtros de celulosa (1.0 µm). La concentración de fármaco se determina a una longitud de onda de 271 nm (Perkin Elmer lambda 2).
Los datos de disolución se ajustan a las ecuaciones cinéticas de Peppas, orden cero, primer orden e Higuchi.
Los ensayos de erosión se realizan manteniendo las mismas condiciones que para el estudio de disolución pero en este caso, las formulaciones se analizan por triplicado.
Los comprimidos se pesan antes del ensayo (P_0) y una vez alcanzado el peso constante (P_F) en estufa a 60ºC. Así se obtiene el porcentaje de comprimido erosionado E (%):

$$E(\%) = \left(\frac{P_0 - P_F}{P_0}\right) \times 100 \qquad \text{Ec. 1}$$

Resultados y discusión: Se procede a estudiar el efecto de la presencia de Kollidon® 25, así como del tratamiento térmico en la liberación de teofilina (fig. 1).

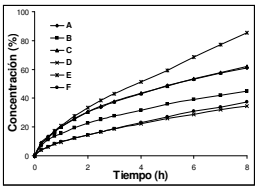


Figura 1. *Perfiles de liberación de teofilina desde matrices de C-888.*

Esta figura nos muestra que un 10% de Kollidon® es insuficiente para ver reflejadas modificaciones en la liberación de teofilina. Se advierte un aumento considerable en la liberación cuando el porcentaje de PVP en la formulación es del 30% (E). Por otro lado, la mayor proporción de Kollidon® en la formulación provoca una mayor variabilidad interindividual en las preparaciones, con desviaciones estándar que no se han reflejado gráficamente por solaparse unas con otras, dificultando su identificación.
El tratamiento térmico, en todos los casos estudiados (B, D y F), disminuye la liberación del fármaco a partir de la matriz, más acusada aún en el caso de las preparaciones formuladas con PVP, cuyos perfiles están situados por debajo incluso de la fórmula que no lo lleva (B).

Tabla 2. *Parámetros cinéticos.*

	Peppas		Primer Orden	Orden Cero	Higuchi
	n	r^2	r^2	r^2	r^2
A	0,553	0,999	0,982	0,933	0,999
B	0,526	0,996	0,964	0,927	0,999
C	0,579	0,997	0,984	0,936	0,998
D	0,618	0,999	0,986	0,969	0,991
E	0,677	0,999	0,972	0,979	0,983
F	0,651	0,999	0,993	0,980	0,984

Las formulaciones tratadas térmicamente presentan además una reducción en la variabilidad interindividual, más apreciable en aquellas que contienen Kollidon® en su composición. De los resultados obtenidos para el ajuste cinético (tabla 2), las formulaciones que más se aproximan a una cinética de orden 0 son las que contienen el porcentaje más alto de PVP.
Aún así, todas las preparaciones estudiadas se ajustan, con un coeficiente de correlación más alto, a la cinética propuesta por Higuchi, lo cual sugiere que el mecanismo principal de liberación de teofilina en nuestro estudio ha sido vía difusión controlada. La excepción radica en la fórmula F, con un 30% de Kollidon® y tratada térmicamente, que se ajusta más a una cinética de primer orden. El estudio de erosión señala cómo a mayor proporción de PVP, el grado de erosión es mayor. Por el contrario, el tratamiento térmico, en todos los casos, reduce el efecto de la erosión durante la disolución (Fig 2).

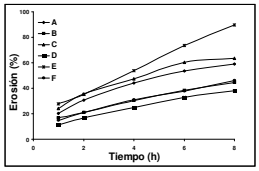


Figura 2.*Grado de erosión de las formulaciones estudiadas*

Conclusiones:
- Al añadir Kollidon® en un porcentaje del 30% queda patente un aumento considerable en la liberación de teofilina.
- El tratamiento térmico reduce la liberación de teofilina en todos los casos, así como el grado de erosión de los comprimidos y la variabilidad interindividual de las fórmulas.

Bibliografía:
[1] A. A. Obaidat, R. M. Obaidat. (2001). Eur. J. Pharm. Biopharm., 52, 231-235.
[2] M. Özyazici, E. H. Gökçe, G. Ertan. (2006). Eur. J. Pharm. Biopharm., 63, 331-339.
[3] Feng-Qian Li et al. (2006). Int. J. Pharm., 324, 152-157.
[4] Y. Zhang, J. B. Schwartz. (2000). Drug Dev. Ind. Pharm., 26, 7, 761-765.

APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS COMO MÉTODO DE ESTABILIZACIÓN DE GELES NATURALES DE A. VERA L.

Hernández, B.[1], Llabrés, M.[1], Fariña, J.B.[1], Pagán, R.[2]., Somolinos, M.

[1] Depart. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna; [2] Depart. Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Introducción: En la actualidad, la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HHP; High Hydrostatic Pressure) se emplea para incrementar la estabilidad y conservación de alimentos de distinta naturaleza. Esta técnica que podría ser de gran utilidad como tratamiento de estabilización de geles de Aloe, no se ha descrito en la literatura con este fin específico. La conservación de los geles de Aloe se ve comprometida por su baja estabilidad física y química, siendo los principales factores de su degradación, la contaminación microbiana y la oxidación enzimática endógena.

Las HHP permiten minimizar la alteración, gracias a su capacidad de inactivar microorganismos contaminantes y enzimas endógenos, sin necesidad de un aumento de temperatura ni de la adición de conservantes químicos (1).
El objetivo de este trabajo es estabilizar geles de aloe a través de la inactivación de 4 microorganismos (*Listeria monocytogenes, E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica)* y observar el comportamiento reológico de los geles tratados.

Materiales y Métodos: Se utilizaron hojas de Aloe vera L. a las que se extrajo el gel incoloro por corte y extrusión mecánica. El material testigo está depositado en el Herbario de la Universidad de La Laguna con referencia TFC 47.792.
Se utilizaron ácidos L-ascórbico y cítrico (Panreac) como agentes coadyuvantes en el tratamiento por HHP, por sus respectivas propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En función del diseño experimental, se emplearon a unas concentraciones de 0,05% y 0,2% (v/v).
Tratamiento HHP: Esta tecnología se basa en el tratamiento de materiales a presiones entre 100 y 1.000 MPa, utilizando el agua como medio de transmisión de dicha presión. Para este estudio se utilizó un equipo HHP del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA - Navarra), aplicando una presión de 300 y 500 MPa, y un tiempo de aplicación de 5 y 20 minutos.
Inactivación microbiana: Se estimó a través del recuento de células viables y para ello las muestras se diluyeron en 0,1% agua de peptona y 0,1 ml se vertió en una placa agar (TSA) con 0,6% de extracto de levadura (YE). Se incubaron a 37ºC durante 24 horas (*E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica)* y 48 horas *(L. monocytogenes).*
Reología: La caracterización reológica se realizó utilizando un Reómetro Bohlin CS (*Bohlin Instrument Inc., Cranbury, NJ*) equipado con plato Peltier y una geometría tipo plato-plato, con una dimensión de 40 mm. Se utilizó aproximadamente un volumen de 1 ml por análisis, a una temperatura constante de 20ºC. Se realizaron barridos de frecuencia de 0,01-8 Hz a una fuerza de cizalla constante. Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico R2.6.1® (*Auckland, USA).*
Se estimó el ángulo de fase (delta o δ), que es un parámetro útil para describir la distribución de la masa molecular de los polímeros que constituyen el gel y el comportamiento dinámico que presenta. Se define como la correlación entre el módulo viscoso (G´´) y el módulo elástico (G´) (3):

$$\delta = \text{arctg}\,(G''/G')$$

A medida que aumenta el valor de delta (expresado en grados), se va perdiendo la contribución elástica del material.
Diseño experimental: Para la búsqueda del tratamiento óptimo se empleó un diseño de matriz cuadrada de Hadamard (2), en la que se hacen participar tres factores (presión, tiempo y concentración de estabilizantes; **Tabla 1**) conjugándolos a dos niveles (+1 y -1; superior e inferior), donde cada fila representa cada uno de los tratamientos y las columnas definen los valores de presión, tiempo y concentración, respectivamente.

Tabla 1. Diseño de una matriz Hadamard 4x4.

1	1	1	1
1	-1	1	-1
1	1	-1	-1
1	-1	-1	1

Resultados y Discusión: En la **Tabla 2** se recogen los datos de la inactivación microbiana resultante del tratamiento por HHP. Los resultados del recuento se expresan en ufc/ml de la microflora natural que contamina el aloe recién extraído, antes (muestras de referencia a las dos concentraciones empleadas) y después del tratamiento (cuatro tratamientos resultantes del diseño), donde: x, es el número de tratamiento (1 a 4; R: referencia); p (MPa) es la presión hidrostática aplicada: t (min) es el tiempo de aplicación; c, es la concentración de los ácidos en porcentaje y ucf/ml son las unidades formadoras de colonia por mililitro.

Tabla 2. *Recuento ucf/ml de inactivación microbiana en geles de aloe tratados por HHP.*

x	p (MPa)	t (min)	c (%)	ucf/ml
1	500	20	0,2	$< 3{,}0.10^2$
2	500	5	0,05	$< 3{,}0.10^2$
3	300	20	0,05	$< 3{,}0.10^2$
4	300	5	0,2	$< 3{,}0.10^2$
R	-	-	0,2	$7{,}1.10^2$
R	-	-	0,05	$2{,}0.10^3$

Todos los tratamientos por altas presiones hidrostáticas produjeron la misma inactivación de la flora microbiana inicial de los geles de aloe. Sin embargo, se observaron diferencias entre las muestras tratadas y las muestras de referencia. Entre estas últimas se detecta una mayor inactivación cuanto mayor es la concentración de los estabilizantes.
Para el estudio del comportamiento reológico se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) del efecto HHP sobre el ángulo de fase, que se muestra en la **Tabla 3.** Se aprecia que la presurización y la adición de estabilizantes afectan de forma significativa (F<0.05) al comportamiento dinámico de las muestras, independientemente del tiempo durante el cual se aplica dicha presión.

Tabla 3. *Análisis ANOVA de los datos de δ de las muestras tratadas por HHP a una frecuencia de 0,1 Hz. Pr (>F): nivel de significatividad de cada factor.*

Factor	Pr (>F)
c (%)	0.02797*
t (min)	0.05924
p (Mpa)	0.04831*

En la **Figura 1** se representa la influencia del tratamiento por HHP para cada una de las muestras y se observa que la aplicación del nivel superior de los factores implicados afecta en mayor medida al ángulo de fase. Este parámetro aumenta considerablemente después del tratamiento, con la consecuente pérdida del componente elástico (G´´>G´) y predominio del comportamiento viscoso. Es decir, las muestras tras la aplicación de esta tecnología pierden, en cierta medida, su naturaleza viscoelástica inicial.

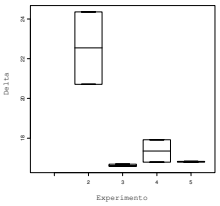


Figura 1. Representación de la influencia del tratamiento por HHP sobre el ángulo de fase a una frecuencia de 0,1 Hz. Los tratamientos 2-5 se corresponden con 1-4 de la Tabla 1.

Conclusiones: La aplicación de altas presiones a muestras de geles de Aloe provoca una reducción significativa de la flora inicial microbiana en comparación con las muestras de referencia, por lo que se confirma la capacidad de inactivación de al menos uno de los factores alterantes.

Con respecto al estudio reológico, se deduce que los mayores niveles de tratamiento provocan una mayor influencia sobre la viscoelasticidad inicial, debido en parte a la desestructuración de polisacáridos presentes en la composición química de los geles de Aloe. Será necesario optimizar las condiciones del tratamiento por HHP para lograr un nivel de inactivación microbiana similar y causar la mínima alteración posible de la estructura inicial del gel.

Bibliografía:
(1) Raventós, M. Industria alimentaria. Tecnologías emergentes. UPC Eds. Barcelona. 2005.
(2) Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. Pharmaceutical Experimental Design; New York, 1999.
(3) Steffe J.F. Rheological Methods in Food Process Engineering, 2nd ed.; East Lansing, MI, 1996.

DESARROLLO DE COLOIDES MAGNÉTICOS DE ETILCELULOSA PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS ANTITUMORALES

M. López-Viota, J.L. Arias, V. Gallardo, M.A. Ruiz
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja, s/n. 18071 Granada
e-mail: vglara@ugr.es

Introducción
El objetivo principal de las técnicas de transporte activo ("active targeting") en el campo de la terapia antitumoral es lograr que la dosis de agente antineoplásico administrada se localice exclusivamente en el tejido tumoral. De esta manera, se logra mejorar la eficacia antitumoral y el perfil farmacocinético del quimioterápico y, además, la incidencia de efectos adversos asociados al tratamiento es mínima o nula. Las estrategias de "active targeting" también permiten revertir los fenómenos de resistencia a fármacos que suele presenta el tejido tumoral. Entre estas técnicas destacan: la funcionalización superficial del sistema transportador con bioligandos específicos de las células cancerosas (conjugación con aptámeros, folatos, integrinas, péptidos, etc.), y el diseño de materiales con capacidad de respuesta a estímulos (sensibilidad a cambios de pH o de temperatura, etc.) (1, 2). Dentro de esta última estrategia, una propuesta muy prometedora es el diseño de materiales con capacidad para responder a campos magnéticos (3, 4).
En este trabajo describimos la preparación y caracterización fisicoquímica de coloides magnéticos de etilcelulosa (EC) cargados con 5-fluorouracilo (5-FU). Nos centramos en el análisis de los parámetros que determinan la vehiculización de 5-FU, así como la contribución de cada unos de los materiales que componen el sistema coloidal propuesto. Finalmente, investigamos los factores determinantes del perfil de liberación *in vitro*.

Materiales y Métodos
Materiales
Los reactivos son de calidad analítica (Panreac, España), excepto el 5-FU (Sigma-Aldrich, Alemania), el polímero etilcelulosa (9004-57-3, ICN Biomedical Inc., EE.UU.) y el hierro carbonilo (Fe^0) (BASF, Alemania). El agua utilizada fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, Francia).
Preparación de los sistemas coloidales
Las partículas de Fe^0 (550 ± 150 nm) se seleccionaron mediante separación por gravedad (5). La síntesis de las partículas de EC (350 ± 250 nm) y de Fe^0/EC (600 ± 150 nm; Figura 1) se realizó mediante un método de emulsificación previamente descrito (6). En el caso de las partículas de Fe^0/EC, la EC se disolvió en una mezcla etanol:benceno (15:85). Esta fase orgánica se emulsionó a 60 ºC en una suspensión acuosa de Fe^0 (94 mL) que contenía LSNa [0.125 % (p/v)] y PEG 4000 [0.375 % (p/v)]. La emulsión y la subsiguiente evaporación total de disolventes se realizaron bajo agitación mecánica (8000 rpm). La limpieza de las partículas se realizó mediante separación magnética y redispersión de los sedimentos en agua.

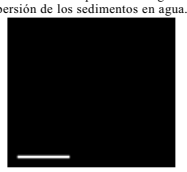


Fig. 1. *Microfotografía HRTEM de campo oscuro de las nanopartículas compuestas (Fe^0/EC). El recubrimiento de EC aparece en blanco. Longitud de barra: 500 nm.*

Estudio de la vehiculización de 5-FU y su liberación *in vitro*
La vehiculización de 5-FU se estudió empleando dos procedimientos: adsorción superficial en partículas preformadas (Fe^0, EC y Fe^0/EC) y, absorción o incorporación en la matriz de los coloides (EC y Fe^0/EC) mediante la adición del fármaco en el medio de emulsión antes de la formación de las partículas. Mediante un método espectrofotométrico validado (λ = 276 nm; ε = 9795 ± 240 $L{\cdot}mol^{-1}{\cdot}cm^{-1}$) se determinó por triplicado la vehiculización de 5-FU y su liberación (37.0 ± 0.5 ºC; solución buffer $NaOH\text{-}KH_2PO_4$ de pH = 7.4; condiciones *sink*) desde los coloides diseñados (7). La adsorción de 5-FU también se evaluó cualitativamente mediante determinaciones electrocinéticas (7).

Resultados y Discusión
Adsorción de 5-FU
En todos los sistemas, la eficiencia del proceso de adsorción se incrementa al aumentar la concentración de antitumoral en solución (Figura 2a). En concreto, la cantidad máxima adsorbida por el Fe^0, el látex de EC y

las partículas compuestas es 24.5 ± 3.3 μmol/m^2, 48.3 ± 4.1 μmol/m^2 y 45.2 ± 4.6 μmol/m^2, respectivamente. Como puede apreciarse, se sugiere la saturación de este proceso a concentraciones superiores a las ensayadas. La electroforesis confirma el proceso de adsorción, el cuál es muy inferior en el caso del Fe^0 (Figura 2b).

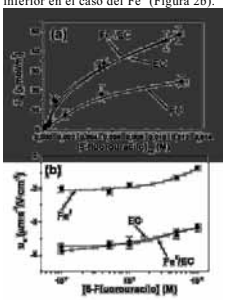


Fig. 2. *Densidad de adsorción de 5-FU (a) y movilidad electroforética de los coloides (b) en función de la [5-FU].*

Absorción de 5-FU

En la Figura 3 se aprecia cómo la absorción aumenta con la concentración de fármaco, sugiriéndose una tendencia a la saturación para concentraciones superiores.

Fig. 3. *Densidad de absorción de 5-FU en función de la [5-FU] en el equilibrio.*

Los resultados obtenidos mejoran los alcanzados con el procedimiento de adsorción. Además, la vehiculización es superior en las partículas de Fe^0/EC (hasta 143 ± 5 μmol/g) en comparación con las de EC (hasta 102 ± 6 μmol/g), hecho que atribuimos a que los núcleos magnéticos utilizados en la obtención de las nanopartículas compuestas ya tienen fármaco adsorbido en su superficie.

Liberación *in vitro* de 5-FU

La Figura 4 muestra que el proceso de liberación de 5-FU es bifásico: una fase de liberación rápida (pérdida del 5-FU asociado a la superficie), seguida de una fase de liberación más lenta atribuible a la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica. La liberación desde las partículas de Fe^0/EC se realiza de una forma algo más lenta (≈ 75 % en las primeras 24 horas y el 25 % restante en las siguientes 48 horas). Esto puede explicarse si consideramos que parte del antitumoral está ya adsorbido en el Fe^0 cuando se forma el recubrimiento de látex sobre éste. Así, el fármaco localizado en la superficie de los núcleos magnéticos debe difundir a través de la cubierta polimérica para poder salir al exterior, lo que ralentiza el proceso de cesión de 5-FU.

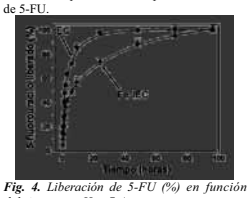


Fig. 4. *Liberación de 5-FU (%) en función del tiempo a pH = 7.4.*

Conclusiones

Se han identificado las condiciones ideales para síntetizar nanopartículas magnéticas (Fe^0/EC) con capacidad para transportar 5-FU y adecuadas para la vía parenteral. El proceso de absorción permite una mayor incorporación de 5-FU en comparación con la adsorción.

Bibliografía

(1) Vauthier, C., et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 519-548. 2003.
(2) Jahr-Milanc, L.S., et al. Cancer Treat. Rev. 34, 592-602. 2008.
(3) Durán, J.D.G., et al. J. Pharm. Sci. 97, 2948-2983. 2008.
(4) Arias, J.L., et al. Langmuir 24, 7512-7519. 2008.
(5) Arias, J.L., et al. J. Colloid Interface Sci. 299, 599-607. 2006.
(6) Arias, J.L., et al. Int. J. Pharm. 339, 237-245. 2007.
(7) Arias, J.L., et al. Eur. J. Pharm. Sci. 33, 252-261. 2008.

PREPARACIÓN DE SISTEMAS COLOIDALES POLIMÉRICOS COMO VEHÍCULOS DEL ALCALOIDE CANTHIN-6-ONE

G. Cebrián[1], J.L. Arias[2], E. Poupon[1], M.A. Ruiz[2]
[1]Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8076 BioCIS, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France.
[2]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja, s/n. 18071 Granada
e-mail: jlarias@ugr.es

Introducción

Los poli(alquilcianoacrilatos) (PACA)s son una familia de polímeros muy utilizada en Biomedicina como material embolítico, pegamento quirúrgico o adhesivo de tejidos. Las nanopartículas de PACA presentan multitud de aplicaciones como sistemas transportadores de fármacos, con diferentes dianas y vías de administración. Actualmente, han adquirido especial interés en el tratamiento del cáncer y se encuentran en fase de investigación clínica (1, 2).

La canthin-6-one ($C_{14}H_8N_2O$; Figura 1) es un alcaloide de origen natural que pertenece al grupo de la *β*-carbolina y que presenta la peculiaridad de tener un ciclo D adicional en su estructura (3, 4). Este alcaloide se caracteriza por presentar una baja toxicidad y una notable actividad antifúngica, parasiticida (anti-tripanosoma y leishmanicida) y antibacteriana (5-7). Sin embargo, su elevada lipofilia limita una posible utilización más amplia en terapéutica.

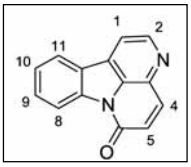


Fig. 1. *Estructura química de la canthin-6-one.*

En el presente trabajo investigamos el diseño de nanopartículas de poli(octilcianoacrilato) (POCA) como sistema de transporte de la canthin-6-one, con el objetivo de mejorar su formulación y, de este modo, su biodisponibilidad y efecto terapéutico. En este estudio preliminar nos centramos en el diseño de una metodología adecuada de preparación, así como en el análisis del tipo de vehiculización de este alcaloide en las partículas poliméricas.

Materiales y Métodos

Materiales

Los reactivos empleados son de calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania), excepto el monómero octilcianoacrilato (regalo de Henkel Loctite, Irlanda). El agua utilizada fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, Francia).

Síntesis química de la canthin-6-one

La síntesis total de la canthin-6-one comienza con una reacción entre triptamina y anhídrido succínico en CH_2Cl_2 y a temperatura ambiente. A continuación, la triptamida obtenida se esterifica mediante catálisis por Amberlist H-15 en MeOH, generándose así un metiléster. El tratamiento de la amida con $POCl_3$ en benceno y a reflujo durante 2 horas, origina la ciclación y formación de una imina. La etapa final de la síntesis es una ciclación intramolecular, mediante la reacción de Bischer-Napierlaski. Este paso se realiza al exponer a la imina a una base fuerte (ej., diazabicicloundeceno) en CH_2Cl_2 y a temperatura ambiente, obteniéndose así la canthin-6-one (rendimiento = 60 %) (5).

Síntesis de las partículas poliméricas cargadas con canthin-6-one

La síntesis de nanoesferas de POCA se realizó mediante el método de polimerización en emulsión del monómero correspondiente (8). Brevemente, se añade el octilcianoacrilato [1 % (p/v)] disuelto en 2 mL de acetona, bajo agitación mecánica, a 50 mL de una fase acuosa 10^{-4} N de HCl y con un 1 % (p/v) de Pluronic® F-68. Tras 3 horas, se neutraliza con cantidad suficiente de KOH. La síntesis de las partículas cargadas con este alcaloide se realiza de igual forma, con la única diferencia de que en la solución acetónica de monómero también se encuentra la canthin-6-one disuelta (4 p. octilcianoacrilato *vs*. 3 p. canthin-6-one).

Caracterización fisicoquímica del sistema transportador polimérico

La determinación del tamaño de partícula se realizó a temperatura ambiente y mediante scattering de luz cuasi-elástico (QELS) (Nanosizer, Coulter N4MD, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL). El ángulo seleccionado fue de 90 º y las suspensiones

preparadas [≈ 0.1% (p/v)] fueron sonicadas durante 5 minutos previamente.

Para la determinación cualitativa de la vehiculización del alcaloide, se analizó el espectro de ^{1}H-RMN (Broker AM-300, EE.UU.) obtenido utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO D6; Euriso-top® S.A., Francia).

Finalmente, la caracterización preliminar del tipo de vehiculación del alcaloide en las partículas de POCA (adsorción/absorción) consistió en la determinación de las propiedades eléctricas superficiales de las partículas y su dependencia del pH, mediante electroforesis (8).

Resultados y Discusión

El tamaño medio de las partículas de POCA es 150 ± 45 nm (IP: 0.160), mientras que en las partículas cargadas con el alcaloide es 200 ± 75 nm (IP: 0.282). El aumento de tamaño puede ser debido a la vehiculización de la canthin-6-one.

En la Figura 2 puede apreciarse el espectro de ^{1}H-RMN de las nanopartículas de POCA con canthin-6-one vehiculizada. La presencia de las bandas características del alcaloide [δ: 8.59 ppm (^{1}H, *d*, H-2), 8.55 ppm (^{1}H, *d*, H-8), 8.42 ppm (^{1}H, *d*, H-11), 8.34 ppm (^{1}H, *d*, H-4), 8.17 ppm (^{1}H, *d*, H-1), 7.82 ppm (^{1}H, *t*, H-9), 7.62 ppm (^{1}H, *t*, H-10), 7.02 ppm (^{1}H, *d*, H-5)] en el espectro del polímero, demuestra cualitativamente la eficacia de la vehiculización.

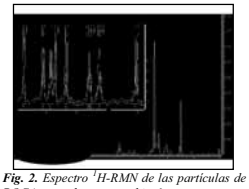


Fig. 2. *Espectro ^{1}H-RMN de las partículas de POCA cargadas con canthin-6-one.*

La Figura 3 muestra los valores de potencial zeta en función del pH, en presencia de NaCl 10^{-3} M. Las partículas de POCA presentan una carga superficial neta negativa en todo el intervalo de pHs estudiado (de 4 a 9), y sólo los datos sugieren la presencia del punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero a pHs < 4. Como se aprecia, no existe diferencia alguna entre las propiedades eléctricas superficiales de las partículas poliméricas que carecen de alcaloide vehiculizado y de las partículas que lo incorporan. Esto nos hace concluir, de forma preliminar, que la canthin-6-one se encuentra absorbida en el interior del coloide polimérico.

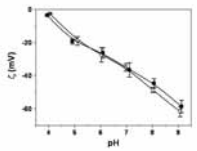


Fig. 3. *Potencial zeta de las nanopartículas de POCA en función del pH (Fi cte = 10^{-3} M NaCl).*

Conclusiones

Se han identificado las condiciones ideales para la preparación de un sistema coloidal polimérico que permite la vehiculización del alcaloide canthin-6-one. El tamaño de partícula se ve afectado por la incorporación de la biomolécula. El espectro de ^{1}H-RMN y la caracterización electrocinética del coloide apuntan efectivamente a que el alcaloide se incorpora en las partículas a nivel de la matriz, mediante un proceso de absorción. Este trabajo abre las puertas al desarrollo de sistemas transportadores de la canthin-6-one y sus derivados.

Bibliografía

(1) Arias, J.L., et al. Colloids Surf. B: Biointerfaces 62, 64-70. 2008.
(2) Vauthier, C., et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 519-548. 2003.
(3) Ma, Z., et al. J. Phytochemistry 53, 1075-1078. 2000.
(4) Bröckelman, M., et al. Eur. J. Org. Chem. 23, 4856-4863. 2004.
(5) Soriano-Agaton, F., et al. J. Nat. Prod. 68, 1581-1587. 2005.
(6) Ferreira, M.E., et al. J. Ethnopharmacol. 109, 258-263. 2007.
(7) O´Donnell, G., Gibbons, S. Phytother. Res. 21, 653-657. 2007.
(8) Arias, J.L., et al. Int. J. Pharm. 337, 282-290. 2007.

CHARACTERIZATION OF OCULAR INSERTS BASED ON SODIUM HYALURONATE/HYDROXYPROPYLMETHYLCELLULOSE.

M. Cabrioulu [1,2], S. Mura [1,2], V. Merino[1], M. Merino-Sanjuán[1], A. Nácher[1], M. Manconi[2], A. M. Fadda[2], O. Díez-Sales[1]
[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, Burjassot, Valencia, España 46100.
[2] Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, University of Cagliari, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari. Italy.

Introduction

Traditional topical ophthalmic formulations such as aqueous eye drops ensure poor drug bioavailability due to several processes such as a rapid precorneal drug elimination. Moreover, traditional eye drop administration also shows a poor patient compliance. Consequently, several novel ophthalmic drug delivery systems have been developed (1). Recently, ocular inserts of various ophthalmic drugs were reported to improve poor ocular drug bioavailability. In particular, prolonged delivery of drugs to the eye offers several advantages over the conventional ocular therapies. Indeed, controlled release ocular inserts can deliver an effective drug amount to the eye for an extended period of time (2).

The aim of the study was to develop an ocular film for the ophthalmic controlled delivery of diclofenac.

Materials and Methods

Preparation of inserts: Aqueous dispersions of Sodium Hyaluronate (HA) and Hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC) were prepared by using the following HA/HPMC w/w ratios: 25:75 (Film I), 50:50 (Film II) and 75:25 (Film III). Diclofenac was dispersed in the mixtures to obtain, in all cases, a 0.1% (w/w) drug concentration. To obtain films, 36 g of the solutions were poured into rectangular glass plates (8x8 cm). The dispersions were dried overnight to constant weight. Films were stored at 20º C and a relative humidity (RH) of 65%. Thickness of the films was determined using a micrometer. Reported values are an average of 6 measurements for each film.

Rheometric measurements: A Haake Rheostress 1 rheometer (Thermo Haake, Germany) with data acquisition software (RheoWin 2.94) and a circulator for sample temperature control was used. Samples were allowed to rest for at least 300 s prior to analysis. In all cases, the exposed edges of the sample were covered with silicone oil (Dimethicone RFE / Ph. Eur.) to prevent evaporation of water during measurements. All measurements were made in triplicate at 32ºC. The formulations were subjected to viscosity measurements after mixing with lachrymal fluid to assess the dilution action of the tears in vivo. The flow curves were carried out using a cone-plate (2º, 35 mm diameter). Steady-state flow curves were obtained working in controlled stress mode. Different ranges of shear stresses, in logarithmic distribution, were used in order to obtain shear rates between 0.1 and 1000 s^{-1}, approximately. This variation in viscosity with shear rate was fitted with the simplified Carreau´ model (3).

$$\eta = \frac{\eta_o}{\left[1+\left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^2\right]^{\frac{1-n}{2}}}$$

where η_o is the zero-shear viscosity (Pa s), the constant viscosity in the lower Newtonian plateau; $\dot{\gamma}_c$ is the critical shear rate corresponding to the transition from Newtonian to shear-thinning behavior (s^{-1}); c is equal to (1-n)/2 and n is a dimensionless constant that corresponds to the power law index or flow index.

In vitro permeation studies: Excised cornea from the bovine eye was used for the determination of in vitro corneal permeability. Franz diffusion cells were used. Receiver chamber contained phosphate buffered saline pH 7.4, in all cases. Samples were analyzed using a Waters HPLC-UV system at a wavelength of 280 nm (4).The apparent corneal permeability coefficient (P_{app}, cm/h) was determined using the expression:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot A \cdot C_o}$$

where Q is the total amount permeated at time t, $\Delta Q/\Delta t$ is the steady-state slope of the linear portion of the plot for the amount of the drug in the receiving chamber (Q) versus time (t), A is the exposed corneal surface (0.78 cm^2) and C_o is the initial concentration of the drug in the donor cell.

Results and discussion

Homogeneous, flexible and transparent films were obtained from the prepared solutions. All films were easily removed from the cast plate and no pores or cracks were detected. Thickness of films varied from 92.7 ± 8.9 (Film I) to 95.3 ± 9.1 (Film II) to 99.5 ± 10.2 μm (Film III).

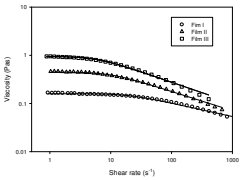


Fig. 1. *E*ffect of shear rate on shear viscosity of HA/HPMC films.

The flow curves, which show viscosity as a function of the shear rate, are reported in Fig.1 for the three studied formulations. The viscosity decreased by increasing the shear rate, that is, these systems showed a shear thinning or a pseudoplastic behaviour. The Films I presents ηo values (0.165±0.001) lower than the Film II (0.556±0.003) and Film III (0.981±0.006). Therefore, the viscosity increased as a function of the HA amount.

The transcorneal permeation profiles of diclofenac are shown in Fig. 2. Results indicate that the Film I presented the highest drug penetration rate across the cornea and that the incorporation of growing quantities of HA into the film systems reduced the drug permeation capacity. Permeation coefficient values calculated for each formulation confirmed these results: Film I (0.271±0.014), Film II (0.119±0.003) and Film III (0.033±0.003). These results could be explained as the consequence of the increased film viscosity as HA concentration increased.

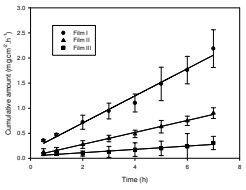


Fig. 2. Permeation of diclofenac through excised cornea from the bovine eye. Errors bars represent standard deviations based on four experiments.

Conclusions

HA/HPMC films showed the capability to control diclofenac transcorneal permeation rate in vitro. Moreover, the drug permeation rate was affected by the HA concentration in the film: the higher the concentration the slower the permeation. Therefore, these preliminary results indicate that HA/HPMC in appropriate ratio can be used as drug controlled delivery systems for topical ocular administration.

References

1. Hornof M. et al., J. Control. Rel. 89: 419-428 (2003).
2) Kawakami S et al., J. Contol. Rel 76: 255-263 (2001).
3) Corrias F. et al., J. Appl. Polym. Sci. 110 : 1225-1235 (2008).
4) Riegel M., Ellis PP., J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 654 (1): 140-5 81994).

Acknowledgement

The authors thank the Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència (Valencian Generalitat) for the financial support (GV2008-237).

MICROENCAPSULATION OF PURIFIED HUMAN BIOACTIVE RECOMBINANT GDNF

E. Ansorena[1], E. Garbayo[1], J.L. Lanciego[2], M.S. Aymerich[2], M.J. Blanco-Prieto[1]
[(1)] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. University of Navarra. Pamplona. Navarra
[(2)] Neuromorphology-Tracing Lab. CIMA. University of Navarra. Pamplona. Navarra.
eansorena@unav.es

Introduction

Parkinson´s disease (PD) is one of the main neurodegenerating disorders affecting old people. PD is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the susbtantia nigra compacta, leading to an impairment of the nigrostriatal pathway, which is responsible for the abnormal motor behavior of these patients (1). The mainstay treatment is L-Dopa, but as the disease progress, patients become less responsive to L-Dopa and develop motor side effects. No currently available treatment alters the progressive neurodegenerative course of PD.

A promising strategy for the treatment of PD is the use of neurotrophic factors that could protect the remaining dopaminergic cells or even regenerate them in order to reverse the neurodegenerative process. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) is considered to be one of the strongest neuroprotectants specific for dopaminergic neurons. Based on the successful results in animal experiments, phase I clinical trials were performed with a very promising effect (2,3). Although further studies are needed, the delivery issue remains unsolved.

The aim of this work was to develop a procedure for the purification of human bioactive glycosylated GDNF and its posterior microencapsulation in PLGA microparticles for the treatment of PD.

Materials and Methods

The hGDNF secreting cell line MDX-12 was kindly provided by professor Patrick Aebischer (EPFL, Lausanne, Switzerland). These cells were cultured in DMEM GlutaMAXTM-I containing 10% foetal bovine serum. When the cells reached 80% confluence, they were washed with PBS and exposed to fresh serum-free medium. The conditioned medium was collected for the purification of the recombinant hGDNF.

The secreted protein was purified by several chromatography steps as follows:

Purification

1. Cation-Exchange Chromatography

The pH of the culture conditioned medium were adjusted to 8,2 and filtered. The sample passed through a XK 16/20 column packed with SP Sepharose™ Fast Flow, using a peristaltic pump. The protein was eluted using a linear salt gradient from 150 mM to 1M NaCl in 10 mM phosphate buffer, 5 mM EDTA, pH 8,2. The fractions obtained were analyzed by SDS-PAGE followed by Western Blot (Fig. 1A). The presence of other proteins in the sample was determined by staining the SDS-PAGE gel with coomassie blue (Fig. 1A). Those fractions enriched in GDNF and presenting low levels of other protein contaminants were passed though the same chromatography column under the same conditions. The purity of the fractions obtained was also analyzed by commassie blue (Fig. 2).

2. Gel Filtration Chromatography

A size-exclusion chromatography using the prepacked column SuperdexTM 200 HR 10/30 with an ÄKTA purifier 10, was finally performed. (Fig. 3)

Biological activity

A neuronal cell bioassay based on the ability of the protein to induce the differentiation of PC12 cells to a neural phenotype was developed to confirm the activity of the purified recombinant protein. (Fig. 4)

hGDNF microencapsulation

PLGA microparticles were prepared by the solvent evaporation method after the formation of a multiple emulsion $W_1/O/W_2$ by TROMS (4) (Total Recirculation One Machine System). The mean particle size was analyzed by laser diffractometry, and the encapsulating efficiency was measured by ELISA (GDNF Emax Immunoassay System Promega). GDNF encapsulation was determined by dissolving the MP in dimethyl sulfoxide and the amount of neurotrophic factor entrapped into the particles was measured by ELISA. *In vitro* release studies were performed at 37 ºC under horizontal agitation during 2 months. For this purpose, the particles were dispersed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and gently shaken. At different times, samples were centrifuged and protein in the supernatant was quantified by ELISA.

Results and Discussion:

Purification

1. Cation Exchange Chromatography

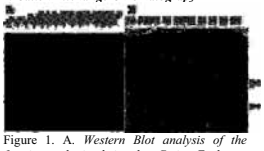


Figure 1. A. *Western Blot analysis of the fractions obtained in the Cation-Exchange Chromatography.* ***B****. SDS-PAGE stained with coomassie blue. Black arrow shows GDNF. White arrow shows IGFBP7.*

Western Blot analysis of the fractions obtained in the first cation-exchange chromatography determined those in which hGDNF had eluted (Fig. 1A). A coomassie blue stain of the gel (Fig. 1B) revealed the presence in the sample of another protein with a predominant expression, identified as IGFBP7 by mass spectrometry.

Figure 2. *SDS-PAGE stained with coomassie blue of the second cation exchange chromatography. Black arrow shows GDNF. White arrow shows IGFBP7.*

The second cation-exchange chromatography (Fig. 2) reduced the amount of IGFB7 in the sample.

2. Gel Filtration Chromatography

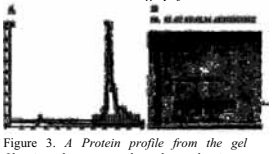


Figure 3. *A Protein profile from the gel filtration chromatography column showing a major peak that corresponds to the fractions containing GDNF.* ***B*** *SDS-PAGE stained with coomassie blue of the fraction indicated. Black arrow shows GDNF.*

The SDS-PAGE stained with coomassie (Fig. 3), demonstrated that this technique was able to discriminate between IGFBP7 and the dimmer of hGDNF obtaining a highly pure recombinant protein.

Biological activity

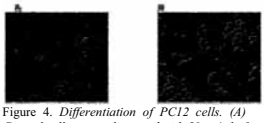


Figure 4. *Differentiation of PC12 cells. (A) Control cells or supplemented with 50 ng/ml of purified GDNF (B).*

We assayed the ability of purified GDNF to induce neurite outgrowth from PC12 cells. As shown in Figure 4, control cells (A) displayed a typical undifferentiated morphology. In contrast, striking neurite outgrowth was observed in cultures treated with 50 ng/ml of mammalian cell-derived hGDNF (B) at day 7.

hGDNF microencapsulation

hGDNF loaded PLGA microparticles prepared with TROMS presented a mean particle size of around 30 m, which is totally compatible with stereotaxic implantation. The drug entrapment efficiency was more than 70 %, and the in vitro release kinetics showed a controlled release of the protein over 2 months, releasing after 60 days 100 % of the entrapped hGDNF.

Conclusions:

1. A procedure for the purification of highly pure human recombinant bioactive glycosylated GDNF has been developed.
2. hGDNF loaded PLGA microparticles were successfully developed by TROMS.
3. Particles showed an efficient protein loading, had a suitable size for their administration into the brain and presented a controlled release of hGDNF.

References:

1. Garbayo E *et al* 2007. *Int J Pharm.* Nov 1;344(1-2):9-15.
2. Gill SS *et al* 2003. *Nat Med.* 2003 May;9(5):589-95.
3. Slevin JT *et al* 2005. *J Neurosurg.* Feb;102(2):216-22
4. Garbayo E *et al* 2008. *Eur J Pharm Biopharm* Aug;69(3):844-51

Acknowledgements: Fundación Caja Navarra and Fundación MAPFRE-Medicina. Government of Navarra, (Departments of Health and Education).

ESTUDIO PRELIMINAR DE ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE UNA MEZCLA INTRAVENOSA PARACETAMOL-TRAMADOL

V. Merino-Bohórquez[2], M.J.Cózar-Bernal[1], S. Salas[1], J. Alvarez-Fuentes[1], M. Cameán[2], M. D. Guerrero[2], M.A. Holgado[1], M. Fernández-Arévalo[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España
[2]Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

Introducción. El control del dolor postoperatorio debe de estar vinculado en primera instancia a brindar una mejor calidad de atención hospitalaria lo que implica un adecuado tratamiento. La deficiencia o ausencia de analgesia va a producir efectos negativos en el paciente a nivel de los sistemas respiratorio, cardiovascular y neuroendocrino (1).

La Sociedad Española del Dolor (SED) ha protocolizado una serie de mezclas de medicamentos intravenosas para su empleo en el tratamiento de dolor agudo y postoperatorio. La combinación paracetamol-tramadol permite el tratamiento sintomático del dolor moderado a intenso, agudo y crónico, con una relación eficacia / efectos indeseables muy alta, permitiendo reducir las dosis de tramadol necesarias (2).

El presente trabajo de investigación surge como consecuencia de una necesidad clínica. Actualmente, las mezclas de fármacos empleadas en analgesia y protocolizadas por la SED (por ejemplo, paracetamol-tramadol) son elaboradas en los Servicios de Farmacia hospitalarios, ya que no se encuentran comercializadas. Además, existe una escasa o nula información sobre la estabilidad fisicoquímica y compatibilidad de algunas de estas mezclas.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo ha consistido en realizar un estudio preliminar de la compatibilidad física y estabilidad química, bajo diferentes condiciones de conservación, de la mezcla tramadol-paracetamol recomendada por la SED para el tratamiento del dolor crónico y postoperatorio.

Material y Métodos. En la realización del presente estudio, se han usado los siguientes materiales:

- Principios activos: Paracetamol (Perfalgan®, Bristol-Myers Squibb) y Tramadol Clorhidrato (Adolonta®, Grunenthal).
- Disolventes: acetonitrilo calidad HPLC (Lichrosolv®, Merck, S.A.); ácido fosfórico, ácido clorhídrico al 37% v/v, dihidrogeno fosfato de potasio (Panreac Química, S.A.) y agua milli-Q (Millipore).
- Patrones de referencia: Tramadol clorhidrato (Chemswiss Ibérica, S.A.); Paracetamol cristal (Laboratorios Cinfa, S.A.).

A partir de las especialidades farmacéuticas Adolonta® y Perfalgan® se preparó mediante mezcla en la bolsa de nutrición parenteral Nutri-Bag Multicapa (Grifols, S.A.) empleando una bomba peristáltica (Baxa repeater LR76994), una disolución madre conteniendo 9,8 mg/mL de paracetamol y 1,1 mg/mL de tramadol en un volumen total de 273 mL. El vehículo para la solución de perfusión fue el propio disolvente que presenta la especialidad de paracetamol y en el cual se adicionó el tramadol. Partiendo de esta disolución madre se prepararon alícuotas de 10 mL en cada uno de los viales hasta un total de 48 viales. Las diferentes alícuotas fueron rotuladas de forma aleatoria en función de los diferentes tiempos y condiciones de conservación (luz, oscuridad, temperatura, etc.). Se estudió la estabilidad durante un período de tiempo de 30 días, realizando medidas en el día de preparación, día cero, de las muestras de referencia o iniciales, y a continuación los días 5, 10, 20 y 30. Las condiciones de almacenamiento utilizadas han sido las siguientes: a temperatura ambiente y exposición a luz ambiental (lote A), a temperatura ambiente preservada de luz ambiental (lote B) y a refrigerada 4 ºC en ausencia de luz (lote C).

Este proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar horizontal clase 100 (Telstar BH-100), según RD 175/2001 por el que se regulan las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales, con el fin de: (I) evitar una posible contaminación microbiana que pudiera alterar los analitos, y (II) reproducir fielmente las condiciones normales de elaboración de mezclas intravenosas en una unidad de mezclas intravenosas hospitalaria.

Además se ha realizado un control visual de partículas, por si aparecían precipitados por incompatibilidad entre los componentes de la mezcla. Tras agitar suavemente (procurando evitar la formación de burbujas de aire) e invertir cada vial, se observaron cada uno durante 5 segundos, primero sobre panel blanco y posteriormente sobre panel de fondo negro (3, 4). Esta experiencia se llevó a cabo primero en el momento en que se preparan los viales, y luego en cada uno de los días en que se hace el análisis de HPLC.

Dentro de este estudio preliminar, se hizo un estudio de degradabilidad para forzar las condiciones con el objetivo de ver qué factores afectan en mayor grado a cada uno de los fármacos. Dicho estudio se realizó empleando

disoluciones acuosas individuales de 0,05 mg/mL de cada uno de los fármacos por separado. La hidrólisis alcalina se llevó a cabo preparando disoluciones individuales de cada fármaco en NaOH 1,0 M. Para el estudio de la degradabilidad en condiciones oxidantes se empleó una disolución acuosa al 33 % de peróxido de hidrógeno. Por último se hizo un estudio de influencia de la temperatura para cada fármaco en un horno a 50 ºC (horno Memmert®). En todos los casos se tomó 1 mL de la disolución acuosa de cada fármaco y se mezclaron con 5 mL de cada una de las disoluciones degradativas durante 24 horas en condiciones de temperatura ambiente (4).

Resultados y Discusión. Comparando la evolución de los contenidos de paracetamol y tramadol en las tres condiciones estudiadas (temperatura ambiente/presencia de luz; temperatura ambiente/ausencia de luz; y 4 ºC/ausencia de luz), se comprueba que las variaciones de contenido en todos los casos son independientes de la forma de conservación de las mezclas.

Analizando los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad planteado, se concluye que las variaciones en el contenido en tramadol y paracetamol parecen más relacionadas con la variabilidad del procedimiento operativo que con procesos relacionados con su degradación. Esto ya se intuía al principio del estudio, antes de analizar los resultados experimentales, debido a la ausencia de picos cromatográficos no identificados procedentes de productos de degradación de tramadol y/o paracetamol, en cualquiera de las condiciones de almacenamiento estudiadas.

En el caso del tramadol los datos de recuperación de concentraciones van desde un 100,11 % hasta un 102,13 %, en el caso de las mezclas conservadas a temperatura ambiente y en presencia de luz; desde un 100,11 % hasta un 102,05 %, en muestras conservadas a temperatura ambiente y ausencia de luz y desde un 100,11 % hasta 102,08 %; en muestras conservadas a 4 ºC y en ausencia de luz.

Esta variabilidad puede ser debida, tanto a la variabilidad del propio método, entorno a un 5 % (según la precisión del método instrumental), como al error introducido en las elevadas diluciones a las que hay que someter a las muestras para poder abordar su análisis.

Con respecto al paracetamol, se obtiene datos que varían entre un 99,45% al 100,88% en condiciones de temperatura ambiente y sin fotoprotección, desde un 98,76% al 102,14% en condiciones de temperatura ambiente y fotoprotección y desde un 98,50% al 99,98% en condiciones de refrigeración a 4º C y fotoprotección.

Al igual que ocurrió con el tramadol, la variabilidad en sus contenidos parece estar relacionada con la variabilidad experimental asociada a la dilución de las muestras, necesaria para su determinación cromatográfica, que a cambios químicos reales en las mezclas.

Con respecto al control visual de las muestras, hubo ausencia total de partículas en suspensión en todas las muestras analizadas, así como de cualquier tipo de coloración durante los 30 días de estudio.

En cuanto al estudio de degradación acelerada, las presencia de alcalinizante (condición de estrés) ha generado, en el caso del tramadol, un porcentaje de recuperación menor que para el paracetamol; esto hace pensar que el tramadol se ve más afectado por unas condiciones básicas.

La presencia de un oxidante potente, el peróxido de hidrógeno, también ha degradado al tramadol en mayor medida que al paracetamol, siendo estas condiciones más degradativas para ambos principios activos que las condiciones de hidrólisis alcalina; así, se observa como el tramadol parece más sensible a estas condiciones oxidantes que a las demás condiciones de estrés evaluadas.

La temperatura parece ser el principal factor de estrés en las condiciones degradativas ensayadas para el paracetamol, debido a que se ha obtenido el menor porcentaje de recuperación de todo el estudio de degradación, por tanto, debe existir una temperatura límite a partir de la cual el paracetamol empieza a degradarse más aceleradamente. Sin embargo, para el tramadol, el porcentaje de recuperación obtenido en condiciones de conservación con alta temperatura es mayor que en condiciones oxidantes y menor que en condiciones alcalinizantes.

Bibliografía

(1) Charlton, E., *"Treatment of postoperative pain"*, en: Giamberardino M., ed., An updated review refresher course syllabus IASP Scientific Program Committee. Pain 2002

(2) Mullican W.E. y Lacy J.R., TRAMAP-ANAG-006 Study Group. "*Tramadol/acetaminophen combination tablets and codeine/acetaminophen combination capsules for the management of chronic pain: a comparative trial"*. Clin. Ther. 2001; 23, 1429-1445

(3) Real Farmacopea Española,3ª ed., 2005

(4) Salmerón-García A., Navas N., Martín A., Román E., Cabeza J., Capitán-Vallvey L.F. "*Compatibilidad y estabilidad de mezclas de fármacos protocolizadas por la Sociedad Española del Dolor***"**. Rev. Oficial SAFH 2007; 2, 83-90

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEO POR HPLC DE PARACETAMOL Y TRAMADOL

V. Merino-Bohóquez[2], M.J.Cózar-Bernal[1], S. Salas[1], J. Alvarez-Fuentes[1], M. Cameán[2], M.D. Guerrero[2], M.A. Holgado[1], M. Fernández-Arévalo[1]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

[2]Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

Introducción. El tratamiento del dolor multimodal es la combinación de dos o más fármacos y/o métodos analgésicos, con el fin de potenciar la analgesia y disminuir los efectos colaterales. El concepto de analgesia multimodal a pesar de no ser nuevo, está cobrando cada día más vigencia. La escalera analgésica es la mejor demostración de la utilización multimodal de los analgésicos, la cual recomienda el manejo progresivo de los diferentes tipos, con una evaluación continua del dolor (1). La Sociedad Española del Dolor (SED) ha protocolizado una serie de mezclas de medicamentos para su empleo en el tratamiento de dolor agudo y postoperatorio. Una de estas mezclas es la combinación paracetamol-tramadol que permite el tratamiento sintomático del dolor moderado a intenso, agudo y crónico, con una relación eficacia / efectos indeseables muy alta, permitiendo reducir las dosis de tramadol necesarias (2).

Actualmente, las mezclas de fármacos empleadas en analgesia y protocolizadas por la SED (por ejemplo, paracetamol-tramadol) son elaboradas en los Servicios de Farmacia hospitalarios, ya que no se encuentran comercializadas. Además, existe una escasa o nula información sobre la estabilidad y compatibilidad de algunas de estas mezclas.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación ha consistido en validar un método cromatográfico por HPLC que permita cuantificar estos fármacos de forma simultánea, en las concentraciones empleadas habitualmente en clínica.

Material y Métodos. En la realización del presente estudio, se han usado los siguientes materiales:

- Principios activos: Paracetamol (Perfalgan®, Bristol-Myers Squibb) y Tramadol Clorhidrato (Adolonta®, Grunenthal).
- Disolventes: acetonitrilo calidad HPLC (Lichrosolv®, Merck, S.A.); ácido fosfórico, ácido clorhídrico al 37% v/v, dihidrogeno fosfato de potasio (Panreac Química, S.A.) y agua milli-Q (Millipore).
- Patrones de referencia: Tramadol clorhidrato (Chemswiss Ibérica, S.A.); Paracetamol cristal (Laboratorios Cinfa, S.A.).

El cromatógrafo utilizado (Merck-Hitachi LaChrom, serie 7000) está compuesto de automuestreador (Merck-Hitachi LaChrom L-7200), bomba cuaternaria (Merck-Hitachi LaChrom L-7100), interfaz (Merck-Hitachi LaChrom D-7000), espectrofotómetro de diodos en serie (Merck-Hitachi LaChrom L-7455) y compartimento de termostatización de la columna (Hitachi LaChrom ELITE L-2350). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Fase móvil: KH_2PO_4, 0,04M pH 3,0: ACN (80:20)
- Volumen de inyección: 30 µL.
- Flujo: 1,0 mL/min.
- Columna LiChrospher® 100 RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Merck, S.A.)
- Temperatura: 40 ºC.
- Longitud de onda de medida de paracetamol: 280 nm.
- Longitud de onda de medida de tramadol: 217 nm.

A continuación, se realizó una recta de calibrado para determinar la linealidad del método cromatográfico utilizando el área de los picos que proporcionaban diferentes concentraciones del fármaco. Se partió de una disolución madre de tramadol con 500 mg de tramadol en 1000 mL del eluyente utilizado y otra disolución madre con 1000 mg de paracetamol en 1000 mL del eluyente utilizado. Estas disoluciones madre se diluyeron hasta obtener las siguientes concentraciones de tramadol 0,022, 0,033, 0,044, 0,055, 0,066 y 0,100 mg/mL y de paracetamol 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 y 1,0 mg/mL.

Seguidamente, se estudió la precisión de la técnica analítica en base a los coeficientes de variación, (C.V.), inyectando muestras con una concentración de 0,033 mg/mL para tramadol y 0,55 mg/mL para paracetamol. Así, se inyectaron 20 muestras de la citada disolución a lo largo de un mismo día de trabajo (precisión intra - día) y 20 muestras repartidas entre 4 jornadas consecutivas (precisión inter - día).

Finalmente, se comprobó la exactitud o aproximación del método para determinar, no sólo los intervalos de concentraciones en los que la respuesta del detector es lineal precisa, sino también aquéllos en los que la determinación experimental de tramadol y

paracetamol es exacta. Así, se valoraron por triplicado una serie de disoluciones de ambos principios activos en los intervalos 0,02 - 0,1 mg/mL y 0,2 – 1,0 mg/mL para tramadol y paracetamol, respectivamente.

Resultados y Discusión. Considerando los tiempos de retención obtenidos y la forma de los picos, el eluyente cromatográfico seleccionado fue la mezcla KH_2PO_4 0,04M (pH 3,0) : ACN en proporción 80:20 v/v. Empleando este eluyente y fijando el flujo en 1 mL/min, se cuantifica el paracetamol (280 nm) y tramadol (217 nm) con unos tiempos de retención de 2,982 ± 0,020 min (p < 0,01) y 15,033 ± 0,237 min (p < 0,01), respectivamente.

Cuantificación de tramadol. En el intervalo de concentraciones estudiado (0,02 y 0,1 mg/mL), se obtuvo la siguiente recta de calibrado (n = 18, F = 4574,71, p < 0,0001, coeficiente de determinación r^2 = 0,9972): Área = (6.059.363,64 ± 89.587,03) × Concentración - (35.542,26 ± 4.180,94). Según estos resultados se puede considerar que la linealidad de la respuesta del detector de diodo array es correcta en el intervalo de concentraciones estudiado.

En lo referente a la exactitud del método cromatográfico, este parámetro se evaluó según el porcentaje de recuperación obtenido al cuantificar el tramadol experimentalmente. Dicho estudio proporcionó valores de recuperación adecuados, entre 95 y 102,5 %, para el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,02 – 0,1 mg/mL (media (%) = 99,84; D.E. = 2,00; C.V. (%) = 2,01).

La precisión de la técnica analítica por HPLC se investiga sobre la base de los coeficientes de variación (C.V.) obtenidos para los ensayos de precisión intra e inter-día (3). Los datos ilustrados en la tabla 1 se obtuvieron del análisis estadístico realizado para estudiar la precisión con una solución de tramadol con una concentración de 0,033 mg/mL.

Tabla 1.- *Precisión intra e inter-día del método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de tramadol*

	Área Media	D.E.	n	C.V. (%)
Intra-día	167.453,00	668,71	20	0,4
Inter-día	170.924,67	3631,45	20	2,12

Cuantificación de paracetamol. En el intervalo de concentraciones estudiado (0,2 y 1 mg/mL), se obtuvo la siguiente recta de calibrado (n = 18, F = 7,792,74, p < 0,0001, y coeficiente de determinación r^2 = 0,9991): Área = (8.138.215,15 ± 92.190,05) × Concentración + (5.891.121,44 ± 41.400,07). Según estos resultados se puede considerar que la linealidad de la respuesta del detector de diodo array es correcta en el intervalo de concentraciones estudiado.

En lo referente a la exactitud del método cromatográfico, este parámetro se evaluó según el porcentaje de recuperación obtenido al cuantificar el paracetamol experimentalmente.

El estudio de exactitud de nuestro método de valoración, proporciona valores de recuperación adecuados, entre 98,91 y 100,61 %, para el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,2 – 1,0 mg/mL (media (%) = 100,00; D.E. = 0,52; C.V. (%) = 0,52).

El estudio de la precisión intra e inter-día de la técnica analítica por HPLC desarrollada para la cuantificación de paracetamol, obtenidos para una solución con una concentración de 0,55 mg/mL, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- *Precisión intra e inter-día del método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de paracetamol.*

	Área Media	D.E.	n	C.V. (%)
Intra-día	10.367.961,67	35.207,24	20	0,34
Inter-día	10.018.318,27	449.607,85	20	4,49

En función de los resultados obtenidos puede decirse que se ha validado un método cromatográfico por HPLC que permite cuantificar tramadol y paracetamol de forma simultánea, en las concentraciones empleadas habitualmente en clínica. El método validado ha resultado ser preciso, exacto y lineal en las condiciones planteadas.

Bibliografía

(1) González de Mejía N., "*Postoperative multimodal analgesia"*. Rev. Soc. Esp. Dolor 2005; 12, 112-118

(2) Mullican W.E. y Lacy J.R., TRAMAP-ANAG-006 Study Group. "*Tramadol/acetaminophen combination tablets and codeine/acetaminophen combination capsules for the management of chronic pain: a comparative trial"*. Clin. Ther. 2001; 23, 1429-1445

(3) Zhong W. y Williams M., "*Quantitative determination of cis-3, 4-dichloro-N-methyl-N-(2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl)-benzamide and three of this metabolites in plasma by HPLC*" J. Pharm. Sci. 1993; 82, 1049-1053

DEVELOPMENT OF PLGA-NANOPARTICLES OF DOXEPIN HYDROCHLORIDE

X. Garcia, E. Escribano, J. Domenech

Biopharmaceutics and Pharmacokinetics laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain, Members of IN2UB

Introduction and objective

Although the nanoprecipitation technique is basically applicable to lipophylic drugs, since hydrophilic drugs showed low loading efficiency (1, 2), the objective of the present study was to obtain PLGA-nanoparticles of doxepin hydrochloride by this methodology and to study its *in vitro* release in comparison with a solution of the drug.

Materials and methods

Preparation and characterization of the nanoparticles

Nanoparticles were prepared using a nanoprecipitation technique according to the method developed by Fessi et al 1989 (3). After different formulation tests, the selected solvent and non-solvent were acetonitrile and purified water with 1% Lutrol® F127 as surfactant, respectively. The method consisted on a first dissolution of the polymer (PLGA RG503) and the drug with a 1:1 (drug:polymer) ratio in the organic solvent. The organic phase was then added dropwise into the aqueous phase using moderate stirring. Finally, the organic solvent was rotaevaporated at 37ºC.

Doxepin hydrochloride-loaded nanoparticles were characterized by measuring the mean particle size and PI (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Ins.) and by calculating the drug loading and encanpsulation efficiency.

Release study

In vitro release studies of the drug were performed by means of Franz-diffusion cells (4) (Figure 1) (0.7854 cm2 surface area) at 37ºC and 600 rpm using a cellophane membrane MWCO: 12,00-14,00 (Cellu Sep T3®, Membrane Filtration Products Inc., USA) and a phosphate buffer pH 7.4 (PBS) in the receptor compartment, assuring sink conditions. The donor compartment was filled with 0.2 ml of a solution of doxepin hydrochloride in PBS (50 µg/mL) or with a suspension of nanoparticles in PBS. Experiments were performed in 6 replicates. Samples from the receptor compartment were taken periodically and the same volume of PBS was replaced. The doxepin content in PBS was estimated by HPLC (UV detection).

Figure 1. *Franz diffusion cell*

Analytical procedure:

Doxepin concentrations were determined by HPLC (Waters, Milford, USA).

The chromatographic conditions were as follows:

-Column: Sunfire 5µm C18, 150x4.6mm.

-Mobile phase: Metanol/acetate buffer pH 6 (70:30)

-Flow rate: 0.6 mL/min

-Lambda: 235 nm

Results and discussion

Doxepin hydrochloride-loaded nanoparticles were characterized showing a drug loading of 34.50%, an encapsulation efficiency of 52.80% and a mean particle size of 405 nm, PI= 0.26 (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Ins.).

A SEM image of the nanoparticles is showed in Figure 2.

Figure 2. *Doxepin HCl nanoparticles (SEM)*

The comparative plot of the mean±sd percentage of cumulative dose released *vs* time is shown in Figure 3. Results confirmed a slower release rate when the drug was encapsulated, since longer time was needed to release 90 % of doxepin from the nanoparticles (53 h) than from the solution (8 h).

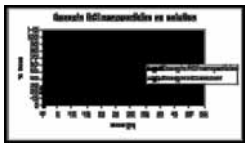


***Figure 3** Release study*

Different mathematical release models were fitted to the fractional release of the drug ($Mt/M\infty$) *vs* time to find out the mechanism of drug release. The best fit was obtained with Korsmeyer-Peppas equation (5-7). The n value of the replicates was between 0.24-0.41 indicating that the drug release was diffusion controlled.

Conclusions

Although the nanoprecipitation technique is basically applicable to hydrophobic drugs due to the miscibility of the solvent with the aqueous phase, a hydrophilic drug (doxepin hydrochloride) has been encapsulated with a quite considerable drug content (34.50%). After *in vitro* release studies, a slower diffusion-controlled release rate of the drug from the nanoparticles than from a solution has been observed.

References

(1) Bilati, U. *et al*. Eur. J. Pharm. Sci., **24**: 67-75, 2005.

(2) Govender, T. *et al.* J. Control. Rel. **57:** 171-185, 1999.

(3) Fessi, H. *et al*. Int. J. Pharm. **55**: R1-R4, 1989.

(4) Franz, T. J. J. Invest. Dermatol. **64**: 190, 1975.

(5) Korsmeyer, RW *et al*. Int J. Pharm., **15**: 25-35, 1983

(6) Hayashi, T. *et al*. Int. J. Pharm., **304**: 91-101, 2005.

(7) Rama Rao, K. et al. J. Microenc., **22**: 863-876, 2005.

EFECTOS DE UN CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO EN LA BIODISTRIBUCIÓN DEL HIERRO EN UN FOCO INFLAMATORIO TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN RATÓN.

E. Escribano[1], R. Fernández-Pacheco[2], M. R. Ibarra[2, 3], J. G. Valdivia[2], C. I. Marquina[3], J. Queralt[4]

[1] Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España, Miembro del IN2UB. [2] Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. [3] Instituto de Ciencias de Materiales de Aragón, ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España. [4] Dpto. De Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España, Miembro del IN2UB.

Introducción

La utilización de nanopartículas (NP) magnéticas dentro del campo de la biomedicina, especialmente en el diagnóstico *in vitro* viene realizándose desde hace unos 40 años. Los últimos estudios realizados con NP magnéticas y sus aplicaciones biomédicas nos revelan un futuro muy prometedor para estos materiales tanto en la detección de tumores y metástasis (diagnosis), como en el tratamiento de los mismos mediante administración de fármacos y/o tratamientos de hipertermia (farmacoterapia). Dado el papel relevante que representan las NP magnéticas en el diagnóstico y en el tratamiento del cáncer, la relación existente entre el desarrollo del cáncer y la inflamación (1-3), y la hiperpermeabilidad de la microvasculatura presente en ambos procesos (poros de 380-780 nm) (4), resulta de gran interés el desarrollo de un modelo biológico que permita estudiar la biodistribución de NP magnéticas administradas por vía intravenosa (i.v.). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la biodistribución de hierro en un foco inflamatorio tras la administración i.v. de NP magnéticas de hierro recubiertas de carbono en ratón, y los cambios inducidos por la aplicación de un campo magnético externo producidos mediante un imán de neodimio.

Materiales y Métodos

Materiales

Las NP de hierro encapsuladas con carbono grafito (40-50 nm de Ø) fueron sintetizadas mediante el método arco-descarga (5) y suministradas por el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA, Zaragoza).

Se preparó una suspensión para inyección i.v. de NP magnéticas en Gelafundina® a la concentración de 0.6 mg/mL. Con el fin de lograr una biodistribución selectiva de las NP se aplicó un campo magnético externo mediante la utilizacion de un imán de neodimio, hierro y boro ($Nd_2Fe_{14}B$) (25 mm Ø, 10 mm de altura).

Métodos: Métodos analíticos

El estudio de biodistribución de las NP en el ratón se realizó a partir de la cuantificación del hierro (6) en el exudado y en el hígado por espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito AAS (Zeeman SpectrAA-30, Varian), previa digestión de la materia orgánica en medio ácido (ácido nítrico 65% PA-ACS y ácido perclórico al 70-72% PA-ACS). Los resultados se expresaron en µg Fe/g de materia orgánica.

Métodos biológicos y diseño experimental

Como animal de experimentación se utilizaron ratones hembra CD-1 (26-30 g), anestesiados previamente con isoflurano. Los ratones fueron repartidos aleatoriamente en tres grupos:

1. Grupo Inflamación (**I**). Animales con inflamación inducida por la administración de carragenina s.c. en el lomo de los animales.
2. Grupo Inflamación-NP (**IN-6**). Animales preparados como en el grupo 1 y que recibieron 6 mg/kg de NP i.v.
3. Grupo Inflamación-NP-imán (**INI-6**). Animales preparados como en el grupo 2 que se expusieron a un campo magnético estático externo durante 20 o 60 minutos después de la administración i.v. de NP.

La obtención de las muestras (exudado inflamatorio e hígado) para su posterior valoración analítica (contenido en hierro) se realizó en primer lugar a 60 minutos y posteriormente, y en base a los resultados obtenidos a 20 minutos.

El estudio estadístico comparativo de las cantidades de hierro en las muestras biológicas y en los tres grupos de animales (I, IN e INI) se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (α= 0.05).

Resultados y Discusión:

En la Figura 1 se presentan los *volúmenes* de exudado obtenidos. Los valores ponen de manifiesto un aumento en los mL de exudado recogidos respecto al grupo control (no tratado), lo que confirma la validez del modelo inflamatorio experimental utilizado.

En la Figura 2 se exponen los niveles de hierro obtenidos en el exudado. Dichos valores aumentan de acuerdo con el siguiente orden: I>IN>INI, y este incremento es mayor cuando

las muestras se extraen a los 20 minutos, respecto a los 60 minutos.

En la Figura 3 se presentan los niveles de hierro en el *hígado*. Los resultados indican un aumento en el hierro hepático cuando se administran las NP respecto al grupo inflamación a los 20 y 60 minutos de extracción del hígado. Sin embargo no se observan diferencias cuando se aplica el campo magnético y se valora el hierro a los 60 minutos, respecto al grupo en que no se aplica el campo magnético. A los 20 minutos el incremento en el hierro sigue la secuencia I>IN>INI de forma significativa.

En la Tabla 1 se muestran los incrementos de los valores de hierro obtenidos en exudado e hígado a los 20 y 60 min de recogida de las muestras. El incremento del hierro en el exudado se produce tanto a los 20 como a los 60 minutos, pero es muy superior cuando se considera el tiempo de los 20 minutos en presencia del imán externo (200% y 123%, respectivamente). Respecto al hígado, también se observa un incremento en los niveles de hierro cuando se administran las NP y en presencia del campo magnético, pero no es de tanta magnitud como en el caso del exudado (63% respecto al 200% a los 20 minutos), lo cual confirma una distribución selectiva hacia el foco inflamatorio.

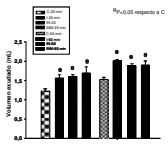


***Figura 1.** Volumen de exudado para los distintos grupos de animales ensayados.*

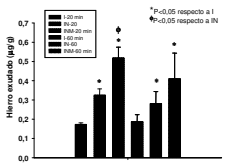


***Figura 2.** Contenido de hierro en el exudado en los distintos lotes de animales ensayados; 20 y 60 minutos de toma de muestras.*

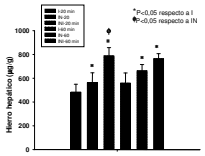


***Figura 3.** Hierro en el hígado en los distintos lotes de animales ensayados, a los 20 y 60 minutos de toma de muestra.*

***Tabla 1.** Incrementos en los valores de hierro en exudado e hígado a los 20 y 60 minutos y en ausencia y presencia del campo magnético*

	Nanopartículas sin imán externo	Nanopartículas con imán externo
Tiempo		
% ▲ exudado		
% ▲ hígado		

Conclusiones:

A los 20 min de la administración de NP, la concentración de hierro en el foco inflamatorio (biofase) se incrementa en un 200% mientras que sus niveles en hígado sólo aumentan un 63%. Este hecho muestra el grado de biodistribución selectiva obtenido gracias a la aplicación de un campo magnético externo.

El método descrito permite el cálculo del grado de distribución selectiva de *carriers* o fármacos formulados en nanopartículas magnéticas de distintos tamaños y/o diferentes recubrimientos, entre un foco inflamatorio o tumor y el sistema retículo endotelial (p.e. hígado). En consecuencia podría ser un método inicial para el *screening* de nanopartículas.

Bibliografía :

(1) F. Balkwill and A. Mantovan, *Lancet*, **357**: 539-545, 2002.

(2) L.M. Coussens and Z.Werb, *Nature*, **420**: 860-867, 2002.

(3) S. Rakoff-Nahoum, *Yale J. Biol. Med.*, **79**: 123-130, 2006.

(4) H.J. Arruebo *et al. Nanotoday*, **2**: 22-31, 2007.

(5) R. Fernández-Pacheco *et al*, *J. Magn. Magn. Mat.*, **311**: 318-322, 2007.

(6) H.L. Ma *et al. Int. J. Pharm.*, **354**: 217-226, 2008.

Agradecimientos

El trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia, España (proyecto CONSOLIDER-INGENIO 2010, CSD2006-12)

IMPLANTACIÓN DE NORMAS ISO/GLP: IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS EN UN LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO.

V. Daza , T. Gonçalves, I. Caraballo.

Cronofarma S.L.L. Autovía Sevilla-Coria del Río km. 3,5 Edificio EUROCEI nave nº 10. C.P.41920. San Juan de Aznalfarache (Sevilla).

Introducción

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (ISO/GLP) son un sistema de normas que establece las condiciones necesarias para asegurar la calidad y la trazabilidad de los estudios realizados dentro del laboratorio. Uno de los principales requisitos para la implantación de las GLP es el relativo a los productos de ensayo y referencia, donde se exigen una serie de datos para la correcta identificación de la muestra. El presente trabajo expone una ficha de identificación de muestra con las referencias más importantes relativas al producto y que resultan necesarias dentro del laboratorio para su correcta identificación y localización, detallando el motivo por el cual hemos hecho la elección específica de cada uno de los datos.

Cabe destacar la importancia del correcto uso de los datos y de su clasificación, ya que nos facilitará mediante un criterio concreto, el reconocimiento efectivo de una muestra.

Materiales y Métodos

- Producto a identificar: Se escoge como ejemplo Lactosa monohidrato.
- Albarán de llegada de producto con la información referente a su llegada y proveedor del producto.
- Certificado de análisis del producto, donde se detallan características como el nº de lote ó la riqueza de la muestra.
- Zona de localización de la muestra: Cronofarma posee 3 áreas dentro de la zona de recepción y almacenamiento de muestras: Materias primas sólidas, Materias primas líquidas y Productos refrigerados. Se especificará el área concreta del producto y se le asignará un número interno a cada muestra.

Resultados y Discusión

Como herramienta para la identificación de las muestras dentro del laboratorio, se diseña una ficha modelo siguiendo las exigencias de las GLP. Los datos se imprimen en un adhesivo que va pegado al producto, fácilmente visible y práctico para su incorporación a la rutina de trabajo.

Las referencias añadidas a la ficha de identificación de muestras son las siguientes:

1) Nombre del producto: Se define el nombre comercial ó, en caso de que no lo tenga, el ingrediente concreto.
2) Número interno y localización: A cada producto se le asigna un número propio dentro del almacén y se indica el área específica (S para sólidos, L para líquidos y * para refrigerados).
3) Composición: Se define el contenido de la muestra.
4) Riqueza del producto.
5) Proveedor: Se indican el nombre y el número de teléfono para una localización rápida en caso de que tengamos que realizar un pedido de ésta.
6) Técnico: Indica la persona que ha recibido y almacenado el producto en el laboratorio.
7) Fecha de caducidad del producto.

PRODUCTO INTERNO

Nombre	**Lactosa Monohidrato**
Número interno. Localización	**19. S**
Composición	**D(+) – Lactose Monohydrate RFE/Ph.Eur.**
Riqueza	**> 99%**
Proveedor	**A.pharma**
Técnico	**V.D.F.**
Fecha caducidad	**07/2010**

Conclusión

La organización de los productos mediante fichas de identificación supone las siguientes ventajas dentro del laboratorio:

1. Una mejor localización de productos, gracias a la asignación de un código interno y la especificación de su área de almacenamiento.
2. Control de stock de los productos del laboratorio, ya que la ficha es realizada a su entrada.
3. Conocimiento de la caducidad del producto.

En resumen, la ficha de identificación de producto facilita el correcto registro y almacenamiento para asegurar la calidad y organización dentro del laboratorio.

Bibliografía

(1)Ministerio y Alimentacion de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Programa de Cumplimiento de las Buenas Practicas de Laboratorio. rev. 3 (2/2/2004).
(2)http://www.agemed.es/actividad/documentos/infoInteres/docs/BPL1bis

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE NANOPARTÍCULAS DE INSULINA-PLGA PARA ADMINISTRACIÓN ORAL

J. Álvarez-Fuentes, M.J. Cózar-Bernal, L. Martín-Banderas, M.A. Holgado, M. Fernández-Arévalo
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
c/ Profesor García González nº 2, 41012 Sevilla
e-mail: ffjalvarez@us.es

Introducción
La vía oral es la preferida por los pacientes por ser indolora y cómoda de administrar, pero no siempre es posible utilizarla, como ocurren el caso de la administración de proteínas terapéuticas. Éstas presentan múltiples desventajas que obstaculizan su administración por esta vía al ser macromoléculas sensibles a la degradación, extremadamente lábiles, además de presentar una baja capacidad de penetración a través de los epitelios intestinales.
La insulina, molécula objeto de nuestro estudio, se caracteriza por una baja estabilidad, ya que es susceptible de degradación física y química y una vida media corta (1).
Las nanopartículas poliméricas son objeto de especial atención debido a su interés para mejorar la estabilidad y promover el transporte y liberación controlada de los fármacos a determinadas regiones del organismo, ya que presentan alta estabilidad, buena protección al principio activo y el uso de materiales poliméricos permite modular las características fisicoquímicas, la liberación del principio activo y el comportamiento biológico de dichos sistemas.
En las últimas fechas se ha visto incrementado el estudio sobre nanopartículas al ser susceptibles de atravesar las placas de Peyer, principalmente a través de las células M, especializadas en la absorción de partículas desde la luz gastrointestinal hacia la región basolateral rica en linfocitos. Lo más característico de estas células es que son capaces de transportar macromoléculas, partículas y microorganismos directamente a las placas de Peyer. Se ha visto que el tamaño óptimo para la absorción a través de las placas de Peyer se encuentra en la escala nanométrica. Además, son también factores de gran importancia la carga superficial, la hidrofilia del polímero formador y la proporción de tensioactivo en el sistema (2, 3).
El objetivo del presente trabajo ha sido elaborar y caracterizar, de forma preliminar, sistemas nanoparticulares, a base de PLGA, conteniendo insulina para su administración oral. Para ello, se estudiará la influencia de dos parámetros de formulación: concentración de alcohol polivinílico (PVA) en la fase externa de la doble emulsión y concentración del polímero formador (PLGA).

Materiales y Métodos
Materiales
Insulina y Tween® 80 (Sigma Aldrich, Alemania); ácido poliláctico-poliglicólico (Resomer® RG 502 - viscosidad inherente, 0.24 dl/g), (Boerhringer Ingelheim, Alemania); alcohol polivinílico (Mowiol® 3-96) (Fluka, Alemania) y acetato de etilo (Panreac Química S.A., España).
Preparación de los sistemas
Las partículas se han elaborado utilizando el método de la doble emulsión-evaporación de disolvente propuesto por Bilati y cols. (4), convenientemente modificado.
El método de la doble emulsión-evaporación de disolvente es el método más ampliamente utilizado para la encapsulación de fármacos hidrofílicos (5).
La composición de las fases de la doble emulsión se recoge en la tabla 1.

***Tabla 1**. Composición de las fases de la doble emulsión.*

A	Solución de insulina en ácido acético (30% v/v)
O	Solución de PLGA en acetato de etilo
A	Solución acuosa de PVA

Para obtener la doble emulsión A/O/A se utilizó un sonicador (Bradson, 50W). A continuación, el sistema se mantiene bajo agitación (Magnetic stirrer hotplate SM6) durante aproximadamente 12 horas, y se somete a centrifugación, lavándolo posteriormente. El producto obtenido se liofiliza (Telstar Cryodos), obteniéndose las nanopartículas.

En la tabla 2, se recogen las distintas condiciones de elaboración.

***Tabla 2**. Composición de los lotes elaborados*

Lote	% PVA	% PLGA
1	0,3	10
2	2	10
3	2	20

Caracterización de los sistemas
El tamaño medio de partícula fue calculado mediante un método de dispersión láser (Partica LA-950 V2, Horiba). El estudio de la forma y superficie se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
Las características eléctricas superficiales de las partículas se determinaron con un dispositivo Malvern Mastersizer 2000.
Para calcular la eficacia de encapsulación, 10 mg de nanopartículas se disolvieron en 2 mL de acetato de etilo. Se añadieron 2 mL de HCl 0.01N y tras someter el sistema a centrifugación, se cuantificó la insulina en el sobrenadante.

Resultados y Discusión

Caracterización de los sistemas
En la figura 1 se muestra, a título de ejemplo, una fotografía del lote 2.

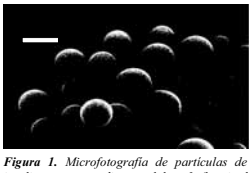


***Figura 1.** Microfotografía de partículas de insulina correspondientes al lote 2 (longitud de la barra 1 µm)*

Como puede apreciarse en la fotografía, los sistemas elaborados mostraron homogeneidad en el tamaño, con forma esférica y superficie lisa.
En la tabla 3 se recogen los tamaños obtenidos para cada uno de los lotes elaborados.

***Tabla 3.** Tamaño medio (µm) de los diferentes lotes de partículas elaborados*

Lote	Tamaño medio (µm)	DS	CV
1	3,210	2,089	65,066
2	0,736	0,123	17,267
3	1,984	0,217	10,932

En función de los datos obtenidos se estima que el tamaño medio de las partículas es reducido y homogéneo. La baja viscosidad del polímero justifica, junto con las condiciones de producción, los tamaños obtenidos.
Al estudiar la influencia de la concentración de PVA (lotes 1 y 2), se aprecia claramente que hay una disminución del tamaño de partícula cuando aumenta la concentración de PVA. La adición del tensioactivo a mayor concentración consigue reducir, de forma más efectiva, la tensión superficial de la fase continua consiguiendo así reducir el tamaño de partícula del sistema (6, 7).
Por otro lado, si se comparan los tamaños obtenidos en los lotes 2 y 3, se aprecia que al aumentar la concentración del polímero (del 10 al 20 %), aumenta el tamaño medio de las partículas. Al aumentar la concentración del polímero se incrementa la viscosidad de la fase dispersa, aumentando así el tamaño de partícula (6, 8).
Con respecto a los valores de potencial zeta, fueron negativos para los tres lotes estudiados, no encontrando influencia significativa por cambios en las concentraciones de PVA y PLGA. Además, los valores negativos de potencial zeta favorecerán el no atrapamiento de las nanopartículas por parte de la capa de mucus que tapiza la mucosa intestinal (9).
En relación a la eficacia de encapsulación, se encontró un incremento de ésta al aumentar tanto la concentración de PVA como de PLGA.

Conclusiones
Con los resultados obtenidos puede concluirse que, mediante el método propuesto, se han conseguido elaborar partículas de insulina de tamaño nanométrico, con características superficiales y contenido adecuados.

Bibliografía
(1) De Rosa, G. y cols., *J. Control. Rel*., **69:** 283-295, 2000.
(2) Cózar, M.J. y cols., *Ind. Farm*., **138:** 88-94, 2008.
(3) Vila Jato, J.L., *An. R. Acad. Nac. Farm*., **73:** 813-832, 2007.
(4) Bilati, U. y cols., *Pharm. Dev. Tech*., **8:** 1-9, 2003.
(5) Li, M., y cols., *Int. J. Pharm*, **363:** 26-39, 2008.
(6) Chiappetta, D.A. y cols., *Acta Farm. Bonaerense* **25:** 485-90, 2006.
(7) Yang, Y.Y. y cols., *Biomaterials*, **22:** 231-241, 2001.
(8) André-Abrant, A. y cols., *Eur. Polym. J.*, **37:** 955-967, 2001.
(9) Hariharan, S. y cols., *Pharm. Res.,* **23:** 184-195, 2006.

Agradecimientos. Este trabajo se ha desarrollado dentro del Proyecto de Excelencia CTS-1688 (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía).

ENSAYOS REALIZADOS A DESHIDRATADOS VEGETALES PARA SU POSIBLE UTILIZACIÓN EN FORMAS GALÉNICAS

M.D. Romero, B. Clares, M.A. Ruiz, J. Alcalá, P. García, V. Gallardo
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada. Verbiotech I+D+i S.L. Verbionat S.C.A.

Introducción
Pretendemos desarrollar los procesos de obtención de materias primas vegetales llevados a cabo por la industria farmacéutica con la finalidad de obtener deshidratados vegetales para su utilización en la elaboración de formas galénicas. Obtendremos polvos de deshidratados vegetales y realizaremos los ensayos galénicos descritos en la Real Farmacopea Española (RFE), que nos permitan detectar si nuestros deshidratados vegetales son idóneos para el fin al que van destinados.

Material y Método
Las materias primas son vegetales frescos procedentes de la producción agrícola tradicional de la Vega Granadina. Se tomaron como objeto de estudio: Cebolla, Limón, Pimiento, Tomate y Zanahoria, que sometiéndose previamente, mediante métodos industriales, a procesos de lavado y cortado, fueron deshidratados en condiciones de vacío y temperatura controlada en el dispositivo CRIOX y, posteriormente pulverizados, para ser transformados en los deshidratados vegetales que deseamos obtener. Los vegetales frescos son introducidos en un tren de lavado para eliminar las impurezas mediante chorros a presión de una solución constituida por hipoclorito sódico y agua. Inmediatamente después son troceadas para su posterior deshidratación en el dispositivo CRIOX, el tamaño de los trozos debe ser más o menos grueso para evitar que queden pegados en las paredes del dispositivo durante la deshidratación. Ésta se hace a vacío y a temperatura controlada, menor o igual a 45-50º C para evitar daño térmico y por tanto la pérdida de las propiedades nutricionales del vegetal.
Para la pulverización utilizamos un molino de martillos donde conseguimos un tamaño de partícula irregular.
Una vez obtenida la materia prima realizamos los ensayos de la RFE , el ensayo de tamaño de partícula, la capacidad de flujo, el volumen aparente y la densidad aparente nos dan una idea de las propiedades de flujo de los mismos, de la capacidad que tienen los sólidos divididos de fluir verticalmente y con el tipo y tamaño de partícula con el que estamos trabajando. De ésta manera podemos definir si son deshidratados vegetales válidos para la elaboración de diferentes formas galénicas.

Resultados y Discusión
La determinación del tamaño de partícula se realiza por tamización en cascada, así seleccionamos los distintos tamaños de partículas. En las figuras 1, 2 y 3 representamos los resultados en porcentajes de los rechazos, los rechazos acumulativos y el tamizado acumulativo que presenta cada vegetal en los distintos tamices.
Con la medida del volumen aparente, la densidad aparente y del ángulo de reposo determinamos la capacidad de flujo que presentan los vegetales.

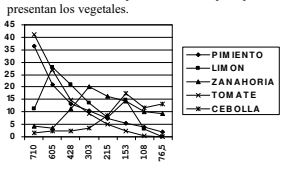


***Fig. 1**. Rechazo (%) frente al límite de diámetro para todos los vegetales.*

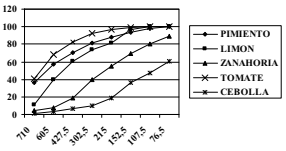


***Fig.2**. Rechazo acumulativo (%) frente a límite de diámetro de todos los vegetales.*

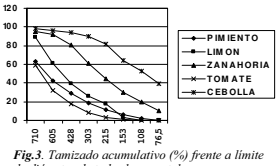


***Fig.3**. Tamizado acumulativo (%) frente a límite de diámetro de todos los vegetales.*

En la tabla 1 se ven reflejados los resultados de estos ensayos y en las figuras 4 y 5 los representamos gráficamente.

Tabla 1. Capacidad de flujo de los distintos vegetales.

	IC (%)	γ	IH	Capacidad de flujo
Pimiento	11.69	26.10	1.14	Buena
Zanahoria	13.38	25.17	1.16	Buena
Limón	15.54	33.42	1.18	Buena
Tomate	27.50	30.11	1.36	Aceptable-Pobre
Cebolla	37.78	37.78	1.61	Pobre-muy pobre

(IC: Indice de Car; γ: Ángulo de reposo; IH: Indice de Hausner)

Dependiendo del ángulo de reposo formado la capacidad de flujo será mayor o menor, si éste es menor a 30º el polvo fluirá fácilmente, si es mayor a 50º no existe flujo libre y si se encuentra comprendido entre 30º y 50º el flujo será difícil.

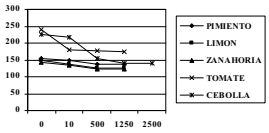


Fig. 4. *Volumen (mL) frente al número de golpes realizados en el ensayo de volumen aparente.*

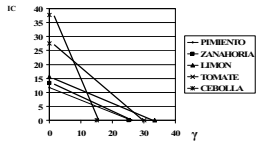


Fig. 5. *Índice de Car frente al ángulo de reposo para todos los vegetales.*

Conclusiones

Los deshidratados vegetales analizados cumplen los ensayos galénicos para polvos descritos en la Real Farmacopea Española, todos ellos presentan buenas propiedades de flujo, destacando la del pimiento y la zanahoria que fluyen fácilmente. Es la cebolla el único de ellos que posee una capacidad de flujo pobre debido a que presenta un tamaño de partícula pequeño, esto hace que se formen aglomerados entre unas partículas y otras y que el polvo quede pegado a las paredes del dispositivo. El resto de vegetales presentan tamaño de partícula grueso. Todos ellos son aptos para la elaboración de diferentes formas galénicas.

Bibliografía

Real Farmacopea Española. 3ª Edición. 2005.
Vila Jato JL. Tecnología Farmacéutica. Vol I y II. Madrid. Edit. Síntesis. 1997.
Aulton ME. Farmacia. La ciencia del diseño de las Formas Farmacéuticas. 2ªed. Madrid Elsevier. 2004.

EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN PARA PRESERVAR MIOBLASTOS MICROENCAPSULADOS

A. Murua, G. Orive, R.M. Hernández, J.L. Pedraz

Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV-EHU), 01006 - Vitoria-Gasteiz, Alava.

Introducción

En la actualidad, para poder asegurar un correcto intercambio de material de investigación entre grupos colaboradores, la posibilidad de criopreservar además de células, estructuras biocompatibles desarrolladas para inmovilizar células, está siendo considerada por muchos grupos de investigación.

La encapsulación proporciona un método seguro y reproducible para la inmovilización de células, obteniendo una liberación controlada y sostenida de productos terapéuticos secretados '*de novo*' (1).

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de identificar selectivamente la tasa óptima de enfriamiento (temperatura y velocidad) y la concentración adecuada de crioprotector para promover la creación de bancos de mioblastos encapsulados secretores de Epo. Se ha seleccionado el dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector.

Material y Métodos

La inmovilización de los mioblastos C_2C_{12} derivados del músculo esquelético de ratones C3H y genéticamente modificados para liberar Epo murina (mEpo) en microcápsulas de alginato-poli-*L*-lisina-alginato (APA) se realizó empleando un goteador electrostático introduciendo algunas modificaciones al protocolo diseñado por Lim y Sun (2).

El primer ensayo de este estudio fue realizado con un grupo de células microencapsuladas no criopreservadas y cuatro grupos donde se evaluaron distintos protocolos de congelación, recogidos en la Tabla 1, utilizando en todos los casos una concentración de 20% de DMSO. En base a los resultados obtenidos en este primer ensayo, se planteó una segunda aproximación con el fin de evaluar el efecto del empleo de distintas concentraciones de DMSO (1%, 5%, 10%, 20% y 30%). Las células microencapsuladas se criopreservaron empleando el protocolo de enfriamiento controlado (ver CC en Tabla 1).

La viabilidad *in vitro* de las células fue evaluada indirectamente por la medida de producción de Epo de las células microencapsuladas, empleando un kit de detección de Epo (R&D Systems).

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones Balb/c adultos (hembras) anestesiados por inhalación de isoflurano, en los que se implantaron las microcápsulas a nivel subcutáneo (SC) mediante un catéter (Nipro 18 gauge; Nissho Corp.). El grupo control recibió HBSS por la misma vía

Tabla 1. Protocolos de criopreservación

	CC	CCSh	SC	MC
DMSO (%)	20	20	20	20
Protocolo de enfriamiento	1h: -20ºC 23h: -80ºC N_2 liq.: -196ºC	1h: -20ºC 23h: -80ºC N_2 liq.: -196ºC	2h: -80ºC No liq.: -196ºC	N_2 liq.: -196ºC
Agitación*	No	Sí	No	No

* Exposición en un agitador horizontal de las microcápsulas a la solución crioprotectora durante 20 min a temperatura ambiente

CC Enfriamiento controlado; CCSh: Enfriamiento controlado + agitación; SC: Super-enfriamiento; MC Maxi-enfriamiento

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción retroorbital con tubos capilares heparinizados. El hematocrito se determinó empleando un método estándar de microhematocrito. Los resultados se expresan como media ± D.E.

El día 45 post-implante, algunos animales fueron sacrificados y se extrajeron las microcápsulas del espacio subcutáneo para su fijación en una solución de 4% paraformaldehído y posterior análisis histológico (H&E).

Resultados y Discusión

El grupo de enfriamiento controlado mostró una reducción de la producción de Epo superior al 64% mientras que el resto de los protocolos mostraron mayores tasas de reducción (Fig. 1).

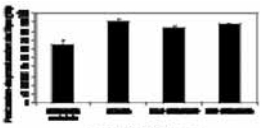


Figura 1. Reducción en la producción de Epo en base a los distintos protocolos de enfriamiento (20% DMSO) empleados en comparación con el grupo control de microcápsulas no criopreservadas.

El análisis de la reducción de producción de Epo de los grupos criopreservados con distintas concentraciones de crioprotector mostró que las concentraciones óptimas fueron 10% y 20%, en

cuyos grupos se observaron las tasas de reducción más bajas (42% y 45% respectivamente), tal y como puede observarse en la Figura 2.

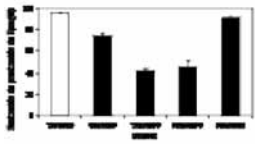


Figura 2. Reducción en la producción de Epo en base a las distintas concentraciones de agente crioprotector empleadas en comparación con el grupo control de microcápsulas no criopreservadas.

Con respecto a los ensayos *in vivo*, tal y como se observa en la Figura 3, no se detectaron diferencias significativas entre el grupo de microcápsulas no criopreservadas y el grupo de 10% de DMSO al día 45 (81 ± 5 % versus 85 ± 2 % respectivamente) (P<0.05). Por el contrario, sí se observaron (al día 45) diferencias significativas entre los grupos criopreservados con el 10% y el 20% de DMSO (85 ± 2 % versus 74 ± 8 % respectivamente) (P<0.05), siendo por tanto la concentración del 10% de DMSO la más adecuada para realizar el proceso de criopreservación.

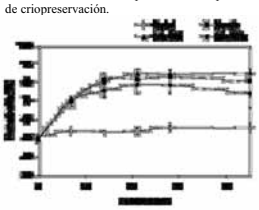


Figura 3. Niveles de hematocrito de ratones Balb/c tras la administración subcutánea de mioblastos C_2C_{12} secretores de Epo inmovilizados en microcápsulas APA empleando distintas concentraciones de agente crioprotector. Los resultados se expresan como media ± D.E.

Los implantes de microcápsulas se explantaron el día 45 post-implante. Se observó una ligera reacción de cuerpo extraño, pero no se observaron efectos secundarios adversos significativos.

Los análisis histológicos de las microcápsulas explantadas mostraron la aparición de una red de capilares sanguíneos entre las microcápsulas (Fig. 4). Estudios realizados previamente han puesto de manifiesto que la eritropoyetina puede actuar como un factor angiogénico por distintas vías de señalización (3,4).

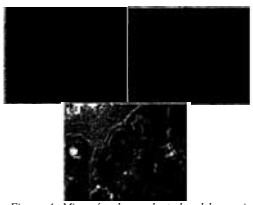


Figura 4. Microcápsulas explantadas del espacio subcutáneo al día 45 post-implante. Análisis histológico (H&E). (A) grupo no criopreservado; (B) grupo criopreservado con 10% de DMSO; (C) grupo criopreservado con 20% de DMSO.

Conclusiones

El objetivo principal de este estudio fue establecer una técnica de criopreservación económicamente asequible y biosegura que provocara un mínimo daño celular durante el proceso de congelación-descongelación. Esta aproximación podría ofrecer la posibilidad y ventaja de llevar a cabo con mayor seguridad un correcto intercambio de células microencapsuladas entre laboratorios. Aunque se observa que la criopreservación provoca una reducción de un 40% en la liberación de Epo por parte de los mioblastos microencapsulados, en base a los resultados obtenidos de producción de Epo, integridad de la estructura polimérica y niveles de hemacrito en los ensayos *in vivo*, podemos concluir que el procedimiento más adecuado para la criopreservación de las microcápsulas es el enfriamiento controlado utilizando un 10% de DMSO.

Referencias:

(1) Murua A, y cols, *J Control Rel*, in press.
(2) Lim F y Sun AM. *Science,* **210**: 908-910 1980.
(3) Müller-Ehmsen J, y cols, *J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**: H331-340; 2006.
(4) de Vos, P, y cols, *J Biomed Mater Res A*, **80**: 813-819; 2007.

Agradecimientos

Proyecto parcialmente financiado por el "Ministerio de Educación y Ciencia" (BIO2005-02659). A. Murua agradece al "Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación)" por la beca predoctoral.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE RASAGILINA MESILATO EN MICROESFERAS BIODEGRADABLES DE PLGA.

M. Fernández[1,2], E. Barcia[1] y S. Negro[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.
[2]Departamento de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Introducción

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer (1). La rasagilina inhibe irreversiblemente la MAO-B, no origina metabolitos tóxicos, en comparación con otros IMAO como la selegilina (2) y también tiene propiedades neuroprotectoras (3).

En la literatura hay descritos solo dos métodos analíticos para la determinación de rasagilina; uno por cromatografía de gases con detector de espectroscopía de masas, y otro por HPLC, con detección electroquímica. Sin embargo, este tipo de equipamiento generalmente no está disponible para el análisis farmacéutico de rutina.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar y validar un método analítico por HPLC con detección UV, que sea simple, rápido, sensible y preciso para la cuantificación de rasagilina mesilato en microesferas biodegradables.

Materiales y Métodos: Rasagilina mesilato (Hangzhou Onion Chemical Co. Ltd.), aciclovir (Guinama), polímero poli-d,l-láctico-co-glicólico (PLGA) 50:50 (Resomer-502®, Boehringer Ingelheim), alcohol polivinílico PVA 72.000 Da (Merck), agua ultrapura (Millipore). Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico (Panreac).

Para la cuantificación de las muestras se utilizó un cromatógrafo Waters (USA), provisto de una bomba modelo 510, un detector UV/Vis modelo 490E, un inyector automático modelo 712D WTSP y el software Empower Login HPLC System Manager.

Elaboración de las microesferas: Las microesferas fueron preparadas mediante la técnica de extracción y evaporación del solvente a partir de una emulsión A/O/A. Para ello, se preparó una solución acuosa de rasagilina mesilato (15 mg/150 µl de tampón fosfato a pH 3,3) que fue emulsificada en una solución de PLGA 502 (450 mg) en CH_2Cl_2 (1,5 ml) con una sonda de ultrasonidos (Heat Systems, Ultrasonics Inc) durante 30 segundos. La emulsión resultante (A/O) fue incorporada en 800 ml de una solución de PVA (0,25% p/v) y NaCl 0,5 N, alcalinizada con NaOH 1N a pH 10, utilizando para ello un Polytron® (Kinematica GmbH PT 300) durante 20 segundos a 6.500 rpm, obteniéndose una emulsión A/O/A. Dicha emulsión se dejó en agitación durante 3,5 horas a temperatura ambiente. A continuación las microesferas fueron lavadas y secadas en un desecador al vacío.

Condiciones cromatográficas: Se ensayaron distintas fases móviles, diferentes pHs, distintos estándares internos así como diferentes flujos de la fase móvil. El método seleccionado utiliza una columna Mediterranea Sea C-18 (5 µm, 250x4 mm) (Teknokroma). La composición de la fase móvil fue acetonitrilo:agua (5/95, v/v), ajustada a pH 3.1 con ácido orto-fosfórico, con flujo de 1 ml/min. La determinación se realizó a 290 nm. Se empleó aciclovir como estándar interno (E.I.)

Determinación de la rasagilina mesilato en las microesferas: Se disolvieron 30 mg de microesferas en 5 ml de CH_2Cl_2. El fármaco fue extraído tres veces desde la fase orgánica con 5 ml de PBS a pH 5,5. A continuación las muestras se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min. Procediéndose a retirar el sobrenadante. El volumen total de muestra (15 ml) se completó a 20 ml con PBS a pH 5,5. Las muestras se filtraron (0,45 µm) y se procedió a la determinación del principio activo por HPLC.

Validación del método analítico: El método analítico fue validado de acuerdo a las normas ICH (4) considerando los criterios de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, sensibilidad, selectividad y robustez.

Resultados y Discusión

El método analítico descrito fue lineal (p<0,05) en el rango de concentraciones de 0,5-20 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0,9999.

La desviación estándar relativa (R.S.D.) para la repetibilidad (intra-día) y precisión intermedia (inter-día) osciló entre 0,21% y 1,36%, lo que indica una baja variabilidad para las diferentes concentraciones ensayadas.

La exactitud se determinó a partir del porcentaje de recuperación del principio activo (tres concentraciones) obteniéndose valores

comprendidos entre 99,91% y 102,50%, con R.S.D. < 2,6.
Los límites de detección y cuantificación fueron 0,07 µg/ml y 0,23 µg/ml, respectivamente.
La figura 1 muestra un cromatograma de rasagilina mesilato y E.I. (aciclovir) en una muestra de microesferas de PLGA 502. Se pueden observan picos simétricos y bien resueltos, sin interferencia de otros compuestos, lo que confirma la selectividad del método

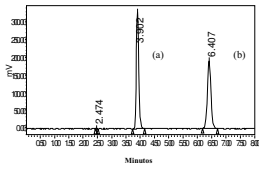


***Figura 1**. Cromatograma correspondiente a microesferas de PLGA 502 cargadas con (a) rasagilina mesilato (10 µg/ml) y (b) E.I. (30 µg/ml).*

El estudio de robustez demostró que los resultados obtenidos no varían con el tiempo o las condiciones de ensayo.
Este método fue aplicado para la cuantificación de principio activo en microesferas cargadas con rasagilina mesilato cuya eficacia de encapsulación fue del 97,2 ± 2,8%.

Conclusiones
Se ha validado un método simple y rápido por HPLC con detección UV para la cuantificación de rasagilina mesilato en microesferas biodegradables de PLGA.

Bibliografía:
(1) Bergareche A et al., *J. Neurol*., **251** : 340-345, 2004.
(2) Bar Am O et al., *Neurosci. Lett*., **355**: 169-172, 2004.
(3) Youdim M et al., *Cell. Mol. Neurobiol*., **21**: 555-573, 2001.
(4) Validation of analytical methods: ICH topics Q2B, 1996.

Agradecimientos
Este trabajo ha sido financiado por un proyecto de investigación de la convocatoria de Becas y Ayudas de la Fundación Mutua Madrileña (AP2696/2008). Marcos Fernández agradece el apoyo del Programa Alβan, Programa de Becas de Alto Nivel de la Unión Europea para América Latina, beca Nº E06D103774CL.

HIGH PRESSSURE HOMOGENISATION METHOD TO PRODUCE NANONSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLCs) TO ENHANCE ORAL BIOAVAILABILITY OF POORLY SOLUBLE COMPOUNDS

A.Beloqui, M.A.Solinís, A.R. Gascón, J.L. Pedraz
Pharmacy and Pharmaceutical Technology Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country (UPV-EHU), Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain
Corresponding email (JLP): joseluis.pedraz@ehu.es

Introduction
There has been a consistent increase in the number of poor water soluble drug candidate compounds and more than 40% of new pharmacologically active chemical entities are lipophilic and exhibit poor water solubility (1). The challenge is to making these molecules into oral administered systems with sufficient bioavailability. For this purpose, NLCs represent an alternative carrier system to traditional colloidal carriers, such as emulsions liposomes and polymeric micro- and nanoparticles (2). Lyophilisation is one of the most employed methods to obtain dehydrated formulations which can be stored and shipped at room temperature. Storage stability includes prevention of degradation reactions and preservation of the initial particle size (3). The aim of this study was to design, produce and characterize SLNs for poorly soluble compounds entrapment.

Materials and Methods
A BSC class II, spironolactone (SPN), was used as poorly water soluble model compound. For the production of NLCs the hot pressure homogenization (HPH) method was performed. Precirol ATO 5 (10%) was chosen as lipid matrix former. Triglycerides (Mygliol 812) were added to increase drug encapsulation efficiency and stability (4). The surfactant solution was composed by Tween 80 (2%) and Poloxamer 188 (1%). Briefly, the lipid phase was melted 5-10ºC above its melting point. A hot pre-emulsion was formed by sonication and introduced into the homogenisizer (Stansted Fuid Homogenisizer) (500 Bar/75ºC). Particle size and surface charge were measured with a Malvern 3000 Zetasizer. The procedure was optimized in terms of number of homogenization cycles since this parameter highly influence the particle size and polydispersion index (P.I).
Once we optimized the homogenization process we evaluated the stability of our NLCs in different medium, in terms of particle size.
Lyophilisation was performed for particles preservation during storage. Lyophilisation involves freezing of the sample: firstly at -20ºC and secondly at -80ºC before the lyophilisation step. Particle size was measured before and after every lyophilisation process. An important point to take into account is the cryoprotector (CP) chosen for freeze drying (FD) the samples. Among the most common used cryoprotectors are trehalose, sucrose and sorbitol, which we have used to evaluate the most suitable stabilizer for freeze drying our nanosuspensions. We used these stabilizers in a 1:1 dilution with our suspension at three different concentrations: 5, 10 and 15%.

Results and Discussion
As shown in figure 1, five cycles would be enough for a small particle population. We decided to use 10 cycles to get a low PI as the particle size population was uniform from 5 to 10 cycles. When we chose the adequate cycles, we run the homogenisizer with an SPN solution for ten cycles to ensure SPN wasn´t damaged with cycles or temperature. We measured SPN concentration before and after homogenisation by spectrophotometry. We also measured entrapment efficacy by centrifuging the samples and measuring the filtrate by spectrophotometry, which was never lower than 99%.

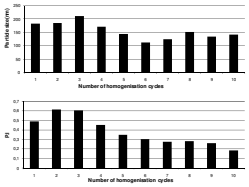


***Figure 1**. Changes on particle size and polydispersity index (PI) with an increasing number of homogenisation cycles.*

Finally, we obtained NLCs with a particle size of 150 nm and a surface charge of -20 mV. Surface charge don´t change with the increasing number of cycles.
Our next approach was to demonstrate that our particles were resistant in gastric and intestinal medium. For that purpose we prepared

simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluid (USP 5.7, 2007) (5) and HCl 0.1N with 0.1% of sodium dodecyl sulphate (SDS), which is described in Pharmacopeia for SPN. For the simulated mediums different enzymes were used: pepsin for SGF and pancreatin for SIF, which contains multiple enzymes: amylase, trypsin, lipase, ribonuclease and protease. We firstly assessed that SPN was stable in those mediums over the time. We introduce 1.5 ml of our suspension containing 7,5mg of SPN in the different medium for 2 hours, in case of HCl and SGF, and 4 hours in case of SIF and measured particle size to ensure there were still particles in the medium (Figure 2).

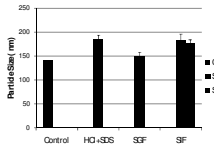


***Figure 2.** Changes in size after stability assay with enzymes in different mediums.*

This figure shows that particle size is increased around 30 nm when NLCs are suspended in HCL+SDS and SIF medium. No difference on particle size over time was observed in SIF.
An important limitation of aqueous suspensions is their poor stability. In fact, the NLCs suspensions employed in the present study were stable only for one month at 4ºC. Hence we performed a lyophilization study with three different cryoprotectors: trehalose, sorbitol and sucrose. We lyophilized in all cases with lyoprotectors at 5%, 10% and 15% concentration. Figure 3 shows particle size when lyoprotectors were used at 5%.

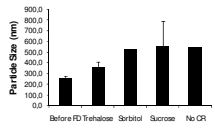


***Figure 3**. Trehalose was the most suitable cryoprotective agent at 5%.*

Lyophilisation of samples without stabilizers resulted in the aggregation of particles forming a cake with rubbery aspect. When sorbitol was used as stabilizer the lyophilized samples showed a powdery aspect but redispersion in water was imposible. The same thing happened when using sucrose. Only when NLCs were lyophilized with trehalose aspect was powdery and redispersion was possible. Figure 4 shows that there is no difference in the effect of trehalose concentration on particle size. In all cases, surface charge did not changed and was around -20 mV. According to these results, 5% trehalose is the best choice for lyophilisation of our NLCs.

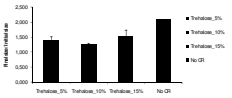


***Figure 4**. Comparison of particle size before and after lyophilisation of NLCs with different concentrated solutions of trehalose.*

Conclusions
In the present study, we have optimized an NLC formulation for poorly soluble compounds made of Precirol ATO5 and Mygliol 812 as lipids and Tween 80 and Poloxamer 188 as emulsifiers, which is stable in the *in vitro* assays for both gastric and intestinal fluids. We have assessed that liofilization with trehalose 5% provided dried NLCs with powdery aspect and easy redispersion.

References:
(1) Dahan, A. *et al.*, *J. Controlled Release*, **129**: 1-10, 2008.
(2) Müller, R.H. *et al., Eur. J. Pham. Biopharm*, **50**: 161-177, 2000.
(3) Müller, R.H., *Int.J.Pharm* **214**: 21-24, 2001
(4) Petkiewicz, J *et al, Int.J.Pharm.*, **310**: 64-71, 2006.
(5) European Pharmacopeia, supplement 5.7, 2007

Acknowledgments:
A. Beloqui thanks the "University of the Basque Country" for the fellowship grants.

CRITICAL POINTS OF HYDROPHILIC MATRICES BASED ON HYPROMELLOSE K100 LV CR

C. Cifuentes, T. Gonçalves, A. R. Rajabi-Siahboomi* and I. Caraballo.
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Seville, C/Profesor García González, 2. 41012 - Seville, Spain,
*Colorcon, Modified Release Technologies, 415 Moyer Boulevard, P.O. Box 24, West Point, PA 19486-0024, USA.

Introduction

The objectives of this study were to determine the critical ranges of polymer concentration within an ER matrix attributed to the excipient percolation thresholds and to evaluate the role of the initial porosity of the system.
The application of the percolation theory to study the hydration and drug release from hydrophilic matrices has allowed formulation scientists to explain changes in release kinetics of swellable extended release (ER) delivery systems (1-3).
Formulations studied here contained verapamil·HCl as a water soluble model drug and one hydrophilic matrix forming polymers with different viscosity.

Experimental Methods

Materials
Verapamil·HCl (Recordatti, Italy), hypromellose (METHOCEL™ K100LV CR, Colorcon, UK), microcrystalline cellulose (Mingtai Chemical, Spain), magnesium stearate (Acofarma, Spain), colloidal silicon dioxide NF (Acofarma, Spain).
Methods
- Tablet preparation

Table 1 shows the composition of the studied formulations where the polymer K100LV CR was used at 15, 20, 25 and 30% w/w concentration.

Table 1. *Composition of the studied formulations*

Verapa.	30	180	30	180	30	180	30	180	30	180
Lactose	19	114	19	114	19	114	19	114	19	114
SiO2	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0
Mg Stearate	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0	0.5	3.0
Total	100	600	100	600	100	600	100	600	100	600

* The letter Y can be replaced by the two letters indicated in Table 2, in order to obtain the name of the tablet batch.

Initially, all materials, with the exception of magnesium stearate and colloidal silicon dioxide (CSD), were blended for 10 minutes in a Turbula mixer. Magnesium stearate and CSD were added and blended for an additional 5 min. The tablets (600 mg target weight, 12 mm diameter) were prepared by direct compression, using a standard eccentric tablet machine (Bonals A-300, Spain) at three different compression forces (Table 2). The matrices containing 10% w/w HPMC K100 LV CR (Batch CF1) were prepared using only the highest compression force.

Table 2. *Tablet batches names*

HPMC K100 LV CR	**VF**	**VM**	**VS**

- Drug dissolution study

Dissolution testing was conducted in 900 ml of distilled water at 37±0.5ºC using the USP II paddle method. The matrices were fixed to the paddle of the USP dissolution apparatus before it was immersed in the media (Sotax AT7).
The testing was conducted at a high level of media agitation (150 rpm) in order to see more clearly the critical points of the system.
Samples were withdrawn after 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 hours and analysed via UV spectrophotometry (Hitachi U-2000) at a wavelength of 278 nm. The testing was performed in three replicates.

- Determination of the release mechanism

Release data analyses were performed using Higuchi (1963), Korsmeyer et al. (1983), Peppas & Sahlin (1989) equations and SYSTAT program. Linear (Higuchi) and non-linear least squares fitting methods were used to determine the optimum values for the parameters included in each equation (1, 8).

Results and Discussion

The data shown in Tables 3 and 4 seem to indicate a critical point below 13.8 % v/v HPMC K100LV CR, i.e., between the blue and yellow lines in Figure 1.

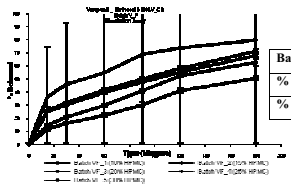


Figure 1. Dissolution Profiles for Batch HPMC K100LV CR - Maximum Force Batch. Porosity between 5 and 10%

Table 3. Polymer concentration and initial porosity for the batches shown in Figure 1, containing HPMC K100LV CR

Batch	CF2	CF3	CF4	C5
% w/w HPMC	13.797	18.828	24.112	28.723
% Initial Porosity	10.6345	7.9589	5.1097	5.2135

Table 4. Kinetic Parameters for the batches shown in Figure 1, containing HPMC K100LV CR

VF	HIGUCHI		ORDEN CERO		KORSMEYER			SAHLIN Y PEPPAS		
	b	r²	b	r²	K	n	r²	Kd	Kr	r²
1	5.5506	0.9823	0.4136	0.9871	15.213	0.324	0.995	12.292	-0.39	0.996
2	4.5519	0.9941	0.2617	0.9908	6.804	0.439	0.995	6.762	0.042	0.995
3	4.5434	0.9934	0.3053	0.9973	7.014	0.442	0.995	7.025	0.051	0.996
4	4.1763	0.9756	0.2418	0.9866	1.67	0.655	0.988	2.097	0.355	0.99
5	5.2212	0.9869	0.2993	0.9783	2.542	0.619	0.995	3.194	0.389	0.995

Table 5 and 6 show no critical behaviour, so we could expect a critical point below 13 % v/v K100LV CR.

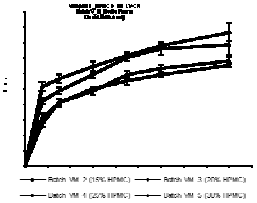


Figure 2. Drug dissolution from HPMC K100LV CR - Medium Force Batch. Porosity between 15 and 20%

Table 5. Polymer concentration and initial porosity for the batches shown in Figure 2, containing HPMC K100LV CR

Batch	CV2	CV3	CV4	CV5
% v/v HPMC	13.009	16.745	21.574	25..510
% Initial Porosity	15.740	18.142	15.097	15.816

Table 6. Kinetic Parameters for the batches shown in Figure 2, containing HPMC K100LV CR

VM	HIGUCHI		ORDEN CERO		KORSMEYER			SAHLIN Y PEPPAS		
	b	r²	b	r²	K	n	r²	Kd	Kr	r²
2	3.3512	0.9982	0.2845	0.9976	26.61	0.223	0.997	16.267	-0.792	0.982
3	4.3961	0.998	0.3733	0.9978	19.995	0.27	0.992	14.217	-0.615	0.994
4	3.5335	0.9694	0.1949	0.8901	14.608	0.291	0.996	11.012	-0.436	0.999
5	4.239	0.9474	0.232	0.8599	12.25	0.338	0.989	10.381	-0.351	0.993

Tables 7 and 8 show that for the tablets prepared applying the low force level, the results show a critical point between 11.3 and 14.3 % v/v K100LV CR.

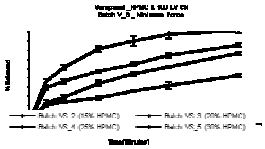


Figure 3. Drug dissolution from HPMC K 100LVCR - Minimum Force batch. Porosity between 20 and 25%

Table 7.Polymer concentration and initial porosity for the batches shown in Figure 3

Batch	CS2	CS3	CS4	CS5
%V/V HPMC	11.318	14.305	19.549	23.650
% Initial Porosity	26.692	30.071	23..064	21.953

Table 8. Kinetic Parameters for the batches shown in Figure 3

VS	HIGUCHI		ORDEN CERO		KORSMEYER			SAHLIN Y PEPPAS		
	b	r²	b	r²	K	n	r²	Kd	Kr	r²
2	9.7079	0.999	1.0383	0.999	21.863	0.305	0.987	17.388	-0.672	0.995
3	4.5786	0.999	0.3381	0.9869	15.088	0.33	0.997	11.993	0.329	0.993
4	5.7593	0.997	0.3836	0.9837	5.224	0.515	0.999	6.009	0.233	0.999
5	3.33	0.9646	0.1949	0.9963	5.122	0.438	0.984	4.988	0.043	0.985

Conclusions

Although different porosities and compression forces have been employed, the obtained release profiles are compatible with a common critical point around 11.3 - 13% v/v K100LV CR, indicating the robustness of this parameter.

As percolation theory predicts, the studied properties show a critical behaviour as a function of the volumetric fraction of the components, which can be attributed to the polymer percolation threshold. Above this point, a sample spanning gel layer will exert a stronger control of the release rate.

References

(1) A. Miranda, M. Millán, I. Caraballo, International Journal of Pharmaceutics**, 311,** (1), 75-81 (2006).

(2) A. Miranda, M. Millán, I. Caraballo**,** J. Pharm. Sci.**, 96,** (10), 2745-2756 (2007)**.**

(3) I. Fuertes, A. Miranda, M. Millán, I. Caraballo, Eur. J. Pharm. Biopharm**., 64, (3) 336-342 (2006).**

(4) T. Gonçalves, 2007. Percolation Threshold in hydropilic matrix obtained by Ultrasonic Assisted Compression and in Industrial Formulation. PhD Thesis. University of Seville, Spain.

(5) T. Gonçalves, A.R. Rajabi-Siahboomi and I. Caraballo**.** Int. J. Pharm., 361, (1-2), 112-117 (2008).

(6) T. Higuchi**.** J. Pharm. Sci., 1963; 52: 1145-1149.

(7) Korsmeyer**.** Int. J. Pharm., 1983; 15: 25-35.

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA LÁGRIMA ARTIFICAL PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE OJO SECO.

Vicario de la Torre M.[1], Benítez del Castillo, J. M[2]., Vico E.[2], Guzmán M[3]., de las Heras B[4]., Herrero-Vanrell R.[1], Molina-Martínez I.T.[1]

[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, España.

[2] Departamento de Oftalmología, Hospital Universitario San Carlos, Madrid, España

[3] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España.

[4] Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, España.

Introducción

El síndrome de ojo seco (SOS) se considera un conjunto de problemas que surgen a partir de la alteración de la película precorneal. Esta película precorneal está constituida por una capa exterior lipídica, que separa la superficie ocular del ambiente externo, y una capa interna constituida por una mezcla de componentes acuoso-proteicos y mucinosos que se combinan dando lugar a un gel hidratado. La capa lipídica impide la evaporación de los componentes acuosos.

Una película precorneal sana permite que se lleven a cabo las funciones de lubricación, protección, limpieza, hidratación y nutrición de la superficie ocular. De esta manera las propiedades ópticas de la misma son óptimas[1].

Actualmente las formulaciones más novedosas destinadas a los pacientes de ojo seco van encaminadas a la estabilización de la película precorneal mediante la incorporación de agentes lipídicos y acuosos.

El objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo de una formulación de administración tópica ocular que aumente la estabilidad de la película precorneal y, por tanto, mejore los síntomas del SOS. La formulación está compuesta por liposomas (nanosistemas farmacéuticos) que se dispersan en una solución acuosa de ácido hialurónico (polímero bioadhesivo). El resultado final es una formulación oftálmica cuyas propiedades físico-químicas son similares a las de la película precorneal.

Materiales y Métodos

Componentes básicos de los liposomas

Fosfatidilcolina (FC) procedente de lecitina de soja (Phospholipon 90G® Phospholipid GMBH), Colesterol (Col), α-tocopherol (vit.E) y cloruro de benzalconio (Sigma Chemical Co. St. Louis), Trehalosa de Cymit Química S.L. (Barcelona, Spain) Hialuronato sódico (HNa grado oftálmico) de peso molecular 400.000-800.000 Da (Abaran Materias Primas S.L.). Conejos albinos macho de Nueva Zelanda, de entre 3-3,5kg de peso.

Método de preparación de los liposomas

Los liposomas se han preparado por la técnica de Bangham[2], modificada por Benítez y col.[3] Como componentes lipídicos de la formulación se emplean FC, Col y vit.E (en relación 8:1:0,08). Después de la extrusión, los liposomas se dispersaron en una solución hipotónica de ácido hialurónico (0,2%). La tonicidad de la formulación (184.5 ± 0.17 mOsm/l) se ajustó con trehalosa. La concentración final expresada en contenido de FC de esta formulación es de 10mg/ml.

Caracterización físico-química de la formulación de liposomas

Las formulaciones ensayadas se mantuvieron en reposo un mínimo de 24 horas con el fin de asegurar la hidratación completa de las vesículas lipídicas. Se ha determinado la tensión superficial (tensiómetro K11 KRÜSS GmbH, Alemania) y la osmolaridad (osmómetro de vapor Knauer K-7000, Alemania). Las dos determinaciones se realizaron a 33º C (temperatura de la superficie corneal). También se analizó el pH (pH- Meter MP 230, Mettler, Toledo, España) realizando las medidas a temperatura ambiente.

Estudios de tolerancia in vitro

Se estudió la tolerancia *in vitro* de la lágrima artificial propuesta en una línea celular línea de cornea humana (Human Corneal-Limbal Epithelial Cell) [4] y en una línea celular de conjuntiva IOBA-NHC utilizando la técnica de reducción a nivel mitocondrial, de la sal de bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazolio (MTT) a formazán[5]. El ensayo se realizó a corto (15 minutos) y largo plazo (2 y 4 horas). Se empleó como control negativo de viabilidad (100%) las células sin tratar y como control positivo las células tratadas con una solución de cloruro de benzalconio al 0,005%.

Tolerancia in vivo de la formulación de liposomas

El estudio de la tolerancia se llevó a cabo en seis conejos macho. Cada animal, en una jaula individual, con acceso libre a comida y bebida y con ciclos controlados de luz y oscuridad de 12 horas de duración cada uno de ellos. Los ensayos realizados cumplen la normativa de ARVO para el uso de animales (ARVO

Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research) y con la directiva correspondiente de la comunidad europea (European Communities Council Directive (86/609/EEC)).

La formulación liposomal se administró en el *cul-de-sac* de los conejos. Se administraron 10µl de la formulación de liposomas en el ojo derecho y 10 µl de una solución salina isotónica (NaCl 9‰) en el ojo izquierdo, utilizado como control, cada 30 minutos durante 6 horas. Se evaluaron síntomas y signos clínicos de acuerdo con un protocolo previamente descrito[6]. Los tiempos estudiados fueron los siguientes: (1) antes de realizar la primera instilación, (2) a las 3 horas; (3) a las 6 horas y (4) a las 24 horas después de la primera instilación. El examen macroscópico de tolerancia de la formulación se graduó de 0 a 2 indicando ausencia o presencia de los siguientes signos clínicos: pérdida de la transparencia de la córnea, alteraciones en la conjuntiva (hiperemia, edema), párpados (inflamación) y parpadeo intenso (ausencia de tolerancia).

Resultados y Discusión

Caracterización físico-química de la formulación de liposomas

La formulación liposomal presentó un valor de pH adecuado, próximo a la neutralidad.

El valor de tensión superficial de la dispersión de liposomas fue de 25,5mN/m. La hipotonicidad de la formulación (188,5 mOsm/l) permite equilibrar la hiperosmolaridad que aparece en este síndrome retornando a valores de osmolaridad más fisiológicos[7].

Tabla 1. *Valores de pH, tensión superficial y osmolaridad para la formulación de liposomas.*

Parámetro	
pH	7.04 ± 0.5
Tensión Superficial (mN/m)	25.5 ± 0.3
Osmolaridad (mOsm/l)	188.5 ± 0.4

Ensayos in vitro de la lágrima artificial

La viabilidad celular de la formulación resultó siempre superior al 80% en los tres tiempos ensayados.

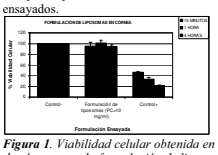


Figura 1*. Viabilidad celular obtenida en células de córnea para la formulación de liposomas*

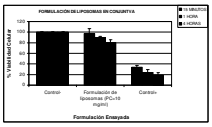


Figura 2*: Viabilidad celular obtenida en células de conjuntiva la formulación de liposomas*

Tolerancia in vivo de la formulación de liposomas

Antes de la instilación, ningún animal presentó signos clínicos anormales. La tolerancia a la lágrima artificial se mantuvo constante (grado cero) para todos los signos clínicos estudiados a las 3, 6 horas y 24 horas después de haber realizado la primera instilación.

	Grado 0
Molestia	Ausencia de molestia
Córnea	No alteraciones
Conjuntiva	No alteraciones
Descarga	No se produce
Párpados	Ausencia de inflamación

Conclusiones

La formulación liposomal desarrollada presenta unas propiedades fisicoquímicas similares a las de la película precorneal. Los estudios de viabilidad celular y de tolerancia *in vivo* indican una tolerancia óptima para la lágrima artificial propuesta.

Bibliografía

(1) Brewitt H, Sistani F. Surv Ophthalmol 2001; 45:S199-S202.

(2) Bangham, A.D. Standish, M.M. and Watkins, J.C. J. Mol. Biol.; 13: 238-252, 1965.

(3) J.M. Benitez et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 8: E-Abstract 375, 2007.

(4) Gipson I.K., Spurr-Michaud S., Argüeso P., Tisdale A., Fong Ng T., Leigh Russo C. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: 2496-2505, 2003.

(5)Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Araki-Sasaki K, Watanabe H, and Urtti A. Pharm. Res. 1998; 15 (8): 1275-80.

(6)Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, Seijo B, Alonso MJ. Biomaterials, 28(8):1553-64 (2007)

(7) Tomlinson A. T. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47 (10) Oct. 2006

Agradecimientos

Grupo de Investigación UCM 920415 CCG07-UCM/MAT-2594, FIS (PI07/0012 y FIS (PI07/0043).

GM-AOT MICROPARTICLES TO TREAT INTRACELLULAR PATHOGENS

D. González[1], E. Imbuluzqueta[1], G. Pérez[1], E. Elizondo[2], N. Ventosa[2], J. Veciana[2], C. Gamazo[3], M. J. Blanco-Prieto[1]

[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, Pamplona 31080, Spain

[2] Molecular Nanoscience and Organic Materials Department. Institut de Ciència de Materials de Barcelona, Campus de la UAB s/n 08193-Bellaterra Barcelona, Spain

[3]Department of Microbiology, University of Navarra, Pamplona 31080, Spain

Introduction:
Brucellosis is a worldwide zoonosis caused by different species of the genus *Brucella. In vivo* the pathogen is mainly localized in cells and organs of the mononuclear phagocytic system such as macrophages of the spleen and the kupffer cells of the liver. The ability of this pathogen to survive and multiply within macrophages difficult the antibiotic access to its niche and relapses remain a problem.

To overcome these difficulties, gentamicin (Gm) loaded into drug delivery systems has been studied with promising results (1, 2). Previously we have shown that Gm-PLGA [poly(lactide-co-glycolide)] microparticles are suitable for the treatment of an experimental brucellosis in mice (3), nevertheless Gm loading improvement would be necessary before the formulation could be used for the treatment of human brucellosis. To achieve this goal, a hydrophobic Gm (Gm-AOT) has been synthesized and encapsulated in PLGA microparticles prepared by the emulsion solvent evaporation method. The activity of free Gm-AOT and loaded Gm-AOT particles was studied *in vitro* against *B. melitensis*. Moreover, microparticles were further characterized in terms of loading and *in vitro* release kinetics.

Experimental methods:
Preparation of Gm-AOT particles
PLGA 752H (Boeringher) was used for the microparticle preparation. Gentamicin-AOT (patent application 7-12-2007 OEP, figure 1) was dissolved in an organic solution of dicloromethane containing the polymer and poured on a water phase containing polyvinilalcohol. Both phases were emulsified by sonication and the emulsion (O/W) was stirred for at least 3 hours in order to evaporate the organic solvent. Microparticles were collected by centrifugation, washed 3 times with distilled water and freeze-dried. For comparison, Gm-Sulfate microparticles were also prepared by a water-oil-water solvent evaporation technique (4).

Particle size characterization
Particle size was determined by laser diffractometry (PCS) using a MasterSizer (Malvern Instruments, UK).

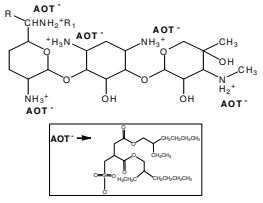


Figure 1. Chemical structure of Gm-AOT

Determination of encapsulated gentamicin
Ten mg of particles were dissolved in 0.1 M NaOH solution and stirred during 5 h. Samples were centrifuged at 25000 x g during 15 min. The supernatant was centrifuged again (16000 x g 10 min) in order to eliminate the traces of polymer. The encapsulated aminoglycosides were quantified by a fluorescence method. The aminated antibiotic (gentamicin) reacts with o-phtaldehide in presence of β-mercaptoethanol, forming a product that is detected by fluorescence spectroscopy (conditions: excitation wavelength 340 nm, emission wavelength 450 nm).

In vitro release studies
The *in vitro* antibiotic release profiles were obtained by the incubation of formulations in 1.5 ml of PBS (pH 7.4, 37 ºC) preserved with 0.02 % of sodium azide.
The vials were fixed horizontally in a shaker at 37 ºC. Samples were withdrawn at regular time intervals after centrifugation and replaced by fresh medium. Gm-AOT and Gm-Sulfate released into the supernatant was quantified by fluorescence spectroscopy as previously described.

Determination of the gentamicin activity
In order to asses the activity of both Gm either free or encapsulated in PLGA microparticles the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined following the protocol normalized by the CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) was used.
Firstly, serial double dilutions of the different types of gentamicin and of loaded particles in 96 well plates were made. A known inoculum of *B. melitensis* 16 M was added to each well with medium that would allow its growth.
These plates were incubated at 37 ºC during 2-3 days and after, bacterial growth was assessed. The last well with no bacterial growth observed corresponds to the MIC of the antibiotic.

Results an discussion: Gm-Sulfate loaded PLGA (752H) microparticles presented a homogenous size of 1.45 µm and a drug loading of 11.17 µg/mg particles, whereas Gm-AOT loaded PLGA (752H) microparticles showed a size of 1.75 µm and 46.12 µg of drug charge per mg of particle. The encapsulation efficiency for GM-Sulfate was 23.20 % while for the Gm-AOT was 97.33 %. Results indicated that with the Gm-AOT complex both a higher encapsulation efficiency and a higher load of antibiotic for mg of particle was obtained.

The cumulative *in vitro* release profiles of Gm-Sulfate and Gm-AOT are shown in figure 2.

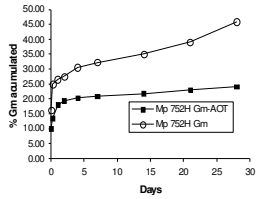


Figure 2. In vitro release of Gm-Sulfate and Gm-AOT from PLGA microparticles in PBS at 37 ºC.

For Gm-AOT, after an initial burst of 10%, a continuos Gm-AOT release was observed for up to four weeks. At 28 days, 23% of the antibiotic was released. On the other hand, the release of Gm-Sulfate from microparticles was faster. After 28 days, almost 50% of the encapsulated drug was released. The results then show that the drug release depends on the physico-chemical characteristics of the encapsulated drug.
In order to assess the activity of either free Gm or Gm loaded particles a MIC study was performed. As shown in figure 3, the MIC against *B. melitensis* 16M for all the tested compounds (Gm, Gm-AOT, Gm-AOT loaded PLGA 725H particles, and Gm loaded PLGA 725H particles) was 0.125 µg/mL, suggesting that Gm-AOT is as effective as Gm-Sulfate.

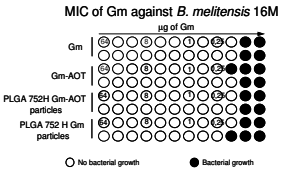


Figure 3. The Minimal Inhibition Concentration (MIC) of free and encapsulated GM-Sulfate and GM-AOT against B. melitensis 16 M.

Conclusion:
- Microparticles prepared with Gm-AOT showed higher encapsulation efficiency and lower *in vitro* release kinetics as compared to Gm-Sulfate.
- The indicated modified forms of Gm did not interfere with the antibiotic antibacterial activity.

The results obtained in this work are encouraging to consider the use of Gm-AOT loaded PLGA 752H particles as an alternative treatment for susceptible intracellular bacterial infections, like *Brucella* infections.

References:
(1) C. Gamazo, et al. Expert Opin. Drug Deliv., 4: 1 (2007)
(2) C. Lecaroz, et al. J. of Nanoscience and Nanotechnology. 6: 3296 (2006)
(3) C. Lecaroz, et al. Antmicrob. Agents Chemother. 51:1185 (2007)
(4) M. J. Blanco-Prieto, Int. J. Pharm. 242: 203 (2002)

Acknowwledgements:
This work was supported by *Ministerio de Ciencia e Innovación* from Spain (NAN2004-09159-C04-03) and Caja Navarra Foundation.

SOLUBILITY BEHAVIOUR OF ALLOPURINOL IN AMPHIPROTIC AND AMPHIPROTIC-APROTIC MIXTURES

A. B. Sánchez, M.A. Peña, P. Bustamante, B. Escalera
* Departament of Farmacia and Tecnología Farmacéutica, Faculty of Farmacia, University of Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain.

Introduction: Allopurinol is a structural isomer of hypoxantine, used in the treatment of the gout primary hyperuricemia.
Solubility studies constitute an indirect method for determining the solubility parameter of solids (1). The solubility of allopurinol was measured at several temperatures (15-35ºC) in solvent mixtures covering a wide polarity range. Different solubility profiles may be obtained for the solubility of drugs against the solubility parameter, δ of the solvent mixtures. The curves may show a single solubility peak and, in other cases, two or more maxima (2).
Bustamante and coworkers (3, 4) proposed a modification of the Hildebrand equation to predict curves with two maxima:

$$\ln X_2 = c_0 + c_1\delta_1 + c_2\delta_1^2 + c_3\delta_{1a} + c_4\delta_{1b} + c_5\delta_{1a}\delta_{1b} \quad \text{eq.1}$$

where X_2 is the mole fraction solubility of the drug and δ_1 is the solubility parameter of the solvent mixtures. The δ_{1a} and δ_{1b} parameters express the acidic (proton donor) and basic (proton acceptor) capacity of the solvent as defined by Karger (5). The constants c_0 to c_5 are obtained from multiple regression analysis.
The aim of this work is to predict the two-peak solubility curve found for allopurinol in the polarity range covered by the three solvent mixtures used.
Materials and Methods: Solute: allopurinol, 1,5-dihydro-4H-pyrazolo [3,4-d] pyrimidin-4-one (Sigma-Aldrich, Germany, Figure 1). Solvents: water, hexane, ethyl acetate and ethanol (spectrophotometric degree, Panreac, Monplet & Esteban, Spain).

Figure 1. *Molecular structure of allopurinol*

The solubility of allopurinol was measured at 15-35°C, in water-ethanol, ethanol-ethyl acetate and ethyl acetate-hexane. An excess solute was mixed with 50 mL solvent and allowed to reach equilibrium in a constant temperature shaking bath (Heto SH 02/100, Denmark; ± 0.1°C). The non-dissolved solid phase was separate by filtration (Durapore membranes, 0.2 µm pore size, Millipore Ibérica S.A., Spain). The clear solutions were assayed in a double been spectrophotometer (Shimadzu UV-2001PC, USA), at λ=209 nm.
The densities of the solutions were determined in 10-mL pycnometers at all temperatures.
The solubilities are the average of three determinations. The coefficient of variation was within 3%.
Results and Discussion: Figure 2 shows that the solubility of allopurinol increases with temperature, meaning that heat is absorbed in the dissolution process (endothermic enthalpy of solution)
The shape of the solubility profile does not change with temperature at the polarity range employed (from hexane, δ_1 = 14.93 $MPa^{1/2}$ to water, δ_1 = 47.97 $MPa^{1/2}$).

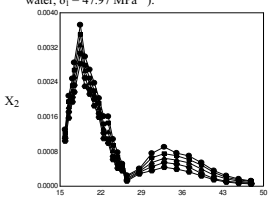


Figure 2. *Experimental mole fraction solubilities (X_2) of allopurinol in water-ethanol (δ_1 = 47.97 to 26.51 $MPa^{1/2}$), ethanol-ethyl acetate (δ_1 = 26.51 to 18.49 $MPa^{1/2}$) and ethylacetate-hexane (δ_1 = 18.49 to 14.93 $MPa^{1/2}$) mixtures.*

Table 1 lists the solubility parameter and the acidic and basic partial solubility parameters for the solvent mixtures. The solubility curve is asymmetrical (Figure 2) and the solvent power of the mixture showing intermediate polarity values (ethanol-ethyl acetate) is larger than that of the most polar mixture (ethanol-water). Going from the right to the left of Figure 2 (decreasing polarity values), the solubility of allopurinol increased to a maximum (70:30 v/v ethanol:water, δ_1=32.92 $MPa^{1/2}$). The profile displayed a minimum at 100% ethanol. Then the solubility values increased again to a second maximum (100:0 v/v ethyl acetate:ethanol, δ_1=18.49 $MPa^{1/2}$). No maximum was observed when the polarity was further lowered by adding hexane to ethyl acetate. The solubility monotonically decreases in the least polar mixture (δ_1 values between 15.87 and 17.45 $MPa^{1/2}$).

Table 1. *Solubility parameter*

Solvents	% solvent	δ_1 [a]	δ_a [b]	δ_b [c]
Water-ethanol	0	47.86	13.70	65.45
	0.1	45.72	14.03	60.03
	0.2	43.59	14.35	54.61
	0.3	41.45	14.68	49.49
	0.4	39.32	15.01	43.77
	0.5	37.18	15.34	38.35
	0.6	35.05	15.66	32.93
	0.7	32.91	15.99	27.51
	0.8	30.78	16.32	22.09
	0.9	28.64	16.65	16.67
	1	26.51	16.97	11.25
Ethanol-ethyl acetate	0.9	25.70	16.36	10.51
	0.8	24.90	15.75	9.77
	0.7	24.10	15.13	9.04
	0.6	23.30	14.51	8.30
	0.5	22.5	13.90	7.56
	0.4	21.69	13.29	6.83
	0.3	20.89	12.68	6.09
	0.2	20.09	12.06	5.35
	0.1	19.29	11.45	4.62
	0	18.49	10.84	3.88
Ethyl acetate-Hexane	0.2	17.45	8.67	3.10
	0.3	17.14	7.58	2.71
	0.5	16.51	5.42	1.94
	0.7	15.87	3.25	1.16

a) solubility parameter, b) acidic parameter; c) basic parameter; calculated for each solvent mixture from expression: $\delta_m = \Sigma\delta_i\Phi_i$, ($\delta_i$ is the value of the pure solvent and Φ_i the volume fraction of the solvent in the solvent mixture).

Allopurinol shows a "chamaleonic behavior" like that Hoy described in a qualitative way for acetic acid (6), a compound which is soluble in higher and lower polarity media. Equation 1 tried to explain this behavior in a quantitative way for the first time, using the hydrogen bonding parameters δ_{1a} and δ_{1b}, related to the Lewis acid and Lewis base characteristics of the solvent. Besides, the model includes the Hildebrand solubility parameter and a constant contribution from the solid phase in the intercept. The regression equations obtained from Eq. 1 are:

35ºC
$\ln X_2 = -6.9392\ (\pm 2.5) + 0.2713\ (\pm 0.2)\delta_1 - 2.033\ 10^{-2}\ (\pm 0.02)\delta_1^2 + 0.0982\ (\pm .0005)\delta a + 0.7557\ (\pm 0.09)\delta b - 2.1813\ 10^{-2}\ \delta a\ \delta b\ (6.5\ 10^{-5})$
r^2=0.98, n=27, F=169.9, t>2, RMSE=0.16 eq.2

25ºC
$\ln X_2 = -6.4494\ (\pm 2.5) + 0.2308\ (\pm 0.2)\delta_1 - 2.037\ 10^{-2}\ (\pm 0.02)\delta_1^2 + 0.1072\ (\pm .0002)\delta a + 0.7653\ (\pm 0.5\ 10^{-2})\delta b - 2.1363\ 10^{-2}\ \delta a\ \delta b\ (6.3\ 10^{-5})$
r^2=0.98, n=27, F=210.31, t>2, RMSE=0.15 eq.3

The predicted values from Eqs. 2 and 3 reproduced the two peaks at both temperatures (Table 2 and Figure 3).
The signs obtained on the regression coefficients agree with those expected from the model (Eq. 1) allowing a physical interpretation of the factors that influence solubility. The positive signs on some coefficients can be related to favorable solute-solvent interactions that increase solubility: nonspecific (δ_1) and hydrogen bonding (δ_a and δ_b) On the contrary, the negative sign on the coefficients associated to δ_1^2 and the product $\delta_a\ \delta_b$ are related to solvent-solvent interactions that decrease solubility.

Table 2. *Solubility mole fraction*

% (v/v)	X_2 [a]	X_2 [b]	X_2 [c]	X_2 [d]
0	0.00011	$9.2\ 10^{-5}$	$8.08\ 10^{-5}$	$6.3\ 10^{-5}$
0.1	0.00016	0.00017	0.00011	0.00011
0.2	0.00024	0.00028	0.00017	0.00020
0.3	0.00035	0.00047	0.00025	0.00034
0.4	0.00054	0.00056	0.00039	0.00041
0.5	0.00069	0.00067	0.00053	0.00049
0.6	0.00076	0.00071	0.00060	0.00054
0.7	0.00090	0.00069	0.00064	0.00052
0.8	0.00075	0.00060	0.00054	0.00045
0.9	0.00040	0.00046	0.00034	0.00035
1	0.00024	0.00032	0.00017	0.00024
0.9	0.00051	0.00049	0.00044	0.00038
0.8	0.00077	0.00073	0.00059	0.00057
0.7	0.00108	0.00103	0.00080	0.00082
0.6	0.00160	0.00138	0.00123	0.00111
0.5	0.00160	0.00176	0.00132	0.00145
0.4	0.00202	0.00216	0.00178	0.00180
0.3	0.00237	0.00252	0.00208	0.00214
0.2	0.00268	0.00281	0.00236	0.00242
0.1	0.00298	0.00300	0.00265	0.00262
0	0.00371	0.00305	0.00324	0.00271
0.2	0.00284	0.00306	0.00252	0.00274
0.3	0.00247	0.00270	0.00217	0.00241
0.5	0.00208	0.00196	0.00182	0.00174
0.7	0.00130	0.00130	0.001181	0.00115

a) experimental solubility at 35°C, b) calculated solubility with eq.2, c) experimental solubility at 25°C, d) calculated solubility with eq.3

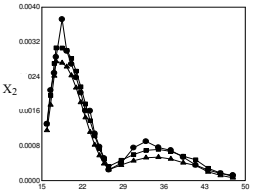


Figure 3. *Solubility (X_2) in woven mixtures. Experimental mole fraction solubilities (▲) with eq. 2 (●) and eq. 3 (■).*

References:
(1) James K. C. In: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, vol. 28, Marcel Dekker, N York, 1986.
(2) Peña M.A. et al., *Int. J. Pharm.* **321:**155-161, 2006.
(3) Escalera J.B. et al., *J. Pharm. Pharmacol*, **45**: 253-257, 1993.
(4) Bustamante P. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **42:**1129-1133, 1994.
(5) Karger B.L. et al., *J Chromatogr.*, **125:** 71-74, 1976.
(6) Hoy K., *J. Paint Tech.*, **42**:76-118, 1970.

RELEASE OF P-AMINOBENZOIC ACID AND NAPROXEN FROM EUDRAGIT RS PO MATRICES AS RELATED TO POLARITY

N. Aragón, P. Bustamante, B. Escalera, M. A. Peña.
* Departament of Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Faculty of Farmacia, University of Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain.

Introduction

It is well known that the controlled drug delivery systems are key in new dosage form research. The purpose is to reach the therapeutical target, increasing the effectiveness of the drug. These systems allow obtaining more comfortable dosing interval reducing the intake frequency and minimizing the plasma drug concentration fluctuations at the steady state. Polymers are of particular importance in oral dosage forms (1).

The purpose of this work is to relate the delivery of p-aminobenzoic acid (PABA) and naproxen from Eudragit RS PO matrices to drug polarity. This polymer is used for controlled drug delivery systems.

Materials

Eudragit RS PO (Degussa), p-aminobenzoic acid (PABA) and naproxen (Sigma). MiliQ water and ethanol (spectrophotometric degree, Panreac).

Methods

1. Tablet preparation

The tablets are loaded with 100 mg of each drug, using Eudragit RS PO as diluent excipient that controls the delivery. Magnesium stearate is added as the lubricant, and silicon dioxide (Aerosil) as antiadherent. The raw materials are weighed and mixed in a porcelain mortar by the method of the successive dilutions. The mixed powders are compressed in a Bonal eccentric machine. The tablet diameter is 12 mm.

2. In vitro drug dissolution studies

The basket dissolution apparatus described in the RFE is used (2). The glasses have a nominal capacity of 900 millilitres, and are equipped with a cover to avoid evaporation. Three tablets for each drug are used. The temperature is kept at 37±0.5°C in a thermostated bath, and the agitation rate is 100 rpm. Ten samples are taken at time intervals previously selected, replacing the lost volume with distilled water. The samples are diluted with 96% ethanol, and the absorbance is measured in a UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-2001PC, Japan). The absorbance units are corrected for medium dilution (3). The absorbance-concentration relationships are obtained at the maximum absorption wavelength, at the concentration range where the Lambert-Beer law is valid. The amount of dissolved drug as a function of time is expressed in percentage of the initial load.

Results and discussion

The Higuchi and Peppas models are used to fit the delivery results (4). Table 1 includes the constants obtained for the models and the solubility parameter δ $(MPa)^{1/2}$ of the drugs. This parameter is used as a measurement of drug polarity. The highest values correspond to the more polar substances. The time range (minutes) used to calculate the constants of both models is also included.

Table 1: *Constants of the models and solubility parameter (δ) of the drugs.*

Figure 1 shows the drug per cent released against the square root of time, according to the Higuchi model. The coefficients of determination obtained are similar for both drugs (r^2 ranges between 0.990 and 0.997).

The Higuchi constant Kh (that corresponds to the slope of the straight lines of Figure 1) is lower for Naproxen (Kh = 1.539) than for PABA (Kh = 19.03, Table 1). That is to say, the release rate is higher for the most polar drug (largest solubility parameter value). Figure 2 shows the logarithmic relationship of the percentage drug released against time, according to the Peppas model. The linear fit is similar to that obtained with the Higuchi model (r^2 ranges between 0.992-0.997). The antilogarithm of the straight line intercepts (Figure 2) provides the Kp constants of the exponential model (Table 1). The release constant is lower for naproxen (Kp = 0.599), than for PABA (Kp = 2.635). The results are similar to those obtained with the Higuchi model; the release rate is higher for the drug showing larger solubility parameter value.

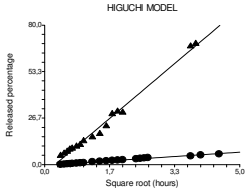


Figure 1*. Drug per cent released versus the square root of time, ▲ (PABA), ● (Naproxen).*

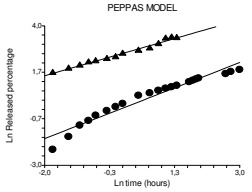


Figure 2. *Ln of drug per cent released versus Ln of time. ▲ (PABA), ● (Naproxen).*

Figure 3 compares the variation of the constants Kp and Kh of both models.

The exponent n of the Peppas model (Table 1) is used to analyse the relative importance of diffusion and erosion in the drug release mechanism (4). The n values are between 0.45 and 0.89, indicating contribution of both diffusion and erosion processes. Diffusion is the main mechanism for naproxen (the exponent is nearer n = 0.45) whereas the contribution of matrix erosion is larger in the case of PABA (the n value is higher)

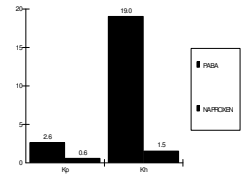


Figure 3*. Bar Chart showing the variation of the release constants Kp and Kh (the values are given inside the plot)*

On the other hand, the n exponent is higher for the least polar drug (naproxen, lower solubility parameter value, Table 1). This result agrees with that observed by Kim and Fassihi (5) for other drugs, where the n exponent increased as the solubility of the drug was lowered.

References

(1) Smith A et al., *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **2**:225-227, 1999.
(2) Real Farmacopea Española. 2005
(3) Ahuja N., *Eur. J. Pharm. Bio.* **65**:26-38, 2007.
(4) Siepmann J., et al., *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **48**:139-157, 2001.
(5) Kim H., et al., *J. Pharm. Sci.*, **86:** 323-328, 1997.

THERMOGRAMS OF THE SOLID PHASES OF THEOPHYLLINE AFTER EQUILIBRATION WITH ETHANOL-WATER

M.A. Peña., P. Bustamante, A. Reíllo
* Departament of Farmacia and Tecnología Farmacéutica, Faculty of Farmacia, University of Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain.

Introduction: Differential scanning calorimertry (DSC) is frequently the pharmaceutical thermal analysis technique of choice because of its ability to provide detailed information about both the physical and energetic properties of a substance (1).

This research is focused on the influence of aqueous mixtures on the DSC pattern of theophylline, a methylxanthine used as bronchodilator.

Solvates in pharmaceutics are generally unwanted as organic vapours remain and would cause unnecessary impurities. Usually the trapped solvent is present at an exact molar ratio with the crystal, e.g. monohydrate, one water molecule to one crystal. The properties greatly differ between the hydrates and anhydrous forms. Unlike polymorphism, hydrates may show faster or slower dissolution rate. Commonly the dissolution rate of the anhydrous form is faster.

Materials and Methods: Solute: theophylline (Figure 1), 1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dione (Sigma-Aldrich, Germany). Solvents: water and ethanol (spectrophotometric degree, Panreac, Monplet & Esteban, Spain).

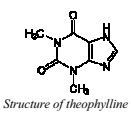


Figure 1. *Structure of theophylline*

The melting point (T_f) and the molar heat of fusion (ΔH_f) of the original powder were determined by DSC (Mettler TA 4000, Switzerland) using pans with approximately 5 mg of samples and a nitrogen gas purge. The experiment was first run from room temperature to 500ºC, (heating rate 10ºC/min), to observe the behavior in a wide temperature range, including possible endothermic or exothermic effects above fusion. The thermograms of each solid phase were determined before and after equilibration with water-ethanol mixtures to detect possible solid phase changes. Following the criteria of several authors in this field (2-5) all the samples were dried at ambient temperature until constant weight before being analyzed. This procedure prevents the removal of solvent loosely bound to the crystal that may affect the thermal behavior of the solid phase.

Indium/zinc/lead standards were used to calibrate the DSC temperature and enthalpy scale.

Results and Discussion: Figure 2 shows the thermogram for the original powder. The melting point (272ºC) of theophylline is measured at the onset (Figure 2) because it is not influenced by mass. The corresponding molar heat of fusion is 29.64 KJ/mol.

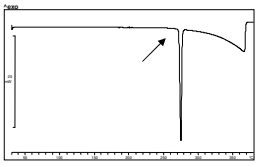


Figure 2. *Thermogram of theophylline.*

The peak of fusion is immediately followed by a broad endotherm (Figure 2).

Table 1. *Temperature and heat of fusion of the solid phases of theophylline*

% Ethanol	T_f (ºC)	ΔH_f (J/g) [a)]
Original powder	272.03	164.52
0 %	271.73	139.13
10 %	271.54	126.06
20 %	271.94	148.18
30 %	271.76	135.79
40 %	271.61	160.75
50 %	271.93	154.77
60 %	271.73	138.97
70 %	272.01	144.90
80 %	271.88	196.75
85 %	272.82	173.67
90 %	271.89	164.04
100 %	271.89	152.13

a) Average of at least three determinations

The heat and temperatures of fusion did not significantly vary after equilibration with the solvent mixtures (Table 1). On the other hand, the heating rate did not vary the DSC profile. However, the mixtures containing 0-80% ethanol in water induce changes in the shape of the DSC profile. The second broad endotherm of Figure 2 becomes sharper and well separated

from the peak of fusion. Besides, two new endotherms appear before melting (Figure 3). To better separate these two peaks the experiments were run at 10°C/min using sealed pans. Figure 3 shows a sample of the DSC profile corresponding to 40% ethanol. The other thermograms obtained for 0-80% ethanol ratios are very similar to that shown in Figure 3. The onset temperatures of the peaks are listed in Table 2.

The first peak (72.5-87.25ºC, Table 2) can be attributed to dehydration of the hydrate formed in the presence of the aqueous mixtures, whereas the second peak (99.54-138ºC) corresponds to water evaporation. These results are close to the values reported for theophylline hydrates (6). The two peaks corresponding to dehydration and water evaporation were found at 79°C and 149°C, respectively.

Above 90% ethanol in water, the DSC profiles do not differ from that obtained for the original powder (Figure 2). This suggests that ethanol do not form solvates with theophylline in these solvent mixtures. In order to observe more thoroughly the transformation from the hydrate to the anhydrous form, an additional experiment was run at 85% ethanol. This concentration was chosen because it is within the region at which the phase change was observed (80-90% ethanol).

The two endothermic peaks characteristics of the hydrate (Figure 3) are almost imperceptible at 85% ethanol.

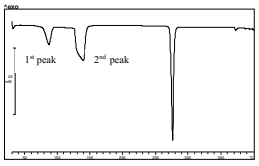


Figure 3. *Thermogram of theophylline (40% water-ethanol).*

Table 2. *Temperatures (ºC) of the new peaks after equilibration with water-ethanol mixtures*

% Ethanol	1st Peak	2nd Peak
0 %	87.2	122.3
10 %	79.9	121.5
20 %	80.4	120.2
30 %	80.2	117.8
40 %	78.1	138.0
50 %	79.1	125.9
60 %	79.2	127.6
70 %	77.3	122.6
80 %	72.5	99.5

The onset temperatures of these minute peaks cannot be accurately measured and are not included in Table 2.

The results agree with previous studies with a related drug, caffeine (7) after equilibration of the solid phase with ethanol-water mixtures. The hydrated form of caffeine appeared at 0-70% ethanol ratios and it converted into the anhydrous form at 80-100% ethanol ratios.

The results remark the importance of detecting solid phase changes that may alter dissolution rate and bioavailability of some drugs in dosage forms such as suspensions where solid and dissolved phases are equilibrium.

References:

(1) Clas S.D. et al., Hancock. Pharmaceutical Science and Technology Today 2 (8), 1999.
(2) Pfeiffer, R.R. et al., *J. Pharm. Sci.* **59**:1809-1814, 1970.
(3) Flynn, G.L. et al., *J. Pharm. Sci.*, **68**:1090-1097, 1979.
(4) Rubino, J.T. et al., *Pharm. Res.* **4**:220-230, 1987.
(5) Leiterman, R.V. et al., *J. Pharm. Sci.*, **84**:1272-1275, 1995.
(6) Phadnis, N.V., et al. *J. Pharm. Sci.*, ***86***:1256-1263, 1997.
(7) Bustamante P., et al., J. Pharm. Sci. **91**:874-883, 2002.

"NEUROFUZZY LOGIC": UNA HERRAMIENTA UTIL EN EL DESARROLLO DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN

Mariana Landín, R.C. Rowe y P. York

Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. e-mail: mlandin@usc.es

Introducción

Para el estudio y desarrollo de formulaciones farmacéuticas se recurre sistemáticamente a los diseños experimentales y a complicados tratamientos estadísticos, lo que exige del especialista en formulación una preparación de alto nivel en este campo. Una de las metodologías más utilizadas para la interpretación de los resultados derivados de este tipo de análisis es la de superficies de respuesta (SR). En general, su predicción se realiza en función de ecuaciones polinómicas de segundo grado obtenidas mediante regresión múltiple secuencial (RMS).

En la última década han comenzado a aplicarse los métodos de inteligencia artificial en el campo farmacéutico. En este sentido, las "Redes neuronales artificiales" (ANN) han resultado útiles para detectar complejas relaciones no lineales entre variables y respuestas, y ya han sido empleadas con éxito, por ejemplo, para la optimización de formulaciones [1]. Sin embargo, la interpretación de los ANN resulta en ocasiones difícil, lo que ha llevado al desarrollo de nuevas aproximaciones como los sistemas "neurofuzzy logic" o de "lógica difusa" que son mixtos y combinan la capacidad de aprendizaje de los ANN con la posibilidad de procesar información incompleta o no precisa, pero presentando simultáneamente capacidad para predecir de forma explícita y comprensible [2].

El trabajo que se presenta pretende poner de manifiesto la utilidad de un sistema "neurofuzzy logic" como herramienta para estudiar y desarrollar formas de dosificación. En concreto, se compararán las conclusiones derivadas de esta nueva metodología con las obtenidas a partir de un tratamiento estadístico convencional por RMS y análisis de SR en el estudio de comprimidos de compresión directa.

Materiales y Métodos

Se tomaron como base los datos incluidos en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio [3] en el que se presentaban los resultados de un estudio comparativo de dos variedades de celulosa microcristalina (Avicel PH101 and PH102) como diluyentes de compresión directa. Las características diferenciales de las 18 formulaciones elaboradas habían sido establecidas siguiendo un diseño factorial para tres variables: variedad de celulosa microcristalina (E) a dos niveles, porcentaje de prednisona (D) (fármaco modelo) a tres niveles y fuerza de compresión (F) a tres niveles.

Se evaluaron los coeficientes de variación de peso (CVP) de las formulaciones, así como sus propiedades mecánicas y de cesión. Adicionalmente y con el fín de interpretar los resultados obtenidos se estudiaron las propiedades microestructurales de los comprimidos.

Los modelos matemáticos desarrollados por regresión múltiple secuencial tomaron como base la ecuación polinómica de segundo grado general siguiente:

$$Y = b_0 + b_1 E + b_2 D + b_3 F + b_4 D^2 + b_5 F^2 + b_6 ED + b_7 EF + b_8 DF + b_9 EF^2 + b_{10} ED^2 + b_{11} DF^2 + b_{12} FD^2 + b_{13} F^2D^2 + b_{14} EDF + b_{15} EDF^2 + b_{16} ED^2F + b_{17} ED^2F^2$$

El ajuste se realizó introduciendo únicamente los términos significativos indicados por el ANOVA.

Para el tratamiento de los datos mediante el sistema de lógica difusa se empleó el software FormRules 3.31(Intelligensys Ltd., UK). La predictibilidad del modelo se establece en función del coeficiente de correlación R^2 para cada parámetro.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \overline{y}_i)^2}$$

donde $\overline{y}_i$ is la media de la variable dependiente e $\hat{y}$ es el valor de la variable que predice el modelo. Valores de R^2 entre 75 y 99% indican que el modelo tiene una buena predictibilidad.

Entre los parámetros para el ajuste que incluye FormRules se seleccionaron aquellos para los que se obtuvieron los mejores resultados.

Resultados y Discusión

Salvo escasas excepciones las ecuaciones polinómicas obtenidas por RMS incluyeron un elevado número de términos (Tabla 1).

Hay que señalar además que, para aquellos parámetros, como el coeficiente de variación de peso de los comprimidos o la friabilidad, que carecen de replicados, las correlaciones obtenidas presentaron escaso valor predictivo. Sin embargo, su tratamiento mediante la lógica difusa permitió una estimación adecuada para todos los parámetros (R^2>88%) (Tabla 2).

Tabla 1. Términos significativos derivados de la RMS y la lógica difusa para cada parámetro

Parámetros	RMS [3]	Submodelos
Coeficiente de variación de peso	E	E*D E*F
Resistencia a la rotura	E F F^2 D^2 E*D*F E*D	E*D*F
Friabilidad (%)	D D*F	E*D*F
Tiempo de disgregación	D^2 E*F E*D*F	F E* D *F
% prednisona disuelto a los 30 min	F D*F F*E	D*F

Tabla 2 - Valores de R^2 correspondientes a los modelos obtenidos por lógica difusa

Coeficiente de variación de peso (%)	88.60
Resistencia a la rotura (Kg)	97.34
Friabilidad (%)	98.92
Tiempo de Disgregación (s)	97.81
% prednisona disuelto a los 30 min	95.06

A modo de ejemplo se presentan en la figura 1 los valores estimados por ambos modelos para el parámetro CVP que, como puede observarse, presentan una mejor correlación con los valores experimentales cuando se utiliza el modelo de lógica difusa.

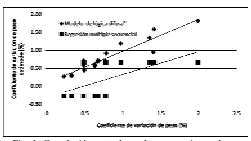


Fig. 1. Correlación entre los valores experimentales y los estimados por ambos modelos.

Para los parámetros que caracterizan las propiedades mecánicas de los comprimidos, los resultados del tratamiento mediante lógica difusa permitieron obtener idénticas conclusiones que la regresión múltiple secuencial.

Del modelo correspondiente se deduce la superioridad del Avicel PH 102 al obtenerse en todos los casos valores de resistencia a la rotura superiores a los obtenidos con la variedad PH 101 (Figura 2), pero adicionalmente la estimación de los valores de pérdida de peso por friabilidad resultó claramente superior.

Al igual que en el caso de las propiedades mecánicas, las conclusiones que permite extraer el tratamiento por lógica difusa son similares y en algún caso superiores a la RMS, permitiendo poner de manifiesto la superioridad de la variedad PH 101 en lo que respecta al tiempo de disgregación de los comprimidos y una mejor estimación del parámetro porcentaje de prednisona disuelto en 30 min.

Al no requerir un diseño experimental determinado, la metodología mediante lógica difusa permite introducir, como variables parámetros intermedios, como los que definen el trabajo de compresión o la estructura microporosa e interpretar sus efectos sobre las características finales de los comprimidos.

Finalmente, el razonamiento difuso permite extraer conclusiones con reglas SI-ENTONCES. Por ejemplo, el tratamiento de los datos realizado resulta en expresiones del tipo: **SI** se emplea la variedad PH101, el porcentaje de prednisona es alto y la fuerza de compresión es alta **ENTONCES** la resistencia a la rotura es alta, la fribilidad es baja, el tiempo de disgregación es corto y el porcentaje de prednisona disuelto a los 30 min es alto.

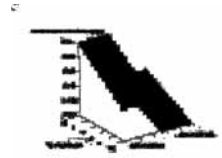


Fig. 2. Efecto del % de prednisona y el tipo de celulosa sobre el parámetro reistencia a la rotura

Conclusiones

El análisis de los datos mediante lógica difusa puede aplicarse con éxito al estudio y desarrollo de comprimidos de compresión directa permitiendo obtener conclusiones similares a las derivadas de la RMS y la metodología de SR, con un número muy limitado de experimentos, de una manera sencilla y sin conocimientos especiales de estadística. El conocimiento derivado de su uso puede, además, almacenarse en forma de reglas explícitas y ampliarse con experimentos adicionales si fuera necesario.

Bibliografía

[1] Takayama et al., *Pharm Res*. 16, 1-6, 1999.
[2] Shao et al., *Eur. J. Pharm. Sci*. 31, 129-136, 2007.
[3] Landín et al, 1992. *Drug Dev. Ind Pharm*. 18, 355-369, 1992.

Los autores agradecen la financiación de la Xunta de Galicia (PGIDIT2007/XA053) y (PGIDT08CSA007203PR)

POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES AS MUCOSAL ADJUVANTS FOR BRUCELLOSIS VACCINATION

R. Da Costa Martins[1], C. Gamazo[2], C. Vauthier[3], J.M. Irache[1]

Immunoadjuvant Unit, [1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and [2]Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, Pamplona, 31080, Spain

[3]Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, 5 av. J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

Introduction

Brucellosis, a zoonosis that affects both domestic and other wildlife animals, is a disease of the reproductive tract that may cause abortion in females, infection of the sexual organs in males, and infertility. Vaccination in animals is usually performed by administration of live attenuated *Brucella* strains. However, these vaccines are pathogenic in humans, interfere with serological diagnosis tests and may induce abortions in pregnant animals [1]. Another possibility to obtain safer and effective vaccines may be the use of subcellular compounds loaded in nanoparticles. This approach would permit to overcome the main drawbacks related with the use of live vaccines and to potentiate the immune response to subcellular antigens, avoiding booster doses.

The aim of this work was to design poly(anhydride) nanoparticles loaded with an antigenic complex extracted from *Brucella ovis* (HS), which has already demonstrated ability to induce protective responses against brucellosis in sheeps [2]. Mannosylated nanoparticles [4] were design to imitate closely *Brucella* colonozation patterns and promote a better interaction with mucosal tissues. Furthermore, the influence of sterilization by γ-irradiation [5, 6] was evaluated.

Materials and Methods

HS was obtained from *B. ovis* REO 198 cells and characterized as described previously [1].

NPs were prepared by modification of the solvent evaporation method [3, 4]. Briefly, the polymer was dissolved in acetone and incubated with manosamine. Then, HS was added and incubated for 30 min at RT. The polymer desolvation was induced by addition of a mixture of ethanol and water. The organic solvents were eliminated under reduced pressure and purified by centrifugation. Finally, NPs were freeze-dried using sucrose (5%) as cryoprotector. Conventional NPs (NP-HS) were prepared, as described above, in the absence of mannosamine.

Nanoparticles were γ-irradiated by using ^{60}Co as irradiation source (Aragogamma, doses of 10 KGy or 25 KGy were applied.

The particle size and the zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser doppler anemometry. The morphology was studied by SEM and the protein content was determined by BCA™Protein assay. To evaluate the manufacturing effects on the protein profile and antigenicity, proteins were extracted with acetone/DMF (3:1 v/v) from the NP, and assayed by SDS-PAGE and immunoblotting, respectively. Complement activation was evaluated by quantification of the conversion of C3 by 2-D immunoelectrophoresis [7]. For the *in vitro* release study NPs were resuspended in PBS at 37±1ºC. At defined time intervals samples were centrifuged and the antigen content was determined by BCA™Protein assay.

Results and Discussion

HS-loaded nanoparticles displayed a size of about 190 nm and an antigen content of 34 µg/mg. Mannosylation of poly(anhydride) nanoparticles yielded carriers with a higher size (about 300 nm) and lower antigen content (28 µg/mg) than conventional nanoparticles.

Table 1. Characterization of the nanoparticles (mean ± sd, n=10).

	Size (nm)	Zeta potential (mV)	HS content (µgHS/mg np)
NP-HS	186 ± 2	-37.7 ± 0.7	33.5 ± 0.4
NP-HS 10 KGy	185 ± 4	-38.2 ± 1.4	33.9 ± 0.7
NP-HS 25 KGy	189 ± 4	-36.9 ± 1.8	33.6 ± 0.9
MAN-NP-HS	306 ± 11	-34.6 ± 1.3	27.9±0.2
MAN-NP-HS 10 KGy	335 ± 22	-33.4 ± 1.3	27.9 ± 0.3
MAN-NP-HS 25 KGy	297 ± 11	-36.9 ± 1.0	27.6 ± 0.2

After irradiation of the nanoparticles no significant modifications in the size of HS-loading of nanoparticles were found (Table 1).

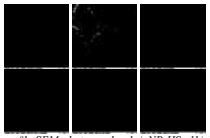


Figure nº1. SEM photographs. 1a) NP-HS; 1b) NP-HS 10 KGy; 1c) NP-HS 25 KGy; 2a) MAN-NP-HS; 2b) MAN-NP-HS 10 KGy; 2c) MAN-NP-HS 25 KGy.

Similarly, by comparing SEM photographs (see Figure 1), no evident modifications on the morphology of the NPs were visualised after irradiation. On the same way, the structural integrity and antigenicity of the entrapped HS (in both conventional and mannosylated NPs) were mantained during the preparation process and after γ-irradiation.

The immuno-electrophoregrams of serum incubated with NPs presented both C3 and C3a+C3b peaks. The area of C3 activated peaks on both NPs types was higher than the VBS^{2+} (background activation) and the CAF very similar (table 2), indicating that poly(anhydride) NPs can enhance the uptake by mononuclear phagocytic system (MPS). However, CAF was slightly higher for serum incubated MAN-NP. This is in agreement with the mannose-binding lectins properties of the mannosamine moieties, which are known to activate the complement pathway.

Table 2. *Area (mm^2) of C3 and C3 activated (C3a+C3b), first and second peak respectively, after 60 min incubation of 5 cm^2 of nanoparticles with 50 µL of human serum at 37 ºC. The complement activation factor (CAF) is expressed as (C3a+C3b)/(C3+C3a+C3b) (mean ± sd, n=10).*

	VBS2+	NP-HS	MAN-NP-HS
CAF (%)	7 ± 2	23 ± 3	29 ± 4

Figures 2 and 3 show the influence of γ-irradiation on the HS release properties. NPs showed a biphasic release pattern characterized by a burst effect (typically about 20-30% of the loaded HS) followed by a continous release of the antigen for at least 30 days. Interestingly, conventional nanoparticles (NP-HS) were not affected by γ-irradiation.

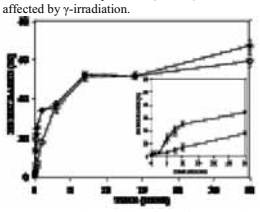


Figure nº2. Influence of the γ-irradiation on the release properties of conventional nanoparticles. NP-HS (○), NP-HS 10 KGy (▽), NP-HS 25 KGy (◆).

On the contrary, mannosylated nanoparticles displayed different HS release profile when γ-irradiated. Thus, by increasing the γ-dose, the burst effect of the nanoparticles was found to be higher. This faster release may probably ascribed to a modification of the molecular weight of the poly(anhydride) during irradiation.

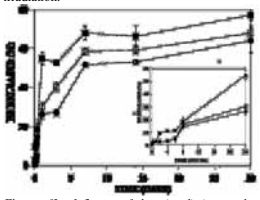


Figure nº3. *Influence of the γ-irradiation on the release properties of mannosylated nanoparticles. MAN-NP-HS (●), MAN-NP-HS 10 KGy (□) and MAN-NP-HS 25 KGy (■).*

Conclusions

Poly(anhydride) nanoparticles appeared to be the appropriate carrier to load HS antigenic extract.

For conventional nanoparticles, γ-sterilization at a dose of 25 KGy did not significantly modify any of the physico-chemical and biopharmaceutical parameters analysed in this work. The γ-irradiation of mannosylated nanoparticles induced a faster release pattern than non-sterilised nanoparticles. Although further *in vivo* studies applied to mucosal immunization are needed, the nanoparticulate systems developed revealed promising characteristics as antigenic delivery systems throughout mucosas,

References

[1] C. Gamazo, et al., *Infect Immun*, 57:1419-1426, 1989.
[2] M. Estevan, et al., Vaccine, **24**: 4179-4187, 2006.
[3] P. Arbós, et al., *J Control Release*, **83**:321-330, 2002.
[4] H. Salman, et al., *J Nanosci and Nanotechnol*, **6**:3203-3209, 2006.
[5] Decision Trees for the Selection of Sterilization Methods. CPMP/QWP/054/98 corr, EMEA, 2000.
[6] The United States Pharmacopoeia USP 2000. 24th ed. Rockville. 2143-2147.
[7] Gómez S., et al., *J Nanosci and Nanotechnol*, **6**:1-7, 2006.

Acknowledgments

"Fundação para a Ciência e a Tecnologia" in Portugal, Picasso grant nº 17121NG and HF2007-0061, "Ministerio de Educación y Cultura de España" and "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" in Spain.

ESTABILIDAD Y EFICACIA DEL INSECTICIDA CIPERMETRINA INCORPORADO EN MICROCÁPSULAS DE POLIUREA

C. Martín Sabroso, P. Rivas Esteban, D. Tavares Silva Fernandes, M.E. Gil-Alegre, A.I. Torres-Suárez
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad Complutense,
28040 Madrid.

Introducción

Cipermetrina es un insecticida de síntesis del grupo de los piretroides ampliamente utilizado en agricultura, ganadería jardinería y a nivel doméstico. La molécula de cipermetrina presenta dos tipos de isomería (figura 1): la isomería óptica, por la presencia de un grupo ciano, y que no tiene trascendencia en el comportamiento del piretroide; y la isomería cis-trans, por la presencia del doble enlace de un grupo vinilo, y que tiene gran influencia sobre la actividad: los isómeros cis son más activos que los trans, por lo que el producto comercializado, high cis-cipermetrina presenta una relación cis/tras de 80/20.

Figura 1. Estructura de Cipermetrina.

Cipermetrina actúa por contacto a través de la cutícula del insecto, por ingestión o por inhalación. Se encuentra comercializado en forma de concentrado emulsificable, y polvos mojables. Estas formas de utilización llevan asociados importantes problemas de toxicidad debido, no sólo al contacto directo accidental del insecticida con personas, animales o alimentos durante su aplicación, sino también al contacto indirecto debido a la contaminación atmosférica, de suelos y de aguas (1).
La incorporación de cipermetrina en microcápsulas de poliurea resultaría una forma eficaz de disminuir la toxicidad y el impacto medioambiental que lleva asociada su aplicación. La utilización de una cubierta no biodegradable aumenta la persistencia en el ambiente del insecticida, evitándose las aplicaciones repetidas; mientras que la toxicidad se encuentra sensiblemente disminuida al encontrarse el insecticida confinado en el interior de una cubierta resistente al agua, a los jugos digestivos, etc., que impide su contacto directo con piel y mucosas así como su disolución en el agua.
El objetivo del presente trabajo es determinar si la incorporación de cipermetrina en microcápsulas supone, además, una forma de aumentar la estabilidad química del insecticida, y verificar que el insecticida microencapsulado resulta eficaz al ser ingerido por los insectos cuando rompen las microcápsulas con sus mandíbulas.

Materiales y Métodos

Se elaboran microcápsulas (MC) de high cis-cipermetrina mediante la técnica de polimerización interfacial. Se utilizan dos monómeros: dietilentriamina y 2-toluen-2,4-diisocianato, que reaccionan en la interfaz de una emulsión en cuya fase interna se encuentra el insecticida a encapsular, dando lugar a la cubierta de poliurea (2).

- Estudio de estabilidad: se evalúa la estabilidad de high cis-cipermetrina sin microencapsular y microencapsulada frente a la humedad ambiental, el oxígeno y la luz. Para ello se mantienen muestras en ambiente de humedad relativa superior al 80%, en atmósfera saturada de oxigeno y expuestas a la luz solar directa. A intervalos de tiempo se determina el contenido total de cipermetrina en las muestras, y la relación de isómeros cis/tras. Se utiliza un método por HPLC que permite la cuantificación específica de los dos isómeros en presencia de polímero y productos de degradación (3).

Tabla 1. Diseño del estudio de eficacia.

Control	Blanco	Problema	Patrón
Sin tratar	Con MC blancas	Con MC de insecticida	Con insecticida m.p

-Estudio de eficacia: se utilizan larvas de Spodoptera sp en estadio L2, que se mantienen a una temperatura de 25ºC, humedad relativa del 70%, y ciclos luz/oscuridad de16h/8h. Se realizan cuatro grupos con diferente tratamiento del alimento artificial (tabla 1). Se determina el porcentaje de muertes a las 24 y 48h de iniciarse el estudio.

Resultados y Discusión

En el cromatograma obtenido con high cis-cipermetrina (fig.2) se observan los picos correspondientes al isómero trans (TR=10,18min) y cis (TR=10,92min).

Figura 2. Cromatograma de high cis-cipermetrina

En la figura 3 se muestran los resultados del estudio de estabilidad frente a la humedad. Cipermetrina se degrada en ambientes de elevada humedad, con un 8% degradado a las 8 semanas de almacenamiento. Esta degradación no lleva asociado ningún cambio en la relación de isómeros que sigue siendo próxima a la teórica (80/20)

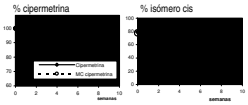


Figura 3. Estabilidad frente a la humedad ambiental

Sin embargo, cuando cipermetrina se encuentra microencapsulada no se observa alteración alguna después de 8 semanas de almacenamiento.
Respecto a la estabilidad frente al oxígeno (figura 4), no se detecta disminución en el contenido de insecticida sin microencapsular, pero sí que se observa una intensa reducción del porcentaje de isómero cis, ya desde la primera semana almacenamiento. Cuando se expone al oxigeno el insecticida microencapsulado, no se observa ninguna variación significativa en el porcentaje de isómero cis, a lo largo del estudio.
En cuanto al estudio de fotoestabilidad, no se detectó ninguna alteración ni en el contenido en activo ni en la relación de isómeros cuando se analizaron las muestras de insecticida sin microencapsular.

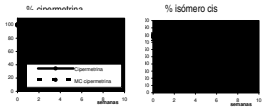


Fig. 5. Estabilidad de cipermetrina frente al oxígeno.

En el estudio de eficacia se obtuvieron los mismos resultados en el grupo patrón y problema: el 100% de muertes a las 48%. Sin embargo, cuando la alimentación se mezcló con microcápsulas no cargadas (blanco) solo murieron el 25% de las larvas.

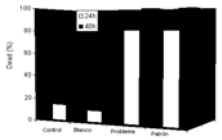


Fig. 7. Estudio de eficacia.

Conclusiones

Las microcapsules de cipermetrina y poliurea desarrolladas protegen al insecticida frente a la humedad y el oxígeno atmosférico, y han demostrado su eficacia frente a larvas de insecto.

Referencias

[1] Herbert B. Scher, Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides. Marcel Dekker, Nueva York, 1999.
[2] N. Yan, P. Ni and M. Zhang, J. Microencapsulation, 10, 375-383, 1993.
[3] I.P. Rivas, M.E. Gil-Alegre, A.I. Torres-Suárez, Analytica Chimica Acta, **557**:22245-251, 2006.

Agradecimientos

Al Dr. Pedro del Estal (ETSI Agrónomos) por la ayuda recibida para realizar el estudio con larvas.

MODIFIED GENTAMICIN TO TREAT INTRACELLULAR INFECTIONS

E. Imbuluzqueta[1], C. Gamazo[2], D. González[1], E. Elizondo[3], N. Ventosa[3], S. Sala[3], J. Veciana[3], M.J. Blanco-Prieto[1]
[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and [2]Department of Microbiology, University of Navarra, 31080 Pamplona, Spain.
[3] Molecular Nanoscience and Organic Materials Department. Institut de Ciència de Materials de Barcelona, Campus de la UAB s/n 08193-Bellaterra Barcelona, Spain.

Introduction

Gentamicin is an aminoglycoside with a wide spectrum of antibacterial activity but due to its hydrophilic nature it penetrates poorly into the cells. This constitutes a particularly important drawback for the therapy of intracellular bacterial infections like brucelosis. Therefore, the use of particulate carriers has been proposed to target the antibiotics to intracellular sites, where the bacterium is found (1,2).
We have previously shown that 752H PLGA microparticles containing gentamicin sulphate (Gm-S) were suitable for the treatment of experimental brucellosis in mice (3). However, Gm loading improvement would be required in order to be used in human therapy. To achieve this goal, a hydrophobic Gm (Gm-AOT) has been synthesized.
Therefore, the aim of this work was to design, develop and characterize biodegradable nanoparticles (NP) for the controlled delivery of Gm-AOT. Moreover, as being a new molecule, it becomes necessary the development of a reliable method for its quantification. Due to the lack of chromophore groups, a method based on an ultra performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) was developed.

Materials and Methods

Gm–S was transformed into a more hydrophobic ionic complex, Gm-AOT (patent application 7-12-2007 OEP). The complex was processed by the method Precipitation with a Compressed Antisolvent (PCA). An organic solution of the active compound is sprayed though a nozzle into a compressed antisolvent (CO_2) which rapidly diffuses into the sprayed droplets causing the precipitation of the solute. The obtained Gm is here difined as processed Gm-AOT.
Gm-AOT was encapsulated into polymeric NP by using an emulsion solvent evaporation method. The antibiotic was dissolved in ethyl acetate containing the polymer (PLGA 752H) and poured on a water phase containing polyvinilalcohol. Both phases were mixed by ultrasonication and the resulting O/W emulsion was continuously stirred for at least 3 h to allow solvent evaporation and particle formation. NP were isolated by centrifugation, washed with water and freeze-dried.
NP size, polydispersity and zeta potential were evaluated by a dynamic light scattering technique with a Zetasizer (Malvern Instruments, UK).
For Gm loading determination 10 mg of particles were dissolved in 0.1 M NaOH solution and stirred for 5 h. Samples were centrifuged at 25000 g during 15 min and the supernatant was centrifuged again (16000 x g 10 min) to eliminate the traces of polymer.
To quantify the antibiotic, an AcQuity UPLC™ BEH C_{18} column (1.7µm, 2.1 x 50mm) (Waters) termostatized at 30ºC was used, with an isocratic elution profile. The mobile phase consisted on 20 mM pentafluoropropionic acid (PFPA) solution in acetonitrile-water (20:80 v/v). The flow-rate was 0.6 mL/min. Working standard solutions were prepared in acetonitrile-water (50:50 v/v) using tobramycin (0.5 µg/mL) as internal standard (IS). For the analysis of the samples, supernatants were diluted 1:20 (1:10 in mobile phase and 1:2 with the IS) and 5 µL were injected onto the UPLC column. The analytes were detected using an electrospray ionization tandem mass spectrometry in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM). The selected transitions of the protonated precursor/product ion pairs were 450/322 for Gm and 468/163 for Tobramycin.
For Gm-AOT toxicity studies, THP-1 human monocytes were plated into 96 well plates at a density of 10^5 cells/well and differentiated into macrophages with 10 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in RPMI medium. After 48h 5µg/mL Gm-S and both non processed and processed Gm-AOT were added and incubated for 1, 4 and 24 h at 37 ºC. For each time cell viability was evaluated by both lactic dehydrogenase (LDH) (Sigma) and MTT colorimetric assays.

Results and Discussion

Characterization of the NP
All the formulations showed mean diameters below 300 nm. Increasing the nominal loading from 10 to 60 mg of Gm-AOT did not affect particle size. Pdl (polydispersity index) was

lower than 0.2 and all the nanoparticles showed a negative surface charge (Table 1).

Table 1. Influence of the Gm-AOT nominal loading in the characteristics of 752H-NP.

Gm-AOT nominal loading (mg)	*Size (nm)*	*PDI*	*Zeta potential*	*µg Gm /mg NP*	*%EE*
10	286	0,105	-4,28	16,25	100
20	227	0,098	-5,72	28,78	100
30	289	0,081	-2,78	39,96	100
40	290	0,098	-3,57	46,61	100
50	300	0,121	-2,5	59,84	100
60	286	0,194	-2,36	69,47	100

Gm-AOT quantification
The MS spectra of Gm-AOT showed the molecular ions from all Gm components (C1, C2, C2a and C1a). Therefore, the Gm-AOT complex was disrupted in the source desolvatation process to Gm and AOT. MS transition (m/z) from 450 to 322 was employed to quantify Gm-AOT in all samples.

Encapsulation efficiency
Encapsulated Gm-AOT was quantified in all the prepared NP by the developed method.. NP with a nominal loading of 10 mg showed a Gm-AOT entrapment of 16,25 µg/mg with, equivalent to a 100% of encapsulation (Table 1). This figure is aprox. 20 times higher than the amount of encapsulated unmodified GM (0.81 µg/mg) at the same nominal loading (4).
Even more, increasing the nominal loading from 10 mg to 60 mg further increased the Gm-AOT entrapment (from 16,25 µg/mg to 69,47 µg/mg of polymer).

Gm toxicity studies in THP-1 cells
Results showed that non processed Gm-AOT was toxic at the studied concentration (5 µg/mL). Conversely, the viability of the cells was above 80% when treated with the same concentration of Gm-S and processed Gm-AOT (figure 1).

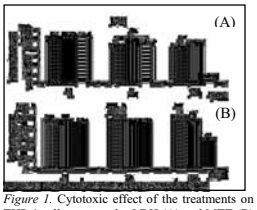


Figure 1. Cytotoxic effect of the treatments on THP-1 cells measure by LDH (A) and MTT (B) assays.

Conclusions

PLGA-NP loaded with Gm-AOT were prepared with a very high entrapment efficiency. Also, the developed UPLC method is suitable to detect the modified Gm. Finally, processed Gm-AOT has shown to be non toxic in THP-1 cells compared to the non processed Gm-AOT.

References

(1) Gamazo C. *et al. Expert Opin. Drug Deliv.*, **4:** 1-12, 2007
(2) Lecároz C. *et al. J. of Nanoscience and Nanotechnology*. **6:** 3296-3302, 2006
(3) Lecároz C. *et al. Antmicrob. Agents Chemother*. **51:** 1185-1190, 2007
(4) Lecároz C. *et al. J Microencapsul*. **23:** 782-92, 2006

Acknowledgements

This work was supported by "Ministerio de Ciencia e innovación" from Spain (NAN2004-09159-C04-03) and Caja Navarra Foundation. E. Imbuluzqueta thanks the Spanish "Ministerio de Ciencia e Innovación", "Gobierno de Navarra (Departamento de Educación)" and "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" for the fellowship grants.

IN VITRO AND *IN VIVO* TOXICITY STUDIES OF POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR ORAL DRUG DELIVERY

P. Ojer[1], A. López de Cerain[2], J.M. Irache[1]

[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, [2]Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and Toxicology, University of Navarra, Irunlarrea s/n, Pamplona, 31080, Spain

Introduction

Nanotechnology is an emerging science involving manipulation of materials at the nanometer scale. Specifically in the case of medicine the term "nanomedicine" has been applied to diverse medical fields such as drug delivery systems. In this context, our group has demonstrated the use of Gantrez® AN nanoparticles in oral drug delivery(1,2). However, the main problem with this type of technology is that little or nothing is known about their potential toxic effects because there are no specific guidelines or protocols for assessing the toxicity of these new nanomaterials. For this reason a new discipline called nanotoxicology is emerging. The aim of this work was to evaluate the toxicity of different Poly(anhydride) nanoparticles intended for oral delivery. For this purpose *in vitro* cytotoxicity in Hep G2 cells and *in vivo* oral single dose studies were developed.

Materials and methods

Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles (Np) were prepared by a desolvation method previously described(3). Similarly, Hidroxipropil-β-cyclodextin nanoparticles (HPCD-Np) and pegylated nanoparticles (PEG2000-Np) were prepared by incubation of either with the polymer prior to formation of nanoparticles.

In order to preserve the formulations throughout, we lyophilized (PEG2000-Np) or spray dried the samples (Np, HPCD-Np).

The particle size and the zeta potential of nanoparticles were determined by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser doppler anemometry, respectively. The morphological examination of the nanoparticles was performed by SEM.

The amount of HPCD and PEG2000 associated to the nanoparticles was quantified by HPLC from the supernatants collected during the purification step of nanoparticles(4,5).

The *in vitro* cytotoxicity studies were carried out by MTS assay in Hep G2 cells. For this purpose different types of poly(anhydride) nanoparticles at different concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/mL) were incubated for 30 minutes, 3, 24, 48 and 72 hours in order to determined the IC_{50} value (half inhibitory concentration).

In order to observe changes in the morphology of cells due to the addition of the nanoparticles Hep G2 images were taken by optical microscopy.

Single oral dose toxicity study was performed according to OCDE guideline 425(6). Briefly, we administered single doses (2,000 mg/Kg) of the different nanoparticles to female Wistar rats. The general symptomathology of the animals was tested during the experiment, and fourteen days after administration blood samples were collected for hematology and blood chemistry analysis. Finally the animals were sacrificed and the lethal dose (LD_{50}) was estimated.

Results and discussion

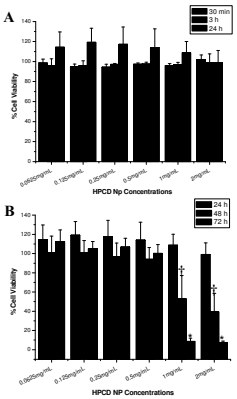
The physical chemical characteristics of the nanoparticles are shown in Table 1. All the nanoparticle formulations displayed a size of about 190 nm and a negative surface charge. For HPCD-Np, the amount of associated cyclodextrin was calculated to be about 219 µg/mg. Whereas for PEG2000-Np the amount of PEG2000 associated to nanoparticles was about 26 µg/mg.

***Table 1**. Physico-chemical characterization of poly-(anhydride) nanoparticles*

	Size (nm)	Zeta Potential (mV)	µg ligand/mg Np
Np	192 ± 2	-56.8 ± 0.5	
PEG2000-Np	205 ± 1	-57.1 ± 0.7	25.74 ± 0.55
HPCD-Np	168 ± 1	-52.8 ± 0.5	219.3 ± 3.2

Data presented are mean values and standard deviations (n=6)

In cytotoxicity studies, as shown in Figure 1, at 30 minutes, 3 and 24 hours the cell viability did not decrease significantly after the addition of nanoparticles. The poly (anhydride) Gantrez® AN was used as control. The nanoparticles were non cytotoxic. Only after incubation for 48 and 72 hours a significant cytotoxic effect was observed at the highest concentrations tested (1, 2 mg/mL).

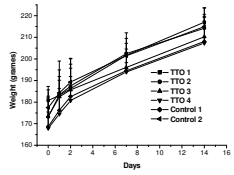


∗ and † :Results were significant at 0.05 level (Kruskal Wallis-U-Mann Whitney)

Figure 1. MTS assay in HepG2 cells at different concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/mL) after incubation for: (A) 30 minutes, 3 and 24 hous, (B) 24, 48 and 72 hours. Data presented are mean values (all experiments were performed triplicate) and standard deviations (n=6)

Finally, during the acute oral toxicity study that lasted for 14 days no signs of toxicity were observed in any animal and as shown in Figure 2 the body weight of all animals was not significantly different between the control groups and the treatment groups.

The hematological results and blood chemistry were found within the range of normal values.



TTO 1: Gantrez® AN; TTO2: Np; TTO3: HP-β-CD Np; TTO4: PEG2000 Np; C.1: Deionized water; C.2: Lactose 66.67 mg/mL

Figure 2. Record weight to 14 days after single oral dose of 2000 mg/kg. Error bars represented standard deviations (n=5

Conclusions

Poly(anhydride) nanoparticles did not show any toxic effects under the experimental conditions used here.

- The cytotoxicity studies demonstrated that the nanoparticles did not have any toxic effect in Hep G2 cells at 30 minutes, 3 and 24 hours. Except at the highest concentrations and times of incubation tested.

- The results achieved in the acute oral toxicity study estimated that the medium lethal dose (LD_{50}) for the different poly (anhydride) nanoparticles formulations were greater than 2,000 mg/Kg.

References

(1) Salman, H.H. et al., *J Control Release,* **106**, 1-13 (2005)
(2) Gomez, S. et al., *Vaccine,* **25**, 5263-5271 (2007)
(3) Arbos, P. et al., *J Control Release,* **83**, 321-330 (2002)
(4) Agueros, M. et al., *J Pharm Biomed Anal,* **39**, 495-502 (2005)
(5) Zabaleta, V. et al., *J Pharm Biomed Anal,* **44**, 1072-1078 (2007)
(6) OCDE. (2001) *Guidelines for the Testing of Chemicals.Test No. **425**: Acute Oral Toxicity: Up-and-down Procedure*

Acknowledgments

P. Ojer thanks the " Gobierno de Navarra (Departamento de Educación)" and the "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" for the grants.

ESTUDIO COMPARATIVO DE CARBOXIMETIL ALMIDON SODICO RETICULADO Y QUITOSANO-SILICE COMO AGENTES DISGREGANTES EN PELETS DE CELULOSA MICROCRISTALINA-HIDROCLOROTIAZIDA ELABORADOS POR EXTRUSION-ESFERONIZACION

Álvaro Goyanes, Consuelo Souto, Ramón Martínez-Pacheco
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
e-mail: ramon.martinez@usc.es

Introducción

La celulosa microcristalina (MCC) es el excipiente más utilizado para la elaboración de pelets por extrusión-esferonización debido a que proporciona masas humectadas con características de plasticidad y adhesividad únicas (1). Sin embargo, los pelets elaborados con MCC como excipiente base no experimentan un proceso de disgregación en medio acuoso y, como consecuencia de ello, exhiben una lenta velocidad de cesión de principio activo, en especial si su hidrosolubilidad es reducida.

Para obviar esta limitación se han propuesto diferentes alternativas tecnológicas entre las que cabe destacar la incorporación de superdisgregantes o la sustitución parcial de la MCC por excipientes hidrosolubles (2).

En el presente estudio se evalúa, de forma comparativa, la eficacia de dos agentes disgregantes, uno comercial (carboximetil almidón sódico reticulado) y otro, quitosano-sílice, propuesto recientemente por El-Barghouthi y col. (3). También se analiza un posible efecto sinérgico asociado a la incorporación simultánea a los pelets de sorbitol como excipiente de marcada hidrosolubilidad.

Materiales y métodos

Materiales

Excipientes. Celulosa microcristalina (Avicel® PH 101, lote 91205001), sorbitol (Neosorb® P60, lote E834AD), carboximetil almidón sódico reticulado (Explotab®, lote E4814X), quitosano 150.000Da, 95% deacetilación (Qingdao Milestone Biotech Co. LTD), sílice coloidal (Aerosil® 200 VV Pharma, lote 1323102).

Principio activo. Hidroclorotiazida (lote 939190004, suministrada por Guinama, España).

Métodos

Formulaciones objeto de estudio. En el presente estudio se han elaborado y evaluado 10 formulaciones que contienen un 10% de hidroclorotiazida (HCT), los porcentajes de sorbitol (SORB), carboximetil almidón sódico reticulado (CMAS) o quitosano-sílice (Q-S) que se indican en la Tabla 1, y celulosa microcristalina (MCC) c.s.p. 100%.

Preparación del disgregante quitosano-sílice. Para su preparación se siguió la metodología descrita por El-Barghouthi (3): El quitosano se dispersa en una disolución de HCl 2M y la sílice coloidal en una disolución de NaOH 2M a la que, posteriormente, se adiciona agua destilada. La suspensión de quitosano se añade lentamente a la suspensión de sílice bajo agitación continua durante 1 hora. El coprecipitado formado se lava, se filtra y se seca en horno a 90ºC.

Tabla 1.
Composición y propiedades de las formulaciones objeto de estudio.

Formulación	Tamaño medio (ds (µm)*	Circularidad (ds)	HTC disuelta 60 min (%)
MCC	764 ± 101	0.971 (2.0 x 10^{-2})	34.04
CMAS2.5%	886 ± 102	0.946 (2.5 x 10^{-2})	36.06
CMAS5%	871 ± 100	0.936 (2.4 x 10^{-2})	34.74
Q-S2.5%	600 ± 120	0.959 (4.0 x 10^{-2})	46.15
Q-S5%	688 ± 123	0.974 (2.4 x 10^{-2})	45.73
SORB50%	934 ± 263	0.933 (4.5 x 10^{-2})	90.2
SORB50%/CMAS2.5%	1037 ± 346	0.935 (4.5 x 10^{-2})	83.72
SORB50%/CMAS5%	1106 ± 293	0.929 (4.3 x 10^{-2})	82.28
SORB50%/Q-S2.5%	835 ± 261	0.942 (4.3 x 10^{-2})	97.74
SORB50%/Q-S5%	913 ± 273	0.937 (4.1 x 10^{-2})	97.68

*de la distribución de tamaños

Elaboración de pelets. Excipientes y principio activo se mezclaron en Turbula® T2C (15 min., 30 rpm). La mezcla se humectó con agua en una malaxadora planetaria Kenwood® (10 min, 44 rpm). La masa humectada se extruyó a través de una malla de 1 mm de luz en extrusor Caleva® 25 (60 rpm) y se esferonizó en equipo Caleva® 120 utilizando un plato de fricción de 12 cm de diámetro y una hendidura de 1 mm de profundidad (10 min, 1200 rpm). Posteriormente los pelets se secaron en estufa de circulación forzada de aire (24 h, 40°C).

Caracterización de los pelets.

Tamaño y forma: Se determinó por microscopía óptica (Estereomicroscopio Olympus SZ-CTV conectado a una video cámara JVC TK-S350) el diámetro medio de Feret y la circularidad de, al menos, 600 pelets. En todos los casos, los datos se ajustaron a una distribución normal, para la que se obtuvieron los mejores resultados en el ajuste, calculándose, para cada formulación, los correspondientes diámetro medio y desviación estándar. La forma de los pelets se caracterizó a través del parámetro circularidad, calculado como $4\pi A/p^2$, donde A es el área proyectada y p el perímetro proyectado. Adicionalmente, se obtuvieron fotomicrografías de los pelets utilizando un microscopio electrónico de barrido (Leo-435VP, Cambridge, UK)

Velocidad de disolución: Los perfiles de disolución de HCT a partir de muestras de 200 mg de pelets se obtuvieron en aparato tipo II (Turu Grau DT-6, Barcelona, España) descrito en la USP 29. Los ensayos se llevaron a cabo en 900 ml de HCl 0.1 N, a 37ºC, con las paletas girando a 50 rpm. La cantidad de HCT disuelta a cada tiempo de muestreo se determinó por espectrofotometría UV directa (Agilent 8453) a 272 nm. Para la caracterización de la velocidad de disolución de HCT a partir de las distintas formulaciones se utilizaron los valores de porcentaje de dosis de HCT disuelta en 60 min (D_{60}).

Análisis estadístico de los resultados. El trabajo experimental se ha adaptado a la estructura de un diseño factorial para tres variables (agente disgregante, presencia de sorbitol y porcentaje de disgregante en la composición de la formulación). Para la cuantificación de los efectos de las variables bajo estudio, se acudió a la regresión múltiple secuencial (Statgraphics, v. 5.1)

Resultados y discusión

En la tabla 1 se han agrupado los resultados obtenidos en la caracterización de las distintas formulaciones objeto de estudio. De su observación cabe destacar, en primer lugar, que las propiedades de los pelets, desde punto de vista morfológico, son adecuadas. Así, en ningún caso, se observaron efectos significativos de los procesos de aglomeración en la etapa de esferonización. Además, los valores obtenidos para el parámetro circularidad permiten concluir una notable esfericidad de los pelets para cualquiera de las formulaciones ensayadas. Las fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido obtenidas para algunas formulaciones tipo (Fig.1) ratifican las afirmaciones anteriores.

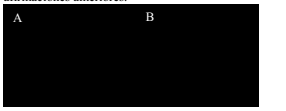


Fig. 1. Fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido de SORB50%/CMAS5% (A) y SORB50%/Q-S5% (B).

En los estudios de velocidad de disolución de HCT se han detectado diferencias importantes entre las diferentes formulaciones (Fig. 2). La presencia de Q-S incrementa la velocidad de disolución de principio activo en todas las formulaciones en las que se halla presente. El incremento adicional de la velocidad de disolución de HCT en las formulaciones que incorporan SORB puede justificarse por la rápida y completa disgregación de los pelets. En cambio, la incorporación de CMAS a pelets que incluyen SORB en su composición, reduce la velocidad de disolución de HCT. Este efecto negativo de la CMAS, que acompaña a la no disgregación de los pelets, podría atribuirse a una competición por la captación de agua con el SORB, excipiente marcadamente hidrosoluble (4).

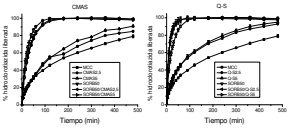


Fig. 2. Curvas acumuladas de disolución de HCT para las formulaciones

Los efectos de las variables bajo estudio sobre el parámetro D_{60} (tabla 1) se han cuantificado por regresión múltiple, obteniéndose la siguiente ecuación

D_{60}= 37.95 -1.07xCMAS +2.00xQ-S +1.02xSORB (R^2=0.991)

que pone claramente de manifiesto que la presencia o el incremento en la proporción de SORB y Q-S en los pelets afectan positivamente a los valores de D_{60}.

La ecuación también pone de manifiesto la inexistencia de interacciones entre las diferentes variables; es decir, la aditividad, sin sinergias, de los efectos de las variables bajo estudio sobre el proceso de disolución de HCT.

Conclusiones

El quitosano-sílice resulta claramente más eficaz que el carboximetil almidón sódico reticulado en la promoción de la velocidad de disolución de HCT en pelets elaborados con MCC como excipiente base.

Además, la incorporación de quitosano-sílice a pelets conteniendo un 50% de sorbitol provoca su rápida disgregación en medio acuoso.

Referencias

(1) K. E. Fielden et.al., *Int. J. Pharm.* **81:** 205-224, 1992
(2) C. Souto et.al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61:** 94-99, 2005
(3) M. El-Barghouthi et.al., *Drug Dev. Ind. Pharm.* **34:** 373-383, 2008
(4) J. R. Johnson et.al., *J. Pharm. Sci.* **80:** 469-471, 1991

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Xunta de Galicia (07CSA006203PR). Excipientes donados por Evonik Industries y por Roquette Laisa España.

INFLUENCIA DE LOS ANTIÁCIDOS EN LA ESTABILIDAD DE OMEPRAZOL

M. López-Viota, J. L. Arias, M.A, Ruiz, V. Gallardo
jlarias@ugr.es
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia
Universidad de Granada, 18071

Introducción

Omeprazol, es un sustituto benzimidazol que inhibe la secreción gástrica por alteración en la actividad de la H^+/K^+ ATPasa, que es el paso final común de la secreción de ácido en las células parietales (1-2). Se usa en el tratamiento de las úlceras pépticas, la esofagitis por reflujo y síndrome de Zollinger-Ellison. Es una base débilmente lipofílica con un pKa1 = 4.2 y un PKa2 = 9 y es degradado a menos que sea protegido de las condiciones ácidas.
El HPLC es el método oficial propuesto por la USP 23 para la determinación y cuantificación del omeprazol. Este procedimiento puede ser utilizado en los estudios de estabilidad ya que no se producen interferencias entre el fármaco y sus productos de degradación.
El objetivo de este estudio es determinar la estabilidad del omeprazol en un medio que pretende simular de un modo aproximado las condiciones de temperatura y pH a las que se encuentra sometido el fármaco durante las dos horas siguientes a la administración oral del preparado.

Materiales y Métodos

Los pellets de Omeprazol poseen un contenido en omeprazol de 86.9 mg/g, suministrados por acofarma (Madrid, España). El almidón de maíz, Hidróxido de aluminio, Hidróxido de magnesio, fueron suministrados por Guinama, (Valencia, España).
La forma farmacéutica oral que se prepara son granulados ya que los estudios han demostrado, que el proceso de granulación, en general incrementa la disolución de fármacos poco solubles como es el omeprazol. El uso de diluyentes como el almidón de maíz, tiende a aumentar la hidrofilia de los ingredientes activos y mejorar sus características de disolución. En este aspecto, el procedimiento que se utiliza es la granulación húmeda utilizando jarabe simple
como aglutinante. La desecación del granulado se realiza a temperatura ambiente, durante 24 h.

Tabla 1. Composición de todas las formulaciones estudiadas

	1	2	3	4
Omeprazol	0.5	0.5	0.5	0.5
Almidón	90	55	35.7	22
Al $(OH)_3$		18	26	33
$Mg(OH)_2$		9	13	16.5
Jarabe simple	9.5	17.5	24.8	28

La formula 1 corresponde a un granulado simple, las fórmulas 2-4 incorporan antiácidos a distintas concentraciones.

Valoración de las formulaciones

Los ensayos llevados a cabo persiguen el estudio de las principales características de las formulaciones que determinarán su idoneidad a la hora de ser administradas.
Conocida la inestabilidad del omeprazol en medio a pH ácido habrá que valorar la capacidad de la suspensión obtenida a partir de los granulados para conservar la estabilidad del fármaco a un pH de acidez equivalente a la del estómago. Se utilizaron dos medios con pH distinto: con el estómago vacío y lleno. La valoración de omeprazol se realiza por HPLC.

Preparación de muestras

Se realiza, adicionando 1g de granulado en 30ml de agua. La dosis administrada que se realiza en este ensayo es similar a la de un granulado en sobres monodosis. La duración del ensayo tiene como finalidad representar de algún modo el tiempo que omeprazol ha de resistir las condiciones de acidez del estómago hasta llegar a absorberse.

Resultados y Discusión

La valoración por HPLC de omeprazol muestra un cromatograma original en el que se observa un tiempo de retención para omeprazol de 9 minutos y el de su impureza (sulfona de omeprazol) de 0.8 min

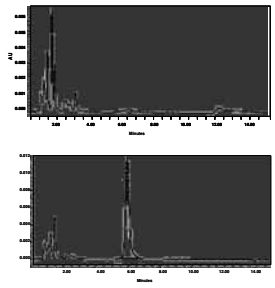
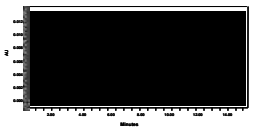


Figura 1: Cromatogramas de la fórmula 1 (fórmula base) ensayada a pH 1.5 y 3 *(simulación de estómago vacío y lleno), con los resultados obtenidos a las dos horas del ensayo.*

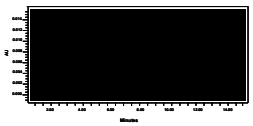
Se observa como a pH 1.5 no existe el pico correspondiente a omeprazol lo que nos indica su destrucción, si se aprecian diversos picos a los dos minutos correspondientes a los diferentes productos de degradación del fármaco.

A pH 3 se detecta el pico del omeprazol así como los picos de sus metabolitos, pero menos acentuados que en el pH 1.5, siendo el omeprazol encontrado de un 18.95%, lo que nos indica en una primera instancia que el incremento de pH produce menos alteración, y confirma la importancia del pH en la estabilidad del fármaco.

Fórmula 2



Fórmula 3



Fórmula 4

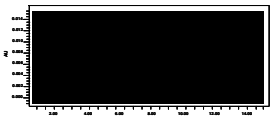


Figura 2: Cromatogramas de las fórmulas 2, 3 y 4 ensayadas a pH 3 con los resultados obtenidos a las dos horas del ensayo.

Los cromatogramas nos muestran que en todas las formulaciones aparece el pico de omeprazol, de forma acentuada, pero también se encuentran productos de descomposición, pero es la fórmula 3 la que mayor protección ha ejercido. En dichas representaciones gráficas se observa como la variación de concentración de omeprazol en el medio de estudio tras 120 min en función de la variación de antiácidos, no muestra diferencias muy significativas.

Conclusiones

La inclusión de antiácidos en la formulación, mejora la estabilidad del fármaco

Referencias

(1) Castro D y cols., J. Pharm. Biomed. Anal. 1999; 21:291-298.

(2) Riedel A y cols., Pharmazie 2005; 60:126-130

Agradecimientos

Financial support from CICYT, Spain, under Project MAT2005-07746-CO2-02, from Junta de Andalucia, Spain, under Project FQM 410 and from FEDER Funds are gratefully acknowledged.

ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

C. Gutiérrez Millán, M.L. Sayalero Marinero, J.M. Lanao

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
c/ Licenciado Méndez Nieto s/n. 37007 Salamanca

Introducción

La utilización de portadores celulares frente a otros sistemas portadores tradicionales ha sido un campo de investigación farmacéutica de amplio desarrollo en los últimos años (1) con interesantes ventajas sobre los sistemas vectoriales tradicionales como su evidente biocompatibilidad y falta de toxicidad (2).

Así se han obtenido sistemas portadores a partir de células tan variadas como bacterias, eritrocitos, leucocitos polimorfonucleares, células tumorales, células dendríticas o células madre entre otras.

Una adecuada manipulación de las distintas células en cada caso ha permitido encapsular en su interior fármacos u otras sustancias de importante utilidad terapéutica.

En la presente investigación se busca desarrollar un sistema portador de fármacos antirretrovirales basado en leucocitos polimorfonucleares (PMN).

Recientemente se han encontrado evidencias de que los neutrófilos y otras células CD4 - pueden jugar un importante papel en la infección por VIH (3). La encapsulación en PMN de fármacos antirretrovirales debe permitir su acumulación selectiva en los macrófagos cuando los PMN apoptópicos son fagocitados por estos.

Materiales y Métodos

Para el aislamiento de leucocitos polimorfonucleares se partió de sangre extraída por punción retro-orbital de ratas Wistar macho y se sometió a un fraccionamiento en gradiente de densidad (4).

Se realizaron ensayos con distintos medios comerciales para gradientes de densidad, como dextran, Histopaque y Percoll de distintas densidades, solos o en combinación de unos con otros.

Tras distintas pruebas, se estableció como procedimiento óptimo de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares de rata el fraccionamiento de sangre periférica en un gradiente sencillo de Percoll al 56 % (5).

Cinco mililitros de sangre fueron depositados sobre tres mililitros de Percoll al 56 % y se centrifugó a 1000 x g durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación se recogió la fracción que contenía mayoritariamente PMN y se sometió a un procedimiento de lisis de eritrocitos contaminantes para aumentar su pureza en leucocitos polimorfonucleares.

Para ello se incubaron las células con una solución de lisis (NH_4Cl 8,02 g/L, $NaHCO_3$ 0,84 g/L) a temperatura ambiente seguido de otra incubación con PBS libre de calcio y magnesio.

Finalmente la suspensión de células fue nuevamente centrifugada (300 x g 7 minutos), el sobrenadante retirado y el pellet conteniendo los PMN fue resuspendido en 0,5 mL de PBS libre de calcio y magnesio.

En la Figura 1 queda recogido un esquema del método de aislamiento de los PMN.

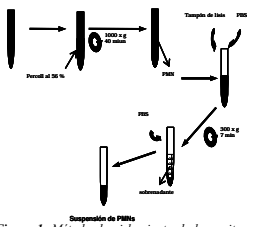


Figura 1. *Método de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares a partir de sangre periférica de rata.*

Alícuotas de las diferentes bandas o fracciones obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad fueron analizadas con un hematoanalizador Sysmex 2100 con objeto de conocer el recuento diferencial celular de cada una de ellas.

Una vez aislados los PMN, se procedió a incubarlos con fármacos antirretrovirales como Zidovudina y Estavudina a concentraciones clínicamente relevantes para favorecer la captación del fármaco por parte de las células.

Para ello, a la suspensión de células, conteniendo una cantidad conocida de PMNs, se añadió una disolución de fármaco en PBS libre de calcio y magnesio durante 1 hora a 37 ºC bajo agitación suave.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó otro lavado con PBS libre de calcio y magnesio y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón.
La concentración de antirretroviral encapsulado en PMNs se determinó mediante una técnica de HPLC de fase reversa y detección ultravioleta (λ= 265 nm), utilizando una columna LiChroCART 55-4.

Resultados y Discusión

La centrifugación en gradiente de densidad permite obtener una serie de bandas o fracciones perfectamente diferenciadas, en las que quedan los diferentes tipos de células sanguíneas en función de su densidad
La utilización de distintos medios de gradiente da lugar a diferente fraccionamiento de las células sanguíneas tal y como recoge la Figura 2.

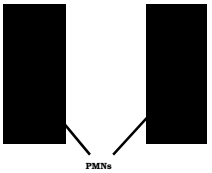


Figura 2. *Imagen de las bandas obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad sencillo (A) y doble (B).*

La composición de estas bandas varía en función del medio elegido, si bien los polimorfonucleares suelen encontrarse mayoritariamente en la misma fracción que los eritrocitos.
Las diferentes bandas fueron recogidas y analizadas para conocer la riqueza en PMNs de cada una de ellas., como queda recogido en la Tabla 1.

Tabla 1. *Porcentaje (media ± D.E.) de leucocitos polimorfonucleares respecto a leucocitos totales en el pellet final.*

Medio de gradiente	PMNs
Histopaque 1077	56,2 ± 10,0
Histopaque 1077 y 1083	64,1 ± 15,3
Percoll 56 y 65 %	62,1 ± 3,8
Percoll 65 %	48,0 ± 6,0
Percoll 56 %	71,6 ± 6,8

En vista de los resultados se estableció el gradiente sencillo de Percoll al 56 % como el mejor medio de gradiente para aislar leucocitos polimorfonucleares a partir de sangre periférica de rata.
La adición de la etapa de lisis con llevó un enriquecimiento de la fracción en PMNs junto con la reducción de la contaminación por eritrocitos, obteniéndose porcentajes de hasta el 90 % de leucocitos polimorfonucleares en pellet.
Tras la incubación y posterior lavado del pellet, se obtuvo un buen rendimiento de leucocitos polimorfonucleares conteniendo fármacos antirretrovirales, que podrían constituir un interesante portador biológico para este tipo de fármacos.

Conclusiones

- Se ha puesto a punto un método de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares a partir de sangre periférica de ratas.
- Se ha llevado a cabo la encapsulación de fármacos antirretrovirales en leucocitos polimorfonucleares de rata.

Bibliografía

(1) Lanao JM, Sayalero ML. Cells and cell ghosts as drug carriers. In: *Nanoparticulates as Drug Carriers*. 329–48, 2006.
(2) Pierigé, F. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.,* 60(2): 286-95, 2008.
(3) Olinger, G.G. et al. *J. Virol.* 74: 8550-857, 2000.
(4) Muntanu, LM. et al. *Romanian J. Biophys.*,14 (1-4):53-58, 2004.
(5) Cavalcanti, D.M.H. et al., *Moll. Cell. Endocrinol.,* 249: 32-9, 2006

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado con los proyectos de investigación el proyecto PI060152 del Plan Nacional de I+D+i y el proyecto SA049A07 de la Junta de Castilla y León.

HIDROGELES DE POLOXAMER DE GELIFICACIÓN *IN SITU* PARA CESIÓN CONTROLADA DE PROTEÍNAS

A. Rey-Rico,[1] C. Alvarez-Lorenzo,[1] L. Balsa,[2] M. Silva,[2] J. Couceiro,[2] y A. Concheiro[1]

[1]Dept. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia. [2]Instituto de Ortopedia y Banco de Tejidos Musculoesqueléticos. Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España.
e-mail: angel.concheiro@usc.es

Introducción

Los sistemas de gelificación *in situ* tienen un gran interés para desarrollar inyectables que, a temperatura ambiente, presentan una viscosidad baja y son fácilmente administrables, mientras que a la temperatura corporal adquieren una viscosidad elevada y forman depósitos de gel en el lugar de aplicación. La gelificación *in situ* permite regular la velocidad de liberación de sustancias bioactivas de estructura diversa (1). Los copolímeros bloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) de la familia de los poloxamer o Pluronic® experimentan transiciones sol-gel a la temperatura corporal cuando la concentración de copolímero es suficientemente alta (2). No obstante, la baja consistencia y la elevada permeabilidad de los geles de Pluronic llevan consigo que el tiempo de permanencia en el lugar de aplicación sea relativamente corto y que su capacidad para retener sustancias activas resulte insuficiente (3). El objetivo de este trabajo fue evaluar las posibilidades que ofrece la incorporación de polímeros hidrosolubles de reconocida capacidad viscosizante sobre las propiedades reológicas de los geles de Pluronic y su aptitud para controlar la cesión de proteínas, manteniendo la biocompatibilidad de los sistemas.

Materiales y Métodos

Materiales

Pluronic® F-127 (PF127) y polivinilpirrolidona Kollidon® 30 (PVP) de BASF (Alemania), alginato sódico de viscosidades baja (ABV, 240 cPs) y media (AMV, 2000 cPs), ácido poliacrílico sal sódica (PAA, 5100 Da) y seroalbúmina bovina (BSA) de Fluka (España).

Preparación de las dispersiones.

Se prepararon disoluciones acuosas de PF127 al 17.5% p/p en NaCl 0.9% y se incorporó ABV, AMV, PAA o PVP30 hasta una concentración final del 1% p/p. A 8 g de cada una de estas disoluciones, se adicionaron 50 mg de BSA.

Evaluación de la citocompatibilidad

Se prepararon dispersiones de PF127 al 17.5% con ABV, AMV, PAA o PVP al 1% en medio de cultivo DMEM F12 HAM (Sigma Aldrich) con 10% FBS y gentamicina. Las dispersiones se filtraron a través de membranas de 0.2 µm (Millipore), se tomaron 0.5 ml y se llevaron a placas de 24 pocillos termostatizadas a 37ºC. A continuación, se inocularon en cada pocillo 1.5 ml de suspensión de células CCL 163 (Balb/3T3 clone A31) o de células SAOS2 (HTB-85) de osteosarcoma humano de la American Type Culture Collection. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5. La viabilidad de las células Balb/3T3 se cuantificó utilizando el Cytotoxicity Detection kit^{PLUS} (LDH, Roche) y la de las SAOS2 por tinción con calceina/yoduro de propidio.

Caracterización reológica

Para caracterizar el comportamiento viscoelástico de las dispersiones se llevaron a cabo barridos de cizalla oscilatoria en un reómetro Rheolyst AR-1000N (TA Instruments, UK) equipado con un plato Peltier, un analizador de datos AR2500 y un cono de 6 cm de diámetro. Los valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') se registraron aplicando una fuerza de cizalla de 0.1 Pa, una frecuencia angular de 5 rad/s y una rampa de temperatura de 2ºC/min desde 15 hasta 45ºC.

Ensayo de cesión de proteína

Las dispersiones se dividieron en alícuotas de 2 ml que se introdujeron en tubos de ensayo y se colocaron en un baño termostatizado a 37ºC. A cada tubo se añadieron 5 ml de NaCl 0.9% a 37ºC y el conjunto se sometió a agitación oscilante (50 osc/min). A tiempos preestablecidos, se tomaron muestras (1 ml) de sobrenadante y se valoró la concentración de BSA espectrofotométricamente a 278 nm (Agilent 5348, Alemania). El medio extraído se reemplazó con un volumen igual de NaCl 0.9% a 37ºC.

Resultados y Discusión

Como componentes de las dispersiones de PF127, se seleccionaron polímeros hidrofílicos admitidos para uso interno por las agencias

regulatorias y que combinan, *a priori*, una adecuada biocompatibilidad con una reconocida capacidad como agentes viscosizantes. El registro de la evolución de los valores de los módulos elástico y viscoso en función de la temperatura puso de manifiesto la influencia de la naturaleza del polímero sobre la temperatura de gelificación y sobre la consistencia de los hidrogeles a 37ºC (**Figura 1**). La presencia de alginato provocó una reducción de hasta 10ºC en la temperatura de gelificación y condujo a la formación de hidrogeles más estructurados.

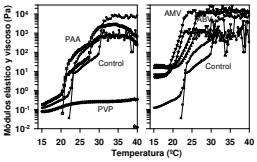


Figura 1. *Módulos elástico (símbolos huecos) y viscoso (símbolos llenos) de las dispersiones de PF127 al 17.5% preparadas en NaCl 0.9% sin (círculos) o con PAA (cuadrados), PVP (rombos), ABV (triángulos hacia arriba), AMV (triángulos hacia abajo) al 1% .*

Con todas las dispersiones se observaron tasas de supervivencia de células Balb/3T3 y de SAOS2 superiores al 60% al cabo de 24 h. En los sistemas preparados con alginato, la tasa de supervivencia superó el 90% (**Figura 2**).

Figura 2. *Resultado de la tinción calceina/ yoduro de propidio de células SAOS2 en geles de PF127-AMV.*

Los perfiles de cesión de BSA resultaron ser muy dependientes de la naturaleza del polímero hidrofílico incorporado al PF127. Las dispersiones de PF127 solo dan lugar a una liberación rápida de una fracción de la dosis en las primeras 12 h, seguida de una cesión más sostenida. La presencia de PVP o PAA produjo una aceleración del proceso de cesión de la proteína, mientras que el alginato permitió obtener geles que proporcionan perfiles de liberación más lentos y que siguen cinéticas de orden cero (**Figura 3**). Este comportamiento de los sistemas que contienen alginato tiene su origen en la notable consistencia que proporcionan a las dispersiones de Pluronic gelificadas.

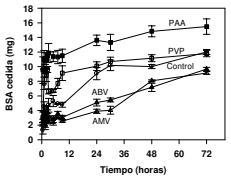


Figura 3. *Perfiles de cesión de BSA.*

Conclusiones

La incorporación de PAA, PVP, AVB ó AVM a dispersiones acuosas de Pluronic F127 permite obtener sistemas de gelificación *in situ* dotados de una excelente citocompatibilidad. La naturaleza del polímero afecta de una manera muy marcada a las propiedades reológicas de estos sistemas y a su eficiencia como dispositivos de liberación controlada de proteínas. Por lo tanto, una adecuada selección del polímero debe permitir ajustar la consistencia y los perfiles de liberación a necesidades terapéuticas concretas. La aproximación desarrollada ofrece interesantes perspectivas para optimizar el comportamiento de sistemas inyectables de gelificación *in situ.*

Bibliografía

(1) Al-Tahami y Singh, *Recent Pat Drug Delivery Formulation* **1**: 65-71, 2007.
(2) Batrakova y Kabanov, *J. Control. Release* **130**: 98-106, 2008.
(3) Cohn et al., *Biomaterials* **24**: 3707–3714, 2003.

Agradecimientos

MEC (SAF2008-01679), FEDER y Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR).

HIDROGELES DE CICLODEXTRINAS Y POLISACÁRIDOS COMO VEHÍCULOS DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

E. López-Montero, C. Alvarez-Lorenzo, J.F. Rosa dos Santos, A. Concheiro, J.J. Torres-Labandeira

Dept. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela.
e-mail: j.torres@usc.es

Introducción

Las infecciones oportunistas, en especial las causadas por *Candida albicans*, constituyen un factor importante de mortalidad y morbilidad en niños y en pacientes con sistema inmune comprometido. El sertaconazol (**Figura 1**) es un agente fungicida y fungistático con un amplio espectro de actividad (1). No obstante su baja solubilidad limita su utilización práctica. El objetivo de este trabajo fue desarrollar hidrogeles de ciclodextrinas para incorporar sertaconazol formando complejos de inclusión en cantidades terapéuticas. El entramado de ciclodextrinas debe ofrecer un microentorno rico en cavidades de alta afinidad, que se mantienen agrupadas una vez que el hydrogel entra en contacto con el medio biológico (2). Para preparar los hidrogeles, se partió de mezclas de polisacáridos y ciclodextrinas y se aplicó un procedimiento de reticulación directa con etilenglicol diglicidiléter (EGDE) (3). Se evaluó la capacidad de los hidrogeles para cargar sertaconazol, controlar su cesión e inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

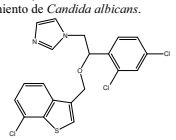


Figura 1. *Estructura del sertaconazol.*

Materiales y Métodos

Materiales

Nitrato de sertaconazol de Ferrer Int. (España), HPβCD de Jansen Pharmaceutische (Bélgica), metilcelulosa (MC, Methocel A15C) de Colorcon Ltd. (UK), hidroxipropilcelulosa (HPC, Nisso M) de Nipón Soda Co. (Japón), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, Methocel K4M) de Dow Stade GMBH (Alemania), carboximetil celulosa sódica (CMCNa) y dodecilsulfato sódico (SDS) de Sigma Aldrich (USA), etilenglicol diglicidiléter (EGDE) de Fluka Chemie GMBH (Alemania). Se utilizó agua purificada por ósmosis inversa (MilliQ®).

Síntesis de los hidrogeles

Se prepararon dispersiones en NaOH 0.2M de HPβCD al 20% p/p sin o con MC, HPC, HPMC, CMC o dextrano al 0.4 ó al 0.8% p/p. A tubos con 10 ml, se añadieron 4 ml de EGDE (al 50%), se homogeneizó y mantuvo en estufa a 50ºC durante 24 h. Los hidrogeles obtenidos se lavaron con HCl 10 mM y agua, y se cortaron en forma de discos de 4-5 mm de espesor.

Caracterización de los hidrogeles

-Hinchamiento: se registró el incremento de peso experimentado por discos secos al sumergirlos en agua.
- Comportamiento biomecánico: se determinó la dureza y la compresibilidad y se estimó el módulo de deformabilidad (ED) (2) utilizando un equipo TA-TX Plus (Stable Microsystems Ltd., UK) utilizando una sonda de 20 mm, que se desplazó a 1 mm/s hasta deformar 3 mm el hydrogel.
- Carga de sertaconazol: los discos se sumergieron en suspensiones acuosas de fármaco (50 mg en 10 ml) y algunos de ellos se sometieron a autoclavado. A continuación, se mantuvieron en agitación durante una semana. La cantidad de sertaconazol incorporado se estimó por extracción en medio SDS al 0.3%.
- Cesión de sertaconazol: los discos cargados se sumergieron en 30 ml de disolución de SDS al 0.3% y, a intervalos preestablecidos de tiempo, se determinó la concentración de fármaco en el medio por espectrofotometría a 302 nm.

Actividad antifúngica

Discos cargados de fármaco (4 por cada tipo de hydrogel y tratamiento) se colocaron en 15 ml de suspensión de *Candida albicans* en fase de crecimiento exponencial, sometida a agitación (180 rpm) a 30ºC. Periódicamente se midió la absorbancia del medio a 600 nm.

Resultados y Discusión

El EGDE es un agente reticulante de baja toxicidad que permite obtener hidrogeles a partir de derivados sacarídicos que mantengan libres algunos de sus grupos hidroxilo (3). El proceso es catalizado por OH^- y se completa en pocas horas a 50ºC. Las proporciones de

polisacárido se seleccionaron de forma que, en la dispersión reticulable, su concentración estuviese fuese inferior a la concentración de entrecruzamiento y favorecer así la distribución homogénea de los componentes del hidrogel. Todos los hidrogeles presentaron una elevada claridad óptica y una superficie lisa y homogénea, y se comportaron como superabsorbentes (**Figura 2**).

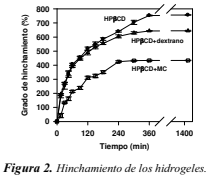


Figura 2. *Hinchamiento de los hidrogeles.*

Los hidrogeles preparados con 0.4% MC, 0.4% HPC ó 0.8% CMCNa fueron los que presentaron mayor consistencia (**Tabla 1**). Esto se puede atribuir a un mayor grado de reticulación, en el caso de los éteres de celulosa no iónicos, al presentar un menor grado de sustitución y, por lo tanto, más grupos hidroxilo disponibles para reaccionar con EGDE. En el caso de la CMCNa, los efectos osmóticos y las repulsiones electrostáticas deben contribuir también a hacer los hidrogeles más rígidos.

Tabla 1*. Módulos de deformabilidad (ED) y cantidades de sertaconazol incorporado por los hidrogeles sometidos o no a autoclavado.*

Hidrogeles de HPβCD	ED (kPa)	Fármaco (mg/g) Sin autoclave	Autoclave
Sin polisacárido	35.5 (0.1)	21.7 (1.2)	18.7 (1.2)
HPMC 0.4%	43.8 (2.1)	33.7 (3.0)	31.8 (4.3)
HPMC 0.8%	57.0 (1.9)	24.0 (5.2)	26.5 (3.1)
MC 0.4%	115 (1)	12.8 (1.9)	19.7 (5.5)
MC 0.8%	49.5 (4.8)	26.5 (1.4)	17.6 (1.1)
CMC 0.4%	86.8 (1.9)	7.9 (1.0)	35.9 (0.4)
CMC 0.8%	110 (10)	3.9 (1.5)	37.2 (3.2)
HPC 0.4%	110 (10)	2.4 (0.2)	24.1 (0.9)
HPC 0.8%	89.1 (7.5)	1.9 (0.1)	21.9 (3.8)
Dext 0.4%	45.5 (3.2)	13.7 (0.4)	36.8 (3.7)
Dext 0.8%	59.3 (4.3)	16.7(0.6)	34.3 (0.5)

Todos los hidrogeles mostraron una capacidad de incorporación de sertaconazol muy por encima de la cantidad de fármaco que se puede alojar en su fase acuosa (0.35-0.54 mg/g), lo que pone de manifiesto que la mayor parte del fármaco se encuentra formando complejos de inclusión con las ciclodextrinas ancladas al hidrogel. No obstante, los hidrogeles preparados con CMC, HPC o dextrano y que no fueron autoclavados mostraron una baja carga de fármaco, que se incrementó notablemente al someterlos a autoclavado. La calefacción facilita la solubilización del fármaco y, por lo tanto, su acceso a las cavidades de la ciclodextrina. El estudio del proceso de cesión de sertaconazol, que se llevó a cabo en disolución micelar de SDS para alcanzar condiciones *sink*, evidenció que los hidrogeles liberan entre el 50 y el 80% del fármaco en las primeras 24 h. Por lo tanto, se seleccionó este tiempo para evaluar su capacidad antifúngica frente a *Candida albicans*. Los hidrogeles de HPβCD cargados con sertaconazol mostraron una eficacia antifúngica tan alta como la que proporciona el fármaco libre, lo que indica que éste mantiene su actividad una vez incorporado al hidrogel (**Figura 3**).

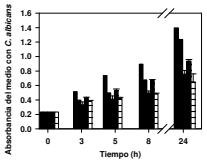


Figura 3. *Crecimiento de Candida albicans en medio de cultivo (columnas negras), en presencia de hidrogeles de HPβCD sin fármaco (gris oscuro), de hidrogeles cargados sin aplicar (gris claro) o aplicando autoclavado (gris con rayas), o en un medio con la misma cantidad de fármaco que el hidrogel que el hidrogel que incorporó la dosis más alta (columna blanca con rayas).*

Conclusiones

Se han desarrollado hidrogeles de ciclodextrinas y polisacáridos en una sola etapa sin utilizar disolventes o reactivos tóxicos. La incorporación de polisacáridos permite modular las propiedades mecánicas, de incorporación de fármaco y de control de la cesión, manteniendo la eficacia antifúngica del sertaconazol.

Bibliografía

(1) Palacín et al. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **71**: 37-76, 2001.
(2) Rodríguez-Tenreiro et al. *J. Control. Release* **123**: 56–66, 2007.
(3) Alvarez-Lorenzo et al. *WO 2006/089993*.

Agradecimientos

MEC (SAF2008-01679), FEDER, Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR).

FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL DE POLIETILENO Y POLIPROPILENO CON CICLODEXTRINAS PARA DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS MEDICADOS

C. A. B. Nava-Ortiz,[1] G. Burillo,[1] E. Bucio,[1] C. Alvarez-Lorenzo[2] y A. Concheiro[2]

[1]Dept. Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, y [2]Dept. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela.
e-mail: carmen.alvarez.lorenzo@usc.es

Introducción

El diseño de productos sanitarios (PS) medicados encierra un notable interés para liberación localizada de fármacos que eviten el desarrollo de reacciones adversas asociadas a la implantación del PS, principalmente de tipo inflamatorio o infecciones. Para dotar a los PS de aptitud como sistemas de liberación, resulta esencial funcionalizar su superficie de manera que adquiera afinidad por el fármaco, sin perjuicio de sus prestaciones como PS (1). Ello obliga a un desarrollo racional del proceso de funcionalización superficial que tenga en cuenta las peculiaridades de cada par fármaco/dispositivo. En este trabajo se aborda una nueva estrategia de funcionalización superficial de polietileno (PE) y polipropileno (PP) con ciclodextrinas (**Figura 1**) para dotarlos de capacidad de incorporación de fármacos hidrofóbicos en general y de diclofenaco en particular. Además de su capacidad antiinflamatoria, el diclofenaco también evita la adsorción de bacterias sobre biomateriales (2). En primer lugar se prepararon injertos de glicidilmetacrilato (GMA) sobre PE (PE-g-GMA) y PP (PP-g-GMA), que sirvan de puntos de anclaje de β-ciclodextrina (βCD) o de hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD). A continuación, se evaluó la capacidad de carga de fármaco y se registraron los perfiles de cesión.

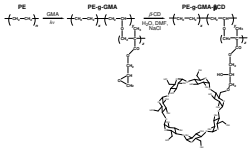


Figura 1. Anclaje de βCD a PE-g-GMA.

Materiales y Métodos

Materiales

PE y PP (100 µm y 50 µm de espesor) de PEMEX (México); GMA de Aldrich (USA), βCD e HPβCD de Roquette Laisa (España); diclofenaco sódico de Vorquímica (España).

Injerto de GMA sobre PE y PP.

La copolimerización de GMA sobre PE y PP, se realizó mediante la técnica de preirradiación oxidativa, empleando para ello una fuente de ^{60}Co (Gamma-Beam 651-PT), con una intensidad de 11.3 KGy/h, una dosis de irradiación de 100 kGy, y una concentración de monómero de 20 %v (3).

Inmovilización de βCD e HPβCD.

Las láminas injertadas se sumergieron en DMF 2 h y, a continuación, se transfirieron a una mezcla de $NaCl_{(0.5M)}$/DMF (2:8 %v) junto con una cantidad equimolar de ciclodextrina con respecto al GMA injertado. El sistema se mantuvo en agitación durante 24 h a 70ºC. Las láminas se lavaron con agua caliente a 60ºC, mezcla etanol:acetona (5:5 %v) durante 24 h y, finalmente, se aclararon con agua.

Estudios de carga de diclofenaco.

Muestras secas (10-20 mg) de láminas injertadas con diferentes cantidades de ciclodextrina inmovilizada se colocaron en 5 mL de disolución acuosa de diclofenaco (0.05-0.50 g/L), durante 48 h en la oscuridad. La cantidad de diclofenaco cargada se determinó por la diferencia entre la concentración inicial y final de cada disolución, registrando la absorbancia a 276 nm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Estudios de cesión de diclofenaco

Las muestras de las láminas injertadas cargadas de diclofenaco se lavaron con agua destilada, se desecaron a vacío durante 5 h y posteriormente en estufa a 50ºC durante 3 h. A continuación, se colocaron en 1-2 mL de tampón fosfato pH 7.4 y se registró la absorbancia del medio a 276 nm a intervalos preestablecidos de tiempo. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Resultados y Discusión

La modificación superficial de PE y PP se realizó en dos etapas: i) irradiación γ en presencia de distintas proporciones de GMA; y ii) reacción de los grupos glicidilo del GMA con βCD e HPβCD. En la **Figura 2**, se muestra la cinética de injerto de GMA sobre PP y PE, mediante el método de preirradiación oxidativa.

El grado de injerto aumenta con el incremento en el tiempo de reacción.

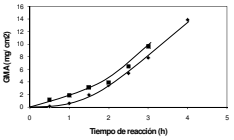


Figura 2. Cinética de injerto de GMA sobre (■) PE y (♦) PP.

La cantidad de ciclodextrina que se inmovilizó en cada lámina aumentó con la proporción de GMA injertado en las láminas (**Figura 3**).

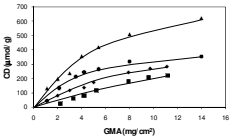


Figura 3. Rendimiento de unión de CDs. (▲) PP-g-GMA-βCD; (●) PP-g-GMA-HPβCD; (◆) PE-g-GMA-βCD; (■) PE-g-GMA-HPβCD.

Con los injertos PP-g-GMA se obtuvo un mayor rendimiento en la unión de CDs, que se puede atribuir a la mayor cristalinidad del PP y, por consiguiente, a una distribución más homogénea del GMA. Por otro lado, el anclaje de HPβCD fue menor que para la βCD, debido posiblemente a impedimentos estéricos. Para cada injerto se observó que, al aumentar la cantidad de CD anclada, la capacidad de incorporación de diclofenaco (**Tablas 1 y 2**) y de control de la cesión (**Figura 4**) se incrementa de forma considerable. Todas las láminas presentaron un marcado efecto burst seguido de una etapa de liberación más lenta.

***Tabla 1**. Carga de diclofenaco sobre láminas PP-g-GMA con ciclodextrinas ancladas (conc. inicial de diclofenaco 0.05 g/l).*

PP-g-GMA-HPβCD			PP-g-GMA-βCD		
GMA mg/cm^2	HPβCD µmol/g	Dicl. µmol/g	GMA mg/cm^2	βCD µmol/g	Dicl. µmol/g
1.1	45	0.14	1.1	130	0.68
2.1	134	0.45	2.0	196	0.40
3.5	213	1.31	3.0	237	2.17
4.2	244	1.46	4.0	356	2.07
5.4	266	0.59	5.4	420	4.84
8.0	318	7.96	8.0	510	2.61
14.0	352	10.09	14.0	623	2.37

***Tabla 2**. Carga de diclofenaco sobre láminas PE-g-GMA con ciclodextrinas ancladas (conc. inicial de diclofenaco 0.05 g/l).*

PE-g-GMA-HPβCD			PE-g-GMA-βCD		
GMA mg/cm^2	HPβCD µmol/g	Dicl. µmol/g	GMA mg/cm^2	βCD µmol/g	Dicl. µmol/g
2.2	23	0.16	2.0	79	0.10
3.3	60	0.15	3.0	116	0.28
4.2	78	0.11	4.2	135	0.17
5.2	118	0.36	5.0	172	0.42
7.9	181	0.13	8.0	243	0.18
9.6	208	0.13	9.7	269	0.31
11.2	220	0.35	11.0	284	0.38

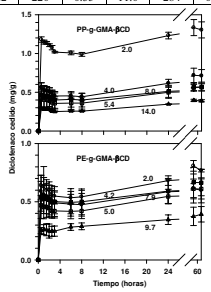


Figura 4. Perfiles de cesión de láminas preparadas con el contenido en GMA que se indica (mg/cm^2).

Conclusiones

La modificación superficial de PE y PP con GMA los dota de capacidad de anclaje de ciclodextrinas. Los materiales funcionalizados combinan las propiedades mecánicas de partida con la capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión. Estos novedosos sistemas poliméricos presentan un gran potencial para el desarrollo de PS medicados dado que la cantidad de ciclodextrina anclada permite regular la carga de diclofenaco y el proceso de cesión.

Bibliografía

(1) Wu y Grainger. *Biomaterials* **27**: 2450-2467, 2006.
(2) Bandare et al. *Curr. Eye Res.* **29**: 245-251, 2004.
(3) Nava-Ortiz et al. *Rad. Phys. Chem.* 2008 (en prensa).

Agradecimientos

MEC (SAF2008-01679), FEDER, Xunta de Galicia (PGIDIT07CSA002203PR) y DGAPA UNAM IN200208, México.

EFECTO DE LA HIDROFOBICIDAD SOBRE EL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE UN SISTEMA DISPERSO DE HIDROXIPROPILCELULOSA

J. Álvarez, M.D. Moya y M.J. Lucero
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla.

Introducción

Los hidrogeles son redes poliméricas que absorben gran cantidad de agua mientras permanecen insolubles en solución acuosa, debido a enlaces físicos o químicos de las cadenas poliméricas individuales (1). Se pueden preparar a partir de sustancias poliméricas de origen sintético, teniendo estructuras bien definidas que pueden ser modificadas para mejorar las propiedades de liberación de fármacos (2). Una estrategia consiste en incorporar grupos hidrófobos a moléculas hidrófilas formadoras de gel y obtener polímeros hidrofóbicamente modificados (3-5). Otra alternativa radica en elaborar mezclas físicas de polímeros hidrólifos con otros de naturaleza hidrófoba, con el fin de obtener sistemas gelificados complejos útiles para la liberación modificada de fármacos (6).
El objetivo del presente trabajo se centra en el estudio de la influencia del efecto hidrofóbico de copolímeros de ácido metacrílico y metacrilato de metilo en mezcla física con hidroxipropilcelulosa.

Materiales y Métodos

Se han elaborado diferentes sistemas dispersos con hidroxipropilcelulosa (HPC) y Eudragit® L100 o Eudragit® S100 (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de las distintas formulaciones ensayadas.

Denominación	Composición (% p/p)			
L30D	Eudragit® L100 /S100 ……. 30			
S30D	LSS ……. 0.7			
	Tween® 80 ……. 2.3			
	Trietanolamina ……. 1.25			
	HPC	**L30D S30D**	**TEO**	**Agua**
HPCL30D HPCS30D	4	17.37		76.67
HPCL30DTEO HPCS30DTEO	4	17.37	1.96	80.59

Se han realizado estudios reológicos mediante un reómetro AR2000 (TA Instrument) equipado con una geometría de plato de 60 mm de diámetro y un gap de 1 mm. La temperatura se ha mantenido a 25ºC mediante una placa Peltier.

En primer lugar se ha efectuado un estudio oscilatorio para determinar la estructura formada por los sistemas dispersos. Para ello se han hecho barridos de esfuerzo (0.5 a 100 Pa) a 1Hz y barridos de frecuencia (0.1 a 100 rad/s) a 2 Pa. En segundo lugar se han realizado las curvas de viscosidad (0 a 50 Pa).
Los ensayos de disolución se llevan a cabo en un aparato de disolución USP 27 tipo
2 (Erweka DT600HH) y con los dispositivos Enhancer Cell® (Vankel) con una superficie efectiva de 1.77 cm^2 y una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm de tamaño de poro. La teofilina se determina por espectrofotometría a 272 nm.

Resultados y Discusión

El barrido de esfuerzo realizado a los sistemas dispersos en estudio ha permitido determinar la zona viscoelástica lineal en donde el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida son independientes de la frecuencia aplicada. Se ha seleccionado un esfuerzo oscilatorio de 2 Pa para someter a las muestras a un barrido de frecuencia. En la Figura 1 se pueden observar los espectros mecánicos de las muestras. En ambos casos los módulos de pérdidas se mantienen por encima de los de almacenamiento, lo que indica que son fluidos predominantemente viscosos, y que no forman estructura de gel. Además tanto para una muestra como para la otra, el ángulo de desfase de la onda es superior a 45º, lo que corrobora este comportamiento. La adición de teofilina a estos sistemas dispersos no modifica la estructura viscosa sin puntos de reticulación obtenida con la mezcla de estos dos polímeros.
En el estudio viscosimétrico recogido en la Figura 2 se puede observar para ambos fluidos que la viscosidad disminuye con la velocidad de cizalla, característico de los sistemas no newtonianos de comportamiento pseudoplástico. Se han ajustado las curvas a los distintos modelos conocidos y se ha obtenido un mejor ajuste para el modelo de Carreau para las dos muestras, lo que permite determinar matemáticamente los parámetros recogidos en la Tabla 2.

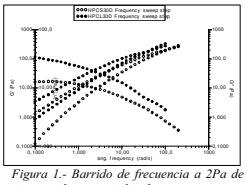


Figura 1.- Barrido de frecuencia a 2Pa de los sistemas dispersos indicados.

En ella se puede observar como el sistema HPCL30D es más viscoso que el HPCS30, lo que indica que al aumentar el % de grupos metacrilato de metilo se obtienen fluidos de menor viscosidad. En ambos casos, la adición de teofilina no modifica el comportamiento viscoso aunque provoca un aumento de la viscosidad en el HPCL30D y una disminución de la misma en el HPCS30D.

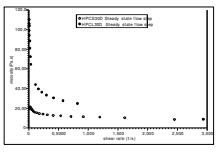


Figura 2.- Curva de viscosidad de los sistemas dispersos indicados.

Tabla 2.- Parámetros obtenidos tras aplicar el modelo de Carreau a las curvas de viscosidad.

	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K (s)	n	EE
HPCL30D	109.5	10.6	99.7	0.441	9.4
HPCS30D	22.6	6.8	42.6	0.374	12.1

Por último, se ha realizado un estudio de cinética de liberación. En la Figura 3 se muestran los perfiles de liberación de los dos sistemas dispersos y se observa que, a las 24 h de transcurrido el ensayo, se ha obtenido una liberación alrededor del 80 % en las dos muestras.

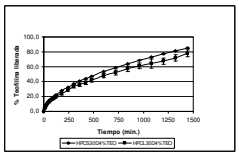


Figura 3.- Cinética de disolución de los sistemas dispersos indicados.

Se han aplicado los modelos cinéticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas, obteniéndose para ambos polímeros un $r^2 > 0.997$ además de un valor de n de 0.584. Por tanto, el mecanismo de liberación es por difusión. En la Tabla 3 se recogen algunos de los parámetros obtenidos después de ajustar las curvas al modelo de Higuchi.

Tabla 3.- Parámetros del modelo de Higuchi.

	r^2	Ecuación recta	D (cm^2/min)
HPCL30D	0.998	$y=0.600\sqrt{t}-0.666$	$1.71\cdot10^{-3}$
HPCS30D	0.999	$y=0.681\sqrt{t}-0.9554$	$1.94\cdot10^{-3}$

Conclusiones Los sistemas HPCL30D y HPCS30D no tienen estructura de gel. Son sistemas sin reticulación, viscosos y pseudoplásticos. El incremento de grupos hidrófobos no modifica el comportamiento de los preparados aunque sí disminuye su viscosidad. Este hecho repercute en el proceso de liberación que se hace ligeramente más rápido.

Bibliografía

(1) Lin C y Metters A, Adv. Drug Deliv. Rev., 58: 1379-1408 (2006).
(2) Bonacucina G y cols., Int. J. Pharm., 307:129-140 (2006).
(3) Castellano I. y col., Int. J. Pharm., 146:71-79 (1997).
(4) Ferrero C. y cols. Int. J. Pharm., 149:233-240 (1997).
(5) MillarD. y Löffler M.,Colloids Surface A, 288:165-169 (2006).
(6) Escudero J. y cols., Int. J. Pharm., 351: 61-73 (2008).

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE HCMMA

C. Claro-Cala, M.R. Jiménez-Castellano
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia
41012 Sevilla, Spain

Introducción
Del estudio de materiales de origen polimérico se ha hallado aplicaciones en el área de medicina y farmacia. Especialmente, al formular formas farmacéuticas tópicas tales como cremas, geles, etc, los materiales que se utilicen dependerán en gran parte de la finalidad requerida del producto final. En el desarrollo de estas formas farmacéuticas de aplicación tópica, una serie de propiedades mecánicas han sido directamente relacionadas con parámetros sensoriales *in vivo*, por ejemplo, extracción del producto de su contenedor original, características de aplicación del producto. Por tanto, son directamente aplicables al diseño de preparaciones farmacéuticas de administración tópica (1).
Los polímeros pueden formar interacciones adhesivas con substratos biológicos, siendo una ventaja para la liberación de fármacos, incluyendo tiempo de residencia prolongado. Los polímeros de celulosa son ejemplos de este tipo de sustancias con propiedades bioadhesivas (2).
El presente trabajo se centra en el estudio de las propiedades mecánicas de los sistemas elaborados con un copolímero de injerto de hidroxipropil celulosa y metacrilato de metilo y un tensoactivo no iónico a distintas concentraciones.

Materiales y Método
Materiales
Copolímero de injerto de hidroxipropil celulosa-metacrilato de metilo (HCMMA) (4), polioxietilen (EO=5) nonil fenil eter (Igepal CO 520®, Sigma-Aldrich, Barcelona) y Teofilina anhidra (Roig Farma, S.A. Barcelona).
Elaboración de sistemas dispersos hidrófilos
Se ha preparado un sistema disperso hidrófilo con HCMMA(1.5 % p/v), distintas proporciones de Igepal CO 520® (20 % - 25 % p/v) y agua purificada. Para ello se ha utilizado un homogeneizador Ultra-Turrax T18 equipado con una turbina S-18 N-19 (IKA, Staufen, Alemania) a una velocidad de 6000 rpm.
Propiedades mecánicas
Para el análisis de las propiedades mecánicas de los sistemas poliméricos se ha empleado un analizador de la textura (Modelo TA-XT2, Stable Micro Systems, Reino Unido), en modo de "*Fuerza en Compresión"*. La sonda utilizada ha sido un disco de extrusión estándar de 35 mm de diámetro (A/BE). La muestra, 60 g, ha sido colocada en un recipiente estándar de 50 mm de diámetro o en cualquier caso, el recipiente contenedor original del semisólido, de similares dimensiones, en el caso de productos dermofarmacéuticos. En ensayo se realiza inmediatamente después de estar almacenado durante 24 horas a la temperatura de 25 ºC, en una habitación con temperatura y humedad controlada, con el propósito de hacer posteriormente posibles comparaciones.
Las características del ensayo han sido las siguientes:

- Célula de carga: 5 Kg
- Velocidad pre-Test: 1 mm/s
- Velocidad Test: 1 mm/s
- Velocidad post-Test: 1mm/s
- Distancia: 4 mm

Las medidas se han llevado a cabo por quintuplicado para cada uno de los doce sistemas poliméricos ensayados.

Resultados y discusión
Este estudio informa sobre el uso del análisis del perfil de la textura (TPA) para caracterización mecánicamente de los sistemas dispersos farmacéuticos que contienen al menos un polímero bioadhesivo y para determinar interacciones entre los componentes de la formulación.
Determinamos la ***dureza*** ("***hardness"),*** fuerza requerida para lograr una deformación al sistema. ***Compresibilidad ("Compressibility"),*** el trabajo requerido para deformar el producto durante la primera compresión de la sonda o sensor.
El "***trabajo de adherencia"*** o ***adhesividad ("adhesiveness"),*** es decir, el trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie de la muestra y la superficie de la sonda.(3)
Las formulaciones examinadas exhiben las características mecánicas dependientes del diseño de la formulación.

Tabla1: Las características mecánicas de los sistemas dispersos como análisis del perfil de la textura a25 ºC. Media (± SD) de al menos tres replicados

	Hardness (N)	Compressibility (N·mm)	Adhesiveness (N·mm)
20 %	0,321 ± 0,005	0,848 ± 0,048	1,038 ± 0,056
21 %	0,350 ± 0,008	0,897 ± 0,090	1,229 ± 0,068
22%	0,392 ± 0,013	1,066 ± 0,049	1,256 ± 0,025
23 %	0,418 ± 0,005	1,019 ± 0,047	1,445 ± 0,039
24 %	0,504 ± 0,020	1,242 ± 0,118	1,678 ± 0,127
25 %	0,546 ± 0,008	1,263 ± 0,085	1,862 ± 0,076

Las propiedades mecánicas de las dispersiones acuosas son presentadas en la Tabla 1. Para estos sistemas farmacéuticos, el incremento de la concentración del tensioactivo muestra una alteración de las propiedades mecánicas, resultando un incremento de la dureza, incremento el trabajo necesario para comprimir cada sistema hasta una distancia fijada (***Compressibility***) e incrementado la adhesividad de los sistemas al sensor analítico (***Adhessiveness)***.
El estudio estadístico del efecto del incremento de la concentración del tensioactivo sobre la ***hardness***, ***compressibility*** y ***adhesivity*** de las formulaciones, mediante el análisis unifactorial de la varianza ($p < 0.05$, denota significancia); y comparaciones múltiple entre las medias, con corrección de Bonferroni ($p < 0.05$ denota significancia) muestra la existencia de diferencias significativas sobre las propiedades mecánicas cuando se produce el incremento de la concentración de tensioactivo de los sistemas dispersos.Además, fue observada la existencia de una buena correlación entre el incremento de ***hardness*** de los sistemas dispersos, al incrementar la concentración tensioactivo con ***compressibility***, entendido como el trabajo requerido para comprimir el producto hasta una distancia fijada, presentando un ***coeficiente de correlación lineal de Pearson*** de 0.933 ($p<0.001$).
Un producto diseñado para una aplicación tópica, como mucosas o piel, debe preferiblemente poseer propiedades adhesivas, tales que mejoren el tiempo de localización en el lugar de acción y de esta forma mejorar la eficacia clínica.
Adhesiveness en TPA es comúnmente definida como el trabajo requerido para superar las fuerzas atractivas entre la superficie de la muestra y la superficie del sensor. Sin embargo, ***adhesiveness*** es una medida del trabajo requerido para separar el sensor de la muestra, la cual puede en algunos casos conllevar a la fractura de enlaces cohesivos en la muestra. Más adelante se realizaron las medidas de las propiedades mecánicas de estos sistemas dispersos en ausencia de polímero, mediante la misma técnica analítica, para examinar, comprobar y justificar las distintas propiedades mecánicas.
Por tanto, las principales propiedades mecánicas correspondientes a los sistemas dispersos, en ausencia de polímero, han sido mostradas en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2 : Características mecánicas de los sistemas formados por Igepal CO 520 como análisis del perfil de la textura a 25 ºC. Media (± SD) de al menos tres replicados

	Hardness (N)	Compressibility (N·mm)	Adhesiveness (N·mm)
20 %	0,128 ± 0,001	0,385 ± 0,004	0,313 ± 0,001
21 %	0,136 ± 0,002	0,398 ± 0,007	0,331 ± 0,007
22%	0,168 ± 0,006	0,473 ± 0,004	0,423 ± 0,002
23 %	0,162 ± 0,003	0,459 ± 0,011	0,358 ± 0,020
24 %	0,205 ± 0,002	0,543 ± 0,015	0,444 ± 0,008
25 %	0,275 ± 0,003	0,698 ± 0,028	0,746 ± 0,006

De nuevo comprobamos que el incremento de tensioactivo de los sistemas dispersos en ausencia del polímero provoca un incremento significativo en los valores de las propiedades mecánicas de los sistemas. Para ello, se ha realizado el estudio estadístico de comparación entre las medias, por el análisis unifactorial de la varianza ($p < 0.05$, denota significancia); y comparaciones múltiple con ***corrección de Bonferroni*** ($p < 0.05$ denota significancia) mostrando la existencia de diferencias significativas. En este caso, del estudio de la correlación entre las propiedades ***hardness*** y ***compresssibility*** observamos la ausencia de asociación entre ellas.

Bibliografía
(1) Jones, D. Int J Pharm, 151, 223,1997
(2) Jones D., Int. J. Pharm., 179,167, (1999).
(3) Jones, D. Journal of Applied Polymer Science, 61, 2229-2234, (1996)
(4)Castellano I. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, San Sebastián, 1997.

DESARROLLO DE NUEVAS FORMAS DE DOSIFICACIÓN PARA USO PEDIÁTRICO/VETERINARIO

B. Clares, V. Gallardo, M.E. Ibáñez, M.E. Morales, M.A. Ruiz
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071, España

Introducción
En la actualidad, la preocupación por desarrollar nuevas formas de dosificación de aplicación en pediatría y veterinaria es una constante en el ámbito de la tecnología farmacéutica (1).
Las gominolas son preparaciones sólidas para administración oral obtenidas por moldeo presentadas en dosis únicas, que van a ser fragmentadas con los dientes mediante masticación y posteriormente deglutidas. En este sentido pueden estar destinadas a aquellos pacientes o animales que tengan dificultades para deglutir o que presenten resistencia a otro tipo de formas farmacéuticas (2).
Nuestro objetivo ha sido la elaboración y puesta a punto de gominolas como nuevas formas de dosificación en pediatría y/o veterinaria. El estudio se ha basado en el cumplimiento de los límites mínimos de aceptabilidad en los ensayos de uniformidad de masa, disgregación y calidad microbiológica, descritos en la RFE (3).

Material y Métodos
Materiales:Los productos utilizados para la elaboración de las mezclas primarias fueron los siguientes: Ácido cítrico, Aspartamo, Bentonita, Esencia de fresa, Glicerina, Goma arábiga, Metilparaben, Pectina, Sacarosa, Colorante rojo (E-124) suministrados por Guinama, (España), Gelatina de Fagron Ibérica, (España) y Agua destilada.
Las diferentes formulaciones empleadas en la elaboración de las gominolas, junto con las proporciones relativas a los componentes figuran en la tabla 1:

Tabla 1. Composición de las formulaciones

FORMULA I	FORMULA II
Jarabe simple....29.8%	Bentonita……1%
Sacarosa……...33.4%	Aspartamo……1%
Mezcla	Goma arábiga..1%
gelatina/pectina 26.6%	Glicerina.....69%
- Gelatina…..4.5%	Gelatina…….19%
- Pectina……1%	Metilparaben c.s.
Colorante c.s	Colorante
Saborizante c.s	Saborizante
Acido cítrico pH 3.35	pH = 5.4
Agua…….csp 100	Agua…… csp 100

Método de elaboración:
FORMULA I:
1. Preparación de la solución azucarada: Se mezclan el agua, el jarabe simple y la sacarosa en las proporciones anteriormente indicadas. Se llevan a ebullición hasta que la mezcla espese y posteriormente se deja enfriar.
2. Para la preparación de la mezcla de gelatina y pectina ambas se adicionan en caliente y en continua agitación al agua de la fórmula
Se mezclan las dos soluciones y por último se adiciona el ácido cítrico (50% p/v) para obtener un pH de 3.35 ± 0.05, el saborizante y el colorante. Esta mezcla primaria se incorpora a los moldes, previamente parafinados.

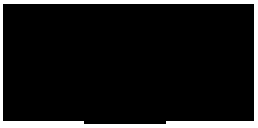
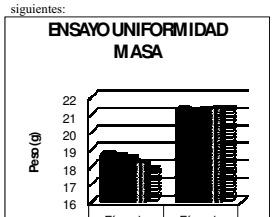


Figura 1. Fotografía de las gominolas según fórmula I (izqda) y fórmula II (drcha)

FORMULA II
1. En primer lugar se prepara una mezcla glicerinada caliente con la bentonita, la goma arábiga, la gelatina y el conservante evitando la formación de grumos.
2. A la mezcla anterior se adiciona la fase acuosa junto con la sacarina, colorante y saborizante, hasta conseguir viscosidad adecuada.
3. Vertemos la preparación sobre los moldes, sin necesidad de parafinado.

Resultados y discusión Con el fin de observar diferencias significativas de las diferentes formas en base a su composición se han llevado a cabo la realización de diferentes ensayos (4). Cada una de las formulas se prepara 6 veces. El periodo de estudio ha sido de 30 días.
En cuanto a las características organolépticas se ha valorado el color, olor y sabor así como la forma, tamaño, superficie y consistencia de las gominolas objeto de estudio. No se han apreciado cambios significativos a lo largo del periodo de estudio.
Ensayo de uniformidad de masa
Se pretende determinar si las masas individuales están dentro de los límites establecidos con respecto a la masa media de la muestra.

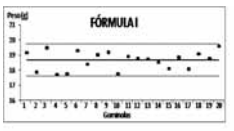
Tomamos 20 gominolas escogidas al azar de cada una de las fórmulas en estudio y las pesamos individualmente. Los pesos medios obtenidos de las 20 unidades fueron los siguientes:

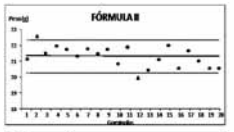


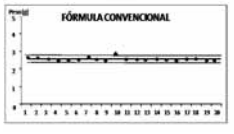
	Fórmula 1	Fórmula 2
1 Día	18,71	21,31
3 Días	18,63	21,25
7 Días	18,49	21,26
15 Días	18,19	21,31
30 Días	17,91	21,38

Figura 2. Evolución uniformidad de masa durante 30 días

Los datos de masa obtenidos no sobrepasan el porcentaje de desviación permitido (±5%). La masa individual de cada una de las gominolas no se ha desviado de la masa media en más del doble del porcentaje especificado (figura 3).







Asimismo durante el periodo de estudio ensayado las gominolas objeto de estudio no sufren ningún cambio significativo en el valor medio de masa.
Ensayo de disgregación
Se realiza en agua a 37ºC, utilizando el dispositivo de disgregación descrito en RFE. Este ensayo está destinado a determinar la mayor o menor aptitud de las gominolas para desintegrarse en medio líquido, en un tiempo determinado. Se realiza el ensayo para las dos formulaciones elaboradas y para una comercial que nos sirve de referencia.
El tiempo de disgregación para la formula I, es de 2 horas y media. En la fórmula II y en la fórmula comercial, podemos observar que a las 3 horas han sufrido un proceso de hinchamiento, con cambios en su forma, pero sin llegar a disgregarse (tabla 2).
Este mismo ensayo se ha llevado a cabo simulando una masticación previa y el resultado obtenido ha sido el siguiente: las gominotas elaboradas conforme a la fórmula I se han disgregado en menos de 1 minuto, mientras que las muestras de la fórmula II y de la fórmula de referencia han tardado 3 minutos en desaparecer.

Tabla 2. Ensayo de disgregación

GOMINOLAS	disgregación 37ºC (enteras)	disgregación 37ºC (troceadas)
Fórmula I	2.5 horas	1 minuto
Fórmula II	> 3.5 horas	3 minutos
Fórmula comercial	> 3.5 horas	3 minutos

Ensayo microbiológico
Cumple la normativa descrita en RFE.

Bibliografía
(1) Salazar R. Análisis y control de medicamentos. Barcelona: Salazar Macian, pp. 394-409, 2005.
(2) Food Hydrocolloids: Textura and structure of gelatin/pectin-based gummy confections. 15 (4-6): 643-653, 2001.
(3) Real Farmacopea Española, 3ªed., 247-289, 2005.
(4) BeMiller JN. Gums/hydrocolloids: analytical aspects. In A. C. Eliasson, Carbohydrates in foods.New York: Marcel Dekker pp. 265-281, 1996.

ESTUDIO DE LA SELECCIÓN DE MATERIALES UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE UNA PLANTA HIGH CONTAINMENT

Johnny Edward Aguilar Diaz[1],Montse Montaner, Eva Planas, Lorena Terres, Immaculada Gomez, Elias Benito
[1]Garantía de Calidad Novartis Farmacéutcia, SA. Doctorando en Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Introducción

La industria Farmacéutica es una industria especializada en la preparación de medicamentos. Esto quiere decir que su objetivo primordial es suministrar a los consumidores finales que son los pacientes, aquella sustancia o mezcla de sustancias que transformadas en la forma farmacéutica adecuada para su administración, permiten diagnosticar, prevenir, aliviar o curar enfermedades. Por lo tantos todos los factores externos como las personas, instalaciones que están implicadas en el ciclo de transformación de una materia prima desde que llega a la planta farmacéutica, hasta el momento que se realiza su liberación y posterior distribución como producto acabado, juegan un papel primordial.
Estos medicamentos requieren ser fabricados en unas instalaciones adecuadas diseñadas desde un punto de vista de las GMP (Good Manufacturing Practices) y cumpliendo con las normativas de HSE (Health Safety, Ecology). Para el diseño de un planta farmacéutica es esencial que el equipo que conforma el proyecto el cual estará integrado por personal de los Departamentos de Garantía de Calidad (incluido Control de Calidad), HSE, Ingeniería y Producción, tengan el conocimiento especifico acerca de:

- La función para la que el edificio es diseñado (Ejemplo: Instalaciones para formas farmacéuticas sólidas, hormonas, citostáticos, estériles, etc).
- Las actividades y operaciones que se van a llevar a cabo en el interior de las instalaciones farmacéuticas.
- La Interrelación entre las diferentes actividades que se van a llevar a cabo en el exterior del edificio.

Ahora si hablamos del diseño de unas instalaciones "high containment" quiere decir que dentro de estas instalaciones se van a fabricar productos cuyo principio activo es altamente activo, como por ejemplo citostáticos. Por tanto requiere prestar especial atención a definir un sistema de contención tanto en instalaciones como también en las máquinas donde un sistema de presiones diferenciales jugará un rol muy importante, además debemos evaluar que tipo de EPI (Equipo de protección individual) se debe utilizar en cada área ya sea producción, acondicionado y control de calidad. El flujo de personal y materiales también debe estar solidamente estructurado así como un plan para la formación del personal, asegurándonos de esta manera que solo personal con un entrenamiento adecuado pueda acceder a esta instalaciones farmacéuticas High Containment..
La construcción de estas instalaciones debe de realizarse con los materiales adecuados ya que al final de cada campaña debe de realizarse una limpieza exhaustiva no solo de las máquinas sino de las instalaciones, por tanto se espera que estos materiales que conformarán paredes, techos, suelos no absorban ni adsorban la sustancia activa ya que representa un riesgo potencial para los trabajadores. La recomendación es utilizar el Acero Inoxidable ya que es fácil de limpiar, pero el coste sería demasiado elevado, por tal motivo este trabajo de investigación muestra la manera de cómo realizar un estudio adecuado seleccionando los materiales idóneos previo a la construcción del edificio

Materiales y métodos

Materiales
4 materiales: Suelos: PVC Azul Conductivo, PVC Toro®, Paredes: Chapa lacada, Placa Metálica.
Métodos
Se realiza un estudio de materiales que consiste en evaluar el porcentaje de recuperación con el producto más insoluble (SI0001), el producto más pegajoso (FL001) y el producto más difícil de limpiar (VL001)sobre el material después de una limpieza. La recuperación se hará a través de Swabb Húmedo(evalúa residuos del API extraídos con solventes), Swabb en seco (evalúa residuos que podrían encontrar en paredes y suelos y que el operario podría llevarselos sobre la piel al tocarlos). La recuperación será aceptable cuando ≥ 50%.

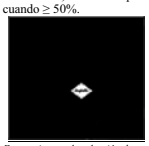


Figura Nº1: Estrategia para la selección de materiales

Resultados y Discusión

De los cuatro materiales seleccionados se observa que para suelos la recuperación es ≥70 % se obtiene en el PVC Toro® y en paredes la

recuperación la chapa lacada la recuperación es ≥ 70% se obtiene en la chapa lacada. Con respecto al Swabb Seco se observa que después de la limpieza no se encontraron residuos de la sustancia activa más insoluble ni de la más pegajosa, pero se observan un porcentaje muy bajo cuando realizamos la recuperación del producto más difícil de limpiar, el cual será optimizado después de realizar la validación de limpieza correspondiente una vez finalice la construcción y la calificación de las nuevas instalaciones

Tabla Nº1: Resultado correspondiente a los materiales seleccionados

	Swabb Húmedo		Swabb Seco	
PVC Toro®	74,19 %	74,81 %	NA	NA
PVC Azul	56,21 %	55,22 %	NA	NA
Placa Metalica	23,20 %	26,20 %	NA	NA
Chapa Lac.	79,11 %	78,48 %	NA	NA
PVC Toro®	77,50 %	78, 22	NA	NA
PVC Azul	51,23 %	50,99 %	NA	NA
Placa Metalica	21,25 %	21,18 %	NA	NA
Chapa Lac.	78,40 %	79,26 %	NA	NA
PVC Toro®	76,48 %	76,61 %	0,62 %	0,66 %
PVC Azul	54,23 %	54,01 %	NA	NA
Placa Metalica	22,34 %	22,12 %	NA	NA
Chapa Lac.	78,54 %	79,08 %	1,05 %	0,55 %

Con respecto al swabb en seco después de realizar la limpieza y la recuperación se observa en el Figura Nº 2 que para el PVC Toro® aparece algún pico cromatográfico desconocido los cuales no son cuantificables al tratarse de porcentajes muy pequeños

Figura Nº2: Cromatograma PVC Toro®.

Para la chapa lacada se observa en el cromatograma detallado en la Figura Nº 3 que no aparece ningún pico cromatográfico desconocido y que el blanco y el solvente salen muy limpios, lo cual indica que no existen restos de la sustancia activa, demostrando de esta manera que a través de una limpieza adecuada no será absorbidos.

Figura Nº3: Cromatograma Chapa Lacada

Cabe comentar que en el análisis del PVC Azul conductivo se puede observar que no aparecen picos cromatográficos desconocidos y cuantificables, sin embargo aparecen unos picos muy pequeños no cuantificables a un tiempo de retención distintos de la sustancia activa, que podría corresponder a la laca superficial que contiene este PVC el cual ha sido removida en la etapa de la limpieza, ya que se realiza una inspección visual y se observa una disminución del brillo del mismo

Figura Nº4: Cromatograma Chapa Lacada

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos detallados en la Tabla Nº 1 y las Fig 2,3,4 se concluye que:
d) El PVC Toro® es el material idóneo para la instalación de suelos.
e) La chapa Lacada ® es el material idoneo para la instalación de paredes.
f) La utilización de materiales alternativos después de un estudio adecuado es aceptable, ya que se demuestra su no retención de sustancias altamente tóxicos.

Bibliografía

4. Salazar M. Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de medicamentos. Tomo II- Tema 5, pp: 560-595
5. 21 CFR part 210, 211: GMP Americanas. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=210&showFR=1, visitada: 18/10/2008
6. GMP Europeas. Capitulo 3: http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-4/pdfs-en/cap3en.pdf. visitada: 18/10/2008

EVOLUTION OF SIZE, SIZE DISTRIBUTION AND Z-POTENTIAL OF DISPERSED PHASE DROPLETS IN O/W EMULSIONS THROUGH AGEING

Mª. E. Franco Gil, A. Mª. Rodríguez Bayón
Biotransformations Group. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid, Spain.

Introduction

Droplet size and droplet size distribution into the dispersed phase are main factors to consider in the development and storage of a new semisolid pharmaceutical form [1]. The better description of an emulsion is provided by the size distribution of its inner droplets, since it indicates how the inner phase has been divided and dispersed through the continuous phase. Besides, droplet size affects the stability of emulsions and suspensions as interparticular forces and sedimentation rate depends on the size of the dispersed matter [2].
In order to calculate globule size, dispersed droplets are consider to be spherical [1]. Moreover, different measurement techniques [3] and results graphs [4] can be used.
Z-potential measurement gives us information about the electrical charge on the droplet surface, its sign, quantity and repercussion on the stability of the dispersed system through storage time [5] as the electrical superficial charge affects the floculation rate [6] and totally floculated droplets show nule z-potential [5].
In this work two different O/W emulsions were prepared including salicylic acid as active compound (1%).
The aims of this work are: a) to achieve the droplet size characterization of two different O/W emulsions and b) to study the stability of both emulsions, through a nine-weeks period, according to the evolution of the droplet size parameters and size distribution, and of the Z-potential value.

Materials and methods

• ***Composition of the emulsions*** is shown in **table 1**

Table 1: Composition of the emulsions

Components of the emulsions	Emulsion E1	Emulsion E2
Mineral oil		8 %
White soft vaseline	40 %	
Tefosé 1500 (HLB=11)	10 %	
Labrafil M 1944 CS (HLB= 4)		3 %
Distilled water	45%	74%
Tween 80 (HLB=15)	5 %	
Tefosé 63 (HLB=9)		15 %

• ***Preparation and storage of the emulsions:*** Emulsions were prepared according to a standard procedure [7]: Salicylic acid (SA, 1%) was dissolved in the melted fatty phase. Melted water phase was added at the same temperature (70 ºC) and the two phases were mixed together with a rotor stator homogenizer (Polytron PT-3000).
The two emulsions obtained were white semisolid creams; E2 were more fuid than E1.
The emulsions were storaged at room temperature in the dark.

• ***Droplet size determination***
Droplet size measurements for internal phase of both emulsions (E1 & E2) were carried out in triplicate at six different ageing times (24 hours, 1, 2, 4, 6 and 9 weeks after the preparation of both emulsions) using a particle size and shape analyzer (Galai CIS-1) at 25ºC of temperature.
The values for different parameters (such as volume equivalent diameter, Sauter diameter, etc) were gathered. After that, different results graphs (normal distribution and log-normal distribution on probability paper) were plotted.

• ***Z-potential determination***
Z-potential measurements for both emulsions were carried out, at 25ºC in a ZetaMaster particle analyzer at the same ageing times as in the droplet size performance. At least, eight samples where tested at each ageing time.
Electrophoretic mobility and Z-potential values were gathered for every test.

Results and discussion

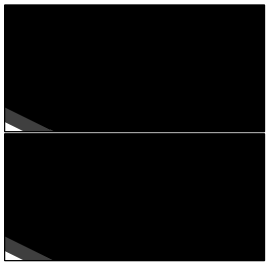
•The ***droplet size (length diameter) distributions*** of both emulsions obtained at 24 hours and nine weeks of storage are shown in **table 2** (emulsion E1) and **table 3** (emulsion E2) and their normal distribution graphs are shown in **figure 1** (emulsion E1) and **figure 2** (emulsion E2)

Table 2. Emulsion E1. Size distribution. Length diameter (µm)

24 hours		9 weeks	
Mean diameter	Frecuency (%)	Mean diameter	Frecuency (%)
0.270	10.1010	0.280	10.1010
0.665	20.2020	0.665	15.1515
0.880	15.1515	0.865	15.1515
1.080	15.1515	1.070	15.1515
1.295	10.1010	1.235	5.0505
1.470	5.0505	1.425	10.1010
1.625	5.0505	1.655	5.0505
1.830	5.0505	1.880	5.0505
2.170	5.0505	2.230	5.0505
2.835	5.0505	2.815	5.0505
3.610	2.0202	3.685	5.0505
4.695	2.0202	4.565	2.0202
		5.840	2.0202

Table 3. Emulsion E2. Size distribution. Length diameter (µm)

24 hours		9 weeks	
Mean diameter	Frecuency (%)	Mean diameter	Frecuency (%)
0.280	15.1515	0.270	10.1010
0.665	20.2020	0.645	15.1515
0.870	20.2020	0.875	20.2020
1.060	15.1515	1.090	15.1515
1.250	10.1010	1.209	10.1010
1.450	5.0505	1.369	5.0505
1.720	5.0505	1.580	5.0505
2.170	5.0505	1.775	5.0505
2.650	2.0202	2.095	5.0505
3.405	2.0202	2.610	5.0505
		3.295	2.0202
		4.155	2.0202



•In **table 4** (emulsion E1) and **table 5** (emulsion E2) the volume equivalent mean diameter, the log-normal distribution slope (plotted on probability paper) and the polydispersity degree were calculated from the results gathered at every storage time (24 hours, 1, 2, 4, 6 and 9 weeks).

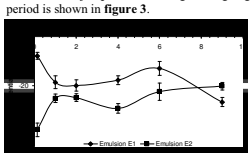
Table 4. Emulsion E1. Size parameters

Ageing time	Volume equivalent mean diameter (µm)	Log-normal distribution slope	Polydispersity degree
24 hours	2.317 ± 0.065	1.550 ± 0.044	0.658 ± 0 .008
1 week	2.357 ± 0.333	1.463 ± 0.037	0.684 ± 0.017
2 weeks	2.803 ± 0.223	1.359 ± 0.034	0.736 ± 0.019
4 weeks	2.423 ± 0.058	1.441 ± 0.043	0.694 ± 0.020
6 weeks	2.650 ± 0.050	1.415 ± 0.042	0.707 ± 0.021
9 weeks	2.670 ± 0.130	1.411 ±0.008	0.708 ± 0.004

Table 5. Emulsion E2. Size parameters

Ageing time	Volume equivalent mean diameter (m)	Log-normal distribution slope	Polydispersity degree
24 hours	1.870 ± 0.223	1.607 ± 0.096	0.624 ± 0.039
1 week	1.543 ± 0.067	1.695 ± 0.105	0.591 ± 0.038
2 weeks	1.980 ± 0.046	1.565 ± 0.024	0.639 ± 0.010
4 weeks	1.630 ± 0.079	1.566 ± 0.089	0.640 ± 0.035
6 weeks	2.017 ± 0.283	1.606 ± 0.036	0.623 ± 0.014
9 weeks	2.080 ± 0.193	1.565 ± 0.038	0.639 ± 0.015

• ***Evolution of Z-potential*** through the ageing period is shown in **figure 3**.



As can be seen, emulsion E1 presents higher droplet size than emulsion E2, both at the beginning and at the end of the ageing period (**tables 2, 3**). The same observation cames out from the results summarized in **tables 4 and 5**, where the highest volume equivalent mean diameter (Dv) is shown by emulsion E1 at any ageing time. Through the nine ageing weeks the average Dv is 2.52 µm for emulsion E1 and 1.85 µm for emulsion E2.
Moreover, size distribution range is wider for emulsion E1 than for emulsion E2 (**tables 2, 3** & **figures 1, 2**). Therefore, emulsion E2 shows the highest log-normal distribution slope values and the lowest polydispersity degree (**tables 4, 5** & **figures 1, 2**).
The statistical analysis ($\alpha = 0.05$) shows a significant increase in droplet size of both emulsions during the storage time. Moreover, there are more statistically significant differences among results of Dv values of emulsion E2 than that of emulsion E1.
In most cases, the values of Z-potential of emulsion E2 are higher than those of emulsion E1 (**figure 3**). In general, droplet Z-potential values of E2 emulsion decrease with storage time, whereas the opposite happends when emulsion E1 is tested (Z-potential increases with time. In both emulsions Z-potential values are negative.

Conclusions

As floculation takes place droplet size and size distribution increase in both emulsions.
The lower the droplet size (E1 Dv = 2.52 µm & E2 Dv = 1.85 µm), the higher the size homogeneity and the lower the floculation.
Even though emulsion E2 Z-potential gets weaker with ageing, it remains stronger than emulsion E1 Z-potential.
Droplet size and its distribution are, not only good tools to characterize an emulsion, but they are good time-dependent stability parameters as well.

References

[1] **IDSON, B.** Pharmaceutical emulsions. En: Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Siystems. vol.1, 1ª ed. Ed.: Lieberman, Rieger, Banker, Marcel Dekker, New York, 1988, 6: 199-244.

[2] **SALAGER, J. L.** Emulsion properties and related know-how to attain them. En: Pharmaceutical Emulsions and Suspensions, Marcel Dekker, New York, 2000, 3:74-76.

[3] **ALLEN, T.; Du PONT de NEMOURS, E.I.** Powder sampling and particle size determination. 1ª ed. Elsevier, Amsterdam, 2003.

[4] **STANIFORTH, J.** Análisis del tamaño de partículas, En: "Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas 2ª ed. Elsevier España, España, 2004, 10: 154 – 167.

[5] **NASH, R.A.** Pharmaceutical suspensions. En: Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Siystems. vol.2, 2ª ed. Ed.: Lieberman, Rieger, Banker. Marcel Dekker York, 1996, 1: 1 – 46.

[6] **BOWMAN, B.J.; OFNER III, C.M.; SCHOTT, H.** Colloidal dispersions. En: The science and practice of Pharmacy. 21ª ed. (Remington's). Lippincott, Williams & Wilking, Philadelphia, 2006, 21: 293-318.

[7] **RODRÍGUEZ BAYÓN, A. Mª.; FRANCO GIL, Mª E.** " Influencia del tipo de Emulsión en la cinética de penetración de fármacos a través de membranas, epidermis y piel humana." Libro de resúmenes. Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Valencia. pp 229-230 (2001).

HIDROGELES A BASE DE GOMAS NATURALES PARA LA LIBERACIÓN COLÓNICA DE FÁRMACOS.

Gago Guillan M., Otero Espinar F.J.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario Sur s/n. 15782 Santiago de Compostela

Introducción

Las nuevas formas de liberación selectiva de fármacos en el colon han desarrollado un gran avance en los últimos años. Su utilización permite tratar de forma más efectiva las patologías colónicas, al permitir alcanzar mayores concentraciones de fármaco en la zona y evitar su absorción en estómago e intestino delgado, reduciéndose de esta manera, un gran número de efectos secundarios.

Existen diferentes estrategias para alcanzar este objetivo entre la que estaca el empleo de productos resistentes a los contenidos gastrointestinales que se degradan en el colon por la acción de enzimas procedentes de la flora bacteriana colónica. Entre las macromoléculas susceptibles de ser utilizadas podemos citar diferentes polisacáridos de origen natural entre los que se encuentran las gomas (1).

En trabajos anteriores (2, 3) se estudiaron los hidrogeles elaborados con goma Xantana, Algarrobo o Garrofina y sus mezclas como sistemas capaces de resistir y evitar la liberación de acetónido de triamcinolona en el tracto gastrointestinal y de llegar en condiciones adecuadas para su liberación en el colon. Estos polisacáridos fueron seleccionados debido a que se ha descrito un comportamiento sinérgico entre estas dos gomas naturales como consecuencia de interacciones entre sus estructuras (4, 5). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, observándose una adecuada retención de fármaco en fluidos gástrico y entérico simulado y el comienzo de la cesión del mismo una vez en presencia de enzimas colónicos. Sin embargo, estudios preliminares realizados con hidrogeles conteniendo ciprofloxacino (2) (figura 1) muestran una liberación prematura del principio activo en fluido gástrico debido a su alta solubilidad en medios ácidos, siendo además los elaborados con goma garrofina los que menor control de liberación presentan.

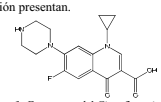


Figura 1: *Estructura del Ciprofloxacino Base.*

Teniendo en cuenta estos resultados en el presente trabajo se estudia la influencia de diversos parámetros en elaboración de hidrogeles elaborados con xantana y mezclas xantana-garrofina sobre la liberación de ciprofloxacino, y se abordan los resultados preliminares del procedimiento de recubrimiento de los xerogeles con una cubierta entérica el fin de evitar la liberación del fármaco en medios ácidos.

Materiales y Métodos

Ciprofloxacino (UQUIFA), Goma Xantana y Goma Garrofina (suministrado gratuitamente por Inagarbe S.L., Padrón), Eudragit L 100 (Evonik)

Elaboración de los Hidrogeles

Los xerogeles empleados para el estudio de liberación se obtuvieron mediante compresión directa de una mezcla homogénea conteniendo 100 mg de Ciprofloxacino y Goma Xantana, o mezclas Xantana/Garrofina al 50% hasta completar el peso final de 500 mg por comprimido. Para su elaboración se ha empleado una matriz de infrarrojos de 12 mm de diámetro y una prensa hidráulica Mega 20. El tiempo de compresión fue variable entre 5 y 20 minutos y la fuerza ejercida de 7,5 o 10 toneladas.

Para la elaboración de los xerogeles con cubierta gastrorresistente se aplicó sobre los xerogeles una fina película de Eudragit L 100. Para ello se preparó una disolución del polímero acrílico al 10% en etanol y fue aplicada con ayuda de un pincel sobre la superficie de los xerogeles, procediéndose a su secado mediante la utilización de una corriente de aire caliente. Este procedimiento se repitió 10 veces con el fin de obtener una cubierta continua de suficiente grosor.

Estudios liberación in vitro

Los ensayos de velocidad de liberación se realizaron utilizando un aparato de disolución nº 2 (USP) Prolabo, conectado de forma automática a un espectrofotómetro HP 8452ª (longitud de onda analítica 242 nm). Se empleó una velocidad de agitación de 100 rpm, y una temperatura de 37±0,5ºC. Como medio de disolución se utilizó inicialmente 450 ml de jugo gástrico artificial. Al cabo de dos horas se adicionaron sobre el jugo gástrico 210 ml de tampón fosfato pH 8.0 y la cantidad necesaria de hidróxido sódico 2M para obtener un pH final de 6.8±0.1.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra la influencia del tiempo de compresión sobre la liberación de ciprofloxacino a partir de los hidrogeles elaborados con xantana. Se observa que el mantenimiento de una fuerza de compresión de 10 Toneladas durante 5 minutos da lugar a hidrogeles que presentan una mayor liberación del fármaco, no encontrándose diferencias significativas entre los elaborados manteniendo la fuerza 10 o 20 minutos.

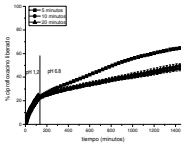


Figura 2. Comparación de los perfiles de liberación de hidrogeles elaborados con goma xantana, empleando una presión de 10 Toneladas y diferentes tiempos de compresión.

En la figura 2 se muestran los perfiles de liberación de hidrogeles elaborados con xantana o mezclas xantana/garrofin al 50% manteniendo la fuerza de compresión durante 10 minutos, en función de la fuerza de compresión empleada.

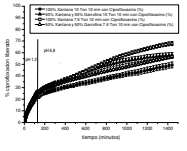


Figura 3. Comparación de los perfiles de liberación de hidrogeles de xantana, de mezclas al 50% con goma garrofina elaborados empleando fuerzas de compresión de 7,5 o 10 Toneladas.

El comportamiento observado se diferencia en función de su composición de los xerogeles. La liberación partir de los hidrogeles elaborados con mezclas 50% de xantana y garrofina a penas de diferencian independientemente de fuerza de compresión utilizada. Sin embargo los elaborados a base de xantana experimentan una disminución significativa en la liberación de ciprofloxacino. El empleo de mayores fuerzas s favorece un aumento de las interacciones físicas entre las cadenas del polisacáridos y provoca modificaciones de la estructura tridimensional de la goma xantana (4,5) que pueden influir sobre la liberación

Por último, comparando la liberación de los geles elaborados con xantana o con mezclas se observa que mientras que a presiones de 7,5 Toneladas las mezclas muestran un mejor control de la liberación este comportamiento se invierte al al aumentar a 10 toneladas.

En todos los casos se aprecia una rápida liberación inicial en jugo gástrico artificial sin enzimas pH 1,2 (>20%). Este comportamiento indica que en este medio los hidrogeles son incapaces de controlar la difusión del fármaco y ello debido a la elevada solubilidad del ciprofloxacino en medio ácido. En este medio el fármaco se disuelve y difunde rápidamente a través de la matriz hidrofílica del hidrogel.

Una vez en medio intestinal, el incremento del pH provoca una disminución en la solubilidad que favorece el control de liberación. Tras 24 horas de ensayo el porcentaje liberado ronda el 50% en el mejor de los casos.

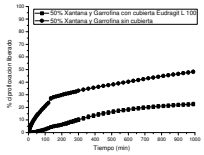


Figura 4. Perfiles de liberación de hidrogeles elaborados con mezclas al 50% garrofin/xantana con o sin cubierta entérica.

Para evitar la liberación prematura en medio ácido se incorporó una cubierta entérica sobre los hidrogeles. En la figura 3 se incluyen los resultados. El proceso de recubrimiento con Eudragit 100L disminuye considerablemente el fármaco liberado en medio ácido obteniéndose niveles próximos al 4% con la cubierta frente al 25% sin ella. Sin embargo será necesario aumentar el grosor de la cubierta para evitar totalmente la liberación en este medio.

Bibliografía

1. (1) Bhardwaj T. R. et al. Drug Dev. Ind. Pharm., 26, 1025–2000
2. (2) Adawe I. et al VIII Congreso SEFIG, Vitoria 2007.
3. (3) Gago Guillan M., et al. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Barcelona 2008
4. (4). Henriques P. et al., VIII Congreso SEFIG, Vitoria 2007.
5. (5) Higiro J. et al.,Food Research International 39, 165, 2006

Agradecimientos

Inagarbe S.L. por las muestras de Goma Xantana y Garrofina

EVALUACIÓN *IN VITRO/IN VIVO* DE UNA FORMULACIÓN DE LIBERACIÓN SOSTENIDA DE LOVASTATINA OBTENIDA MEDIANTE GRANULACIÓN POR FUSIÓN.

Ochoa, L., Igartua, M., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Solinis, M.A. y Pedraz, J.L.

Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.

Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz (Alava)

e-mail: joseluis.pedraz@ehu.es

Introducción

La lovastatina, profármaco que se hidroliza mediante el Citocromo P-450 3A4 a su correspondiente metabolito activo (lovastatina ácida), es un inhibidor específico y competitivo de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (enzima esencial en la biosíntesis del colesterol). La lovastatina presenta baja biodisponibilidad oral (<5%) debido a su baja solubilidad y rápido metabolismo en el tracto gastrointestinal y en el hígado. Los resultados obtenidos en ensayos clínicos ponen de manifiesto que la administración de formulaciones de liberación sostenida de lovastatina producen una mayor reducción del colesterol LDL que la administración de formas de liberación inmediata. Teniendo en cuenta el incremento de eficacia asociada a las formas de liberación sostenida (1), el objetivo del presente estudio fue el desarrollo de una nueva formulación de liberación sostenida de lovastatina (Lovastatina SR) mediante granulación por fusión y evaluar su bioequivalencia con la formulación comercial Altoprev®. Para ello, se estudió el comportamiento farmacocinético de ambas formulaciones en perros Beagle tras su administración por vía oral en presencia y en ausencia de alimentos ricos en grasa.

Método experimental

Preparación de la matriz hidrófila de liberación sostenida

La formulación se preparó mediante compresión de un granulado elaborado mediante granulación por fusión en un solo paso en un granulador-mezclador de alta velocidad (Rotolab® Zanchetta), empleando PEG 6000 como agente aglutinante.

Estudio de disolución in vitro

El estudio de disolución *in vitro* se realizó en un equipo de disolución USP II a 50 rpm y 37 ± 0,5ºC (n=12). El ensayo se realizó en medio de disolución con cambio de pH (HCl 0,1N durante 2 h y tampón fosfato 0,05M pH 6,8 hasta 18 h). El cambio de pH se realizó adicionando 250 mL de fosfato sódico tribásico 0,2M.

Para comparar los perfiles de disolución obtenidos se calculó el factor de similitud (f_2).

Estudio in vivo

El estudio farmacocinético se realizó en perros Beagle (n=5) en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMI). Cada animal recibió una administración intravenosa en solución. Además se administraron por vía oral la formulación comercial Altoprev® 60 mg y la nueva formulación de liberación sostenida Lovastatina SR 60 mg. Con objeto de evaluar la posible interacción entre la lovastatina y alimentos, en un primer grupo de estudio las formulaciones se administraron tras un ayuno de 12 h y en el segundo grupo la administración se realizó 10 min. después de la ingestión de una dieta rica en grasa. Se dejó un periodo de blanqueo de una semana entre las distintas administraciones. A diferentes tiempos se extrajeron muestras de sangre y los niveles plasmáticos de lovastatina ácida se analizaron mediante una técnica LC/MS/MS, previamente validada de acuerdo con las guías de la FDA y de la ICH (2, 3).

Los niveles plasmáticos se ajustaron a un modelo nocompartimental con el programa Winnolin® 4.1.

Resultados y Discusión

Estudio de disolución in vitro

Como se observa en la Figura 1, se obtuvo un perfil de disolución diferente en cada una de las formulaciones ensayadas. La disolución de lovastatina a partir de la formulación desarrollada presentó un perfil de orden zero. Sin embargo la formulación comercial presentó un "tiempo de latencia" de 2 h.

El valor del factor de similitud f_2 fue de 57,07 indicando similitud entre el perfil de disolución de las dos formulaciones.

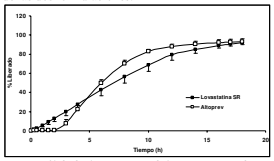


Fig. 1 Perfil de disolución in vitro de lovastatina en medio de disolución con cambio de pH de las dos formulaciones estudiadas (n=12).

Estudio in vivo

Las Figuras 2 y 3 muestran las concentraciones plasmáticas medias de lovastatina ácida en ayunas y en presencia de alimentos, respectivamente. La Tabla 1 recoge los parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambas formulaciones en las dos condiciones estudiadas. Tanto con la formulación comercial como con la nueva formulación se obtuvo un

perfil de niveles plasmáticos sostenidos de lovastatina ácida.

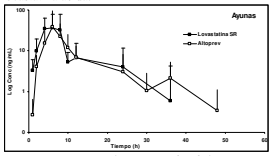


Fig. 2. Concentraciones plasmáticas medias de lovastatina ácida tras administración oral de las formulaciones en estado de ayunas (n=5)

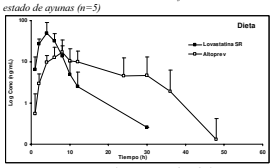


Fig. 3. Concentraciones plasmáticas medias de lovastatina ácida tras administración oral de las formulaciones con una dieta rica en grasa (n=5)

Como puede observarse en la Figura 2, en ayunas los niveles plasmáticos de lovastatina ácida fueron similares con las dos formulaciones en todos los tiempos de muestreo.

Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 3, en presencia de una dieta rica en grasa se observaron diferencias entre los perfiles de niveles plasmáticos de las dos formulaciones.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos medios de lovastatina ácida tras la administración oral de las formulaciones de liberación sostenida.

	Ayunas		Dieta	
	Lovastatina SR	Altoprev®	Lovastatina SR	Altoprev®
	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)	Media (DE)
Ke (h^{-1})	0,31 (0,18)	0,14 (0,09)	0,39 (0,42)	0,36 (0,30)
$t_{1/2}$ (h)	3,06 (1,94)	6,48 (3,73)	5,32 (5,19)	3,97 (3,44)
Tmax (h)	5,00 (2,00)	6,00 (2,45)	4,00 (1,41)	8,00 (1,41)
Cmax (ng/mL)	42,04 (41,58)	40,04 (56,19)	56,89 (37,50)	21,49 (13,56)
AUC $_{0-\infty}$ (ng h/mL)	334,70 (392,31)	293,62 (301,78)	273,46 (109,56)	265,22 (285,09)
MRT (h)	6,86 (2,80)	5,12 (1,37)	10,46 (3,56)	10,40 (4,45)

Tal y como se muestra en la Tabla 1, en presencia de alimentos, la formulación Lovastatina SR presentó una velocidad de absorción más rápida y mayores niveles plasmáticos (Tmax= 4 ± 1,41 h y Cmax= 56,89 ± 37,50 ng/mL respectivamente) que la formulación comercial (Tmax= 8 ± 1,41 h y Cmax= 21,49 ± 13,56 ng/mL, respectivamente).

El diferente comportamiento *in vivo* de las dos formulaciones en presencia de alimentos puede ser debido al diferente efecto de la dieta sobre cada una de ellas. En el caso de la formulación Lovastatina SR, la presencia de alimentos pudo acelerar la erosión de la matriz induciendo una liberación más rápida del fármaco en el tracto gastrointestinal (4). Esta erosión y el posible incremento de la solubilidad de lovastatina, debido a la naturaleza grasa de los alimentos y el aumento de las secreciones intestinales (principalmente secreción biliar, mayor incluso en perros que en humanos) pudieron dar lugar a una mayor absorción del fármaco (5, 6).

Sin embargo, la presencia de alimentos produjo un retraso en la liberación y absorción del fármaco a partir de la formulación comercial, dando lugar a niveles más bajos de lovastatina ácida en plasma.

Por último, no hay diferencias significativas en el área bajo la curva (AUC 0-∞) entre ambas formulaciones, lo que sugiere que la comida puede afectar a la velocidad de absorción de lovastatina sin afectar a la magnitud de dicha absorción.

Es importante señalar la alta variabilidad interindividual observada en las concentraciones plasmáticas y los parámetros farmacocinéticos de ambas formulaciones, lo cual ya había sido descrito previamente en diferentes estudios (7).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la influencia de la presencia de alimentos en la absorción de lovastatina a partir de las dos formulaciones estudiadas. En el estudio realizado en condiciones de ayuno, se obtuvieron perfiles plasmáticos similares entre la formulación de Lovastatina SR y Altoprev®. Sin embargo, ambas formulaciones presentan diferente comportamiento *in vivo* en presencia de alimentos. Por lo tanto, se procederá a la optimización de la formulación desarrollada para intentar minimizar la influencia de los alimentos, con objeto de que sea bioequivalente con la formulación de referencia.

Referencias

(1) Davidson *y cols*. Clin. Therap. **24:** 112-125. 2002.
(2) FDA: Guidance for Industry. Bioanalytical methods validation for human studies. 1998.
(3) ICH: Q2/R1 Validation of analytical procedures. 1995.
(4) Abrahamsson *y cols.* Drug Dev. Ind. Pharm. **25:** 765-771. 1999.
(5) Persson *y cols* Pharm. Res. **22:** 2141-2151. 2005.
(6) Kalantzi *y cols.* Pharm. Res. **23:** 1373-1381. 2006.
(7) Sterman *y cols*. Abstract nº 1063. J. Clin. Pharm**. 42:** 2002.

Agradecimientos

Lourdes Ochoa agradece a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) por la beca predoctoral otorgada.

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MICORENCAPSULACIÓN DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS FERMENTUM CECT5716*

M.E. Morales Hernández[1], M.J. Martín Villena[1], F. Lara Villoslada[2], V. Gallardo Lara[1] y M.A. Ruiz Martínez[1].

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, Campus Cartuja s/n, Granada, CP 18071, España, maen@ugr.es

[2]Departamento de Nutrición Y Salud, Puleva Biotech, Camino de Purchil s/n, Granada, España

Introducción

La OMS, define a los probióticos como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador.

(1)Si tenemos en cuenta, que los probióticos son principalmente consumidos por vía oral, es lógico pensar, que sus efectos beneficiosos se pondrán de manifiesto, fundamentalmente en patologías intestinales. Sin embargo, la posibilidad de modular la respuesta inmune de tipo sistémica, hace que los probióticos, también presenten efectos positivos en otras alteraciones extraintestinales, como alergias (3) y vaginitis.

El probiótico que utilizamos, fue *Lactobacillus fermentum*, un bacilo Gram positivo anaerobio que, entre otras aplicaciones, se ha empleado en alimentación infantil y en el tratamiento de enfermedades urogenitales en mujeres. El problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la escasa resistencia de estos microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxigeno, o la temperatura.

Por todo esto, es necesario que los microorganismos, se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Las técnicas de microencapsulación permiten aislar a las bacterias mediante una cubierta que las protege de estos factores, siendo este el objetivo de nuestro trabajo.

Materiales y Métodos:

El probiótico utilizado fue el *Lactobacillus fermentum* CECT5716, cedido por Puleva Biotech (Granada).

La técnica de microencapsulación empleada, fue la Gelificacion iónica interna. En cada uno de los pasos críticos de la síntesis, se tomaron muestras para evaluar la supervivencia de las bacterias.

A 40 mililitros de una solución de alginato cálcico al 5%(m/v) se le adicionó $CaCO_3$ y los probióticos (Muestra 1). A continuación, se añadió aceite de soja (100ml) con Span 80 y se agitó durante 10 min a 700 rpm con el agitador mecánico. A la emulsión formada, se le añadió ácido acético glacial, para iniciar la gelificación, y se agitó durante otros 10 minutos. Posteriormente, se adicionó $CaCl_2$ (Muestra 2) y se agitó durante 10 min y se dejó sedimentar 24 horas a 4ºC. Transcurrido este tiempo las partículas se centrifugaron a 1050 rpm durante 10min y se lavaron las muestras con agua destilada. Finalmente, las partículas se filtraron al vacío con 200mL de una solución al 0,9% de NaCl (Muestra 3).

Para evaluar la supervivencia de los prebióticos (2), las muestras se cultivaron en medio de Man, Rogosa, Sharpe (MRS), específico para este tipo de bacterias. Para ello las muestras se sometieron a diluciones seriadas en agua de peptona. Además, en el caso de las muestras 2 y 3, previo a las diluciones, fue necesario ponerlas en contacto durante 30 minutos en agitación (500 rpm) con un tampón fosfato (0,067M y pH 7) para que se produjera la liberación de los microorganismos. Las diluciones adecuadas se cultivaron en medio MRS y se incubaron a 37ºC y en anaerobiosis durante 24h. La síntesis se llevó a cabo por triplicado y se muestran la media de los resultados (tabla 1).

Resultados y discusión:

La figura 1 muestra el tamaño de las microcápsulas obtenidas de acuerdo con el método descrito en el apartado anterior. El tamaño tiene que ser lo suficientemente grande para albergar en su interior la carga de bacterias cuyo tamaño oscila en torno a 0,3 µm. Por otra parte, como se observa en la figura 2, aunque son polidispersas, todas presentan una forma esférica.

En cuanto a los estudios realizados para evaluar la supervivencia de los microorganismos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1, expresados como unidades formadoras de colonias (ufc) por mL y ufc totales. Analizando los datos de las muestras inicial (muestra 1) y final (muestra 3) se observa una pérdida de viabilidad de aproximadamente 0,2 órdenes de magnitud, que se puede considerar aceptable. De hecho la concentración del producto final permitiría alcanzar la dosis diaria habitual (10^9ufc/día) con 5g del producto microencapsulado. Sin embargo en la muestra 2

se observa una pérdida de casi 2 órdenes de magnitud, que no es coherente con lo observado en la muestra 3. Esto podría ser debido a que no se ha producido correctamente la liberación de las bacterias.

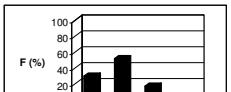


Figura 1. Histograma de las microcápsulas sintetizadas.

Figura 2. Fotografía de las microcápsulas de alginato cálcico obtenidas al microscopio óptico.

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias (ufc) obtenidas en cada una de las muestras ensayadas.

	Muestra 1
ufc/mL	1,50E+08
ufc/totales	6,00E+09
	Muestra 2
ufc/mL	4,50E+05
ufc/totales	7,20E+07
	Muestra 3
ufc/g	2,00E+08
ufc/totales	3,60E+09

Conclusiones:

La técnica de microencapsulación empleada, parece ser adecuada para *L. fermentum* CECT5716 ya que, las microcápsulas obtenidas presentan un tamaño y forma adecuada para albergar a estos microorganismos. Asimismo, los datos obtenidos en los estudios de supervivencia muestran la viabilidad del método propuesto. Futuros ensayos deben confirmar la estabilidad del probiótico a lo largo del proceso, así como durante el almacenamiento.

Referencias:

(1) Aplicaciones terapéuticas de los probióticos B. Arrisbas B, M.E. Rodríguez, D. Camuesco, A. Zarzuelo, J. Galvez . Ars Pharm **49(1):** 2008.

(2) Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. K.kailasapathy, LWT39 (2006); 1221-1227.

(3) Probiotics and the skin
G. Caramia, A. Atzei, V. Fanos, Clinics in Dermatology **26**: 4-1, 2008.

Agradecimientos:

Agradecemos a Puleva Biotech la colaboración prestada, suministrándonos el prebiótico utilizado en este estudio.

UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL DE ELABORACIÓN PROPIA

M.I. Soriano, J.B. Fariña, A. Oliva

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, Fco. Sánchez s/n, La Laguna, 38200, Spain

Introducción

Para garantizar la uniformidad de las unidades de dosificación presentadas en dosis únicas, cada unidad debería tener un contenido de principio activo dentro de unos límites establecidos alrededor del valor declarado. La uniformidad de las unidades de dosificación puede ser demostrada tanto por el ensayo de uniformidad de contenido como de uniformidad de masa o variación de peso.

El trabajo ha sido realizado, teniendo en cuenta las disposiciones oficiales establecidas por la Farmacopea Europea 5ª edición, por los alumnos de la asignatura de Tecnología Farmacéutica III. Las prácticas de laboratorio de dicha asignatura tienen como finalidad el que el alumno sea capaz de elaborar y, además, de identificar cuáles son los controles de calidad que deben realizarse sobre las formas farmacéuticas sólidas (comprimidos y cápsulas) y aceptar o rechazar un lote de un medicamento en función de los resultados obtenidos.

Materiales y Métodos

Tanto el paracetamol como los excipientes utilizados fueron suministrados por Acofarma.

Comprimidos

Se elaboraron dos lotes de 500 comprimidos, conteniendo cada uno 500 mg de paracetamol, de acuerdo con la fórmula recogida en la tabla 1, con 3% (Formulación PVP-3) o 5% (Formulación PVP-5) de la cantidad total por comprimido de polivinilpirrolidona (PVP).

Tabla 1.- Composición de la fórmula empleada en la elaboración de los comprimidos.

Componentes	Cantidad/Comprimido
Paracetamol	500 mg
Sacarosa	92,3 mg
PVP (10% p/v en alcohol)	c.s. (*)
Talco	23,1 mg
Almidón de maíz	46,2 mg
Ácido esteárico	9,2 mg

Para la preparación de los comprimidos se siguió la técnica de granulación por vía húmeda y compresión utilizando una máquina de comprimir excéntrica con punzones de 12 mm (J. Bonals, 1975) instrumentada para controlar la fuerza de compresión y elaboración de la carta control.

Determinación del paracetamol

El método analítico fue por espectrofotometría UV a 245 nm. Para ello la muestra, alícuota o comprimido, se introduce en un matraz aforado de volumen apropiado al que se le adicionan 10 ml de etanol y agua hasta su enrase, se filtra y se diluye con agua destilada. Los resultados se comparan con patrones primarios Ph. Eur. previamente preparados.

Uniformidad de masa

Se pesan, individualmente y de forma precisa, 10 comprimidos escogidos al azar. Se pulverizan en un mortero, hasta obtener un sólido finamente dividido, y se homogeniza la mezcla. Se toma una alícuota de la mezcla y se determina la cantidad de principio activo de acuerdo con el método analítico propuesto. Por último, se calcula la cantidad de paracetamol de cada comprimido expresada como porcentaje del valor declarado, asumiendo que el principio activo se encuentra distribuido de forma homogénea, y se calcula el valor de aceptación (VA).

Uniformidad de contenido

El ensayo de uniformidad de contenido de las preparaciones presentadas en dosis únicas está basado en el ensayo de los contenidos individuales del principio activo de un número de unidades, para determinar si los contenidos individuales están dentro de los límites establecidos con respecto al valor declarado. Para ello, se toman 10 unidades de dosificación al azar, se determinan los contenidos individuales, que debe expresarse como porcentaje del valor declarado, y calcular el valor de aceptación.

Valor de aceptación (VA) y criterios

El valor de aceptación se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$VA = \left|M - \overline{X}\right| + ks$$

donde:

VA = Valor de aceptación

M = Valor de referencia, siendo M igual a:
98,5% si $\overline{X} < 98,5\%$
$\overline{X}$ si $98,5\% < \overline{X} < 101,5\%$
101,5% si $\overline{X} > 101,5\%$

$\overline{X}$ = Media de los contenidos individuales

n = Número de muestras

k = Factor de tolerancia
k = 2,4 si n = 10
k = 2,0 si n = 30
s = Desviación estándar
RSD = Desviación estándar relativa
L1 = Límite para el intervalo de aceptación L1 =15
L2 = Límite para las unidades individuales L2 = 25

Tanto en los ensayos de uniformidad de contenido como de variación en peso se deben aplicar los siguientes criterios a menos que se especifique lo contrario en la monografía.
La preparación cumple con el ensayo cuando el valor de aceptación de los 10 contenidos individuales es menor o igual a L1. Si el valor de aceptación es mayor, entonces se determinan los contenidos individuales de otras 20 unidades de dosificación tomadas al azar. En este caso, el valor de aceptación final de las 30 unidades debe ser menor o igual a L1 (n = 30) y los contenidos individuales de ninguna unidad puede ser inferior a (1-L2·0,01) x M ni mayor de (1+L2·0,01) x M. A menos que se especifique lo contrario en la monografía individual L1 es 15 y L2 es 25.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de masa para los dos lotes de cada una de las formulaciones, PVP-3% y PVA-5%, se recogen en la tabla II.

Tabla 2.-Resultados del ensayo de uniformidad de masa de los comprimidos. $\overline{X}$, media expresada como porcentaje del valor declarado; SD, desviación estándar; VA, valor de aceptación.

Lote	$\overline{X}$	SD	VA
PVP-3%-I	103,01	0,55	2,82
PVP-3%-II	89,83	0,53	9,95
PVP-5%-I	98,33	0,65	1,72
PVP-5%-II	89,97	0,41	9,99

Como puede comprobarse de los resultados obtenidos, todos los lotes de ambas formulaciones cumplen con el ensayo pues el valor de aceptación en ningún caso es superior al límite para el intervalo de aceptación (L1= 15).
En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de contenido para cada uno de los lotes de comprimidos.
El ensayo de uniformidad de contenido o ensayo de riqueza de un principio activo de un lote de comprimidos es indicativo de la correcta dosificación del lote. Este dato se obtiene de una muestra representativa del lote estudiado y, por tanto, es un dato general, ya que indica si el lote fabricado contiene globalmente la cantidad de principio activo por comprimido. La USP 30 es la única farmacopea que contempla una monografía específica de comprimidos de paracetamol y, en ella se indica que los comprimidos deben contener no menos del 90% y no más del 110% del valor declarado de paracetamol. Teniendo en cuenta estos límites de riqueza, el valor de aceptación calculado según la Farmacopea Europea, coincidiría con el de la USP puesto que el valor de referencia M es el mismo al ser la media de los límites de riquez T menor o igual que 101,5.

Tabla 2.-Resultados del ensayo de uniformidad de contenido de los comprimidos. $\overline{X}$, media expresada como porcentaje del valor declarado; SD, desviación estándar; VA, valor de aceptación.

Lote	$\overline{X}$	SD	VA
PVP-3%-I	97,55	4,77	12,39
PVP-3%-II	97,03	5,30	14,19
PVP-5%-I	100,31	8,26	19,82
PVP-5%-II	99,54	4,25	10,2

Los resultados obtenidos muestran que, a excepción del lote PVP-5%-I, las formulaciones cumplen el ensayo dado que el valor de aceptación es inferior al límite establecido (VA ≤ 15). En cuanto al lote PVP-5%-I, el VA fue ligeramente mayor de 15. Esto es probablemente debido a un error experimental asociado con el método analítico del paracetamol y/o falta de homogeneidad del granulado o bien, que el proceso de mezcla no haya sido óptimo, y no a problemas relacionados con le proceso de fabricación dado que los datos obtenidos en la carta de control de la fuerza de compresión aplicada, se mantuvo dentro de los límites establecidos.

Referencias

(1) Pharmacopeé Européenne, 5ª edition. Conseil dl'Europe. Strabourg, 2005.
(2) The United States Pharmacopeia (USP 30/NF 25), Vol.1, p. 381, Rockville, 2007.
(3) A. Folivene Aldea, J.M. Suñé, P. Pérez Lozano, M. Roig, E. García Montoya, M. miñarro, J.R. Ticó. Estudio farmacotécnico comparativo de cinco medicamentos industriales que contienen 1g de paracetamol (II). El Farmacéutico de Hospitales. 189: 5-10, 2008.

ESTUDIO FARMACÉUTICO DE FORMULACIONES GENÉRICAS DE PARACETAMOL

H. Ossété. S. Torrado-Susana, S. Torrado-Santiago, M.P. Ballesteros y J.J. Torrado
Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Introducción

El estudio de la calidad de los medicamentos es siempre un tema muy interesante desde el punto de vista práctico, que por su incidencia en la salud, ocupa un lugar destacado en la prensa. Cada vez con más interés se estudia la relación calidad/precio y bastantes veces se duda, incluso por algunos profesionales de la Sanidad, sobre la calidad "real" de medicamentos del tipo genérico que han debido superar, desde el punto de vista administrativo y técnico una serie de pruebas y controles. Evidentemente, resolver estas dudas excede las posibilidades de este trabajo, pero sí se ha pretendido modestamente contribuir a un mejor conocimiento de la calidad de algunas de estos medicamentos. Dentro de los distintos principios activos que se podían elegir hemos seleccionado el paracetamol ya que este es un principio activo fácil de analizar, económico y susceptible de ser utilizado *in vivo* con facilidad ya que se puede analizar en saliva (Gandia et al., 2003). Así pues, en este trabajo se estudian y comparan las características farmacotécnicas y biofarmacéuticas de varias formulaciones comercializadas de paracetamol.

Materiales y Métodos

Las formulaciones comercializadas que se han estudiado son las siguientes: Tylenol® (España), Paracetamol Edigen® (España), Paracetamol Winthrop® (España), Paracetamol Mundogen® (España), Paracetamol RPG® (Francia), Paracetamol Bayer® (Francia), Paracetamol GNR® Pharma (Francia), Paracetamol Merck® (Francia), Paracetamol Revania® (Jordania), Paracetamol Ratiopharm® (Alemania) y Paracetamol MK® (El Salvador). A estas 11 formulaciones se les asigna una clave que no necesariamente corresponde con el orden antes usado de F1 a F11. En estas formulaciones se estudian sus características farmacotécnicas y de biodisponibilidad.

Características farmacotécnicas

Se estudia la uniformidad de masa, uniformidad de contenido, riqueza por espectrofotometría, disgregación, resistencia a la fractura, friabilidad, ensayo de disolución (con determinación del factor dos de similitud) y determinación del 4-aminofenol. Los ensayos se realizan según lo estipulado por las farmacopeas española (RFE 2005), norteamericana (USP 2003), europea (E.P. 3ed. 1997) y británica (B.P. 2003).

Características de biodisponibilidad

Con las dos formulaciones españolas que presentan una mayor disparidad en velocidad de disolución se hace un ensayo de biodisponibilidad en once voluntarios sanos de edad comprendida entre 23 y 40 años. Se realizó un diseño cruzado aleatorio y se tomaron muestras de saliva a los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos; 1, 1'5, 2, 2'5, 3, 4, 5, 6 y 8 horas. Las muestras se analizaron por HPLC. El tratamiento de dichas muestras y las condiciones de análisis son las descritas por Shim y Jung (1992). El tratamiento de datos se realizó de forma no compartimental.

Resultados y discusión

En cuanto a las características farmacotécnicas todas las formulaciones cumplían las especificaciones de farmacopea en cuanto a uniformidad de masa, uniformidad de contenido, riqueza por espectrofotometría, disgregación, resistencia a la fractura, friabilidad, ensayo de disolución y determinación del 4-aminofenol, salvo dos formulaciones una de las cuales no cumplía especificaciones de uniformidad de contenido y otra tenía una velocidad de cesión ligeramente inferior a la especificada por USP 2003. En ambos casos las diferencias con respecto a los valores límites fijados por la farmacopea eran muy pequeños por lo que no se consideraron de relevancia. Por ejemplo en el ensayo de uniformidad de contenido el coeficiente de variación según USP debe ser menor del 6 % y en la formulación que no cumple está en el 7%. En el caso de la formulación que no cumple la especificación de velocidad de cesión en la USP 2003 se marca como criterio un mínimo del 80% y la cesión es del 79%. También se estudió si había una relación entre el precio del medicamento y alguna característica farmacotécnica indicativa de la calidad. Como parámetros de calidad se eligieron el contenido en 4-aminofenol y la velocidad de cesión de paracetamol. En los estudios realizados no se encontró relación directa entre el precio y estas características de calidad.

Las formulaciones comercializadas en España que muestran una mayor disparidad en cesión son las descritas como F2 y F4 y sus resultados se muestran en la figura 1.
En cuanto a las características de biodisponibilidad en la figura 2 se muestran los resultados medios de las dos formulaciones estudiadas.

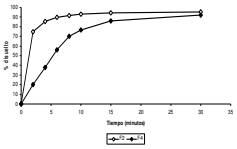


Figura 1. Resultados medios de paracetamol liberado en los estudios de cesión de las formulaciones F2 y F4.

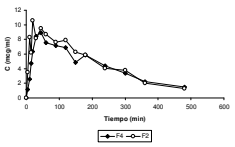


Figura 2. Resultados medios de concentraciones en saliva tras la administración de dos formulaciones de paracetamol.

Los resultados de área bajo la curva (AUC), tmax y Cmax se muestran en la tabla 1. Como se puede observar en dicha tabla existe una gran variabilidad en tmax y Cmax que no permite estudiar si hay o no diferencias entre dichas formulaciones. Con respecto al área bajo la curva si se puede concluir que no existen diferencias entre ambas formulaciones.

Tabla 1. Resultados medios del estudio de biodisponibilidad de las dos formulaciones estudiadas

Parámetro	F2	F4	t-Student
$AUC_{0-\infty}$ (μg/h ml)	43.1±11.1	40.6±13.2	0.63
Tmax (h)	0.92±0.6	0.75±0.5	0.54
Cmax (μg/ml)	19.7±19	12.1±4.1	0.23

Conclusiones

En cuanto a las características farmacotécnicas no se encontraron diferencias relevantes en cuanto a las distintas formulaciones y tampoco se pudo correlacionar el precio de los medicamentos con ningún parámetro farmacotécnico estudiado.
Desde el punto de vista de biodisponibilidad en el estudio realizado con las dos formulaciones que mostraban mayores diferencia en velocidad de cesión en nuestras condiciones de estudio se puede concluir que ambas formulaciones son bioequivalentes en cuanto a la cantidad total de paracetamol absorbido.

Referencias

(1) B.P. 2003. British Pharmacopoeia, Her Magesty´s Stationery Office. Londres, 2003
(2) E.P. 1997. European Pharmacopoeia. 3 ed. Council of Europe, Pharmacopoeia Convention, vol I-III 1997-1999.
(3) Gandia, P., Bareilli, M.P., Saivin, S., Le-Traon, A.P., Lavit, M., Guell, A., Houin, G., *J. Clin. Pharmacol* **43 (11):** 1235-1243, (2003)
(4) RFE 2005. Real Farmacopea Española. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2005.
(5) Shim, CK y Jung B., *Int. J. Pharm* **82**: 233-237, 1992.
(6) USP 2003. United States Pharmacopoeia 26. US Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2003.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación recibida por la UCM al grupo de investigación 910939.

DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD Y DE LA COMPATIBILIDAD PRINCIPIO ACTIVO-EXCIPIENTE PARA EL DESARROLLO DE MICROESFERAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE CANNABINOIDES

D. Hernán[1], J. Molpeceres[2], M.R. Aberturas[2], C. Martín, M.E. Gil[1], A.I. Torres[1]
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,
[1]Universidad Complutense, 28040 Madrid.
[2] Universidad de Alcalá, 28871 Madrid.

Introducción

En el desarrollo galénico de microesferas como sistemas de liberación controlada de un fármaco resulta de gran utilidad recurrir a la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Esta técnica permite, por un lado, determinar de forma rápida incompatibilidades entre el principio activo y los materiales poliméricos posibles constituyentes de la formulación (1).
Por otro lado, por DSC también se puede obtener información sobre el estado físico de principio activo y polímero una vez formada la microesfera (2). La técnica permite, incluso determinar la solubilidad del principio activo en el polímero, dato especialmente importante para el desarrollo de sistemas de liberación controlada ya que el perfil de liberación del activo a partir del sistema está fuertemente influenciado por su disposición, al estado molecular o en forma de microcristales, en el mismo (3).

En el presenta trabajo se determina, mediante DSC, la compatibilidad entre un principio activo del grupo de los cannabinoide (Cannabidiol) y un polímero (poli-ε-caprolactona), así como la solubilidad del principio activo en dicho polímero. Estos datos se aplican al desarrollo de microesferas de cannabidiol como sistemas de liberación controlada de administración por vía parenteral.

Materiales y Metodos

Se utiliza Cannabidiol (CBD), pureza del 99,4% (THC Pharm Frankfurt, Alemania) y poly-ε-caprolactona (PCL) Pm 42.500 (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU).

Preparación de las muestras

Se prepararon microesferas placebo, y con distinta relación principio activo:polímero (5:150; 10:150; 15:150; 30:150 y 50:150). Se utilizó la técnica de emulsión O/A-evaporación de solvente.

También se prepararon mezclas binarias CBD: PCL en proporción 1,5:1; 2:1; 3:1, 4:1; 5:1 y 6:1.

Análisis de las muestras

Se evaluó, por DSC; el perfil térmico de las materias primas (CBD y PLC); de microesferas placebo, de las mezclas binarias; y de los diferentes tipos de microesferas cargadas con CBD.
Todos los ensayos se realizaron, por triplicado, en cápsulas de aluminio tapadas, a una velocidad de calefacción de 10ºC/min en el rango de temperaturas de 10-100ºC, en un calorímeto diferencial de barrido (Mettler-Toledo DSC820).
A partir del área de los picos de fusión se determina el calor de fusión (ΔHm), que se relaciona con el grado de cristalinidad (λm) de la muestra según la ecuación:

$$\lambda m\ (\%) = (\Delta Hm/\Delta H^{c}m) * 100$$

donde ΔHcm es la entalpía de fusión de una muestra con una cristalinidad del 100%.

Resultados y Discusión

La figura 1 resume los resultados obtenidos en el análisis térmico de CBD y PCL m.p, y de los diferentes tipos de microesferas elaborados.

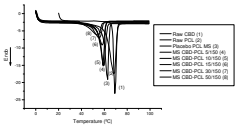


Figura 1. Termogramas de las materias primas y de las microesferas.

CBD muestra un pico de fusión a 68.5ºC, confirmando su naturaleza cristalina. Dicho pico no aparece en los termogramas de las diferentes formulaciones de microesferas, sugiriendo que el CBD se encuentra disuelto en la matriz polimérica.

PCL m.p y las MPs placebo muestran una entalpía de fusión de 102.09±2.36 J/g y 98.84±4.17 J/g, respectivamente, lo que sugiere que el polímero mantiene sus características semicristalinas en las MPs, no estando afectadas por el proceso de microencapsulación (p-value = 0,2467).
Sin embargo, analizando la endoterma de fusión de PCL en las microesferas cargadas se observa que al aumentar la carga disminuye progresivamente tanto la temperatura como la entalpía de fusión del polímero (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros calorimétricos de las muestras.(ΔHm=139,5J/g)

Muestra	Tm (ºC)	ΔHm* (J/g)	λm (%)
PCL m.p	66,95	102,09	73,69
Ms placebo	62,28	98,84	70,85
MS 5/150	59,26	90,97	65,21
MS 10/150	59,16	88,55	63,48
MS 15/150	58,44	76,09	54,55
MS 30/150	55,79	57,32	41,09
MS 50/150	53,81	68,24	48,92

La disminución de la entalpía de fusión se corresponde con una disminución del grado de cristalinidad (λm) de las muestas; que, junto con la disminución de la temperatura de fusión, indican un efecto plastificante del principio activo sobre el polímero.
En efecto, en las fotografías de las microesferas con CBD (fig.2) se observa que al aumentar la relación CBD: PLC las microesferas tiende a pegarse de manera que para una relación 50:150 la agregación es tan intensa que compromete la microencapsulación.

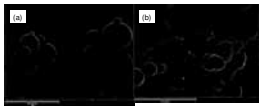


Figura 2. Fotografía SEM de las microesferas 30:150 (a) y 50:150 (b).

En la figura 3 se recogen los termogramas obtenidos a partir de las mezclas binarias. Estas curvas presentan dos picos endotérmicos, que se corresponden con CBD y PCL, lo que indica que no se detecta incompatibilidad química entre ambos.

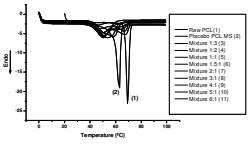


Figura 3. Termogramas de las mezclas binarias.

En la figura 4 se representan los valores de calor de fusión de CBD en las mezclas. La concentración de CBD extrapolada para un calor de fusión "cero" se corresponde con la solubilidad de CBD en el polímero. Este valor es de 1,5: 1.

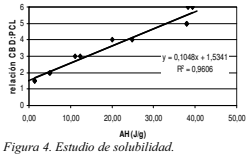


Figura 4. Estudio de solubilidad.

Conclusiones

CBD y PCL son sustancias químicamente compatibles. El factor que limita la carga de CBD en las microesferas de PCL es el efecto plastificante que el principio activo ejerce sobre el polímero y, que a concentraciones sensiblemente por debajo de la solubilidad de CBD en el polímero, llega a impedir la microencapsulación. Por este motivo en las microesferas, CBD se encuentra siempre disperso al estado molecular.

Referencias

(1) Dubernet C., Thermoanalysis of microspheres, *Termochim. Acta*. **248:** 259 – 269, 1995.
(2) Mundargi, RC; et al. *J. Control Rel.* **119**: 59-68, 2007.
(3) Li ZZ, Li Q. *J. Pharm Sci*, **96:** 5-11, 2007.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con una beca de FPU (Ministerio de Educación y Ciencia), y con la financiación de la Universidad Complutense de Madrid.

LIBERACIÓN *IN-VITRO* DE LIDOCAÍNA BASE DESDE PREPARACIONES TÓPICAS AL 5% FORMULADAS CON DISTINTOS DISOLVENTES EMOLIENTES

E. Blanca, M. D. Contreras
evablani@ugr.es
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, España.

Introducción

Se formulan 4 preparaciones tópicas con lidocaína base al 5% (m/m) utilizando en cada una de ellas un disolvente emoliente no polar (Adipato de di(2-etil hexilo) *(Formulación A)*, 2-Octil dodecanol *(Formulación B)*, Adipato de dibutilo *(Formulación C)* y Miristato de isopropilo *(Formulación D)*), de uso habitual en preparaciones dermatológicas. Previamente se determinó, teórica y experimentalmente, la solubilidad del fármaco en cada uno de dichos disolventes (1). Las formulaciones diseñadas son emulsiones O/A. Como fase oleosa se utilizan los disolventes no polares en cantidad suficiente para mantener la lidocaína en solución y a saturación. Como emulgente se seleccionó un polímero poliacrílico (Pemulen TR1) que origina emulsiones estables durante la reposición de las formulaciones e inestables al extenderlas sobre la piel favoreciendo la rápida evaporación de la fase acuosa y la saturación del preparado. El objetivo fundamental es que la lidocaína se encuentre en solución y a saturación para, de esta manera, aumentar su biodisponibilidad [1] e iniciar un rápido efecto y prolongarlo en el tiempo.
Todas las formulaciones tienen la misma cantidad de polímero y pH (7) para ello se adiciono trietanolamina, excepto en el caso de las formulaciones B y C. La incorporación de una pequeña cantidad de tensioactivo fue necesaria en la formulación D.
Mediante ensayos viscoelásticos [2], las formulaciones fueron caracterizadas como gel (crema-gel) y de la comparación de los parámetros característicos (G´y G") con los que presentaban formulaciones análogas sin fármaco se detectó la interacción del polímero (aniónico) con la lidocaína (catiónica), haciendo dudar sobre la idoneidad de la elección del polímero como emulgente.
En este trabajo se estudia como esta interacción entre el polímero y el fármaco afecta a la liberación de la lidocaína.

Materiales y Métodos

El ensayo de liberación *in vitro* se ha realizado en células tipo Franz [3] (FDC-400 de 2 cm de diámetro) a 25 ºC. La cantidad de muestra es constante y como membrana de separación con la fase receptora, se utiliza una de metilcelulosa. La solución receptora ha sido un tampón fosfato a pH igual a 5,91, del cual hemos comprobado previamente que cumple las condiciones *sink* [4].
Las alícuotas extraídas, con reemplazamiento, han sido cuantificadas mediante espectrofotometría.
Cada fórmula ha sido ensayada 5 veces, comparándola con un blanco.

Resultados y Discusión

Todas las preparaciones se han mantenido estables al menos durante un año.
El ensayo de liberación se realizó durante 24 horas, de ellas, solo los resultados referentes a las 5 primeras horas fueron representativos.

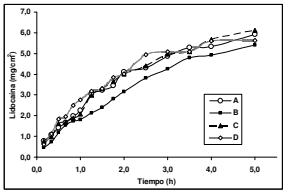


Figura 1. Cantidad acumulativa de lidocaína liberada por unidad de superficie desde la formulación con Adipato de di(2-etil hexilo) (A), 2-Octildodecanol (B), Adipato de dibutilo (C) y Miristato de isopropilo (D)

En la figura 1 se observa la liberación de la lidocaína en función del tiempo. De su análisis se deduce
-La ausencia de tiempo de retardo. Experimentalmente se comprobó la rápida cesión de la lidocaína al medio receptor.
- Los perfiles de las curvas son muy similares. En ellos, se distinguen dos zonas bien diferenciadas: desde 0 a 1 hora donde la liberación esta regida por los componentes de la emulsión, y desde 1 a 5 horas después de iniciado el ensayo donde existe la posibilidad de la ruptura de la emulsión. En ambos casos se observa (figura 3) que la formulación D, es la que presenta mayor liberación. En ella se presupondría, que la interacción de la lidocaína con el polímero sería de menor intensidad y solo

podría afectarse el reparto de la lidocaína entre ambas fases como consecuencia del tensioactivo. Sin embargo, la formulación B, en la que la lidocaína actuó como neutralizante, es la de menor liberación, en ella se presupone la mayor intensidad de interacción entre lidocaína y polímero.

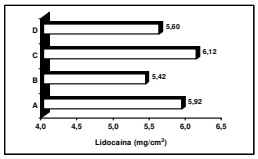


Figura 3. Cantidad de lidocaína acumulativa liberada a las 5 horas.

En todos los casos, la liberación de lidocaína fue próxima como podemos observar en la figura 4 incluso en la formula B (68,1%).

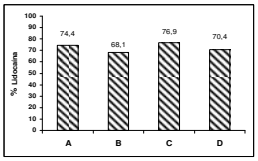


Figura 4. Porcentaje de lidocaína liberada en las 5 horas.

Las observaciones anteriores quedan reflejadas en los valores de velocidad (Tabla 1) y en los coeficientes de difusión (Tabla 2), ambos obtenidos a partir de la cinética de Higuchi, previa comprobación de otras. Hemos comprobado, tras el análisis de estos datos que la fórmula que más rápidamente libera el fármaco es la D.

Tabla 1. Cinética de liberación. Y= a + bx$^{1/2}$; a=mg; y = mg.cm^{-2}; x = t (s); b= mg.cm^{-2}.s$^{-½}$.

Form.	Ecuación	r²	(*)
A	$y = -0,202 + 0,0397 \cdot t^{1/2}$	89,95	0,19
B	$y = -0,423 + 0,0385 \cdot t^{1/2}$	84,51	0,24
C	$y = 0,0361 \cdot t^{1/2}$	99,23	0,14
D	$y = -0,595 + 0,0488 \cdot t^{1/2}$	90,62	0,17

***(*)**Error estándar de estimación*

Los coeficientes de difusión (Tabla 2) se encuentran dentro de los valores normales referentes a formulaciones para aplicación tópica.

Tabla 2. Coeficiente de difusión (D) de la lidocaína base en las distintas formulaciones

Formulación	D (cm².s^{-1})
A	$5,317 \cdot 10^{-7}$
B	$5,149 \cdot 10^{-7}$
C	$4,218 \cdot 10^{-7}$
D	$8,105 \cdot 10^{-7}$

Conclusiones

La liberación de la lidocaína en todos los casos es adecuada, a pesar de que se podía intuir una gran interacción entre las moléculas del fármaco y los grupos ácidos del Pemulen TR1 y como consecuencia una baja cesión de fármaco. Esto hace prever un rápido inicio de efecto y de intensidad adecuada.

Referencias

(1) Wiechers, J. W. et al., *Int. J. Cosm. Sci.* **26:** 173-182, 2004.
(2) Blanca, E., Contreras, M. D. and Sekkat, H."Modification of physical-chemical parameters of topical emulsions by lidocaine base and Pemulen TR1 interaction". 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceuticta Technology. 2008.
(3) Franz, T. J., *J. Investigative Dermatology*, **64:** 190, 1975
(4) Doménech, J et al., *Biofarmacia y farmacocinética*, **2:** 1998.

BIODEGRADABLE MICROSPHERES FOR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) DELIVERY IN ISCHEMIC PATHOLOGIES

F. R. Formiga[1], B. Pelacho[2], E.Garbayo[1], G. Abizanda[2], F. Prosper[2] and M.J. Blanco-Prieto[1]
[1] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology
[2] Department of Hematology and Cell Therapy
Clinica Universitaria and Division of Cancer. University of Navarra. Irunlarrea s/n, Pamplona, 31080, Spain

Introduction

Cardiovascular diseases are the worldwide leading cause of death in both men and women, extending across all racial and ethnic groups (1). Currently available approaches for treating patients with ischemic disease include drugs, percutaneous intervention and vascular surgery. However, a significant number of these patients are not candidates for coronary revascularization procedures. In order to look for curative more than paliative therapies, early strategies to improve the regeneration of the damaged tissue are being explored like the delivery of growth factors to promote neovascularization or stimulate cell proliferation and protection (2, 3). Thus, several clinical trials have been already performed in patients with cardiac and limb ischemia, by injection of pro-angiogenic factors like VEGF or bFGF (4). However, positive results have not been obtained, being part of this failure attributable to suboptimal delivery strategies and instability of the protein. The aim of this work was to develop Poly-lactide-co-glycolide (PLGA) biodegradable microparticles loaded with the vascular endothelial growth factor (VEGF-165) that could be applicable to these pathologies.

Materials and Methods

VEGF-165 was encapsulated by solvent extraction/evaporation method using the Total Recirculation One-Machine System (TROMS) (5). Briefly, 50 mg of PLGA with a monomer ratio (lactic acid/glycolic acid) of 50:50 (Resomer RG 503H, Boehringer) were dissolved in 2 ml of a dichlorometane/acetone mixture. This polymer solution was injected into the inner aqueous phase (W_1) containing the rhVEGF$_{165}$ (R&D Systems). Next, the previously formed inner emulsion (W_1/O) was recirculated through the system for 3 min under a turbulent regime. After this step, the first emulsion was injected into the outer aqueous phase (W_2), composed of 30 ml of a 1,5% Poly (vinyl alcohol), resulting in a multiple emulsion (W_1/O/W_2), which was homogenized by circulation through the system for 4 min. The multiple emulsion was stirred for 3 h. Microparticles were washed three times with ultrapure water by consecutive centrifugation at 4°C (20000 g, 10 min). Finally, the particles were resuspended in 1 ml of ultrapure water, frozen at -80°C, lyophilised (Genesis 12EL, Virtis) and stored at 4°C. Particle size distribution was determined by laser diffractometry using a Mastersizer® (Malvern Instruments, UK). The encapsulation efficiency and the *in vitro* release of VEGF in PBS were conducted using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for rhVEGF-165 (R&D Systems). The bioactivity of the released VEGF was evaluated *in vitro* determining the proliferation capacity of a human iliac artery endothelial cell line (HIAEC) after VEGF stimulation, by using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Also, VEGF bioactivity was confirmed by determining its capability to activate its receptor (KDR) by measuring KDR-tyrosine phosphorylation by ELISA (RD Systems).

Results and Discussion

TROMS produced microspheres with a diameter of 5 µm, which resulted to be more compatible with a *in vivo* administration. The encapsulation efficiency was around 30% and the drug loading 0,208 µg VEGF/mg polymer. Concerning *in vitro* release of VEGF in PBS, 28% of the entrapped protein was released within the first 24 hours and around 40% by day 4 (Figure 1).VEGF released from 4 mg of microparticles stimulated the proliferation of HIAECs in culture (Figure 2), indicating that the protein remains active after its encapsulation. Different concentrations of released VEGF from the microparticles did not induce prominent shifts on the proliferation profile (data not shown). Also, bioactivity of VEGF was confirmed by detection of its receptor (KDR) activation in HIAEC cells when treated with 10 ng/ml of free VEGF or with 4 mg of VEGF microparticles (Figure 3).

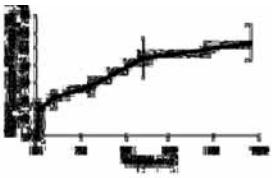


Figure 1. VEGF in vitro release profile from PLGA microparticles.

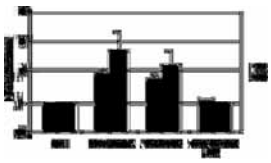


Figure 2. HIAEC proliferation assay. HIAEC stimulated by daily administration of pure VEGF at 10 ng/ml during 3 or 7 days or by VEGF released from the microparticles (VEGF MP). Culture medium (Co) and non-loaded microparticles were used as controls Pore transwells of 0.3µm.

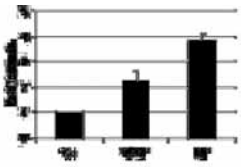


Figure 3. KDR activation by VEGF (10ng/ml) stimulation. Receptor activation by phosphorilation in tyrosine residues was determined by ELISA technique.

Conclusions

- VEGF-PLGA microparticles were successfully developed by TROMS, with a suitable size for *in vivo* administration.
- The VEGF remained active after the microencapsulation process, activating its receptor KDR in endothelial cells (HIAEC), and as a consequence of it, promoting the cell proliferation.
- VEGF microparticles could be a promising strategy for ischemic cardiovascular diseases.

References

(1) N. M. Pandya *et al*. *Vasc. Pharmacol.* **44:** 265–274, 2006.
(2) S. Grundmann *et al*. *Eur. J. Clin. Invest.* **37:** 755-766, 2007.
(3) P. Carmeliet *et al*. *Nat. Med.* **5:** 495-502, 1999.
(4) M. Simons *et al*. Circ. **111:** 1556-1566, 2005.
(5) E. Garbayo *et al*. *Eur. J. Pharm. Biopharm. In press* (2008).

Acknowledgments

This work was supported by *Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo* (AECID), Fundación Caja Navarra and Ministerio de Ciencia e Innovación (PSS-0100000-2008-1)

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DIHEXADECILFOSFATO (DHP) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LIPOSOMAS DE SUCCINATO DE SUMATRIPTÁN ELABORADOS POR DISTINTAS TÉCNICAS

M.L. González-Rodríguez, W. Dhrimeur, S. Villasmil, S. Salas, A.M. Rabasco
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla. España

Introducción

Sumatriptán (SUM) es un fármaco agonista selectivo de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} muy utilizado en el tratamiento de los episodios agudos de migraña.

Este trabajo de investigación forma parte de un proyecto destinado al desarrollo de una formulación óptima de liposomas de SUM con la finalidad de poder administrar el fármaco por vía nasal, evitando las típicas recurrencias producidas por las formas convencionales.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la importancia de adicionar carga a las formulaciones de liposomas para poder incluir SUM en el interior de las vesículas [1]. La adición de estearilamina (lípido cargado positivamente), ha permitido obtener liposomas REV con una carga de fármaco de aproximadamente 60 % p/v [2]. Aunque las dispersiones coloidales resultantes tras la adición de DHP mostraron eficacias de encapsulación menores, sin embargo, en base a los datos de potencial zeta, presentaron una mayor estabilidad que los liposomas con carga positiva.

Por ello, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar las propiedades fisicoquímicas de distintas formulaciones elaboradas con DHP a distintas concentraciones, y mediante distintas técnicas de elaboración, con el fin de esclarecer el comportamiento del fármaco cuando se modifica la carga superficial de las vesículas.

Materiales y Métodos

Fosfatidilcolina (PC), Colesterol (CH), Dihexadecilfosfato (DHP), Cloroformo, tampón HEPES (10 mM, pH=7.4), succinato de sumatriptan ofrecido por Glaxo Smith Kline.

Los liposomas fueron preparados siguiendo los métodos recogidos en estudios previos [3].

En este trabajo, todos los lotes fueron preparados con 66.6 mg de SUM y usando cinco concentraciones de DHP (1.83, 2.29, 2.75, 3.66 y 5.50 mM) como se recoge en la tabla 1.

Tamaño vesicular, índice de polidispersión y potencial zeta

Estos parámetros fueron determinados a 25 ºC en un equipo zetamaster (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Tabla 1. Composición de los lotes estudiados.

Lotes	DCP	TLE	REV	FAT	SU
1 (1.83)					
2 (2.29)					
3 (2.75)					
4 (3.66)					
5 (5.50)					
6 (1.83)					
7 (2.29)					
8 (2.75)					
9 (3.66)					
10 (5.50)					
11 (1.83)					
12 (2.29)					
13 (2.75)					
14 (3.66)					
15 (5.50)					
16 (1.83)					
17 (2.29)					
18 (2.75)					
19 (3.66)					
20 (5.50)					
21 (1.83)					
22 (2.29)					
23 (2.75)					
24 (3.66)					
25 (5.50)					
26 (1.83)					
27 (2.29)					
28 (2.75)					
29 (3.66)					
30 (5.50)					

Lamelaridad

La morfología de las vesículas fue visualizada utilizando técnicas de confocalidad (CLSM) mediante la adición de rodamina a la fase acuosa.

Eficacia de encapsulación

Este parámetro fue determinado mediante diálisis dinámica, que permite el cálculo de la concentración de principio activo no encapsulado [3].

Condiciones cromatográficas

- Columna de acero inoxidable (Waters Spherisorb 5 µm ODS2) de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro.
- Fase móvil: tampón fosfato (0.05 M) - acetonitrilo (80:20 v/v) ajustado a pH= 6 con hidróxido de sodio (0.05 M).
- Flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 µL.

Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se ha realizado utilizando el programa SPSS versión 14.0.

Resultados y Discusión

Efecto de la técnica de elaboración

Las distintas formulaciones han sido caracterizadas por confocalidad. Se puede observar a partir de las imágenes obtenidas por el CLSM que los métodos TLE y FAT proporcionan vesículas multilaminares (Figura

1A y 1B) mientras que la técnica REV permite la formación de vesículas unilaminares (Figura 1C).

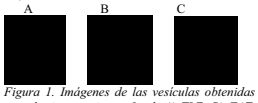


Figura 1. Imágenes de las vesículas obtenidas por el microscopio confocal. A) TLE. B) FAT. C) REV.

Al analizar las variables dependientes (EE, tamaño vesicular, potencial zeta e IP), no se ha observado ninguna diferencia significativa ni en la EE (F: 2.229, p: 0.150) ni en el potencial zeta (F: 0.213, P: 0.809) entre las distintas formulaciones. La mayor EE obtenida correspondió a las vesículas REV (54.56 %), debido fundamentalmente al mayor espacio acuoso de los liposomas unilaminares [4]. Respecto al tamaño vesicular, el ANOVA demostró diferencias significativas entre las técnicas, obteniéndose una variación positiva de 157.56 (p: 0.024) entre los métodos TLE y REV, indicativo del menor tamaño de los REV. En cuanto al IP, la prueba T de Dunnet mostró una diferencia significativa entre los métodos TLE y REV, con una diferencia de 0.4354 (p: 0.13), que indicaba una mayor homogeneidad de la dispersión en las formulaciones REV.

Efecto de la concentración de DHP

En este trabajo se elaboraron formulaciones con cinco concentraciones distintas de DHP para modificar la carga superficial de las formulaciones. La prueba ANOVA no mostró diferencias significativas sobre las variables estudiadas. Sin embargo, en la figura 2, donde se recoge la evolución de las respuestas en función de la concentración de DHP, puede observarse la evolución de las distintas respuestas. En concreto, la EE muestra una tendencia ascendente a medida que se incrementa la densidad de carga negativa en las vesículas, hasta el punto correspondiente a 2.75 mM de DHP, a partir del cual no aumenta significativamente. Una hipótesis que se baraja es la posibilidad de que el SUM (que al pH formulado se encuentra ionizado positivamente) interaccione con el DHP, favoreciendo la encapsulación del fármaco, hasta un límite a partir del cual no se produce la interacción. Este hecho daría lugar a una evolución en los valores de potencial zeta como el reflejado en la figura 2.

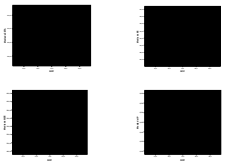


Figura 2. Variación de las respuestas en función de la concentración de DHP. A) Potencial zeta. B) EE. C) Tamaño. D) IP.

Efecto de la presencia de SUM

Globalmente, las formulaciones elaboradas presentaron un tamaño vesicular que osciló entre 398,4 y 860.6 nm, habiéndose observado, al aplicar las pruebas no paramétricas, para variables independientes: U de Mann-Whitney, W de Wilcoxon y estadístico Z, diferencias estadísticamente significativas cuando se incorporaba el fármaco (el tamaño aumentó, p: 0.003).

Respecto al potencial zeta, igualmente se observaron diferencias entre los liposomas blanco y los formulados con SUM (p: 0.003).

Conclusiones

De todos los resultados obtenidos, podemos concluir que la concentración de DHP no afectó a los parámetros estudiados, aunque sí se obtuvo una relación directa con la EE hasta un valor de 2.75 mM de DHP. En cuanto a la técnica de elaboración, podemos concluir que la técnica REV es la que proporciona la mayor cantidad de fármaco encapsulado, lo que puede ser debido a la homogeneidad y al pequeño tamaño de las vesículas. Por último, la presencia del fármaco en las formulaciones incrementa el tamaño vesicular y disminuye el valor del potencial zeta, lo que podría contribuir a un incremento de la estabilidad de la formulación.

Referencias

(1) González-Rodríguez *et al.* VIII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 135-136, 2008.
(2) González-Rodríguez *et al.* VIII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 137-138, 2008.
(3) Maestrelli *et al. Int. J. Pharm.* **312**: 53 - 60, 2006.
(4) Abraham *et al. Methods Enzimol*. **391**: 71 - 96, 2005.

INTERACCIÓN DE SUMATRIPTAN CON LOS COMPONENTES DE UNA FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS CARGADOS CON ESTEARILAMINA Ó CON DIHEXADECILFOSFATO: ESTUDIO MEDIANTE DSC Y ^{31}PNMR

M.L. González-Rodríguez, S. Villasmil, W. Drhimeur, A.M. Rabasco.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/ Prof. García González, 2. 41012 Sevilla

Introducción

Sumatriptán (SUM) es un fármaco agonista serotoninérgico muy utilizado en el tratamiento de los episodios agudos de migraña.

Existen comercializados en la actualidad preparados de SUM destinados a su administración por vía subcutánea, oral o nasal. Sin embargo, se están estudiando otras vías alternativas con el fin de minimizar el fenómeno de recurrencia del fármaco [1]. Nuestro grupo de investigación está desarrollando una formulación intranasal de SUM vehiculado en liposomas. Resultados previos han demostrado que es necesario aportar carga a la superficie de las vesículas para formar liposomas de SUM estables [2]. Es por ello por lo que en el presente trabajo, se va a realizar un análisis del comportamiento físico de las vesículas cuando éstas están en proceso de formación, en presencia de lípidos cargados positiva o negativamente, comparando los resultados con los obtenidos con las vesículas sin cargar.

Materiales y Métodos

Fosfatidilcolina (PC), colesterol (CH), estearilamina (EA), dihexadecilfosfato (DHP), cloroformo, tampón HEPES (ajustado a pH 7.4) y succinato de sumatriptán (SUM), que fue donado por Glaxo Smith Kline.

Preparación de los liposomas

Las formulaciones de liposomas fueron preparadas utilizando la técnica de evaporación en capa fina (TLE) [4]. Se prepararon liposomas cargados positiva y negativamente, usando 3.7 mM de EA Y DHP, respectivamente. La cantidad de SUM fue de 66.6 mg en 10 mL de fase acuosa por lote.

Las muestras que fueron utilizadas para el estudio por DSC correspondieron a liposomas en fase de formación, donde la hidratación de la película lipídica fue parcial.

Para el estudio de ^{31}PNMR, la película lipídica se hidrató con 10 mL de una solución formada por 0.5 mL de agua deuterada y 9.5 mL del tampón HEPES.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El equipo que se utilizó fue un DSC 131 (Setaram). Las muestras se sometieron a un barrido con una velocidad de calentamiento de 10 ºC / min, en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 400 ºC, obteniendo así los termogramas correspondientes a las distintas formulaciones.

Microscopía de platina caliente (HSM)

El proceso de fusión de las muestras se realizó mediante una platina caliente (*Mettler FP82 HT*), acoplada a un microscopio Olympus, BH-2 (objetivo 10x) con un dispositivo de registro fotográfico digital. La temperatura inicial y final de programación se eligió en base a los termogramas obtenidos en el DSC.

Espectroscopía de ^{31}PNMR

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

Resultados y Discusión

Estudio térmico por DSC y HSM

En este estudio se ha evaluado el comportamiento térmico del SUM, de los lípidos formadores de película individualmente, de las mezclas físicas binarias (50%) del fármaco con los distintos componentes, así como de muestras obtenidas de la película durante el proceso de formación de los liposomas con y sin fármaco.

La figura 1 muestra los termogramas de cada uno de los componentes de la formulación por separado. Se observa que SUM presenta un pico bien definido a una temperatura de transición (Tm) de 169.69ºC, el cual corresponde a su fusión. Con respecto a los lípidos formadores de película, resulta de interés la PC que presenta un comportamiento irregular, el cual se aprecia por la ausencia de picos en el termograma, probablemente debido a que se trata de una mezcla de fosfolípidos. En los termogramas resultantes de las mezclas binarias se observó cómo desaparecía el pico de SUM en la mezcla PC/SUM, lo cual se debe a una disolución del SUM en la fosfatidilcolina a una temperatura

por debajo de su temperatura de fusión, hecho que fue corroborado por HSM y lo que explica la imposibilidad de preparar liposomas neutros de SUM.

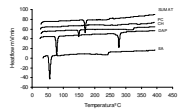


Figura 1. DSC del sumatriptán y de cada lípido.

En cuanto a los liposomas, tanto los cargados negativa como positivamente con SUM, presentan una alteración en sus Tm y en sus entalpías con respecto a los liposomas blanco (tabla 1, Fig. 2 y 3), lo cual es indicativo de una posible interacción del SUM con la película lipídica.

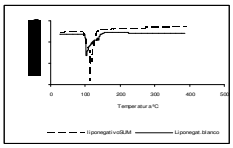


Figura 2. Termogramas de liposomas blanco y con SUM cargados negativamente.

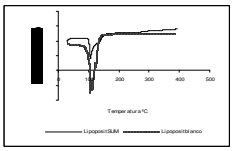


Figura 3. Termogramas de liposomas blanco y con SUM cargados positivamente.

Espectroscopía de ^{31}PNMR

En los espectros recogidos en la figura 4, se observa la estructura de bicapa en los espectros a, b y c, a 303 ºk, los cuales muestran un pico definido acompañado de un hombro lateral bajo. Sin embargo, en los espectros d y e aparece un pico adicional que es característico de la estructura de fase hexagonal H_{II}, propia de liposomas con carga negativa (Figura 5).
A 338º (Figura 6), se observa el efecto degradativo de la temperatura sobre los liposomas, acentuándose éste en las formulaciones que no contienen SUM.

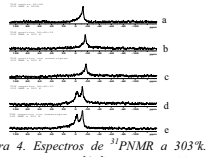


Figura 4. Espectros de ^{31}PNMR a 303ºk. a) liposomas neutros, b) liposomas positivos, c) liposomas positivos con SUM, d) liposomas negativos, e) liposomas negativos con SUM.

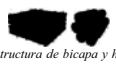


Figura 5. Estructura de bicapa y hexagonal H_{II} de liposomas.

Ello hace pensar que el fármaco podría estabilizar a los liposomas, sobre todo a los cargados positivamente.

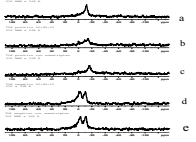


Figura 6. Espectros de ^{31}PNMR at 338ºk. a,b,c,d,e y f son las mismas muestras de la figura 4.

Conclusiones
Las moléculas de SUM y la carga superficial de las vesículas alteran el orden en el interior de las bicapas lipídicas. Los liposomas cargados positivamente son más estables que los que poseen carga negativa. Mientras que la EA induciría la formación de la estructura de bicapa en los liposomas [5], el DHP origina dos tipos de conformaciones: bicapa y hexagonal HII, contribuyendo a la desestabilización de la formulación.

Referencias

(1) Femenía-Font *et al. Int. J. Pharm*., **323** : 125 – 130, 2006.
(2) Weidmann *et al*., *Clin. Therap*., **25:** 235 – 246, 2003.
(3) Cullis and De Kruijff. Biochim. *Biophys. Acta*, **559 :** 399 – 420, 1979.
(4) Maestrelli *et al.*, Int.. *J. of Pharm*., **312** : 53 – 60, 2006.
(5) López-García *et al.*, *Biochim. et Biophys. Acta*, **1153** : 1 – 8,1993.

MICROGRANULOS DE PECTINA CONTENIENDO FORMULACIONES MULTIPARTICULARES CON BUDESONIDA: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU EFICACIA APLICANDO EL MÉTODO BOOTSTRAP

Manuel Guzmán[1], Susana Sánchez[1], Raquel Gragera[2]
1Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
[2]Dpto. Especialidades Médicas. Histología. Facultad de Medicina.
Universidad de Alcalá. 28871. Alcalá de Henares (Madrid).España.

Introducción

Según precisa la Guía de la EMEA para el desarrollo de productos medicinales destinados al tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, como la de Crohn, es muy importante que el fármaco llegue eficientemente al colon (1). Evitando la absorción en el tracto gastrointestinal (TGI) proximal y logrando una elevada concentración en las regiones inflamadas se incrementa la efectividad del fármaco. La pectina es un polisacárido natural, derivado del ácido α(1-4)D-galacturónico parcialmente metoxilado. Es biodegradado por la microflora colónica, a pH>3,5 tiene una carga neta negativa, pósese bioadhesividad y sus dispersiones acuosas gelifican en presencia de iones calcio, por lo que presenta unas cualidades muy interesantes para el desarrollo de formulaciones dirigidas a los tramos finales del TGI (2). Por su parte, los sistemas multiparticulares como las nanopartículas (NP), microparticulas (MP) y nanocápsulas (NC) presentan afinidad por los tejidos inflamados (3). En trabajos previos hemos elaborado y caracterizado microgránulos (MG) de polisacáridos, recubiertos con polímeros metacrílicos incluyendo sistemas multi particulares, que permiten su liberación y vectorización al colon (4,5).
El objetivo de este trabajo ha consistido en la preparación, caracterización y evaluación de la eficacia "in vivo" de MG de pectina recubiertos con Eudragit S-100, conteniendo NP, MP o NC de poli-ε-caprolactona cargadas con Budesonida. Debido a la gran variabilidad interindividual y al reducido número de animales utilizado, nos propusimos explorar la metodología Bootstrap para mejorar la fiabilidad de la evaluación de los resultados de eficacia.
El método Bootstrap (6) propuesto por Efron en 1979 es un procedimiento de remuestreo, considerado como una buena alternativa a las pruebas paramétricas y no paramétricas convencionales para el contraste de hipótesis. Se basa en construir un modelo de distribución para el estadístico a partir de la información proporcionada por la muestra, y no requiere asumir ningún supuesto previo sobre su distribución teórica. Esta se determina simulando un elevado número de muestras aleatorias construidas directamente a partir de los datos observados.

Materiales y Métodos

Las MP, NP y NC se prepararon mediante las técnicas de emulsión-evaporación del disolvente, nanoprecipitación y deposición interfacial respectivamente, empleando como polímero la poli-ε-caprolactona. Las partículas se incorporaron a dispersiones acuosas de pectina, con las que se obtuvieron los microgránulos por gelificación iónica. A continuación se secaron y se recubrieron con un copolímero metacrílico gastrorresistente (Eudragit S-100) y un polisacárido, con lo que se obtiene un sistema de liberación controlada de entrega del fármaco (DDS) en el intestino grueso (7).
La caracterización de las formulaciones se realizó por microscopía óptica y electrónica (Zeiss DSM 950), la distribución de tamaño por dispersión de la luz (Leeds−Northrup), la eficacia de encapsulación por cromatografía líquida (HPLC, Waters) a 245nm, previa extracción con etanol al 40%. La caracterización se completó con: calorimetría (DSC Mettler), espcetrometría FT-IR (Spectrum 2000 Perkin Elmer), difractometría (Ray Xpert Pro) y estudios de liberación en flujo continuo, con gradiente de pH, en una célula de ultrafiltración (10mL).
Para la evaluación de la eficacia "in vivo" se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, (animalario UAH, nº homologación EC 28005-22A). Los animales se dividieron en 9 grupos, uno control y al resto se les indujo una reacción inflamatoria aguda con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (4). A las 72 horas de inducir la reacción inflamatoria se administraron diariamente, durante 4 días, con una cánula bucogástrica, las formulaciones (85µg BDS/Kg) a los 9 grupos: G1: suero salino (control), G2: dispersión de BDS en CMC, G3 a G5: Microgránulos de pectina con MP, NP o NC, cargadas con BDS; G6 a G9: Microgránulos de pectina con partículas sin carga. Al quinto día, y siguiendo el protocolo establecido, los animales fueron sacrificados y se extrajo el intestino. Como índices de la lesión se ha considerado: el daño macroscópico observado, la relación peso colon distal (8 cm)/ peso

corporal, la actividad mieloperoxidasa (MPO) y daño histológico de la pared intestinal a nivel del colon.

Resultados y Discusión
Los datos de tamaño y Eficacia de Encapsulación (E.E.) para la BDS en los sistemas multiparticulares MP, NP y NC y en los microgánulos de pectina recubiertos con Eugragit S-100, se muestran respectivamente en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Tamaño y carga de MP, NP y NC con BDS.

SISTEMAS Multiparticulares	TAMAÑO (nm)	DISTRIBUCIÓN AMPLITUD (nm)	E.E. (BDS%)	RENDIMIENTO (%)
Microparticulas	2460±130	300±30	87,38±2,91	83,53±6,3
Nanoparticulas	175,1±14,9	67,2±7,9	90,77±2,22	93,42±5,35
Nanocápsulas	244,3±25,1	81,6±25,6	97,41±0,24	92,48±1,26

Tabla 2. Microgránulos de Pectina con BDS.

MICROGRANULOS Conteniendo	TAMAÑO (nm)	RENDIMIENTO (%)	CONTENIDO (BDS µg/ mg)
Microparticulas	1,203±0,112	92,59±4,49	2,098±0,43
Nanoparticulas	1,220±0,063	82,26±3,93	2,63±0,36
Nanocápsulas	1,222±0,133	92,15±2,42	5,16±0,37

En la Figura 1 se muestras microfotografías obtenidas con SEM de los MG sin recubrir, su forma y núcleo (a) y un detalle de la cubierta (b).

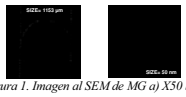


Figura 1. Imagen al SEM de MG a) X50 b) X200.

De los resultados de DSC, Rayos X y FT-IR se deduce que la BDS no forma enlaces ni con la P-ε-CL, ni con la Pectina. Su liberación comienza a las 2h, cuando el pH del fluido cambia de 1,2 a 6,4.
La aplicación de un contraste paramétrico convencional para analizar los resultados in vivo, requiere comprobar la normalidad de las variables; pero cuando la variable no tiene esta distribución o el tamaño de la muestra es insuficiente (4-5 animales) se estaría cometiendo un error en la inferencia. Mediante la técnica Bootstrap se obvian estos inconvenientes. Con este método se ha realizado un análisis de la varianza y un test de comparaciones múltiples (6), generado 599 muestras bootstrap mediante el paquete de libre difusión R (8).
Para valorar la eficacia de los tratamientos se asignaron puntuaciones de 1 a 5 a la lesión histológica de la pared intestinal, evaluada por microscopía, y al daño macroscópico observado visualmente en todo el TGI, obteniéndose un índice global de daño (figura 2). Las figuras 3 y 4 representan los otros dos índices considerados.

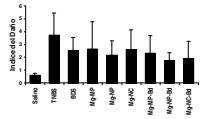


Figure 2. Índice del daño macroscópico e histológico.

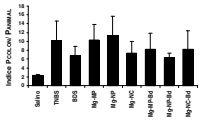


Figure 3. Peso segmento colon/peso corporal del animal.

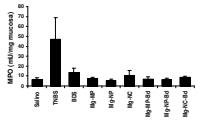


Figura 4. Actividad mieloperoxidasa MPO mU/mg mucosa.

En los tres índices se aprecian diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) de todos los grupos con el control (salino) y con respecto a la actividad MPO, con el grupo sin tratar. En general, los sistemas multiparticulares (MP, NP y NC) presentan mayor efectividad que la BDS libre. La formulación de MG con NC es la que más carga de fármaco permite, coadyuvando a su acción los ácidos grasos insaturados de la formulación.

Referencias

(1) Doc.Ref.CPMP/EWP/2284/99.EMEA 2007
(2) Liu L et al. *Biomaterials* **26:**5907-5916, 2005
(4) Bhardwaj, V et al. *J. Biomed. Nanotechnol.* **1(3):**235-258, 2005
(4) Sánchez S. Tesis doctoral. Univ. Alcalá, 2006
(5) Guzman M. et al. Proc. 34th Ann Meeting & Expos of Control. Release Soc PO-643, 2007
(6) García-Pérez A. cap 9, en *Métodos avanzados de estadística aplicada*.Madrid.UNED, 2002
(7) Guzman M. et al Pat nº ES2228243, (2006)
(8) http://cran.r-project.org/

PROPIEDADES VISCOSIMÉTRICAS DE FORMULAS AR EN NUTRICIÓN INFANTIL

Morales, M.E.[1], López, G[1]., Lara-Villoslada, F.[2], Infante, D[3], Ruiz, M.A. [1] y Gallardo, V[1].
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada
Campus de Cartuja s/n 18071 Granada
e-mail: maen@ugr.es
[2]Departamento de Nutrición y Salud. Puleva Biotech. Granada.
[3]Departamento de Pediatría. Hospital Vall D'Hebrón. Barcelona.

Introducción

Recientemente, en nutrición infantil, se han comercializado las llamadas fórmulas AR, sinónimo de anti-regurgitación, con la indicación aprobada para lactantes con regurgitaciones, reflejo de la inmadurez del sistema nervioso entérico y del tono del esfínter esofágico inferior durante los primeros meses de vida.
Las modificaciones más frecuentes en las fórmulas AR se basan en añadir alguna sustancia espesante, tales como la harina de la semilla de algarrobo y almidones, la amilopectina como almidón de arroz y almidón precocido de maíz. El objetivo de este trabajo es conocer la viscosidad de algunas de las fórmulas AR del mercado, tras su reconstitución según recomendación del fabricante y en condiciones de similitud fisiológica gástrica tras su hipotética ingesta.
Para ello hemos realizado un exhaustivo estudio reológico de fórmulas AR con diferente composición en cuanto al espesante empleado.

Materiales y Métodos

Se determinó la viscosidad expresada en mPa·s de 6 fórmulas AR de inicio reconstituidas siguiendo las recomendaciones del fabricante y se comparó con una fórmula de inicio estándar (sin espesante).
Los ensayos reológicos se realizaron con un reómetro Bolhim CS-10 de esfuerzo controlado. La geometría de medida escogida fue la de cilindros coaxiales (C14-Ti).
Asimismo, los estudios fueron realizados tanto a temperatura ambiente (25±0.1º C) como a 37±0.1º C, pH 4±0.1 y un 1% de pepsina, simulando las condiciones gástricas durante 1 hora tras la administración.

Resultados y Discusión

Un paso previo a la realización de estas medidas consiste en someter todas las muestras a las mismas precondiciones. Las muestras se someten a un determinado esfuerzo durante un tiempo establecido y, seguidamente se dejan en reposo. Con esto suponemos que se rompe la estructura interna del sistema, que comienza a formarse durante el tiempo de reposo. De este modo aseguramos obtener siempre resultados reproducibles.

Todas las muestras estudiadas muestran un comportamiento newtoniano a 25ºC. De modo que el dato de viscosidad aportado es el correspondiente al ajuste lineal de los datos experimentales conforme a ley de Newton para fluidos líquidos (tabla 1).

Tabla 1. Viscosidad de las fórmulas estudiadas a 25º C.

FÓRMULA	η (mPa·s)	DE
Control	19.48	0.01
Almidón de maiz y patata (14.1%)	26.96	0.19
Almidón de arroz pregelatinizado (15.9%)	28.36	0.72
Harina semilla algarrobo (2.9%)	46.47	0.35
Harina semilla algarrobo (3.5%)	21.37	0.57
Almidón de maiz (15%)	22.54	0.16
Goma garrofín (4.7%)	20.02	1.17

En la tabla 1, observamos que la fórmula que contiene harina de semilla de algarrobo a una concentración del 2.9% (m/m) es la que presenta valores más altos de viscosidad. Esto viene abalado por los trabajos realizados por otros autores. Por lo tanto, esta fórmula ya espesa en el biberón.
La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en condiciones gástricas para los tres tiempos estudiados (tiempo cero, 30 y 60 minutos). Todas las fórmulas exhiben un comportamiento newtoniano, salvo la muestra que contiene como espesante harina de algarrobo a una concentración de 2.9% es pseudoplástica. Por este motivo, la viscosidad de esta muestra es el

resultado del ajuste lineal de los datos obtenidos cuando la fórmula comienza a fluir.
En todos los casos, la viscosidad de las muestras ensayadas es mayor en condiciones gástricas que a 25ºC y pH natural. Esto puede deberse a la coagulación que experimentan en estas condiciones, principalmente debido a la acción de los espesantes.

Tabla 2. Viscosidad de las fórmulas a 37ºC, pH 4 y 1% de pepsina.

FÓRMULA	η (mPa·s)		DE
Control	0 min	24.44	0.38
	30 min	22.69	0.47
	60 min	23.80	0.25
Almidón de maiz y patata	0 min	56.14	7.52
	30 min	55.40	5.39
	60 min	19.26	0.66
Almidón de arroz pregelatinizado	0 min	32.76	0.09
	30 min	32.05	1.22
	60 min	41.70	1.93
Harina sem algarrobo(>4%)	0 min	68.03	1.26
	30 min	73.07	2.68
	60 min	70.87	0.76
Harina sem algarrobo(3,5%)	0 min	39.08	0.38
	30 min	37.14	1.19
	60 min	45.42	0.45
Almidón de maiz	0 min	29.37	1.36
	30 min	29.34	1.02
	60 min	28.34	0.29
Goma garrofín	0 min	26.82	0.10
	30 min	29.32	1.58
	60 min	30.57	2.35

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que todos los espesantes analizados incrementan la viscosidad del producto, sobre todo en condiciones gástricas. La harina de semilla de algarrobo es el viscosizante que mayor viscosidad confiere a la fórmula en las dos condiciones en las que se realizó el estudio, aunque este dato es mayor a la concentración más baja. Esto se debe a la presencia de otros componentes, como la caseina. Futuros estudios deberán determinar si las diferencias en la viscosidad tienen una implicación en la eficacia clínica de las fórmulas.

Bibliografía

(1) Suárez, L., 2005. Bol Pediatr **45:** 100.

(2) Agosteni, C., 2004. ESPEHAN Committee on Nutrition Acta Pedriat r **93:** 406.

(3) Macosko, C.W., 1994. Rheology. Principles and appications. Nueva York: VCH, p 426.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN FORMULACION DE EMULSIONES: INVESTIGACION DE UNA NUEVA VARIABLE RESPUESTA

H. Sekkat[1], M. D. Contreras Claramonte[1], M. D. Mingorance Álvarez[2]
mdcontre@ugr.es
[1]Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España.
[2]Estación Experimental Del Zaidín (C.S.I.C), Granada, España.

Introducción

La formulación de emulsiones es frecuente en Tecnología Farmacéutica. Con esta finalidad y en la última década, se aplica el diseño de experimentos como herramienta de trabajo. Ahorra tiempo y dinero y permite detectar interacciones entre los componentes, difícilmente apreciables con la técnica de "ensayo y error". Como variable respuesta, las usuales son medidas de viscosidad y tamaño de gota entre otras. El objetivo de este trabajo, es evaluar la conductividad de las emulsiones como variable respuesta, en el diseño de experimentos [1]. La conductividad tiene la ventaja de obtenerse fácil y rápidamente, además de su gran sensibilidad. Esta evaluación, se aplica al diseño de la formulación de una emulsión con aceite de oliva y un agente polimérico [2,3]. El diseñó fue utilizado previamente incluyendo la viscosidad como variable respuesta. El objetivo fue determinar las proporciones de aceite de oliva, polímero poliacrílico (Pemulen TR1) y agua así como el pH que originan formulaciones estables. Se incluyó el pH debido a que el polímero poliacrílico no tiene propiedades tensioactivas y la estabilidad del preparado depende el pH del medio. Se aplicó un diseño de mezclas [4, 5, 6] con variable de proceso con restricciones, basado en el criterio D-Optimal debido a la irregularidad del dominio experimental. Los componentes y sus intervalos fueron: Aceite de oliva (Ac): 0,03 < Ac < 0,6; Pemulen (Pm): 0,001 < Pm < 0,005; Aqua conservans (Ag): 0,393 < Ag < 0,963. El pH varia: 5 < pH < 7 (compatible con la piel).

Materiales y Métodos

El diseño de mezclas con variable de proceso con restricciones (D-Optimal), fue generado (MODDE 5) dando lugar a 20 formulaciones diferentes (Tabla 1). De ellas, 16 (N1-N16) constituyen los vértices y puntos centrales de las aristas de los lados y el punto centro fue repetido cuatro veces (N17-N20).
La elaboración de las emulsiones se realizan según el método descrito en Sekkat y Contreras [7] siguiendo un orden aleatorio para evitar errores sistemáticos.
La conductividad, se determina mediante un conductímetro Crisol (Barcelona).

Resultados y Disucusión

Todas las formulaciones originan emulsiones estables al menos durante un año, excepto las formulaciones N7, N8, N12 y N16, que se separaron las fases antes de 24 horas, siendo excluidas del diseño. Este fenómeno sucede siempre que existen alta proporción de aceite y polímero, probablemente debido a la interacción estérica de las cadenas del polímero.
Transcurridas al menos 48 h de la preparación, se determina la conductividad de cada una de las emulsiones (Tabla 1), los valores varían de 49 a 600 µS/cm, confirmando que las formulaciones son emulsiones O/A.

Tabla 1.- Composición de las formulaciones según un diseño D-Optimal (en tanto por uno) y la conductividad.

Formu-lación	pH	Aceite Oliva	Pemulen	Agua	Conductividad (µs/cm)
N1	5	0,03	0,001	0,963	87,2
N2	5	0,03	0,001	0,963	177,7
N3	5	0,6	0,001	0,393	49,1
N4	5	0,6	0,001	0,393	49,1
N5	5	0,03	0,005	0,959	95,6
N6	5	0,03	0,005	0,959	217
N7	5	0,596	0,005	0,393	Rota
N8	5	0,596	0,005	0,393	Rota
N9	7	0,03	0,001	0,963	274
N10	7	0,6	0,001	0,393	117
N11	7	0,03	0,005	0,959	578
N12	7	0,596	0,005	0,393	Rota
N13	7	0,03	0,003	0,961	454
N14	7	0,315	0,001	0,678	170,7
N15	7	0,313	0,005	0,676	400
N16	7	0,598	0,003	0,393	Rota
N17	6	0,314	0,003	0,677	270
N18	6	0,314	0,003	0,677	254
N19	6	0,314	0,003	0,677	250
N20	6	0,314	0,003	0,677	200

La evaluación de la conductividad por medio de análisis de regresión múltiple indica que la composición de las mezclas influye significativamente en ella. Para ello, se hizo el ajuste de los datos mediante regresión lineal por mínimos cuadrados parciales indicando que la proporción de agua y la interacción de ésta con

el pH no influye de forma significativa (Figura 1) en la conductividad. En cambio, el contenido en aceite y pemulen si tienen un efecto significativo (P<0,05), aunque contrario, y a su vez, presentan una interacción también significativa (P<0,05) con el pH.

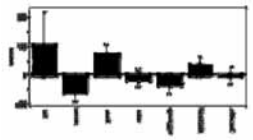


Figura 1: Influencia del aceite de oliva, pemulen y agua y su interacción con el pH en la conductividad de las preparaciones.

La conductividad se ajusta al modelo:

Conductividad (µS/cm) = 70,16 pH + 651,3 Ac
-113786 Pm - 147,1 (pH*Ac) + 25400 (pH*Pm)

El valor del coeficiente de determinación (R^2 = 0,928) junto con el valor del parámetro "validez" (0,813) que indican la fracción de la variación de la conductividad que es explicada por el modelo, corroboran la bondad del ajuste. Adicionalmente, la varianza debida a la falta de ajuste no es significativa frente al error puro (P = 0,475). El coeficiente Q2 (0,776) indica la alta capacidad de predicción de dicho modelo. Por ultimo la precisión de los puntos centrales (n = 4) es del 12%.

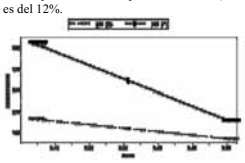


Figura 2. Influencia de la interacción Aceite-pH sobre la conductividad de las preparaciones.

Del análisis de la interacción aceite-pH (Figura 2) se deduce que la conductividad para valores de pH bajo (5) es independiente de la concentración de aceite. Sin embargo para valores de pH alto (7) depende de la concentración de aceite. Es alta (500 µS/cm) para concentraciones reducidas de aceite y baja (175 µS/cm) para concentraciones elevadas de aceite.

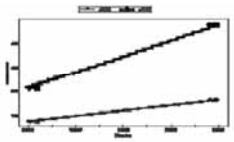


Figura 3. Influencia de la interacción Pemulen-pH sobre la conductividad de las preparaciones.

De la interacción Pemulen-pH (Figura 3) se deduce que la conductividad para valores de pH bajo (5) es independiente de la concentración de polímero. Sin embargo la conductividad para valores de pH alto (7) depende de la concentración de pemulen siendo baja (200 µS/cm) para concentraciones educidas de polímero y alta (500 µS/cm) para concentraciones elevadas de polímero.

Conclusiones

La variable respuesta conductividad, tiene limitaciones. Va a ser adecuada siempre y cuando se quieran obtener emulsiones que tengan un pH elevado con cantidades inferiores a 0,3 en aceite (30 % m/m) y superiores a 0,002 en Pemulen (0,2 % m/m). Su utilización en diseño de experimentos requiere estudios adicionales.

Bibliografía

(1) J. Gabrielson, y cols., *J. Chemometrics*, **16:** 41-160, 2002.
(2) BFGoodrich. TDS-114.R1-212, 1994.
(3) Noveon. TDS-239, (1996).
(4) S. Cafaggi y cols., Chem. Intel. Lab. Syst. **65:** 139–147, 2003.
(5) R.A. Fisher, J. of the Ministry of Agric. **33**: 503-513, 1926.
(6) P. Gao, y cols., Pharm. Dev. Techn. **9**: 301–309, 2004.
(7) H. Sekkat, y cols. IX Congreso Científico, I Congreso Internacional de Formulación Magistral, Ciudad Real, 10-13 Nov, (2004).

LIBERACIÓN CONTROLADA DE DICLOFENACO SODICO EN COMPRIMIDOS ELABORADOS CON UNA POLIESTERAMIDA NO HINCHABLE

Rodríguez Galán I.C.[1], Margarit M.V.[1], Rodríguez Galán A.[2], Morales M.L.[1], Bouzas P.R.[2] y Hernández P.J.[1]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
[2]Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071, Granada.
[3]Departamento de Ingeniería Química, ETSEIB. Universidad Politécnica de Cataluña, Avd. Diagonal 647. 08028, Barcelona. e-mail: margarit@ugr.es

Introducción

El uso de excipientes poliméricos es un recurso tecnológico en el control de liberación de fármacos. Los poliésteres son una familia de polímeros biodegradables muy importante en formulación de liberación controlada, sin embargo se encuentran escasas publicaciones que empleen poliesteramidas con este objetivo (1-5). En este trabajo se formulan comprimidos de diclofenaco sódico con una poliesteramida, PADAS, y se estudia su influencia en el control de liberación del fármaco modelo así como las modificaciones inducidas por la presencia de diluyentes (tipo y cantidad). PADAS es, biocompatible, biodegradable, de estructura química regular y contiene el mismo número de grupos éster y amida (fig.1).

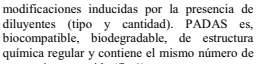


Figura 1. Poliesteramida PADAS (L-alanina-dodecanol-L-alanina-ácido sebácico)

Material y Métodos

Material: Diclofenaco sódico (Guinama, Valencia); PADAS (L-alanina-dodecanol-L-alanina-ácido sebácico) preparada por polimerización interfacial, siguiendo el método descrito por Paredes et al. (6) con un tamaño medio de partícula de 75 µm (60-90 µm); celulosa microcristalina (Avicel PH 101); lactosa monohidrato (Guinama, Valencia) fosfato cálcico dibásico dihidratado (Emcompres) (Farma-químico Sur, Málaga).
Elaboración de comprimidos

Las formulaciones estudiadas se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de comprimidos.

	100	100	100	100	100	100	100
	200	150	100	150	100	150	100
	---	47	97	---	---	---	---
	---	---	---	47	97	---	---
	---	---	---	---	---	47	97
	---	3	3	3	3	3	3

Mezclados los componentes se elaboran, por compresión directa (5 Tons/1min) en prensa hidráulica, comprimidos planos, de 300 mg y 10 mm de diámetro.

Estudios de liberación in Vitro

Comprimidos de cada formulación se someten a ensayos de liberación en dispositivo de disolución (Sotas AT7 Smart), aparato de paleta de R.F.E. 3ª ed. con 50 rpm de velocidad de rotación de las palas y 1000 mL de tampón de fosfatos pH 6,8 a 37±0,5 ° C como medio de liberación.
El estudio de liberación se realiza durante un periodo de 24 horas y las cantidades liberadas acumuladas de diclofenaco sódico se evalúan por espectrofotometría U.V. a 278 nm (Perkin Elmer Lambda 2). Los resultados (media de seis réplicas) se expresan en curvas representativas del porcentaje de dosis liberada/tiempo.
Para estudiar la cinética del proceso de liberación se aplican diferentes funciones: orden cero, primer orden, Higuchi y Peppas.

Resultados y Discusión

Todas las formulaciones originan comprimidos con características galénicas idóneas. La fig 2 muestra las curvas medias de liberación de diclofenaco sódico polvo, comprimidos con fármaco y PADAS (referencia, 200P) y formulaciones adicionadas de diluyentes.

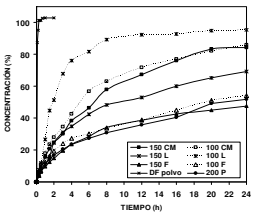


Figura 2. Perfiles de liberación de diclofenaco sódico en polvo y formulaciones con PADAS

La tabla 2 recoge los parámetros del estudio de liberación in vitro. La poliesteramida demuestra, en todos las fórmulas estudiadas, capacidad para controlar la liberación de diclofenaco sódico. En ausencia de diluyentes (200P), el polímero origina comprimidos matriciales inertes no deformables de liberación lenta y progresiva con una eficacia de disolución del 25,36%. La sustitución parcial de polímero por fosfato cálcico dibásico no modifica sustancialmente el comportamiento de liberación de los comprimidos matriciales, con escasa variación entre las dos concentraciones de PADAS estudiadas (tabla 2). La incorporación de celulosa microcristalina y lactosa incrementa la cesión de diclofenaco hasta un 60 y 90 % de la dosis al final del ensayo.

Tabla 2. Parámetros de liberación

	838,62 (122,09)	1471,75 (108,59)	1545,26 (344,58)	2188,09 (974,63)	2004,43 (217,66)	839,44 (97,31)	897,33 (126,68)
	25,36 (4,44)	44,19 (3,05)	49,41 (9,79)	96,28 (53,64)	73,16 (9,17)	26,40 (3,18)	28,08 (3,64)
	8,96 (0,53)	6,70 (0,26)	6,07 (1,17)	0,45 (0,88)	3,22 (1,18)	8,83 (0,38)	8,63 (0,44)

Realizado un análisis estadístico de los datos (ANOVA multifactor) a t = 8h, tanto la cantidad de poliesteramida como el tipo de diluyente influyen significativamente en la cantidad de fármaco disuelto (p=0,0003 y p=0,0000 respectivamente). Se llega a deducciones similares para t=12 h. La fig. 3 muestra la relación entre cada diluyente y la concentración de PADAS respecto a la liberación de fármaco.

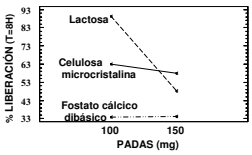


Figura 3. Grafico de relación entre PADAS y los diluyentes de las formulaciones

Para un nivel de significación de 99% y comparando 200P con cada diluyente, no se encuentran diferencias significativas para los comprimidos con fosfato cálcico dibásico, 150F y 100F, (diferencia estimada, D est.=3,14), pero son significativas las diferencias en la liberación de los comprimidos con celulosa microcristalina, 150 CM y 100CM, (d.est.=29,72) y los que contienen lactosa monohidrato 150L y 100L (d.est.=37,86).

El análisis cinético de los resultados (tabla 3) indica que la liberación de diclofenaco sódico de los comprimidos responde a una cinética de tipo Higuchi.

Tabla 3. Cinéticas de liberación de diclofenaco sódico desde las formulaciones de comprimidos

	1,9433	3,5181	3,4430	2,7463	3,4896	1,8983	2,0389
	0,9150	0,8934	0,8448	0,8531	0,6097	0,8639	0,8791
	-0,0281	-0,0803	-0,0811	-0,0479	-0,1331	-0,0265	-0,0302
	0,9597	0,9846	0,9693	0,9432	0,8686	0,9127	0,9403
	10,4209	19,033	19,0007	15,0907	20,8941	10,4065	11,1048
	0,9949	0,9886	0,9728	0,9739	0,8264	0,9917	0,9860
	0,4824	0,6129	0,5886	0,6011	0,5428	0,5967	0,5291
	0,9960	0,9831	0,9755	0,9643	0,8559	0,9839	0,9679

Conclusiones

La poliesteramida **PADAS** (L-alanina-dodecanol-L-alanina-ácido sebácico) permite elaborar comprimidos de liberación controlada con cinética de liberación de la raíz cuadrada. El tipo y cantidad de diluyente modifica la liberación de diclofenaco, siendo la lactosa la de efecto más acusado

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia 2006 FQM 1370) y por la CICYT (Proyecto MAT 2006-02406).

Bibliografía

(1) Tarvainen T et al., *J. Control. Rel*., **81(3):** 251-261, 2002.
(2) Tarvainen T et al., *Int. J. Pharm*., **310**: 162–167, 2006.
(3) Rodríguez-Galán IC et al., Actas X Reunión del Grupo Especializado de Polímeros, 231 (2007).
(4) Margarit MV et al., Actas X Reunión del Grupo Especializado de Polímeros, 232 (2007).
(5) Margarit MV et al., 6ª World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics & Pharmaceutical Technology. Barcelona, abril 2008
(6) Paredes N et al., *J. Appl. Polymer Sci*., **69**: 1547-1549, 1998.

IN VITRO GENE TRANSFER TO ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS BY IMPROVED TRANSFERRIN- LIPOPLEXES AND POLYPLEXES. PRELIMINARY STUDIES: CYTOTOXICITY AND TRANSFECTION

S. Olmedillas[1], A. Liras[1], I. Miguéliz[2], D. García-Olmo[3], M. García Arranz [3] and C. Tros de Ilarduya [2]
[1]Department of Physiology, School of Biology, Complutense University of Madrid, Spain
[2]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Navarra, Spain
[3]Cell Therapy Laboratory, La Paz University Hospital of Madrid, Spain

Introduction

Stem cells are a self-renewing population, with long-term viability and multilineage potential (1). These properties turn stem cell-based gene therapy into a promising strategy for the treatment of inherited diseases, such as haemophilia.
The aim of this study was to isolate adipose mesenchymal stem cells (ASC) from lipoaspirate samples, to expand them *in vitro*. Characterization of cultured cells based on cell surface markers expression patterns and differentiation assays was performed.
DOTAP lipoplexes and PEI and PAMAM polyplexes with or without transferrin carrying pCMVLuc plasmid were prepared for particle size and zeta potential characterization. Then, preliminary *in vitro* transfection studies in ASC were developed, evaluating cell viability and gene expression.

Materials and Methods

*Isolation, culture and characterization of stem cells***.** Adipose stem cells were obtained and cultured as described by Garcia Olmo *et al.* (2). Raw lipoaspirates were washed extensively with sterile phosphate buffered saline (PBS) to remove blood cells, saline and local anesthetic. The extracellular matrix was digested with collagenase type I (Gibco-BRL, UK). The cells resuspended in DMEM-10 (DMEM with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin) were plated onto 100 mm tissue-culture dishes and incubated at 37ºC/5%CO_2 in air to subconfluence. Flow cytometric analysis of ASC incubated with specific phycoerythrin-conjugated monoclonal antibodies CD90, CD34 (Millipore, Spain), CD73, CD71 and fluorescein isothyocianated-conjugated CD45 (Becton Dickinson, Spain) was performed on a FACScan argon laser cytometer (Becton Dickinson, Spain). Confluent cells were induced to differentiate with adipogenic medium (DMEM-10 with 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 10 µM insulin and 200 µM indomethacin) until day 7. Then, they were maintained in DMEM-10 with 10 µM insulin for 3 days. Lipid accumulation was assessed by Oil-Red O staining (1, 3).

*Liposome, lipoplexes and polyplexes preparation***.** 1,2-di-oleoyl-3-(trimethylammonium)propane (DOTAP, Avanti Polar Lipids, USA) liposomes were prepared by drying a chloroform solution of the lipid by rotary evaporation under reduced pressure and then by hydrating the film with a 10mM HEPES, 5% (w/v) glucose buffer, pH 7.4 (HBG). The resulting multilamellar vesicles were extruded through polycarbonate membranes with 100 nm pore diameter using a Liposofast device (Avestin, Canada), to obtain a uniform size distribution. The lipid to DNA charge ratio was calculated as the mole ratio of DOTAP (one charge per molecule) to nucleotide residue (average MW 330) (4).
Branched polyethylenimine (PEI 25KDa, Sigma-Aldrich, Spain) was diluted in distilled water at pH 7 to a final concentration of 40 mg/mL. The PEI concentrations were calculated to make the desired N/P charge ratio for 1 µg of plasmid DNA, assuming that 43.1 g/mol corresponded to each repeating unit of PEI containing one nitrogen atom and 330 g/mol corresponded to each repeating unit of DNA containing one phosphorus atom (5).
Generation 5 polyamidoamine (PAMAM, Sigma-Aldrich, Spain) cationic dendrimer was prepared by drying a methyl alcohol solution of the dendrimer by rotary evaporation under reduced pressure and then by hydrating the film with HBG. The PAMAM concentrations were calculated to achieve different charge ratios (+/-), taking into account the amount of positive amines on the dendrimer over negative phosphates on the DNA.
Complexes for *in vitro* experiments were prepared by first mixing HBG with (Tf-lipoplexes/polyplexes) or without (plain lipoplexes/polyplexes) iron saturated heat inactivated human transferrin (Becton Dickinson Biosciences, Spain), with the corresponding amount of DOTAP, PEI or PAMAM. The pCMVLuc (BioServe Biotechlogies, USA) was then added and gently mixed. Particle size and zeta potential were

determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, UK) and a ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA).

In vitro cell transfection. Cells were seeded in 48-well culture plates 24h before addition of the complexes. Then, 0.3 mL of DMEM-10 and 0.2 mL of complexes were added gently to each well. After a 4h incubation the medium was replaced, and the cells were further incubated for 48 h. Cell viability was quantified by a modified Alamar Blue (Gibco-BRL, UK) assay (5). Cells were lysed using reporter lysis buffer (Promega, USA) followed by two alternating freeze-thaw cycles. A luminometer (Sirius-2, Berthold Detection Systems, Spain) was used to measure luciferase activity with luciferase assay reagent (Promega, USA). The protein content was measured by the DC Protein Assay reagent (Bio-Rad, USA) using bovine serum albumin as the standard. The data were expressed as ng of luciferase per mg of protein.

Results and Discussion

Light phase contrast microscopy of isolated ASC from two lipoaspirate donors shows a monolayer of adhering fibroblast-like cells. These observations are consistent with Zuk *et al.* (1, 6). As shown in Figure 1, ASC expressed mesenchymal stem cell surface markers CD90 (94.7%), CD73 (97.5%) and CD71 (45.2%). In contrast, no expression of the haematopoietic lineage markers CD34 and CD45 was observed. Induction of ASC with adipogenic medium resulted in a significant fraction of the cells containing multiple intracellular lipid-filled droplets stained by Oil-Red O solution (Figure 2).

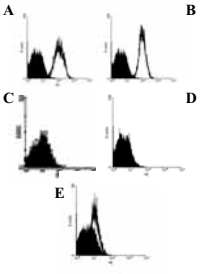


Figure 1. *Surface antigens of ASCs detected by flow cytometry. Human ASCs were positive for CD90 (A), CD73 (B), and CD71 (E), and negative for CD45 (C) and CD34 (D).*

Figure 2. *Oil-Red O staining shows lipid-filled droplets accumulated by ASC upon treatment with adipogenic medium (A). Undifferentiated ASC maintained in control medium were stained as a negative control (B).*

Cell viability following transfection was assessed to evaluate whether transferrin and plain complexes at various lipid/DNA charge ratios (+/-) were toxic to ASC. The Alamar blue assay showed a viability higher than 80% for DOTAP lipoplexes, while transfection with PEI and PAMAM polyplexes reduced the percentage of viable cells to 60%. The cytotoxicity of cationic polymers is thought to be a result of permeabilization effects of positive charges to cellular membranes (7). The relative cytotoxicity of complexes was also assessed by the total amount of extractable cellular proteins in the cell lysate per well, and confirmed the results with the Alamar blue assay (data not shown).
Gene expression measurements after our preliminary *in vitro* transfection assays suggest that transferrin promotes cellular entry of the PEI complexes into the ASC, although levels achieved are very low (less than 1 ng of luciferase per mg of protein). PEI polyplexes conjugated with 30 µg of transferrin gave higher levels of transfection than plain polyplexes. Characterization of the complexes used for transfection in terms of particle size and zeta potential showed that Tf-complexes were bigger than plain-complexes, and the presence of transferrin also seemed to turn liposomes and PEI/DNA complexes into less positively-charged particles. These results are consistent with previous reports about PEI/Tf conjugates (7). Further experiments are in progress to confirm these results in a reproducible manner, and to establish the optimal conditions for transfection of ASC.

Conclusion

In summary, human processed lipoaspirates yield a population of adult mesenchymal stem cells, which can be homogeneously characterized by their cell surface markers expression patterns and differentiation potential. This population is an ideal candidate for stem

cell based gene therapy, and PEI/Tf conjugated polyplexes appear to be non-cytotoxic efficient gene carriers for ASC *in vitro* transfection. However, further investigations are needed to improve the transfection activity and its reproducibility.

References

(1) Zuk PA *et al. Mol Biol Cell* **13**: 4279-95, 2002.
(2) García-Olmo D *et al. Int J Colorectal Dis,* **18:** 451-4, 2003.
(3) Madsen L *et al. Biochem J*, **375:** 539-49, 2003.
(4) Tros de Ilarduya C *et al. Biochim Biophys Acta* **1561:** 209-21, 2002.
(5) Ahn HH *et al. Biomaterials*, **29:** 2415-22, 2008.
(6) Zuk PA *et al. Tissue Eng*, **7:** 211-28, 2001.
(7) Lee KM *et al. Arch Pharm Res*, **28:** 722-9, 2005.

Acknowledgments

This work was financially supported by a grant from the Government of Navarra (Department of Education), from University of Navarra Foundation (FUN), Royal Foundation "Victoria Eugenia", Baxter BioScience Spain and from Spanish Society of Thrombosis and Hemostasis.

LIBERACIÓN *IN VITRO* DE CICLOSPORINA A DESDE NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA FORMULADAS CON DIFERENTES DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS

M. Pecchio, J.M. Irache, M.J. Renedo, M.C. Dios-Viéitez
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra. Pamplona. España.

Introducción

La ciclosporina A (CsA) ha sido extensamente utilizada para la profilaxis y el tratamiento del rechazo en la mayoría de los tipos de transplante de órganos. También es un fármaco efectivo en el tratamiento de varios trastornos autoinmunes [1]. La absorción de la CsA en el tracto gastrointestinal es muy variable. La estructura cíclica rígida y el alto peso molecular confieren a este fármaco baja permeabilidad a todas las barreras biológicas [2, 3]. La formulación del fármaco en nanopartículas ha recibido mucha atención en los últimos años debido a su potencial de mejorar la biodisponibiliad y mantener una liberación controlada. En este contexto, hemos desarrollado distintas formulaciones de nanopartículas de poli-metil-vinil-éter-co-anhídrido maleico (PVM/MA) cargadas con CsA con el fin de evaluar su capacidad como transportadores por vía oral.

Materiales y Métodos

Preparación y optimización de las nanopartículas

Las nanopartículas de PVM/MA se han preparado mediante desolvatación del polímero. Para mejorar la eficacia de encapsulación de la CsA se ha añadido hidroxipropil-α- o hidroxipropil-β ciclodextrina (HPαCD o HPβCD). Tras evaporar los disolventes orgánicos, las nanopartículas obtenidas se purifican mediante dos ciclos de centrifugación (17000 rpm, 20 min). Finalmente, el agua se elimina mediante liofilización.

Con este procedimiento se han obtenido las siguientes formulaciones: *Formulación A* (nanopartículas de PVM/MA con CsA y HPαCD) y *Formulación B* (nanopartículas de PVM/MA con CsA y HPβCD).

Para optimizarlas únicamente se ha variado la cantidad de fármaco utilizada, permaneciendo constantes las cantidades de PVM/MA, de HPαCD o de HPβCD.

Caracterización de las nanopartículas

Tamaño y Potencial Zeta: Se han determinado por espectroscopia de correlación fotónica (PSC) utilizando un sistema de análisis Zetasizer Nano.

Eficacia de encapsulación de CsA (% EE): Ha sido determinada por HPLC-UV.

Liberación *in vitro* de CsA desde las nanopartículas

*Medios: Gástrico Simulado pH=1,7 (GS), Intestinal Simulado pH=6, 8 (IS) y PBS pH=7,5.*Para estudiar la liberación *in vitro* se añaden 2,5 mg en el caso de la formulación A o 1,5 mg en el caso de la B a 15 mL del medio seleccionado. La muestra se incuba a 37 ° C en un baño con agitación. A tiempos prefijados, la muestra se centrifuga (20 min a 17,000 rpm) y se determina la CsA liberada por HPLC-UV utilizando un método totalmente validado.

Resultados y Discusión

El tamaño de las nanopartículas oscila entre 100 y 130 nm y los valores de polidispersión fueron inferiores a 0,3 lo que indica homogeneidad en el tamaño de las partículas. La carga superficial oscila entre -36 y -60 mV (Tabla 1).

Tabla 1. *Tamaño, polidispersión y carga superficial de las nanopartículas de PVM/MA cargadas con CsA.*

Formulación	CsA (mg)	Tamaño (nm)	Polidis-persión	Potencial Zeta (mV)
A	0,0	119,9 (±0,46)	0,070 (±0,30)	-49,9 (1,60)
	2,5	126,8 (±27,57)	0,105 (±0,004)	-56,3 (±10,2)
	5,0	110,8 (±9,15)	0,088 (±0,02)	-55,7 (±6,39)
	7,5	120,5 (±14,44)	0,101 (±0,41)	-50,1 (±8,13)
	10,0	103,4 (±11,53)	0,093 (±0,01)	-48,3 (±10,60)
	12,5	115,9 (±8,51)	0,096 (±0,02)	-60,8 (±13,00)
	15,0	101,2 (±6,75)	0,205 (±0,28)	-43,3 (±11,50)
B	0,0	141,8 (±0,97)	0,0820 (±0,01)	-68,9 (±3,00)
	2,5	123,9 (±19,94)	0,0847 (±0,01)	-42,8 (±5,26)
	5,0	115,2 (±3,77)	0,0680 (±0,01)	-45,8 (±10,68)
	7,5	109,6 (±5,88)	0,0680 (±0,01)	-52,5 (±2,44)
	10,0	119,1 (±1,75)	0,0520 (±0,02)	-45,1 (±1,78)
	12,5	126,8 (±5,79)	0,0570 (±0,02)	-36,7 (±5,29)
	15,0	108,4 (±5,59)	0,0940 (±0,04)	-39,1 (±7,15)

Formulación A: Nanopartículas de PVM/MA con hidroxipropil-α-ciclodextrina y ciclosporina A. **Formulación B**: Nanopartículas de PVM/MA con hidroxipropil-β-ciclodextrina, y ciclosporina A. Los datos muestran la media ± SD (n=3)

El % E.E. oscila entre el 20 % y 82 %, mientras que la cantidad de CsA asociada al polímero, expresada en µg de CsA/ mg polímero varía entre 14 y 87 (Tabla 2). La recuperación del polímero (rendimiento) es igual o superior al 65 %.

Tabla 2. *Cantidad de CsA asociada al polímero, % E.E y % de rendimiento.*

Formulación	CsA (mg)	µg/mg de PVM/MA	%E.E	% Rendimiento
A	2,5	14,60 (±1,14)	47,30 (±4,19)	81,3 (±13,1)
	5,0	25,75 (±2,48)	45,23 (±5,21)	87,7 (±1,7)
	7,5	38,53 (±4,61)	43,48 (±3,68)	85,0 (±3,5)
	10,0	31,59 (±6,64)	25,63 (±5,76)	80,9 (±1,6)
	12,5	42,64 (±2,99)	28,71 (±2,342)	84,1 (±1,3)
	15,0	39,10 (±3,41)	20,11 (±1,93)	77,1 (±0,9)
B	2,5	20,9 (±2,18)	82,0 (±7,59)	83,0 (±6,85)
	5,0	22,26 (±2,71)	35,76 (±4,87)	80,2 (±2,2)
	7,5	34,51 (±2,74)	38,41 (±2,84)	83,6 (±4,0)
	10,0	36,30 (±6,15)	26,43 (±4,41)	72,8 (±1,1)
	12,5	86,18 (±15,70)	47,98 (± 8,95)	69,5 (±0,8)
	15,0	65,19 (±8,33)	28,54 (±6,01)	65,0 (±6,3)

Formulación A: Nanopartículas de PVM/MA con hidroxipropil-α-ciclodextrina y ciclosporina A. **Formulación B**: Nanopartículas de PVM/MA con hidroxipropil-β-ciclodextrina, y ciclosporina A. Los datos muestran la media ± SD (n=3)

Durante la optimización de las dos formulaciones se observaron fenómenos de precipitación cuando la cantidad de CsA era igual o superior a 15,0 mg.

A vista de los resultados obtenidos tras la optimización, se observó que para la formulación A las nanopartículas preparadas con 7,5 mg eran las que presentaban las propiedades más interesantes, y en el caso de la formulación B eran las que contenían 12,5 mg de fármaco (Tablas 1 y 2, y Figura 1). Por ello, se estudió la liberación del fármaco desde las mismas en medios GS e IS, así como en PBS.

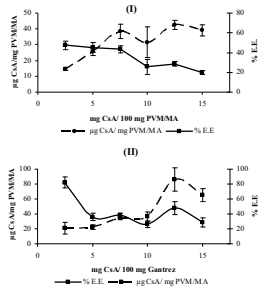


Figura 1. *Influencia de la relación CsA/ PVM/MA sobre la cantidad de CsA asociada al polímero (µg CsA/ mg PVM/MA) y la eficacia de encapsulación (% E.E). Las barras de error representan las desviaciones estándar en base a determinaciones realizadas por triplicado.* ***(I)*** *Formulación A* ***(II)*** *Formulación B.*

En medio PBS pH=7,5 (figura 2), la liberación del fármaco es continua en el tiempo desde las dos formulaciones. Después de 15 min se libera aproximadamente el 38 % y el 30 % de CsA desde las formulaciones A y B, respectivamente. Tras 8 h estos porcentajes son cercanos al 41 % y al 30%.

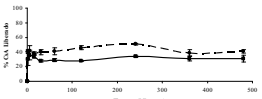


Figura 2*. Perfiles de liberación in vitro de ciclosporina A desde las formulaciones A (--●--) y B (--■--) en medio PBS pH= 7,5 a 37° C. Los distintos valores representan la media ± SD (n=3).*

Por otra parte, las formulaciones A y B liberan en medio GS (figura 3) entre un 38 % y 30 % en los primeros 5 min y a las 4 h el porcentaje oscila entre un 54 y 34 %, respectivamente.

Finalmente, en lo que hace referencia al medio IS (figura 4), las formulaciones A y B liberan, respectivamente, en los primeros 5 min alrededor del 34 % y del 24 % del fármaco. Después de 4 h de incubación estos porcentajes son aproximadamente del 54 % y 24 %.

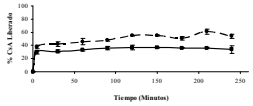


Figura 3. *Perfiles de liberación in vitro de CsA desde las formulaciones A (--●--) y B (--■--) en medio GS pH= 1,7 a 37° C. Los distintos valores representan la media ± SD (n=3).*

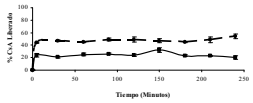


Figura 4. *Perfiles de liberación in vitro de CsA desde las formulaciones A (--●--) y B (--■--) en medio IS pH= 6,8 a 37° C. Los distintos valores representan la media ± SD (n=3).*

Conclusiones

Al incluir hidropropil-β-ciclodextrina en el proceso de preparación de nanopartículas de PVM/MA con CsA, la cantidad de fármaco asociada al polímero se incrementa de forma notable en comparación con lo que ocurre al utilizar hidroxipropil-α-ciclodextrina. También aumenta la eficacia de encapsulación. En ambas formulaciones, las nanopartículas presentan tamaños y cargas superficiales adecuadas para la administración oral.

El fármaco se libera inicialmente de forma rápida desde las dos formulaciones, posteriormente más lentamente pero siempre de forma continua a lo largo del tiempo.

La formulación que contiene hidroxipropil-β-ciclodextrina libera menos del 30 % del total de la CsA tras 4 h de incubación en los medios GS e IS y tras 8 h de incubación en medio PBS.

Referencias:

[1] J.L. Italia et al. Kumar. Drug Discov. Today, 11 (2006), 846–854.
[2] J.C. Kolars et al. Lancet, 338 (1991), 1488–1490.
[3] M.F. Hebert. Adv. Drug. Deliv. Rev., 27 (1997), 201–214.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por FUNDACIÓN CAJA NAVARRA y M. Pecchio actualmente recibe una beca de SENACYT-IFARHU del GOBIERNO de PANAMA.

ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS BIODEGRADABLES CON NALOXONA PARA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL: SELECCIÓN DEL POLÍMERO

L. Bautista Chávez, C. Martín Sabroso, J.I. Espada García, M.E. Gil Alegre, A.I. Torres Suárez.
Dpto.Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense Madrid

Introducción

Naloxona es un antagonista opiáceo útil en la deshabituación de drogodependientes, ya que permite un bloqueo farmacológico efectivo ante una nueva dosis de heroína. Su corta semivida plasmática (1-2 horas) y su baja biodisponibilidad oral (6,67%) aconsejan su inclusión en un sistema de liberación controlada de administración por vía parenteral. Se plantea la elaboración de microparticulas (MP) con naloxona que tras su administración por vía subcutánea sean capaces de liberar fármaco durante una semana. Para ello es necesario contar con un material integrante de la MP que sea capaz de controlar la liberación del fármaco. Existe una gran variedad de materiales transportadores con distintas características (peso molecular, grado de cristalinidad...), pero no siempre son válidos para obtener MP. Por tanto, la adecuada selección de este material controlador es de gran importancia.

Materiales y Métodos

En el presente trabajo, dada la vía de administración de las MP, se emplea material controlador de la liberación de Naloxona biocompatible y biodegradable. Se parte de polímeros con ambas características, obtenidos del ácido láctico (PLA), ácido glicólico y de caprolactona (PCL), y de sus copolímeros. La Tabla 1 recoge los polímeros empleados y sus características. Todas las MP se elaboran a partir de la misma cantidad de polímero y por el mismo método de microencapsulación (1). Se recurre a la técnica de doble emulsión (A/O/A) evaporación del solvente dada la elevada hidrosolubilidad de Naloxona.HCl.

Tabla 1. Polímeros empleados.

Polímeros	V.i. (dL/g)	Tfusión (ºC)	Tg (ºC)
Poly (DL-Láctico)	1,3-1,7	Amorfo	
Poly (DL-Láctico)	0,55-0,75	Amorfo	50-60
P-ε-Caprolactona (PCL)	1,00-1,30	58-63	-60
50:50 (DL-PLGA)	0,16-0,24	Amorfo	42-46
50:50 (DL-PLGA)	0,45-0,60	Amorfo	46-50
75:25 (DL-PLGA	0,71-1,00	Amorfo	49-55
80:20 (DL-PLCL)	0,77	Amorfo	17-23

Se realiza una primera selección en función de la compatibilidad entre el polímero y naloxona

(DSC). Con los preseleccionados, se elaboran MP. Se selecciona aquel que mejores características proporcione a las MP en cuanto a tamaño, capacidad de transporte y control de la liberación de Naloxona (2) **(**Figura 1).

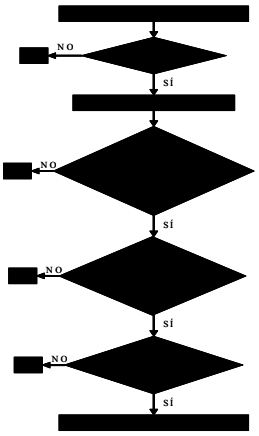


Figura 1. Árbol de decisión para la selección del polímero en las MP de Naloxona

Para ayudar en la interpretación del proceso de cesión in vitro del fármaco, se determina el estado físico de Naloxona en las MP (DSC) y se realizan fotos a las MP tras el ensayo de cesión (SEM). Por último, se realiza un estudio de solubilidad de Naloxona en cada polímero para evaluar su capacidad de transporte, analizando mezclas físicas con proporciones crecientes de fármaco por DSC (3). Si existe una relación entre la proporción de Naloxona en la mezcla y el valor de entalpía de fusión, se extrapola al

valor de entalpía cero (ordenada en el origen), es decir, a la proporción en la que el fármaco está disuelto en el polímero.

Resultados y Discusión

Todos los polímeros ensayados resultaron ser compatibles con Naloxona. Se procedió a la elaboración de MP con todos ellos. El diámetro de las MP estuvo comprendido entre 20 y 70 µm, según el polímero empleado. Por tanto, todas las MP presentaron un tamaño adecuado para su administración parenteral mediante inyección subcutánea. En la Figura 2 se muestran fotos (SEM) de algunas de las MP.

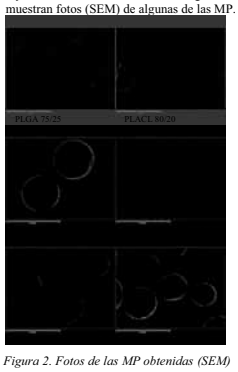


Figura 2. Fotos de las MP obtenidas (SEM)

La Figura 3 muestra la cantidad de Naloxona encapsulada según el polímero empleado.

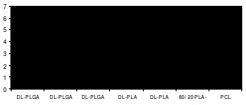


Figura 3. Cantidad de Naloxona en las MP.

Se calcula para cada polímero, la cantidad de MP que contiene una dosis semanal de Naloxona. Solo con 3 polímeros de los 7 estudiados se consigue que esta cantidad de MP se pueda suspender en 2 mL: PLGA 50/50 (los dos estudiados) y DL-PLA de menor viscosidad inherente. Con las MP de estos 3 polímeros se lleva a cabo el ensayo de cesión. Se consigue una liberación de Naloxona durante una semana, pero con diferente velocidad de liberación (Figura 4). El mecanismo de liberación es principalmente difusión según el aspecto de las MP después del ensayo de cesión (Figura 5).

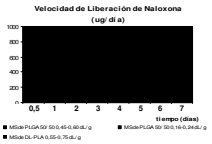


Figura 4. Cesión "in vitro" de Naloxona.

Figura 5. MP tras el ensayo de cesion "in Vitro".

Se analizaron las MP por DSC y no se detectó presencia de Naloxona al estado sólido. Se observó que los polímeros en los que la solubilidad de Naloxona es mayor, proporcionaron MP con mayor carga de fármaco. La Figura 6 muestra los resultados de solubilidad de Naloxona en 3 polímeros.

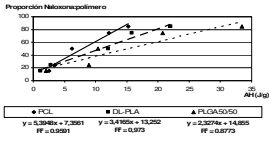


Figura 6. Solubilidad de Naloxona en polímeros.

Bibliografía

(1) Bautista L.y col. En: *Libro Actas II Congreso Nacional Investigación Alumnos Pregrado Ciencias Salud*. Madrid, Abril 2008.
(2) Lareo M, Torres A.I., Gil M.E.. *J. Sep. Sci.,* **28**: 16, 2086-2088, 2005.
(3) Theeuwes F, Hussain A, Higuchi T. *J Pharm Sci*., **63**:3, 427-9, 1974.

Agradecimientos

IV Plan Regional de Investigación. CCG07-UCM/BIO-2824. Grupo de investigación UCM-CM. 910939 Administración parenteral de medicamentos.

IMPROVEMENT OF GENE TRANFER TO TUMORAL CELLS BY TRANSFERRIN DENDRIPLEXES

G. Navarro[1], C. Tros de Ilarduya[1], M.Ogris[2], E.Wagner[2]
[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Navarra, Pamplona, Spain;
[2]Pharmaceutical Biology-Biotechnology, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

Introduction

The major drawbacks of nonviral vectors are the lack of cell specificity and their limited ability to transfect cells. Coupling of cell-binding ligands such as transferrin (Tf) to polycations can be a relevant strategy to overcome these barriers (1). Transferrin receptor is expressed on the surface of cerebral endothelial cells, hepatocytes and highly proliferating cells such as erythroblasts and tumor cells. The inclusion of transferrin into polyplexes enhances their specificity towards target sites (e.g. tumor, brain, liver) and at the same time shields their positive charge surface, leading to an inhibition of unspecific interactions after systemic application (2,3). In our experiments, we used a gene delivery system consisting of PAMAM dendrimers and plasmid DNA that mediates efficient transgene expression in Neuro 2A tumors after intravenous administration (G.N. et al, manuscript in preparation). In this study, we go a step beyond and present preliminary biophysical and transfection studies carried out with PAMAM/Tf-PAMAM complexes in order to investigate whether high tumor expression obtained with plain dendriplexes can be reinforced by the incorporation of transferrin.

Materials and Methods

Transferrin-PAMAM conjugate synthesis was performed similarly as previously described (2). In all experiments, generation 5 of PAMAM dendrimer (G5) was partially replaced by Tf-G5 conjugates (molar ratio Tf/G5 = 1/1) and condensed with plasmid DNA at different charge ratios. The degree of replacement is represented as percentage, (e.g. 25% means 1 part of Tf-G5 plus 3 parts of G5).

Dendriplexes sizes and zeta-potentials were measured by laser difractometry in a Zetasizer-nanoparticle analyzer.

In vitro transfection efficiency was determined on neuroblastoma Neuro2A and erythroid leukemic K562 cells. Luciferase activity and protein content were measured. Cell viability was determined by MTT assay.

Results and Discussion

Gene transfer efficiency on Neuro2A cells was studied as a function of G5/DNA charge ratio (+/-), and increasing amounts of G5 were replaced by Tf-G5 in the complex.

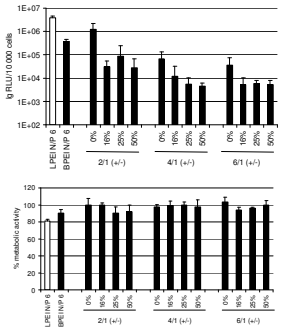


Figure 1. Transfection efficiency of G5/Tf-G5 complexes and metabolic activity in Neuro2A.

As shown in Figure 1, plain complexes or their mixtures with Tf-conjugates turn out to be nontoxic. However, no improvement by using transferrin was observed. It might be that, for Neuro2A cells, adsorptive endocytosis by electrostatic interactions of charged complexes with cell membrane heparane sulfates is masking transferrin mediated gene transfer. Therefore, we selected erythroid leukemic K562 cells for further experiments. These cells are known to express elevated numbers of transferrin receptors (4). Gene transfer efficiency on K562 cells was studied as a function of G5/DNA charge ratio and increasing amounts of G5 in the complex were replaced by Tf-G5 conjugate. As shown in Figure 2, both factors have an influence on transfection efficiency. On the one hand, complexes containing both G5 and Tf-G5 mediated 1.5 to 25-fold higher transfection efficiencies compared to plain dendriplexes depending on the percentage of transferrin used. On the other hand, low charge ratios near

electroneutrality resulted in an enhanced transfection.

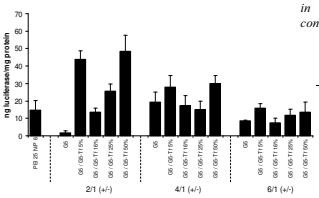


Figure 2. Transfection efficiency G5/Tf-G5 complexes on K562 cells.

Differences between formulation perfor-mances cannot be explained by the effect of particle size on transfection rate. The incorporation of transferrin within the dendriplexes did not significantly affect their size, around 100 nm in most cases, whereas the positive surface charge of complexes was shielded by transferrin even at low concentrations (Table 1). No signs of aggregation were observed since the polydispersion index (PDI) was ≤ 0.3.

To demonstrate whether the uptake of G5/Tf-G5 complexes is facilitated via interaction with the transferrin receptor, a competitive inhibition experiment was performed using 2/1 (+/-) charge ratio complexes. As shown in Figure 3, the increase of transfection mediated by G5/Tf-G5 complexes could be largely blocked by the addition of free transferrin to the medium, thus demonstrating that Tf-complexes mediated ligand-dependent gene transfer.

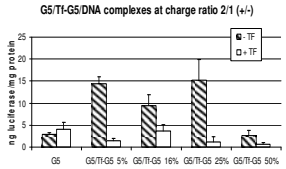


Figure 3. Competitive inhibition with free transferrin. G5/Tf-G5/DNA complexes at charge ratio 2/1 (+/-) were added to K562 cells in the presence or absence of free transferrin (5mg/mL).

Table 1. Biophysical properties of G5/Tf-G5/ pDNA complexes. All complexes were prepared in HBG (pH 7.4) and the final DNA concentration was 10μg/mL.

	Polyplexes	Size (nm) (PDI)	Zeta potential (mV)
Charge ratio 2/1	PAMAM G5	113 +/- 15 (0.16)	26.2 +/- 2.7
	G5/ Tf-G5 (5%)	193 +/- 0.5 (0.17)	9+/- 2
	G5/ Tf-G5 (16%)	148 +/- 6 (0.25)	9.6 +/- 7.4
	G5/ Tf-G5 (25%)	108 +/- 17 (0.22)	1.8 +/- 1
	G5/ Tf-G5 (50%)	100 +/- 6 (0.17)	1 +/- 0.1
Charge ratio 4/1	PAMAM G5	98 +/- 11 (0.21)	24 +/- 2.3
	G5/ Tf-G5 (5%)	113 +/- 12 (0.19)	6.14 +/-1
	G5/ Tf-G5 (16%)	118 +/- 14 (0.25)	5.4 +/- 1.5
	G5/ Tf-G5 (25%)	110 +/- 5 (0.23)	2.9 +/- 0.9
	G5/ Tf-G5 (50%)	93 +/- 6 (0.21)	1.7 +/- 0.45
Charge ratio 6/1	PAMAM G5	98 +/- 5 (0.3)	29.5 +/- 4.4
	G5/ Tf-G5 (5%)	130 +/- 11 (0.28)	3.1 +/- 1
	G5/ Tf-G5 (16%)	89 +/- 14 (0.19)	5.9 +/- 0.3
	G5/ Tf-G5 (25%)	104 +/- 8 (0.24)	4.6 +/- 1.3
	G5/ Tf-G5 (50%)	98 +/- 11 (0.23)	3 +/- 1.2

References

(1) Merdan, T. *et al.*, *Adv.Drug Del. Rev.*, **54:** 715-58, 2002
(2) Kircheis, R. *et al.*, *Gene Therapy*, **8:** 28-40, 2001
(3) Huang, R.Q. *et al.*, *FASEB J.*, **21(4):**1117-25, 2007
(4) Cotten, M.*et al., Proc. Nat.l Acad.Sci. USA,* **87:** 4033-37, 1990

NORTRIPTYLINE STRATUM CORNEUM PENETRATION PROFILE FROM HPMC PATCHES

A. Melero[1,2], T.M. Garrigues[1], M. Alós[1], A. Martín-Villodre[1], U.F. Schaefer[2], C.M. Lehr[2].
[1] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy. University of Valencia, Spain.
[2] Institute of Biopharmacy and Pharmaceutical Technology. University of Saarland. Germany.

Introduction

Nortriptyline hydrochloride (NTH) is a tricyclic antidepressant drug which has shown to be as effective as bupropion in the support therapy for smoking cessation [1]. Five patches containing the drug have been tested to see the effects of the vehicle in the drug distribution. The influence of different incubation times (3h and 6h) have been evaluated on the penetration profiles of NTH within the *stratum corneum* (SC).

Experimental methods

Preparation of the patches

Five different patches were prepared. Their composition is presented in Table 1. Formulation of the patches is summarized in Figure 1.

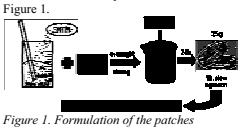


Figure 1. Formulation of the patches

Table 1. Composition of the patches

(%)	Film A	Film B	Film C	Film D	Film E
NTH	2	2	4	4	4
EtOH	30	30	30	30	30
PG	30	30	30	30	30
OA	1	1	1	1	-
PS80	-	1	-	1	1
HPMC	2	2	2	2	2
H_2O	35	34	33	32	33

In vitro tape-stripping study

The penetration profile of NHT from the patches within the *stratum corneum* has been evaluated in vitro by means of the so called Saarbrücken (SB) model. It consists of incubation and a tape-stripping. For the incubation, a 15 mm diameter piece of skin is put on a filter paper soaked with Ringer solution on a teflon bloc. The formulation is placed on the top of the skin and a teflon punch is fixed over the formulation. The punch has a cavity of 2 mm depth where the formulation remains. The two parts of the device are sealed with Plastibase® to avoid water loss from the skin.

The whole apparatus is temperated at 32°C in an oven

After the incubation time, the Plastibase® is removed with paper and the incubation device is opened. The formulation is completely removed from the skin with the aid of a cotton ball. The skin is then transferred over a filter paper soaked with Ringer solution to an aluminium bloc, where it is fixed with nails. The skin is covered with a Teflon mask with a 1 cm of diameter hole. The uncovered area will be the stripping area. The block is then placed under a Teflon punch. 20 strips are prepared. Each strip will be fixed over the skin and pressured with a 2 kg weight placed over the punch for 10 seconds. It is a critical step of the technique to assure the same contact time and pressure for every strip. The strip is then removed and collected in scintillation vials following the sequence: S1, S2, S3, S4, S5, S6-10, S11-15, S16-20. The removal speed should also be constant. The strips are then extracted with ClH 1% solution, and analyzed for NTH content [2].

Measurement of the SC Thickness

SC thickness has been calculated by infrared densitometry using a The SquameScanTM 850A device. The SquameScan device is equipped with a diode emitting light with a wavelength of 850 nm, i.e. in the infrared range. Each tape can be measured by the reduction in light intensity, which is linearly related to the stratum corneum density on the tape and is expressed in terms of percentage transmission (%T). The corresponding calibration curve can be used for an indirect evaluation of proteins on tapes. Tape-stripping in-vivo studies showed a highly significant correlation between %T and the protein content per strip.

Evaluation of changes in the SC after incubation with the patches by CLSM

Skin samples of the same female have been incubated for 3h, 6h and 24h with patches A to E. After the incubation time, the formulation was removed and skin cuts were prepared and evaluated by Confocal Laser Scanning microscopy (CLSM).

Results and discussion

In Figures 2 and 3, the amounts of NTH per pool of samples are represented for the five patches under the incubation times.

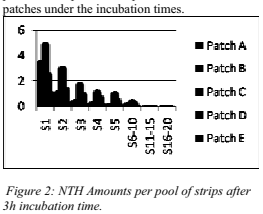


Figure 2: NTH Amounts per pool of strips after 3h incubation time.

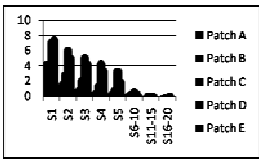


Figure 3: NTH Amounts per pool of strips after 6h incubation time.

It can be seen that the amount of drug decreases when the SC thickness increases, under every incubation-time, as it is the common tendency observed in the literature [3, 4]. The amount of drug permeated increases for all formulations when increasing the incubation time, as it was expected.

Comparing the different vehicles after 3h and 6h, patch C provides highest amount of NTH in the *Stratum Corneum*. These results are not in accordance with previously reported results [2] as FDC experiments estimated more efficiency for patch D than for patch C. This could be explained in light to the contact time. Therefore, further studies with 24h incubation time are needed.

Concerning the other patches, the enhancing effect of OA is patent again. Patch E, having the double amount of NTH but no OA provides a worse penetration of drug than patches A and B.

The influence of the increase of drug concentration of the patches in NTH penetration though the SC can also be seen in these experiments by comparison of patches A with C and B with D.

The evaluation of the changes in the stratum corneum by means of CLSM after incubation with patch D is presented in Figure 4.

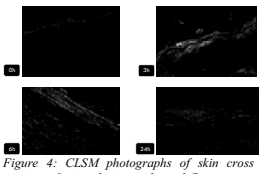


Figure 4: CLSM photographs of skin cross sections after incubation with patch D

These photographs revealed a time-dependent increase of the water content in the corneocytes, because their size increased considerably.

Conclusions

NTH penetration and distribution within the SC is strongly influenced by the vehicle and incubation time. The tape-stripping technique allows the evaluation of differences in rate and amount of drug penetrated. There is a time-dependent increase of the hydration of the SC after incubation. Patch D can be considered as a good candidate for transdermal delivery of NTH and is worth to proceed with further in vivo studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank the DAAD grant for A. Melero, the Galenos Network-Marie Curie-Fellowship agreement in the framework of the EU Project "Towards a European PhD in Advanced Drug Delivery" MEST-CT-2004-504992 and the project FIS Instituto de Salud San Carlos III FI 060944 (953/2006)

References

(1) Hughes, J.R., Mechanism of action of a decision aid for smoking cessation treatment. Addiction, 2006. **101(9):** 1362; author reply 1362-3.
(2) Melero A, Garrigues TM, Almudever P, Martín-Villodre A, Lerh CM, Schäfer U. Nortriptyline Hydrochloride Permeation through Human Skin: Influence of pH and Penetration Enhancers. Development of a nortriptyline-TDS.
Eur. J. Pharm Biopharm, **69**: 588–596, 2008.
(3) Lademann J., Richter H., Teichmanna A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiß B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles
Eur. J. Pharm Biopharm, **66**: 159-164, 2007.
(4) Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing
Eur. J. Pharm Biopharm, **55**: 57-65, 2003.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE RASAGILINA MESILATO PARA EL TRATAMIENTO DEL PARKINSON

M. Fernández[1,2], S. Negro[1], A. Fernández[1] y E. Barcia[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.
[2]Departamento de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer (1). Se trata de una patología crónica que, de momento, no tiene cura, por lo que el objetivo del tratamiento es reducir su progresión, así como controlar los síntomas y efectos secundarios de los fármacos que se usan para tratarla (2).

La rasagilina inhibe irreversiblemente la MAO-B y no origina metabolitos tóxicos, en comparación con otros IMAO como la selegilina (3). La rasagilina y su metabolito mayoritario, 1-R-aminoindano poseen propiedades neuroprotectoras, lo que hace que sean hoy considerados como potencialmente muy útiles en el tratamiento no solo de la EP sino de otros procesos neurodegenerativos asociados al envejecimiento (4).

Las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas de la rasagilina junto con el hecho de que se utilice en un tratamiento crónico y de que no exista ningún sistema de liberación controlada del mismo, hace que este compuesto sea un candidato idóneo para el desarrollo de dicho tipo de sistemas.

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una nueva formulación para el tratamiento de la EP, consistente en microesferas biodegradables de rasagilina mesilato.

Materiales y Métodos

Las microesferas fueron preparadas utilizando PLGA 50:50 (Resomer-502®, Boehringer Ingelheim) mediante la técnica de extracción y evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A o de una emulsión A/O/A. Para el desarrollo y optimización de cada método, se modificaron los siguientes parámetros: cantidad de principio activo, cantidad de polímero, volumen de CH_2Cl_2, concentración de PVA y pH de la fase acuosa interna y externa (método A/O/A). Finalmente, se desarrollaron los siguientes métodos:

Método de emulsión O/A

Se dispersaron 40 mg de rasagilina mesilato en una solución de PLGA 502 (400mg) en 1 mL de CH_2Cl_2. La dispersión fue emulsificada en 5 ml de una solución de PVA al 1% p/v utilizando un Polytron® (RECO Kinematica GmbH PT 3000) durante 1 min. a 2.500 rpm. La emulsión O/A resultante fue adicionada a 100 ml de PVA 0,1% p/v y se dejó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Por último, las microesferas fueron lavadas y liofilizadas.

Método de emulsión A/O/A

Se preparó una solución acuosa de rasagilina mesilato (15 mg/150 µl de tampón fosfato a pH 3,3) que fue emulsificada en una solución de PLGA 502 (450 mg) en CH_2Cl_2 (1,5 ml) con una sonda de ultrasonidos (Heat Systems, Ultrasonics Inc) durante 30 segundos. La emulsión resultante (A/O) fue incorporada en 800 ml de una solución de PVA (0,25% p/v) y NaCl 0,5 N, alcalinizada con NaOH 1N a pH 10, utilizando para ello un Polytron® (Kinematica GmbH PT 300) durante 20 segundos a 6.500 rpm, obteniéndose una emulsión A/O/A. Dicha emulsión se dejó en agitación durante 3,5 horas a temperatura ambiente. A continuación las microesferas fueron lavadas y secadas en un desecador al vacío.

Eficacia de encapsulación: Se disolvieron 30 mg de microesferas en 5 ml de CH_2Cl_2. El fármaco fue extraído tres veces desde la fase orgánica con 5 ml de PBS (pH 7,4). A continuación las muestras se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min. Procediéndose a retirar el sobrenadante. El volumen total de muestra (15 ml) se completó a 20 ml con PBS (pH 7,4). Las muestras se filtraron (0,45 µm) y se procedió a la determinación del principio activo por HPLC a 290 nm.

Estudio de cesión: Se dispersaron 20 mg de microesferas en 3 ml de PBS (pH 7,4). Las muestras se mantuvieron a 37ºC bajo agitación constante, tomándose muestras a diferentes tiempos que fueron cuantificadas por HPLC.

Estudio morfológico: El estudio se llevó a cabo mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) (Jeol, JSM-6400), tanto en microesferas cargadas como no cargadas.

Rayos X: Se utilizó un difractómetro automático de polvo (Philips X'Pert MPD), en configuración θ-2θ, en el rango angular 5-50º 2θ, tamaño de paso 0,04º 2θ y tiempos de conteo 1 seg/paso.

CalorÍa diferencial de barrido (DSC): Se utilizó un equipo Mettler Toledo (DSC 820). El estudio se realizó con 6 mg de cada producto, entre -10-250ºC con una velocidad de calentamiento de 10ºC/min.

Resultados y discusión

Los rendimientos más elevados de proceso y de encapsulación se obtuvieron con el método de emulsión A/O/A (tabla 1).

Tabla 1. Rendimientos de proceso y encapsulación obtenidos en la preparación de las microesferas.

Emulsión	Rendimiento del proceso (%)	Eficacia de encapsulación (%)
O/A	50,0 ± 4	32,3 ± 2,4
A/O/A	75,1 ± 2	97,2 ± 2,8

El análisis morfológico por SEM muestra que las microesferas cargadas con rasagilina mesilato presentan superficies irregulares con invaginaciones mientras que las no cargadas son esféricas y con superficie lisa.

Los estudios de cesión muestran una cesión inicial del 26,1±1,8% (1er día), seguida de una liberación constante durante aproximadamente 9 días. A dicho tiempo el porcentaje liberado fue de 69,8±4,4%. A partir de ese tiempo se produce una liberación más lenta hasta el final del proceso (figura 2).

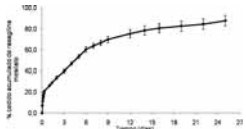


Figura 2. Perfil de cesión de rasagilina mesilato desde microesferas de PLGA.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de rayos X.

Las intensidades máximas en el espectro de rayos X para la rasagilina mesilato se obtuvieron a 10,42º, 20,86º, 24,14º y 27,94º. Cuando se analizó el espectro correspondiente al polímero y microsferas sin cargar no se observó ningún máximo, lo que indica que el polímero se encuentra al estado amorfo y, además, el proceso de encapsulación no modifica sus características. En el perfil correspondiente a las microesferas cargadas con principio activo no se observan de forma tan acusada los máximos de intensidad correspondientes a la rasagilina mesilato.

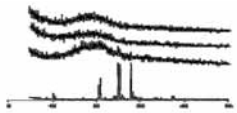


Figura 3. (a) Rasagilina mesilato (b) microesferas de PLGA 502 cargadas con rasagilina mesilato (c) microesferas de PLGA 502 (d) PLGA 502

Finalmente, en el estudio de DSC se observa la aparición del pico de fusión de rasagilina mesilato a 212,8ºC (figura 4a), así como la Tg característica del PLGA 502 a 51,1ºC (figura 4b). En el DSC correspondiente a las microesferas cargadas se observa la Tg característica del PLGA 502 y un pico a 189,8ºC.

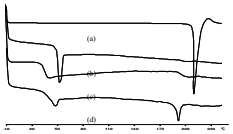


Figura 4. (a) Rasagilina mesilato (b) PLGA 502 (c) microesferas de PLGA 502 (d) microesferas de PLGA 502 cargadas con rasagilina mesilato.

Conclusiones

La técnica de extracción y evaporación del solvente a partir de una emulsión A/O/A ha mostrado resultados adecuados para la microencapsulación de rasagilina mesilato, obteniéndose rendimientos de producción y encapsulación elevados así como un buen control en la liberación del principio activo.

Bibliografía

(1) Bergareche A et al., *J. Neurol*., **251** : 340-345, 2004.
(2) Shastry B, *Neurosci. Res*., **41**: 5-12, 2001.
(3) Bar Am O et al., *Neurosci. Lett.*, **355**: 169-172, 2004.
(4) Youdim M et al., *Cell. Mol. Neurobiol*., **21**: 555-573, 2001.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por un proyecto de investigación Fundación Mutua Madrileña (AP2696/2008). Marcos Fernández agradece el apoyo del Programa Alβan, Programa de Becas de Alto Nivel de la Unión Europea para América Latina, beca Nº E06D103774CL.

PRELIMINARY STUDIES ON DRUG DELIVERY OF LOW TEMPERATURE PLASMA TREATED TEXTILE SUPPORTS

C. Canal[1], J.M.Canal[2], A.Navarro[2], M.J.Garcia-Celma[1]
[1] Department Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona (Spain).
[2] Textile and Paper Engineering Department, Universidad Politécnica de Cataluña, c/Colom 1, 080222 Terrassa (Spain)

Introduction

Medical textiles are one of the most dynamically expanding sectors in the technical textile market. According to the literature, over 1.5mn tons of textile materials, with a value of US$5.4bn, were consumed worldwide in the manufacture of medical and hygiene products in 2000. This is predicted to increase in volume terms by 4.5% per annum to 2010 to reach 2.4mn tons with a value of US$8.2bn (1).

Categories of medical textiles include:

- non-implantable materials,
- implantable materials,
- extracorporeal devices,
- healthcare and hygiene products.

Within these categories an interesting point is to provide the medical textiles with controlled drug release properties, to improve wound healing, in the case of non-implantable materials such as pansements or in the case of implantable materials such as stents.

To improve the hydrophilic properties of the materials to potencially improve wetting with the solutions of active principle or modulating their release properties, they were treated with low temperature plasma (LTP). LTP is a partially ionized gas composed of charged and neutral particles (2-5) which can interact either physically or chemically with the substrate surface to a depth of a few tens of nm (6) due to its high reactivity. LTP has been extensively studied for the surface modification of polymers or textiles, but not for drug delivery purposes. Therefore, the authors have identified a potentially interesting new path for modifying the incorporation and release properties of polymeric textile
materials, which is preliminarily studied in this work.

Materials and Methods

Three different fabrics were selected for their morphological and chemical differences: a polypropylene nonwoven (PP), a cotton woven fabric (CO) and a wool woven (WO) fabric.

Incorporation and drug release properties of the materials befor and after LTP treatment were studied by using ketoprophene as a model drug by the molecular dialysis method reported in (7) and analyzed by spectrophotometry.

LTP treatments were carried out on one side of the fabrics in a corona reactor, at atmospheric pressure and 60W, using ambient air as plasma gas.

Static contact angle on the fabrics was determined with a Krüss DSA100 goniometer.

Results and discussion

The increase in hydrophilicity by very short LTP treatment times (0.35 and 1.05s) of the tree materials studied is reported in Figure 1.

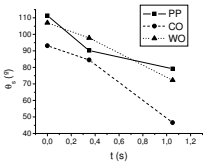


Figure 1. Evolution of static contact angle of the materials with air LTP treatment.

Depending both on their surface chemical properties, the 3D structure of the fabrics, and their specific surface (directly dependant on the fibre diameter), the materials incorporate different percentage of ketoprofen.

Table 1. ketoprofen (% wt) incorporated to the different materials on weight of fabric

	ketoprofen (%wt) incorporated to the fabric		
	PP	CO	WO
Untreated	17.8 ± 2.1	10.65 ± 1.4	5.7 ± 0.4
LTP 0.35s	22.8 ± 6.8	10.01 ± 0.5	7.6 ± 1.2
LTP 1.05s	20.1 ± 0.7	10.81 ± 2.3	6.8 ± 2.5

The comparison of the drug incorporated (Table 1) to the most hydrophobic materials, WO and PP, reveals a higher drug absorption in PP, which can be explained by a higher specific surface of PP due to the presence of a layer of fibres of nanometric diametre on the nonwoven structure. Untreated CO, which is hydrophilic with fibre diameters similar to those of WO, shows intermediate ketoprofen incorporation between the other two materials. Being already an hydrophilic fibre, no drug uptake increase is observed, while in WO and PP plasma treatment tends to improve ketoprofen uptake on the fabric. Two mechanisms may be taken into account; a superficial absorption, which may take place in WO or PP due to their hydrophobic properties, or a diffusion into the fibre in more hydrophilic materials, such as CO.

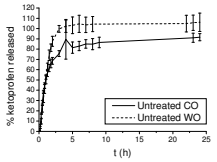


Figure 2. Ketoprofen released from three different untreated (UT) textile supports

The kinetics of ketoprofen release on the untreated materials (Figure 2) reveals significant differences in the ketoprofen released from CO (80% in 24h) and from WO (around 100% in 24h).

LTP treatment previous to drug incorporation produces significant differences in the ketoprofen release with respect to the untreated materials in CO and WO fabrics.

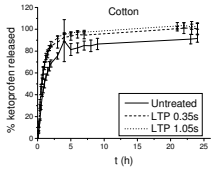


Figure 3. Effect of air LTP treatment on the ketoprofen release of CO fabrics.

The drug release of untreated CO fabrics increases from 80% to 100% after LTP treatment (Figure 3). This can be explained taking into account the etching effect attributed to LTP, which may have eliminated occlusive ceric substances on the surface of CO, therefore favouring the release of the drug.

In the case of WO fabrics (Figure 4), LTP treatment reduces the percentage of ketoprofen released. This could be explained by the presence of the characteristic fatty acids monolayer covalently bound to the protein matrix of wool. This hydrophobic layer may impair penetration of the drug into the fibre in the untreated material, while its elimination may favour the absorption in the bulk of the fibre, therefore difficulting its latter liberation.

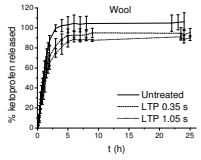


Figure 4. Effect of air LTP treatment on the ketoprofen release of WO fabrics.

No significant differences were found in the drug release properties of the PP fabrics, either untreated or LTP-treated.

Conclusions

The preliminary studies carried out in this work reveal that it is possible to modulate the incorporation and drug release of different fabrics by the use of very short treatment times by LTP. The chemical and morphological properties of the materials are of high relevance in these kind of studies.

References

(1) Rigby D. associates, *Technical Textiles and Industrial Nonwovens: World Market Forecast to 2001 ' http://www.davidrigbyassociates.com*
(2) Grill A., *Cold Plasma in Materials Fabrication, From Fundamentals to Applications*, IEEE Press, New York, 1993.
(3) Johan F. *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.* **51**: 285-295, 1994
(4) Rakowski W. *et al.*, *Melliand Textilberichte - Int. Textile Reports* **11**: 301-308, 1982
(5) Yasuda T. *et al.*, *J. Appl. Polymer Sci.* **38**: 201-214, 1984
(6) Hesse H. *et al.*, *Textile Res. J.* **65** : 335-361, 1995
(7) Calderó G. *et al.*, *Langmuir*, **13**: 385-390, 1997

Acknowledgments

The authors acknowledge the support of Departament d'Educació i Universitats of Generalitat de Catalunya for the post-doc fellowship of CC and to the funding of project CTQ2005-08241-C03-03/PPQ.

BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR VANCOMYCIN QUANTIFICATION AND ITS APPLICATION TO A PHARMACOKINETIC STUDY

Jesús Valle, M.J. de, González López, F., Sánchez Navarro, A.
Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca
Licenciado Méndez Nieto, s/n 37007
e-mail: asn@usal.es

Introduction

Among the methods developed to date for the quantification of vancomycin in biological fluids immunoenzymatic techniques (FPIA(TDx), EMIT and RIA) [1] and chromatographic methods are the most relevant. The former, although widely used in clinical practice for monitoring serum levels owing to their simplicity and speed, do have some drawbacks such as the low precision of the EMIT assay for concentrations higher than 30 mg/L. The latter with greater accuracy and precision and greater sensitivity use complex procedures for sample preparation, including liquid-liquid extraction (LLE) [2] or solid-phase extraction (SPE) [3] except for the case of Luska et al, whose sample treatment is simple but showing a limit of quantification of the order of 1µg/mL which is insufficient in certain cases [4].

The present work reports the setting up and validation of an HPLC method for the quantification of vancomycin concentrations in biological fluids in a rapid, simple way, using a basic HPLC system. The method shows higher sensitivity than other techniques of similar complexity described to date. The application of the method to a pharmacokinetic study of vancomycin in isolated rat lung is also described.

Experimental

Materials and reagents

Vancomycin was provided by Combino Pharm (Barcelona, Spain). HPLC grade acetonitrile was used to prepare the mobile phase and was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained with a MilliQ Millipore system. All other chemical reagents were of analytical grade and were used as received: 60% perchloric acid (Panreac Química SA, Barcelona, Spain), Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) and $NH_4H_2PO_4$ (Sigma Aldrich Química S.A. Madrid, Spain).

Instruments

The Shimadzu HPLC system (SCL-10A x L) comprised a pump (model LC-10AD), a Kontron a variable-wavelength UV detector (Groβ- Zimmern, Germany) and a Kontron column oven. For data processing, a Class VP Data system (Shimadzu, Duisburg, Germany) was used.

Chromatographic conditions and sample preparation

Separation was accomplished using a Nucleosil 120 C_{18} 5 µm column with a length of 15 cm and an inner diameter of 0.4 cm. A mixture of 50 mM $NH_4H_2PO_4$ (pH 4)-acetonitrile (92:8, v/v) as the mobile phase at a flow rate 1 mL/min and a column temperature of 40ºC were selected as the best conditions. Regarding sample treatment, the following procedure proved to be optimum: a mixture of 300 µL of sample with 15µL of 60% perchloric acid was vortexed for 30 s, followed by centrifugation at 10,900 rpm to separate proteins, after which the supernatant was collected. Of this, an aliquot of 100 µL was injected into the chromatographic system.

Validation

Validation was performed following the FDA guidelines for bioanalytical methods [5]. The method was validated as regards its specificity, linearity, accuracy, precision (within- and between-day), sensitivity and stability.

The stability of vancomycin samples analysed was investigated after three consecutive cycles of freezing-thawing.

Results and discussion

With this simple, fast and inexpensive procedure an excellent chromatographic specificity was obtained (figure 1), with no interferences due to the components of the biological samples analysed (perfusion fluid and lung tissue homogenate). The method was checked with respect to 6 blanks of different origins, as recommended by the FDA.

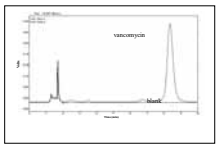


Figure 1. Specificity. Chromatogram showing a blank of a Krebs-Henseleit medium sample and a Krebs-Henseleit medium sample spiked with vancomycin.

Table 1 summarizes the results of the regression analysis

Table 1. Linear regression and statistical analysis

0.1 - 2	70128.30	1411.06	0.9985	2.72E-41	0.0087
2 - 15	16369.28	- 179.18	0.9996	2.86E-49	0.7276
15 - 250	3171.73	- 3985.30	0.9985	5.02E-41	0.1541

Accuracy was determined using standard calibration curves of vancomycin within the ranges of 0.1-2, 2-15 and 15-250 µg/mL for each day. The data on accuracy shown coefficients of variation <7%, a value below the limit accepted by the FDA (15%).

The means ± S.D. of the recoveries were 100.20±3.96; 99.38±1.83; 101.43±3.16 for standard curves 1 (0.1-2 µg/mL), 2 (2-15 µg/mL) and 3 (15-250 µg/mL), respectively. In the 0.1-2 range, accuracy was calculated for concentrations of 0.25, 1.0 and 2.0 µg/mL instead of the lower limit -0.1 µg/mL-, considering this as the quantification limit and hence admitting greater variability in it.

For the 0.1 µg/mL concentration, the results were: mean±S.D.=84.96±4.97; C.V.=5.85; error=15.04%. A slight underestimation can be seen in the results for concentrations close to the limit of quantification, with an error of 15.04%; i.e., lower than that stipulated by the FDA (20% for the limit of quantification.).

The values of the coefficients of variation of the response obtained in the three validation ranges were less than 6% in the studies on repeatability and within-day precision may be seen in tables 3 and 4, respectively.

Table 3. Repeatability (within-day precision)

0.1	7369.40± 348.83	4.73
0.5	37894.20± 2253.64	5.95
2	141437.60±1630.43	1.15
2	32176.40± 692.62	2.15
5	81179.00±2015.32	2.48
15	245165.60±1533.34	0.62
15	46896.00± 531.49	1.13
50	153964.20± 1449.34	0.94
250	791759.60± 24138.54	3.05

Table 4. Reproducibility (between-day precision)

0.1	7479.50± 523.56	7.00
0.5	37439.90± 2483.30	6.63
2	140891.20± 2932.47	2.08
2	31137.20± 1076.36	3.46
5	79853.40± 2722.85	3.41
15	242816.40± 2902.91	1.20
15	48442.10± 1012.33	2.09
50	152963.70± 2592.60	1.69
250	797772.50± 24833.92	3.11

The stability of the drug at three concentration levels (0.25, 5 and 100 µg/ml) during three cycles of freezing-thawing was assessed. The results obtained confirmed the absence of any effect of three thawing and freezing cycles.

The limit of quantification was < 0.1 µg/mL since this concentration can be determined with an error of 15.04% and hence less than the 20% limit permitted by the FDA. The analytical method proposed and validated here was applied in a pharmacokinetic study of the pulmonary distribution of vancomycin in isolated rat lung [6]. This type of study requires the quantification of vancomycin in perfusate samples, whose concentrations decrease rapidly from very high maximum values as well as in lung tissue. The availability of a rapid, simple and inexpensive method of analysis that allows precise and accurate quantification of the drug across a broad range of values facilitates the characterisation of the kinetic profile in all its phases and the mechanisms involved in vancomycin disposition in the pulmonary system.

Conclusions

The proposed analytical methodology in comparison with previously reported methods of similar complexity and equipment requirements, provides a lower quantification limit together with a shorter sample analysis time.

These characteristics are very interesting and helpful for research studies related to drug pharmacokinetics involving a high number of samples within a broad concentration range and tissue levels information.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León for PhD grant (Orden EDU/1490/2003).

References

(1) Yeo KT et al. *Clin. Chem.,* **35**: 1504-1507, 1989
(2) Hu MW et al. *Ther. Drug Monit.*, **12**: 562-569, 1990
(3) Greene SV et al. *J. Chromatogr.* **417**: 121-128, 1987
(4) Luksa J et al. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **667**: 277-281, 1995
(5) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf), 2001.
(6) De Jesús MJ et al. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**: 3771-3774, 2007.

COMPARACIÓN DEL FACTOR RAZA Y GÉNERO EN LA RATA COMO MODELO ANIMAL DE ABSORCIÓN INTESTINAL

Oltra-Noguera D[1], Gonzalez-Alvarez I[2], Gonzalez-Alvarez M[1], Casabo VG[1], Bermejo M[2]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia.
[2]Depto. de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández, Elche.

Introducción: En el modelado de procesos cinéticos, como la absorción, para establecer correlaciones estructura actividad es frecuente combinar y comparar datos obtenidos en la misma especie animal en diferentes laboratorios a fin de incrementar la significación del modelo y su ámbito de aplicación a mayor número de moléculas. No obstante es frecuente observar disparidad en los valores obtenidos para un mismo fármaco en distintos laboratorios a pesar de utilizar técnicas experimentales similares. Este trabajo es parte de un proyecto en el que se pretende caracterizar la variabilidad asociada a los experimentos de perfusión in situ en rata en distintos laboratorios y estimar cuales son los factores principales responsables de la misma y de que modo pueden estandarizarse y/o ponderarse los distintos resultados si se dispone de información sobre el protocolo experimental. Con este fin en este trabajo preliminar se ha caracterizado la permeabilidad intestinal de dos fármacos modelo: Metoprolol y Verapamilo en tres razas de rata utilizando en ambas machos y hembras.

Se seleccionó Metoprolol porque es el patrón utilizado para clasificar los compuestos en alta o baja permeabilidad y Verapamilo como conocido sustrato de glicoproteina-P.

Materiales y Métodos: La determinación de la constante de velocidad de absorción se realizó por un método de perfusión "*in situ*" en intestino completo de rata sin recirculación (1, 2) como se muestra en la figura 1. Se utilizaron animales de peso comprendido entre 220-240 gramos, tras 24 horas de ayuno Las concentraciones de perfusión fueron 100 µM para ambos compuestos: Metoprolol y Verapamilo.

Figura 1. Representación gráfica del método de perfusión in situ sin recirculación

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida HPLC de fase inversa con detección fluorescente para determinar las concentraciones de fármaco en las mismas. Los valores de constante de velocidad de absorción aparente para cada compuesto se determinaron a partir de las concentraciones remanentes en lumen. Las constantes de velocidad de absorción aparentes de primer orden en cada condición se obtuvieron por ajustado de la ecuación monoexponencial a las concentraciones remanentes en lumen a cada tiempo (Ecuación 1).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -k_a \cdot C \qquad \text{Ec. 1}$$

Resultados y Discusión La constante de velocidad de absorción de Metoprolol difiere cuando usamos machos y hembras excepto en la raza Wistar Unilever (Tabla 1 Figura 2).

Tabla 1. Constantes aparente de velocidad de absorción obtenidos tras una perfusión de Metoprolol 100 µM.

METOPROLOL 100 µM	Ka ± DE (h^{-1})	
	MACHO	HEMBRA
W. Han	2.88 ± 0.23	2.54 ± 0.29
W. Unilever	2.58 ± 0.19	2.90 ± 0.47
CD* IGS	3.12 ± 0.73	1.82 ± 0.13

W: Wistar

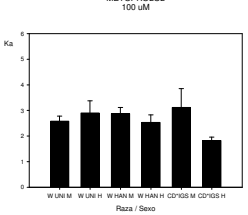


Figura 2. Constantes aparente de velocidad de absorción obtenidos tras una perfusión de Metoprolol 100 µM.

El análisis de varianza de una vía y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (α=0.05) ponen de manifiesto que existen

diferencias significativas entre los valores de velocidad de absorción para las distintas razas e incluso entre macho y hembras dentro de la misma raza (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

METOPROLOL 100 µM		W. UNI.		W. HAN		CD* IGS	
		M	H	M	H	M	H
W. UNI.	M	-	-	-	-	-	-
	H	NS	-	-	-	-	-
W. HAN	M	S	NS	-	-	-	-
	H	NS	NS	S	-	-	-
CD* IGS	M	NS	NS	NS	NS	-	-
	H	S	S	S	S	S	-

En el caso de perfundir Verapamilo a una concentración de 100 µM La constante de velocidad de absorción difiere significativamente cuando se compara el resultado obtenido en machos y hembras para todas las razas estudiadas (Tabla 3. Figura 3).

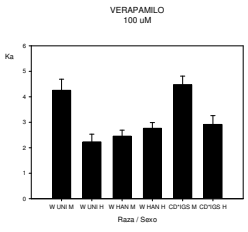


Figura 3. Constante aparente de velocidad de absorción obtenidos tras una perfusión de Verapamilo 100 µM.

Tabla 3. Constante aparente de velocidad de absorción obtenidos tras una perfusión de Verapamilo 100 µM. (W: Wistar)

VERAPAMILO 100 µM	Ka ± DE (h^{-1})	
	MACHO	HEMBRA
W. Han	2.45 ± 0.23	2.76 ± 0.21
W. Unilever	4.25 ± 0.43	2.23 ± 0.30
CD* IGS	4.48 ± 0.33	2.91 ± 0.35

La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (α=0.05) ponen de manifiesto que existen diferencias significativas entre los valores de velocidad de absorción para las distintas razas e incluso entre macho y hembras dentro de la misma raza (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

VERAPAMILO 100 µM		W. UNI.		W. HAN		CD* IGS	
		M	H	M	H	M	H
W. UNI.	M	-	-	-	-	-	-
	H	S	-	-	-	-	-
W. HAN	M	S	NS	-	-	-	-
	H	S	NS	NS	-	-	-
CD* IGS	M	NS	S	S	S	-	-
	H	S	S	S	S	S	-

Conclusión A la vista de los resultados, la variabilidad no es homogénea entre razas ni género. No obstante los resultados de permeabilidad promedia para el compuesto de permeabilidad pasiva, metoprolol, son mas parecidos que los de verapamilo para el que la diferente expresión del portador añade una fuente adicional de variación. En el caso de las dos razas wistar los resultados son similares, incluyendo los obtenidos con hembras que clásicamente se consideraban más variables. Para el verapamilo en cambio ambas razas wistar proporcionan en los machos resultados muy distintos mientras que las hembras de las tres razas ofrecen menos diferencias. Es por ello importante detallar al publicar los resultados la raza particular utilizada y en el caso de compuestos con portadores intestinales sería conveniente utilizar un compuesto patrón que permita corregir para los diferentes niveles en distintas razas y o laboratorios asociados al método de cría-alimentación.

Bibliografía:

1. Doluisio J. T., Billups N. F., Dittert L. W., Sugita E. T., Swintosky J.V. *J Pharm. Sci.,* 58: 1196 (1969).**2.** Martín Villodre et al. J. Pharmacokin. Biopharm, 14, 615(1986).

Agradecimientos: -Ministerio de Educación y Ciencia: SAF2006-2749-E; AE 2007-005 - Consellería de Cultura, Educación y Ciencia y Conselleria de Empresa Universidad y Ciencia, Generalitat Valenciana: ACOMP2007/180; ACOMP2006/156 Comisión Europea: Network of Excellence BIOSIM: LSHB-CT-2004-005137 WP 14 y 15. -Pharsight Corporation por la licencia académica de Winnonlin 5.2.

BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE LEUCINA TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL DE DIETAS DE NUTRICIÓN ENTERAL

S. Miralles Arnau, M. Merino-Sanjuán, A. Nácher, N.V. Jiménez Torres.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universitat de València.
Avda. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot. Valencia

Introducción

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de todas las células del organismo. Un aporte dietético adecuado de proteína es esencial para mantener la integridad y la función celular, y para lograr un buen estado de salud.

La leucina es un aminoácido esencial ramificado, se localiza preferentemente en tejido muscular y condiciona el desarrollo y funcionamiento de la masa muscular. Además es un aminoácido precursor de la glutamina y de la alanina, cuyo requerimiento aumenta en estados críticos de sepsis, heridas, inflamación [1].

La nutrición enteral es el mejor recurso para alimentar o complementar la alimentación de personas con deficiencias o con alguna patología cuando se conserva total o parcialmente la funcionalidad del tracto gastrointestinal.

El objetivo de este trabajo ha sido valorar en ratas normonutridas si el aprovechamiento de la leucina está condicionado por la composición de la mezcla proteica del preparado de nutrición enteral. Para ello, se ha determinado la biodisponibilidad relativa de la leucina tras la administración oral de una dosis única de una formulación problema utilizando como referencia una formulación ampliamente introducida en la práctica asistencial.

Materiales y Métodos

El estudio se ha realizado con dos preparados enterales comercializados por diferentes laboratorios. La mezcla proteica del preparado problema está constituida por caseína, proteína de suero lácteo y proteína de guisante (lote 8861) y la del preparado de referencia por caseína, proteína de suero lácteo y proteína de soja (lote 0279).

Ensayo de digestión in vitro. 25 mL del preparado enteral, acondicionados en un baño de agua a 37ºC bajo agitación, se han sometido a un proceso de digestión in vitro durante un periodo de 4 horas [2]. Este ensayo ha permitido conocer la cantidad de leucina en cada uno de los preparados de estudio. La toma de muestras se ha realizado en tiempo 0 horas, momento en el que no se ha iniciado la digestión del preparado, 1 y 3 horas, tiempos que completan el periodo de digestión gástrica e intestinal, respectivamente.

Ensayos in vivo. Se han utilizado ratas macho de la raza Wistar con un peso comprendido entre 250 y 310 g. Los ensayos han sido aprobados por el Comité Ético de la Facultad de Farmacia, Universitat de València.

Los animales se asignaron de forma aleatoria a los grupos:

1. *Control*: administración oral de 2.5mL de agua (N=3).
2. *Problema:* administración oral de 2.5 mL del preparado enteral problema (N=6).
3. *Referencia*: administración por vía oral del preparado enteral de referencia (N=6).

Para la obtención de las muestras de sangre se ha utilizado la técnica de canulación de la vena yugular de la rata. La toma de muestras se prolongó durante 8 horas, en los tiempos -0.16 (previa administración), 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00 y 8.00 horas. El volumen de sangre extraído a cada tiempo fue de 0.2 mL, que una vez obtenido se centrifuga a 3000 *g* durante 10 min. a 4ºC. El plasma sobrenadante se desproteiniza con Ácido 5-Sulfosalicílico (SSA) y se almacena durante un mínimo de 24 horas a temperatura de -70ºC hasta el momento de su valoración. La determinación cuantitativa de leucina, se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución por detección fluorimétrica mediante derivatización de las muestras con OPA-MCA (λ_{ex}= 230 nm y λ_{em}= 389 nm) y una columna cromatográfica de fase inversa (UltraBase C18 3µm 100x4.6 mm). La fase móvil empleada ha consistido en una mezcla de tampón fosfato K+ 9mM con 0.5 mL/L de tietilamina a pH 6.9 y una mezcla orgánica de metanol: acetonitrilo (90:10), en proporción 55:45 (v/v) [3]. Se ha utilizado un flujo constante de 0.9 mL/min. y un volumen de inyección de 50 µL.

El tratamiento matemático de los datos experimentales de concentración plasmática de leucina y tiempo de toma de muestra, se ha realizado mediante el programa informático WinNonlin® 5.0.1, utilizando la metodología no compartimental. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado con ayuda del programa SPSS 15.0.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se indica la concentración de leucina en los preparados de estudio determinada en cada una de las fases del ensayo de digestión *in vitro*. No se detectaron concentraciones apreciables del aminoácido en las

condiciones de ensayo sin digerir y digestión gástrica (pH 1). Por el contrario, en la etapa de digestión intestinal, en la que se origina el proceso de proteólisis, la concentración de aminoácido es elevada. Este resultado confirma la composición referida en el etiquetado de los preparados, ya que no contienen leucina declarada en forma de aminoácido libre sino que su procedencia es exclusivamente de la mezcla proteica. La comparación estadística de los valores de las concentraciones de leucina obtenidas a pH 7 indica que las diferencias no son estadísticamente significativas (p=0.394).

Tabla 1. Media (M) y desviación estándar (DE) de la concentración de leucina (mmol/L) en los preparados enterales estudiados obtenida en cada una de las fases del ensayo de digestión. ND: No detectado

	Concentración de Leucina mmol /L preparado enteral (M±DE)	
	Problema	Referencia
Sin digestión	ND	ND
pH=1	ND	ND
pH=7	**10,65±1,34**	**9,92±1,62**

La figura 1 muestra las concentraciones promedio de leucina en plasma (µM de leucina/g rata) frente a los tiempos de muestreo obtenidas tras la administración oral de agua (A), del preparado problema (B) y del preparado de referencia (C).

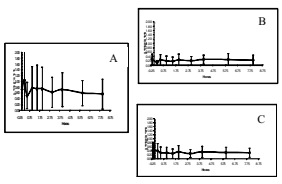


Figura.1 Concentración plasmática de leucina tras la administración oral de una dosis única de 2,5 mL de agua (A), preparado enteral problema (B) y preparado enteral de referencia (C).

La variabilidad de las concentraciones plasmáticas de leucina tras la administración de agua es mayor que la
obtenida cuando se administra una dosis única de preparado enteral. Este resultado pone de manifiesto que el periodo de ayuno influye en la eficiencia de la autorregulación fisiológica de las concentraciones plasmáticas de aminoácido.

En la Tabla 2 se muestran los valores individuales del área bajo la curva de concentración plasmática de leucina – tiempo, $AUC_{0\text{-}8}$, calculados normalizando la concentración plasmática-tiempo del aminoácido por la concentración plasmática basal individual.

Tabla 2. Valores individuales del $AUC_{0\text{-}8}$ normalizada de leucina obtenida tras la administración de una dosis única de los preparados enterales ensayados.

Animal	$AUC_{0\text{-}8}$ Normalizada problema	Animal	$AUC_{0\text{-}8}$ Normalizada referencia
1	7.27	7	6.64
2	4.66	8	6.00
3	7.81	8	6.59
4	8.64	10	8.16
5	6.39	11	7.76
6	8.70	12	5.93

En la Figura 2 se representa el cociente de las medias geométricas, y su intervalo de confianza 90% (IC 90%), de la concentración plasmática máxima (Cmáx) y del $AUC_{0\text{-}8}$ obtenidas para los preparados de estudio.

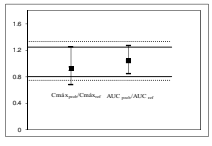


Figura 2. Cociente entre las medias geométicas de los valores de Cmáx y $AUC_{0\text{-}8}$. Línea punteada: Intervalo aceptación EMEA (0.75, 1.33). Línea continua: Intervalo aceptación FDA (0.8, 1.25)

Conclusiones

Las concentraciones de leucina obtenidas tras el periodo de digestión intestinal *in vitro* (pH 7) en ambos productos son equivalentes, indicando que la utilización digestiva de la mezcla proteica de ambos preparados es similar.

Se demuestra bioequivalencia entre el preparado problema y el de referencia cuando se utiliza la leucina como biomarcador. Este resultado confirma que la fuente proteica no condiciona su aprovechamiento por el organismo.

Bibliografía

1. Garcia de Lorenzo.A. Metabolismo en la agresión. Indicaciones del soporte nutricional especializado. En: SENPE, SEMICYUC. Galenitas-Tria Nigra eds. Aspectos metabólicos y nutricionales en el paciente bajo agresión aguda grave. **1**: 13-29, 2008.
2. http://www.fda.gov/caer/guidance/index
3. Teerlink T. Y col. Clin.Chem. **40/2**: 245-49, 1994.
4. Olza Meneses J. y col. Nutrición Hospitalaria. **23(3):** 206-211, 2008.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Vegenat S. A. la financiación realizada para desarrollar el proyecto: "Caracterización de la biodisponibilidad de nutrientes del preparado TDiet Plus®" a través del contrato con la Universitat de València SCP/JP 38518 Ref: 205/2007.

BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE TAURINA TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL DE DIETAS DE NUTRICIÓN ENTERAL

S. Miralles Arnau, A. Nácher, M. Merino-Sanjuán, N.V. Jiménez Torres.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universitat de València.
Av. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot. Valencia

Introducción

El objetivo principal de las técnicas de soporte nutricional es satisfacer las necesidades energéticas de cualquier paciente incapaz de ingerir por vía oral los nutrientes necesarios. La preparación de un preparado nutricional individualizado requiere realizar una valoración inicial de los parámetros antropométricos, bioquímicos y nutricionales del paciente. Esta individualización conduce a elaborar formulaciones enriquecidas con nutrientes con el fin de compensar carencias fisiológicas específicas de los individuos desnutridos. En este contexto, determinar la bioequivalencia del preparado enteral enriquecido respecto a otro preparado ampliamente introducido en el mercado constituye un aspecto esencial para proceder al intercambio de productos dietéticos, garantizando la calidad nutricional del preparado administrado.

La taurina es un aminoácido sulfurado de "esenciabilidad adquirida" que se incorpora con frecuencia a las formulaciones nutricionales [1]. Es un aminoácido esencial para los pacientes con alteraciones hepáticas, ya que surge como producto final del metabolismo de los aminoácidos metionina y cisteína.

El objetivo de este estudio ha sido determinar en ratas normonutridas la biodisponibilidad relativa de la taurina tras la administración oral de una dosis única de una formulación problema enriquecida con este aminoácido, utilizando como referencia una formulación sin enriquecer.

Materiales y Métodos

El estudio se ha realizado con dos preparados enterales comercializados por diferentes laboratorios. Se denomina problema al preparado enriquecido (lote 8861) y referencia al no enriquecido (lote 0279).

Ensayo de digestión in vitro. 25 mL del preparado enteral, acondicionados en un baño de agua a 37ºC bajo agitación, se han sometido a un proceso de digestión in vitro durante un periodo de 4 horas [2]. Este ensayo ha permitido conocer la cantidad de taurina en cada uno de los preparados de estudio. La toma de muestras se ha realizado en tiempo 0 horas, momento en el que no se ha iniciado la digestión del preparado, 1 y 3 horas, tiempos que completan el periodo de digestión gástrica e intestinal, respectivamente.

Ensayos in vivo. Han permitido conocer el acceso del biomarcador al plasma sanguíneo tras la administración por vía oral de los preparados enterales.

Se han utilizado ratas macho de la raza Wistar con un peso comprendido entre 250 y 310 g. Los ensayos han sido aprobados por el Comité Ético de la Facultad de Farmacia, Universitat de València.

Los animales se asignaron de forma aleatoria a los grupos:

1. *Control*: administración oral de 2.5mL de agua (N=3).
2. *Problema:* administración oral de 2.5 mL del preparado enteral problema (enriquecido con taurina) (N=6).
3. *Referencia*: administración por vía oral del preparado enteral de referencia (N=6).

Para la obtención de las muestras de sangre se ha utilizado la técnica de canulación de la vena yugular de la rata. La toma de muestras se prolongó durante 8 horas, en los tiempos -0.16 (previa administración), 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00 y 8.00 horas. El volumen de sangre extraído a cada tiempo fue de 0.2 mL, que una vez obtenido se centrifuga a 3000 *g* durante 10 min. a 4ºC. El plasma sobrenadante se desproteiniza con Ácido 5-Sulfosalicílico (SSA) y se almacena durante un mínimo de 24 horas a temperatura de -70ºC hasta el momento de su valoración. La determinación cuantitativa de taurina, se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución por detección fluorimétrica mediante derivatización de las muestras con OPA-MCA (λ_{ex}= 230 nm y λ_{em}= 389 nm) y una columna cromatográfica de fase inversa (UltraBase C18 3µm 100x4.6 mm). La fase móvil empleada ha consistido en una mezcla de tampón fosfato K+ 9mM con 0.5 mL/L de tietilamina a pH 6.9 y una mezcla orgánica de metanol: acetonitrilo (90:10), en proporción 75/25 (v/v) [3]. Se ha utilizado un flujo constante de 0.9 mL/min y un volumen de inyección de 50 µL.

El tratamiento matemático de los datos experimentales de concentración plasmática de taurina y tiempo de toma de muestra, se ha realizado mediante el programa informático WinNonlin® 5.0.1, utilizando la metodología no compartimental. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado con ayuda del programa SPSS 15.0.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se indica la concentración de taurina en los preparados de estudio determinada en cada una de las fases del ensayo de digestión *in vitro*.

Cuando se comparan dos a dos los valores de las concentraciones de taurina procedentes de los preparados problema y referencia obtenidos en las tres condiciones de ensayo (sin digerir, pH 1 y pH 7), se obtienen en todos los casos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1, p=0.000).

Tabla 1. Media (M) y desviación estándar (DE) de la concentración de taurina (µmol/L) de preparado enteral.

	Concentración de Taurina µmol /L preparado enteral (M±DE)	
	Problema	**Referencia**
Sin digestión	332,52±2,78	31,91±2,84
pH=1	532,4±79,00	41,36±3,97
pH=7	1848,85±208,46	714,35±89,52

Estos resultados indican que el preparado problema constituye una fuente enriquecida de taurina, unas 3 veces superior al preparado de referencia. Asimismo, la concentración de taurina proporcionada inicialmente por el preparado problema se encuentra dentro de las recomendaciones establecidas para productos enriquecidos en dicho aminoácido, por ejemplo en fórmulas infantiles (337±28 µmol/L) [4].

La figura 1 muestra las concentraciones promedio de taurina en plasma (µM de taurina/g rata) frente a los tiempos de toma de muestra obtenidas tras la administración de agua (A), del preparado problema (B) y del preparado enteral de referencia (C). Se observa que la concentración plasmática de aminoácido se mantiene más próxima a su valor basal y es más sostenida en el tiempo para los animales del grupo B. Este resultado puede deberse a que en ausencia de aporte exógeno enriquecido (grupos control y referencia) el retorno del aminoácido desde los reservorios musculares hacia el torrente circulatorio se agota.

El ANOVA realizado con la concentración plasmática basal de taurina obtenida para todos los animales del estudio indica que no existen diferencias estadísticamente significativas (p=0.572).

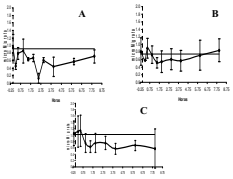


Figura.1 Concentración plasmática de taurina tras la administración oral de una dosis única de 2,5 mL de agua (A), preparado enteral problema (B) y preparado enteral de referencia (C).

En la Tabla 2 se muestran los valores individuales del área bajo la curva de concentración plasmática de taurina – tiempo (AUC_{0-8}. Estos valores se han calculado normalizando la concentración plasmática del aminoácido obtenida a cada tiempo de toma de muestra por la concentración plasmática basal obtenida para cada animal ensayado. Asimismo se indica el cociente entre las medias geométricas del parámetro y el intervalo de confianza 90% (IC 90%), cuyos límites exceden los de aceptación (0.8-1.25).

Tabla 2. Valores individuales, cociente de la media geométrica e IC 90% del AUC_{0-8} normalizada de taurina obtenida tras la administración de una dosis única de los preparados enterales ensayados.

AUC_{0-8} Normalizada problema	**AUC_{0-8} Normalizada referencia**
4.69	4.83
9.82	8.21
7.96	4.09
6.35	7.42
20.74	24.37
1.43	28.16
Parámetro	**prob/ref**	**IC 90%**
Ln(AUC_{0-8})	0. 66	0.27, 1.61

Conclusiones

El preparado problema presenta una cantidad de taurina tres veces mayor que el preparado de referencia.

El enriquecimiento de preparado enteral problema con taurina, administrado en dosis única a ratas normonutridas, no se traduce en un aumento de las concentraciones plasmáticas del aminoácido.

La variabilidad en el AUC_{0-8} de taurina dificulta la aplicación del criterio de bioequivalencia

entre los preparados ensayados administrados en dosis única a ratas normonutridas.

Bibliografía

1. Stipanuk M.H. Homocysteine, cysteine and taurine. En: Shils ME, Shike M and Ross Caballero B. Cousins RJ. eds. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th ed. Philadelphia, PA. Lippincott Willians & Wilkins. 34: 545-559, 2006.
2. (http://www.fda. gov/caer/guidance/index.htm) (Kulp KS, y col. 2003).
3. Teerlink T. y col. Clin.Chem. 40/2: 245-49, 1994.
4. Olza Meneses J. y col. Nutrición Hospitalaria. 23(3): 206-211, 2008.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Vegenat S. A. la financiación realizada para desarrollar el proyecto: "Caracterización de la biodisponibilidad de nutrientes del preparado TDiet Plus®" a través del contrato con la Universitat de València SCP/JP 38518 Ref: 205/2007.

ESTUDIO IN VIVO DE LA DISTRIBUCIÓN TISULAR Y LA CAPTACIÓN POR MACRÓFAGOS DE ZIDOVUDINA UTILIZANDO ERITROCITOS PORTADORES

Elsa Briones Cuesta, Clara Isabel Colino Gandarillas, José Martínez Lanao.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n. 37007. Salamanca.

Introducción

Los eritrocitos presentan características que los hacen adecuados como sistemas portadores, como la capacidad de proporcionar un efecto de liberación controlada, o de dirigir el fármaco al sistema retículo-endotelial, debido a su rápido aclaramiento de la sangre por el sistema monocito-macrófago (1).

Existe una gran variedad de fármacos disponibles para el tratamiento de la infección por VIH, pero su insuficiente capacidad de penetración en los macrófagos y su baja biodisponibilidad dan lugar a la aparición de resistencias y efectos tóxicos debido a la acumulación en otros órganos. Teniendo en cuenta la importancia del sistema monocito-macrófago en la infección por HIV1, que actúa como un importante reservorio del virus, la vectorización específica de estos agentes hacia los macrófagos tiene un gran interés terapéutico (2). Por estas razones, los fármacos antirretrovirales son buenos candidatos para ser encapsulados en eritrocitos portadores.

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la biodistribución de Zidovudina (ZDV) cuando se administra encapsulada en eritrocitos portadores.

Materiales y Métodos

Los eritrocitos portadores de ZDV se prepararon mediante un método de diálisis hipotónica utilizando un tampón hipoosmótico de 90 mOsm/kg y un tampón de resellado de 500 mOsm/kg (3). El procedimiento de encapsulación se muestra en la figura 1 y fue optimizado previamente en nuestro laboratorio seleccionándose las siguientes condiciones: concentración inicial de zidovudina de 10 mg/ml, tiempo de incubación de 45 minutos y relación de volúmenes saco de diálisis/tampón de 2:50 mL

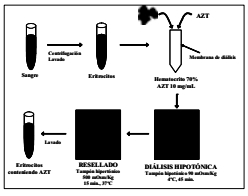


Figura 1. Procedimiento de diálisis hipotónica para la encapsulación de ZDV en eritrocitos de rata.

El estudio se realizó en dos grupos de ratas Wistar que habían recibido tres días antes una inyección de tioglicolato al 3% por vía intraperitoneal: uno recibió una solución de ZDV a una dosis de 8 mg/Kg y el otro 1 mL de eritrocitos conteniendo ZDV, en ambos casos por vía intraperitoneal. A tiempos predeterminados se extrajeron los macrófagos peritoneales mediante lavado peritoneal. A continuación los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de plasma, hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro y medula ósea.

Las concentraciones de ZDV en las distintas muestras se determinaron mediante una técnica de HPLC con detección de UV (λ=265 nm), tras una precipitación proteica y extracción líquido-líquido. La técnica se validó siguiendo las normas de la FDA para muestras biológicas (4) Se obtuvieron valores de coeficiente variación para la exactitud y precisión inferiores al 15%.

Resultados y Discusión

El procedimiento de diálisis hipotónica utilizado para la encapsulación de ZDV en eritrocitos permitió obtener un buen rendimiento de encapsulación obteniéndose concentraciones de ZDV en eritrocitos de 1,563±0,504 mg/mL, y rendimientos de encapsulación del 15,6 %.

Las figuras 1 y 2 muestran las concentraciones de ZDV en plasma y bazo tras la administración de zidovudina en solución o incorporada a eritrocitos. Los resultados obtenidos reflejan

cambios en la farmacocinética de ZDV incorporada en eritrocitos portadores. La semivida de eliminación y el tiempo medio de residencia de ZDV se incrementan cuando el fármaco se administra incorporado en eritrocitos portadores. La semivida de eliminación estimada para zidovudina encapsulada en eritrocitos fue de 9,4 horas frente a un valor para este parámetro de 3,7 horas cuando se administró en forma de solución.

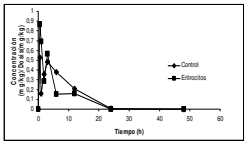


Figura 2.- Concentraciones de zidovudina en plasma para el grupo control (●) y el grupo que recibió ZDV encapsulada en eritrocitos (■)

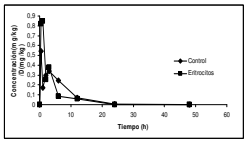


Figura 3.- Concentraciones de zidovudina en bazo para el grupo control (●) y el grupo que recibió ZDV encapsulada en eritrocitos (■)

La encapsulación de ZDV en eritrocitos produce un incremento en las concentraciones de fármaco en células fagocíticas y en tejidos del sistema retículo-endotelial como bazo e hígado.

Bibliografía

(1) C.G. Millán, M.L. Marinero, A.Z. Castañeda, J.M. Lanao, Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers, J. Control. Release. 95(1) (2004) 27-49.
(2) J.M. Lanao, E. Briones, C.I. Colino, Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy, J. Drug Target. 15(1) (2007) 21-36.
(3) C. Gutiérrez Millán, M. Arévalo, A. Zarzuelo Castañeda, F.G. López, M.L. Sayalero, J.M. Lanao. Encapsulation and in vitro evaluation of amikacin-loaded erythrocytes. *Drug Delivery*, 12(6) (2005) 409-416.
(4) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. http//www.fda.gov/cvm

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado en el marco del Plan Nacional de I+D+i (ref: PI060152) y por la Junta de Castilla y León (ref: SA049A07).

VALIDACIÓN Y FUNCIÓN DEL ERROR DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA MONITORIZACIÓN DE NIVELES PLASMÁTICOS DE CARVEDILOL EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA

A.J. Braza, P. Modamio, C.F. Lastra, J. Sebarroja, E.L. Mariño
Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia (http://www.ub.es/farcli/wp0.htm)
Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
Universidad de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n. 08028, Barcelona

Introducción

Carvedilol es un agente bloqueante β-adrenérgico no selectivo con actividad alfa-1-adrenérgica bloqueante y actividad simpaticomimética no intrínseca. Tiene propiedades vasodilatadores debido principalmente, a su actividad alfa 1. Carvedilol ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la hipertensión arterial y como coadyuvante en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y en la enfermedad coronaria (1).

Los métodos de estimación paramétrica en estudios farmacocinéticos, generalmente requieren la ponderación de los datos primarios. La problemática de la elección del método de ponderación no está del todo resuelta y no existe una solución universal para todos los casos (2).

Material y Métodos

Como técnica analítica se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa acoplada a un detector de fluorescencia. Previamente al análisis, las muestras biológicas se procesaron mediante extracción líquido-líquido, utilizando en la primera fase como disolvente éter etílico y en la segunda ácido sulfúrico 0,05 M.
El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente, con una columna Nucleosil C18 fase reversa, 5µm, 150×4,6 mm (Phenomenex®) y una precolumna C18 ODS, Octadecyl, 4×3,0 mm (Phenomenex®). La fase móvil consistió en acetonitrilo-tampón fosfato ajustado con ácido fosfórico a pH 5 y eluida isocráticamente a 1 ml/min.
La validación del método analítico (3) se inició con el ensayo de linealidad. Para éste se prepararon varias rectas de calibrado en plasma humano proveniente de diferentes donantes, dentro del rango de concentraciones seleccionado de 3,9-125 ng/ml.
Para los ensayos de precisión y exactitud intra e inter-día se escogieron tres concentraciones (alta, media y baja), dentro del rango de concentraciones de la recta de calibrado. También se realizaron los ensayos de estabilidad correspondientes.

Tras de la validación del método, se calculó la función del error analítico. Durante 4 días diferentes se analizó una curva de calibrado (que comprendía 6 concentraciones dentro del rango 125-3,9 ng/ml). Se determinaron los valores de concentración experimental, las medias y las desviaciones estándares (SD) de las rectas analizadas. Posteriormente, se buscó la mejor función entre la desviación estándar (variable dependiente) y la concentración teórica de la curva de calibrado (variable independiente). El análisis se comenzó con un polinomio de orden 3, cuya ecuación general es:

$$SD= A_0+A_1.C+A_2.C^2+A_3.C^3$$

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra un cromatograma representativo del análisis de carvedilol, obtenido con el método analítico desarrollado.

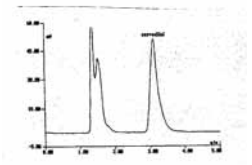


Figura 1. Cromatograma representativo de carvedilol a una concentración de 15,63ng/ml.

El tiempo de retención aproximado de carvedilol resultó ser de 3,15 min.

El porcentaje de extracción medio del fármaco fue de 89,3%. Los resultados del ensayo de linealidad para el rango de concentraciones seleccionadas se muestran en la tabla 1, donde el coeficiente de variación (CV) se refiere al de los factores respuesta.

Tabla 1. Resultados del ensayo de linealidad de carvedilol en plasma humano.

R	CV (%)	Error estándar de la pendiente	F
0,994	12,05	0,022	2,065

Los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad permitieron comprobar la existencia de una buena correlación entre el área y la concentración dentro del rango de concentraciones estudiado.

Los resultados obtenidos en la precisión (CV) y exactitud (Error Relativo, ER) intra e inter-día, a la concentración alta, media y baja seleccionadas, se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Resultados del ensayo de precisión y exactitud intra-día.

Cteor (ng/ml)	Cexp (ng/ml)	CV (%)	ER (%)
62,50	62,19±2,05	2,83	-0,49
15,63	16,36±1,45	8,31	4,67
3,91	3,46±0,59	2,92	-11,51

Tabla 2. Resultados del ensayo de precisión y exactitud inter-día.

Cteor (ng /ml)	Cexp (ng/ml)	CV (%)	ER (%)
62,50	62,38±3,09	4,96	-0,19
15,63	15,51±1,19	7,67	-0,77
3,91	4,12±0,44	10,84	5,37

Respecto a la precisión intra-día, el CV presentó su valor más elevado (8,31%) para la concentración de 15,63 ng/ml. En el ensayo de precisión inter-día se obtuvo el mayor CV (10,84%) para la concentración de 3,91 ng/ml.

El ER intra e inter-día presentó un valor máximo de -11.51% % y de 5,37%, respectivamente, ambos para la concentración de 3,91 ng/ml.

Los resultados de los estudios de estabilidad en diferentes condiciones se encontraron dentro de los límites establecidos

La función del error analítico que mejor representaba los datos experimentales se determinó estadísticamente mediante regresión polinomial. La función obtenida fue la que se incluye a continuación y cuya representación gráfica se muestra en la Figura 2.

DE (ng/ml)= 0,322+0,086C

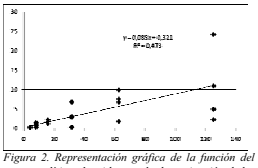


Figura 2. Representación gráfica de la función del error analítico obtenida para la determinación de los niveles plasmáticos de carvedilol con este método analítico.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de validación, todos los valores se encuentran dentro de los aceptados cuando se trabaja con muestras biológicas, por lo que se dispone de una metódica analítica apta para la cuantificación adecuada de niveles plasmáticos de carvedilol a concentraciones terapéuticas procedentes de pacientes.

Bibliografía

(1) Baek IH et al. *Arch Pharm Res*, 31: 814, 2008.
(2) Braza A.J. et al. *Biomed Chromatog*, 16: 522, 2002.
(3) Modamio, P. et al. En R. Salazar (Editor). Análisis y control de medicamentos. Romargraf, L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), 689-718. 2005.

PRECLINICAL STUDY OF A NEW SUSTAINED RELEASE FORMULATION OF MORPHINE: DISCREPANCIES BETWEEN THE *IN VITRO* DRUG RELEASE AND THE *IN VIVO* ABSORPTION PROFILE

A. Araíco, F. Torres-Molina, J. Cárcel-Trullols, A. Saadeddin, J.E. Peris
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia,
Avda. V. Andrés Estellés, s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Introduction

A new sustained release formulations of morphine has been developed, which involves the formation of a complex between morphine and Eudragit® L, an acrylic polymer insoluble at low pH values and soluble above pH 5.5. *In vitro* studies of the complex have demonstrated that morphine release depends on the pH of the dissolution medium (1,2). The present work constitutes an *in vivo* preclinical study of the sustained release features of the proposed new morphine-Eudragit®L complex formulation. The study has been conducted in dogs, comparing the plasma concentration versus time profile of morphine administered as morphine-Eudragit®L complex with the profile obtained after the administration of morphine alone. Furthermore, since morphine release from the complex is influenced by the ionic strength, both profiles were compared in fed and fasted animals.

Materials and Methods

Six purpose-bred beagles (2 males and 4 females), approximately one year of age, were used in the experiments (range 7.8 -11.0 kg). Dogs were administered with capsules filled with 15 mg of morphine hydrochloride trihydrate (MHT) or 33.3 mg of morphine-Eudragit® complex (MEC), equivalent to 15 mg of morphine hydrochloride trihydrate. In study I, dogs were fasted overnight and the capsules containing MHT or MEC were administered at 9:00 a.m. using a two-period crossover design with a washout period of one week. In study II, dogs were conditioned to eat once a day (between 8:00 and 8:30 a.m.) during several days. On the day of the administration of MHT or MEC, dogs were allowed to eat normally and the drug was administered at 9:00 a.m. according to the same experimental design used in study I.
Blood samples were withdrawn through a catheter placed in the cephalic vein until 600 min after dosing and placed in heparinized tubes to obtain plasma. Morphine was extracted from plasma samples with chloroform-isopropanol (95:5, v/v) and quantified by HPLC with UV detection.
The area under the plasma morphine concentration versus time curve from time zero to the last time with a detectable concentration of morphine (partial area, AUCp) was estimated by means of a combination of the regular trapezoidal and the logarithmic trapezoidal rules. The maximum plasma morphine concentration (Cmax) and the time to Cmax (Tmax) were observed values. Pharmacokinetic parameters of morphine were compared by means of a 3-way ANOVA test (factors: treatment, dog and period).

Results and Discussion

The absorption and the elimination of morphine was rapid in fasted dogs (Figure 1), regardless of the kind of capsule used (i.e., filled with MHT or MEC). In fact, the mean values of pharmacokinetic parameters corresponding to both formulations were not statistically different (Table 1).

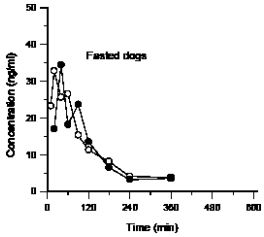


Figure 1. *Mean morphine plasma concentrations obtained in fasted dogs (n = 6) after oral administration of one capsule containing MHT (o) or MEC (•). Standard deviation bars have not been represented to improve figure clarity.*

When MHT and MEC were administered to fed animals, the mean plasma morphine concentrations were again similar for both formulations (Figure 2), without statistically significant differences in the pharmacokinetic parameters of morphine (Table 2).

Table 1. *Pharmacokinetic parameters of morphine (mean ± SD) obtained in* ***fasted dogs*** *(n = 6).*

Parameter	MHT	MEC
Cmax (ng/ml)	45 ± 16	38 ± 31[a]
Tmax (min)	32 ± 18	57 ± 29[a]
AUCp (ng.min/ml)	2805 ± 1174	2915 ± 1596[a]

[a] *Statistically not different from mean value obtained with MHT*

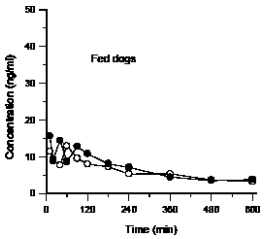


Figure 2. *Mean morphine plasma concentrations obtained in fed dogs (n = 6) after oral administration of one capsule containing MHT (o) or MEC (•).*

Table 2. *Pharmacokinetic parameters of morphine (mean ± SD) obtained in* ***fed dogs*** *(n = 6).*

Parameter	MHT	MEC
Cmax (ng/ml)	18 ± 10	18 ± 11[a]
Tmax (min)	100 ± 130	105 ± 109[a]
AUCp (ng.min/ml)	3257 ± 1245	3415 ± 1394[a]

[a] *Statistically not different from mean value obtained with MHT*

All this indicates that the complex (MEC) is unable to afford sustained release of morphine *in vivo*. These results contrast with those obtained *in vitro* (Alvarez-Fuentes et al., 1997), and suggests the limited usefulness of *in vitro* assays for this kind of sustained release formulations in which pH and ionic strength are important factors in drug release from the polymeric structure.

The administration of MHT and MEC to fed dogs gave rise to plasma morphine concentrations lower than those obtained in fasted dogs, though the plasma morphine levels were detectable for a longer time, up to 10 hours after dosing (figure 1). The partial area under the plasma morphine concentrations (AUCp) was slightly larger in fed dogs than in fasted animals for both morphine formulations, though the differences were not statistically significant. The apparently prolonged absorption of morphine in fed dogs could be due to the presence of food in the gastrointestinal tract, which decreases the morphine diffusion rate, but also to the enterohepatic recycling of the drug as a consequence of food-induced gallbladder emptying. In fact, morphine glucuronides are the main morphine metabolites in rats, dogs and humans (3-5), and following biliary excretion they could be hydrolysed back to the parent compound and reabsorbed from the intestine (3, 4).

Conclusions

In vitro dissolution assays can be of limited usefulness for sustained release formulations in which pH and ionic strength are important factors in drug release from the polymeric structure

References

(1) Alvarez-Fuentes J. et al., *Drug Dev. Ind. Pharm*., **23**: 553-559, 1997
(2) Fernández-Arévalo M. et al., *S.T.P. Sciences,* **12**: 334-336, 2002
(3) Jacqz E. et al., *Drug. Metab. Dispos*., **14**: 627-630, 1986
(4) Ouellet D.M., et al., *Drug Metab. Dispos*., **23**: 478-484, 1995
(5) Gourlay G.K. et al., *Clin. Pharmacokinet*., **35**: 173-190,1998

Acknowledgements

This work is part of a research project supported by a grant from the 'Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT)' of the Ministry of Education and Culture of Spain, and the European Comission (1FD97-0624-C04-03).

FARMACIA CLÍNICA Y FARMACOTERAPIA

MEDICAMENTOS BIOSIMILARES: REQUERIMIENTOS DE FARMACOVIGILANCIA Y GESTIÓN DE RIESGOS

L. Zúñiga, B. Calvo
Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco.
Pº Universidad, 7. 01006 Vitoria

Introducción

Un medicamento biosimilar no puede aprobarse en base a los mismos requerimientos que se exigen para un fármaco genérico sino que es preciso realizar ensayos clínicos destinados a establecer su eficacia y seguridad en una indicación definida así como desarrollar un programa de farmacovigilancia y gestión de riesgos después de su comercialización (1).
El laboratorio solicitante debe presentar a la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMEA) el mencionado plan de gestión de riesgos y el programa de farmacovigilancia junto con la solicitud de autorización del producto biosimilar, incluyendo una descripción de los incidentes de seguridad que puedan derivarse de las diferencias existentes en el proceso de fabricación respecto al medicamento de referencia (2). El aspecto de seguridad más importante a tener en cuenta es la inmunogenicidad.

Consideraciones respecto al proceso de fabricación

La necesidad de reforzar la farmacovigilancia en los biofármacos se hizo más evidente tras el problema observado en algunos pacientes que habían recibido una eritropoyetina innovadora (Eprex®) que presentaron Aplasia Eritrocitaria Pura (3). Este efecto adverso no había sido detectado en los ensayos clínicos durante el desarrollo del producto, debido a que su incidencia es extraordinariamente baja (0,7 por 10.000). Ello fue debido a un ligero cambio en el proceso de producción de esta epoetina alfa (el uso un nuevo estabilizante utilizado en la formulación del producto interaccionó con los tapones de goma del envase que cedieron algunos componentes) que se tradujo en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes no solo para el medicamento sino también para la eritropoyetina endógena en algunos pacientes. Si los productos biosimilares se fabrican utilizando un proceso totalmente diferente al del fármaco de referencia, probablemente den lugar a diferencias estructurales y bioquímicas en la molécula, por lo que no puede garantizarse su seguridad sin llevar a cabo estudios clínicos amplios (4).

Puntos clave en el periodo de post-comercialización de medicamentos bio-similares

Los principales aspectos a considerar en la seguridad de los medicamentos biosimilares una vez comercializados son los siguientes:

Planes de gestión de riesgos
Las directrices CHMP de la EMEA sobre biosimilares explican que los datos de los ensayos clínicos previos a su autorización normalmente son insuficientes para identificar las posibles diferencias con el producto de referencia. Por lo tanto, la seguridad clínica de los biosimilares debe monitorizarse muy de cerca durante la fase de post-comercialización y debe realizarse una evaluación continua del balance riesgo-beneficio.

El objetivo debe ser caracterizar y cuantificar el riesgo para los compuestos nuevos o comprobar que el riesgo de la proteína biosimilar no es mayor que el del producto de referencia.

Los planes de gestión de riesgos para un biosimilar deben centrarse en:
- Reforzar las medidas de farmacovigilancia.
- Planificar cómo identificar el riesgo de inmunogeniciadad: pérdida secundaria de efecto en pacientes *naive*, cualquier pérdida de efecto en pacientes *no naive*, evidencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes (análisis de anticuerpos), etc.
- Implementar un sistema especial de vigilancia post-comercialización (5)

Farmacovigilancia
Las directrices del Comité de Medicamentos de Uso Humano de la EMEA (CHMP) enfatizan la necesidad de prestar especial atención a la farmacovigilancia, especialmente para detectar efectos adversos serios y raros.

Los puntos a considerar son:
- Los sistemas de farmacovigilancia deben diferenciar entre el producto innovador y el biosimilar (de tal forma que los efectos de los biosimilares no se pierdan en los informes de los productos de referencia) .
- Asegurar la trazabilidad.

Sustitución de medicamentos. (DCI Denominaciones Comunes Internacionales) .
Las Denominaciones Comunes Internacionales (DCI) o nombres genéricos identifican las sustancias farmacéuticas o principios activos. Cada producto genérico tiene un único nombre que es reconocido globalmente y es de dominio público.
El propósito del programa DCI es asignar nombres genéricos (seleccionados por la Organización Mundial de la Salud, OMS) a las sustancias farmacéuticas para que cada una pueda reconocerse globalmente. Los DCIs también forman parte esencial del proceso regulatorio en muchos países donde se requiere un nombre genérico para la licencia.

La OMS no evalúa datos de comparabilidad y por tanto no puede asignar un DCI a un biosimilar sin la autorización previa de las autoridades. La evaluación y aprobación de los biosimilares debe realizarse de manera independiente al proceso de asignación de nomenclatura de la OMS.

El término "biológico" es un concepto científico mientras que "biosimilar" significa una ruta regulatoria y legal para la autorización y los dos deben diferenciarse claramente. Por tanto, se recomienda no incluir ninguna distinción que indique el término regulatorio biosimilar en el DCI para estos productos. De hecho, se propone que la política sobre DCI de nomenclatura de los biosimilares sea la misma que la de los productos biológicos originales.

La asignación de los DCIs debe ser independiente del proceso regulatorio o de las consideraciones sobre la sustitución de medicamentos en la prescripción médica o del uso de DCIs en farmacovigilancia. A pesar de ser conocido que los DCIs son de gran utilidad en farmacovigilancia, no deben ser el único medio de identificación del producto o el indicador único para la sustitución de medicamentos en el caso de los biosimilares. La trazabilidad depende de múltiples factores (DCI, fabricante, número de lote, sistema de farmacovigilancia bien definido, requisitos post-comercialización de información sobre acontecimientos adversos, etc) y la sustitución debe ser responsabilidad de la autoridad regulatoria nacional y basarse en datos científicos y clínicos apropiados (6).

Conclusiones

Los medicamentos biosimilares pueden aportar beneficios importantes pero no sin riesgo añadido. El uso de estos productos proporciona la oportunidad de mejorar el sistema de farmacovigilancia e implementar una meto-dología efectiva en la práctica clínica.

Un programa de farmacovigilancia es esencial en la utilización de los biosimilares debido a que es difícil predecir las consecuencias clínicas de los cambios aparentemente inocuos en su proceso de fabricación así como al vacío de información científica existente.

Es esencial disponer de una información exhaustiva de los pacientes la cuál debe recogerse en una base de datos nacional. Implementar este sofisticado esquema de farmacovigilancia es complejo y costoso y por tanto no está al alcance de la mayoría de los laboratorios fabricantes de biosimilares.

Debido a las exigencias especiales los fabricantes de biosimilares deben invertir más de lo necesario en los medicamentos genéricos tradicionales, por lo que la gran reducción de precios que normalmente se observa con las pequeñas moléculas genéricas de síntesis química no se observará en los productos biosimilares .

Referencias

1.- A. Domínguez-Gil, *Medicamentos Biotecnológicos: características diferenciales.* INESME, Madrid, 2006: 11-22.

2.- B. A. Liang. *Regulating Follow-On Biologics,* Harvard J Legisl, 2007; 44:363-471.

3.-I.C. Macdougall . *Antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA): epidemiology, Immunogenicity and risks.* Nephrol Dial Transplant 2005; 20 Suppl 4: 9-15.

4.- S. D. Roger, A. Mikhail. *Biosimilars: Opportunity or Cause for Concern*, J Pharm Pharmaceut Sci, 2007; 10: 405-410.

5.-*Volume 9A of the Rules Governing Medicinal Products in the European Union*. Guidelines on Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use. March 2007. http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/ eudralex_en.htm

6.-WHO *Informal Consultation on International Nonproprietary Names* (INN) , Policy for Biosimilar Products. WHO Geneva, 2006. http://www.who.int/medicines/services/inn/BiosimilarsINN_Report.pdf

EVOLUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA REALIZADA EN EL ESTADO ESPAÑOL DESDE LA PERSPECTIVA DE UNA CRO

B. Nicolás[1], P. Modamio[2], C.F.Lastra[2], E.L. Mariño[2]
[1]CRO Dynamic Solutions S.L. C/ Sant Antoni Ma. Claret 434. 08027 Barcelona
[2]Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona (http://www.ub.es/farcli/wp0.htm)

Introducción

En investigación clínica existen dos grandes grupos de estudios: los experimentales y los observacionales. Los ensayos clínicos (EC) son estudios experimentales que, según la fase de desarrollo clínico del medicamento, se clasifican en EC de fase I, II, III y IV o post-autorización. Los estudios observacionales son estudios post-autorización (EPA) y, por tanto, se realizan según las condiciones de uso establecidas en la autorización de comercialización (1).
De acuerdo con el RD 223/2004 de 6 de febrero por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, una organización de investigación por contrato o "contract research organization" (CRO) es una persona física o jurídica contratada por el promotor para realizar funciones o deberes del promotor en relación con el EC (2). Las CRO aportan recursos no solo en la gestión de EC sino, en general, de la investigación biomédica (3).
El objetivo principal del estudio fue analizar la evolución de la investigación clínica realizada en el estado español desde la perspectiva de una CRO.

Material y Métodos

Estudio transversal descriptivo sobre los estudios de investigación clínica encargados a una CRO del estado español durante el periodo 2003-08. Las fuentes de obtención de los datos fueron los archivos y la propia base de datos de la CRO.
Las variables del estudio fueron: tipo de estudio, área terapéutica, número de centros y sujetos participantes, duración, evolución del número en el tiempo y organismo promotor.
Se diseñó una base de datos en la que se recogió información sobre cada uno de los estudios llevados a cabo en el periodo establecido.
Los tipos de estudios se clasificaron en EC, y dentro de éstos en fase I, II, III ó IV, y estudios observacionales, y dentro de éstos post-autorización prospectivo (EPApros), post-autorización retrospectivo (EPAretros), post-autorización transversal (EPAtrans), casos clínicos (CC) y otros estudios epidemiológicos (EPI).

Resultados y Discusión

El número total de estudios de investigación clínica registrados en la CRO durante el periodo 2003-08 fue de 303. En la Figura 1 se muestran los estudios clasificados y su prevalencia.

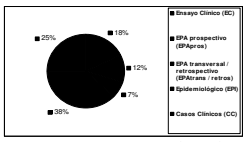


***Figura 1**. Tipos y prevalencia de estudios de investigación clínica registrados en la CRO durante el periodo 2003-08.*

Desde la perspectiva de la CRO, se observó una tendencia clara hacia los estudios observacionales (82%) en detrimento de los EC (18%). Los estudios observacionales se constituyen en una herramienta productiva para la industria farmacéutica, tanto por motivos de marketing (contacto con médicos, promoción del uso de determinados medicamentos, etc.), como con el objeto de continuar la investigación de un medicamento ya comercializado (farmacovigilancia, poblaciones especiales, calidad de vida, etc.).

En la Figura 2 se representa el número total de centros y sujetos participantes en función del tipo de investigación clínica.

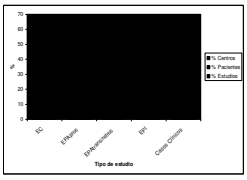


***Figura2**. Número de centros y sujetos participantes en función del tipo de investigación clínica.*

Los EC con más pacientes y con más centros fueron los de fase IV. Con relación a los estudios observacionales, los EPApros fueron los que tuvieron menor número de pacientes y centros de reclutamiento, probablemente debido a su estricta legislación, con objeto de impedir la realización de estudios de inducción a la prescripción y de marketing.

En la Figura 3 se representan las áreas terapéuticas cubiertas en función del tipo de estudio clínico.

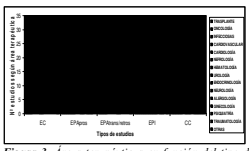


***Figura 3**. Áreas terapéuticas en función del tipo de estudio.*

Oncología fue el área terapéutica predominante en los EC. En los estudios observacionales destacaron las áreas de oncología, enfermedades infecciosas, transplantes, endocrinología y cardiovascular.

La distribución del tipo de investigación clínica en la que participó la CRO, durante los cinco años de estudio, se muestra en la Figura 4.

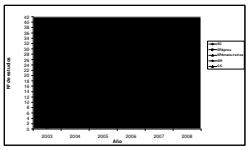


***Figura 4**. Distribución del tipo de estudio clínico durante los años 2003 al 2008.*

El número total de estudios en los que participó la CRO entre los años 2003 al 2008 fue de 34, 39, 44, 83, 52 y 51, respectivamente. 2006 fue el año en el que tuvo mayor número de estudios, cuantificándose un total de 47 observacionales y 15 EC. 2008 destacó por el incremento del número de CC que sumó un total de 29 frente a sólo 5 EC.

El organismo promotor principal de los estudios de la CRO fue la industria farmacéutica (97%).

Conclusiones

Desde la perspectiva de la CRO y durante el periodo estudiado (2003-08), se observó un aumento de los estudios observacionales en detrimento de los EC.

El organismo promotor principal de los estudios de la CRO fue la industria farmacéutica, dirigiendo su inversión hacia los estudios observacionales y en áreas terapéuticas de mayor incidencia en los últimos años (oncología, enfermedades infecciosas, trasplantes, endocrinología y cardiovascular).

Los estudios observacionales son, en la actualidad, un instrumento ampliamente utilizado para seguir potenciando el desarrollo clínico de un medicamento tras su comercialización.

Bibliografía:

(1) Álvarez-Dardet C et al., *Med. Clin. (Barc)*, **89**:296-301, 1987.

(2) RD 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. BOE núm. 33, de 7 febrero de 2004.

(3) Alami M et al. En: *El ensayo clínico en España.*; Sección IV, Capítulo 18, 2001.

DOCENCIA

THE PHARMACY CURRICULUM OF THE UNIVERSITY OF FLORIDA (USA)

M. Martone[1], D. Nobel[1], J. Sebarroja[2], P. Modamio[2], C.F. Lastra[2], E.L. Mariño[2]
[1]College of Pharmacy at the University of Florida. USA
[2]Clinical Pharmacy and Pharmacotherapy Unit. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology.
Faculty of Pharmacy. University of Barcelona.
Avda. Joan XXIII s/n. 08028. Barcelona, Spain. http://www.ub.edu/farcli/wp0.htm

Objective

To present the Pharmacy curriculum and typical course of study at the University of Florida´s College of Pharmacy.

Background

The University of Florida (UF) Pharmacy program is a rigorous four year curriculum. Students will acquire a total of 146 credit hours and 2080 hours of clerkship experience. The mean attrition rate is 4.8% over 13 years and the mean retention rate is 95.2% over 13 years. The educational philosophy can be described as **C**ase-**A**ssisted **S**tudent **C**entered **L**earning. This approach facilitates active learning through patient cases in which students are prompted to make pharmacotherapeutic decisions.

Methods

A descriptive method based on the curriculum at the UF College of Pharmacy organized by year. Class titles will be italicized with a brief description following the core classes.

Results and Discussion

Before starting pharmacy studies, some prerequisites are required to apply to the college of pharmacy. That includes taking pre-professional courses which are shown in Table 1.

Table 1. Pre-professional course requirements

• Chemistry I & II with labs
• Organic Chemistry I and II with labs
• Biological Sciences I & II with labs
• Physics I & II with labs
• Anatomy and Physiology with labs
• Math: Analytical Geometry and Calculus
• Public Speaking

In addition to completing these courses an applicant must also take the Pharmacy College Admissions Test (PCAT). The PCAT is a specialized test that helps identify qualified applicants to pharmacy colleges. It measures general academic ability and scientific knowledge necessary for the commencement of pharmaceutical education. The PCAT is constructed specifically for colleges of pharmacy and consists of 240 multiple-choice items and two writing topics. Candidates are given four hours to complete the test

Moreover it is necessary to write a personal profile and an essay to communicate motivation, goals, circumstances, and experiences related to a pharmacy career; two recommendation letters from separate references (a pharmacist and a science professor) and extracurricular activities (involvement in student organizations, community service, volunteering, and work experience). Although pharmacy experience is not a requirement for admission, it is strongly recommended.
The UF College of Pharmacy admits more or less 300 students once per year, and there were approximately 1,800 applications (2008).

First Professional Year

The first year of the Pharmacy program is designed to give students an introduction to pharmaceutical concepts including biochemistry, medicinal chemistry and dosage forms. Students accrue 34 credit hours through completion of the courses included in Table 2.

Table 2. First professional year courses

• Clinical Biochemistry
• Dosage Forms I and II
• Fundamentals of Medicinal Chemistry
• Physiological Basis of Disease I & II
• Intro to Pharmacists, Pharmaceuticals and the Health Care System
• Microbiological and Immunological Basis for Therapy
• Practicum I and II
• Structure and Function of Nucleotides
• Pharmacotherapy I
• Basic Principles of Pharmacology

Pharmacotherapy I is the first of a 6 course sequence. Students are called on in class to do a patient interview including complete patient history, assessment of symptoms, and pharmacotherapeutic recommendation. Another core class taken is *Basic Principles of Pharmacology* which is the first of a three course sequence that examines the pharmacological principles of chemicals used in therapeutics with heavy emphasis on mechanism of action and major side effects.
Practicum I and II introduces patient care needs from health care system and sociological perspectives. Students are assigned in a group

with a volunteer patient and are also assigned to shadow senior pharmacy students

Second Professional Year

During this year students are introduced to more in depth drug-specific information and topics are organized by disease state. Students take *Introduction to Quantitative Methods in Pharmacy* which emphasizes the application of biostatistics in research and pharmacy practice. Important concepts of pharmacokinetics, including absorption, distribution, metabolism, and elimination, are taught in *Basic Principles of Dose Optimization I* and II. *Medicinal Chemistry I* & II teach students to predict solubility, metabolism, and pharmacological activity/potency of drug classes based on the contribution of their functional groups to their structures. Finally, *Professional Communications in Pharmacy Practice* calls on students to hone their skills inclusive of empathy and assertiveness, specific to functions pharmacists perform. Other classes during this year include:

- *Pharmacological Basis of Therapeutics II & III,* which examines the pharmacological principles of chemicals used in therapeutics.
- *Pharmacotherapy II &III,* that provides framework for the therapeutic management and focuses on specific disease states by utilizing a case-assisted student centered learning format
- *Practicum III & IV,* which provide students experience in community pharmacy or hospital pharmacy operations

Third Professional Year

Students will complete their coursework in preparation for beginning clerkships. In the fall semester students take the courses shown in Table 3.

Table 3. Third professional year courses (fall semester)

• Dosage Forms and Contemporary Practice
• Pharmaceutical Skills Laboratory I
• Drug Therapy Monitoring and Pharmacogenomics
• Evidenced-Based Pharmacy
• Pharmacotherapy IV
• Legal and Organizational Environment of Medicines Use

In the spring students start clerkships and begin working in hospitals, community pharmacies, and outpatient pharmacies as independent practitioners with the guidance of preceptors. Throughout the third and fourth year of school clerkships will provide 12-month rotations with a total of 2080 hours of professional practice. This exposes the student to a variety of pharmaceutical environment Students will complete 6 months of required rotations including *Adult Medicine* (2 month), *Ambulatory Care* (2 month),, *Drug Information, and Pediatrics-Oncology-Gerontology* and have 6 months of elective rotations of their choice.

In spring semester, students are also required to attend the following classes: *Pharmaceutical Skills Laboratory II*, *Pharmacotherapy V,* and *Critical Appraisal of Pharmacoeconomics Studies*. They will also accrue 2 credit hours in this semester through their choice of elective courses such as *Pediatric Pharmacy and Clinical Toxicology*.

Fourth Professional Year

Students continue clerkships throughout the summer, fall and spring of their fourth year. After completing their clerkships in February, students return to their campus and attend two more months of class.

Pharmacotherapy VI, the last course in the 6-part sequence, where students assimilate and combine their didactic and clinical knowledge through real-life patient case presentations.

Herbal Medicines, a practice-oriented introduction into herbal medicines, focuses on botanical or herbal products. That will allow students to make judgments about clinical effectiveness and potential for adverse consequences in patients.

Students will also acquire 4 credit hours through their choice of two electives.

Conclusion: The University of Florida Pharmacy Degree is a four year program with a rigorous curriculum. The first three years of the program are mostly case-based in-class learning designed to prepare students for their final year of school where they will earn 2080 experiential hours through clerkship work. The goal of the University of Florida's Pharmacy Degree is to provide a strong educational foundation so that students will become pharmacists who embrace the concept of being a life-long learner.

References:

1. The University of Florida's College of Pharmacy. http://www.cop.ufl.edu/root4/index.htm (November 08).

PHARMACY EDUCATION AT THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN (USA)

A. Garcia[1], C. Simister[1], J. Sebarroja[2], P. Modamio[2], C.F. Lastra[2], E.L. Mariño[2]
[1]College of Pharmacy at the University of Texas at Austin. USA
[2]Clinical Pharmacy and Pharmacotherapy Unit. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology.
Faculty of Pharmacy. University of Barcelona.
Avda. Joan XXIII s/n. 08028. Barcelona, Spain. http://www.ub.edu/farcli/wp0.htm

Objective

To describe the curriculum at the University of Texas (UT) at Austin's College of Pharmacy and pharmacy education in the United States of America (USA).

Material and Methods

A descriptive method based on the curriculum at the UT at Austin's College of Pharmacy and post graduation pharmacy education programs in USA was applied for this study.

Results and Discussion

The UT pharmacy school curriculum consists of three main components. First are the prerequisites required to apply to the college of pharmacy. The courses include the basic sciences with their corresponding laboratory components: general and organic chemistry, cellular biology, microbiology, genetics, immunology, and physics. Calculus and statistics are also required. All students attending UT must take the "core" humanity classes as part of their degree requirements. These "core" classes include English literature, writing, government, history, fine arts, and a social science such as psychology. Because the pre-pharmacy classes only take a minimum of 2 years to complete, a pharmacy applicant varies in age and degree background, as can be seen in Figure 1.

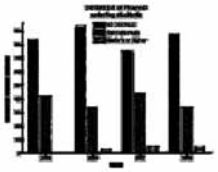


Figure 1: Comparing the educational background of students entering the College of Pharmacy at UT.[1]

In addition to completing these courses an applicant must also take the Pharmacy College Admissions Test (PCAT). This is a national standardized exam to test and equally compare the applicants' abilities in math, science, reading and writing. An applicant must also write an essay or "personal statement" declaring their interest in pharmacy and provide letters of recommendation written by previous professors,

employers or pharmacists. After the first round in the selection process the applicant will be invited for an interview with a faculty member and a current pharmacy student. This application process is very competitive. At the UT College of Pharmacy, about many applications are received each year, but only 120 applicants can be accepted, as can be seen in Figure 2.

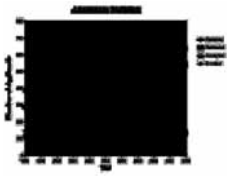


Figure 2: Illustrating the admission statistics at the College of Pharmacy at UT.[1]

After students are accepted into the College of Pharmacy they begin a four year program to earn their Pharm. D. degree. The first three years are didactic and the fourth year is dedicated to practical experience.

The first year of course work, "P1" year, is very intense and includes the basic pharmacy courses. These classes build upon the basic science or pre-pharmacy courses taken previously. Students take the subject shown in Table 1.

Table 1: Subjects of P1

Fall Semester	Spring Semester
• Biochemistry and Lab • Physical & Chemical Principles of Drugs • Anatomy & Physiology • Pharmacy Administration and lab • Medicinal Chemistry Principles and lab • Introduction to Pharmacy	• MacroMolecular Chemistry and Biotechnology • Anatomy & Physiology II • Biopharmacy & Kinetics and lab • General Pathology • Pharmacology Principles • Pharmaceutics and lab • Introd. to Pharmacy II

Some of these courses also include a laboratory component. The students are in class for at least sixteen hours per week during both semesters.

The P2 year's primary focus is on the pharmacotherapy courses, as it is shown in Table 2. Each class focuses on a different disease states and the drugs used to treat them. These courses require at least fifteen classroom hours in the fall and spring and six in the summer.

Table 2: Subjects of P2

Pharmacotherapy Courses	Additional Courses
• Allergy, asthma and autonomics • Cardiovascular and renal systems • Antimicrobials • Nonbacterial/retroviral therapies and oncology/anticancer therapies • Hormonal replacement (Diabetes, pregnancy, contraception, thyroid dysfunction, growth hormone, and inflammatory disorders) • Neurological/psychology disorders • Local anaesthetics and pain management • Pharmacotherapy lab	• Communication and ethics • Introduction to drug information • Pharmacy administration II • Professional electives (4 hours) • Experiential practice in the pharmacy at the UT student health science center.

The laboratory component associated with the pharmacotherapy courses deals with real patient cases. The students must evaluate the patient's current drug treatment, make changes when needed and provide recommendations for the proper course of treatment for each case. Each group prepares a subjective, objective, assessment and plan note (SOAP) in order to thoroughly assess and evaluate the patient. This lab helps prepare students for clinical practice.

P3 year includes courses that go beyond drug information to prepare the students for rotations the following year and increase their knowledge in all areas of pharmacy. The seventeen hours of curriculum in the P3 year is shown in Table 3.

Table 3: Subjects of P3

P3 Courses	
• Pharmacy Law • Over the Counter Medications • Drug Literature and Biostatistics • Advanced pharmacotherapy lab • Pharmacogenomics	• Intravenous medications and IV preparation lab • Applied Kinetics • Patient assessment and Lab • Pharmacoeconomics • Professional elective

The P4 year is composed of seven rotations starting in July and ending in May of the following year. Students are divided among six different regions in Texas to complete them. The seven rotations consist of two acute care, one ambulatory care, one institutional practice, one selective focused on patient care and two elective. The minimum time commitment for these rotations is 44-50 hours per week.

After completing these four years each student must take two standardized exams to become licensed pharmacists, the North American Pharmacist Licensure Examination (NAPLEX) and the Multistate Pharmacy Jurisprudence Examination (MPJE). The pharmacy license is only good in the state that the tests were taken in but students have the option to pay to have their test scores transferred to other states.

If a student would like to further their clinical knowledge they have the option to apply for residencies after graduation. A residency is a one year program that is similar to an internship or the rotations during the P4 year. A residency provides a fast paced learning environment to provide the student with the equivalent of three years of practice experience in just one year. All pharmacists interested in pursuing a residency complete the first post-graduate year (PGY1) residency which is a general residency.

After the PGY1 a pharmacist can choose to specialize in a certain area of pharmacy and pursue a second post-graduate year (PGY2) residency allowing them to specialize in a focused area of patient care, such as oncology, infectious diseases, or psychiatry. Pharmacists must apply for these residencies and complete the interview process to be accepted into a residency program. Residencies are very competitive because most programs are limited and can only accept 2-4 pharmacists a year.

In USA there are about 800 residency programs in hospitals, clinics, community practice, or managed care settings.[2] These residencies provide students with the qualifications for positions in hospitals and other health care systems and also distinguish them from other Pharm. D. graduates. The typical pay for residents is $30,000-$40,000 a year, and a typical pharmacist's salary is $90,000-$100,000.

References:

1. The University of Texas at Austin. College of Pharmacy. www.utexas.edu/pharmacy (November 08).
2. American Society of Health-System Pharmacists. Internet: www.ashp.org (November 2008).

TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA: GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO MEDIANTE UNA INNOVACIÓN DOCENTE BASADA EN EL DESARROLLO DE UN TRABAJO GRUPAL.

M. Fernández Arévalo, M.J. León Wasmer
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España

Introducción.

El entorno generado por la inminente implantación del EEES ha supuesto un reto en numerosas universidades europeas (y algunas americanas) en cuanto a aspectos muy diversos. En el área de la docencia, este reto ha implicado que una buena parte del profesorado haya aprovechado la oportunidad ofertada por esta nueva concepción de la universidad para dar forma a muchas de las iniciativas que en la innovación docente se han ido llevando a cabo a lo largo de los años pero que, en la mayoría de las ocasiones, no habían sido plasmadas en estructuras formales.

El área de la Tecnología Farmacéutica resulta ser especialmente interesante para implantar numerosas actividades de innovación docente que les permita al estudiante universitario superar algunos de los problemas que habitualmente se le achacan, como son cierto grado de apatía en el alumnado y la consecuente falta de desarrollo de determinadas habilidades necesarias para su desenvolvimiento académico, personal e, incluso a veces, profesional.

Con la intención de actuar sobre estas cuestiones, la asignatura Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla desarrolló, durante el curso pasado, un cambio en su estrategia docente cuyo objetivo básico era intentar paliar, en la medida de lo posible, las carencias indicadas anteriormente. La estrategia consistió en el desarrollo, por parte de los alumnos y por medio de una actividad grupal, de un caso práctico planteado por ellos mismos.

Como no podía se de otra manera, este cambio fue, inicialmente, tímido; no obstante, vistos los resultados obtenidos durante el curso pasado (2007 / 2008), presentados en diversos foros, se ha decidido ampliar la duración requerida para desarrollar esta actividad durante el presente curso académico.

A su vez, estimamos que resulta fundamental reflexionar acerca de cualquier iniciativa en la docencia de una materia en particular con el objeto de que no se produzcan perturbaciones en el transcurso del año académico. En este sentido, el profesorado debe ser consciente de que la duración del curso es limitada, y que en él deben caber todas las actividades programadas respecto a las tareas docentes del alumno relativas a todas las materias. Si esto no se tiene en cuenta, se corre el riesgo de que una asignatura absorba los recursos del alumnado en detrimento de las demás, con el consiguiente fracaso académico de alumnado. No debemos dejar de pensar que todas las iniciativas que se lleven a cabo en las diversas materias que debe cursar el alumnado tendrán un reflejo no sólo en el desarrollo de competencias varias, sino también en sus expedientes académicos. Y esto será así tanto para los resultados positivos como para los negativos.

Metodología.

Se ha diseñado una estrategia nueva con relación a conseguir una implicación más formal y eficaz del alumnado en su formación dentro del área de la Tecnología Farmacéutica.

La iniciativa se ha estructurado sobre la base de conseguir que el alumno desarrolle cinco competencias genéricas de gran importancia para su posterior desenvolvimiento personal y profesional: (1) buscar información a través de las nuevas tecnologías, (2) trabajar en equipo, (3) tomar decisiones, (4) elaborar informes de manera correcta y (5) debatir en público.

El objetivo último consiste en que el alumno aborde la asignatura de manera que sea capaz de, una vez conocidos y dominados los conceptos teóricos de la materia, poder realizar un abordaje práctico de la misma.

Para ello deberán, trabajando en equipo, recabar y manejar la información necesaria para ser capaces entre todos de plantear, estructurar y resolver un caso real en el campo de la Tecnología Farmacéutica.

Cada grupo de trabajo estará coordinado por un alumno elegido entre ellos, que actuará en calidad de portavoz de grupo. En la figura 1 se recogen los portavoces de grupos del curso pasado.

Figura 1. Portavoces de grupos de trabajo.

Habida cuenta que son ellos mismos quienes deberán ser capaces de determinar cuál será su campo concreto de trabajo, deberán ir estudiando la materia tratada, hasta fechas establecidas de antemano para realizar esta actividad, para establecer cuáles son los

conocimientos de los que disponen y cuáles necesitan localizar para poder estructurar y resolver los casos que el grupo va planteando. Lógicamente, estos casos irán aumentando su complejidad y su necesidad de relacionar conceptos a medida que se vaya avanzando en el programa.
Con el objetivo de compatibilizar esta actividad con la totalidad del trabajo que debe abordar el alumno durante el curso académico, se han tenido en consideración los siguientes condicionantes:
Se ha establecido reducir en un 20 % las clases magistrales para poder llevar a cabo esta iniciativa. Así, la actividad se podrá realizar en la franja horaria y en el aula asignada a esta asignatura (ver figura 2). Estimamos que esto es lo que posibilita la compatibilidad con la totalidad de las actividades involucradas en el curso académico. Lógicamente esto implica, por parte del profesorado, una reflexión acerca de qué parte de los contenidos de ciertos temas el alumnado deberá ser capaz de buscar en fuentes de solvencia reconocida, con el objeto de poder llevar a cabo una reducción proporcional del programa y liberar, así, el tiempo necesario para realizar la actividad.

Figura 2. Grupo trabajando en el aula.
Con la intención de llevar a cabo el proceso de manera formal, normalizando los informes, se les hizo entrega de una plantilla que debían emplear para la entrega de los casos, en sus diferentes estadios de desarrollo. El modelo se recoge en la figura 3.

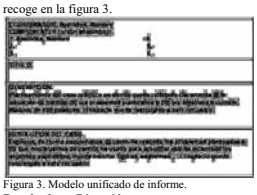


Figura 3. Modelo unificado de informe.
Resultados y Discusión.
Cerca del 70 % de los alumnos matriculados terminaron la actividad grupal, cumpliendo con las fechas de entrega establecidas previamente. Esto supuso trabajar con unos 6 grupos de trabajo con una composición media de 5 – 6 alumnos.
Todos los casos terminaron en tiempo y forma, y fueron entregados a todos los alumnos por medio de los portavoces de grupo. Los grupos tuvieron tiempo de analizarlos para seleccionar, por medio de votación, los tres trabajos finalistas de entre todos los casos entregados.
Los portavoces de los grupos finalistas defendieron sus casos y, finalmente, volvieron a votar para determinar el caso ganador, a cuyos componentes se les hizo entrega de un premio de carácter institucional, otorgador por el Rectorado de la Universidad de Sevilla (figura 4).

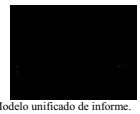


Figura 4. Modelo unificado de informe.
A modo de datos subjetivos, valgan como ejemplos lo recogido en la figura 5:

Figura 5. Puntuación otorgada para el grado de satisfacción de la actividad (izda.) y capacidad para relacionar conceptos (dcha.).
Como dato objetivo se muestra la siguiente figura (figura 6):

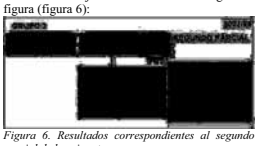


Figura 6. Resultados correspondientes al segundo parcial de la asignatura.
Respecto al impacto de la activad, queremos resaltar que el 89 % de los presentados al 2º parcial aprobó el examen, y de ellos, el 80 % fueron alumnos pertenecientes a los grupos de trabajo.

Bibliografía

M. Fernández Arévalo, M.J León Wasmer, F. Fernández Cortés, "Innovación docente en tecnología farmacéutica", I Jornada de innovación docente en ciencias de la salud, Sevilla, 13 de marzo de 2008.
M. Fernández Arévalo, M.J León Wasmer, "Tecnología Farmacéutica y EEES. Es posible", Intercambio de experiencias ECTS de las Facultades de Farmacia Andaluzas, Granada, 24 de junio de 2008.
M. Fernández Arévalo, M.J. León Wasmer, "Tecnología Farmacéutica: cómo gestionar el conocimiento a través de actividades EEES", 2nd International Congress in High Education in Pharmaceutical Sciences, Santiago de Compostela, 16 – 18 de julio de 2008.

VALORACIÓN DE LA FORMACIÓN RECIBIDA Y DE LAS COMPETENCIAS PROFESIONALES DEL FARMACÉUTICO. PUNTO DE VISTA DEL ALUMNO.

Begoña Calvo[1], Enrique Etxebarría[2]
[1]Area de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. [2]Departamento de Fisiología.
Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco.
Pº Universidad, 7. 01006 Vitoria

Introducción

La Universidad española se encuentra inmersa en la elaboración y adaptación de los planes de estudio para ajustarse a los requerimientos del nuevo Espacio Europeo de Educación Superior. El objetivo esencial de estos nuevos planes es garantizar la adquisición de competencias profesionales por parte de los alumnos, para lo cuál es preciso cambiar el enfoque tradicional basado exclusivamente en la memorización de contenidos, y modificar los métodos de aprendizaje así como los procedimientos de evaluación.

Asimismo, las Directrices para la elaboración de títulos de Grado y Máster" del Ministerio de Educación y Ciencia, establecen que estas enseñanzas tendrán como finalidad entre otras "*una formación orientada a la preparación para el ejercicio de las actividades de carácter profesional*" (1).

La ficha técnica del título de Farmacéutico (2) establece un listado de 16 competencias cuya adquisición debe ser garantizada por las universidades. Diez de ellas presentan un enfoque de la labor profesional del farmacéutico centrada en el paciente, mientras que las seis restantes están enfocadas a la producción y control de medicamentos, así como a los análisis clínicos, de alimentos e higiénico-sanitarios, entre otras. Esta distribución estaría en concordancia con la distribución de las salidas profesionales del farmacéutico.

Según datos procedentes del Libro Blanco de la Titulación de Farmacia y del Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, el número de Colegiados actual en España es de, aproximadamente, 53.000. De ellos, el 63,5% trabajan en Oficinas de Farmacia; el 23% en la industria farmacéutica; el 2,5% en Servicios de Farmacia Hospitalaria y el resto en otras modalidades profesionales.

Por otra parte, en la mayor parte de los planes de estudio españoles los créditos de los tres primeros años están destinados principalmente a asignaturas relacionadas con la Química y la Física, reduciendo la posibilidad de profundizar en la adquisición de competencias profesionales propias del farmacéutico.

Objetivo y Metodología

Con el fin de contribuir a la evaluación y mejora del Plan de Estudios de Graduado en Farmacia, se ha realizado una valoración de la formación recibida durante la Licenciatura mediante la recogida de opiniones de los alumnos del último curso de Farmacia de la Universidad del País Vasco en el curso 2007/08.

Para ello se ha llevado a cabo una encuesta en la que se ha solicitado a los alumnos que valoren los diferentes métodos de enseñanza-aprendizaje utilizados y puntuen la utilidad de cara a su futuro profesional de la formación recibida en las diferentes asignaturas de su plan de estudios (enfoque de la materia y su aplicabilidad a la adquisición de competencias profesionales), tanto para las competencias específicas como transversales.

Resultados

En cuanto a la metodología utilizada en su proceso de enseñanza-aprendizaje, una amplia mayoría de los alumnos encuestados señala que, se hace bastante o mucho énfasis en las *Teorías y conceptos* (67 %) , por el contrario, el énfasis en *Conocimientos prácticos y metodológicos* es considerablemente menor (34 %) así como el *Aprendizaje basado en problemas* (17 %) (Figura 1).

Por lo que se refiere a las fuentes de información, la mayoría (70 %) indican al Profesor como la principal fuente de información.

La mayoría de los alumnos utiliza poco la bibliografía recomendada y apenas consultan Internet para sus estudios. Los que utilizan Internet, lo hacen para consultar las páginas web de las diferentes asignaturas.

Como material de apoyo, utilizan fundamentalmente las fotocopias de los esquemas de clase , proporcionados por los profesores.

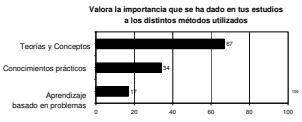


Fig. 1.- *Metodología de enseñanza utilizada*

En la tabla 1 se recoge la valoración (escala de 0 a 10), de los alumnos de la utilidad para su futuro profesional de las asignaturas troncales de la titulación.

Conclusiones

Los alumnos consideran muy importante para su futuro profesional la formación orientada a la clínica y a la obtención y control de medicamentos, mientras que la excesiva formación que reciben en el campo de la Química, la Física y otras materias no específicamente biosanitarias, les restaría tiempo para completar su formación acorde a las necesidades del farmacéutico.

Sólo un 44 % piensa que los estudios de Farmacia son una buena base para llevar a cabo su trabajo profesional en el futuro, por lo que en su opinión debe reorientarse los contenidos.

Los contenidos formativos no cubren las competencias requeridas a los titulados

Bibliografía

1.- RD 1393/2007, de 29 de Octubre, por el que se establece la Ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales. BOE 30 Octubre 2007.

2.- Orden CIN/2137/2008, de 3 de julio, por la que se establecen los requisitos para la verificación de los títulos universitarios oficiales que habilitan para el ejercicio de la profesión de Farmacéutico. BOE 19 Julio 2008.

Tabla 1.- Valoración (0 a 10) de los alumnos de la utilidad de las materias para su futuro profesional

Valoración	Asignaturas	Créditos
Puntuación < 5	Física aplicada	5.5
	Matemática aplicada	8
	Psicología y Sociol Sanitaria	4.5
	Biología vegetal	7.5
	Química Inorgánica	7.5
	Citología e Histología	7
	Técnicas instrumentales	4.5
Puntuación ≥ 5 - < 8	Físico Química	7
	Bioquímica	10
	Nutrición y Bromatología	8
	Toxicología	7.5
	Gestión y Planificación	5
	Química Orgánica	14
	Farmacognosia	7
	Anatomía	6
	Fisiología	9
	Química Analítica	12
	Fisiopatología	5
	Química Farmacéutica	12
	Bioquímica Clínica	7.5
	Inmunología	4.5
	Microbiología y Parasitología	19
	Legislación y Deontología	4.5
Puntuación ≥ 8	Salud Pública	6
	Tecnología Farmacéutica	17
	Biofarmacia y Farmacocinética	9
	Farmacia Clínica y Farmacoterapia	9
	Farmacia Galénica	9
	Farmacología	17

ÍNDICE DE AUTORES

ÍNDICE DE AUTORES

A

Aberturas, M.R. PO-58
Abizanda, G. PO-60
Agüeros, M. CO-11
Aguilar Díaz, J.E. PO-04, PO-51, PO-58
Alcalá, J. PO-27
Alonso, L. PO-13
Alonso, V. PO-05
Alós, M PO-71
Álvarez, J. PO-48
Álvarez-Fuentes, J. CO-05, PO-21, PO-22, PO-26
Alvarez-Lorenzo, C. CO-01, CO-06, PO-12, PO-45, PO-46, PO-47
Ansorena, E. PO-20
Antequera, D. CO-02
Aragón, N. PO-35
Araíco, A. PO-80
Araújo, M.L. PO-14
Areses, P. CO-11
Arias, J.L. CO-08, PO-17, PO-18, PO-43
Aymerich, M.S. PO-20

B

Balaguer-Fernández, C. CO-04, PO-06
Ballesteros, M.P. PO-57
Barcia, E. PO-29, PO-72
Bautista Chávez, L. PO-69
Beloqui, A. PO-30
Benítez del Castillo, J.M. PO-32
Benito, E. PO-51
Bermejo, M. CO-12,CO-15, PO-01, PO-05, PO-75
Bermell, M.A. PO-05
Blanca, E. PO-59
Blanco-Prieto, M.J. PO-11, PO-20, PO-33, PO-40, PO-60
Bouzas P.R. PO-66
Bravo-Osuna, I. CO-03
Braza, A.J. PO-79
Briones Cuesta, E. PO-78
Bucio, E. PO-47
Burillo, G. PO-47
Bustamante, P. PO-34, PO-35, PO-36

C

Cabrioulu, M. PO-19
Calatayud-Pascual, M.A. CO-04, PO-06
Calvo, A. CO-10
Calvo, B. PO-81, PO-86
Camacho, A.I. PO-14
Cameán, M. PO-21, PO-22
Campanero, M.A. CO-11, PO-11
Canal, C. PO-73
Canal, J.M. PO-73
Caraballo, I. PO-25, PO-31
Cárcel-Trullols, J. PO-80
Carro, E. CO-02
Casabó, V.G. CO-15, PO-75
Castro-Hernández, E. CO-05
Catena, R. CO-10
Cebrián, G. PO-18
Centelles, A. PO-01

Checa-Casalengua, P. CO-03
Chianella, I. CO-01
Cifuentes, C. PO-31
Clares, B. PO-08, PO-27, PO-50
Claro-Cala, C. PO-49
Colino Gandarillas, C.I. PO-78
Colombo, P. P-01
Concheiro, A. CO-01, CO-06, PO-12, PO-45, PO-46, PO-47
Contreras Claramonte, M.D. PO-59, PO-65
Cózar-Bernal, M.J. CO-05, PO-21, PO-22, PO-26

D

Da Costa Martins, R. PO-38
Dannies, P PO-07
Daza, V. PO-25
De las Heras, B. PO-32
Del Pozo-Rodriguez, A. CO-07
Delgado, D. CO-07
Dhrimeur, W. PO-61
Díez-Sales, O. PO-09, PO-19
Dios-Viéitez, M.C. PO-68
Doménech, J. PO-23

E

Echevarría, E. CO-07
Elizondo, E. PO-33, PO-40
Escalera, B. PO-34, PO-35
Escobar-Chávez, J.J. PO-09
Escribano, E. PO-23, PO-24
Escudero, J.J. PO-10
Espada García, J.I. PO-69
Estella-Hermoso de Mendoza, A. PO-11
Etxebarría, E. PO-86

F

Fadda, A.M. PO-19
Fariña, J.B. PO-02, PO-07, PO-16, PO-56
Femenía-Font, A. CO-04, PO-06
Fernández, A. PO-72
Fernández, M. PO-29, PO-72
Fernández-Arévalo, M. CO-05, PO-21, PO-22, PO-26, PO-85
Fernández-Pacheco, R. PO-24
Ferrero, C. PO-10
Flores-Mosquera, M. CO-05
Formiga, F. R. PO-60
Franco Gil, Mª.E. PO-52

G

Gago Guillan, M. PO-53
Gallardo, V. CO-08, PO-08, PO-17, PO-27, PO-43, PO-50, PO-55, PO-64
Gálvez, P. PO-08
Gamazo, C. PO-14, PO-33, PO-38, PO-40
Gañán-Calvo, A. CO-05
Ganem-Quintanar, A. PO-09
Garbayo, E. PO-20, PO-60
Garcia, A. PO-84
García, P. PO-27
Garcia, X. PO-23
García Arranz, M. PO-67
García Celma, M.J. PO-73
Garcia-Montoya, E. PO-04
García-Olmo, D. PO-67
Garrido, M.J. CO-09, CO-14
Garrigues, T.M. PO-71

Gascón, A.R. CO-07, PO-30, PO-54
Gil-Alegre, M.E. PO-39, PO-58, PO-69
Gomez, I. PO-51
Gómez-Amoza, J.L. PO-12, PO-13
Gómez-Carracedo, A. PO-12
Gonçalves, T. PO-25, PO-31
González López, F. CO-13, PO-74
González, D. PO-33, PO-40
Gonzalez-Alvarez, I. CO-12, CO-15, PO-01, PO-05, PO-75
Gonzalez-Alvarez, M. CO-12, PO-05, PO-75
González-Rodríguez, M.L. PO-61, PO-62
Goyanes, A. PO-42
Gragera, R. PO-63
Guerrero, M.D. PO-21, PO-22
Gutiérrez Millán, C. PO-44
Guzmán, M. PO-32, PO-63

H

Hernán, D. PO-58
Hernández, P.J. PO-66
Hernández, B. PO-16
Hernández, R.M. CO-02, CO-10, PO-28, PO-54
Herráez, M. PO-09
Herrero-Vanrell, R. CO-03, PO-32
Holgado, M.A. CO-05, PO-21, PO-22, PO-26

I

Ibáñez, M.E. PO-50
Ibarra, M.R. PO-24
Igartua, M. PO-54
Imbuluzqueta, E. PO-33, PO-40
Infante, D. PO-64
Irache, J.M. CO-11, PO-14, PO-38, PO-41, PO-68

J

Jesús Valle, M.J. de CO-13, PO-74
Jiménez Torres, N.V. PO-76, PO-77
Jiménez-Castellanos, M.R. PO-10, PO-49

L

Lanao, J.M. P-02, PO-44, PO-78
Lanciego, J.L. PO-20
Landín, M. PO-37
Lara Villoslada, F. PO-55, PO-64
Lastra, C.F. PO-79, PO-82, PO-83, PO-84
Lehr, C.M. PO-71
León Wasmer, M.J. PO-85
Liras, A. PO-67
Llabrés, M. PO-02, PO-03, PO-07, PO-16
López de Cerain, A. PO-41
López, G. PO-64
López-Castellano, A. CO-04, PO-06
López-Montero, E. PO-46
López-Viota, M. CO-08, PO-17, PO-43
Lucero, M.J. PO-48
Luque-Ramos, M.A. CO-08

M

Manconi, M. PO-19
Manku, M. CO-15
Margarit Bellver, M.V. PO-15, PO-66
Marín Boscá, M.T. PO-15
Mariño, E.L. PO-79, PO-82, PO-83, PO-84
Marquina, C.I. PO-24

Marra, F. CO-04
Martín Sabroso, C. PO-39, PO-58, PO-69
Martin Villena, M.J. PO-55
Martín-Banderas, L. CO-05, PO-26
Martín-Villodre, A. PO-71
Martínez-Pacheco, R. PO-12, PO-13, PO-42
Martone, M. PO-83
Mateu, V. PO-03
Melero, A. PO-71
Merino, V. CO-04, CO-12, CO-15, PO-01, PO-06, PO-09, PO-19, PO-21, PO-22
Merino-Bohórquez, V. PO-21, PO-22
Merino-Sanjuán, M. PO-09, PO-19, PO-76, PO-77
Miguéliz, I. PO-67
Miñarro, M. PO-04
Mingorance Álvarez, M.D. PO-65
Miralles Arnau, S. PO-76, PO-77
Modamio, P. PO-79, PO-82, PO-83, PO-84
Molina Martinez, I.T. CO-03, PO-32
Mollinedo, F. PO-11
Molpeceres, J. PO-58
Montaner, M. PO-51
Morales, M.E. PO-50, PO-55, PO-64
Morales, M.L. PO-66
Moreno, D. CO-09, CO-14
Moya , M.D. PO-48
Mura, S. PO-19
Murua, A. PO-28

N

Nácher, A. PO-09, PO-19, PO-76, PO-77
Nava-Ortiz, C.A.B. PO-47
Navarro, A. CO-13, PO-73, PO-74
Navarro, C. CO-15
Navarro, G. PO-70
Navarro, I. CO-09, CO-14
Negro, S. PO-29, PO-72
Nicolás, B. PO-82
Nicoli, S. CO-04
Nobel, D. PO-83
Nogueiras-Nieto, L. CO-06

O

Ochoa, I. PO-54
Ogris, M. P-03, PO-70
Ojer, P. PO-41
Oliva, A. PO-02, PO-56
Olmedillas, S. PO-67
Oltra-Noguera, D. CO-12, PO-75
Orive, G. CO-02, CO-10, PO-28
Ossété, H. PO-57
Otero-Espinar, F.J. CO-06, PO-53
Ovadi, J. CO-12

P

Padula, C. CO-04
Pagán, R. PO-16
Pecchio, M. PO-68
Pedraz, J.L. CO-02, CO-07, CO-10, PO-28, PO-30, PO-54
Pelacho , B. PO-60
Peña, M.A. PO-34, PO-35, PO-36
Peñuelas, I. CO-11
Pérez, G. PO-33
Pérez-Lozano, P. PO-04

Peris, J.E. PO-80
Piletsky, S.A. CO-01
Planas, E. PO-51
Portero, A. CO-02
Poupon, E. PO-18
Prosper, F. PO-60
Puebla González, M.M. PO-15

Q

Queralt, J. PO-24
Quincoces, G. CO-11

R

Rabasco, A.M. PO-61, PO-62
Rajabi-Siahboomi, A.R. PO-31
Reíllo, A. PO-36
Renedo, M.J. PO-68
Rey-Rico, A. PO-45
Rivas Esteban, P. PO-39
Rodríguez Bayón, A.Mª. PO-52
Rodríguez Galán A. PO-66
Rodríguez Galán I.C. PO-66
Rodríguez, J.M. CO-07
Rodríguez-Gil, A. CO-05
Romero, M.D. PO-27
Rosa dos Santos, J.F. PO-46
Rowe, R.C. PO-37
Ruiz, M.A. PO-08, PO-17, PO-18

S

Sá Barreto, L.C.L. PO-13
Saadeddin, A. PO-80
Sala, S. PO-40
Salas, S. PO-21, PO-22, PO-61
Sánchez Navarro, A. CO-13, PO-74
Sánchez, A. B. PO-34
Sánchez, S. PO-63
Sandez-Macho, I. CO-06
Santi, P. CO-04
Santos, E. CO-10
Santoveña, A. PO-03, PO-07
Sayalero Marinero, M.L. PO-44
Schaefer, U.F. PO-71
Sebarroja, J. PO-79, PO-83, PO-84
Sekkat, H. PO-65
Simister, C. PO-84
Solinís, M.A. CO-07, PO-30
Somolinos, M. PO-16
Soriano, M.I. PO-56
Souto, C. PO-42
Spuch, C. CO-02
Staab, A. P-04
Suñé-Negre, J.M. PO-04

T

Tavares Silva Fernandes, D. PO-39
Terres, L. PO-51
Ticó, J.R. PO-04
Torrado, J.J. PO-57
Torrado-Santiago, S. PO-57
Torres Suárez, A.I. PO-39, PO-69
Torrado-Susana, S. PO-57
Torres, A.I. PO-58
Torres-Labandeira, J.J. PO-46

Torres-Molina, F. PO-80
Trocóniz, I.F. CO-14
Tros de Ilarduya, C. CO-09, PO-67, PO-70
Tucker, B. CO-03

V

Valdivia, J.G. PO-24
Vauthier, C. PO-38
Veciana, J. PO-33, PO-40
Ventosa, N. PO-33, PO-40
Vicario de la Torre, M. PO-32
Vico, E. PO-32
Villasmil, S. PO-61, PO-62

W

Wagner, E. PO-70

Y

Yañez, F. CO-01
York, P. PO-37
Young, M.J. CO-03

Z

Zalba, S. CO-09, CO-14
Zhu, Y. PO-07
Zúñiga, L. PO-81