XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. 25 aniversario SEFIG

6-8 febrero 2013

Universidad Miguel Hernández de Elche

Alicante

XI Congreso de la Sociedad Española de

Farmacia Industrial y Galénica.

25 aniversario SEFIG

Universidad Miguel Hernández de Elche

Hotel Meliá Alicante

6-8 febrero 2013

Libro de Abstracts del XI Congreso de la SEFIG,
6-8 febrero 2013, Alicante, España
ISBN - 10: 84-695-6868-X
ISBN - 13: 978-84-695-6868-2

Presentación

En representación del Comité Organizador quiero daros la bienvenida a Alicante en este año de celebraciones para todos nosotros. Por una parte se celebra el 25 aniversario de la SEFIG y por otro los 15 años de nuestra joven Universidad. Estas fechas señaladas son, habitualmente, motivo de alegría y también oportunidades para la reflexión, la revisión de lo ya hecho y la planificación de las nuevas metas y retos por delante. Con esa filosofía y con toda nuestra ilusión el comité organizador y científico ha elaborado un programa que quiere reflejar el estado más actual de la investigación en Farmacia y además ofrecer espacio para el debate y la expresión de opiniones y propuestas. En una etapa en que la profesión Farmacéutica se cuestiona desde tantos ámbitos quisiéramos que este congreso sirviera para dejar constancia de nuestras capacidades y nuestra contribución esencial en el mundo del medicamento y la salud en general. Sigamos mirando alto para poder decir como el poeta oriolano "Alto soy de mirar a las palmeras".

Queremos agradecer a los ponentes su contribución a la excelencia científica del congreso y a las entidades colaboradoras por su apoyo. Como Presidenta del Comité Organizador tengo que expresar mi reconocimiento y gratitud a mis compañeros por su esfuerzo para que el programa, los actos sociales, la organización logística y el material para los congresistas sean de la mayor calidad posible. Deseamos que vuestra participación sea inolvidable a nivel científico y personal y que Alicante, como sede y el Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Miguel Hernández, como anfitriona, hayan alcanzado vuestras expectativas en este 25 aniversario.

Mª del Val Bermejo Sanz
Presidenta del Comité Organizador

Comité de Honor

Excma. Sra. Dña Sonia Castedo Ramos

Alcaldesa de Alicante

Sr. D. Jesús T. Pastor Ciurana

Rector Magnífico de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Sr. D Jorge Manzanares Robles

Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Sra. Dña. Mª del Carmen Peña López

Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

Sr. D. Jaime J. Carbonell Martínez

Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante

Comité Organizador

Presidenta: Mª del Val Bermejo Sanz

Secretaria: Isabel González Álvarez

Tesorera: Marta González Álvarez

Vocales

Víctor Mangas Sanjuán

Elsa Lopez Pintor

Veronica Vivancos Gómez

Mª Teresa Martínez Martínez

Sarín Colon Useche

Isabel Lozoya Agulló

Ignacio González García

Pedro García Salom

Juan Laborda Álvarez

Comité Científico

Presidenta:

Isabel González Álvarez, UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Vocales:

Mª ROSARIO ABERTURAS RAMOS	UNIVERSIDAD DE ALCALA
JOAQUIM ALMELA NAVARRO	FARMAPROJECTS
JOSE LUIS ARIAS MEDIANO	UNIVERSIDAD DE GRANADA
Mª JOSE BLANCO PRIETO	UNIVERSIDAD DE NAVARRA
CLARA I. COLINO GANDARILLAS	UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
ARACELI DELGADO HERNANDEZ	UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
MANUEL GUZMAN NAVARRO	UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Mª ROCIO HERRERO VANRELL	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
ALICIA LOPEZ CASTELLANO	UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA
Mª CARMEN LOZANO ESTEVAN	UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
Mª JESUS LUCERO MUÑOZ	UNIVERSIDAD DE SEVILLA
EDUARDO MARIÑO HERNÁNDEZ	UNIVERSIDAD DE BARCELONA
MATILDE MERINO SANJUAN	UNIVERSIDAD DE VALENCIA
CONSUELO MONTEJO RUBIO	UNIVERSIDAD CEU SAN PABLO
BEGOÑA SEIJO REY	UNIVERSIDAD SANTIAGO DE COMPOSTELA
ALICIA RODRIGUEZ GASCON	UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO

Programa
6 febrero 2013

8:30-9:30 Entrega documentación

9:30-10:20 Sesión Inaugural del IX Congreso

10:30- 14:00 Primera Sesión
Moderadoras: Isabel González-Alvarez y Marival Bermejo

10:30-11:20 *Conferencia Plenaria*. Academia and Industry Consortium: Collaborative Research on Drug Development. **Prof. Shinji Yamashita. Setsunan University, Japan.**

11:30-12:00 Pausa Café: Primera Sesión de Posters

12:00-12:50 *Conferencia Plenaria*. The Science-Policy Dynamic Insuring Pharmaceutical Product Quality and Interchangeability: BCS Discovery, Development, Regulation. **Prof. Gordon Amidon. University of Michigan, USA**.

13:00-13:50 *Conferencia Plenaria*. Intestinal permeability considerations when formulating low-solubility drugs. **Prof. Arik Dahan. Ben-Gurion University of the Negev, Israel.**

14:00-15:50 Almuerzo

16:00-17:50 Segunda Sesión: Mesa Redonda-Patrocinada por SPLC-CRS: "Drug Delivery Systems: From bench to Clinic".
Moderadora: Prof. Ruth Duncan

Ponentes: Prof. Ruth Duncan. Cardiff University (Prof. Emerita). Introduction.

Dra María José Vicent. Centro de Investigación Príncipe Felipe . Oral Delivery.

Prof Maria J. Alonso. Universidad Santiago de Compostela. Novel Polymers.

Dra. Mercedes Pozuelo, Bioncotech, BO-110, a new concept of anticancer therapy

Prof Atila Hincal. Presidente TUFTAD. University of Hacettepe (Prof. Emeritus). Challenges for pharmaceutical formulation scientists on the nano-sized drug delivery systems

18:00-18:30 Entrega Premio Investigación SEFIG
18:30-20:30 ASAMBLEA GENERAL SEFIG
21:00-22:30 Recepción-Vino Bienvenida

7 febrero 2013

09:00- 11:00 Tercera Sesión
Moderadoras: Rosa Hernández y Virginia Merino

9:00-9:50 Conferencia Plenaria. La nanotecnología farmacéutica: ¿creamos, copiamos o innovamos? **Prof. Mª Jose Alonso Fernández. Universidad Santiago de Compostela**

10:00-10:50 Conferencia Plenaria. Polymer Therapeutics as Nanomedicines: Now and Future. **Prof. Ruth Duncan. Cardiff University, United Kingdom.**

11:00- 14:00 Cuarta Sesión
Moderadores: Antonio Rabasco y Marta González-Alvarez

11:00-11:35 Comunicaciones orales: Tecnología Farmacéutica. I

Nueva generación de nanopartículas elaboradas a base de ésteres de sorbitán (Span® 80): potencial aplicación en terapia génica. A Pensado, GK Zorzi , ES Carvalho, A Sánchez , B Seijo.

The effectiveness of edelfosine lipid nanoparticles in enhancing the drug cytotoxicity in breast cancer cells. A Aznar Gómez, B Lasa-Saracíbar, A Estella-Hermoso de Mendoza, MJ Blanco-Prieto.

In vivo administration of VEGF-releasing biodegradable nanospheres in a mouse model (APP/Ps1) of Alzheimer's disease. E Herrán, R Perez- Gonzalez, M Igartua, JL Pedraz, E Carro, RM Hernández.

11:35-12:00 Pausa Café: Segunda Sesión de Posters.

12:00-12:50 Conferencia Plenaria. Novedades en Bioequivalencia. **Dr. Alfredo Garcia Arieta. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.**

13:00 -14:00h Comunicaciones orales: Tecnología Farmacéutica. II

Optimización de la actividad de doxorrubicina en cáncer de mama mediante una nanoplataforma polimérica biodegradable. JL. Arias, C Melguizo, J Prados, R Ortiz, L Cabeza, MA Ruiz, R Luque, B Gónzalez, V Gallardo, A Aránega.

Sistemas supramoleculares de poloxamina-ciclodextrina-simvastatina como promotores de diferenciación de células madre a osteoblastos. SMN Simões, F Veiga, JJ Torres-Labandeira, ACF Ribeiro, A Concheiro, C Alvarez-Lorenzo.

Nanopartículas de poli-caprolactona como sistema de liberación controlada de fármacos para aplicación tópica. A Melero, A Ourique, A Pohlmann, S Guterres, R Beck, UF Schaeffer.

Acquiring knowledge on antibacterial effect of bioactive glass by neurofuzzy logic. MM. Echezarreta, M Landin.

Long-term controlled brain delivery of microencapsulated GDNF induces functional and structural recovery of the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian monkeys. E Garbayo, E Ansorena, H Lana, JL Lanciego, MJ Blanco-Prieto.

14:00-15:50 Almuerzo

16:00-18:00 Quinta Sesión
Moderadores: Iñaki Fernández de Trocóniz y Vicente G. Casabó

16:00-16:50 Conferencia Plenaria. Terapia Personalizada en la Infección por el VIH: Aplicación de Criterios Farmacocinéticos y Farmacogenéticos. **Prof. Mª Jose García Sánchez. Universidad de Salamanca.**

17:00-17:50 Comunicaciones orales: Biofarmacia y Farmacocinética.

Estudios farmacológicos con D-pencilamina: correlación de niveles plasmáticos y cerebrales vs. eficacia clínica. A Orrico, L Martí-Prats, MJ Cano-Cebrián, L Granero, A Polache y T Zornoza.

Modelos basados en reglas y QSPR para la predicción de la permeabilidad en Caco-2. MA Cabrera-Pérez, H Pham-The, M Bermejo, I González-Álvarez y T Garrigues.

Análisis de un modelo de tres compartimentos para el estudio del trasporte y metabolización de fármacos en monocapas de células Caco-2. M. Llabrés.

Development of a PBPK model for the anticancer drug vivia009 and its main metabolite administered as a new delivery system in rats. M. Matoses-Osborne, C Tudela, MJ Garrido, TA Bennet, J Ballesteros, L Caveda, IF Trocóniz.

Modificación del modelo no lineal para el cálculo de la permeabilidad en monocapas celulares. V Mangas-Sanjuan, I Gonzalez-Alvarez, VG Casabó, M Bermejo.

18:00-18:20 Pausa Café: Tercera Sesión Póster

18:30-20:00 Acto Celebración 25 aniversario SEFIG.

21:30 h – Cena de Gala

8 febrero 2013

09:00-14:30 Cuarta Sesión

9:00-11:30 Mesa Redonda. Título: Farmacia Clínica, Atención Farmacéutica, Farmacia Asistencial y ....

Moderador: Prof. Eduardo L. Mariño Hernández. Catedrático de Farmacia Galénica Director Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Universidad de Barcelona.

Ponentes: Prof. Ana María Santoveña Estévez. Vicedecana de la Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna

Prof. Cecilia Fernández Lastra. Catedrática de Farmacia Clínica y Farmacoterapia.Coordinadora de Farmacia Asistencial. Universidad de Barcelona

Prof. Maria Luisa González Rodríguez. Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla

Prof. Diego Marro Ramón. Director, Máster Universitario en Atención Farmacéutica y Farmacoterapia. Universidad de San Jorge

11:30-12:00 Pausa Café: Cuarta Sesión Póster

12:00-13:00 Comunicaciones orales: Docencia, Atención Farmacéutica y Farmacia Clínica
Moderadores: Eduardo Mariño y Alicia Rodriguez

Riesgo Cardiovascular de los Antiinflamatorios No Esteroideos y su repercusión en el manejo del paciente con dolor e inflamación. E Lopez

La Dermofarmacia en la formación del Farmacéutico en la Universidad de Sevilla. MJ Lucero.

Primera valoración del 41st ESCP Symposium on Clinical Pharmacy. Barcelona 2012. EL Mariño, P Modamio, C Fernández Lastra.

13:00-14:30 Mesa Redonda: Reflexión sobre el proceso de implantación de los nuevos Grados en Farmacia: repercusión en las enseñanzas del Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Moderadora Prof. Alicia Rodriguez. Universidad del País vasco

Ponentes: Prof. Alicia Rodríguez. Universidad del País Vasco. Estado actual de la implantación del Grado en Farmacia

Prof. José B Fariña. Universidad de la Laguna. Efecto de la implantación del grado en Farmacia en los objetivos formativos de la Tecnología Farmacéutica: ¿Qué hay de nuevo?

Prof. Teresa Garrigues. Universidad de Valencia. Retos y oportunidades para la movilidad en el Grado en Farmacia

14:30 Clausura del Congreso

Conferencias Plenarias

The Science-Policy Dynamic Insuring Pharmaceutical Product Quality and Interchangeability: BCS Discovery, Development, Regulation

Gordon L. Amidon
Charles R. Walgreen, Jr. Professor of Pharmacy
And Pharmaceutical Sciences
College of Pharmacy
The University of Michigan
Ann Arbor, Michigan 48109-1065

It has been over 10 years since the FDA published the Biopharmaceutics Classification System (BCS) guidance (http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm) This guidance describes how drug permeability and solubility and product dissolution can be used to classify drugs and drug products and determine *in vitro* bioequivalence (BE) standards for oral drug products. This guidance was based on FDA and Swedish MPA supported research and subjected to extensive public discussion and debate before regulatory implementation(1). Theoretical analysis and experimental results indicated that a drug permeability/solubility classification scheme can be used as a basis to determine improved oral drug product dissolution standards, for therapeutic equivalence, that both reduce regulatory requirements and **improve** pharmaceutical product quality.

In the case of BCS Class I drugs in rapidly dissolving drug products, gastric emptying is the rate-determining step for drug absorption, plasma levels are insensitive to formulation changes and no IVIVC is expected. Thus bioequivalence (BE) can be assured by product dissolution!

Further extensions of waivers of *in vivo* BE studies to Class 2 and Class 3 drug and drug products can be developed based on more detailed dissolution considerations particularly *in vitro* dissolution methods based on the *in vivo* dissolution processes. For example the European regulatory agency (EMA) allows biowaivers for BCS Class III drug products.

This presentation will provide an overview of the development, current status and future extensions of the BCS-based approach to regulating oral drug product bioequivalence based on an *in vitro* dissolution standard. I will also highlight the process of science-based regulatory change, the significance of regulatory research, and the importance of public discussion and debate of regulatory science developments and issues.

1. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P Shah and J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, Pharm. Res., 12, 413 (1995).

Intestinal Permeability Considerations when Formulating Low-Solubility Drugs: The Solubility-Permeability Interplay

Arik Dahan, Ph.D.
Department of Clinical Pharmacology
School of Pharmacy
Ben-Gurion University of the Negev
Israel
E-mail: arikd@bgu.ac.il

While each of the two key parameters of oral drug absorption, the solubility and the permeability, has been comprehensively studied separately, the relationship and interplay between the two has been largely ignored. For instance, when formulating a low-solubility drug using various solubilization techniques: what are we doing to the apparent permeability when we increase the solubility? Permeability is equal to the drug's diffusion coefficient through the membrane times the membrane/aqueous partition coefficient divided by the membrane thickness.

The direct correlation between the intestinal permeability and the membrane/aqueous partitioning, which in turn is dependent on the drug's apparent solubility in the GI milieu, suggests that the solubility and the permeability are closely associated, exhibiting certain interplay between them, and the current view of treating the one irrespectively of the other may not be sufficient.

In this lecture, I will describe the research have been done thus far, and present new data, to shed light on this solubility-permeability interplay. It has been shown that decreased apparent permeability accompanied the solubility increase when using different solubilization methods. On the other hand, we have recently revealed that when increasing the apparent solubility by supersaturation e.g. via amorphous solid dispersions, the solubility-permeability interplay is circumvented, and higher drug flux through the membrane and overall absorption is achieved.

Overall, the solubility-permeability interplay cannot be ignored when using solubility-enabling formulations; looking solely at the solubility enhancement that the formulation enables may be misleading with regards to predicting the resulted absorption, and hence, the solubility-permeability interplay must be taken into account to strike the optimal solubility–permeability balance, in order to maximize the overall absorption.

Academia and Industry Consortium: Collaborative Research on Drug Development.

Shinji Yamashita, Ph.D.
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Setsunan University,
Japan.

Japanese pharmaceutical industries have developed many of innovative medicines so far such as pravastatin, tacrolimus, which made Japan as one of the leading countries in the pharma-business. However, with the advent of paradigm shift in drug development, activity of pharmaceutical industry decreased gradually in Japan. In spite of their high level in pharmaceutical science and technology, rather smaller size of companies (compared with mega-companies in USA and EU) makes a new drug development very challenging because of the smaller size of compound library, database and budget. As one of the possible ways to keep the high activity of drug development, Japanese companies should share the knowledge and technologies in some parts.

Consortium of Oral Drug Absorption Screening with 25 Japanese pharmaceutical companies was organized at 2001. Final goal of the consortium is to establish the effective strategy for development of oral drug product. Also, it aims to give a platform for mutual interaction of researchers working in different companies. During past 10 years, various projects were performed in the consortium relating to oral drug absorption and their outcomes were shared with all member companies. In the lecture, as an organizer, activity of the consortium will be presented with showing outcomes of 2 main projects for “assessment of oral absorption of poorly-soluble drugs” and “BCS Classification to identify drug developability as oral products”.

Governmental support is also essential to activate the industry. As a new strategy of drug development, early phase clinical study (exploratory IND (eIND) study) including Microdosing (MD) study was proposed to enhance success probability of clinical trial. In Japan, in order to promote eIND study, national project on MD clinical study started at 2008 (supported by NEDO: New Energy and Industrial Technology Development Organization), entitled as “Establishment of Evolutional Drug Development with the Use of Microdosing Clinical Trial”. In the project, we performed more than 30 MD clinical studies with marketed drugs to validate the usefulness of this new strategy and to construct the system (both soft and hard) for conducting MD clinical study in Japan. Furthermore, we challenged the molecular imaging study with PET to investigate the process of GI absorption and subsequent bio-distribution of orally administered drugs. This is also a collaborative work with a governmental research center “Riken”. As a second issue of the lecture, results of this innovative work will be highlighted with emphasizing the importance of integration of new

technologies in drug development such as molecular imaging modalities.

Nanopharmaceuticals: creating, innovating or copying?

Maria José Alonso
Research Center on Molecular Medicine (CIMUS), School of Pharmacy,
University of Santiago de Compostela, Spain
Email: mariaj.alonso@usc.es

Despite the recent introduction of the nanomedicine term in the scientific arena, the origin of nano-drug-delivery, dates from the early 60’s. It is thanks to these original ideas, that we have currently in the market a significant number of nanopharmaceuticals. However, the full potential of nanomedicine is still to come. This potential is promising because over the last decades we have initiated a non-return pathway, which is the adoption of transdisciplinary and translational approaches to the design and development of new nanopharmaceuticals. In particular, the advances made over the last decade have been largely related to the progress made in the biomedical field (improved knowledge of disease mechanisms, identification of new targets and new bioactive compounds…etc) and the nanomaterials field (new biomaterials and nanotechnologies). The nanopharmaceutical technology area has also contributed making it feasible the nanoencapsulation and controlled delivery of complex molecules, as well as defining ways to scale-up the production of nanomedicines. Nevertheless, a significant amount of this research relies in making “mee too” delivery carriers, while the most creative activity still needs to confront great hurdles for its translation to the clinic.

Our group, being committed with the translation of ideas from the university through novel pharmaceutical technology, has designed novel nanostructured materials intended to transport drugs and antigens across biological barriers and to deliver them to the target tissue. During my presentation I would like to focus on the different applications of the nanocarriers we have designed. These applications include cancer therapy, nanovaccines and oral delivery of complex macromolecules. More information about these applications and the literature associated to them can be found at:
http://webspersoais.usc.es/mariaj.alonso

Polymer Therapeutics as Nanomedicines: Now and Future

Ruth Duncan
Cardiff, UK and Polymer Therapeutics Lab,
CIPF, Valencia, Spain
http://www.ruthduncan.co.uk,
profruthduncan@btinternet.com

Over recent decades a growing number (> 40) nanomedicines have entered routine clinical use as nanopharmaceuticals and imaging agents (reviewed in [1]). To put into perspective, this compares with ~ 1,200 NCEs and > 100 biologicals approved since 1950 [2]. It is clear that the 21st century will see many more complex nanomedicine products arriving to first in man studies and into routine clinical use. There are currently >70 nanomedicines in clinical trials as anticancer therapies alone. Nanomedicines have been designed for administration by various routes and they include a diverse array of technologies; e.g. iron oxide nanoparticles (treatment of anaemia and as MRI imaging agents), nano-sized drug crystals for improved oral bioavailability, liposomes, nanoparticles and polymer therapeutics. The polymer therapeutics are amongst the most successful first generation nanomedicines being designed as biologically active drugs, and as conjugates for drug, protein, aptamer and siRNA delivery and as block copolymer micelles to which the drug is covalently bound [3,4]. An increasing number of "follow-on" nanomedicine products are now emerging with others (e.g. polymeric drugs, PEG-protein conjugates) on the horizon. It is evident that classical requirements applied to small molecule generic drugs (pharmaceutical equivalence and pharmacokinetic bioequivalence) will not be adequate to ensure equivalent safety and efficacy of complex, multicomponent nanomedicines.

Polymer therapeutics are amongst the most successful first generation nanomedicines (products listed/discussed in [1,3-6]) and the number of gaining product approval and entering clinical trial continues to grow rapidly. So what is new? Emerging 'hot' topics have recently been reviewed in [5,6] and they include; (i) use of biodegradable polymers such as polyglutamic acid (PGA), dextrin, hydroxyethylstarch (HES), the polyacetal Fleximer® and polysialic acid to generate conjugates entering clinical trials (endocytic capture on non degradable polymers brings the potential risk of lysosomal accumulation - 'lysosomal storage disease' syndrome (discussed in [7,8]), (ii) design of bioresponsive polymer-protein conjugates - we have recently we reported a new approach for protein conjugation called polymer-masking–unmasking protein therapy (PUMPT) and (iii) the development of polymer conjugates for delivery of combination therapy and as theranostics. The latter are both reviewed in [6]. Finally, it is important to note that > 2 decades have passed since we began first Phase I clinical trials with anticancer synthetic polymer-drug conjugates and their related gamma camera imaging agents (theranostics). Growing understanding of the preclinical and clinical mechanisms controlling whole body

XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. 25 Aniversario SEFIG. Alicante 6-8 febrero 2013

pharmacokinetics and body distribution, tumour targeting by the EPR effect, drug release rate and of the endocytic and intracellular trafficking pathways in health and disease [7] is bringing important new opportunities for improved preclinical models and the use of patient-specific biomarkers to aid selection of the most appropriate patients for polymer therapeutic therapy (discussed in [1]).

References

1. Duncan, R. and Gaspar, R. (2011) Nanomedicine(s) under the microscope, Mol. Pharmaceutics, 8 (6), 2101–2141.
2. Munos, B. (2009) Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. Nat. Rev. Drug Discov. 8 (12), 959–968.
3. Duncan, R. (2003) The Dawning Era of Polymer Therapeutics. Nature Rev. Drug Discov. 2(5), 347-360.
4. Duncan, R. (2006) Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. Nature Rev. Cancer, 6, 688-701.
5. Duncan, R. (2011) Polymer Therapeutics as Nanomedicines: New Perspectives, Curr. Opin. Biotechnol., 22, 1-10.
6. Duncan, R. and Vicent, M. J. (2013) Polymer therapeutics-prospects for 21st Century: The end of the beginning, Adv. Drug Del. Rev., in press
7. Duncan, R. and Richardson, S. C. W. (2012) Endocytosis and Intracellular Trafficking as Gateways for Nanomedicine Delivery: Opportunities and Challenges, Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 2380–2402
8. Duncan, R (2013) Nanomedicine(s) and their Regulation: An Overview, In: "Safety assessment of nanomaterials: implications for nanomedicine", Ed. Fadeel, B., Pan Stanford Publishing, in press

Novedades en bioequivalencia

Dr. Alfredo García Arieta.
Jefe de Servicio de Farmacocinética y Genéricos
División de Farmacología y Evaluación Clínica
Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

La demostración de equivalencia en los productos de aplicación local y efecto local ha estado limitada por la exigencia de realizar costosos estudios con variables clínicas. A pesar de que dichas variables son insensibles para detectar diferencias entre productos con distinta biodisponibilidad debido a que la curva dosis –respuesta, en la mayoría de estos productos, es bastante plana en el rango terapéutico. Esta presentación describe los cambios que se han producido en este campo en los últimos años, entre los que destacan las nuevas aproximaciones simplificadas para la demostración de equivalencia en los productos de inhalación, nasales, cutáneos y gastrointestinales.

Recientemente, se ha adoptado la Guía sobre validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea del Medicamento (EMA). En esta presentación se comentarán brevemente las novedades existentes con respecto al estado del arte que se venía aplicando hasta el momento, basadas en la actual guía de la Food and Drug Administration de Estados Unidos (US-FDA).

Próximamente saldrá a consulta la nueva revisión de la guía sobre productos de liberación modificada de la EMA.

XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. 25 Aniversario SEFIG. Alicante 6-8 febrero 2013

Terapia Personalizada en la Infección por el VIH: Aplicación de Criterios Farmacocinéticos y Farmacogenéticos.

Mª José García Sánchez
Catedrática. Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia
Universidad de Salamanca.

Desde la introducción de la terapia antirretroviral la eficacia virológica en pacientes infectados de VIH se ha incrementado de forma significativa y ha cambiado la historia de esta patología, transformándola en una enfermedad crónica que requiere tratamiento a largo plazo. Sin embargo la toxicidad farmacológica constituye el principal obstáculo para el éxito del tratamiento, observándose además una importante variabilidad interindividual en el grado de exposición y consecuentemente en la respuesta. Se cree que variaciones genéticas entre los pacientes podrían justificar una fracción significativa de la variabilidad farmacocinética observada.

La información farmacocinética obtenida mediante la práctica de la monitorización (TDM) puede ser una herramienta muy útil para la optimización del tratamiento antirretroviral. Aunque aún presenta ciertas limitaciones, la medida rutinaria de las concentraciones plasmáticas puede proteger a los pacientes de la aparición de efectos adversos y prevenir el fracaso virológico. La variabilidad farmacocinética observada en los fármacos antirretrovirales depende de las alteraciones que se producen en los procesos del LADME, especialmente en la biodisponibilidad y el metabolismo. En consecuencia, la existencia de polimorfismos genéticos para ciertas proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de estos fármacos pueden explicar de forma importante esta variabilidad farmacocinética interindividual que condiciona su respuesta; la integración de la información farmacogenética y farmacocinética podría permitir un gran avance en la optimización de la posología del tratamiento antirretroviral.

En Farmacogenética las variantes genéticas más frecuentemente estudiadas son los polimorfismos de un único nucleótidos o SNPs (single nucleotide polimorphisms) en genes involucrados en el trasporte, metabolismo o toxicidad de los fármacos. Las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19, CYP2D6, CYP2A6 y CYP2B6 son las de mayor participación en el metabolismo de los fármacos antirretrovirales por ello, son los polimorfismos relacionados con estas isoenzimas los más ampliamente estudiados en los últimos años.

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la influencia de factores genéticos del huésped en pacientes infectados con VIH, cuya información actualizada se puede encontrar en la web www.hiv-pharmacogenomics.org, son pocos los biomarcadores genéticos convenientemente validados que la FDA recomienda utilizar en la práctica clínica. En el momento actual el mejor ejemplo de aplicación clínica en el tratamiento del VIH es la

asociación encontrada entre el antígeno de histocompatibilidad del alelo B 5701 (HLA-B*5701) y el riesgo de reacciones de hipersensibilidad para abacavir. De hecho el test para detectar este polimorfismo se ha introducido recientemente como práctica clínica estándar previa a la prescripción de este fármaco. Otra asociación bien establecida es la observada entre algunos de los alelos del gen que codifica el CYP2B6 con la farmacocinética y la toxicidad de efavirenz, por lo que su caracterización también ha sido propuesta para la individualización de la dosis de este fármaco en un intento de reducir sus efectos adversos sobre el SNC. Otras asociaciones significativas incluyen los polimorfismos de UGT1A1 y MDR1y la hiperbilirrubinemia observada en los tratamientos con atazanavir y la presencia del HLA-DRB*0101 relacionada con un aumento del riesgo de hepatotoxicidad de nevirapina.

También se han descrito asociaciones genéticas para la neuropatía periférica, la lipodistrofia, la hiperlipidemia, la pancreatitis y la tubulopatia proximal renal, pero todavía no existen resultados concluyentes que permitan su aplicación clínica. No obstante, la información genómica presenta un gran potencial en la individualización de los tratamientos farmacológicos del VIH, pero se precisan superar problemas logísticos y realizar más estudios de coste-efectividad para poder incorporar la Farmacogenética a la práctica asistencial de esta patología. Nuestro grupo ha incorporado la farmacocinética y la farmacogenética en el seguimiento terapéutico de los pacientes dentro de un programa integral del tratamiento de la infección por VIH.

XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. 25 Aniversario SEFIG. Alicante 6-8 febrero 2013

Comunicaciones Orales

NUEVA GENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS ELABORADAS A BASE DE ÉSTERES DE SORBITÁN (SPAN® 80): POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA

A. Pensado[1], G.K. Zorzi [3], E.S. Carvalho[4], A. Sánchez[1,2] , B. Seijo[1,2]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela.
[2]Grupo de Imagen Molecular. IDIS. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago.
[3]Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen Westfälische Wilhelms Universtät - Münster
[4]Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus UFRJ - Macaé.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos sistemas para la vehiculización de fármacos, supone un reto constante en el ámbito de la investigación farmacéutica. En este marco, la nanotecnología se ha situado como una alternativa prometedora, sin duda por las múltiples ventajas que ofrece (1). Hasta el momento se han desarrollado muchos tipos de nanosistemas (p.ej. micelas, emulsiones, nanopartículas y liposomas), utilizando diferentes tipos de biomateriales. Sin embargo la búsqueda de nuevos componentes, a ser posible, seguros y de bajo precio, así como métodos de preparación cada vez más sencillos, no cesa.

En esta línea, el objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo una nueva generación de nanopartículas a partir de materiales biocompatibles, biodegradables, y de bajo coste y que, además, se utilizan desde hace tiempo en Tecnología Farmacéutica (por ejemplo como tensoactivos) que son los ésteres de sorbitán, conocidos con el nombre comercial de Span®, por un procedimiento de preparación sencillo y escalable y, en la medida de lo posible, versátil con el que sea posible obtener nanopartículas de características fácilmente modulables y, por tanto, con capacidad para incorporar moléculas bioactivas muy diversas.

Más concretamente, en este trabajo se ha utilizado el monooleato de sorbitán (SP80) como material formador de las nanopartículas, solo o combinado con la amina grasa oleilamina (OA), y un plásmido modelo (pEGFP), con el objetivo de evaluar la posible aplicación de estas nuevas nanopartículas en terapia génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación: Para la elaboración de las nanopartículas se parte de la disolución de SP80 o SP80 + OA en etanol (fase orgánica) la cual se adiciona bajo agitación magnética suave a una solución acuosa, de manera que las nanopartículas se forman de manera espontánea. A continuación, el etanol se elimina a presión reducida en un rotavapor (2) obteniéndose la suspensión de nanopartículas blancas. En una fase posterior, es posible asociar a estas partículas moléculas bioactivas en disolución (p.ej. el plásmido modelo pEGFP) mediante su incubación con los nanosistemas en una proporción 1:1 (v/v), bajo agitación.

Características físico-químicas: El tamaño medio de las partículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica y su carga superficial en términos del potencial ζ, por anemometría de Láser Doppler. Para estudiar su morfología se ha recurrido a la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la asociación del plásmido modelo (pEGFP) a los sistemas se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Cultivos celulares: La línea celular HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), fue cultivada en medio MEM (Modified Eagle Medium), suplementado con un 10% de suero fetal bovino y penicilina/ estreptomicina al 1%. Se mantuvieron a 37ºC con un 5% de CO2 en atmósfera húmeda.

Estudios de transfección: Las células HEK 293 fueron sembradas a una densidad de 250.000 células por pocillo. El medio de cultivo fue reemplazado por HBSS que contiene los nanosistemas asociando el pEGFP a diferentes dosis. Las nanopartículas fueron incubadas con las células durante 4 horas y se evaluó la transfección pasadas 48 y 72 horas mediante microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante esta nueva técnica que ha sido diseñada y patentada en nuestro laboratorio, se han podido obtener partículas de monooleato de sorbitán SP80, con un tamaño nanométrico (117 nm) y potencial ζ negativo (-33 mV). Ambos valores son fácilmente modulables ya que, cuando se incorpora OA junto con el SP80, las partículas que se forman presentan un tamaño mayor (210 nm) y carga superficial positiva (+30 mV). Estas partículas son a priori idóneas para asociar moléculas activas cargadas negativamente mediante interacciones electrostáticas, como es el caso del plásmido modelo pEGFP. Este plásmido ha sido incorporado a distintas concentraciones, sin que afecte significativamente al tamaño nanométrico de las mismas en el rango estudiado (~290-340 nm), (Tabla 1).

Por el contrario, la incorporación del DNA plasmídico sí produce una inversión en el valor de potencial ζ, el cual se hace cada vez más negativo a medida que se aumenta la proporción de pDNA.

Formulación	pDNA (mg/ml)	Tamaño (nm)	PdI	ζ Potencial (mV)
SP80	----	116,9±5,3	0,10	- 33,2±2,5
SP80OA	----	200,5±10,2	0,08	+ 30,3±5,5
SP80OA + pEGFP	0,15	340,3±15,3	0,13	- 11,1±0,4
	0,2	287,1±5,1	0,12	- 19,5±1,5
	0,25	295,2±8,3	0,14	- 20,5±0,3
	0,3	317,6±3,2	0,13	- 22,2±0,4

Tabla 1: Caracterización físico-química de los nanosistemas asociando DNA plasmídico. (PDI: Índice de polidispersión)

Mediante el análisis de TEM, (Figura 1), podemos corroborar el tamaño nanométrico y la forma esférica de las partículas así como la presencia de una población homogénea.

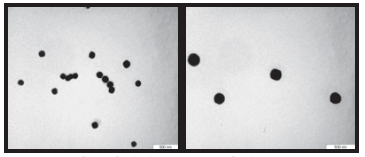


Figura 1. Morfología de las nanopartículas SP80OA+ pEGFP observadas mediante TEM a diferentes aumentos.

Los sistemas desarrollados son capaces de asociar eficazmente pEGFP a las concentraciones estudiadas, como se ha comprobado en el estudio de electroforesis (Figura 2) ya que, a diferencia de lo que ocurre con el pEGFP libre, no se observa la migración del material genético a través del gel de agarosa.

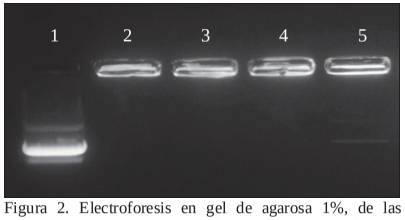


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1%, de las formulaciones SP80OA con diferentes cargas de plásmido. 1) pEGFP libre 2) pEGFP- 0,15 mg/ml 3) pEGFP- 0,2 mg/ml 4) pEGFP- 0,25 mg/ml 5) pEGFP- 0,3 mg/ml

Para estudiar la capacidad de transfección de estas nuevas nanopartículas se ha seleccionado la formulación preparada con una concentración de 0,2 mg/ml de plásmido, la cual se ha incorporado a las células a distintas dosis (1- 4 µg de pEGFP). En la Figura 3, se aprecia la expresión celular positiva de la proteína verde fluorescente en la línea celular HEK 293, transcurridas 72 horas post-transfección. Mediante microscopía de fluorescencia se ha comprobado que dicha expresión presenta un perfil dosis-dependiente hasta alcanzar un máximo (3 µg), manteniéndose casi constante a partir de este valor. Estos resultados nos permiten confirmar la elevada eficacia de transfección de esta nueva generación de nanopartículas, incluso a dosis tan bajas del plásmido modelo como las que se han utilizado en este estudio.

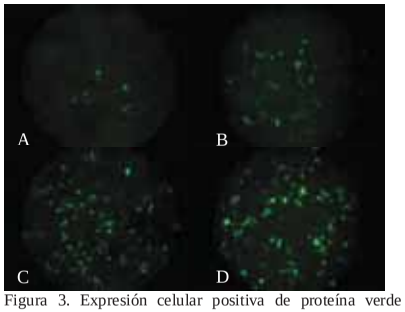


Figura 3. Expresión celular positiva de proteína verde fluorescente 72 post-transfección. Nanopartículas SP80OA+ pEGFP (0,2mg/ml). A) 1 µg pEGFP, B) 2 µg pEGFP, C) 3 µg pEGFP, D) 4 µg pEGFP.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una nueva generación de nanosistemas, usando cono componente principal el monooleato de sorbitán (Span® 80). El método de preparación es sencillo, rápido, de bajo coste y fácilmente escalable, lo cual facilitará su producción a nivel industrial. Son además sistemas muy versátiles ya que, gracias a la simple incorporación de componentes adicionales a su estructura (p.ej. OA), podemos modular ampliamente sus propiedades físico-químicas y facilitar por tanto, la incorporación de moléculas terapéuticas, como se ha comprobado para el caso concreto del DNA plasmídico. Efectivamente, se ha verificado su gran capacidad para asociar cantidades elevadas de pDNA, así como también su eficacia de transfección incluso utilizando dosis bajas de plásmido. Por ello consideramos que estas nanopartículas son sistemas potencialmente interesantes para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, como por ejemplo en el campo de la terapia génica.

REFERENCIAS

1. Duncan, R. and R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the Microscope. Molecular Pharmaceutics, 2011. 8(6): p. 2101-2141.
2. Sánchez, A. Seijo, B. Zorzi, G.K., et al., Sistemas nanoparticulares elaborados a base de ésteres de sorbitán. P201131812.

AGRADECIMIENTOS

MATERA/BBM-1856 10TMT203011PR
MAT2010-20452-C03-02

The effectiveness of edelfosine lipid nanoparticles in enhancing the drug cytotoxicity in breast cancer cells

Ángela Aznar Gómez, Beatriz Lasa-Saracíbar, Ander Estella-Hermoso de Mendoza, María J. Blanco-Prieto
Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, University of Navarra, Spain.

Introduction

Breast cancer is the fifth most common cancer worldwide after lung cancer, the second most common cause of cancer death, and the leading cause of cancer death in women (1). The global burden of breast cancer exceeds all other cancers and the incidence rates of breast cancer are increasing. Treatment approaches for breast cancer include surgery, chemo and radiotherapy and hormone-therapy and depend on the stage and targeted therapy. However, the survival rates for patients in advanced stages of the disease remain low (1). Consequently, new treatment options have to be studied to improve these rates.

The antitumor ether lipid edelfosine (ET-18-OCH3) is the prototype of a novel generation of promising anticancer drugs that, in contrast to most chemotherapeutic agents currently in use, does not target the DNA of the cells (2). This alkyl-lysophospholipid is incorporated into biological membranes as a natural lipid compound of the cellular bilayers (3). Edelfosine selectively induces apoptosis in tumor cells, acting through lipid rafts (4, 5). The fact of encapsulating this drug into lipid nanoparticles (LN) increases its oral bioavailability and decreases toxicity (6). Besides, LN may modify the entrance mechanism of the ether lipid into breast cancer cells and this might overcome the resistance that some cell lines show to the free drug (7). They are also able to modify the drug distribution profile in order to improve drug bioavailability through controlled release (6).

Objectives

The aim of this study was to develop LN loaded with edelfosine to enhance its therapeutic activity against breast cancer cells.

Material and Methods

Preparation of lipid nanoparticles
LN were prepared by the hot homogenization method, consisting of high shear homogenization and ultrasonication (8, 9). The drug (30 mg per formulation) was melted in Precirol® lipid at 70ºC. A Tween®80 aqueous solution heated at the same temperature was added onto the molten lipid and dispersed with the help of high shear homogenization and ultrasonication. The emulsion that was obtained was left to cool down at room temperature in order for the nanodrolets to solidify into LN, and these were concentrated by ultra-filtration using Amicon® Ultra 10,000 MWCO filters at 4,500 x *g* for 30 minutes and washed twice with distilled water. The resulting suspension was frozen at -80ºC for at least 3 hours, freeze-dried and stored at 4ºC.

Nanoparticle characterization
Nanoparticle size and polydispersity index were determined in triplicate by photon correlation spectroscopy and zeta potential by laser doppler anemometry, using a Zetasizer Nano (Malvern, UK). The amount of edelfosine nanoencapsulated was determined using an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (6).

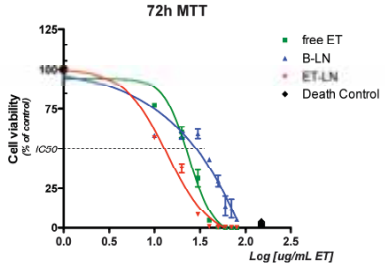
Cell culture
MCF7 breast cancer cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 50 U/ml penicillin, 50 U/ml streptomycin and 10% calf serum (Hyclone) at 37˚C in a humidified incubator supplemented with 5% carbon dioxide

In vitro proliferation assay: MTT assay
The MTT assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation (10). This assay is based on the cleavage of yellow-colored tetrazolium salt, (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) to a blue-colored formazan by the mitochondrial enzyme succinate-dehydrogenase of the living cells (11). The absorbance of this colored solution can be quantified by measurement with a spectrophotometer. The amount of formazan produced during a given exposure period is directly proportional to the number of viable cells per well. MTT solution was added directly to the culture media at a final concentration of 0.5 mg/mL and then incubated for 3 hours. Afterwards, MTT containing medium was removed from all wells and the remaining cells containing formazan crystals were dissolved in DMSO. Optical density was determined with a 96-well plate reader by using an absorption spectrum of 540 nm against the blank wells in the standard curve.

Results and discussion

Nanoparticle characterization
Nanoparticles were characterized in terms of size, zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading. All the formulations showed a similar size, with a mean diameter of 164 (±8) nm. Zeta potential was -26 mV, which is an acceptable value to obtain good physical stability and to avoid cell membrane instability. Drug loading was 31.42 (±3.72) µg/mg. The polydispersity index was 0.27 (±0.01), suggesting homogenous dispersion. The encapsulation efficiency (%EE) was 64.85 (±6.85) %.

In vitro assays
The optimized LN containing edelfosine (ET-LN) were effective in inhibiting proliferation of MCF7 breast cancer cell line at an IC_{50} concentration of 12.9 µg/mL after 72 hours of incubation (Fig 1). The IC_{50} values of free edelfosine (ET) and blank (unloaded) nanoparticles (B-LN) were 17.8 and 28.7 µg/mL respectively.



	Free ET	B-LN	ET-LN
IC50 (µg/mL)	17.8	28.7	12.9

Fig 1 Inhibitory effect of ET, B-LN and ET-LN in MCF7 breast cancer cells. Cell viability was determined by MTT assay after 72 hours of treatment.

Morphological changes
Optical inspection of the cell cultures revealed morphological changes in MCF7 cells 48 hours after the treatment either with ET or ET-LN. Compared with untreated cells and cells incubated with B-LN, treated cells showed expression of small vesicles (apoptotic bodies, see arrows in Fig. 2) in some cells. In addition, treated groups showed unattached and distorted cells, which is indicative of cell death.

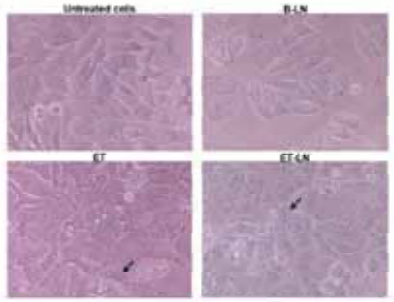


Fig 2 Morphological changes of MCF7 cells after 48 hours incubation. Cells grown in medium containing either ET or ET-LN show hints of cell damage and production of apoptotic bodies (arrows).

Conclusion

The edelfosine loaded LN developed display higher efficacy in treating MCF7 breast cancer cells than the free drug. Presently, the cytotoxicity mechanism of action of ET-LN is under evaluation by assessment of cell cycle and apoptosis using flow cytometry.

Bibliography

(1.) R. Siegel, *et al.* Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 62:10-29 (2012).
(2.) W.J. Van Blitterswijk, *et al*. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. Current pharmaceutical design. 14:2061-74 (2008).
(3.) A.H. Van der Luit, *et al.* A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. Molecular cancer therapeutics. 6:2337-45 (2007).
(4.) F. Mollinedo, *et al.* Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). Cancer Res. 57:1320-8 (1997).
(5.) F. Mollinedo, *et al.* Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. Oncogene. 29:3748-57 (2010).
(6.) A. Estella-Hermoso de Mendoza, *et al.* Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. Journal of biomedical nanotechnology. 5:323-43 (2009).
(7.) B.A. Wagner, *et al.* Sensitivity of K562 and HL-60 cells to edelfosine, an ether lipid drug, correlates with production of reactive oxygen species. Cancer Res. 58:2809-16 (1998).
(8.) M.W. Schwarz *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. Journal of Controlled Release. 30:83–96 (1994).
(9.) Muller RH, *et al.* Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). European Patent: 0605497 (A1), (1993).
(10.) T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 65:55-63 (1983).
(11.) T.F. Slater, *et al.* Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. Biochimica et biophysica acta. 77:383-93 (1963).

Acknowledgements

Caja Navarra Foundation, Ibercaja, University of Navarra (FUN), the Government of Navarra, Department of Health (ref: 63/09, "Ortiz de Landázuri" fellowship) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2007-61261, SAF2010-15547)

In vivo administration of VEGF-releasing biodegradable nanospheres in a mouse model (APP/Ps1) of Alzheimer's disease

E. Herrán[1,2], R. Perez- Gonzalez[3,4], M. Igartua[1,2], J.L. Pedraz[1, 2], E. Carro [3,4], R.M. Hernández[1, 2]

[1]NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country (UPV/EHU), School of Pharmacy, Vitoria, Spain ; [2]Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria, Spain. [3]Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; [4]Neurodegenerative Diseases Biomedical Research Center (CIBERNED), Madrid, Spain.

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive decline. The pathological signs of the disease are high levels of amyloid beta-peptide (Aβ), presence of neurofibrillary tangles, neuronal loss and cerebrovascular pathologies. These regional microvasculature alterations establish an important abnormality in Aβ clearance, resulting in an increasing concentration of Aβ deposits into the brain. This perception suggests that this vascular alteration may have a significant role in AD[1]. VEGF is a mayor regulator of angiogenesis into the brain. It is also involved in neuroprotection and BBB integrity. For these reasons current research efforts are focused in new VEGF delivery systems to obtain a continuous and direct drug release into the brain[2].

In this work we propose a novel strategy based on the encapsulation of VEGF in PLGA biodegradable nanospheres (NS) which can be administered by craniotomy directly into the brain. The *in vivo* and *in vitro* studies were carried out in order to evaluate the capacity of VEGF-NS to restore the neuronal loss, cerebrovascular abnormalities and enhance Aβ clearance.

Experimental methods: PLGA (50:50) nanospheres loaded with VEGF (VEGF-NS) and empty-NS were prepared by modification of a previously described ($W_1/O/W_2$) double emulsion solvent evaporation technique[3]. After NS preparation, the following parameters were characterized: particle size, morphology, zeta potential, and encapsulation efficiency. Moreover, VEGF *in vitro* release and bioactivity assays in neuronal cultures were conducted. To carry out *in vivo* studies 24 female 6 month-old amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) double transgenic mice (12 mice receiving VEGF-NS and 12 mice empty-NS) were used. The NS were dropped directly into the cerebral cortex after craniotomy and excision of the dura mater (Fig. 1).

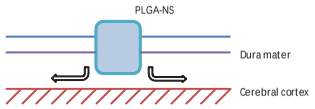


Figure 1. VEGF-NS diffusion after the administration into the brain.

3 months after VEGF-NS were implanted mice behavior was evaluated over a 10-day period. Finally, animals were perfused transcardially for inmunohistochemical examination.

Results and discussion: All NS had a uniform morphology with a smooth surface devoid of irregularities. The mean particle size was 235 ± 0.111 nm for VEGF-NS and 267 ± 0.111 nm for empty-MS (Fig. 2).

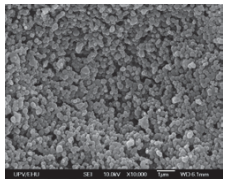


Figure 2. SEM photomicrograph of VEGF-NS

Figure 3 represents the release profile of VEGF-NS. The release profile was biphasic, with an initial burst in the first day and a second constant release rate until the end of the assay.

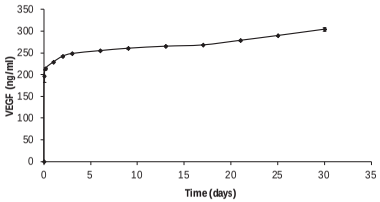


Figure 3. *In vitro* VEGF-NS release profile at 37ºC in PBS buffer (pH 7.4). Values are represented as mean ± SD (n=3).

To confirm the biological activity of the encapsulated VEGF, bioactivity assays were performed in neuronal cultures. different VEGF concentrations released from VEGF-MS were added at the same time of seeding cells. After 8 days the cell viability was statistically increased in VEGF 10 ng/ml and 50 ng/ml treated groups (one way ANOVA, **p<0.001and ***p<0.0001 with respect to control and empty-MS) (Fig.4).

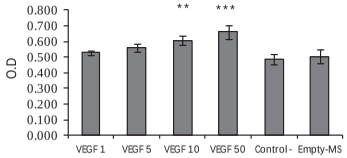


Figure 4. Viability evaluation in neuronal cell cultures.

To prove VEGF protection against lipopolysaccharide (LPS), neuronal cell cultures were treated for 24h with VEGF, LPS, VEGF+LPS and control group (Fig. 5). The addition of VEGF protected neuronal cultures against the cytotoxicity caused by LPS (one way ANOVA, **p<0.01and ***p<0.0001 respect to LPS group).

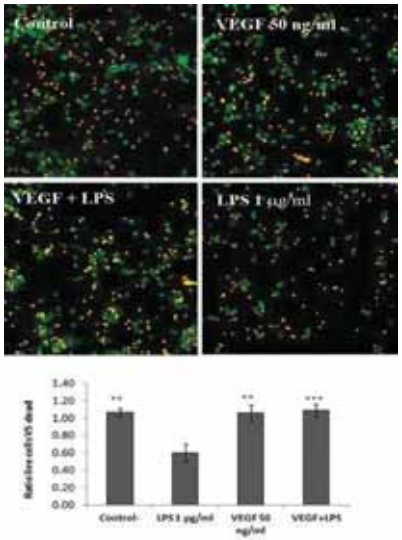


Figure 5. Live/Dead Viability/Citotoxicity test in neuronal cultures (green: live cells/yellow: dead cells).

In vivo efficacy of encapsulated VEGF was assessed analyzing behavioral deficits after VEGF-NS administration. In the T-maze, choice trial latencies of VEGF-NS group were significantly decrease compared with empty-NS group (one way ANOVA, ***p<0.0001) (Fig. 6).

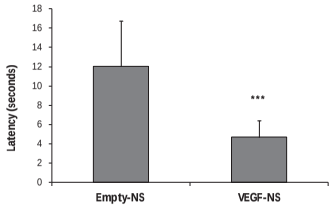


Figure 6. T-maze behavior test in APP/Ps1 mice.

Inmunohistochemical analysis of Aβ deposits after VEGF-NS administration suggested that the administration of VEGF-NS reduced the percentage of these deposits in APP/Ps1 mice brain (t-student *p< 0.05 emty-NS vs VEGF-NS) (Fig. 7).

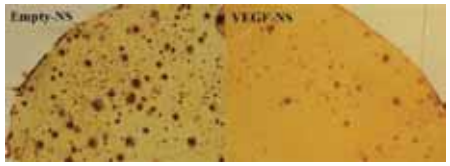


Figure 7. Aβ deposits in cerebral cortex of APP/PS1 mice.

To confirm the inmunohistochemical results Aβ 42 levels were measured in cerebral cortex. These data indicate that animals receiving VEGF-NS treatment had a reduction of 45% in Aβ 42 levels (t-student *p<0.01) when compared with empty-NS (Fig. 8).

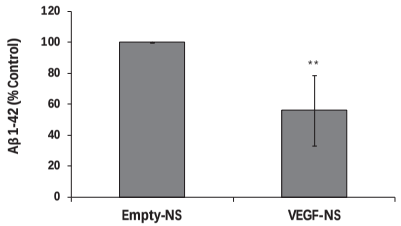


Figure 8. Aβ 42 levels in cerebral cortex

Conclusion: PLGA VEGF - NS may be a potential therapeutic strategy to decrease neuronal loss *in vitro* and Aβ deposits *in vivo*, as well as able to improve behavioral deficits in APP/Ps1 mice.

References:

1.- Zlokovic, M.D et al. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2002, (54) 1553-1559

2.- Carro, E et al. Biomaterials 2010, (31) 5608-5618

3.- Gutierro, I et al. Vaccine 2002, (21), 67-77.

Acknowldegements

E. Herran thanks the Basque Government for the Fellowship grant.

OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DOXORRUBICINA EN CÁNCER DE MAMA MEDIANTE UNA NANOPLATAFORMA POLIMÉRICA BIODEGRADABLE

J.L. Arias[1], C. Melguizo[2], J. Prados[2], R. Ortiz[3], L. Cabeza[2], M.A. Ruiz[1], R. Luque[4], B. Gónzalez[4], V. Gallardo[1], A. Aránega[2]

[1]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
[2]Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Dpto. de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España.
[3]Dpto. de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, España.
[4]Servicio de Medicina Oncológica, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España.
e-mail: jlarias@ugr.es

Introducción: La necesidad de encontrar tratamientos quimioterápicos eficaces ha hecho que se incrementen las líneas de investigación en oncología. Esto ha permitido un mayor conocimiento de los orígenes moleculares del cáncer, con el consiguiente desarrollo de novedosas estrategias farmacoterapéuticas. Sin embargo, los antitumorales utilizados en clínica suelen exhibir serias limitaciones que conducen a un fracaso del tratamiento, incluso en tipos de cáncer teóricamente sensibles (1). Por ejemplo, a pesar de la notable actividad antitumoral de la doxorrubicina, su uso se encuentra seriamente limitado por el desarrollo de resistencias por las células tumorales y por importantes reacciones adversas (p. ej., cardiotoxicidad) (2).
Para solventar estos problemas se han asociado moléculas antitumorales con coloides basados en nanopartículas biodegradables. Así, se pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la masa tumoral e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosas a éste (1, 3). Las partículas diseñadas con este fin se construyen principalmente con polímeros o materiales de carácter lipídico (1, 3, 4). Como ejemplo, los polímeros alquilcianoacrilato han mostrado grandes posibilidades como material base para el diseño de estos nanosistemas. De hecho, diferentes estudios preclínicos demuestran su eficacia como vehículos de anticancerosos, incluso en células malignas resistentes (5). Nuestro objetivo es desarrollar una (nano)formulación basada en partículas de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) como sistema transportador de doxorrubicina (DOX), y valorar su actividad en cáncer de mama.

Materiales y Métodos: El agua utilizada fue desionizada y filtrada (Milli-Q, Millipore, Francia). Los reactivos empleados eran de calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania). El monómero butilcianoacrilato fue un regalo de Henkel Loctite (Irlanda).
La síntesis de nanoesferas de PBCA (diámetro medio ≈ 135 nm) se realizó por polimerización en emulsión del monómero: éste (1%, p/v, en acetona) se incorporó, bajo agitación (1200 rpm), a un medio acuoso con una concentración 10^{-4} N de HNO_3 y un 1% (p/v) de pluronic® F-68. Tras 3 horas de agitación, se neutralizó con cantidad suficiente de NaOH para asegurar el final de la polimerización.
La incorporación de DOX en las nanopartículas de PBCA se realizó por: *i*) adsorción superficial del fármaco en las partículas preformadas (t = 24 h.); y, *ii*) incorporación de DOX en la solución de acetona donde el monómero está disuelto antes de polimerizar. En este último caso, se analizó la influencia sobre la vehiculización de las concentraciones de fármaco, monómero y tensioactivo. La incorporación (y liberación) de DOX se cuantificó mediante un método validado de espectrofotometría UV-Vis (481 nm). La liberación de DOX se estudió mediante diálisis.
A continuación, la actividad antitumoral *in vitro* de las partículas cargadas con DOX (PBCA-DOX) se investigó en la línea MCF-7 de cáncer de mama, utilizando el test colorimétrico MTT (azul de tetrazolio). Las células MCF-7 se incubaron con cantidades crecientes de PBCA (control), DOX y PBCA-DOX. La dosis equivalente de DOX fue 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 μM. La actividad citotóxica se determinó mediante el cálculo de la concentración inhibitoria cincuenta (IC_{50}). Además, se evaluó cualitativamente la captación intracelular de DOX mediante microscopía de fluorescencia (470 y 570 nm).
Finalmente, se indujeron tumores sólidos subcutáneos en ratones C57BL/6 con células E0771 de cáncer de mama. Los grupos de tratamiento (n = 10) fueron: suero salino (control), PBCA (placebo), DOX (dosis: 10 mg/Kg) y PBCA-DOX (dosis equivalente a 10 mg/Kg de DOX). El tratamiento comenzó cuando el tamaño de los tumores era ≈ 75 mm^3. Los días 0, 3, 6, 9 y 12 se administraron las formulaciones vía i.v., siguiéndose la evolución del tamaño del tumor. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Medicina (UGR). La toxicidad de las formulaciones se evaluó mediante seguimiento de la mortalidad, daño tisular, alteraciones en el comportamiento y peso corporal relativo de los animales.
Todos los experimentos se realizaron por triplicado y su análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student.

Resultados y Discusión: En comparación con el método de adsorción superficial, se lograron unos valores de *entrapment efficiency* (%) y *drug loading* (%) significativamente mejores mediante el método de absorción en matriz. Por ejemplo, si la concentración utilizada de DOX era 10^{-2} M (óptima para la vehiculización), estos parámetros pasaban de ≈ 22.3% y ≈ 3.6% (adsorción) a ≈ 49.3% y ≈ 14.8% (absorción), respectivamente. De todas las variables que podían afectar a la incorporación de DOX en la matriz de PBCA, sólo la concentración de este fármaco tuvo una influencia significativa. También resultó precisa una concentración de tensioactivo del 1% (m/v) para obtener partículas adecuadas para la vía parenteral.
La liberación *in vitro* de este fármaco (figura 1) se produce según un proceso bifásico si se incorpora en la matriz: rápida liberación de la DOX situada a nivel superficial (≈ 37% en 1 h.), seguida de una fase lenta consecuencia de la difusión del antitumoral o de la degradación polimérica por erosión superficial (completa en 24 h.). Sin embargo, si la DOX se incorpora por adsorción, el proceso termina en tan sólo 3 h.

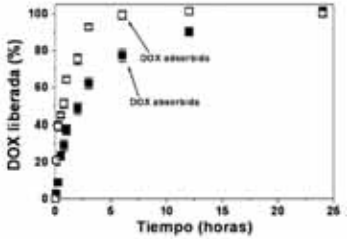


Figura 1. Liberación de DOX (%), adsorbida (□) o absorbida (■) en PBCA, en función del tiempo de incubación en PBS (pH 7.4) a 37 ºC.

La citotoxicidad de PBCA-DOX en la línea MCF-7 (IC_{50} = 0.1 μM) fue significativamente superior a la de DOX en solución (IC_{50} = 0.5 μM) (p < 0.001). Tiempos de incubación mayores (48 y 72 h.) confirmaron estos resultados. El análisis de microscopía de fluorescencia puso de manifiesto cómo la asociación de DOX con PBCA acrecentaba notablemente la intensidad de la fluorescencia a nivel citoplasmático y en el núcleo (t = 1, 2 y 4 h.), lo cuál podría ser consecuencia de una mayor entrada celular de DOX.
En cuanto a la actividad antitumoral de las formulaciones en un modelo murino (C57BL/6) de tumor sólido subcutáneo (células E0771) (figura 2), puede apreciarse cómo las partículas PBCA-DOX mejoran la actividad antitumoral de esta molécula quimioterápica. La inhibición del crecimiento del tumor, en comparación con DOX, resultó ser significativa los días 21, 24 y 27 (p < 0.05) y muy significativa los días 30 y 33 (p < 0.001). Al final del tratamiento (día 12), el desarrollo de la masa tumoral fue inhibido en el 90% de los ratones tratados con PBCA-DOX. Finalmente, no se apreció toxicidad alguna en el grupo de animales tratado con PBCA-DOX.

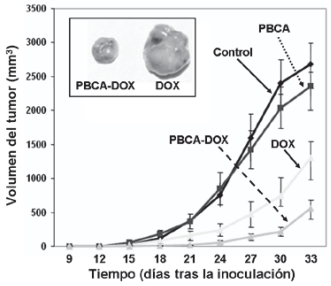


Figura 2. Actividad antitumoral de PBCA-DOX (equivalente a 10 mg/Kg) y de una solución de DOX (10 mg/Kg), comparado con el grupo control (suero salino) y el grupo placebo (PBCA). Figura insertada: ejemplo de masas tumorales de los grupos tratados con PBCA-DOX y DOX (t = 33 días).

Conclusiones: Hemos desarrollado un procedimiento reproducible para la síntesis de nanopartículas PBCA-DOX adecuadas para la administración parenteral. Los resultados obtenidos en los estudios preclínicos realizados abren una interesante vía para el tratamiento eficaz del cáncer de mama.

Referencias:

(1) Davis ME et al. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nat. Rev. Drug Dicov. 2008;7(9): 771-82.
(2) Minotti G et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol. Rev. 2004;56(2):185-229.
(3) Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. Mini Rev. Med. Chem. 2011;11(1):1-17.
(4) Arias JL et al. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. Curr. Drug Targets 2011;12(8):1151-65.
(5) Vauthier C et al. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. J. Control. Release 2003;93:151-60.

Agradecimientos: Proyectos FIS 11/02571 y FIS 11/01862 (Instituto de Salud Carlos III, España).

SISTEMAS SUPRAMOLECULARES DE POLOXAMINA-CICLODEXTRINA-SIMVASTATINA COMO PROMOTORES DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE A OSTEOBLASTOS.

S.M.N. Simões[1,2], F. Veiga[1,2], J.J. Torres-Labandeira[3], A.C.F. Ribeiro[4], A. Concheiro[3], C. Alvarez-Lorenzo[3]

[1]Department of Pharmaceutical Technology and [2]Centre for Pharmaceutical Studies, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal. [3]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, España. [4]Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Portugal.

Introducción: La elevada prevalencia de enfermedades degenerativas y accidentes obliga a prestar una atención creciente a procedimientos de regeneración de hueso y cartílago que resulten una alternativa eficaz a los trasplantes. Además de los andamiajes rígidos cargados con proteínas morfogénicas, en el tratamiento de defectos críticos pueden resultar muy útiles los sistemas semisólidos inyectables que adquieren una consistencia elevada al entrar en contacto con el medio fisiológico. Estos sistemas se pueden implantar por procedimientos mínimamente invasivos, con lo que la cicatrización es más rápida y el riesgo para los pacientes es menor. Recientemente, se ha observado que los copolímeros de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO) de la familia de las poloxamina (Tetronic®) pueden dar lugar a sistemas de gelificación *in situ* [1] biocompatibles con osteoblastos y capaces de actuar como implantes de cesión sostenida de proteínas morfogénicas [2]. Además, algunas variedades de poloxamina, como el T908, presentan por sí mismas actividad osteoinductora, dando lugar *in vitro* a una notable proliferación de células madre que, en unos días, se diferencian a osteoblastos y forman matriz mineralizada [2]. Otra alternativa a las proteínas morfogénicas y que también busca reducir los costos del tratamiento, es el fármaco hipolipemiante simvastatina que, en un estrecho intervalo de concentraciones, puede inducir la regeneración ósea [3]; si bien es muy hidrofóbico y difícil de formular. El objetivo de este trabajo es diseñar sistemas inyectables viscoelásticos que combinen una elevada retención en el defecto crítico con la capacidad osteoinductora de la poloxamina T908 y la simvastatina. Para optimizar la concentración del copolímero bloque, se ensayó el efecto de la incorporación de α-ciclodextrina (α-CD), que puede engarzarse en los bloques PEO y actuar de enlace entre los de cadenas adyacentes, incrementando de forma muy notable la viscoelasticidad del entramado [4].

Materiales y Métodos:

Preparación de los geles. A partir de disoluciones de T908 (BASF, Alemania) y de α-CD (Wacker, Alemania) en tampón fosfato se prepararon mezclas cubriendo entre 1 y 13% de T908 y de 0 a 9.7% de α-CD, y se almacenaron a 4, 20 y 37ºC.

Reología. Se registraron los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de los geles a 0.5 Pa en el intervalo de 0.5 a 50 rad/s usando una geometría cono-plato (6 cm, 2º) a 10, 25 y 37 ºC en un Rheolyst AR-1000N (TA Instruments, UK).

HET-CAM test. La biocompatibilidad se evaluó depositando 0.3 ml de gel en la membrana corioalantoidea de huevos incubados siguiendo el protocolo ICCVAM [5].

Solubilización de simvastatina. Se incorporó fármaco en exceso a 5 ml de gel y los sistemas se mantuvieron a 25 ºC y 50 rpm durante 5 días. A continuación, los sistemas se filtraron, la concentración total de simvastatina disuelta se cuantificó espectrofotométricamente a 239 nm (Agilent 8453, Alemania) y su estabilidad química se valoró mediante HPLC a 238 nm utilizando una columna LiChroCART RP-C18 (3.9 x 150 mm, 5 µM) a 25 ºC, y acetonitrilo:28 mM tampón fosfato pH 4 (65:35, 1 mL/min) como fase móvil isocrática Los tiempos de retención de las formas hidroxiácida y lactona fueron 3 y 6 min, respectivamente.

Cesión de simvastatina. Se depositaron 2 ml de gel en el compartimento dador de células Franz-Chien y 6 ml de tampón fosfato pH 7.4 en el receptor. Como separador se utilizó una membrana de acetato de celulosa (0.45 µm, 0.785 cm^2). A intervalos de tiempo, se retiraron 300 µL del receptor y se valoró la simvastatina por HPLC.

Actividad fosfatasa alcalina (ALP). Se sembraron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (StemPro, Invitrogen, USA) en placas de 6 pocillos ($3x10^4$ células/pocillo, 2.5 mL) y sobre soportes Transwell se añadieron 200µL de T908 (4 y 8%)/ α-CD (0 y 5%) geles conteniendo o no simvastatina (0.08 y 8.5 µM). Como controles negativo y positivo se utilizaron las células en medio de cultivo y en medio osteogénico, respectivamente. Tras 3, 7 y 12 días de incubación, se determinó la ALP [2]. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo MTT [2].

Resultados y Discusión:

Preparación de los geles y caracterización reológica. La poloxamina T908 da lugar a sistemas de gelificación *in situ* a 37ºC cuando su concentración es del 20%. La incorporación de α-CD al 5-7% permitió obtener geles viscoelásticos con tan sólo el 1% de T908 (Figura 1). Los geles se formaron en pocas horas a 4 ó 20 ºC, resultando estables durante al menos un mes. Proporciones más bajas de α-CD o incubación a 37 ºC dio lugar a fenómenos de separación de fases. Todos los geles presentaron una elevada citocompatibilidad en el test HET-CAM.

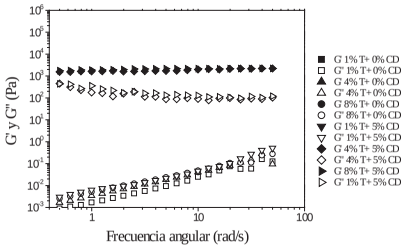


Figura 1. Módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de dispersiones de T908 al 1, 4 y 8% en ausencia y en presencia de α-CD al 5%.

Solubilización y cesión de simvastatina. Las dispersiones de α-CD y T908 presentaron una elevada capacidad para solubilizar simvastatina, incrementando su solubilidad aparente en PBS entre 3 y 12 veces. Además, los geles sostuvieron la cesión durante varios días (Figura 2).

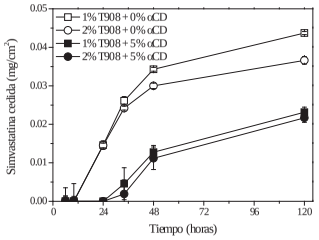


Figura 2. Perfiles de difusión de simvastatina en PBS a partir de dispersiones de T908 al 1 y 2% en ausencia y en presencia de α-CD al 5%.

Actividad fosfatasa alcalina (ALP). El estudio con células madre mesenquimales se inició con un screening de concentraciones de simvastatina (0.08 a 42.5 µM equivalente a 0.01 a 5 µM en el medio de cultivo) con el fin de identificar la que da lugar a valores de ALP más elevados. A partir de los resultados de este estudio se seleccionaron 0.08 y 8.5 µM simvastatina para incorporarla en los geles.

Los estudios con células madre mesenquimales confirmaron la elevada citocompatibilidad y el efecto osteoinductor de las dispersiones de T908 y revelaron que la presencia de simvastatina aumenta aún más la ALP (Figura 3).

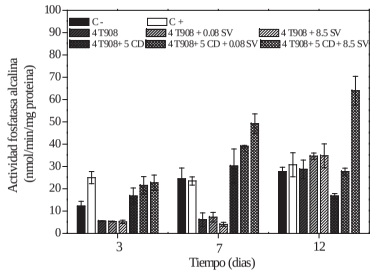


Figura 3. Actividad ALP de células madre mesenquimales en medio de cultivo (control negativo), medio osteogénico estándar (control positivo) y medio con T908 al 4%, sin y con α-CD al 5%, y sin y con simvastatina a dos concentraciones diferentes.

Conclusiones: La combinación de poloxamina con α-CD y simvastatina da lugar a inyectables de elevada citocompatibilidad y con actividad osteogénica, con propiedades reológicas y de cesión fácilmente modulables.

Referencias:

(1) C. Alvarez-Lorenzo et al. Poloxamine-based nanomaterials for drug delivery. Frontiers Biosci., 2:424-40 (2010)
(2) A. Rey-Rico y col. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. Eur. Cells Mater., 21:317-40 (2011)
(3) J. Pagkalos et al. Simvastatin induces osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells. J. Bone Min. Res., 25:2470-8 (2010)
(4) S.M.N. Simões et al. Syringeable Pluronic–α-cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin. Eur. J. Pharm. Biopharm., 80:103-12 (2012).
(5) NICEATM-ICCVAM. In vivo test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants.http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox.htm (2012).

Agradecimientos:
Trabajo financiado por la Xunta de Galicia (10CSA203013PR), FEDER y MICINN (SAF2011-22771). S.M.N. Simões agradece la beca Praxis SFRH/BD/48324/2008 de FCT Portugal.

NANOPARTÍCULAS DE POLI-CAPROLACTONA COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS PARA APLICACIÓN TÓPICA.

A.Melero[1,2], A. Ourique[3], A. Pohlmann[3,5], S. Guterres[3,4], R. Beck[3,4], U.F. Schaeffer[2]

[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia, España.
[2] Department of Biopharmacy and Pharmaceutical Technology. Saarland University. Germany.
[3] Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
[4] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
[5] Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Introducción: Clásicamente, la vía de administración tópica se ha utilizado para tratar patologías locales o modificar el aspecto de la piel. La piel humana conforma una barrera que protege de forma muy efectiva al organismo frente a la entrada de xenobióticos, de forma que la mayoría de los fármacos no son capaces de atravesarla en cantidad suficiente para dar lugar a un efecto sistémico. En las últimas décadas, sin embargo, se ha demostrado que determinados fármacos pueden difundir a su través hasta generar niveles plasmáticos de fármaco suficientes para dar lugar a un efecto terapéutico sistémico, e incluso, toxicidad en algunos casos. Este fenómeno representa un problema importante para el tratamiento local. Es el caso de la tretinoína, fármaco muy efectivo en casos de acné, dermatitis crónica o psoriasis[1] pero que presenta una gran teratogenia, de forma que las pacientes deben también recibir terapia anticonceptiva suplementaria, con sus subsecuentes efectos indeseados. Si además la aplicación de este fármaco ha de ser crónica, la calidad de vida de los pacientes puede verse muy afectada. La mometasona es un corticoide muy utilizado también en casos de psoriasis o eccema, en que las áreas de aplicación pueden ser muy extensas y, por tanto, el acceso de fármaco a sangre alto. Los corticoides, a su vez, pueden producir efectos secundarios muy graves que afecten al metabolismo y reduzcan las defensas del sistema inmunitario.

En este trabajo, se presenta una forma farmacéutica de liberación controlada para fármacos lipófilos de aplicación tópica, como son tretinoína o mometasona, basada en la encapsulación de fármaco en partículas poliméricas de poli-caprolactona y formuladas como hidrogel. El objetivo de este tipo de formulación es conseguir la liberación controlada de fármaco para aumentar su permanencia en la piel, el tejido diana, y retardar la absorción sistémica de grandes cantidades de fármaco de forma rápida, con el fin de disminuir los efectos sistémicos indeseados[2].

Materiales y Métodos: Para cada fármaco, se formularon tres lotes diferentes de nanopartículas en suspensión por el método de deposición interfacial de Fessi[3]. Las nanocápsulas se caracterizaron en términos de tamaño, polidispersión, y morfología. Para cada fármaco se prepararó un hidrogel con el fármaco en suspensión y otro con el fármaco encapsulado, conteniendo ambos una concentración final de 0.05%. En el caso de la tretinoína, el gel se preparó utilizando carbopol (0.5%). Para la mometasona, se utilizó hidroxi-etil-celulosa al 2%. Se realizaron ensayos de permeabilidad a través de epidermis humana separada por calor a partir de los hidrogeles, utilizando células de difusión estáticas de tipo Franz. Además, se estudió la permeabilidad de fármaco a partir de una solución de fármaco y una suspensión de nanopartículas, a título comparativo. Los ensayos se realizaron en condiciones de dosis infinita, 32ºC, agitación a 500 rpm, utilizando PBS pH 5.5/etanol (50:50) como solución receptora, para asegurar las condiciones sink[2,4].

Por último, se realizaron estudios de penetración de fármaco a partir del gel de mometasona y del gel de partículas de mometasona, mediante las técnicas de tape-stripping y criosección[5].

Resultados y Discusión: Las partículas obtenidas presentaron forma esférica, incluso después de ser incorporadas al gel (figura 1), un tamaño de alrededor de 200 nm, con una polidispersión inferior al 0.2, considerada adecuada para este tipo de nanopartícula[2].

En los estudios de permeabilidad, se puede observar en ambos casos una disminución de la permeabilidad de fármaco formulada en forma de nanocápsula o de hidrogel respecto a la solución (figuras 2 y 3). El efecto es mucho más acusado en el caso de la tretinoína (figura 2). Además, en este caso, la encapsulación de fármaco permite un control mayor de la permeabilidad de tretinoína respecto del hidrogel, independientemente de si se incorporan al hidrogel.

En el caso de la mometasona, este efecto se reproduce (figura 3). Si bien las formulaciones con las nanocápsulas en suspensión presentan una permeabilidad ligeramente superior respecto al hidrogel, las diferencias no son significativas. Además, se pudo comprobar por microscopía la formación de cristales de fármaco dentro de la estructura del gel, que actuarían como reservorio de fármaco. Este efecto, junto con el efecto de la matriz del gel, controlaría la liberación final de fármaco. Sin embargo, el efecto de las nanocápsulas en el control de la liberación de fármaco es mayor, independientemente de la formulación utilizada.

Figura 1: Imagen de un hidrogel conteniendo nanocápsulas de mometasona [escala = 100 nm (300,000x)].

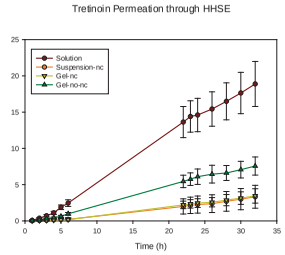


Figura 2. Perfiles de permeabilidad de tretinoína a partir de las distintas formulaciones.

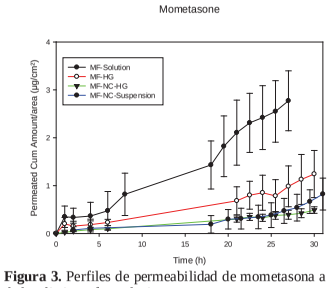


Figura 3. Perfiles de permeabilidad de mometasona a partir de las distintas formulaciones.

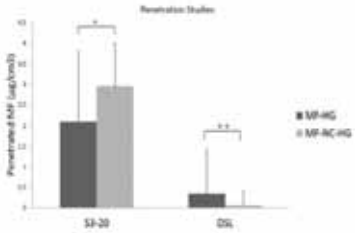


Figura 4: Distribución de mometasona en las distintas capas de la piel.

En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos por tape-stripping con la mometasona. Se comprueba que tras un periodo de incubación de 2 h, el fármaco satura el estrato córneo y permite el paso a capas más profundas de la piel, siendo mayor en el caso del hidrogel. Estos resultados complementan y son consistentes con los obtenidos en los ensayos de permeabilidad.

Conclusiones: Los ensayos realizados demostraron que las nanocápsulas de poli-caprolactona preparadas con ambos fármacos presentan características físico-químicas adecuadas para su inclusión en formulaciones tipo hidrogel y que son efectivas para el control de la administración de fármacos de forma tópica sobre la piel, resultando en formulaciones que producen una mayor permanencia de fármaco en el tejido diana y una menor absorción sistémica. Cabe esperar de estos resultados pues una mayor eficacia y una menos aparición de efectos sistémicos adversos.

Referencias:

(1) Brisaert M.G., Everaerts I., Plaizier-Vercammen J.A., 1995. Pharm. Acta Helv. 70, 161 – 166.
(2) Melero A., Ourique A. F., Silva C. B., Schaefer U. F., Pohlmann A. R., Guterres S. S., Lehr C., Kostka K., Beck R. C. R. Eur J Pharm Biopharm. 2011; 79:95–101.
(3) Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., 1988. European Patent 0274961 A1.
(4) Manconi M., Valenti D., Sinico C., Lai F., Loy G., Fadda A.M., 2003. Int. J. Pharm. 260, 261 – 272.
(5) Melero A., T. Hahn, U.F. Schaefer, M. Schneider. K. Turksen (Ed.), Permeability Barrier: Methods and Protocols, Humana Press, New York (2011), pp. 33–50

Agradecimientos: Los autores desean agradecer a la fundación CAPES por la beca de A. Ourique, los proyectos INCT_if, CNPq/Brazil, CAPES/Brazil, y Rede Nanocosméticos MCT/CNPq/Brazil, así como el proyecto BMBF BRA 09/017. También a P. Meiers por su asistencia técnica en los ensayos de permeabilidad.

ACQUIRING KNOWLEDGE ON ANTIBACTERIAL EFFECT OF BIOACTIVE GLASS BY NEUROFUZZY LOGIC

M.M. Echezarreta, M. Landin
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, A Coruña

Introduction: Bioactive glasses (BG) are special systems composed by SiO_2, CaO, P_2O_5, and NaO that show bioactive behaviour due to their ability of bonding soft and hard tissues through complex reactions (1). BGs have been employed for clinical use for a variety of medical applications, including surgical orthopaedics and dentistry.

Bacterial colonisation of the used materials is the most important reason of failure of these surgeries. Antibacterial properties of BGs have been studied by different authors (2). The wide variety of biomaterials and conditions (bacteria and antimicrobial conditions or glass pretreatment) in those studies hinder general conclusions being obtained on the specific factors that influence the bactericidal capacity and the best combination of characteristics in achieving the maximum antibacterial effect.

Artificial intelligence tools allow the treatment of historical data and finding general or new patterns from a dataset in a process named "data mining" (3). In particular, the neurofuzzy logic (NFL) approach combines the adaptive learning capabilities from artificial neural networks with the generality of representation from fuzzy logic through simple rules. NFL has proven its usefulness in modelling complex non-linear relationships hidden in data, giving higher accuracy in prediction than classical statistics and helping the understanding of those relationships between variables (3). The aim of this study was to establish general conclusions about BG antibacterial effect from an extensive database from literature, finding the specific factors that influence the results of bactericidal capacity of BGs experiments using NFL approach

Materials y Methods:

A large database (348 facts) on antimicrobial properties of several bioactive glasses was generated from 10 previously published articles from 2000 to 2010. The growth index was modelled using 21 variables or inputs that can be classified into three groups. BGs characteristics [production method, BGs composition regarding compound concentration (SiO_2, CaO, Na_2O, P_2O_5, MgO, K_2O, Al_2O_3, B_2O_3, Ag_2O, CuO) (w/w %), particle size (μm), morphology as nanoparticles, powder, particles and fibres and BG concentration (mg/mL)]. Bacterial characteristics [microorganism specie including *S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, E. coli, P. aeruginosa* and *S. typhi*, and morphology (bacillus or coccus)] and microbiological experimental conditions [bacterial concentration (CFU/mL), culture time (h) and culture media (buffered solutions and nutrient solution)].

The output recorded was the growth index (GI), measured as a function of the number of survival bacteria colonies. Absence of growth (GI= 0) indicates bactericidal effect. Very sparse, sparse and moderate values of GI (GI=1 between 0-5 colonies, G=2 between 5-50 and G=3 between 50-300 colonies, respectively indicate moderate growth. The growth index of 4 (>300 colonies) indicates no effect. Commercial NFL software, FormRules v3.31 (Intelligensys Ltd, Stokesley, UK) was used. The training process was conducted, in the same way, as reported previously by other authors (4).

Results and Discussion:

The common factor in the published studies on antibacterial properties of BGs is the great variability in the conditions used with regard to the bacteria types, compositions and sizes of BGs as well as microbiological parameters used. In this situation to establish general conclusions on the optimal BGs properties to assure antibacterial activity is a complex task.

The 21 inputs and the corresponding growth index reflect the main variables (independent and dependent) included in the articles from literature. The large database on antibacterial properties of BGs materials was successfully modeled (train set r^2 = 76.31, computed f-ratio=5.81 with 19 and 348 f.d., $\alpha<0.01$) allowing the selection of the critical factors or inputs which accurately explain the variability of the growth index, selected as output.

Fig. 1 presents the four sub-models considered by NFL to explain the GI variability and the inputs included by them. It is interesting to note the reduced number of inputs, five (SiO_2 and Ag_2O concentration, BG concentration, bacteria specie and bacteria concentration) out of the twenty one that NFL had selected as the ones having an important effect on the growth index or, in other words, enough to explain GI variability. Therefore, the sub-models generated pointing out a significant input interaction of SiO_2 and BG concentration (in purple) as the main effect and the interaction of BG concentration and bacteria specie, the single effects of Ag_2O and bacteria concentrations affecting growth index (Fig. 1).

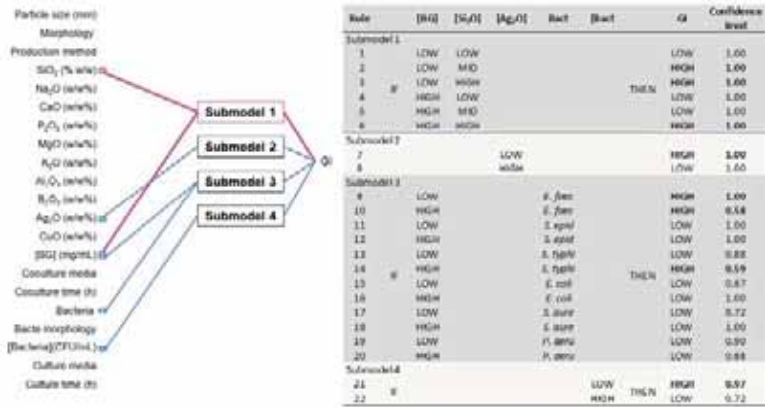


Figure 1. Submodels with indication of significant inputs that explain variability of growth index (GI) and set of IF…THEN rules and corresponding confidence levels generated by NFL

NFL technology allows a set of "IF….THEN" rules per sub-model with their corresponding membership degrees to be generated (3). Using those rules, Neurofuzzy generates understandable and reusable knowledge on the antibacterial activity of BGs.

The meaning of Low, Medium and High depends on the range of dataset values for variables BG, Ag_2O, bacteria and SiO_2 concentrations (explanation at reference 3).

Surprisingly, antibacterial effect cannot be explained by particle size or production method as indicated by other authors. BG bactericidal effect depends mainly on BG chemical composition and its dissolution properties in the surrounding medium. Model indicates that BG has no effect when its concentration in the experiment is low and the silicon concentration is medium or high (submodel 1, rules 2 and 3) or the BG concentration is high and the silicon concentration is also high (submodel 1, rule 6). Our findings agree with previous authors which correlate BG antibacterial properties with the immediate release of alkaline species. The higher the silicon concentration the lower the alkaline species that can be release to the medium and the lower its bactericidal effect. From our results, it can also be deduce that silver is decisive for the BG antibacterial activity (submodel 2, rule 8). Its effect is confirmed when the Ag_2O concentration is higher than 1.5%.

The significant effect of the interaction, BGs concentration and the bacterial specie points out differences in the susceptibility of bacteria treatment with BGs, *E. faecalis* and *S. typhi* being the most resistant species (submodel 3, rules 9, 10 and 14). Those differences can be explained by variations in the structure and/or association of bacteria.

Conclusions: NFL was able to model an extensive database of historical results on bioactive glasses, to determine the critical variables that explain their antibacterial activity and to present conclusions in an explicit format.

References:

(1) Hench et al., J Biomed Mater Res. 5, 117-141. 1971.
(2) Bellantone et al., Antimicrob Agents Chemother. 46, 1940-1945, 2002.
(3) Gallego et al. http://www.intechopen.com/books/show/title/artificial-neural-networks-methodological-advances-and-biomedical-applications
(4) Landin et al., Eur. J. Pharm. Sci 38, 321-331, 2009.

Acknowledgements
This work was supported by the POCTEP 0330IBEROMARE1P project, FEDER

Long-term controlled brain delivery of microencapsulated GDNF induces functional and structural recovery of the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian monkeys

E. Garbayo[1], E. Ansorena[2], H. Lana[1], J.L. Lanciego[3], M.J. Blanco-Prieto[1]

[1]Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, University of Navarra, Spain
[2]Biochemistry & Molecular Biology Department, University of Navarra, Spain
[3]Neurosciences Division, CIMA, University of Navarra, Spain

Introduction: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a promising therapeutic agent for Parkinson's disease (PD), is a naturally occurring protein found in the brain that promotes dopaminergic neurons growth, regeneration and protection. Different approaches comprising cell grafts, gene therapies and direct delivery methods using infusion pumps have been attempted (1). Results obtained in PD animal models were confirmed by two phase I trials carried out in PD patients (2-4). These studies consisted on the intraputaminal delivery of the 'naked' protein through an infusion pump. However, by using a similar approach, a double blind phase II trial did not confirm earlier expectations and GDNF was withdrawn from clinical trials due to lack of efficacy and safety concerns such as the appearance of blocking antibodies against exogenous unglycosylated GDNF (5). Efficient GDNF brain concentrations using existing delivery methods require repeated injections or pump reservoir refilling and are difficult to sustain, due to protein degradation in solution and to GDNF low penetration when injected intracerebroventricularly. GDNF encapsulation in biodegradable and biocompatible microparticles (MP) could represent a valuable therapeutic approach. GDNF-MP efficacy was assessed by our group in a PD rat model showing that GDNF-MP were able to achieve long-term neuroprotection and neurorestoration and demonstrating that MP were an efficient vehicle for sustained neurotrophic factor delivery to the brain (1,6).

Objetive The main objective of this work was to elucidate if the controlled release of GDNF through MP drug delivery systems in a primate PD animal model is a useful strategy for (i) improving motor performance and (ii) restoring the striatum dopaminergic reinnervation, without leading to safety concerns.

Material and Methods: Human recombinant glycosylated GDNF expressed and purified by our group was used in these studies (7,8). GDNF-MP were prepared and characterized as previously described (1). Briefly, GDNF-MP were prepared by solvent extraction/evaporation method using Total Recirculating One Machine System (TROMS) technology. GDNF encapsulation efficiency was quantified by Western Blot. Released GDNF bioactivity was assessed using the PC-12 cell line as described (1). Animal handling was conducted in accordance with the European Council Directive 86/609/EEC. The experimental design was approved by the University of Navarra Ethical Committee for Animal Testing (CEEA/050-11) as well as by the Health Department from the Navarra Government (ES/31-2016-000001-US). Ten adult male *Macaca fascicularis* monkeys were used in the study. Animal basal motor function was assessed using clinical rating scales (CRS). Basal dopaminergic function was measured by ^{11}C-(+)-α-dihydrotetrabenazine positron emission tomography (^{11}C-DTBZ PET). This radioligand binds specifically to the vesicular monoamine transporter and is use as a dopaminergic innervation marker. Blood samples were obtained at various point times before and after treatment to evaluate serum IgG antibody response against GDNF. In order to evaluate fine motor skills, animals were trained on a hand-reach test. To create the animal model, primates were lesioned with the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). MPTP was weekly administered intravenously (0.5mg/kg) until each monkey reached a stable parkinsonian syndrome. The severity of the MPTP-induce parkinsonism was evaluated using CRS and ^{11}C-DTBZ PET. Only macaques with parkinsonian syndromes stables for at least 2 months after last MPTP injection were enrolled in the study. Macaques were randomly assigned to receive unilateral administration of either GDNF-loaded MP or non-loaded MP. Each monkey received 25 µg of GDNF divided in four implantation sites within the putamen. Animal motor function was evaluated weekly after treatment using CRS. In order to assess changes in the dopaminergic terminal integrity, the dopaminergic function was measured by ^{11}C-DTBZ PET every 90 days. Nine months after MP injection animals were perfused transcardiacally with a fixing solution containing 4% paraformaldehyde in 0.125 M phosphate buffer, pH 7.4. Coronal sections (40 µm thick) were used for immunohistochemistry studies.

Results: Human glycosylated GDNF was successfully microencapsulated in MP using TROMS technology. The mean particle size measured by laser difractometry was 39 µm which was totally compatible with stereotaxic injection according with previous studies. Drug entrapment efficiency was 70%. The *in vitro* bioactivity assay with PC-12 cells showed that released GDNF from MP was biologically active. The potential neurorestorative effect exerted by microencapsulated GDNF was next evaluated in a PD primate model. GDNF dose appeared to be well tolerated and no apparent safety or toxicity concern after GDNF-MP putaminal delivery was observed. None of the macaques showed weight loss, a common side effect observed after GDNF administration. Microencapsulated GDNF improved bradycinesia, rigidity and postural instability, the main cardinal PD symptoms. CRS scores improved steadily after treatment in GDNF-treated animals compared to control animals for most time periods. The performance on the hand-reach task was also improved in GDNF-treated animals. Six-month PET scan showed a bilateral increase in ^{11}C-DTBZ uptake in GDNF-MP treated monkeys while non-loaded MP animals did not showed a significant change from baseline in ^{11}C-DTBZ uptake in either hemisphere (Fig 1).

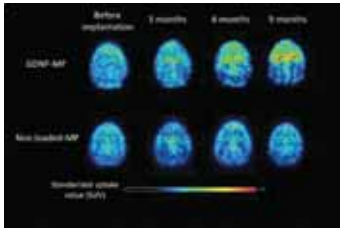


Fig 1: ^{11}C-DTBZ PET images before and after treatment with GDNF-MP and with non-loaded-MP. GDNF-MP administration induced a progresive increase in the radioligand uptake in the target areas (striatum; caudate and putamen).

The increase in ^{11}C-DTBZ uptake was correlated with improvements in the CRS. Postmortem analysis confirmed increased dopaminergic activity and showed enhanced tyrosine hydroxilase-positive fiber innervation of lesioned putamen (Fig 2). Further histological studies are currently being performed in order to fully characterize GDNF-MP long term effect and to elucidate the mechanism by which GDNF exerts its neuroprotective/neurorestorative effect.

Fig 2: Coronal section through the primate brain taken at the midline decussation of the anterior commissure level. (A) Low-power photomicrograph showing the left and right putamen. Square areas indicated by dashed lines show the places from which the insets were taken. (B) Higher-power photomicrograph taken from panel A showing tyrosine hydroxylase-positive (TH$^+$) fibers density within the left putamen following GDNF-loaded MP delivery. (C) Panel illustrating the deposit of GDNF-loaded MP. (D) Higher-power photomicrograph showing TH$^+$ fibers density within the right putamen. By comparing B&D it becomes evident that GDNF slow release from the MP induced an increase on dopaminergic terminals density. Such increase is maintained in putaminal territories located far away from the implanted site.

Conclusions: GDNF-MP showed long-term neuroprotection and neurorestoration in a primate model of PD demonstrating that MP are an efficient vehicle for sustained neurotrophic factor delivery to the brain. GDNF-MP might be a viable therapeutic strategy for PD patients.

References:

(1) Garbayo E *et al.*, Effective GDNF brain delivery using microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease. J Control Release. 2009, 17;135(2) :119-126.
(2) Gill SS. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. Nature Medicine. 2003, 9 :589-595.
(3) Patel NK *et al.*, Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. Ann. Neurol 2005, 57 (2) : 298–302.
(4) Slevin JT *et al.*, Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. J. Neurosurgery 2005, 102 (2) : 216–222.
(5) Lang AE *et al.*, Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. Ann Neurol. 2006, 59(3):459-66.
(6) Garbayo E *et al.*, Long-term neuroprotection and neurorestoration by glial cell-derived neurotrophic factor microspheres for the treatment of parkinson's disease. Mov Disord. 2011,15 :1943-1947.
(7) Ansorena E *et al.*, Production of highly pure human glycosylated GDNF in a mammalian cell line. Int J Pharm. 2010, 29;385(1-2) :6-11.
(8) Ansorena E *et al.*, A simple and efficient method for the production of human glycosylated glial cell line-derived neurotrophic factor using a Semliki Forest virus expression system. Int J Pharm. 2012, Epub ahead of print.

Acknowledgments: CAN Foundation, FUN

Estudios farmacológicos con D-pencilamina: correlación de niveles plasmáticos y cerebrales vs. eficacia clínica

Alejandro Orrico, Lucía Martí-Prats, Mª José Cano-Cebrián, Luis Granero, Ana Polache y Teodoro Zornoza

Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España

Introducción:

En general la comunidad científica acepta que las drogas de abuso generan cambios en determinados sistemas del cerebro que perduran largo tiempo después de abandonar su consumo. La naturaleza duradera de estos cambios sitúa a los individuos adictos en un estado de elevado riesgo de **recaída**; de hecho, algunos autores han estimado que el riesgo de recaída es mayor del 60% en el primer año que sigue al abandono del consumo (1). La adicción al alcohol no es una excepción: las **recaídas en el consumo de alcohol** son uno de los problemas más importantes con los que se enfrentan tanto el paciente alcohólico sometido a tratamiento deshabituador como el equipo clínico que lo trata.

Actualmente, sólo existen tres moléculas autorizadas como fármacos anti-recaída para el tratamiento del alcoholismo y su eficacia clínica puede considerarse moderada. En los últimos años los trabajos realizados por diversos grupos de investigación sugieren que el principal metabolito del etanol, el acetaldehído (ACD), es el responsable, al menos en parte, de ciertos efectos neuroconductuales que explicarían la adicción al alcohol (2). Dada la alta reactividad del ACD, la administración sistémica de sustancias capaces de reaccionar químicamente con el ACD - en otras palabras, "de secuestrarlo" *in vivo*- podría, potencialmente, suprimir o atenuar estos efectos del etanol abriendo nuevas posibilidades para la prevención de las recaídas. Una de estas sustancias es la D-penicilamina (DP): se trata de un fármaco ya comercializado para otros fines y con una elevada capacidad para secuestrar al ACD. Nuestro grupo ya ha comprobado en trabajos previos la capacidad de esta molécula para suprimir de un modo dosis-dependiente algunos de los efectos del etanol sobre el sistema nervioso central. En este trabajo pretendemos analizar con más detalle su potencial uso como agente anti-recaída y para ello, perseguimos alcanzar los siguientes objetivos:

(1) evaluar la eficacia de la DP para prevenir las recaídas en el consumo del alcohol en un modelo animal de consumo crónico de etanol a largo plazo.

(2) determinar las concentraciones de fármaco en plasma y en tejido cerebral que se asocian con la eficacia farmacológica.

Materiales y Métodos:

Se emplearon 41 ratas macho de la raza Wistar, que se sometieron a un protocolo de alcoholización a largo plazo que facilita la manifestación de las recaídas en el consumo (3). La recaída puede cuantificarse a través de la medición del conocido como fenómeno ADE ("Alcohol Deprivation Effect"). Todos los experimentos se desarrollaron entre la finalización del 5º periodo de abstinencia y el comienzo del siguiente periodo de re-exposición. Los animales contaban en ese momento con un historial de consumo de aproximadamente 9-10 meses. El consumo de alcohol mostrado por cada animal siempre se expresa como gr de etanol/kg/día

Experimento 1: Efecto de la administración subcutánea de DP en el fenómeno ADE.

A cada animal se le implantó quirúrgicamente, dos días antes de la reintroducción del etanol, una mini-bomba osmótica ALZET® 2ML1 a nivel subcutáneo. Cada bomba liberó a velocidad constante y durante una semana una de las siguientes soluciones: Agua (n=8), DP 0.25 mg/h (n=9) o DP 1 mg/h (n=8). La ingesta basal se determinó a partir de la media aritmética del consumo de etanol cada 24 horas cuantificado durante los tres días previos al comienzo del quinto periodo de abstinencia (valores "B_1", "B_2" y B_3 de la figura 1A). El consumo de alcohol tras la re-exposición del animal al mismo, se cuantificó durante 4 días (*post-abstinence days* en la Figura 1A).

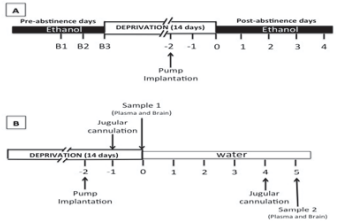


Figura 1. (A) Protocolo seguido en el experimento 1. (B) Protocolo seguido en el experimento 2.

Experimento 2: Determinación de niveles de DP en plasma y cerebro.

Los animales empleados en este experimento fueron sometidos al mismo protocolo de alcoholización y quirúrgico anteriormente descrito. Un total de 16 animales fueron utilizados para determinar la concentración de DP en plasma y cerebro tras la administración subcutánea de DP a las velocidades de 0.25 mg/h (n=8) y 1mg/h (n=8). Las concentraciones de DP se determinaron los días 2 (subgrupo n=4) y 7 (subgrupo n=4) después de la implantación de la bomba, correspondiendo a los días 0 y 5 post-abstinencia del experimento 1 (ver Figura 1B). Las muestras de sangre (0.2-0.3 ml) se recogieron con jeringuillas heparinizadas a las 12:00 a.m. del día correspondiente. Tras el muestreo de sangre, las ratas fueron inmediatamente sacrificadas con objeto de muestrear dos regiones distintas del cerebro (cerebro anterior y cerebro medio) que fueron procesadas en el momento para su análisis.

El análisis de las muestras empleó un método cromatográfico de HPLC con detección electroquímica desarrollado en nuestro laboratorio a partir de dos protocolos anteriores (4,5). El límite de detección del método se estableció en 0.004 µg/ml.

Para el análisis de los datos se empleó un ANOVA mixto seguido por la prueba de Bonferroni cuando se detectaron diferencias significativas.

Resultados y Discusión.

Experimento 1: Efecto de la administración subcutánea de DP en el fenómeno ADE.

Los cuatro días posteriores a la re-introducción tras el quinto periodo de abstinencia observamos el típico incremento en el consumo de alcohol indicativo del fenómeno ADE en el grupo control (Figura 2A). Aparentemente la administración de DP redujo el ADE de forma dosis-dependiente. El ANOVA mixto confirmó una interacción significativa ($F(8,88)=2.24$; $p=0.031$). El análisis post-hoc demostró que sólo la administración subcutánea de DP 1mg/h fue capaz de suprimir el ADE durante los cuatro días post-abstinencia. No ocurrió esto con la dosis de DP 0.25 mg/h.

La preferencia por el etanol total y el consumo total de líquido se muestra en la Figura 2B y 2C respectivamente. Como se puede observar, tras dos semanas de abstinencia la preferencia se vio incrementada significativamente ($F(8,88)=3.74$; $p=0.02$) en los grupos control y DP 0.25 mg/h respecto a su basal. Sin embargo, los animales tratados con la dosis grande de DP no mostraron cambios significativos en ninguno de los 4 días post-abstinencia ($p=0.877$, $p=0.154$, $p=0.973$ and $p=0.505$). Finalmente, la ingesta líquida total (Figura 2C) no se vio modificada.

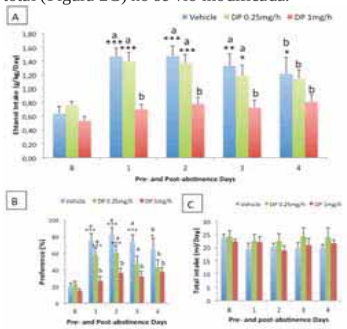


Figura 2. Resultados del experimento 1. (A) Ingesta de ettanol, (B) preferencia de etanol e (C) ingesta total líquida. Los datos son valores medios±e.e. Los asteriscos reflejan diferencias significativas respecto al basal (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$). Las diferentes letras (a,b) indican diferencias significativas respecto a los grupos en cada día post-abstinencia. ($p<0.05$).

Experimento 2: Niveles de DP en plasma y cerebro.

Los niveles de DP en plasma oscilaron entre 0.4-0.5 µg/ml en plasma en los días 2 y 5 para el grupo DP 0.25mg/h y entre 2.8-4.3 µg/ml para el grupo DP 1mg/h. Para los dos velocidades de infusión ensayadas, los niveles plasmáticos en el día de muestreo 5 tendieron a ser superiores a los obtenidos en el día 2, aunque no se detectaron diferencias significativas.

Por otro lado, no se detectó DP en cerebro de los animales del grupo DP 0.25 mg/h, independientemente de la región analizada. Sin embargo, en el grupo DP 1mg/h, los niveles de DP en cerebro constituyeron alrededor del 2-3% de los encontrados en plasma.

Referencias:

(1) McLellan et al. The journal of the American Medical Association.284:1689-1685. (2000)
(2) Correa M. et al. Neurosci.Biobehav.Rev.36(1):404-30 (2012).
(3) Holter et al. Psychopharmacology;145(4):360-369. (1999).
(4) Bergstrom et al. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics. 9:603-621.(1981)
(5) Kreuzig and Frank. Journal of chromatography. 218:615-620(1981)

MODELOS BASADOS EN REGLAS Y *QSPR* PARA LA PREDICCIÓN DE LA PERMEABILIDAD EN CACO-2.

M.A. Cabrera-Pérez[1,2,3], H. Pham-The[1], M. Bermejo[2], I. González-Álvarez[2] y T. Garrigues[3]

[1]Group of Molecular Simulation & Drug Design, Center of Chemical Bioactives. Central University of Las Villas, Cuba.
[2]Department of Engineering, Area of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Miguel Hernández University, Spain.
[3]Department of Phamacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,Valencia University, Spain.

Introducción: La permeabilidad intestinal es una propiedad farmacocinética relacionada con el proceso de absorción y desempeña un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos y en los estudios de bioequivalencia de compuestos genéricos. Las células Caco-2 es un método *in vitro*, de bajo costo y con una alta capacidad de cribado, que se utiliza para el estudio de la permeabilidad intestinal (1). Por otro lado, los métodos *in silico* han sido ampliamente utilizados para predecir la permeabilidad intestinal y aunque varios modelos han mostrado adecuados valores de exactitud y precisión en la predicción de esta propiedad, su uso práctico ha estado limitado debido a la utilización de bases de datos pequeñas, la alta variabilidad de los datos de permeabilidad y la pobre validación externa. En este sentido los objetivos del estudio son: 1- Desarrollar reglas, basadas en propiedades moleculares simples, y modelos de relación cuantitativa estructura-propiedad (QSPR) para clasificar la permeabilidad intestinal en células Caco-2 y 2- Validar las predicciones computacionales utilizando un set externo de compuestos.

Materiales y Métodos: Se colectó la mayor base de datos pública de compuestos con valores de permeabilidad en Caco-2 (~1300 compuestos) y se utilizó para el desarrollo de los modelos *in silico*. Dos valores de corte se utilizaron para dividir la data en compuestos con ALTA (H), MODERADA (M) y BAJA (L) permeabilidad: Papp $\geq 20\times10^{-6}$cm/s (Metoprolol, alta permeabilidad) y Papp $< 0.7\times10^{-6}$ cm/s (Manitol, baja permeabilidad). Veintidos compuestos fueron utilizados como un set de predicción externo. Un total de 265 descriptores moleculares (0D-1D) fueron calculados con los programas DRAGON, VolSurf y CDK. Un total de 21 propiedades físico-químicas se seleccionaron para obtener las reglas. Los parámetros de mayor influencia sobre los valores de permeabilidad se determinaron con el clasificador OneR (Weka). Cada clasificador se obtuvo por un procedimiento de validación cruzada (10 veces) y se compararon los valores de sensibilidad y especificidad de la curva ROC. Los parámetros más relevantes fueron graficados por pares para una mejor visualización de las reglas basadas en dos propiedades. El error estándar se utilizó para la selección de las reglas. Las mejores clasificaciones basadas en 1 y 2 propiedades fueron ensambladas en un regla de 3 propiedades.
Para el desarrollo de los modelos QSPR se utilizaron 1006 compuestos para la serie de entrenamiento y 283 para la de predicción. Se desarrollaron 5 modelos de árboles de clasificación, utilizando 97 descriptores moleculares previamente seleccionados y se siguió la siguiente metodología (Figura 1):

Figura 1. Procedimiento de tres etapas para la clasificación de las diferentes clases de permeabilidad en Caco-2, utilizando modelos consenso.

Resultados y Discusión: De las 21 propiedades físico-químicas evaluadas, el Área Superficial Polar (PSA) es la que mejor describe las variaciones en la permeabilidad (66.4% de la data), lo que está en correspondencia con su rol en el transporte a través de la membrana y en la absorción de fármacos (2, 3). Otras propiedades relevantes fueron el peso molecular (MW), el coeficiente de partición (MLogP) y el coeficiente de distribución (LogD7.5) con un 60.7%, 61% y 60.6% de clasificación de la permeabilidad, respectivamente. Para explicar el carácter multifactorial de la permeabilidad, se evaluó la interacción entre descriptores. A pesar de la excelente correlación entre el PSA y el coeficiente de permeabilidad, este descriptor tiene una alta correlación con el resto de propiedades físico-químicas. En este sentido, para la clasificación basada en dos propiedades, el MW y el LogD7.5 mostraron los mejores resultados, alcanzando un 72.1% de clasificación para los compuestos con alta permeabilidad y un 64.3% para los de baja. Sin embargo, la combinación de las 3 propiedades permitió una mejor clasificación de la permeabilidad en Caco-2. Un 78% y 70% de los compuestos con alta y baja permeabilidad fueron adecuadamente predichos (Figura 2).

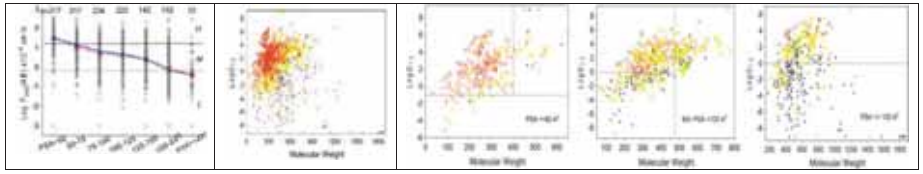


Figura 2. Diferentes reglas de clasificación de la permeabilidad en Caco-2, basadas en 1, 2 y 3 propiedades físicoquímicas.

Para el desarrollo de los modelos QSPR, se obtuvieron un total de 15 modelos de clasificación para las tres clases seleccionadas (ver Figura 1). Tres de los 5 modelos en cada grupo se utilizaron para obtener modelos consenso y su selección se basó en la capacidad de clasificación del set predicción externa (Figura 3). La predicción final para el sistema de modelos consenso evidenció buenos resultados, siendo la clasificación en la serie de entrenamiento para los compuestos de H, M y L permeabilidad 78.4%, 76.8 y 79.1%, respectivamente. En el caso de la serie de predicción la exactitud en la clasificación fue de un 78.6% para los de alta permeabilidad, 71.1% para los de moderada y de 77.6% para los de baja permeabilidad.
Los modelos desarrollados por ambas metodologías (reglas y QSPR) fueron utilizados para clasificar un set externo de validación. Los resultados que se muestran en la Tabla 1 evidencian un 77.3% de buena clasificación.

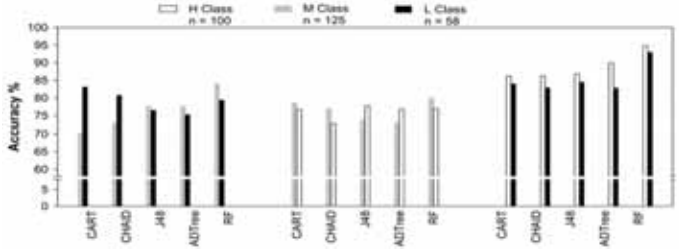


Figure 3. Selección de los modelos de árboles de clasificación para el voto consenso, basado en la prevalencia de clasificación del set de predicción externo.

Tabla 1. Resultados de la clasificación del set de validación externa.

Compuestos	Perm (R-3P)	Perm $QSPR_c$	Perm Caco-2	Compuestos	Perm (R-3P)	Perm. $QSPR_c$	Perm. Caco-2
ASA	***ML***	***M***	H	Furosemida	L	L	L
Amoxicilina	***L***	M	M	Indometacina	MH	H	H
Antipirina	H	H	H	Naproxeno	H	H	H
Atenolol	ML	M	M	Norfloxacin	ML	M	M
Cafeina	H	H	H	Paracetamol	H	H	H
Carbamazepina	H	H	H	Propranolol	H	H	H
Celiprolol	***MH***	***H***	L	Ranitidina	ML	M	M
Cimetidina	ML	M	M	Terbutalina	ML	M	M
Colchicina	MH	M	M	Teofilina	***ML***	H	H
Cortisol	MH	H	H	Verapamilo	MH	***NC***	H
Fexofenadina	ML	L	L	Vinblastina	ML	M	M

Referencias:

(1) A. L. Ungell, P. Artursson, in *Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Vol. 40*, Second ed. (Eds.: Han van de Waterbeemd, B. Testa), WILEY-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 133-59.
(2) J. Kelder, P. D. Grootenhuis, D. M. Bayada, L. P. Delbressine, J. P. Ploemen, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1514-9.
(3) P. Stenberg, U. Norinder, K. Luthman, P. Artursson, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1927-37.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo financiero de la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana para el Desarrollo (AECID) al proyecto: A1/036687/11: *Montaje de un laboratorio de Química Computacional, con fines académicos y científicos, para el diseño de potenciales candidatos a fármacos, en enfermedades de alto impacto social* y a la Comisión Europea al proyecto: DCI-ALA/19.09.01/10/21526/245-297/ALFA 111(2010)29: Red-Biofarma. *Red para el desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales que incrementen la competencia y el impacto social de las Industrias Farmacéuticas Locales.*

ANÁLISIS DE UN MODELO DE TRES COMPARTIMENTOS PARA EL ESTUDIO DEL TRASPORTE Y METABOLIZACIÓN DE FÁRMACOS EN MONOCAPAS DE CÉLULAS CACO-2

M. Llabrés

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna

Introducción. El estudio in vitro de la permeabilidad de fármacos utilizando monocapas cao-2 permite, además de determinar la permeabilidad del fármaco debido a la difusión pasiva, estudiar la función que desempeñan diversos sistemas de transporte que afectan a la absorción y biodistribución de los fármacos y el metabolismo intracelular (1, 2). El parámetro más utilizado para expresar los resultados es la permeabilidad aparente o efectiva (P, LT^{-1}) calculada mediante la ecuación,

$$P = \frac{\Delta x_R / \Delta t}{S c_0} \qquad \text{(ec. 1)}$$

Donde $\Delta x_R / \Delta t$ es la velocidad media de entrada del fármaco en el compartimento receptor (MT^{-1}); S, la superficie de la monocapa celular (L^2); c_0, la concentración de fármaco en el compartimento fuente que se supone constante durante el experimento. La identificación de los mecanismos activos de transporte se basa en comparar las permeabilidades aparentes en dirección apical – basolateral (P_{AB}) y basolateral – apical (P_{BA}), así como el efecto que tienen los inhibidores del transporte. La ecuación 1 se deriva de la primera ecuación de Fick en estado estacionario suponiendo además que se dan las condiciones de sumidero (concentración de fármaco en el compartimento receptor despreciable). La constatación de que las células caco-2 expresan distintos sistemas transportadores de fármacos en los lados apical y basolateral, así como la posibilidad de metabolización intracelular del fármaco, ha llevado diversos autores a proponer el modelo de tres compartimentos; en la figura 1 reproduce el publicado por Sun y Pang (1). Es bien conocido que las funciones del tiempo derivadas de los modelos n – compartimentales son, en principio, funciones n – exponenciales y la justificación del empleo de la ecuación 1 se ha basado en el análisis de simulaciones numéricas. El objetivo de esta comunicación es derivar la relación existente entre la ecuación 1 y las funciones del tiempo derivadas del modelo de Sun y Pang cuando se da la condición necesaria y suficiente que el sistema se encuentre en estado transitorio. Tanto el desarrollo analítico del modelo como las simulaciones numéricas se realizaron utilizando el programa de álgebra simbólica wxMaxima (http://sourceforge.maxima.net).

Modelo. La solución general de los sistemas lineales homogéneos en el dominio de Laplace es:

$$\mathbf{x}(s) = (s\mathbf{I} - \mathbf{K})^{-1}\mathbf{x_0} \qquad \text{(ec. 2)}$$

Donde $\mathbf{X}(s)$ es el vector de funciones (racionales) en el dominio de Laplace; $\mathbf{I}$, la matriz unidad de dimensiones n x n; $\mathbf{K}$, la matriz del sistema,

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} & 0 \\ k_{12} & -k_{22} & k_{32} \\ 0 & k_{23} & -k_{32} \end{pmatrix} \qquad \text{(ec. 3)}$$

La interpretación de las constantes de velocidad se deriva de la figura 1. El vector de condiciones iniciales $\mathbf{x_0}$ es igual a $[x_{01}, 0, 0]^T$ cando el experimento es en dirección basolateral – apical o igual a $[0, 0, x_{0,3}]^T$ cuando es el dirección apical – basolateral. En el problema que nos ocupa pueden darse dos casos; primero, si para i = 1…n $k_{ii} = \sum_{j\neq i}^{n} k_{ij}$ el sistema es cerrado y una de los autovalores de $\mathbf{K}$ es igual a cero y los n – 1 restantes son reales negativos; segundo, si para i = 1 … n $k_{ii} \geq \sum_{j\neq i}^{n} k_{ij}$ el sistema es abierto y los n autovalores son reales negativos[1]. En el contexto del modelo en estudio, la primera situación se da cuando Cl_{met} =0. Para que la velocidad de entrada en el compartimento receptor sea constante deben darse dos condiciones. Primero, la condición de sumidero, $c_{baso} \approx 0$ o $c_{ap} \approx 0$, según sea el compartimento receptor; la condición de sumidero puede ajustarse modificando el volumen del compartimento receptor o mediante el drenaje continuo del fármaco. Segundo, debe darse la condición de estado transitorio, es decir,

$$\frac{dc_{cel}}{dt} \cong 0 \qquad \text{(ec. 4)}$$

Obviamente la situación de estado transitorio estricta sólo se alcanza para un instante determinado, razón por la que hemos relajado su definición; por lo tanto, si el transporte es, por ejemplo, en dirección apical – basolateral,

$$\frac{dc_{baso}}{dt} = \frac{1}{V_{baso}}(Cl_d + Cl_{efflux})\, c_{cell}^{ET} \qquad \text{(ec. 5)}$$

Por otro lado, en condiciones de sumidero,

$$c_{cell}^{ET} = \frac{Cl_d + Cl_{abs}}{Cl_{met} + 2Cl_d + Cl_{eff}} \frac{x_0}{V_{ap}} \qquad \text{(ec. 6)}$$

Las ecuaciones 4 - 6 explican por qué la velocidad de entrada en el compartimento receptor es constante durante un cierto tiempo y proporcional a la concentración inicial en el compartimento fuente (apical).

Otro punto de interés, el tiempo necesario para alcanzar el estado transitorio, puede analizarse directamente a partir de la matriz del sistema. Una de las propiedades de los autovalores de esta matriz es que $\max(\lambda_i) > \max(k_{ii})$; debido al bajo valor de V_{cell} (10 – 15 µl, referencia 1), k_{22} es mucho mayor que las restantes constante de velocidad de salida de los compartimentos y el estado transitorio en el compartimento celular se alcanza en menos de un minuto.

Simulación. Hemos comparado la solución general del modelo con la simplificación introducida a través del estado transitorio simulando el modelo tomando valores dentro de los intervalos utilizados por Sun y Pang. Como resumen de los resultados obtenidos se muestran las figuras generadas con los valores siguientes; (volúmenes en ml; aclaramientos en ml/min): V_{ap} = 1,50; V_{bas} = 2;50; V_{cel} = 11,56·10^{-3}; Cl_d = 0,20; Cl_{efl} = 0,50; Cl_{met} = 0,20. Las condiciones iniciales fueron $\mathbf{x_0} = [0,0,100]^T$. Las constantes de velocidad calculadas fueron 95,23; 0,122 y 0,0158 min^{-1}. La figura 2 muestra las curvas predichas por el modelo donde se aprecia como el compartimento celular alcanza la concentración máxima casi de forma instantánea. En la figura 3 hemos incluido los niveles predichos para el compartimento receptor (basolateral) y celular, junto con la curva calculada considerando el estado transitorio y la condición de sumidero (ecuaciones 4 – 6; línea de puntos); hemos reducido la escala de ordenadas al intervalo 0 – 5 y de tiempo a 0 – 1 minuto para apreciar con claridad como el estado transitorio se alcanza rápidamente.

Conclusiones. Hemos justificado el uso de la ecuación 1 en el marco del modelo de Sun y Pang bajo la hipótesis de que estamos trabajando en condiciones de sumidero y en régimen de estado transitorio. El valor de la permeabilidad efectiva, en términos de los parámetros del modelo de Sun y Pang se deduce inmediatamente de las ecuaciones 5 y 6. La determinación de los parámetros del modelo requeriría el bloqueo selectivo de los procesos de transporte y metabolización.

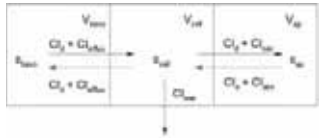


Figura 1. Modelo de tres compartimentos de Sun y Pang (1)

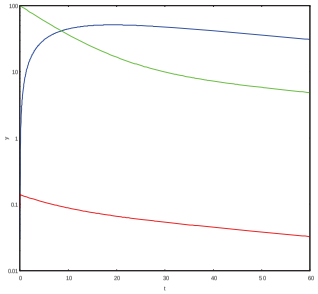


Figura 2. Perfiles de concentración – tiempo simulados

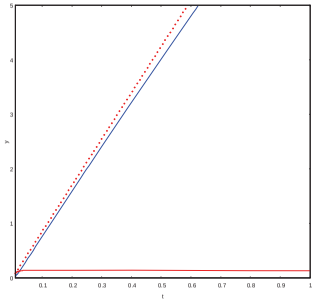


Figura 3. Perfiles de concentración tiempo en el compartimento receptor, compartimento celular y valores predichos en estado transitorio y condiciones de sumidero (línea de puntos)

Bibliografía

(1) Sun, H., Pang, K. S., *Drug Metab. Disp.* **36** (2008) 102

(2) Pang, K. S., Maeng, H.-J., Fan, J. *Mol. Pharm.* **6** (2009) 1734

(1)Puede solicitar el desarrollo del modelo a mllabres@ull.es

DEVELOPMENT OF A PBPK MODEL FOR THE ANTICANCER DRUG VIVIA009 AND ITS MAIN METABOLITE ADMINISTERED AS A NEW DELIVERY SYSTEM IN RATS

M. Matoses-Osborne[1], Tudela C[2], Garrido MJ[1], Bennet TA[2], Ballesteros J[2], Caveda L[2], Troconiz IF[1]

[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Navarra, España

[2] Vivia Biotech S.L.; Tres Cantos; Spain

Introduction: Vivia009 is a patented new drug indication that targets B cell population overproliferation in Non-Hodgkings lymphoma (NHL) patients. NHL are a heterogeneous group of malignacies of the lymphoid system that includes any kind of lymphoma except the Hodgkin's lymphoma.

The rapid expansion of nanoparticle research demands new technologies that will enable better interpretation of experimental data and assistance in the rational design of future nanoparticles. Recently, great efforts have been made in the study of the biodistribution, toxicity and medical applications of nanoparticles (89).

Physiological based pharmacokinetic models (PBPK) are based on the anatomical structure of the living systems, with each important organ or tissue listed as an individual compartment. All compartments are interconnected through the mass transportation among them. PBPK help simulate the concentration-time profile of a drug in a species by integrating the physicochemical properties of the compound with the physiology of the species. The applications of PBPK modeling for nanoparticles have appeared as early as 2006 (8).

The aim of this project was to develop an integrated PBPK model capable to describe simultaneously the biodistribution of Vivia009 and its main metabolite, after the free drug's administration or MP.

Materials and Methods: Fifty-one rats divided in two groups were treated with 0.75 mg/kg of either free drug (free009) or MP given as a bolus. At time points 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 24 hours, three animals were sacrificed. Samples of plasma, axillary lymph node, brain, spleen and bone marrow were collected to measure Vivia009 and its metabolite concentrations. Data regarding blood flows and tissue volumes were taken from literature (1-4). Modelling and simulations were performed with NONMEM version VII using the naïve pool data approach.

Results and Discussion: Model development took part in three steps: first, the free009 model was developed consisting of 6 anatomical compartments (blood, brain, bone marrow, lymph node and rest) connected to each other in an anatomical fashion via blood flow (Figure 1, middle part). Secondly, the same six compartments were added for the metabolite, produced in the liver and included in the rest compartment (Figure 1, right part) and bound to the free009 model through the hepatic clearance (Fm × CL). Finally, microparticle model is bound to the free009 model through the in vivo release constant (K_{REL}) within the tissues (Figure 1, left part).

Figure 1.- PBPK model for microparticle (all), or free009 (middle & right part). Organs are represented by a rectangular compartment and connected in an anatomical manner with blood flow (red, blue) and lymphatic flow (yellow). Compartments are named as follows: the first letter **N, D, M** represent microparticle, free drug and metabolite respectively. The second and third letter define the organ: PL, BR, BM, LN, SP, RT, stand for plasma, brain, bone marrow, lymph node, spleen and rest of tissues respectively. **CO**, represents cardiac output. $\mathbf{Q_{BR}}$, $\mathbf{Q_{BM}}$, $\mathbf{Q_{LN}}$, $\mathbf{Q_{SP}}$ and $\mathbf{Q_{RT}}$ represent blood flow to the brain, bone marrow, lymph node, spleen and rest of tissues, respectively. $\mathbf{PS_{LN}}$, represents permeability surface factor in the lymph nodes. $\mathbf{KI_{SP}}$, $\mathbf{KO_{SP}}$ represents constants of association and dissociation of sertraline in the spleen, respectively. **Fm**, represent the fraction of drug metabolized by the liver. **CL,** total sertraline clearance. **CLR,** renal clearance from sertraline. **CLM,** total N-Desmethyl-Sertraline clearance.

Physiological parameters used for the PBPKs model developments can be found in Table 1. Due to the fast in vitro release profile of the microparticle (data not shown), at injection time, part of its dose had been already released (F_1).

Table 1.- Physiological parameters taken from literature and additional information used to develop the PBPK models of Vivia009.

	Blood Flow = Q (L/h)	Lymph Flow = Q_L (L/h)	Organ Volumes (L)
BRAIN	0.08 [2]	0.0032 [3]	0.0017 [2]
BONE MARROW	0.152 [2]	0.00608 [1]	0.0158 [2]
LYMPH NODE	0.0096 [3]	0.000384 [1]	0.0008 [5]
SPLEEN	0.017 [5]	0.00074 [1]	0.00053 [5]
PLASMA	Cardiac Output = 4.44 [4]	Q_{LPT}=0.133 (3%)	0.0078 [4]
Rest (adrenal gl., heart, kidneys, liver, lungs, muscle, pancreas, stomach, skin, stomach, testes, thymus)	CO-Q_{BR}-Q_{BM}-Q_{LN}-Q_{SP} [7]	Q_{LRT} = Q_{LT}-Q_{LBR}-Q_{LBM}-Q_{LLN}-Q_{LSP}	0.207 [7]
PARTITION COEFICIENTS	$\frac{AUC_{tissue}}{AUC_{plasma}} = Kp$ [6]		
BLOOD TO PLASMA RATIOS	VIVIA009 = 1.8 METABOLITE = 1.75 (experimentation)		

The final model structure was based on visual inspection of the fit to the data, the value of Negative Log Likelihood, and the Akaike Information Criterion. Estimated parameter values for both models can be found in Table 2. PBPK model results for free009 are shown in Figure 2 and PBPK model results for the microparticle administration are shown in Figure 3.

Table 2.- Estimated parameter values for the microparticle (left), free009 (middle) and metabolite (right).

EMULSION MODEL PARAMETERS	FREE009 MODEL PARAMETERS	METABOLITE MODEL PARAMETERS
Kp_{PLBR} = 4.47	Kp_{DBR} = 4.5	Kp_{MBR} = 16.3
Kp_{PLBM} = 0.707	Kp_{DBM} = 0.392	Kp_{MBM} = 0.31
Kp_{PLLN} = 50.5	Kp_{DLN} = 68.6	Kp_{MLN} = 17.7
Kp_{PLSP} = 0.196	Kp_{DSP}= 28.5	Kp_{MSP} = 27.6
Kp_{PLRT} = 0.84	Kp_{DRT} = 7.97	Kp_{MRT} = 1.18
F1 = 0.45	PS_{DLN} = 3.49	CLM = 0.0267 L/h
K_{REL} = 0.0927	KISP =32.9 h^{-1}	Fm = 0.0593
CL = 0.537 L/h	KOSP = 9.6 h^{-1}	
CLM = 0.0352 L/h	CL = 0.257 L/h	
Fm = 0.0811		

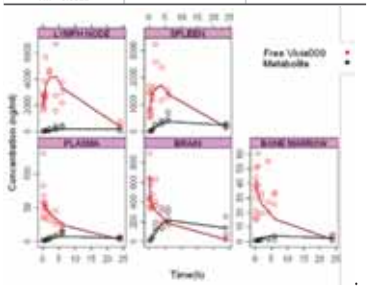


Figure 2.- Comparison of PBPK model predictions (lines) and observed concentrations dots) of Vivia009 and its metabolite after administration of FREE009.

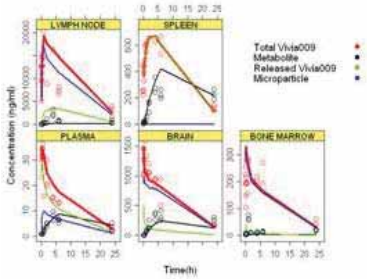


Figure 3.- Comparison of PBPK model predictions (lines) and observed concentrations (dots) of Vivia009 and its metabolite after administration of MICROPARTICLES.

Based on the results of the modeling exercise, 45% (F1) of the microparticles' dose was released before the bolus administration, behaving as a free drug.

CL,CLM and Fm increased 2, 1.3 and 1.3 times respectively, when the drug was administered as a microparticle Table 2.

Referencias:

[1] Covell D et al. Cancer Res 1986;46(8):3969.
[2] Kawai et al. J Pharmacokinet Biopharm 1994 Oct; 22(5): 327-365
[3] Meno-Tetang el al. Drug Metab Disposition 2006; 34(9):1480-1487
[4] Davis et al. Pharm Res 1993;10(7): 1093-1095
[5] Kang et al. Pharm Res 1997;14(3): 337-344.
[6] Balthasar et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2011 Feb; 38(1):121-142
[7] Bernareggi et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 1991; 19(1):21-50.
[8] Yang et al. J Nanosci Nanotechnol 2010 (10) 8452-8490

Acknowlegments:
- Vivia Biotech S.L. for supporting me and the project.

MODIFICACIÓN DEL MODELO NO LINEAL PARA EL CÁLCULO DE LA PERMEABILIDAD EN MONOCAPAS CELULARES

V. Mangas-Sanjuan[1], I. Gonzalez-Alvarez[1], VG. Casabó[2], M. Bermejo[1]

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

Introducción: El cálculo de la permeabilidad mediante estudios de transporte *in vitro* en monocapas celulares es de gran relevancia en los estudios preclínicos de desarrollo de nuevos fármacos. La correcta estimación de la permeabilidad es fundamental, ya que afecta a la selección de nuevas moléculas durante su desarrollo preclínico. El cálculo de la permeabilidad deriva de la Ley de Fick o Ley de difusión de la materia, cuya primera aproximación es una ecuación lineal ya que se asumen condiciones sink (o sumidero) y que la concentración en la cámara dadora no se modifica[1]. Posteriormente, Artursson[2] publicó un modelo lineal para el cálculo de la permeabilidad en condiciones sink, en el que se corrige la concentración en la cámara dadora a cada tiempo de muestreo, mediante el cálculo de las fracciones transportadas. La principal ventaja de ambas aproximaciones es que son regresiones lineales de las cantidades acumuladas o fracciones transportadas frente al tiempo pero tienen la limitación asociada a aquellos casos en los que no se cumplen los supuestos previos, es decir condiciones sink y cambio despreciable en la concentración dadora. Tavelin[2] propuso utilizar una ecuación general, en la cual el cálculo de la permeabilidad se realiza mediante un modelo no lineal, válido tanto para condiciones sink como para condiciones no sink. Sin embargo, el mismo autor refleja la incapacidad de su modelo para estimar correctamente la permeabilidad en situaciones en las cuales se produce una latencia al inicio de la difusión o un mayor paso inicial de fármaco a través de la monocapa. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un modelo no lineal que permitiera el cálculo de la permeabilidad en cada una de las situaciones posibles y realizar simulaciones con el fin de determinar cual es el mejor modelo para el cálculo de la permeabilidad.

Materiales y Métodos: El trabajo fue realizado en Excel 2010. El modelo no lineal propuesto en este trabajo es una modificación del modelo no lineal de Tavelin En el nuevo modelo se permite calcular una permeabilidad hasta el primer tiempo de muestreo y otra diferente o igual desde el primer hasta el último tiempo de muestreo. La comparación de cada uno de los cuatro modelos se realizó generando una población de mil experimentos, con tres pocillos por experimento, incorporando un modelo de error interindividual exponencial entre las permeabilidades individuales y un modelo de error residual exponencial. Los datos fueron simulados para cada uno de los tres tipos de perfiles de concentraciones acumuladas frente al tiempo, en condiciones *sink* y *no sink* y cuatro combinaciones para cada uno de ellos de alta y/o baja variabilidad interindividual y residual (alta=coeficiente de variación del 20% y baja del 5%.). El primer perfil asume una latencia inicial en el paso del fármaco a través de la monocapa. El segundo perfil no presenta ningún cambio en el paso del fármaco a través de la monocapa. El tercer perfil asume un paso inicial de fármaco mayor y una disminución posterior al primer punto de muestreo. Bajo estas condiciones se simularon los datos y se analizaron con cada uno de los modelos para el cálculo de la permeabilidad, es decir la aproximación lineal (LINEAL), la aproximación lineal con corrección de la concentración dadora (LINEAL-corregida), la ecuación no lineal original (NO-LINEAL)y el nuevo modelo (NO LINEAL-modificada). Se calcularon los errores medios de estimación, error intraensayo y error individual. La comparación de los modelos se realizó mediante un ANOVA de los errores medios de estimación, errores intraensayo y errores individuales entre los cuatro métodos para la determinación de la permeabilidad por perfil y variabilidad designados en SPSS 20.0

Resultados y Discusión: Los resultados de los ANOVA para cada uno de los perfiles en condiciones sink y no sink se muestran en las tablas 1,2 y 3. El modelo propuesto en este trabajo presenta un error de estimación inferior en la mayoría de casos al modelo no lineal de Tavelin. Los modelos lineales presentan valores de errores de estimación similares al modelo no lineal corregido en los casos en los que se cumplen condiciones sink, ya que la acumulación de las cantidades frente al tiempo siguen un comportamiento lineal. Sin embargo, en condiciones no sink, el sesgo en la estimación es superior en todos los casos para los modelos lineales frente a los no lineales y sólo el modelo de Tavelin no lineal presenta valores similares al modelo no lineal de dos pendientes en el perfil 2, cuando se presenta una única pendiente para todos los puntos experimentales.

PERFIL 1

NO SINK		SINK	
H IIV	H RSV	H IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
H IIV	L RSV	H IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
L IIV	H RSV	L IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	S
L IIV	L RSV	L IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	S

PERFIL 2

NO SINK		SINK	
H IIV	H RSV	H IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	NS	NS	NS
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
H IIV	L RSV	H IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	NS	NS	NS
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
L IIV	H RSV	L IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	NS	NS	NS
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
L IIV	L RSV	L IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	NS	NS	NS
S	S	S	S
CS	S	CS	NS

PERFIL 3

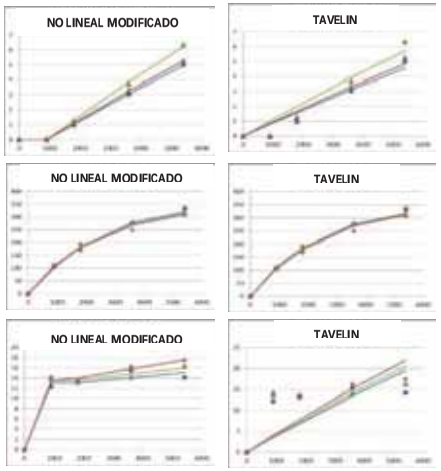
NO SINK		SINK	
H IIV	H RSV	H IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
H IIV	L RSV	H IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	S
CS	S	CS	NS
L IIV	H RSV	L IIV	H RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	NS
CS	S	CS	NS
L IIV	L RSV	L IIV	L RSV
	MC		MC
MC		MC	
NS	S	NS	S
S	S	S	S
CS	S	CS	S

Tabla donde se recogen los resultados del ANOVA para los pefiles 1, 2 y 3 en condiciones sink y no sink y para cada uno de los escenarios de variabilidad propuestos. S hace referencia a significativo, NS a no significativo, MC modelo no lineal modificado, NS modelo no lineal, S modelo lineal sink y CS modelo lineal sink corregido. IIV es variabilidad interindividual y RSV variabilidad residual.

El modelo no lineal modificado propuesto por en este trabajo presenta un menor error de estimación frente al modelo no lineal de Tavelin de forma significativa en los perfiles 1 y 3, tanto en condiciones sink como no sink. Los modelos lineales son comparables en preciosión y exactitud al modelo no lineal modificado en condiciones sink para cada uno de los perfiles. Por tanto, la estimación de la permeabilidad mediante el modelo no lineal de dos pendientes es en la mayoría de situaciones más preciso en la estimación de la permeabilidad que el resto de modelos analizados.

Referencias:

1. Dawson, D., *Principles of membrane transport*, in *Handbook of physiology*, R. B, Editor 1991, American Physiological Society: Bethesda. p. 1-45.
2. Tavelin, S., et al., *Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport*. Methods Mol Biol, 2002. **188**: p. 233-72.



Figuras 1-6. Las figuras de la izquierda corresponden al modelo no lineal de dos permeabilidades y las de la derecha al modelo no lineal. Las figuras superiores hacen referencia al perfil 1, las centrales al perfil 2 y las inferiores al perfil 3.

RIESGO GASTROINTESTINAL Y CARDIOVASCULAR DE LOS AINE: NUEVAS EVIDENCIAS Y SU REPERCUSION EN EL ABORDAJE DEL PACIENTE.

López-Pintor, E[1]

[1] Departamento de Ingeniería. Area de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández de Elche.

Introducción

Los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE) constituyen un grupo heterogéneo de fármacos que comparten acciones terapéuticas (analgésica, antiinflamatoria y antipirética) y se diferencian en su eficacia y toxicidad relativas. Constituyen uno de los grupos terapéuticos más consumidos a nivel mundial, tanto por prescripción médica como por automedicación.

Los efectos adversos más importantes de los AINE, por su frecuencia y potencial gravedad se localizan a nivel gastrointestinal (GI). La introducción de los inhibidores selectivos de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) mejoró la tolerancia GI de estos fármacos, pero puso de manifiesto efectos adversos cardiovasculares (CV) no específicos de los COX-2 y que podrían responder a un efecto de clase, compartido, en mayor o menor grado, por todos los AINE.

El objetivo de este trabajo consiste en revisar el perfil de seguridad CV y GI de los AINE y establecer las pautas para el adecuado manejo del paciente consumidor de AINE por el profesional sanitario.

Material y Métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed. Las palabras clave seleccionadas fueron: risk, safety, toxity, cardiovascular, gastrointestinal, NSAID, non-steriodal anti-inflammatory agents.. Se establecieron como límites: 1) bibliografía anterior a 10 años,; 2) meta-análisis; 3) ensayos clínicos aleatorizados, y 4) revisiones sistemáticas.

Resultados y Discusión

Riesgo CV

Se revisaron 33 artículos: siete eran ensayos clínicos, 12 meta-análisis y el resto revisiones sistemáticas. Los resultados obtenidos muestran que, en pacientes de riesgo, todos los AINE salvo la aspirina, se asocian a un incremento del riesgo CV, manifestado como infarto agudo de miocardio (IAM), accidente o muerte cerebrovascular, sin que exista una relación clara entre la especificidad de los COX-2 como mecanismo farmacológico y el incremento del riesgo cardiovascular. En comparación con placebo, Naproxeno parece ser el fármaco con menor incremento del riesgo CV, seguido de Celecoxib. El consumo crónico de Ibuprofeno y Diclofenaco se asocia a un incremento en más de tres veces del riesgo CV. La asociación entre el aumento de riesgo CV con otros AINE como indometacina, meloxicam, piroxicam apenas ha sido evaluada.

Riesgo GI

Los factores de riesgo de gastropatía por AINE y los mecanismos de profilaxis GI del paciente están bien establecidos e incorporados en la mayoría de las guías clínicas. Son: 1) edad superior a 60 años; 2) historia ulcerosa previa o de complicaciones ulcerosas relacionadas con la ingesta de AINE; 3) consumo concomitante de anticoagulantes orales ; 4) consumo concomitante de glucocorticoides; 5) enfermedad concomitante grave; 6) consumo de AINE a dosis elevadas y 7) asociación de varios AINE de forma concomitante.

Repercusiones en el manejo del consumidor de AINE

Si bien son necesarios más ensayos clínicos controlados que evalúen el perfil de seguridad CV de los AINE y permitan definir al paciente de riesgo, la información disponible hasta el momento debe incorporarse a los algoritmos de manejo del paciente consumidor de AINE. Estos protocolos deberían integrar no sólo el riesgo GI, sino también las nuevas evidencias sobre riesgo CV de los AINE.

En este contexto, el adecuado manejo del paciente consumidor de AINE por parte del profesional sanitario, toma especial relevancia. Debe garantizarse la adecuada profilaxis del paciente frente a la potencial toxicidad GI y CV de estos fármacos, lo que implica la identificación en el paciente de las posibles situaciones de riesgo y su prevención o resolución.

Los profesionales sanitarios deben realizar una evaluación previa a la prescripción y/o dispensación, del riesgo GI y CV del paciente que demande un AINE. Además, la magnitud de consumo de estos fármacos al margen de la prescripción hace que los farmacéuticos comunitarios deban tomar constancia de la importancia de su actuación, especialmente en el control de los pacientes que se automedican con AINE.

Referencias

1. Lanza FL, Chan FK, Quigley EM; Guidelines for prevention of NSAID-related ulcer complications. *Am J Gastroenterol. 2009;104(3): 728-38.*
2. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, Egger M, Jüni P. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ. 2011; 342:c7086.*

LA DERMOFARMACIA EN LA FORMACION DEL FARMACEUTICO EN LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MJ Lucero
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

Introducción: La Dermofarmacia está definida por el Diccionario de la Real Academia de la Lengua y por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (CGCOF) como la rama de la Farmacia que estudia, fabrica y expende productos de cosmética no relacionados con patologías (1,2). En la actualidad, es una oferta en la cartera de servicios de la Oficina de Farmacia junto con la nutrición, ortopedia, etc. Este servicio se hace desde la propia Farmacia y en las más innovadoras desde internet, bien a través de páginas web o de blogs (3-5). Pero en el campo de la Cosmética además hay que competir con las grandes superficies, grandes almacenes y supermercados en los que también se venden estos productos. Todos los laboratorios cosméticos solicitan a la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (6) la autorización de puesta en el mercado que, si es conveniente, se concede. Además, los laboratorios que lo consideran adecuado, aunque no es obligatorio, solicitan al CGCOF un código nacional (CN) que parece que garantiza la calidad del producto cosmético. Entonces ¿cuál es la diferencia entre un cosmético vendido en uno o en otro lugar? La diferencia radica en la persona que hace el consejo y venta del producto. En este sentido, el Farmacéutico por la formación que recibe a los largo de sus estudios tiene criterios suficientes para hacer un acto profesional con rigor y ciencia y diferenciarse de otros vendedores formados bien por el establecimiento o por la marca comercial en cuestión. Dentro de estos estudios, existe una formación opcional en Dermofarmacia.

El objetivo del presente trabajo es exponer los materiales docentes que se utilizan y los resultados obtenidos en la asignatura de Dermofarmacia y Formulación Magistral del Grado de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Materiales y Métodos: En la Facultad de Farmacia de Sevilla, la Dermofarmacia y Formulación Magistral (DF y FM) es una asignatura optativa que se cursa en el 2º año del Grado de Farmacia. Tiene 6 créditos que se han dividido en 3 para teoría, 1.5 para seminarios y 1.5 para prácticas. En la parte teórica se imparte Dermofarmacia, en los seminarios Formulación Magistral y en las prácticas parte son de FM y parte de DF.

El programa teórico se imparte mediante lección magistral, a excepción del último tema que trata sobre los tratamientos dermocosméticos que se estudiaran a través de casos prácticos.

El programa de Formulación Magistral, impartido en los seminarios, se realiza mediante clases participativas en las que tras la lectura del las leyes correspondientes se les ensaña a elaborar un Protocolo Normalizado de Trabajo.

Por último, las prácticas son de laboratorio y en ellas se elaboran 13 fórmulas desde geles de baño y cremas anticelulíticas hasta jarabe y cápsulas de ranitidina.

Los casos prácticos se imparten al modo de ABP. Los alumnos se reúnen en grupos de 4 a 6 alumnos para realizar el trabajo. Se desarrollan 4 historietas distintas en las que se plasma un supuesto problema cosmético relacionado con un personaje famoso. Estos textos se entregan al grupo de trabajo al comienzo del curso y tendrá que resolverlo en el correspondiente cuatrimestre. Para poder elaborar su trabajo tendrá que visitar cualquier Oficina de Farmacia y elegir un cosmético o cosméticos con el que tratar a su paciente famoso. El siguiente paso será elaborar un *power point* en el que, además de señalar el cosmético y los activos que lleva, deberá indicar los componentes, la función de los mismos, el sistema físico-químico que forman y la acción dermofarmacéutica que tiene el preparado base sin activos.

Al final del periodo de docencia se reservan 4 días para que los alumnos hagan la exposición de sus consejos dermofarmacéuticos. Una vez expuestos todos los trabajos y después del debate que se establece entre los propios alumnos, se hace una votación entre ellos para seleccionar el que más les ha convencido.

Los casos estudiados en el curso 2011-12 han sido: celulitis, envejecimiento cutáneo: arrugas, pigmentación cutánea y protección solar (Fig. 1).

Los casos prácticos se eligen voluntariamente por el grupo de alumnos.

La evaluación global de la asignatura se hace sumando la nota de teoría (75%), la nota de prácticas (10%) y la nota de casos prácticos (15%). Pese a la repercusión de esta actividad sobre la nota final, hay alumnos que optan por no hacerlos.

Figura 1. *Caso práctico sobre celulitis, pigmentación cutánea, envejecimiento cutáneo: arrugas y protección solar.*

Resultados y Discusión: El Espacio Europeo de Educación Superior tiene como objetivo, entre otros, hacer que nuestros estudiantes tengan una formación más práctica, es decir, más profesional. Sin abandonar la lección magistral como instrumento para impartir la docencia sobre Dermofarmacia, creemos que esta formación no es suficiente si el alumno no la completa con un conocimiento real de la actuación sobre un consejo dermofarmacéutico (resolución de casos prácticos). En cuanto a la Formulación Magistral, somos conscientes que para un alumno de 2º curso del Grado le resulta bastante complicado comprender en 15 h una materia tan compleja, máxime cuando aún no ha cursado las Tecnologías Farmacéuticas I y II, Farmacología, Legislación y ni siquiera han definido que es un medicamento. Tras las clases, el alumno tendrá que elaborar un Protocolo Normalizado de Trabajo según el protocolo elaborado por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de la provincia de Alicante (7). En cuanto a las prácticas de laboratorio, el alumno elaborará tanto cosméticos como fórmulas magistrales durante 5 días, 3 h/día. Además, se le enseñará el manejo de aparatos frecuentes en un laboratorio de Formulación Magistral como: Ungüator, magnetoagitador, encapsulador y emblistador de cápsulas. Por último, se mostrarán las aplicaciones que tienen el Dermascope MDS 800 ó dermoanalizador determinando las propiedades de la piel a un alumno o alumna.

Los grupos de trabajo se han establecido con 4 a 6 alumnos, dependiendo de cada uno. De los 4 casos expuestos este año (celulitis, arrugas, protección solar y pigmentación cutánea): 33,33% han elegido el de celulitis, 27.7% el de envejecimiento cutáneo: arrugas, 11.1% el de pigmentación cutánea y 27.7% el de protección solar. Se ve claramente como relacionarlos con un personaje famoso influye en la motivación para la elección de los casos. Los grupos de trabajo han buscado en las Oficinas de Farmacia la información directamente del Farmacéutico, por lo que en muchos casos no han elegido ellos mismos el cosmético. Dependiendo de lo avanzado que tenga la Dermofarmacia en ese establecimiento, la información y el cosmético que reciben se ven claramente influido con respecto a otras Farmacias menos desarrolladas. Otra información con la que trabajan los alumnos es con la página web del laboratorio cosmético del producto elegido. Además, cada grupo tiene al menos 1 tutoría en el despacho del Profesor para ver los avances y la elaboración del *power point*. Por último, todos los trabajos son corregidos por el Profesor antes de la exposición.

Las evaluaciones finales se realizan de la siguiente manera:

- Examen escrito de teoría: 20 preguntas cortas de contestación breve.
- Evaluación continua de las clases prácticas.
- Evaluación de los casos prácticos:
  - Resolución del problema
  - Desarrollo del *power point*
  - Defensa pública del trabajo.

Los resultados finales de la asignatura son:

- 34.25% aprueban la teoría
- 100% aprueban las prácticas
- 100% aprueban los casos prácticos
- 56.57% aprueban la asignatura
- 16.67% no se presentan

Conclusiones:

1. Dado el nivel de conocimientos de los alumnos matriculados en Dermofarmacia y Formulación Magistral es necesario realizar actividades dirigidas por el profesor para que aprueben y mejoren las calificaciones obtenidas.
2. El desarrollo de los casos prácticos les lleva a conocer la realidad de la Dermofarmacia en la Oficina de Farmacia. Además, les permiten a los alumnos integrar los conocimientos teóricos con la práctica profesional y mejorar la nota final.
3. Aunque los conocimientos de los alumnos son escasos en Dermofarmacia y Formulación Magistral, la motivación que tienen les permiten alcanzar mejores resultados.

Referencias:

1.-http://www.rae.es
2.-http://www.portalfarma.es
3.-http://www.a5farmacia.es
4.-http://www.farmaciacomercialesforjadores.es
5.-http://blog.lafarmaciademodesta.com/tag/modesta-cassinello/
6.-http://www.aemps.es
7.-L. Ruiz, JL Vidal. Documentación y normas de correcta elaboración en Formulación Magistral. COF de Alicante. 3º edic., 1999.

PRIMERA VALORACIÓN DEL 41ST ESCP SYMPOSIUM ON CLINICAL PHARMACY. BARCELONA 2012

Eduardo L. Mariño, Pilar Modamio, Cecilia Fernández Lastra.

Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Barcelona.

Introducción: La European Society of Clinical Pharmacy (ESCP) es una sociedad científica y profesional de larga trayectoria, creada en el año 1979 por profesionales clínicos, investigadores y docentes, que incluye a más de 500 miembros de más de 50 países, con el objetivo general de desarrollar y promover el uso racional y apropiado de los medicamentos, productos medicinales y dispositivos, no sólo para el individuo sino también para la sociedad (http://www.escpweb.org/cms/home).

La ESCP viene realizando cada año su Simposio, que ya con antelación tuvo alguna vez lugar en España, pero en la 41 edición fue la primera vez que la organización conjunta estuvo a cargo de un grupo universitario como la Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona

Aunque el Congreso tuvo lugar durante los días 28 a 31 de octubre de 2012, prácticamente dos años antes habíamos comenzado los preparativos para su realización, previa aceptación de la propuesta que nos hizo llegar la ESCP a tales efectos.

Materiales y métodos: Se contó con un amplio respaldo institucional, que permitió constituir el siguiente Comité de Honor:

- Ministra de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad de España.
- Alcalde de Barcelona.
- Conseller de Salut de la Generalitat de Catalunya.
- Rector de la Universitat de Barcelona.
- Decano de la Facultad de Farmacia de Barcelona.
- Presidenta del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España.
- President del Consell de Col.legis de Farmacéutics de Catalunya.
- Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia de España.
- Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia.
- President de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya.

Por otra parte pretendíamos hacer un Congreso integrador, por lo que invitamos a que se incluyeran con nuestra Unidad en el Comité organizador y aceptaron a formar parte "activa" del mismo al Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, Fundación Pharmaceutical Care, Sociedad Española de Farmacia Comunitaria (SEFAC), Sociedad Española de Farmacia de Atención Primaria (SEFAP), Sociedad Española de Farmacia Rural (SEFAR), Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) y la Societat Catalana de Farmàcia Clínica (SCFC).

El programa resultó equilibrado para tratar cuestiones que fueran de interés a la Farmacia Comunitaria, a la Farmacia Hospitalaria, a la Atención Primaria y también para la Universidad en las vertientes profesionales y científicas, con temáticas de absoluta actualidad presentadas por especialistas de España y del resto de Europa principalmente, aunque también del Norte, Centro y Sudamérica junto con países Árabes y Asiáticos.

Se recibió la propuesta para hacer un total de 30 talleres, de los cuales tras su evaluación 28 fueron finalmente los ofertados. Los asistentes pudieron participar en 5 talleres (2 por día (2 horas cada uno)) excepto el último día que sólo hubo una sesión de talleres.

El primer día estuvo dedicado a los temas de Efectividad y Coste-Efectividad, el segundo a Seguridad y el tercer y último día tuvo como lema y objetivo prioritario: los Pacientes.

Se contó con la acreditación del Consell Català de Formació Continuada de les Professions Sanitàries de las sesiones plenarias y de los workshops. Para cada sesión plenaria: 0,2 créditos; para cada workshops: 0,3 créditos con validez estatal. Por primera vez de todas las realizadas en España, este Congreso ha recibido este tipo de acreditación habitual cuando se hace en otros países de Europa.

Por otro lado y además de las sesiones establecidas para discutir las conferencias plenarias, cada día tuvimos para dar más la palabra a los congresistas: 2 horas para comunicaciones orales y 2 horas para discusión de poster y así hacer un congreso claramente participativo.

Todas las comunicaciones presentadas fueron valoradas mediante un proceso "ciego" de revisión por pares, aleatorizado.

Fue un Congreso absolutamente independiente y libre de cualquier conflicto en el campo de la ética y la bioética, y al no estar presente la industria farmacéutica no hubo lugar a ninguna posible incidencia que pudiera contravenir los códigos de Farmaindustria ni de la EFPIA.

Resultados y Discusión: Sin pretender hacer una revisión exhaustiva del Simposio, señalaremos sólo algunas cuestiones como que hubo un total de 700 participantes de más de 30 países de todo el mundo.

Del total de comunicaciones presentadas, casi 500, fueron seleccionadas 409. Además del libro del Congreso (por cierto agotado) las conferencias y comunicaciones (poster incluidos) presentadas, serán publicadas en la revista International Journal of Clinical Pharmacy anteriormente conocida como Pharmacy World & Sciences.

Se hizo notar la presencia de congresistas muy jóvenes. La mayor parte de los participantes han sido extranjeros mientras que españoles eran alrededor de unos 130 y la mayoría del ámbito hospitalario. Teniendo pues en cuenta el número de integrantes en el colectivo, se observó una baja asistencia de participantes de Farmacia Comunitaria.

La presencia de profesorado y alumnos de las Universidades donde se imparte los estudios de Farmacia fue reducidísima, descontado la de Barcelona por nuestra Unidad, como era de prever, y por una Profesora más. La Decana de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU de Moncada y profesorado de esta Universidad estuvieron con nosotros durante los tres días. No encontramos inscritos ni participantes al menos en un número significativamente alto de los órganos de gobierno de los demás Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, excepto del de Barcelona.

Tampoco contamos, salvo honrosas excepciones, con quienes habitualmente a nivel estatal más suelen opinar sobre las temáticas de Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica, a pesar de que en esta ocasión si tuvimos la oportunidad de encontrarnos y debatir con los auténticos líderes sobre estas materias.

Para finalizar sólo agradecer muy sinceramente la colaboración de todos los que nos han ayudado en los casi dos años previos, para que después de 40 ediciones este Congreso CIENTÍFICO Y PROFESIONAL fuera coorganizado, POR PRIMERA VEZ EN ESPAÑA POR UN GRUPO DE LA UNIVERSIDAD como es nuestra Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia de la UB.

41st ESCP Symposium on Clinical Pharmacy. Barcelona 2012.

Posters Sección Tecnología Farmacéutica

BIOSISTEMAS BASADOS EN HIDROGELES PARA EL TRANSPORTE Y LA RETENCIÓN DE CÉLULAS MICROENCAPSULADAS.

A. Acarregui[1,2], F.J. Blanco[3], G. Orive[1,2], J.L. Pedraz[1,2], R.M. Hernandez[1,2]
[1]Grupo NanoBioCeL, Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad del País Vasco, Facultad de Farmacia, Paseo de la Universidad 7. 01006 Vitoria, España
[2]Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Vitoria, España
[3]CIBER-BBN Bioscaff Cartílago, INIBIC-Hospital Universitario, 15006, A Coruña, España

Introducción: La encapsulación de células permite trasplantar cualquier tipo célula y protegerla frente a la respuesta inmunológica del huésped con el fin de recuperar la funcionalidad de tejidos y órganos dañados o simplemente como sistema de liberación de productos terapéuticos, a largo plazo, sin el requerimiento de inmunosupresión farmacológica(1-3). En los últimos años, esta tecnología ha sido objeto de un gran interés por parte de la comunidad científica lo que ha permitido su estudio en numerosas aplicaciones terapéuticas (4). Sin embargo, para llegar a la aplicación clínica quedan todavía una serie de limitaciones por solventar, como controlar y optimizar la administración y extracción de los sistemas bioencapsulados y reducir la inflamación y la reacción fibrótica que se produce. El propósito del presente estudio fue desarrollar un biosistema basado en un hidrogel de alginato que contenía células microencapsuladas y estudiar el comportamiento biológico después de la administración *in vivo*. Se elaboraron y evaluaron dos tipos diferentes de hidrogeles: hidrogeles preformados e hidrogeles formados *in situ*. Estos hidrogeles cargadas con las células microencapsuladas se compararon con las células microencapsuladas libres.

Materiales y Métodos: Los mioblastos C_2C_{12} modificados genéticamente para secretar eritropoyetina (Epo) murina fueron encapsulados en microcápsulas alginato poli-L-lisina alginato (APA) a una densidad de $5x10^6$ células/mL usando un goteador electrostático (5). Para la elaboración de los hidrogeles se añadieron 100 µL de microcápsulas APA a una solución de alginato y esta mezcla se gelificó ionicamente mediante una solución de $CaSO_4$ utilizando para ello un sistema de dos jeringas conectadas.

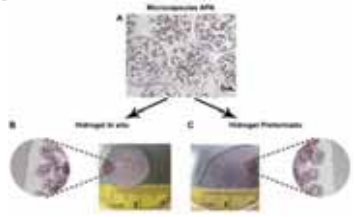


Figura 1. Figura representativa de las microcápsulas APA (A). Hidrogel *in situ* (B). Hidrogel preformado (C).

Para los ensayos *in vitro* las mezclas se dejaron gelificar durante 40 minutos entre dos placas de vidrio separadas por un espaciador de 1 mm (hidrogel preformado) o en un placa de 6 pocillos (hidrogel *in situ*) (Figura 1). La actividad metabólica de las células encapsuladas se determinó mediante un ensayo colorimétrico (CCK-8). La producción de Epo se cuantificó utilizando un kit ELISA.

Para los ensayos *in vivo* se emplearon ratones Balb/c hembras y se dividieron en 3 grupos tratados (n=8 por grupo): (1) hidrogel *in situ* (la gelificación de la mezcla de las cápsulas APA/alginato se produce en el cuerpo del animal tras la administración), (2) hidrogel preformado (con cápsulas APA) y (3) microcápsulas APA y en otros 2 grupos control (n=3 por grupo): (4) control hidrogel *in situ* (la gelificación del hidrogel con las cápsulas APA vacías se produce en el cuerpo del animal tras la administración) y (5) control hidrogel preformado (con cápsulas APA vacías). En los grupos 1, 3 y 4 la administración fue mínimamente invasiva y se hizo subcutáneamente con un catéter. En los animales de los grupos 2 y 5 fue necesario realizar una incisión de 2 cm en la zona dorsal y se introdujo el hidrogel preformado en el espacio subcutáneo suturando posteriormente la incisión. Se realizaron muestreos semanales de sangre durante el primer mes y posteriormente cada quince días de la zona submandibular utilizando capilares heparinizados. Los niveles de hematocrito se determinaron usando un método estándar (microhematocrito). Dos meses después de la implantación, algunos animales fueron sacrificados y las microcápsulas fueron explantadas y fijadas para su posterior análisis histológico (H & E).

Resultados y Discusión: Los ensayos *in vitro* realizados pusieron de manifiesto que tanto la actividad metabólica como la producción de Epo de las células se mantuvieron elevadas y estables durante el ensayo y no se observaron diferencias entre las 3 formulaciones (Figura 2). Estos resultados podrían sugerir que el hidrogel de alginato no condiciona negativamente en la difusión de los nutrientes y O_2 hacia el interior ni de la difusión de la Epo al exterior.

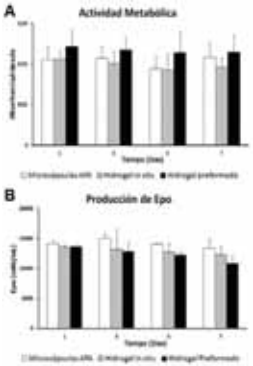


Figura 2. Actividad metabólica (A) y producción de Epo (B).

En cuanto al ensayo *in vivo*, los niveles de hematocrito en los grupos hidrogel *in situ* y microcápsulas APA (grupos 1 y 3) se mantuvieron elevados hasta el último día del ensayo y no se observaron diferencias significativas entre ellos (Figura 3A). Los análisis histológicos de las microcápsulas explantadas mostraron la formación de capilares alrededor de las microcápsulas (Figura 3B, flechas negras). Además, se observó un crecimiento fibrótico alrededor de las microcápsulas en ambos grupos tratados, que era más evidente en el grupo de las microcápsulas APA.

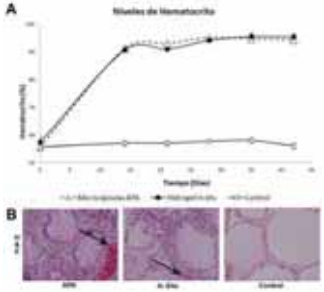


Figura 3. Niveles de hematocrito (A) y análisis histológico (B) de las grupos hidrogel *in situ*, microcápsulas APA y control *in situ*.

El nivel de hematocrito de los grupos hidrogel preformado y microcápsulas APA fue similar durante las primeras 3 semanas. Desde este punto, el nivel de hematocrito del grupo hidrogel preformado sufrió una bajada, pero se mantuvo en niveles superiores al 80% hasta el final del experimento y no mostró diferencias significativas respecto al grupo de microcápsulas APA (Figura 4A). Los resultados de las histologías mostraron una reacción a cuerpo extraño alrededor de las microcápsulas, que fue más pronunciada en el grupo de microcápsulas APA. También se observaron capilares rodeando las microcápsulas en el grupo de microcápsulas APA (Figura 4B, flecha negra).

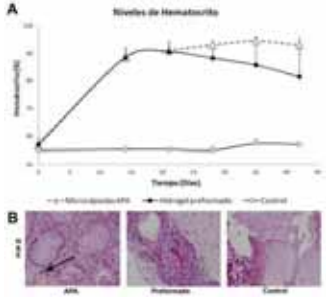


Figura 4. Niveles de hematocrito (A) y análisis histológico (B) de las grupos hidrogel preformado, microcápsulas APA y control preformado.

La formación de vasos puede ser debido a los efectos angiogénicos reportados para la Epo, lo que lleva a un microambiente más adecuado, mejorando así el acceso de oxígeno y nutrientes a las células encapsuladas. La cápsula fibrótica que se observa es más evidente en el grupo las microcápsulas APA. Esto puede ser debido a que el hidrogel que rodea las microcápsulas APA en los grupos preformado e *in situ* evita el contacto directo de la poli-L-lisina con las células de la respuesta inflamatoria, dando lugar a una menor reacción de cuerpo extraño.

Conclusión: Se han elaborado y analizado dos tipos de hidrogeles que contienen microcápsulas APA, para mejorar la administración y la retención y reducir la inflamación post-trasplante de las células microencapsuladas. En el futuro, estos biosistemas pueden permitir la incorporación y la coencapsulación de factores de crecimiento u otros compuestos para eliminar la hipoxia, mejorar el suministro de oxígeno y promover la angiogénesis.

Referencias:

(1) Orive G et al. Nat. Med. 2003; 9, 104-107.
(2) Hernandez R.M et al. Drug. Deliv. Rev. 2010, 62, (7-8), 711-730.
(3) Chang T.M. Science. 1964, 146, 524-525.
(4) Acarregui A et al. Biodrugs 2012; 26 (5): 283-301
(5) Lim F, Sun AM. Science 1980; 210: 908-10

Agradecimientos:
Este proyecto ha sido parcialmente financiado por la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (UFI 11/32). A. Acarregui agradece al Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universides e Investigación) por su beca predoctoral.

INFLUENCIA DEL PH EN LA TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO PCMS-EGFP MEDIADA POR OLIGOQUITOSANOS

M. Agirre, J. Zarate, G. Puras, J.L. Pedraz
NanoBioCel Group, Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, UPV-EHU, Vitoria-Gasteiz.
Centro de Investigación en Red-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).

Introducción: El quitosano es un polímero biodegradable compuesto por subunidades repetidas de D-Glucosamina y N-acetil-D-Glucosamina, con una amina primaria en cada unidad deacetilada y un pKa de 6,5 que lo convierte soluble en medios ácidos. Debido a su inocuidad demostrada en animales y humanos y sus adecuadas características físico-químicas, ha sido propuesto como una alternativa a los vectores virales (1). Entre los factores que afectan a la transfección con quitosanos, el grado de deacetilación (GDA) y el peso molecular (Pm) del quitosano son los más importantes, además del ratio de carga quitosano/DNA (ratio N/P), el tipo de célula, el tamaño y el potencial Z de las nanopartículas y la concentración de sales del medio (2). En comparación con los de alto Pm, los quitosanos de bajo Pm (oligoquitosanos) son de baja viscosidad y mejoran la liberación del ADN unido al vector, necesaria para una mejor transfección. Además, los oligoquitosanos de alto GDA han demostrado ser los mejores para transfectar *in vivo*, evitan el riesgo de acumulación en tejidos y son menos tóxicos (3, 4). Otras de las características de los complejos quitosano/DNA es su alta sensibilidad por el pH del medio. Numerosos estudios han demostrado mejores eficiencias de transfección *in vitro* a pHs entorno a 6,5 en comparación con pHs alrededor de 7,4 (5). Por lo tanto, hemos analizado la influencia del pH del medio en la eficiencia de transfección de células HEK293 y ARPE19, con oligoquitosanos de bajo Pm y alto GDA (NOVAFECT O15: 5,7 kDa eta 99%; NOVAFECT O25: 7,3 kDa eta 99%).

Materiales y Métodos: Para realizar el estudio de la influencia de las variables N/P, pH y concentración de sales en el tamaño y carga de los poliplexos, se ha llevado a cabo un diseño factorial 2^3. Mediante electroforesis en geles de agarosa, se ha analizado a diferentes ratios N/P la capacidad de los poliplexos para condensar, liberar y proteger el plásmido. Posteriormente se ha llevado a cabo el estudio de transfección *in vitro* en células HEK293 y ARPE19 a pH 7,4 para seleccionar las proporciones N/P que más transfectan. Finalmente, con los poliplexos seleccionados se ha estudiado el efecto del pH en la transfección del plásmido pCMS-EGFP en estas dos líneas celulares. El análisis cualitativo de la transfección se ha llevado a cabo mediante microscopia de fluorescencia, mientras que por citometría de flujo se ha medido el porcentaje relativo de células que expresan EGFP. El análisis estadístico de los datos de transfección se ha realizado mediante la comparación de medias aplicando el test T de Student. Valores de $p<0,05$ se han considerado significativos.

Resultados y Discusión: Los 8 experimentos de caracterización de tamaño y carga (respuestas) han mostrado que los efectos de las variables testadas no tienen la misma influencia sobre el tamaño de partícula en los dos tipos de poliplexos diseñados. Mientras que en los poliplexos O15 el pH y el N/P influyen mucho en el tamaño, en el caso del O25 sólo se ha podido apreciar un leve descenso en el tamaño al aumentar la N/P (Figura 1A y 1C). Por otro lado, se ha visto que, independientemente del quitosano utilizado, el parámetro limitante del potencial Z es el pH del medio. Además, cabe destacar que el efecto de cada variable sobre las respuestas obtenidas no depende de las demás variables, salvo en el caso del pH y la N/P en los poliplexos elaborados con O15 (Figura 1B).

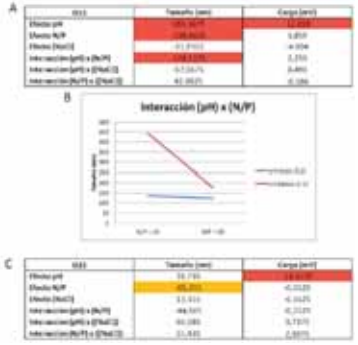


Figura 1- Valores de las respuestas (tamaño y carga) obtenidas analizando cada variable de forma independiente y considerando las posibles interacciones entre variables, en el caso de los poliplexos O15 y O25 (A y C, respectivamente). Gráfica de la interacción entre las variables pH y N/P en los poliplexos O15 (B).

En cuanto a los geles de agarosa, el O25 ha mostrado una mayor capacidad de retención del plásmido, aunque en presencia de SDS y enzima todas las proporciones N/P analizadas (5, 10, 20

y 30) han sido capaces de liberar y proteger el plásmido (Figura 2).

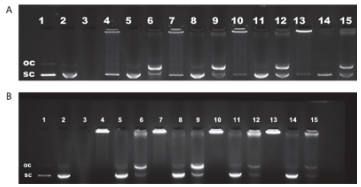


Figura 2- Geles de agarosa para el estudio de la capacidad de retención, liberación y protección de los oligoquitosanos O15 (A) y O25 (B). OC: forma circular abierta, SC: forma superenrrollada. Líneas 1-3: ADN libre; líneas 4-6: N/P = 5; líneas 7-9: N/P = 10; líneas 10-12: N/P = 20; líneas 13-15: N/P = 30. Los poliplexos han sido tratados con SDS 2% (líneas 2, 5, 8, 11 y 14) y DNasa I (1U /2.5µg ADN) (líneas 3, 6, 9, y 15).

Por otra parte, en los resultados obtenidos en los ensayos de transfección a diferentes pHs (7,4 y 6,5), se ha visto que en las dos líneas celulares, independientemente del vector y de la N/P utilizada, a pH 6,5 se obtienen valores de transfección significativamente superiores (Figura 3, barras). Respecto a la viabilidad de las células, se ha observado que las ARPE19 son más sensibles a los efectos tóxicos de los poliplexos, más aún a medida que se aumenta la N/P (Figura 3, líneas).

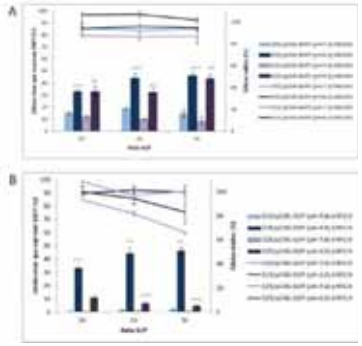


Figura 3: Influencia del ratio N/P el pH en la expresión de EGFP y viabilidad en células HEK293 (A) y ARPE19 (B). Los datos de transfección han sido normalizados respecto a la Lipofectamina ™ (media ± DS; n=3).

Esto demuestra la gran influencia del pH del medio de transfección cuando se transfectan *in vitro* líneas celulares de diferentes características utilizando como vector no-viral el quitosano. A pesar de ello, el descenso del pH del medio no ha sido suficiente para llegar a obtener porcentajes de transfección similares a los obtenidos con los liposomas comerciales (lipofectamina™), utilizados como control positivo en transfección (Figura 4).

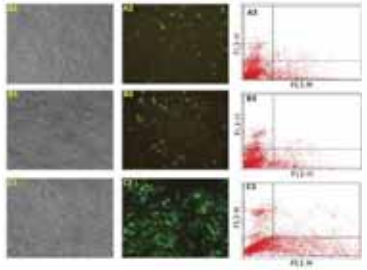


Figura 4: Microfotografías de células HEK293 transfectadas a pH 6,5 (campo claro: columna de la izquierda; fluorescencia: columna del centro) y gráficas (FL1/FL3) de citometría de flujo (columna de la derecha). Imágenes A1, A2 y A3: O15, N/P 30. Imágenes B1, B2 y B3: O25, N/P 30. Imágenes C1, C2 y C3: Lipofectamina™.

Conclusión: El descenso del pH del medio de transfección incrementa significativamente el % relativo de células transfectadas con los dos tipos de quitosanos. Estos resultados sugieren que estos oligoquitosanos podrían ser útiles para transfectar *in vivo* células que se encuentran en un ambiente ligeramente ácido, tales como, células de la retina o células tumorales.

Referencias:

(1) Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(1):12-27.

(2) Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, et al. (2006). Characterization of folate–chitosan–DNA nanoparticles for gene therapy. Biomaterials, 27, 2060–2065.

(3) Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. Biomaterials 2006; 27(27):4815-4824

(4) Klausner EA, Zhang Z, Chapman RL, Multack RF, Volin MV. Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer. Biomaterials 2010; 31(7):1814-1820.

(5)Nimesh S, Thibault MM, Lavertu M, Buschmann MD. Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. Mol Biotechnol Oct;46(2):182-196.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido apoyado económicamente por la UPV/EHU (UFI 11/32). Los autores agradecen el apoyo técnico y humano de los SGIker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, FSE).

DISEÑO DE VECTORES NO VIRALES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE RETINA

PS. Apaolaza[1], A. del Pozo-Rodríguez[1], AR Gascón[1], MA Solinís[1]

[1]Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmaceútica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Vitoria, 01006, España.

INTRODUCCION

La terapia génica a nivel ocular con vectores no virales basados en Nanopartículas Sólidas Lipídicas (SLNs) ha obtenido resultados positivos "in vitro" (1) e "in vivo" (2,3). Con el fin de obtener nuevos vectores más seguros y eficaces, se pueden incorporar ligandos en la superficie, como el Ácido Hialurónico (HA). Este polisacárido es biocompatible, muco-adhesivo, biodegradable y además se encuentra de forma fisiológica en el ojo (3). El objetivo de este trabajo es la evaluación de la capacidad de transfección de vectores basados en SLNs que contienen HA y protamina en células ARPE-19, así como el estudio de su captación y disposición intracelular en la misma línea celular. Para ello se utilizó el plásmido modelo pCMS-EGFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los vectores: Los vectores compuestos por HA-protamina-ADN-SLN se obtuvieron tras adición del complejo HA-protamina-ADN en solución con la suspensión acuosa de SLNs elaboradas por el método de emulsificación y evaporación del solvente descrito por del Pozo-Rodríguez et al (4). Se utilizó HA con tres pesos moleculares diferentes: 150 kDa; 500 kDa y 1630 kDa. La proporción HA:protamina:ADN:SLN fue fijado en 0.5:2:1:5.

Caracterización: El tamaño de partícula y la carga superficial se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica (PCS) y por velocimetría láser doppler, respectivamente (LDV). La capacidad del vector de unir el ADN, protegerlo de la acción de la DNAsa I y la liberación del vector, inducida por SDS, se estudiaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Ensayos en cultivos celulares: La eficacia de transfección "in vitro" en células de retina ARPE-19 se determinó mediante citometría de flujo, cuantificando el porcentaje de células EGFP positivas a diferentes tiempos. La viabilidad celular se determinó empleando el kit Apotox-Glo™. La captación celular de los vectores 2 horas post-administración se observó mediante citometría de flujo, empleando SLNs marcadas con Nile Red.

Mecanismo de entrada y disposición intracelular: El mecanismo de endocitosis empleado en la internalización de los vectores se determinó cualitativamente por microscopía confocal (CLSM). Para ello las células se incubaron durante 2 horas con vectores marcadas con Nile Red (rojo) junto a los marcadores para la endocitosis mediada por caveola/*lipid rafts* (*AlexaFluor488*-Toxina del cólera) y clatrinas (*AlexaFluor488*-Transferrina). La coincidencia de ambos marcadores en un mismo plano es indicativa de colocalización (amarillo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se recoge el tamaño y carga superficial de los vectores preparados con el HA. Como puede observarse, el peso molecular del HA no produjo cambios significativos ni en el tamaño de partícula ni en la carga superficial.

Vector	Tamaño (nm)	Potencial ζ (mV)
HA150kDa	292.10 ± 51.36	+33.00 ± 1.18
HA500kDa	259.13 ± 16.51	+36.77 ± 0.35
HA1630kDa	271.93 ± 17.11	+30.73 ± 1.2

Tabla 1. *Tamaño y Potencial Z de los vectores HA-protamina-ADN-SLN formados con HA de 150kDa; 500 kDa y 1630 kDa. El ratio p/p/p/p se fijo en 0.5:2:1:5.*

Como se puede observar en la figura 1, todos los vectores fueron capaces de unir el ADN, protegerlo de la acción enzimática y liberarlo (figura 1).

Figura 1. *Electroforesis en gel de agarosa. Carriles: 1 = ADN; 2-4=Unión vectores HA150kDa; 500kDa y 1630kDa; 5= ADN+DNAsa; 6-8= Protección vector HA150kDa; 500kDa y 1630kDa; 9-11=Liberación vector HA150kDa; 500kDa y 1630kDa.*

En la figura 2 se recoge la eficacia de transfección de los vectores a lo largo del tiempo. Se puede observar un aumento de la transfección con los tres vectores desde las 24 horas hasta los 7 días, alcanzándose el valor máximo a las 96 horas. (60-70% de células transfectadas). Este aumento puede deberse por un lado a la incorporación de protamina, péptido capaz de condensar el DNA y por ello protegerlo; además posee secuencias de

localización nuclear (NLS) (5) en su estructura capaces de facilitar el acceso del DNA al núcleo. No obstante, la presencia de HA en el vector produjo un aumento en la eficacia de transfección respecto a los resultados obtenidos en estudios previos (1) con vectores elaborados únicamente con protamina-ADN-SLN.

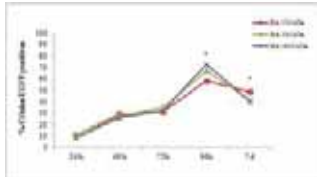


Figura 2. *Eficacia de transfección a lo largo del tiempo en células ARPE-19.Las barras de error representan D.E. (n=3).* p<0.05 con respecto a HA150kDa-Prot-ADN-SLN.*

En la figura 3 se puede observar que la viabilidad celular fue siempre superior al 70%.

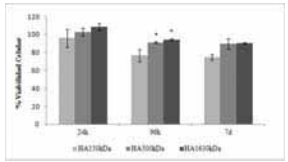


Figura 3. *Viabilidad celular en células ARPE-19. Las barras de error representan D.E. (n=3).* p<0.05 con respecto a HA150kDa-Prot-ADN-SLN.*

La captación celular de los vectores se confirmó cuantitativamente por citometría de flujo. Como se observa en la figura 4, el desplazamiento de los histogramas con respecto al control de células sin tratar, indica que todas las células fueron capaces de captar los vectores.

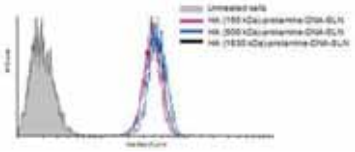


Figura 4. *Análisis por citometría de flujo de la captación celular de vectores HA-Prot-ADN-SLN preparados con SLNs marcadas con Nile Red.*

No se observaron diferencias en la captación entre los vectores elaborados con HA de diferente peso molecular. No se encontraron diferencias entre la captación de estos vectores y el vector preparado con protamina pero sin HA y estudiado en un trabajo previo (2), por lo que el incremento en la transfección de los vectores que tienen HA no está relacionado con la internalización celular.

En la figura 5 se muestran las imágenes obtenidas por CLSM. Se observa que los vectores elaborados con SLNs marcadas con Nile Red colocalizaban con el marcador de la vía endocítica mediada por caveola/*lipid rafts*. Sin embargo, no se observó colocalización con el marcador de la vía endocítica mediada por clatrinas. Estudios anteriores han mostrado que el vector protamina-ADN-SLN emplea la endocitosis mediada por clatrinas (1). Este hecho nos indica que la incorporación de HA al vector fue capaz de modificar su mecanismo de entrada en las células ARPE-19, pasando de la vía clatrina a la vía caveola/*lipid rafts*. Este cambio en el mecanismo de internalización puede ser la causa del aumento observado en los niveles de transfección con las formulaciones que contienen HA, ya que la vía caveolar evita la fusión con los lisosomas y por tanto, la degradación lisosomal.

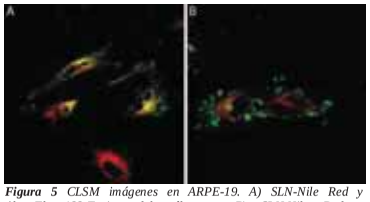


Figura 5 *CLSM imágenes en ARPE-19. A) SLN-Nile Red y AlexaFluor488-Toxina del cólera y B) SLN-Nile Red y AlexaFluor488-Transferrina.*

CONCLUSION

Los vectores no virales compuestos por HA, protamina y SLNs permiten obtener altos niveles de transfección en células ARPE-19. La alta eficacia de transfección obtenida se relaciona con la capacidad de la protamina de proteger e internalizar el ADN en el núcleo, por su contenido en NLS, y a la presencia de HA en la superficie del vector, que dirige el mecanismo de internalización celular hacia la ruta caveola/*lipid rafts*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al Gobierno Vasco (IT-341-10). PS Apaolaza agradece a la Universidad del País Vasco UPV/EHU por su beca.

REFERENCIAS

1. Delgado D, et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011; 495:502-79.
2. Delgado D, et al. Int. J. Pharm. 2012; 35:43-425.
3. Delgado D et al. Hum Gene Ther 2012; 23:345-355
4. de la Fuente M, et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008; 2016:24-49.
5. del Pozo-Rodríguez A, et al. Int. J. Pharm. 2007; 261:268-339.
6. Masuda T, et al. FEBS Lett. 2005; 2143-2148:579.

ESTUDIO PRELIMINAR DE NANOCOMPUESTOS MAGNETITA/POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO AGENTES DE CONTRASTE EN RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN DE CÁNCER DE COLON AVANZADO

J. Prados[1], J.L. Arias[2], A. Alberich-Bayarri[3], E. Sáez-Fernández[2], C. Melguizo[1], R. Ortiz[4], G. Perazzoli[1], M.A. Ruiz[2], A. Aránega[1]
[1]Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Dpto. de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España.
[2]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
[3]Hospital Quirón, Valencia, España
[4]Dpto. de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, España.
e-mail: jlarias@ugr.es

Introducción: La resonancia magnética de imagen (RMI) es una técnica no invasiva que permite obtener imágenes anatómicas de alta resolución. Éste es un método ampliamente empleado para el diagnóstico de patologías de tejidos blandos o cartílagos, ya que permite diferenciar tejidos enfermos (p. ej., cancerosos). Actualmente, uno de los agentes de contraste de RMI más prometedores son las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético. Su utilidad se debe a la capacidad de relajación T_2* que tienen, con una excelente sensibilidad en imágenes T_2 y T_2* en comparación con otros agentes de RMI como los quelatos de iones paramagnéticos (p. ej., Gd^{3+} – DTPA). La relajación T_2 que inducen estas partículas superparamagnéticas se traduce en una atenuación de la señal de imágenes T_2. De esta manera, generan un contraste negativo o negro en RMI al provocar una fuerte susceptibilidad magnética en las moléculas de agua vecinas (1).
Este trabajo se centra en el diseño y caracterización de nanocompuestos constituidos por núcleos superparamagnéticos de magnetita (Fe_3O_4) embebidos en una matriz de poli(ε-caprolactona) (PCL). La selección de este polímero semicristalino se debe a su naturaleza biodegradable y biocompatible, lo que ha hecho que sea ampliamente utilizado en la formulación de micro-(nano-)partículas e implantes (2).
Materiales y Métodos: Los productos químicos eran de calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania). El agua fue desionizada y filtrada (Milli-Q, Millipore, Francia). Los núcleos de Fe_3O_4 se obtuvieron mediante co-precipitación química en solución (1).
La síntesis de las partículas Fe_3O_4/PCL se basa en el método de disposición interfacial del polímero ampliamente utilizado en la síntesis de nanoesferas de PCL (2). Brevemente, la síntesis comenzó con la adición bajo agitación de 10 mL de una solución de polímero en diclorometano (0.3%, p/v) sobre una suspensión acuosa de Fe_3O_4 (0.3%, p/v) con una concentración de pluronic® F-68 del 2% (p/v). La agitación mecánica fue mantenida durante 1 hora, para a continuación realizar la limpieza magnética de los nanocompuestos.
Para optimizar las condiciones de síntesis, se obtuvieron nanocompuestos con diferentes proporciones de Fe_3O_4:PCL (desde 1:4 a 4:1), determinándose el rendimiento de la reacción. La geometría de las partículas fue estudiada mediante HRTEM y PCS.
A continuación, se investigó la citotoxicidad de las partículas Fe_3O_4/PCL utilizando el test colorimétrico MTT (azul de tetrazolio), y un rango de concentraciones de 10 a 200 mM. Para ello, se seleccionó la línea SW480 de células de adenocarcinoma de colon humano.
Finalmente, la caracterización de las partículas Fe_3O_4/PCL como agentes de contraste en RMI se realizó mediante el estudio de los tiempos de relajación T_2. La figura 1 muestra la disposición de los tubos de las diferentes suspensiones acuosas de nanocompuestos en el fantoma. Se adquirieron secuencias multieco con tiempos de eco de 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112 y 128 ms.

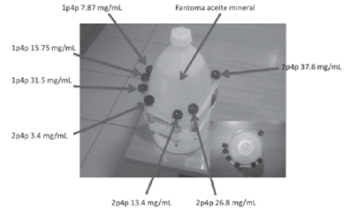


Figura 1. Colocación en el fantoma de las suspensiones de diferente concentración de nanocompuestos Fe_3O_4:PCL 1:4 (1p4p) y 2:4 (2p4p).

Los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba *t* de Student.

Resultados y Discusión: La figura 2 recoge las microfotografías HRTEM de las partículas Fe_3O_4/PCL obtenidas según las variantes del procedimiento de síntesis. Las diferencias más importantes se observaron entre los nanocompuestos de relación 1:4 y 4:1. Si la relación inicial entre las masas es 4:1, el recubrimiento polimérico de los núcleos de Fe_3O_4 era prácticamente inexistente. Como

mucho llegó a apreciarse ocasionalmente en las zonas de contacto entre los núcleos magnéticos (figura 2a). En el caso contrario, cuando la relación es 1:4, las partículas de Fe_3O_4 quedaban totalmente englobadas por una enorme matriz de polímero. Incluso se apreció la formación de una excesiva cantidad de partículas de polímero puro (figura 2b). Por otro lado, el análisis de la influencia de esta relación Fe_3O_4:PCL sobre el rendimiento de la síntesis, permitió comprobar que éste era máximo para una proporción 2:4 (≈ 90%). En estas condiciones de formulación (figura 2c), se obtuvieron nanocompuestos en los que el recubrimiento polimérico de los núcleos de Fe_3O_4 era completo y patente. El análisis PCS de las partículas preparadas según esta proporción 2:4 permitió confirmar su pequeño tamaño (86 ± 12 nm), muy adecuado para la vía de administración parenteral.

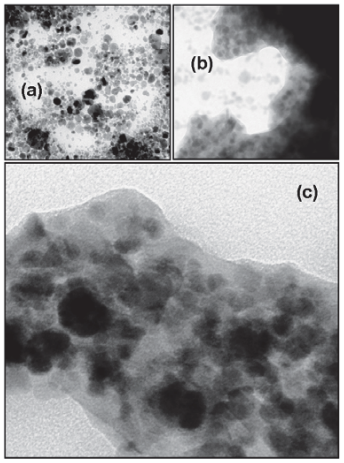


Figura 2. Microfotografías HRTEM de las nanopartículas Fe_3O_4/PCL obtenidas partiendo de una relación de masas inicial Fe_3O_4:PCL de 4:1 (a), 1:4 (b) y 2:4 (c).

El ensayo MTT puso de manifiesto que ninguna de las nanopartículas Fe_3O_4/PCL desarrolladas ejercía citotoxicidad alguna en las células SW480 en el rango de concentraciones investigado. De hecho, no se apreciaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia del control negativo y los de los diferentes nanocompuestos tras 72 horas de incubación ($p > 0.05$).

En relación a la utilidad de las nanopartículas Fe_3O_4/PCL como agentes de contraste de RMI, la figura 3 muestra cómo éstas reducen de forma progresiva (y dependiente de la concentración) el valor medio del T_2 del aceite mineral contenido en el fantoma (92 ms). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y los valores típicos para el T_2 en diferentes regiones anatómicas como el colon (3), el hígado (4) y el cerebro (5), la suspensión de nanocompuestos 2:4 de concentración 13.4 mg/mL (T_2: 98 ms) sería adecuada para utilizarse como contraste en estas regiones. De igual forma, la suspensión de nanocompuestos 1:4 de concentración 31.5 mg/mL también sería adecuada aunque presente un T_2 un poco más largo.

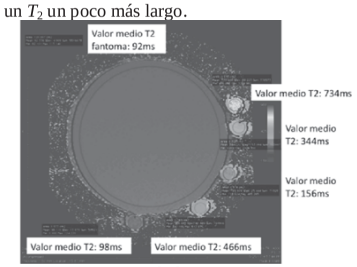


Figura 3. Mapa T_2 de las suspensiones acuosas de diferente concentración de nanocompuestos formulados según las proporciones Fe_3O_4:PCL 1:4 (1p4p) y 2:4 (2p4p).

Conclusiones: La metodología de síntesis desarrollada permite obtener nanopartículas Fe_3O_4/PCL con unas propiedades adecuadas como agente de contraste en RMI: pequeño tamaño, ausencia de toxicidad y disminución del T_2. Se encuentran en desarrollo ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan clarificar este uso en el diagnóstico precoz de cáncer de colon.

Referencias:

(1) Reddy LH et al. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. Chem. Rev. 2012;doi: 10.1021/cr300068p.
(2) Sinha VR et al. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. Int. J. Pharm. 2004;278:1-23.
(3) Beall PT et al. NMR relaxation times of water protons in human colon cancer cell lines and clones. Cancer Biochem. Biophys. 1982;6:7-12.
(4) Bernardino ME et al. Multiple NMR T2 relaxation values in human liver tissue. AJR Am. J. Roentgenol. 1983;141:1203-8.
(5) Siemonsen S et al. Age-dependent normal values of T2* and T2´ in brain parenchyma. AJNR Am. J. Neuroradiol. 2008;29:950-5.

Agradecimiento: Proyectos FIS 11/02571 y FIS 11/01862 (Instituto de Salud Carlos III, España).

DIFUSION DE LEVODOPA EN DISOLUCIONES ACUOSAS CON DIFERENTES VALORES DE pH

Marisa C. F. Barros[1], Miguel A. Esteso[1], Víctor M.M. Lobo[2] y Ana C.F. Ribeiro[2]

[1]Departamento de Química Física, Universidad de Alcalá, 28871. Alcalá de Henares, Madrid, España
[2]Department of Chemistry, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

Introdución:
La levodopa (L-3,4-dihihroxifenilalanina) es un aminoacido que en el organismo se transforma en dopamina y cuya deficiencia provoca la enfermedad de Parkinson. Esta propriedad transforma la levodopa en el farmaco más utilizado en el tratamiento de esta enfermedad[1]. La levodopa se administra por vía oral y se absorbe rápidamente.

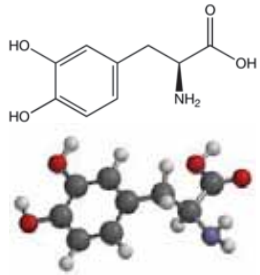


Figura 1 – Fórmula y estrutura de la levodopa

La absorción de un fármaco en el organismo humano implica su tránsito a través de una membrana celular. Para que este tránsito se produzca, el fármaco debe penetrar en el interior de la membrana, para lo cual éste tiene que ser soluble en la fase lipídica de la misma y para que tenga lugar su salida es necessario que el fármaco sea también soluble en la fase fisiológica acuosa de las inmediaciones de la membrana. Sin embargo, la extensión de la absorción y de su respuesta clínica depende de múltiples factores, incluyendo el pH del estómago e intestino.

La levodopa presenta distintos valores de pKa, lo que significa que su comportamiento estrutural va a depender del pH del medio en el que ésta se encuentra.

Como la absorcion de la levodopa ocurre fundamentalmente en el tracto gastrointestinal, por medio de un proceso de difusión pasiva, ello hace que la magnitud de tal absorción se vea afectada por los valores del pH local[2].

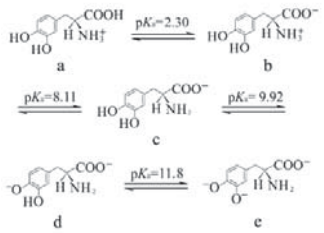


Figura 2- Disociacion de la molecula de levodopa[3]

En esta comunicación presentamos los coeficientes de difusion mutua de la levodopa a pH=1,8 y pH=3, en disolució acuosa, a temperaturas ambiente y fisiologica. Dichos valores de pH se ajustaron con ácido clorhídrico. Variando el pH se ha buscado obtener información acerca de la cuantía y tipo de las especies protonadas presentes en la disolución, así como de su difusión, en un intento de comprender mejor el comportamiento de este fármaco en el proceso de absorcion mediante difusión pasiva.

Referencias

1. Carlsson A., J Neural Transm 2002, 109, 777.
2. P. A. Shore, B.B. Brodie, and C.A.M Hogben, *J. Pcol. Exp. Therap.*, 957, 119, 361
3. Xiaofeng Chen et all, J. Sep. Sci. 2004, 27, 1005

Agradecimientos:
Marisa.C.F.Barros agradece a la "*Fundação para a Ciência e Tecnologia*" la beca recibida SFRH/BD/72305/2010.

MICROESFERAS BIODEGRADABLES CARGADAS CON KETOROLACO PARA ADMINISTRACIÓN INTRAOCULAR

E. Rodríguez Villagra, A. Juan Puñales, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las patologías que afectan al segmento posterior del ojo se encuentran la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y las retinopatías diabéticas. Ambas cursan con inflamación. Sin embargo, dados los importantes efectos adversos que presentan (aumento de presión intraocular y formación de cataratas, entre otros), se está estudiando la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (1). De entre estos, el ketorolaco resulta de gran interés (2) como alternativa a los corticoesteroides en el tratamiento post-operatorio de la inflamación ocular, prevención o alivio del edema macular cistoide, del edema macular diabético, de la uveítis y de la degeneración macular asociada a la edad (3). La administración intravítrea de sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada que fueran capaces de mantener concentraciones terapéuticas de ketorolaco en el vítreo durante periodos prolongados de tiempo supondría una importante herramienta terapéutica para el tratamiento de inflamación intraocular. La utilización de estos sistemas disminuiría de forma importante el número de administraciones. El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la relación fármaco:polímero en la preparación de microesferas (MPs) de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLAGA) cargadas con ketorolaco, por el método de emulsión-evaporación del disolvente (O/A), como paso inicial en la optimización de la formulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de microesferas

Para la preparación de las microesferas se preparó como fase interna de la emulsión una dispersión de ketorolaco en una solución de PLAGA 85:15 en CH_2Cl_2: ACN (3:1) (volumen=1,4 ml). Las proporciones fármaco: polímeros estudiados fueron 0,5:10, 1:10 y 1,5:10. Una vez homogenizada la dispersión se formó una emulsión mediante la adición de 5 ml de una disolución de acuosa de PVA (1% m/v) y agitación a 9500 rpm durante 2 min. A continuación, se añadieron 10 ml de una disolución acuosa diluida de PVA (0,1% m/v) y se homogenizó mediante agitación mecánica (9500 rpm, 1 min). Tras 3h de maduración en 100 ml de PVA 0.1% p/v, las MPs fueron recogidas, lavadas y se seleccionó la fracción 20-40 µm para su posterior estudio. Las microesferas fueron liofilizadas y se conservaron refrigeradas a 4ºC protegidas de la humedad en un desecador a vacío.

Caracterización de microesferas:

La *morfología* de las microesferas se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokio, Japón).

Se determinó la *distribución del tramaño* de las partículas utilizando un equipo Microtrac S-3500 (Microtrac, Pensilvania, EEUU) que mide la dispersión de la luz laser al incidir sobre las microesferas.

El *Contenido y eficacia de encapsulación* se determinó mediante disolución inicial de las microesferas en diclorometano y posterior precipitación del polímero con etanol. La cantidad de ketorolaco en la mezcla diclorometano + etanol (5+12 ml) se determinó por un método espectrofotométrico (λ=314 nm) previamente validado.

Los *estudios de liberación in vitro* se realizaron con dos replicados de una muestra de MPs (10 mg) que fueron suspendidos en 1.5 ml de PBS pH 7.4. El ensayo se realizó a 37 ºC en agitación constante (100 oscilaciones/min) (4). La toma de muestras se realizó a intervalos de tiempo pre-establecidos (1h, 24h y una vez por semana hasta el final del estudio), mediante extracción del volumen de medio de cesión y posterior reposición del mismo con tampón recién preparado. La cuantificación del principio activo se llevó a cabo por espectrofotometría.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha calculado el valor de rendimiento del proceso de elaboración de MPs para cada una de las proporciones fármaco: polímero empleadas, obteniendo los resultados recogidos en la Figura 1.

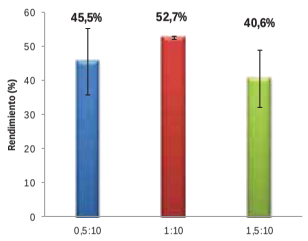


Figura 1: Rendimientos medios del proceso de elaboración de MPs obtenido para cada una de las formulaciones ensayadas.

La eficacia de encapsulación obtenida en las formulaciones ensayadas se encontró comprendida entre 55 y 60% para todas las proporciones fármaco: polímero. Sin embargo en la observación realizada en el microscopio electrónico, se observaron cristales de ketorolaco fuera de las microesferas en la formulación elaborada con una proporción fármaco:polímero 1,5:10 (Figura 2). En todos los casos las microesferas resultaron esféricas y con una superficie lisa. Junto a las microfotografías se muestran las gráficas obtenidas en el análisis granulométrico de cada formulación, Los tamaños medios (Mv) obtenidos fueron de 22,05 ± 1,36 µm en la formulación 0,5:10, 49,28 ± 0,28 µm en la formulación 1:10 y 26,99 ± 13,46 µm en la formulación 1,5:10.

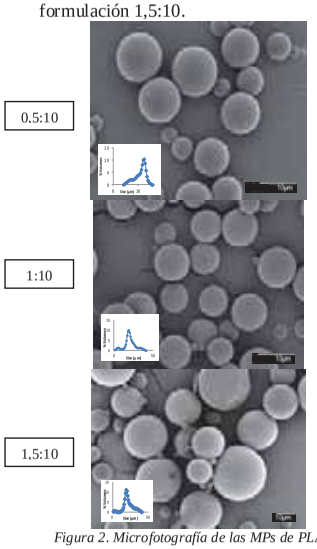


Figura 2. Microfotografía de las MPs de PLAGA 85:15 cargadas con Ketorolaco y distribución granulométrica.

En la Figura 3 se recoge la representación gráfica de los perfiles de cesión para las tres formulaciones ensayadas junto al diagrama de barras de la cesión inicial (*burst*) a las 24 horas del ensayo. Como se puede observar, a medida que disminuye la relación fármaco : polímero, disminuye la cesión inicial de ketorolaco. Para todas las formulaciones se observa una cesión controlada de ketorolaco durante aproximadamente 2 meses.

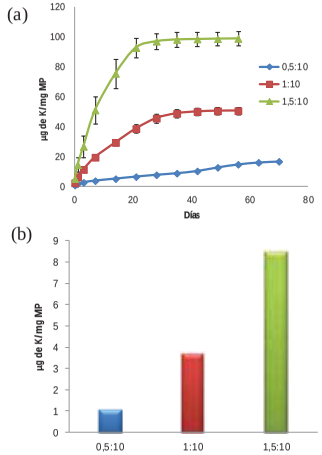


Figura 3. (a) Representación gráfica de los perfiles de cesión (±DE) obtenidos para las tres formulaciones ensayadas. (b) Representación gráfica de la cesión inicial (Burst) a las 24 h de ensayo.

CONCLUSIONES

El método desarrollado permite obtener formulaciones con eficacias de encapsulación de entre 55-60% con un tamaño medio de partícula idóneo para la administración intraocular y una cesión mantenida de ketorolaco durante dos meses.

AGRADECIMIENTOS

RETICS net (RD 07/0062/2002). UCM 920415. Ministerio de Educación (MAT-2010-18242).

REFERENCIAS

(1) Thadani SM, Foster CS. *Treatment of ocular inflammation in children.* Pediatr Drugs 2004; 6: 289-301. (2) Allan J. Flach, MD; Manus C. *The Quantitative Effect of 0.5% Ketorolac Tromethamine Solution and 0.1% Dexamethasone Sodium Phosphate Solution on Postsurgical Blood-Aqueous Barrier.* Arch Ophthalmol, 1980; 106(4):480-483. (3) Margalit E, Kugler LJ. *The safety of intraocular ketorolac in rabbits.* Invest Ophtamol Vis Sci 2006; 47: 2093-2099. (4) Herrero R. , Refojo M. *"Biodegradable Microspheres of Vitreoretinal Drug Delivery"*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001, 52: 5-16.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FÓRMULAS LÍQUIDAS ORALES DE METADONA.

M. Mallandrich[1], N. Provenza[1], B. Clares[2], L. Halbaut[1], F. Fernández[1], A. Flo[1], A.C. Calpena[1]

[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Barcelona. Barcelona, España
[2]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada. Granada, España.

Introducción:

En España, las formulaciones líquidas orales de Metadona están únicamente comercializadas para adultos. Los neonatos expuestos durante la gestación a ciertas sustancias, pueden desarrollar una dependencia física (1,2). La Metadona es el fármaco más prescrito para tratar este síndrome. No obstante, considerar al niño como si fuera una adulto pequeño puede llevar a grandes errores de dosificación de fármacos.

La falta de disponibilidad en el mercado farmacéutico de productos adaptados a las necesidades de la población pediátrica, y en especial, a las del neonato, conduce a la elaboración de fórmulas magistrales y éstas presentan una gran variabilidad en el diseño.

En nuestro entorno, son pocos los estudios que han valorado la utilización de fórmulas magistrales para el uso en pediatría. Es decir, que el mayor inconveniente para difundir estos fármacos es la falta de investigación no sólo a nivel clínico sino a nivel tecnológico.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad de 2 soluciones orales de Metadona 0.2 mg/ml, una de ellas apta para diabéticos en 3 condiciones de almacenamiento (4, 25 y 40ºC) durante 30 días.

Materiales y Métodos:

Materiales

La Metadona fue adquirida a través de la Agencia Española del Medicamento de acuerdo con la normativa vigente.

El resto de excipientes fueron proporcionados por Acofarma S.A.

La composición de las soluciones orales de Metadona estudiadas se muestra en la tabla 1.

	Solution 1	Solution 2
Metadona hidrocloruro	0.2 mg/mL	0.2 mg/mL
Agua	50 %	50 %
Excipiente 1	50 %	-
Excipiente 2 *	-	50 %

Tabla 1. Composición de las fórmulas líquidas orales de Metadona. * Excipiente 2: apto para diabéticos.

Método analítico

El método analítico fue validado a partir de 6 rectas de calibración, preparadas en días diferentes (validación interdía). Como criterios fundamentales de validación se utilizaron la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y de cuantificación (3).

La cuantificación de principio activo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): cromatógrafo Waters 600C acoplado Autosampler Waters 717 plus. Detector Photodiode Waters 2996 ajustado a 220nm, columna Mediterranea Sea18, 5µmm 25 x 0.46 mm, flujo de 1ml/min, la fase móvil estaba compuesta por una mezcla de Acetato de amonio 0.025M: Acetonitrilo (20:80).

Estudio de estabilidad

Alícuotas de 20 ml de cada una de las formulaciones fueron almacenadas en frascos de vidrio topacio a las diferentes condiciones de temperatura, 4, 25 y 40ºC. El periodo de estudio comprendió 1 mes. Los ensayos fueron realizados a 0, 7, 15 y 30 días. Se monitorizaron los siguientes parámetros:

- Características organolépticas: aspecto, color y olor.
- Cuantificación de principio activo: de ambas fórmulas.
- pH: se realizó un seguimiento de pH mediante el pHmetro Crison micropH 200.
- Determinación de la viscosidad: mediante Haake Rheometer Rheo Stress 1, usando una geometría plato-plato.

Análisis estadístico:

El número de determinaciones efectuadas por fórmula, tiempo y temperatura fueron 6. Se calcularon los valores medios y la desviación estándar. Con objeto de comprobar si existen diferencias significativas entre las medias comparadas, todos los resultados se sometieron a un tratamiento estadístico ANOVA para un nivel de confianza del 95 %.

Resultados y Discusión:

Método analítico:

Validación:

El método analítico desarrollado resultó ser lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de Metadona de 1.76-20 µg/ml. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.46 y 1.38 µg/ml respectivamente.

Estudio de Estabilidad:

Características Organolépticas:

Al inicio del estudio, todas las soluciones resultaron transparentes, de color rosado y olor a fresa. Estas características se mantuvieron hasta el día 30.

Cuantificación del principio activo:

En las gráficas 1 y 2 se muestran la evolución de la concentración de Metadona determinada para cada una de las fórmulas ensayadas en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento.

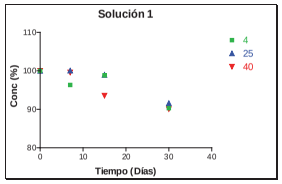


Figura 1. Concentración de Metadona en la Solución 1 expresado en porcentaje respecto a la concentración inicial de día 0.

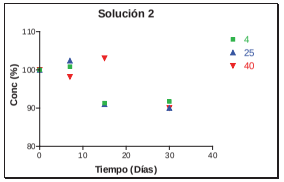


Figura 2. Concentración de Metadona en la Solución 2 expresado en porcentaje respecto a la concentración inicial de día 0.

En ambas soluciones la concentración de Metadona se mantuvo dentro del intervalo ±10% durante 30 días en todas las condiciones de almacenamiento.

Estudio de pH:

El pH de ambas soluciones no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo en ninguna de las condiciones de temperatura de conservación.

Estudio reológico:

En la figura 3 se muestran las curvas de flujo y curvas de viscosidad para cada una de las formulaciones estudiadas. La gráfica muestra un comportamiento Newtoniano para la Solución 1; frente a un comportamiento pseudoplástico para la solución 2. Desde el punto de vista tecnológico este último sería más adecuado para la administración de un jarabe pediátrico. Se ha comprobado como un aumento de la viscosidad tras la adición de modificadores reológicos como gomas o carbohidratos puede reducir la difusión de sustancias amargas de la saiva a las papilas gustativas (4).

Los valores de viscosidad hallados para la Solución 1 fueron de 7.99±0.11 a día 0 y de 7.84±0.05 a día 30. La Solución 2, a día 0 el valor de viscosidad fue de 15.12±0.02 y de 14.94±0.05 a día 30.

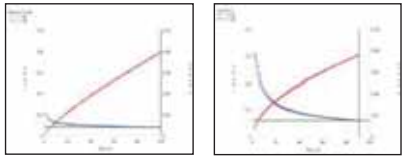


Figura 3. Gráficas de viscosidad. Izquierda, Solución 1. Derecha, Solución 2.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos indican que las soluciones de Metadona objeto de estudio fueron estables durante 30 días sin cambios significativos por causa de la temperatura. Así mismo mostraron valores constantes y adecuados de pH y viscosidad en función del tiempo.

Referencias:

(1)http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/neonatologia/abstinencianeonatal.htm

(2) University of the Sciences in Philadelphia. Philadelphia College of Pharmacy. *Neonatal Pharmacotherapy. Neonatal Abstinence Syndrome.* Philadelphia College of Pharmacy Reports, 2003; 3(3): 3-35

(3) Aguirre, O. L., Pérez, C. J. A., & Pujol, F. M. *Validación de métodos analíticos. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*. 2001.

(4) Rathbore, M.J., Helgraft, J. *Drugs and pharmaceutical Sciences in drug delivery technology.* Marcel Dekker, New York, 2003; 126: 191-202.

Agradecimientos:

- Acofarma S.A.

RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SEVERAL SEMISOLID FORMULATIONS CONTAINING DIFFERENT ENHANCERS FOR BUCCAL TOPICAL ADMINISTRATION OF DRUGS

R. Sanz[1], A. Flo[1], N. Provenza[1], M. Ronzadilla[1], L. Halbaut[1], M. Mallandrich[1], B. Clares[2], AC Calpena[1].
[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
[2] Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain.

Introduction:

Oral mucosal drug delivery is an alternative method of systemic drug delivery that offers several advantages over both injectable and enteral methods. As the oral mucosa is highly vascularised, drugs absorbed through the oral mucosa directly enter the systemic circulation, bypassing the gastrointestinal tract and first-pass metabolism in the liver (1).
Oral mucosa is, in general, a somewhat leaky epithelia between that of the epidermis and that of the intestinal mucosa. It is estimated that the permeability of the buccal mucosa is 4-4000 times greater than that of the skin (2).
However, one of the major disadvantages associated with buccal drug delivery is the low flux which results in low drug bioavailability.

Orabase® has been chosen as the base for the tested formulations due to its safety profile and the fact that it is well reported in the literature as a common vehicle for buccal formulations.
Various compounds have been investigated for their use as buccal penetration enhancers in order to increase the flux of drugs through the mucosa. Since the buccal epithelium is similar in structure to other stratified epithelia of the body, enhancers used to improve drug permeation in other absorptive mucosa have been shown to also work in improving buccal drug penetration (3).
Permeation enhancers should be safe and non-toxic, pharmacologically and chemically inert, non-irritant, and non-allergenic (4). After a literature search, myristylic alcohol, menthol, N-methylpyrrolidone and trascutol were selected as candidates to help permeate drugs.

Different physical properties in semisolid formulations may affect drug release and transmucosa permeation. Also, they are likely to result in a different feel when administered (5).
As well as viscosity plays an important role for transmucosa formulations, viscoelasticity is reported to be a way to assess the physical properties of semisolids (5).

Therefore, the aim of this study is to assess, from a rheological point of view, the influence of different enhancers in a semisolid formulation which could be used as a vehicle for topical buccal application of drugs.

Material and Methods:

The different semisolid formulations were prepared using Orabase® as the main component. One of the formulations did only contain Orabase® and was, therefore, used as reference (O).
For the other formulations, 5% of either menthol (M) or myristyl alcohol (A) or N-methylpyrrolidone (N) was added to the Orabase®. Besides, another set of samples were prepared by adding 10% transcutol (T) to the previous formulations.

The rheological analysis was performed with the HAAKE rheometer Rheo Stress 1, using a plate-plate geometry (6 cm in diameter and 0.2 mm gap between plates for the rotational test).
Rotational viscosimetry measurements at 25 ºC were carried out at three different shear rates (25, 50 and 100 s^{-1}) and recorded during 60 s after the corresponding three ramp-up periods of 60 s (from 0 to 25 s^{-1}, 25 to 50 s^{-1} and 50 to 100 s^{-1}).
Oscillatory tests firstly included a stress amplitude sweep test which was performed from 0.01 to 10 Pa at a constant frequency of 1 Hz to determine the linear viscoelastic range. Three different gaps between plates were tested (0.2, 0.5 and 1 mm).
After this, a frequency sweep test was performed from 0.1 to 10 Hz at a constant shear stress within the linear viscoelastic region in order to determine the related variation of the storage modulus (G') and loss modulus (G'') at 25 ºC. Both viscoelastic moduli are defined as follows:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0}\cos\delta \quad \text{and} \quad G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0}\sin\delta$$

(where τ_0 and γ_0 are the amplitude of stress and of strain, respectively, and δ is the phase shift between them).

Rotational viscosity measurements and oscillatory tests were performed by triplicate.

Results and Discussion:

Rotational viscosimetry tests showed that the different formulations have a pseudoplastic behaviour, as in all cases the viscosity decreased with the increase of share stress rate (Table 1). Moreover, the addition of an enhancer to Orabase® significantly decreased the viscosity of the adhesive excipient. Even more effect on the viscosity level was observed by the addition of transcutol alone or in combination with another enhancer.

Sample	VISCOSITY at 25 ºC (Pa.s)		
	25 s^{-1}	50 s^{-1}	100 s^{-1}
O	8.27 ± 0.084	6.93 ± 0.10	3.96 ± 0.31
OT	2.78 ± 0.043	1.50 ± 0.13	0.84 ± 0.089
OM	6.36 ± 1.18	4.16 ± 0.19	2.91 ± 0.26
OMT	1.80 ± 0.13	0.97 ± 0.050	0.90 ± 0.082
OA	4.83 ± 0.20	4.05 ± 0.70	2.59 ± 0.32
OAT	1.63 ± 0.005	0.93 ± 0.012	0.78 ± 0.012
ONT	3.09 ± 0.054	1.48 ± 0.060	0.82 ± 0.013

Table 1. Results of rotational viscosimetry (O: Orabase® cream; OT: 10% Transcutol in Orabase®; OM: 5% Menthol in Orabase®; OMT: 5% Menthol + 10% Transcutol in Orabase®; OA: 5% Myristyl alcohol in Orabase®; OAT: 5% Myristyl alcohol + 10% Transcutol in Orabase®; ONT: 5% N-Methylpyrrolidone + 10% Transcutol in Orabase®)

According to the results of the oscillatory stress sweeps, a plate gap of 0.5 mm and a constant shear stress of 1 Pa (16.7% of the critical value of 6 Pa) were selected to perform the frequency sweep test.

Results of the oscillatory test for two of the studied formulations are shown in Figures 1 and 2 as examples.

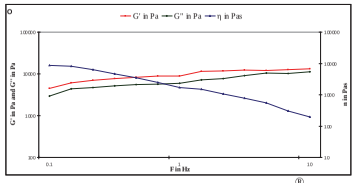


Fig. 1. Dynamic oscillatory test (plain Orabase®)

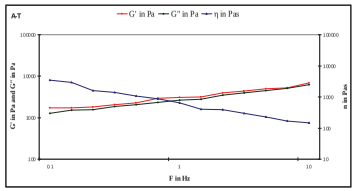


Fig. 2. Dynamic oscillatory test (myristyl alcohol + transcutol in Orabase®)

In the whole frequency range studied, the storage modulus G' was always greater than the loss modulus G''. That indicates prevalence of the elastic over the viscous behaviour.

Significant differences were detected between the different formulations:
Viscosity levels decreased for all formulations containing at least one permeation enhancer.

Neither transcutol alone or combined with N-methylpyrrolidone did significatively change the viscoelastic behaviour of the formulation when compared to the reference one (plain Orabase®). However, both myristyl alcohol and menthol did show a decrease on both the elastic and viscous behaviour of the formulations. Such decrease being more pronounced when combined with transcutol. Finally, there were no relevant differences on the viscoelastic behaviour observed between the formulations containing menthol and myristyl alcohol.

Conclusions:

The addition of permeation enhancers to an adhesive excipient for buccal topical administration as Orabase® does modify its physical properties.

Viscosity of the tested formulations drops whenever at least one permeation enhancer is used.

As regards their viscoelastic behaviour, transcutol alone and combined with N-methylpyrrolidone failed to modify the viscosity component of the formulations suggesting same adhesiveness as Orabase® on its own. All other semisolid formulations tested did present a different viscoelastic behaviour which could imply different drug permeation and treatment compliance by the patient.

References:

(1) H. Zhang et al. Oral Mucosal Drug Delivery: Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Applications. Clinical Pharmacokinetics. 2002; 41(9):661-680.
(2) W.R. Galey et al. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. J. Invest. Dermat.1976; 67:713-717.
(3) B.J. Aungst et al. Comparison of the effects of various transmucosal absorption promoters on buccal insulin delivery. International Journal of Pharmaceutics. 1989; 53:227-235.
(4) Y. Sudhakar et al. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. Journal of Controlled Release. 2006; 114:15-40.
(5) Y. Inoue et al. A comparison of the physicochemical properties and a sensory test of Acyclovir creams. International Journal of Pharmaceutics. 2012; 436:265-271.

Acknowledgements:

- Álvaro Gimeno, Animal Facility Bellvitge. Universtity of Barcelona. Spain.

Diseño de emulsiones mucoadhesivas A/S conteniendo ciprofloxacino para su empleo en el tratamiento de la enfermedad pélvica inflamatoria

Campaña Seoane M. J., Pérez Gago A., Otero Espinar F.J.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela

INTRODUCCION

La enfermedad pélvica inflamatoria es una patología de transmisión sexual que consiste en la infección de la zona alta del aparato reproductor femenino (útero, trompas de Falopio, ovarios y tejidos circundantes) causada principalmente por clamidia, cándida o gonococo y en menor medida por estafilococos y estreptococos. Es frecuente que aparezca como una complicación grave de enfermedades de transmisión sexual y su tratamiento consiste en la administración combinada de antibióticos por vía oral o parenteral, quirúrgico en aquellos casos más graves. Uno de los problemas en su tratamiento es la dificultad para identificar a los microorganismos que infectan los órganos genitales internos y que para alcanzar concentraciones eficaces en estos lugares a veces es necesario mantener altas concentraciones plasmáticas durante tiempos prolongados. La vía vaginal presenta un interesante potencial como ruta de administración de fármacos a nivel sistémico debido a la gran superficie disponible para la absorción, alta permeabilidad y abundante vascularización (1). Además es especialmente interesantes para la fármacos que actúen a nivel de los órganos genitales internos ya que se ha descrito un efecto de primer paso preferente hacia el útero, dando lugar a una elevada concentración a estos niveles (2). En un trabajo previo (3) hemos puesto de manifiesto el interés de las emulsiones A/S bioadhesivas como sistemas de administración vaginal, estas emulsiones presentan gran extensibilidad, buena adherencia y permanencia y baja toxicidad en las mucosas (4).

Nuestro objetivo es la elaboración de emulsiones A/S bioadhesivos conteniendo ciprofloxacino, insensibles al aclaraminento del flujo vaginal. Las emulsiones seleccionadas se emplearán en un futuro trabajo para evaluación como posible tratamiento de la enfermedad pélvica inflamatoria.

MATERIALES Y METODOS

Elaboración de emulsiones

Las emulsiones se elaboraron mediante emulsificación directa empleando un homogeneizador Unguator 2 (Microcaya) (3). La composición de las emulsiones elaboradas figura en la tabla 1.

	pentámera	tetramera
Ciclometicona	15	15
ClNa	2	2
Abil WE 09	5	5
Glicerol	3	3
ciprofloxacino	2	2
Agua	67	67

Tabla 1. Composición de las emulsiones A/O elaboradas en este trabajo.

Jeringabilidad (estudios de extrusión)

Se determina el trabajo necesario para la descarga de las muestras a través de una jeringa de 1 ml. La jeringa cargada se sitúa en el texturómetro TA.XT.plus desplazando el émbolo 2 cm a 2 mm/seg, registrando la fuerza vs distancia

Efecto del fluido vaginal sobre la bioadhesion

Se determina la fuerza máxima y el trabajo de adhesión requerido para separar dos discos de cuero curtido entre los que se encuentra la muestra, empleando un texturómetro TA-XT (5). Se fija un disco de cuero en el punzón superior y otro sobre una placa que se fija al soporte inferior. Se depositan 0.2 ml de muestra en el disco inferior y se adiciona fluido vaginal simulado (FVS) a 37ºC. Se hace descender el punzón superior a 1 mm/seg hasta el disco entra en contacto con la muestra y ejerce una fuerza de 0.5 N. El punzón se mantiene 60 seg. y se hace retornar a una velocidad de 1 mm/seg hasta una altura de 2 cm. Pasado 1 min se reinicia el ciclo compresión-extensión en las mismas condiciones y se repite 10 veces.

El efecto de arrastre de la crema por efecto del fluido se estudia empleando viales de fondo plano en los que se deposita 1 g de emulsión que se cubre con 5 ml de FVS. A intervalos de tiempo predeterminados se retiran todo el FVS, se pesa para determinar la crema arrastrada y se repone FVS de nuevo. Se calcula además la concentración de CFX en las muestra de FVS retiradas para estudiar su liberación. El ensayo se realiza a 37º y con agitación orbital (100 rpm).

Liberación de ciprofloxacino

Para completar la liberación se realizó un estudio empleando células de Franz verticales, usando membrana de diálisis entre los compartimentos y tampón fosfato como medio aceptor. El ensayo se realizo a 37º determinando el contenido de progesterona en el aceptor espectrofotométricamente a 234nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las emulsiones A/S presentaron valores de jeringabilidad comprendidos entres 160 y 260 N·mm, inferiores a los 380 N.mm , límite para formulaciones inyectables cuando se emplean para su administración agujas hipodérmicas (3).

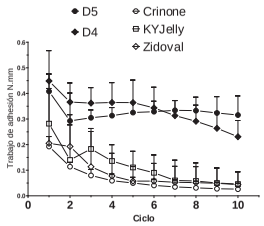


Figura 1. Influencia del fluido vaginal sobre la capacidad bioadhesiva de las formulaciones vaginales.

Las dos emulsiones O/S de ciprofloxacino presentan valores de bioadhesión superiores a los obtenidos para tres formulaciones bioadhesivas vaginales comerciales. Además tal como se observa en la figura 1 las tres formulaciones de referencia, elaboradas empleando polímeros derivados del ácido poliacrílico, pierden su capacidad bioadhesiva a medida que transcurren los ciclos de compresión/extensión, como consecuencia de su dilución con el fluido vaginal. A partir de sexto ciclo presentan ya valores muy bajos reflejo de la total pérdida de su capacidad bioadhesiva. Por el contrario las emulsiones A/S mantienen los niveles de adhesión prácticamente constantes durante todo el experimento, indicando que no sufren efectos negativos por arrastre o dilución con los fluidos biológicos.

Además de la capacidad de bioadherencia es importante que las formulaciones resistan el continuo aclaramiento al que son sometidas por efecto del fluido vaginal. Los resultados de pérdida de masa causado por el arrastre del FVS se muestran en la figura 2 y se observa que tras 8 horas de agitación continua en presencia del fluido no se observa una pérdida aparente de peso en ninguna de las emulsiones, apreciándose incluso una pequeña ganancia en el tiempo probablemente causada por incorporación de medio en el seno de las emulsiones provocando el aumento de su peso.

La determinación del ciprofloxacino liberado durante estos estudios se muestran en la figura 3.

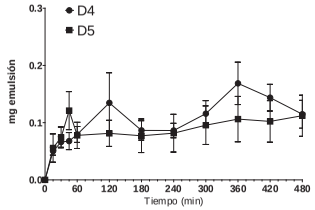


Figura 2. Variación de peso de las emulsiones en presencia de FVS.

Se observa una lenta liberación del CPF a partir de las emulsiones independientemente del tipo de cilometicona empleada en su elaboración. El perfil de liberación se ajusta a una cinética de Higuchi con unos coeficientes de determinación del 99.4 y 99.2% indicando que es un proceso controlado preferentemente por la difusión del fármaco.

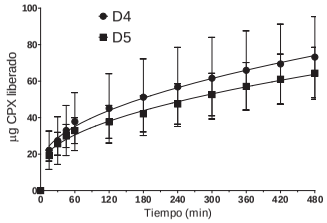


Figura 3. Resultados de los ensayos de liberación in vitro

CONCLUSIONES

Debido a sus buenas propiedades bioadhesivas, la resistencia al aclaramiento y control de liberación las emulsiones A/S propuestas pueden una buena alternativa para la administración vaginal de CPX.

REFERENCIAS.

1. Claudia Valenta. T. Advanced Drug Delivery. Reviews. 57 (2005) 1692– 1712
2. (16) Cicinelli, E, De Ziegler, D, Buletti, C, Matteo, MG, Schonaeur, LM, Galantino, P. Direct transport of progesterone from vagina to uterus. Obstetrics and gynecology. 2000; 95 (3); 403 – 406.
3. Campaña Seoane M. J., Otero Espinar F.J. Nuevas emulsiones mucoadhesivas para la liberación controlada de progesterona. X Congreso SEFIG. Madrid 2011.
4. Campaña Seoane M.J., Lenoir J., Otero Espinar F.J. and Remon J.P. Evaluation of the local tolerance of silicone based mucoadhesive formulations, using the Slug Mucosal Irritation test. XI Congreso SEFIG. Alicante 2013
5. Blanco-Fuente, H.; Vila-Dorrio, B.; Anguiano-Igea, S.; Otero-Espinar, F. J.; Blanco-Mendez, J.,. Int J Pharm. 1996, 138 (1), 103-112.

NUEVAS EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DEL EFECTO DE LA POROSIDAD DE MATRICES INERTES EN LA LIBERACIÓN

Á. Aguilar-de-Leyva[1], C. Cifuentes[1], A. R. Rajabi-Siahboomi[2], I. Caraballo[1]
[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla. C/Profesor García González, 2. 41012. Sevilla. España.
[2]Colorcon Inc. Global Headquarters, 275 Ruth Road, Harleysville, PA 19438, EEUU.

Introducción: Las matrices inertes son sistemas que consisten en una red sólida polimérica y porosa que es insoluble e indigerible en el tracto gastrointestinal (1). La liberación del principio activo desde estas formas farmacéuticas ocurre por difusión del fármaco a través de los poros de las matrices, incluyendo los poros iniciales y los poros que aparecen cuando el fármaco o los excipientes solubles se han disuelto (2).

La etilcelulosa es un polímero insoluble usado en la fabricación de diferentes formas farmacéuticas sólidas orales, entre ellas las matrices inertes de liberación prolongada, pudiendo actuar como excipiente formador de matrices mediante compresión directa (3).

La teoría de la percolación es una teoría derivada de la física estadística que estudia sistemas caóticos o desordenados. Esta teoría ha sido ampliamente aplicada al campo farmacéutico desde 1987, empezándose a aplicar al estudio de sistemas matriciales inertes de liberación prolongada (4).

La teoría de la percolación estudia la existencia de puntos críticos que en los comprimidos corresponden con concentraciones críticas de uno o más componentes del sistema, incluyendo la porosidad. En el umbral de percolación, un componente del sistema experimenta una transición geométrica de fases, empezando a formar una red que recorre todo el comprimido y teniendo una influencia mucho mayor en las propiedades del mismo. Por tanto es de esperar que cuando un componente alcanza su umbral de percolación, ocurran cambios repentinos en las propiedades del sistema que estén relacionadas con este componente. Nos encontraríamos en este caso ante un punto crítico del sistema.

En la formulación de matrices inertes de liberación prolongada lo ideal es que ambos, fármaco y excipiente se encuentren por encima de su umbral de percolación. De esta forma nos aseguramos que el fármaco se va a liberar por completo y que el excipiente formador de matriz va a actuar controlando la liberación (5).

El objetivo de este trabajo es estimar la influencia de la porosidad de comprimidos matriciales inertes multicomponentes de liberación controlada, elaborados con etilcelulosa como polímero formador de matriz, en la liberación de carbamazepina.

Materiales y Métodos: Los materiales empleados fueron: Carbamazepina (Fagron, España), ETHOCEL 7 FP y ETHOCEL 10 FP (Colorcon Ltd., UK) como polímeros formadores de matrices inertes, lactosa fast flow (Foremost, EEUU) como diluyente y estearato de magnesio (Fagron, España) y AEROSIL 200 (Evonik, Alemania) como lubrificante y deslizante, respectivamente.

Se elaboraron 10 lotes de 60 comprimidos matriciales de 300 mg de peso (5 lotes conteniendo ETHOCEL 7 FP y 5 lotes conteniendo ETHOCEL 10 FP) con un contenido en carbamazepina del 30% p/p, 40% p/p de etilcelulosa 7 FP y 10 FP, respectivamente y 5 niveles de porosidad inicial, variando desde el 0 al 25 % v/v mediante compresión directa, en una máquina de comprimir excéntrica (Bonals A-300, España). La tabla 1 muestra la composición y los niveles de porosidad de estos lotes.

	CBZ	Ethocel 7 FP	Ethocel 10 FP	Lactose	SiO_2	Mg stearate
7FP CA[a]	30.0	40.0		29.0	0.5	0.5
7FP CB[b]	30.0	40.0		29.0	0.5	0.5
7FP CC[c]	30.0	40.0		29.0	0.5	0.5
7FP CD[d]	30.0	40.0		29.0	0.5	0.5
7FP CE[e]	30.0	40.0		29.0	0.5	0.5
10FP CA[a]	30.0		40.0	29.0	0.5	0.5
10FP CB[b]	30.0		40.0	29.0	0.5	0.5
10FP CC[c]	30.0		40.0	29.0	0.5	0.5
10FP CD[d]	30.0		40.0	29.0	0.5	0.5
10FP CE[e]	30.0		40.0	29.0	0.5	0.5

[a] Porosidad inicial entre 0% y 5% v/v.
[b] Porosidad inicial entre 5% y 10% v/v.
[c] Porosidad inicial entre 10% y 15% v/v.
[d] Porosidad inicial entre 15% y 20% v/v
[e] Porosidad inicial entre 20% y 25% v/v

Tabla 1: Composición de las diferentes formulaciones preparadas.

Se realizaron estudios de disolución del fármaco en un aparato USP Sotax AT7 smart (Suiza). El porcentaje de carbamazepina liberada en función del tiempo fue medida en un espectrofotómetro de UV/VIS Agilent 8453 (EEUU) a una longitud de onda de 284 nm. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando los principales modelos cinéticos.

Resultados y Discusión: Independientemente del tipo de polímero empleado puede observarse que los perfiles de liberación muestran 3 comportamientos diferentes que pueden ser relacionados con el umbral de percolación del

diluyente más la porosidad inicial (Figuras 1 y 2). Los lotes CA, con menor porosidad inicial (0-5% v/v), muestran una velocidad de liberación del fármaco claramente menor que puede atribuirse a que estas matrices se encuentran por debajo del umbral de percolación del diluyente soluble más la porosidad inicial (por debajo del 30% v/v en ambos casos). En el extremo opuesto se encuentran los lotes CD y CE que muestran la mayor velocidad de liberación. Estos lotes presentan una porosidad inicial superior al 15% v/v por lo que se espera que estén por encima del umbral de percolación del diluyente soluble más la porosidad inicial. Por último los lotes CB y CC, con una porosidad inicial comprendida entre el 5 y el 15% v/v, muestran un comportamiento intermedio entre los expuestos previamente. Basándose en la teoría de la percolación, estos lotes muestran un comportamiento típico de un cluster incipiente, que indica que estos lotes están muy próximos al umbral de percolación del diluyente soluble más la porosidad inicial.

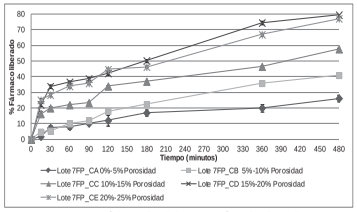


Figura 1. Perfiles de liberación de los lotes que contienen carbamazepina y 40% w/w de ETHOCEL 7 FP.

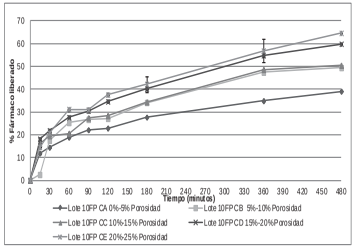


Figura 2. Perfiles de liberación de los lotes que contienen carbamazepina y 40% w/w de ETHOCEL 10 FP.

Asimismo, el efecto de la porosidad se puede observar como factor individual. Las Figuras 3 y 4 muestran un aumento en la velocidad de liberación del fármaco entre el 12.5 y el 17.5% de porosidad inicial. Estos resultados concuerdan con las predicciones de la teoría de la percolación. Es bien conocido que el umbral de percolación de los poros en un sistema sólido se encuentra en torno al 16% (6).

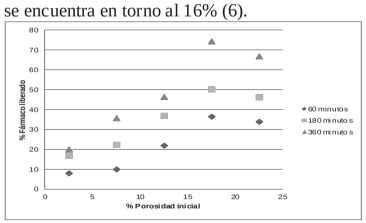


Figura 3. Porcentaje de fármaco liberado frente a la porosidad inicial en lotes que contienen carbamazepina y ETHOCEL 7 FP.

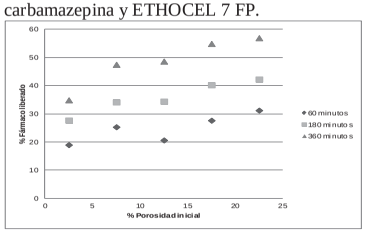


Figura 4. Porcentaje de fármaco liberado frente a la porosidad inicial en lotes que contienen carbamazepina y ETHOCEL 10 FP.

Referencias:

(1) E. Costa et al. Sistemas matriciales. Acta Farmaceutica Bonaerense. 2004; 23:259-65.
(2) I. Caraballo et al. Percolation theory: application to the study of the release behaviour from inert matrix systems. International Journal of Pharmaceutics. 1993; 96: 175-81.
(3) P.R. Katikaneni et al. Ethylcellulose matrix controlled release tablets of a water-soluble drug. International Journal of Pharmaceutics. 1995. 123**:** 119-25.
(4)J.D. Bonny y H. Leuenberger. Matrix type controlled release systems: I. Effect of percolation on drug dissolution kinetics. Pharmaceutica Acta Helvetiae.1991;66: 160-64.
(5) I. Caraballo et al. Design of controlled release inert matrices of naltrexone hydrochloride based on percolation concepts. International Journal of Pharmaceutics. 1999; 181**:** 23-30.
(6) I. Caraballo et al. Percolation thresholds in ultrasound compacted tablets. Journal of Control Release. 2000; 69: 345-55.

Agradecimientos:
Los autores quieren expresar su gratitud a Colorcon por financiar este estudio y por el suministro de ETHOCEL™.

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE GELES DE CHITOSAN MODIFICADO

M. Casas[1], C. Ferris[2], M.J. Lucero[1], V. de Paz[2], M.R. Jiménez-Castellanos[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España
[2]Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

Introducción: El chitosan es un polisacárido natural, biocompatible y biodegradable que procede de la hidrólisis de la quitina. Es una base débil que forma hidrogeles en presencia de aniones multivalentes gracias a la carga positiva de sus grupos amino. Se utiliza ampliamente en el campo biomédico y farmacéutico con múltiples aplicaciones. Además, el chitosan posee buenas propiedades mucoadhesivas, considerándose un polímero bioadhesivo "natural" que puede adherirse a tejidos duros y blandos. Es por ello que se ha utilizado en sistemas de liberación de fármacos a nivel de las mucosas. Ensayos clínicos usando biomateriales basados en chitosan no muestran reacciones inflamatorias o alérgicas tras la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano (1). Sin embargo, posee ciertas limitaciones, como su naturaleza hidrofílica o su insolubilidad en algunos medios fisiológicos, que pueden solventarse con la modificación química (2).
En los últimos años nuestro grupo de investigación viene desarrollando nuevos hidrogeles debido a su gran utilidad como sistemas semisólidos tópicos de liberación modificada (3-5). Teniendo en cuenta que los geles de chitosan modificado han cobrado una gran importancia por su biocompatibilidad, baja toxicidad y degradación por enzimas humanas, el objetivo del presente trabajo se centra en el estudio de las propiedades reológicas de nuevos hidrogeles de chitosan modificado.

Materiales y Métodos: Chitosan (CTS) (75% desacetilado) fue suministrado por Aldrich Chemical Co. Todos los reactivos utilizados para la síntesis fueron de grado analítico.
La modificación química del chitosan se llevó a cabo con el fin de incorporar grupos tioles al polisacárido. A continuación, se generó el sistema disperso por contacto con un agente oxidante.
Caracterización reológica
Los sistemas dispersos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas después de su preparación para asegurar la misma historia mecánica reciente para todas las muestras.
Los estudios se realizaron en un reómetro AR-2000 (TA Instruments, USA) para determinar las propiedades mecánicas dinámicas de las muestras. Primero, se determinó la región viscoelástica lineal a través de un barrido de esfuerzo a una frecuencia de 1 Hz. Posteriormente, se aplicó un esfuerzo oscilatorio de 1 Pa en un intervalo de frecuencia de 0.01 a 100 rad/s. El análisis de los resultados se centró en la determinación de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') que determinarán el comportamiento mecánico de las muestras. Por otro lado y mediante cizalla rotacional, se determinó el comportamiento de flujo de los preparados. El protocolo experimental consistió en aplicar una velocidad de cizalla hasta la aproximación al estado estacionario o hasta un tiempo máximo de 300 segundos por punto. Las curvas de flujo se determinaron con una geometría lisa plana de 60 mm de diámetro. Las determinaciones se hicieron a una temperatura de 25 ºC.
Por último, las distintas curvas de flujo se ajustaron a los modelos reológicos establecidos.

Resultados y Discusión: De los distintos preparados de CTS modificado, se seleccionaron dos concentraciones, 1 y 4%, para su estudio reológico. A partir de barridos de esfuerzo (figura no mostrada) se determinó la región viscoeslástica lineal. Así, las dispersiones acuosas al 1% muestran un comportamiento independiente hasta 2 Pa, punto a partir del cual empieza a fluir la muestra, esfuerzo crítico. Por el contrario, en las muestras al 4% no se detecta un esfuerzo crítico en todo el intervalo estudiado (0-100 Pa). En la Figura 1 se muestra el barrido de frecuencia de las dispersiones al 1 y 4% recogiéndose los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'').

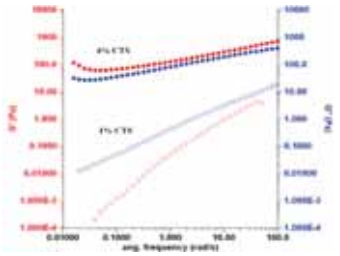


Figura 1. Barrido de frecuencia para los sistemas dispersos al 1 y 4% de chitosan modificado.

En ella se observa que el aumento de concentración de CTS modificado en la dispersión, provoca un cambio reológico importante. Así, en el preparado al 1% predomina G'' sobre G', lo que significa que tiene un comportamiento más viscoso que elástico, y presenta un posible punto de reticulación a 71 rad/s y 12 Pa. Por su parte, en el preparado al 4% de CTS se da la situación inversa, con predominio del módulo elástico (G') respecto al viscoso (G''), indicando la presencia de una estructura tridimensional gelificada.
Por otro lado, se aprecia un importante incremento en las viscosidades aparentes del preparado al 4% con respecto al 1% (Figura 2), aproximadamente 10^5 veces mayor, lógicamente debido a la mayor concentración de polímero.

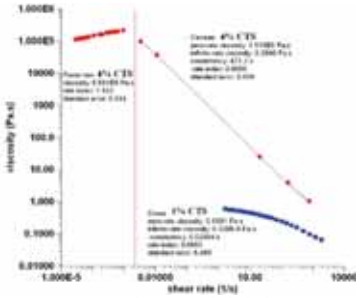


Figura 2. Curva de viscosidad de los sistemas dispersos con 1 y 4% de chitosan modificado.

La dispersión al 1% muestra un flujo no newtoniano con comportamiento pseudoplástico (shear-thinning), debido a que la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Sin embargo, la dispersión al 4% muestra un comportamiento característico de fluidos estructurales en los que se recoge un comportamiento newtoniano, la viscosidad aparente se mantiene independiente de la velocidad de cizalla (zona plateau), y a partir de 240 Pa comienza a fluir con flujo pseudoplástico.
Finalmente, los datos se ajustaron a modelos reológicos matemáticos, corroborando así lo observado en las gráficas. El mejor ajuste para la dispersión al 1% correspondió al modelo de Cross (6), cuyos parámetros obtenidos se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros del modelo de Cross para la dispersión acuosa al 1% de chitosan modificado.

	η_0(Pa.s)	η_∞(Pa.s)	k (s)	n
Cross	0.689	6.328×10^{-8}	0.02864	0.4349

En ella se refleja la baja viscosidad del preparado (η_0 y η_∞), así como un tiempo de relajación muy pequeño (k). Además, el valor de "n" menor que 1 refleja su comportamiento pseudoplástico (shear-thinning).
Por su parte, la dispersión al 4% se ajustó al modelo de Ostwald-De Waele para velocidades de cizalla inferiores a 0.002 s^{-1} y 240 Pa de esfuerzo y al modelo de Carreau para valores superiores a éstos (Tabla 2). Así, se puede observar como el sistema disperso presenta inicialmente un comportamiento newtoniano (n≈1) con altos valores de viscosidades aparentes que se confirman con el modelo de Carreau, ya que η_0, viscosidad a velocidad de cizalla 0, es del orden de 10^5. Cuando empieza a fluir y dado su flujo pseudoplástico (n=0.967), va disminuyendo la viscosidad hasta alcanzar valores de 0.286 Pa.s (η_∞).

Tabla 2. Parámetros de los modelos de Ostwald-De Waele y Carreau para los sistemas dispersos al 4% de chitosan modificado.

	K (Pa.s)	**n**		
Ostwald-De Waele	6.58×10^5	1.16		
	η_0(Pa.s)	**η_∞(Pa.s)**	**k(s)**	**n**
Carreau	1.61×10^5	0.2860	421.2	0.967

Conclusiones:
Mediante la modificación química del chitosan se consiguen dispersiones acuosas de hasta 4% de chitosan modificado. Los fluidos obtenidos son viscoelásticos con flujo pseudoplástico, para los menos concentrados, y estructurados, para los de mayor concentración, con el consiguiente interés en aplicaciones cosméticas, biomédicas y farmacéuticas.

Referencias:
(1) C. Chatele et al. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials, 22:261–8 (2001).
(2) K. Tapan et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. Acta Pharmaceutica Sinica B, doi:10.1016/j.apsb.2012.07.004 (2012).
(3) C. Claro et al. Surface tension and rheology of aqueous dispersed systems containing a new hydrophobically modified polymer and surfactants. International Journal of Pharmaceutics, 347: 45-53 (2008).
(4) MJ. Lucero et al. Rheological and mechanical properties of hydrophilic dispersions using a new hydrophobically modified polymer and Igepal® CO520. Carbohydrate Polymers, 86: 891-896 (2011).
(5) MJ. Lucero et al. Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer® vs Franz cells. Carbohydrate Polymers, doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.005 (2012).
(6) L. Medina-Torres et al. Rheological properties of the mucilage gum (Opuntia ficus indica). Food Hydrocolloids, 14: 417-424 (2000).

ANÁLISIS CALORIMÉTRICO DE SISTEMAS BUCOADHESIVOS

H. Castán[1], M.E. Morales[1], B. Clares[1], A.C. Calpena[2], M.A. Ruíz[1]

[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Granada. España.

[2] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Barcelona. España.

Introducción

En la actualidad, uno de los problemas que causan una mayor demanda analgésica es el dolor odontológico. Sin embargo, el uso continuado de analgésicos presentan numerosas reacciones adversas, las cuales podrían ser evitadas con el uso de formas farmacéuticas de administración transbucal. En diferentes estudios (1) se ha comprobado que algunos antidepresivos tricíclicos pueden tener efecto analgésico gracias a su acción bioquímica molecular ya que son capaces de aumentar la cantidad de noradrenalina y serotonina en el espacio sináptico. En este sentido la administración transbucal de clorhidrato de doxepina podría proveer de una potente actividad analgésica empleando bajas dosis y por tanto evitando los efectos adversos asociados a la administración sistémica de dichas sustancias. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es el diseño de un parche bucoadhesivo para la administración transbucal de clorhidrato de doxepina utilizando diferentes polímeros (2) así como la caracterización de dichos sistemas en cuanto al análisis calorimétrico y la capacidad de hinchamiento.

Materiales y métodos

Materiales

Clorhidrato de doxepina fue suministrado por Fagron Iberica S.A.U. (Barcelona, España). Las películas fueron preparadas utilizando tres polímeros: chitosan (Sigma-Aldrich, Valencia, España), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (Methocel K 15M EP, Palex S.A., Jaén, España) y carboximetilcelulosa sódica (SCMC) (Guinama, Valencia, España). El plastificante ha sido glicerol (Fagron, Barcelona, España). Polivinilpirrolidona (PVP) fue suministrado por Basf (Barcelona, España) y el ácido acético por Panreac (Barcelona, España).

Análisis calorimétrico

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se ha realizado en un dispositivo Mettler FP 85, tomando medidas a intervalos de 5º C/ minuto. El peso de las muestras se encuentra comprendido entre 5-7 mg.

Capacidad de hinchamiento

Después de la determinación del peso y diámetro del parche original, las muestras fueron sometidas a hinchamiento en la superficie de una placa de agar preparado al 2% (m/m) y mantenida en estufa a 37º C. El aumento de peso y diámetro de los parches se determinó en intervalos de tiempo predeterminados. El porcentaje de hinchamiento fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hidratación} = (W_2 - W_1)\ W_2 \times 100$$

Donde W_2 es el peso del parche después de permanecer en la estufa un tiempo determinado y W_1 es el peso del parche inicial.

Resultados y discusión

Los sistemas bucoadhesivos estudiados (tabla 1) son sistemas matriciales en una sola lámina elaborada a partir de un hidrogel, donde el material polimérico, además de constituir el reservorio del fármaco, también es responsable de la fijación del sistema a la mucosa oral.

SCMC 4% (p/v)	HPMC 3% (p/v)	Chitosan 2% (p/v)
PVP 5% (p/v)	PVP 5% (p/v)	PVP 5% (p/v)
Glicerol 5%	Glicerol 5%	Glicerol 5%
Agua destilada	Agua destilada	Solución acuosa de ácido acético 1,5% (v/v)
Clorhidrato de doxepina 0,05%	Clorhidrato de doxepina 0,05%	Clorhidrato de doxepina 0,05%

Tabla 1. Composición de los parches bucoadhesivos propuestos.

Es preciso hacer notar que los termogramas (figuras 1-3) están evaluados tomando como criterio las transiciones exotérmicas y endotérmicas. El hidrocloruro de doxepina (figura 2) mostró un solo pico endotérmico correspondiente al punto de fusión a 191,1º C, así como un pico exotérmico correspondiente a su descomposición.

Según se muestra en la figura 1, en los tres sistemas estudiados se da una transición de tipo endotérmico, en el intervalo de temperaturas entre 30 y 120º C, lo cual se atribuye a la deshidratación por la pérdida de las uniones con las moléculas de agua. Al final de la curva calorimétrica, se evidencia otro proceso térmico a partir de los 140º C, debido a la descomposición de los biopolímeros.

Se observan entalpías de deshidratación similares para los polímeros de carboximetilcelulosa sódica (281 J/g) y chitosan (281 J/g). Sin embargo, la película de hidroxipropilmetilcelulosa presenta una tendencia menor respecto a la entalpía (251 J/g), lo que indica que se suministró una energía menor para eliminar el agua del sistema. Este hecho confirma como los soportes de carboximetilcelulosa sódica y chitosan poseen una mayor capacidad de absorción de la molécula de agua en su estructura, observando esta misma tendencia en el análisis de hinchamiento ya que los porcentajes de la tabla 3 muestran que los parches elaborados con hidroxipropilmetilcelulosa presentan menor tendencia a captar agua y que esta da lugar a la disolución del sistema en un tiempo máximo de 3 minutos. En cambio, en los sistemas de carboximetilcelulosa sódica y chitosan no hay una diferencia significativa ($p > 0,05$) en cuanto al porcentaje de hidratación.

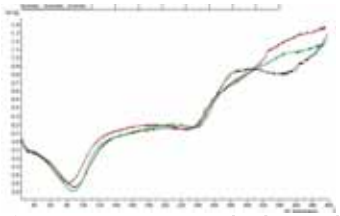


Figura 1. Termogramas de los parches bucoadhesivos.

Formulación	% hidratación ± DE
SCMC	67,04 ± 2,03
HPMC	55,91 ± 2,26
Chitosan	67,30 ± 2,45

Tabla 3. Porcentaje de hidratación.

De manera similar las mezclas físicas con las mismas proporciones que los parches no muestran el pico característico del principio activo (figura 2), debido muy probablemente a su escasa relación con el resto de excipientes.

En las mezclas binarias del principio activo con los excipientes evaluados no se detectaron desplazamientos significativos de las transiciones, ni formación de picos adicionales, así como tampoco se observó la desaparición de las transiciones características de cada sustancia estudiada, lo que indica que las transiciones físicas características de cada uno de los excipientes empleados no fueron modificadas por la presencia del principio activo (figura 3). Sin embargo, la combinación con chitosan muestra un desplazamiento considerable de la temperatura de fusión del activo lo que podría indicar cierta interacción. No obstante, todas estas hipótesis se deberían contrastar con otras técnicas.

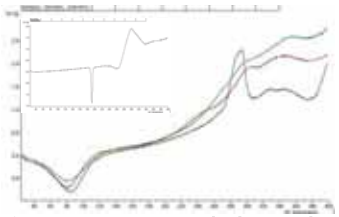


Figura 2. Termogramas de las mezclas de polímero, polivinilpirrolidona y doxepina en las proporciones en las que se encuentran en el parche.

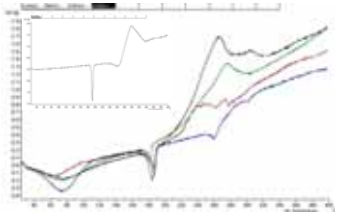


Figura 3. Termogramas de las mezclas físicas de la doxepina y cada polímero.

Conclusión

Los análisis calorimétricos tanto de los materiales empleados como de las formulaciones propuestas coinciden con los datos existentes en la bibliografía consultada, observando compatibilidad manifiesta entre los polímeros seleccionados y el clorhidrato de doxepina, así como temperaturas de transición vítrea aptas para proporcionar la flexibilidad adecuada tras su administración bucal. Además, los datos de entalpía de las diferentes películas se correlacionan con los resultados obtenidos en el ensayo de hinchamiento, mostrando al parche de hidroxipropilmetilcelulosa como el soporte con menor capacidad de hinchamiento.

Bibliografía

(1) McCleane, G. (2007). Analgésicos por vía tópica. Anesthesiology Clin. N. Am., 25, 825-839.

(2) Nafee, N.A., Ismail, F.A., Boraie, N.A. y Mortada, L.M. (2003). Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. International Journal of Pharmaceutics, 264, 1-14.

MAGNETOLIPOSOMAS PARA EL TRANSPORTE DE 5-FLUOROURACILO: UNA APROXIMACIÓN PRELIMINAR AL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE COLON AVANZADO

R. Biedma-Ortiz[1], B. Clares[1], E. Sáez-Fernández[1], A.V. Delgado[2], M.A. Ruiz[1], J.L. Arias[1]
[1]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
[2]Dpto. de Física Aplicada, Universidad de Granada, España.
e-mail: beatrizclares@ugr.es

Introducción: Dentro de los diferentes tipos de nanoplataformas diseñadas para el transporte específico de fármacos hasta el tejido o célula diana destacan los coloides magnéticos. Se postula que las principales ventajas de estos nanosistemas como sistemas transportadores de sustancias activas frente a la farmacoterapia convencional son principalmente: *i*) la disminución de reacciones adversas derivadas de una extensa biodistribución del fármaco, la cual no existe porque toda la dosis queda acumulada en el lugar de acción; y, *ii*) una intensa exposición del tejido y células diana a las moléculas de sustancia activa transportadas magnéticamente (1). En este sentido, el presente trabajo de investigación pretende el desarrollo de una formulación de magnetoliposomas como nanoplataformas para el transporte selectivo de 5-fluorouracilo (5-FU) en el tratamiento de cáncer de colon avanzado.

Materiales y Métodos: Todos los reactivos químicos usados tenían calidad analítica (Panreac, España), excepto la L-*α*-fosfatidilcolina y el 5-FU (Sigma-Aldrich, Alemania). El agua utilizada en todos los experimentos fue desionizada y filtrada previamente (Milli-Q, Millipore, Francia).
Los núcleos de magnetita (Fe_3O_4) se sintetizaron mediante un método de co-precipitación química (2, 3). Los liposomas fueron preparados utilizando el método de hidratación del *film* (*thin layer evaporation technique*) (4). La preparación de los magnetoliposomas se basó en esta misma metodología con la única excepción de la inclusión de los núcleos de Fe_3O_4 en la fase acuosa utilizada para la rehidratación de la fina capa lipídica.
La caracterización fisicoquímica de los magnetoliposomas comenzó con el estudio de su geometría mediante análisis de microfotografías electrónicas de transmisión (TEM) y mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Estas determinaciones se realizaron por triplicado a 25.0 ± 0.5 ºC. Las nanopartículas fueron caracterizadas también mediante análisis electrocinético (electroforesis) y caracterización termodinámica superficial (balance hidrofilia/hidrofobia, a partir del tratamiento termodinámico de las determinaciones de ángulo de contacto con agua, formamida y *α*-bromonaftaleno).

En el primer caso, se determinó la evolución de los valores de potencial zeta (ζ) de las nanopartículas en función de la fuerza iónica del medio de dispersión (concentración de KNO_3). La concentración de las nanopartículas se fijó ≈ 0.1 % (p/v). Por otro lado, y con el objetivo de analizar cualitativamente la degradación de los magnetoliposomas, se determinó la evolución temporal de los valores de movilidad electroforética (u_e) de éstos y de nanopartículas de Fe_3O_4. Estas medidas se realizaron reproduciendo *in vitro* las siguientes condiciones fisiológicas: 37.0 ± 0.5 ºC y pH 7.4 ± 0.1 (tampón NaOH-KH_2PO_4).
En la realización de los ensayos de incorporación de 5-FU en los magnetoliposomas, la fase acuosa contenía una concentración de este fármaco de 3 mg/mL. La eficacia de atrapamiento (*EE*, %) y carga de fármaco (*DL*, %) del 5-FU, junto con el perfil de liberación *in vitro* (pH 7.4, 37 ºC) se caracterizaron mediante un método validado de espectrofotometría UV-Vis (266 nm). Los ensayos de liberación se realizaron mediante diálisis.

Resultados y Discusión: Los núcleos de Fe_3O_4 presentaron una morfología cúbica y un tamaño medio de partícula de 12 ± 2 nm, mientras que los liposomas se caracterizaron por una morfología esférica y un tamaño medio de 635 ± 393 nm (elevada heterogeneidad de tamaño). Por el contrario, los magnetoliposomas presentaron una morfología esférica y un tamaño de partícula adecuado para la vía de administración intravenosa (120 ± 24 nm). La termodinámica superficial y el análisis electrocinético de los diferentes tipos de nanopartículas pusieron de manifiesto que la naturaleza hidrófila de las nanopartículas de Fe_3O_4 (figura 1) y su correspondiente carga eléctrica positiva (figura 2) desaparecen al ser embebidas en la matriz liposomal hidrófoba y de carga eléctrica negativa. Ambas caracterizaciones fisicoquímicas constituyen una clara evidencia de la eficacia de la metodología desarrollada para la síntesis de magnetoliposomas.

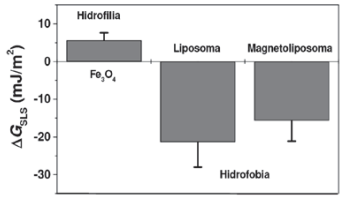


Figura 1. Valores de incremento de energía libre superficial en medio acuoso (ΔG_{SLS}, mJ/m^2) y carácter hidrófilo/hidrófobo de los tres tipos de nanomateriales.

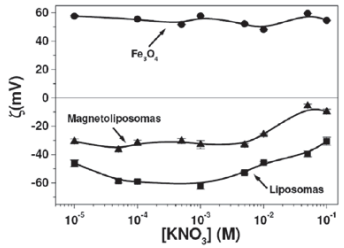


Figura 2. Potencial zeta (ζ) de Fe_3O_4, liposomas y magnetoliposomas en función de la concentración molar de KNO_3, y a pH natural (pH ≈ 6).

La degradación de los magnetoliposomas parece transcurrir rápidamente, siendo completa en 12 horas. De hecho, este comportamiento es claro si consideramos el ensayo electrocinético de degradación realizado (figura 3). Los valores de u_e de los magnetoliposomas se hacen más negativos conforme transcurre el tiempo, llegando a ser similares a los de los núcleos de Fe_3O_4 transcurridas sólo 12 horas. Otro hecho destacable es que la evolución más acusada de estos valores se produce durante las primeras 2 horas. Así, la degradación debe transcurrir más acusadamente durante este periodo de tiempo.

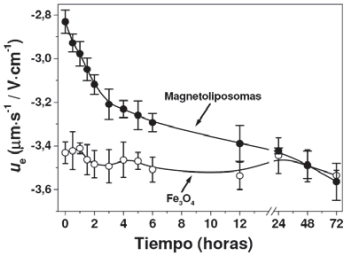


Figura 3. Movilidad electroforética (u_e) de magnetita (Fe_3O_4, ○) y magnetoliposomas (●) en función del tiempo (horas) (37 ºC y pH 7.4).

En cuanto a la vehiculización de 5-FU, la *EE* (%) y la *DL* (%) de los magnetoliposomas fue del ≈ 23% y ≈0.2 %, respectivamente. Como puede apreciarse en la figura 4 la liberación *in vitro* del 5-FU transcurre mediante un proceso rápido, ya que el 70% del fármaco vehiculizado es liberado en ≈1 h. Este fenómeno podría apoyarse en la rápida degradación descrita para la matriz liposomal (figura 3).

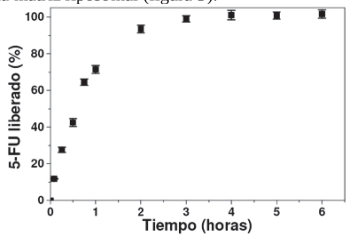


Figura 4. Liberación de 5-FU (%) desde los magnetoliposomas en función del tiempo (horas) (37 ºC y pH 7.4).

Conclusiones: Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible para la síntesis de magnetoliposomas como sistemas transportadores del agente quimioterápico 5-FU. La caracterización fisicoquímica realizada refleja la eficacia de esta metodología. Si bien por sus características esta formulación tendría interés si se administra por vía intratumoral o intraarterial, en la actualidad se están desarrollando modificaciones en la formulación que mejoren la capacidad de los magnetoliposomas como nanovehículos de este agente quimioterápico.

Referencias:

(1) Durán JDG et al. Magnetic colloids as drug vehicles. 2008;97(8):2948-83.
(2) Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. 1981;17(2):1247-8.
(3) Arias JL et al. Magnetoresponsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. 2008;24(14):7512-9.
(4) Clares B et al. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability and characterization. 2009;19(3):197-206.

Agradecimientos: Proyecto FIS 11/02571 (Instituto de Salud Carlos III, España).

POTENCIAL DE MAGNETOLIPOSOMAS COMO AGENTES DE HIPERTERMIA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE COLON AVANZADO

R. Biedma-Ortiz, B. Clares, E. Sáez-Fernández, V. Gallardo, M.A. Ruiz, J.L. Arias
Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
e-mail: beatrizclares@ugr.es

Introducción: En la actualidad, numerosos ensayos preclínicos han puesto de manifiesto la excelente capacidad que tienen los coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos antitumorales, ya que mejoran notablemente la eficacia y seguridad del agente quimioterápico (1). Más recientemente, diversas investigaciones han postulado su potencial utilidad como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) y como agentes de hipertermia. Ésta última cualidad tiene un enorme interés en la lucha contra el cáncer. En concreto, se indica que los coloides magnéticos podrían ser guiados magnéticamente hasta la masa tumoral y allí generarían selectivamente un calor que mataría las células malignas (hipertermia). El fenómeno de hipertermia es consecuencia de la vibración de los momentos magnéticos de estas partículas, al encontrarse bajo la acción de un gradiente de campo electromagnético alterno (2).
El objetivo de esta investigación es el análisis de la capacidad como agente de hipertermia que tiene una formulación de magnetoliposomas constituida por núcleos de óxido de hierro superparamagnético (magnetita, Fe_3O_4) embebidos en una matriz liposomal basada en fosfatidilcolina. Este estudio preliminar *in vitro* pretende constituir un paso previo en la valoración de la aplicabilidad de esta (nano)-formulación en el tratamiento de cáncer de colon avanzado.

Materiales y Métodos: Los productos químicos utilizados tenían calidad analítica (Panreac, España), incluida la L-*α*-fosfatidilcolina (Sigma-Aldrich, Alemania). El agua utilizada fue previamente desionizada y filtrada (Milli-Q, Millipore, Francia).
Los magnetoliposomas que se estudiarán en este trabajo de investigación tienen una morfología esférica y un tamaño medio de 120 ± 25 nm (figura 1). Su síntesis se ha basado en la modificación de una metodología ampliamente empleada para la formulación de liposomas: el método de hidratación del *film* (*thin layer evaporation technique*) (3). La principal variante a esta metodología consiste en la inclusión de núcleos de Fe_3O_4 (tamaño medio ≈ 10 nm, *a priori* superparamagnéticos) en la fase acuosa empleada en la rehidratación de la fina capa lipídica.

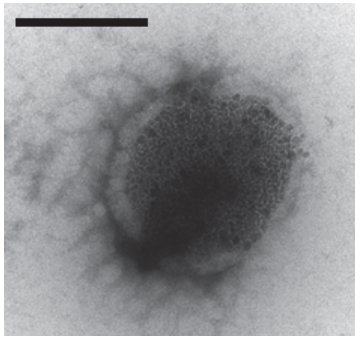


Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión de un magnetoliposoma. Longitud de barra: 100 nm.

La estructura cristalina de estos nanocompuestos magnéticos se caracterizó mediante la obtención del difractograma de rayos X (método de Debye-Scherrer). La masa de magnetoliposomas empleada para ello fue 0.5 g, habiéndose desecado previamente la muestra a 35.0 ± 0.5 ºC en un horno de convección.
Las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas se caracterizaron mediante un magnetómetro-susceptibilímetro a 25.0 ± 0.5 ºC. Finalmente, se caracterizó la capacidad de estos nanocompuestos magnéticos como agentes de hipertermia. Para ello, se preparó una suspensión acuosa de magnetoliposomas (10 mg/mL, 5 mL) y se determinó su capacidad para generar calor cuando ésta es sometida a un gradiente de campo electromagnético alterno (frecuencia e intensidad: 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente). El registro de la temperatura se realizó con una sonda termométrica conectada a un ordenador.

Resultados y Discusión: La figura 2 recoge el difractograma de rayos X de los magnetoliposomas. Es interesante observar cómo todos los picos característicos de la Fe_3O_4 permanecen inalterados en el difractograma de los liposomas magnéticos. De esta manera, puede afirmarse que la estructura de los núcleos de óxido de hierro permanece inalterada tras su inclusión en la matriz del liposoma, siendo éste un requisito indispensable para que los nanocompuestos tengan una adecuada capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético.

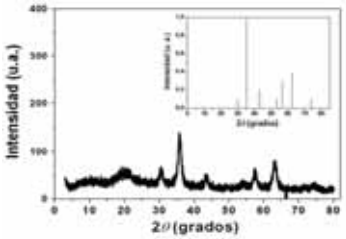


Figura 2. Difractograma de rayos X de los magnetoliposomas. Figura insertada: patrón *ASTM* de difracción de rayos X de la Fe_3O_4. La intensidad se expresa en unidades arbitrarias (u. a.).

El análisis de las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas puso de manifiesto su adecuada capacidad de respuesta a gradientes magnéticos. Los datos de susceptibilidad magnética inicial y de magnetización de saturación de las partículas confirman esta afirmación (25.0 ± 0.2 y 206 ± 12 kA/m, respectivamente). De esta forma, es de esperar que los magnetoliposomas sean fácilmente guiados al lugar de acción con la ayuda de un imán.
Finalmente, la exposición de la suspensión acuosa de nanocompuestos a un gradiente de campo electromagnético alterno parece convertir a los magnetoliposomas en adecuados agentes de hipertermia (figura 3). De hecho, puede apreciarse en la figura cómo en tan sólo 22 minutos se alcanza la temperatura mínima de hipertermia (≈ 41 ºC) (4). Además, se observa que la temperatura de la suspensión continúa subiendo hasta alcanzar un valor máximo de 45 ºC, el cual se mantiene estable durante todo el experimento.

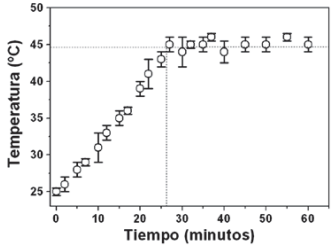


Figura 3. Curva de calentamiento de una suspensión acuosa de magnetoliposomas (10 mg/mL) bajo la influencia de un gradiente de campo electromagnético alterno.

Esto demuestra un óptimo control de la temperatura y flujo de calor (requisito básico para su aplicación en hipertermia contra el cáncer). De hecho, debe tenerse en cuenta que si se calienta una masa tumoral durante ≈ 30 minutos, está puede destruirse. Asimismo, pueden inducirse daños en el tejido sano que rodea al tumor si la temperatura supera los 48 ºC (5, 6).

Conclusiones: El método de síntesis desarrollado permite obtener magnetoliposomas con una geometría adecuada para su administración por vía parenteral. Las excelentes propiedades magnéticas de estos nanocompuestos permiten postular un futuro prometedor en Biomedicina para su aplicación en el tratamiento de tumores por medio de la hipertermia. Actualmente, se encuentran en desarrollo estudios para valorar la eficacia antitumoral de esta (nano)-formulación para hipertermia en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de colon avanzado.

Referencias:

(1) Durán JDG et al. Magnetic colloids as drug vehicles. 2008;97(8):2948-83.
(2) Wang SY et al. Magnetic nanoparticles and thermally responsive polymer for targeted hyperthermia and sustained anti-cancer drug delivery. Adv. Exp. Med. Biol. 2013;765:315-21.
(3) Clares B et al. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability and characterization. 2009;19(3):197-206.
(4) Johannsen M et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. Int. J. Hyperthermia. 2005;21(7):637-47.
(5) Gonzales M, Krishnan KM. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. J. Magn. Magn. Mater. 2005;293:265-70.
(6) Lao LL, Ramanujan RV. Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2004;15:1061-4.

Agradecimientos: Proyecto FIS 11/02571 (Instituto de Salud Carlos III, España).

SOLUBILIDAD DE LA LIDOCAÍNA BASE EN EXCIPIENTES EMOLIENTES

E. Blanca Eliche, M. D. Contreras Claramonte
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España

Introducción: La lidocaína se presenta en forma de derivado salino (ClH) y en forma de base. El derivado salino es habitual en preparaciones tópicas. Este trabajo explora las posibilidades de formulaciones tópicas con lidocaína base. De esta molécula se conoce su carácter básico débil, su lipofília y la escasa solubilidad en agua a pH compatible con la piel (5 -7). El objetivo del trabajo es determinar la solubilidad de la Lidocaína base en excipientes lipofílicos, líquidos a temperatura ambiente y adecuados para preparaciones dermatológicas.
La selección de los excipientes, se realiza en base a su probable solubilidad. Para ello, se utiliza la Teoría de las Soluciones Regulares y los parámetros de solubilidad de Hansen. Los conceptos generales de ambas, son de carácter práctico y permiten conocer a-priori la bondad de los disolventes. Están basados en los parámetros de solubilidad total (δ_t) y parámetros de cohesión (δ_d, δ_p y δ_h) del soluto y de los disolventes.

Materiales y Métodos:
1.- Selección de los excipientes. Para aplicar los conceptos anteriores, es necesario conocer el valor de δ_t y de δ_d, δ_p y δ_h, de la lidocaína y de los excipientes. El valor de δ_t de la lidocaína (Tabla 1), fue determinado por Lin y Nash (1), el resto de los parámetros son determinados por métodos de contribución de grupos de Fedors (2), Van Krevelen y Hoftyzer y Hansen y Beerbower (3)
Se seleccionan disolventes (Tabla 1).cuyo δ_t varían de 17,44 a 20,2 MPa, cumpliendo la primera premisa: diferencia en δ_t entre la lidocaína y disolvente menor de 5,11 MPa $^{1/2}$.

2.- Análisis cualitativo de la solubilidad. Para una estimación inicial de la solubilidad de la lidocaína en los disolventes se ha seguido la metodología propuesta por Teas (4) aplicada a diagramas triangulares y esfera de solubilidad. Como referencia se ha utilizado la solubilidad de la lidocaína en etanol.

Diagrama Triangular de solubilidad.. Se obtiene empleando los parámetros de cohesión normalizados (f_d):

$$f_d = \left(\frac{\delta_d}{\delta_d + \delta_p + \delta_h}\right) * 100 \quad f_p = \left(\frac{\delta_p}{\delta_d + \delta_p + \delta_h}\right) * 100$$

$$f_h = \left(\frac{\delta_h}{\delta_d + \delta_p + \delta_h}\right) * 100$$

En el diagrama triangular (Fig. 1): La distancia entre los excipientes y la lidocaína es menor que la distancia entre la lidocaína y el etanol. Es previsible que la lidocaína sea soluble en los disolventes.

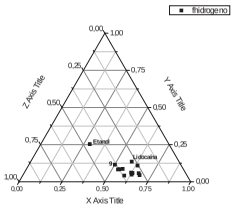


Figura 1. Diagrama triangular de Teas, predicción de la solubilidad de la lidocaína en los disolventes.

Esfera de solubilidad de la lidocaína: El centro de la esfera (Fig. 2) tiene los valores de δ_d, δ_p y δ_h de la lidocaína. El radio de la esfera (radio de interacción R_0) es determinado desde los valores de δ_d, δ_p y δ_h del etanol. Los límites de esta esfera caracterizan los "buenos" disolventes (5). Estos deben tener una distancia desde el centro de la esfera "distancia del parámetro de solubilidad" (Ra) menor que Ro.

Figura 2. Esfera de solubilidad de la lidocaína.

Es previsible una buena solubilidad, Ra es menor que R_0.

3. Estimación teóriva de la solubilidad. La Teoría de las Soluciones Regulares permite una estimación cuantitativa de la solubilidad de la lidocaína en los disolventes (Fig. 4), aplicando la ecuación deducida por Hildebrand y Scott:

$$-\ln X_2 = -\ln X_2^{ideal} + \frac{V_2 \phi_1^2}{RT}(\delta_2 - \delta_1)^2$$

Ecuación 1

Donde: V_2 = volumen molar del soluto; Φ_1= fracción de volumen del disolvente; R: constante de los gases; T: temperatura absoluta de la experiencia; δ_1 y δ_2 = parámetros de solubilidad, total (o de Hildebrand) del disolvente y del soluto respectivamente.

Solubilidad experimental. Se obtiene soluciones saturadas a 25 ºC . Se valoraron por espectrofotometría alícuotas del sobrenadante. Cada valor es la media de dos ensayos independientes.

Resultados y discusión.
Los resultados obtenidos (Figura 4) demuestran la elevada solubilidad de la lidocaína en los disolventes.

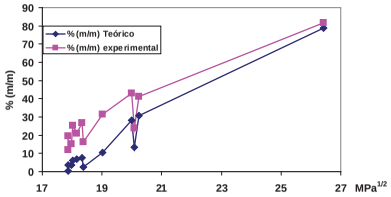


Figura 4. Solubilidad de la lidocaína.

En todos los casos los valores de solubilidad experimental es superior a la estimada por la ecuación 1, siendo esta diferencia más elevada en los disolventes de parámetros de solubilidad más bajos (aceite de oliva al Adipato de di (tri polietilenglicol éter mirístico) donde la diferencia es hasta de 20 veces superior. En estos disolventes, inicialmente, era previsible que en función de sus parámetros, la lidocaína formara soluciones regulares, donde solo existieran fuerzas de dispersión y ambos valores, teórico y experimental, se aproximaran. Estas diferencias pueden ser atribuidas a interacciones de tipo polar o de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la lidocaína (amido, amino y carboxilo) y de los disolventes (alcohol, éter, ester).
A todo ello hay que añadir que la lidocaína en solución y debido a la conformación espacial del grupo amido, puede adoptar configuración cis, trans o simultáneamente ambas (cis/trans) en equilibrio (6). Lumley-Jones (7) puso en evidencia la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en la lidocaína cuando esta se encuentra en solución en disolventes poco polares, originando configuración cis, estables, más lipofílicas que cuando la lidocaína se encuentra en disolventes de mayor polaridad, donde predomina la configuración trans (8) y asociaciones intermoleculares (6). Todos los disolventes estudiados son poco polares, su δ_p varía entre 1,2 y 2,53 MPa$^{1/2}$. Es probable que al menos en los primeros disolventes de la serie, la lidocaína se encuentre en forma cis y contribuya a explicar, al menos en parte, las discrepancias observadas.

Tabla 1.- Disolventes seleccionados y parámetros de solubilidad y Volumen Molar

Nombre comercial		δ_T (MPa$^{1/2}$)	δd (MPa$^{1/2}$)	δp (MPa $^{1/2}$	δh (MPa$^{1/2}$)	V molar (cm^{3}mol)
Aceite de oliva	Aceite de oliva	17,86*	15,9*	1,20*	5,40*	900,000
Cetiol SN	Isononanoate de cetilo/esteárico	17,86	15,16	1,06	9,36	482,1
Cetiol LC	Coco Caprilato/caprato	17,98	16,64	1,10	6,72	465,8
	Miristato de isopropilo	18,03	16,01	1,59	8,12	321,2
Cetiol A	Laurato de hexilo	18,15	16,25	1,51	7,94	337
Eutanol G	2-octil dodecanol	18,33	16,91	1,45	6,93	352,7
Cromoll. DP3A	Adipato de di (tri polietilenglicol éter mirístico)	18,38	16,85	2,89	6,73	921,4
Cromadol DOA	Adipato di(2 etil hexilo	19,02	15,97	2,46	10,04	414,4
Cetiol B	Adipato de dibutilo	19,99	15,62	3,57	11,96	285
Croda. GTCC	Triglicéridos caprílicos/cápricos	20,07	16,41	2,53	11,27	603,6
Crodamol LL	Lactato de laurilo	20,24	16,36	2,53	11,64	284,6
	Etanol	26,42	12,60	11,20	20,00	58,5
lidocaina		22,90*	20,32	4,69	9,48	208,500*

Bibliografía

1-. H.M. Lin y R.A. Nash, J.Pharm. Sci. 82, (1993) 1018- 26.
2.- R.F. Fedors, Polym. Eng. Sci. 14 (1974) 147 – 154.
3.- C.M. Hansen. Hansen solubility: A user´s handbook. 2ª edc. 2007, CRC Press, Boca Raton, Florida.
4.- J.P. Teas, J. Paint. Tech. 40 (1968) 19 – 25.
5.- C.M. Hanse, Prog. Org. Coat. 51 (2004) 77-84.
6.- P.D. McMaster y cols., Pharm. Res. 8 (1991) 1013 – 1020.
7.- R. Lumley-Jones, J. Pharm. Sci. 63 (1974) 1170 – 1171.
8.- J.P. Chupp, J. Pharm. Sci. 59 (1970) 1524 - 5

GLUTATHIONE-RESPONSIVE MICROPARTICLES FOR DRUG DELIVERY

M. Curcio[1], C. Alvarez-Lorenzo[2], B. Blanco-Fernandez[2], F. Puoci[1], N. Picci[1], A. Concheiro[2]

[1] Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Edificio Polifunzionale, Università della Calabria, 87036 Rende (CS), Italy.
[2]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

Introduction: Stimuli-responsive hydrogels constitute a fast-growing area of polymer science because of the ability to rapidly respond to environmental stimuli [1,2]. Among polymers that can form hydrogels, natural polymers are often preferred to synthetic materials because of their non-toxicity, low cost, ready availability, and biocompatibility. Chitosan (CS), a natural polysaccharide obtained by deacetylation of chitin, has been used extensively as a component of a variety of pharmaceutical preparations. The aim of this work was to prepare chitosan-based glutathione-responsive particles containing disulfide bonds by an emulsion/separation method. Glutathione (GSH) is an antioxidant that prevents damage to important cellular components caused by reactive oxygen species such as free radicals and peroxides. GSH has been shown suitable for reduction of disulfide bonds of polymer nanocarriers and polymer-drug conjugates, enabling intracellular-specific drug release [3]. GSH is present in high concentrations in the hypoxic regions, such as the tumor cells. The cells generally contain majority of GSH in the cytosol at concentrations ranging from 1 to 11 mM, while the extracellular concentration is about 1000-fold less [4,5]. On the basis of the differences in the intracellular and extracellular GSH concentrations, the chitosan microparticles containing disulfide bonds can be suitable for the development of drug delivery systems responsive to GSH levels.

Materials and Methods:

Synthesis of CS-SH conjugate. EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) reacted with carboxyl groups of thiolactic acid to form active ester intermediates, which reacted with free amine groups of chitosan (MW 250000-350000) to form amide bonds [6]. Lyophilized thiolated chitosan (CS-SH) appears as a white fibrous powder easily soluble in water. The structure of CS-SH was confirmed by ^{1}H NMR in DMSO-d6 and FTIR spectroscopy.

Preparation of chitosan microparticles by emulsion-suspension polymerization. CS-SH conjugate (0.2 g) dissolved in $NaBrO_3$ aq. solution (0.1M, 10 ml) was added to sunflower seed oil (150 ml) containing Span 80 (3 g) under Ultraturrax® stirring (25000 rpm). The emulsion was kept at 60°C for 2 hours. Then, the microparticles were washed with petroleum ether, ethanol and water, and dried under vacuum for 24 h at 25ºC. Scanning electron microscopy (SEM) images were recorded in FESEM ULTRA Plus (Zeiss, USA).

Swelling. Microparticles (20 mg) were placed in 5-ml syringe fitted with a sintered glass filter, weighed, and left to swell by immersion in phosphate buffer with GSH (0, 0.1 and 5 mM) of GSH. At a predetermined time (1, 5, 8 and 24 h), the excess of water was removed by filtration at atmospheric pressure and the filter centrifuged at 3500 rpm for 5 min and weighted. The filter tare was determined after centrifugation with only water. The weights recorded at the different time intervals and the water content percent was estimated as:

$$WR\ (\%) = \frac{Ws - Wd}{Wd} \times 100$$

where *W*s and *W*d are the weights of swollen and dried microparticles, respectively.

Incorporation of methotrexate (MTX) into the microparticles. Microparticles (200 mg) were placed in 2 ml of drug solution (5 mg/ml, C_0) in phosphate buffer pH 7.4, for 3 days under stirring at room temperature. Then, the microparticles were filtered and dried under reduced pressure to constant weight. MTX remaining in the medium (C_i) was quantified by HPLC at 302 nm. The loading efficiency (LE) was estimated as:

$$LE\ (\%) = \frac{C_i - C_0}{C_i}$$

In vitro MTX release. Loaded microparticles were dispersed in phosphate buffer with GSH at 0, 0.1 and 5 mM (10 ml, 37°C). At various times, 0.150 ml were withdrawn, analyzed by HPLC and replaced with fresh medium. The experiments were done in triplicate.

Results and Discussion:

Synthesis of CS-SH conjugate. CS–SH conjugate was achieved by the covalent attachment of thiolactic acid to the amine groups of CS. Compared with the ^{1}H NMR spectrum of CS (the *N*-acetyl methyl proton of CS was at 1.95 ppm), a new resonance peak at 2.93 ppm was assigned to the side-chain methylene (CH_2SH). FTIR spectra showed that the absorption peaks of CH-SH at 1660 cm^{-1} (amide I band), 1570 cm^{-1} (amide II band) and 1386 cm^{-1} (amide III band) were stronger than those of CS, which can be attributed to the additional amide group of thiolactic acid.

Preparation of chitosan microparticles. Chitosan microparticles were obtained from an emulsion constituted by a CS-SH oxidizing solution (dispersed phase) in an oily phase. Na_2BrO_3 in the dispersed phase promoted the oxidation of the thiolic groups to disulphide bonds. SEM micrographs showed spherical particles (~10 μm) with rough surface (Figure 1).

Figure 1. SEM micrographs of the CS microparticles.

Swelling. Microparticles swelled the same in phosphate buffer without and with GSH 0.1mM (~164%). By contrast, a relevant increment in the swelling percentage was verified in GSH 5mM solution (~273%). These findings suggest that the disulfide bonds in the structure of the microparticles can be broken when the GSH concentration is above a certain threshold.

In vitro MTX loading and release. MTX was loaded in the microparticles with a loading efficiency of 73.6 %. Release experiments were conducted in phoshate buffer at pH 7.4 without and with GSH at 0.1 and 5 mM. These concentrations were chosen to mimic the GSH concentration in the extra- and intra-cellular spaces, respectively. MTX release rate resulted to be GSH concentration-dependent (Figure 2). In the first 30 min, the amount of MTX released was much higher in phosphate buffer containing GSH 5 mM than that recorded in phosphate buffer solely or containing GSH 0.1 mM.

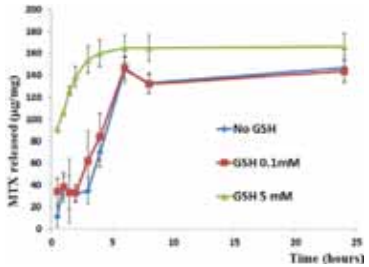


Figure 2. MTX release profiles in phosphate buffer pH 7.4 prepared with different concentrations of the reducing agent GSH.

Conclusions:

Microparticles of chitosan with disulfide bonds were readily obtained by means of an emulsion/crosslinking method that rendered spherical particles of homogeneous size (~10 μm) and that exhibit drug release dependent on the GSH concentration. Further research will be devoted to reduce the size of the particles in order to achieve intracellular-specific drug release.

References:

(1) M. Curcio, U.G. Spizzirri, F. Iemma, F. Puoci, G. Cirillo, O.I. Parisi, N. Picci, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76:48–55 (2010).
(2) C. Li, J. Madsen, S.P. Armes, A. Lewis. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45:3510-3513 (2006).
(3) R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen and Z. Zhong, *J. Control. Release*, 152:2-12 (2001).
(4) F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.* 30:1191-1212 (2001).
(5) V. Bulmus, M. Woodward, L. Lin, N. Murthy, P. Stayton, A. Hoffman, *J. Control. Release* 93:105-120 (2003).
(6) R. Jayakumar, R. L. Reis, J. F. Mano, *Drug Deliv.* 14:9–17 (2007)

Acknowledgements:

M.C. acknwoledges the support of the Regional Operative Program (ROP) Calabria ESF 2007/2013-IV Axis Human Capital-Operative Objective M2-Action D.5. Work supported by POCTEP (EU IBEROMARE), MICINN (SAF2011-22771) and FEDER.

Adipose-derived stem cells combined with biodegradable scaffolds for heart tissue engineering

P. Díaz-Herráez[1], E. Garbayo[1], B. Pelacho[2], F. Prosper[2], M.J. Blanco-Prieto[1]

[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, Spain
[2]Hematology, Cardiology and Cell Therapy, Clinica Universidad de Navarra and Foundation for Applied Medical Research, University of Navarra, Spain

Introduction: Cardiovascular diseases constitutes now a days the greatest health risk. One of the causes is the absence of an effective myocardial regeneration after ischemia. Despite pharmacological advances made in the last years, the only real option in severe cases is transplantation. A therapy that has shown promising results in myocardial regeneration is stem cell (SC) implantation, principally due to the paracrine action of the cells [1]. This mechanism consists on the secretion of angiogenic and anti-apoptotic cytokines that favors the formation of new vessels and cardiomyocytes, together with factors involved in progenitor recruitment by the cells. Among SC, adipose tissue derived SC (ADSC) have received great interest for their easy obtention from the stromal vascular fraction and because they have demonstrated an angiogenic potential [2, 3]. However, problems such as the low rate of SC survival after implantation have limited their effectiveness. It is generally accepted that this problem could be solved administering the cells into a three-dimensional structure, also known as scaffold, that provide support to the cells. Microparticles (MP) made of polilactic-co-glicolic acid (PLGA), that is a biocompatible and biodegradable polymer approved by the FDA for human use, could be used as carriers for cell transplantion.

Objective: The objective of the present work was to develop PLGA MP and engineered them with hADSCs in order to facilitate cell engraftment, paracrine secretion and differentiation into the required tissues.

Material and Methods:

MP Formulation: PLGA MP were prepared by solvent evaporation method using the Total Recirculation One-Machine System (TROMS) [4, 5]. Several device settings were adjusted to obtain microparticles of a certain size (10 µm). The following TROMS parameters were adjusted during microparticle preparation: pumping flow, recirculation times to form W_1/O and $W_1/O/W_2$ emulsions, and the inner diameter of the needle used to prepare the $W_1/O/W_2$ emulsion. MP size was characterized by laser diffractrometry using a Mastersizer.

hADSCs Culture: hADSC cells were cultured in complete medium containing α-MEM with 10% of fetal bovine serum and 1ng/mL of bFGF at a confluence of 80-90%.

Attachment of ADSCs to particles: PLGA MP were coated with three different amounts of collagen: 0.1, 1 and 10 µg/cm^2. To achieve a homogenous coating, MP were re-suspended under agitation at 37ºC for 2 h in the collagen solution. Finally, MP with a biomimetic surface of collagen were seeded with two different densities of hADSCs (200,000 and 100,000 cells) for the formation of the complexes.

Results and Discussion:

Microparticle Formulation: PLGA MP ranging from 0.9 to 24 µm were successfully prepared using TROMS (Table 1). Particle size remained unchanged after lyophilisation. Among all formulations, MP with a size of 10 µm were selected as scaffolds for the cells. This selection was made based on previous works of our group considering a balance between having sufficient surface for cells adhesion and not causing damage to the heart tissue [6, 7]. The best device settings to obtain 10 µm-MP were: flow of 24 ml/min, needles with an average diameter of 0,17 mm and recirculation times of 90 s and 60 s (Table 1).

Needles	Flow (ml/min)	Recirculation times (s)	Size (µm)
N/N	28	90/90	0,9±0,31
N/N	28	90/55	2,55±0,15
N/N	28	90/30	5,94±0,31
N/A	28	90/55	10,75±6,55
N/A	28	90/45	24,25±12,46
N/N	23	90/90	1,49±0,14
N/N	23	90/30	8,23±3,52
N/A	23	90/55	14,76±6,62
N/A	23	90/45	12,59±6,51
N/N	24	90/60	10,73±1,73
N/N	24	90/30	24,04±2,16
N/A	24	90/60	12,54±1,29

Table 1: Summary of formulations prepared using TROMS. The table shows the influence of TROMS conditions on the final MP size. The highlighted formulation corresponds to the formulation selected for the cell attachment experiments. Needles: N has an average diameter of 0.17 mm and A 0.5 mm.

The inner diameter of the needles is a critical factor determining the final size of microparticles prepared by TROMS (Table 1). A reduction in particle size was observed using the needle with the smaller diameter.

Attachment of hADSCs to PLGA particles:
The concentration of collagen needed an homogenous coating was selected considering the total surface of the particles and the adhesive properties of the cells. 0.5 mg of collagen coated PLGA MP were mixed with two densities of hADSC cells in complete medium. The attached cells were observed under the microscope after 1, 2, 3 and 4 h. The best complex were obtained seeding 200,000 hADSCs in MP coated with 0,1 µg/cm^2 of collagen (Figure 1).

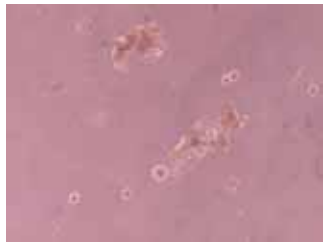


Figure 1: PLGA MP scaffold carrying ADSCs. Bright field microscopy image of ADSC adhered to PLGA-MPs coated with collagen after 2 hours of adhesion.

Presently, cytokines influenced in heart tissue regeneration (i.e. neureguline), are being loaded into the developed MP to combine the three elements of the tissue engineering triad in the same therapeutic approach.

Conclusion: A biodegrable and biocompatible PLGA MP scaffold able to carry ADSC cells to the site of injury has been prepared confirming that PLGA MP may be exploited in cardiovascular regenerative medical applications.

References:

1. M. Mirotsou, T.M. Jayawardena, J. Schmeckpeper, M. Gnecchi, V.J. Dzau, Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in th heart, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 50 (2011) 280-289.
2. A. Efimenko, E. Starostina, N. Kalinina, A. Stolzing, Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning, Journal of Translational Medicine (2011) 9:10.
3. M. Mazo, V. Planat-Bénard, G. Abizanda, B. Pelacho, B. Léobon, JJ. Gavira, I. Peñuelas, A. Cemborain, L. Pénicaud, P. Laharrague, M. Collantes, J. Barba, L. Casteilla, F. Prosper, Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction, Eur J Heart Fail, 10 (2008) 454-62.
4. E. Garbayo, C.N. Montero-Menei, E. Ansorena, J.L. Lanciego, M.S. Aymerich, M.J. Blanco-Prieto, Effective GDNF brain delivery using microspheres—A promising strategy for Parkinson's disease, Journal of Controlled Release 135 (2009) 119–126.
5. G. del Barrio, F.J. Novo, J.M. Irache, Loading of plasmid DNA into PLGA microparticles using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): evaluation of its integrity and controlled release properties, J. Control. Release 86 (1) (2003) 123–130.
6. F.R. Formiga, E. Tamayo, T. Simon-Yarza, B. Pelacho, F. Prosper, M.J. Blanco-Prieto, Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems, Heart Fail Rev, 17 (2012) 449-473.
7. F.R. Formiga, B. Pelacho, E. Garbayo, G. Abizanda, J.J. Gavira, T. Simon-Yarza, M. Mazo, E. Tamayo, C. Jauquicoa, C. Ortiz-de-Solorzano, F. Prosper, M.J. Blanco-Prieto, Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model, J Control Release, 147 (2010) 30-37.

Acknowledgements: Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra, FUN, CAN, Juan de la Cierva Program.

LA ADMINISTRACION INTRATUMORAL DE BETA LAPACHONA DIMINUYE EL TAMAÑO TUMORAL Y ELIMINA LA TOXICIDAD SISTEMICA

P. Díaz-Rodríguez[1], S. Seoane[2], J. Sendon-Lago[2], R. Gallego[3], R. Pérez-Fernández[2], M. Landin[1]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, España.

[2]Dpto de Fisiología-Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, España.

[3]Dpto de Ciencias Morfológicas, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Introducción: La limitada efectividad de la administración quimioterápica sistémica conduce al empleo de dosis elevadas durante los tratamientos, ya que solo una pequeña fracción del fármaco alcanza el tumor y realiza su efecto terapéutico. Además, una importante cantidad de fármaco se distribuye a otros órganos y tejidos sanos generando efectos no deseados (1). La administración local en forma de sistemas intratumorales se presenta pues como una atractiva alternativa a la hora de favorecer el éxito terapéutico y disminuir la toxicidad. La beta-lapachona (βLap) es una naftoquinona natural cuya actividad antitumoral ha sido ampliamente demostrada. Sin embargo, no es una excepción en cuanto a la elevada toxicidad sistémica que se produce tras su administración (2) por lo que el desarrollo de formulaciones intratumorales que incluyan este fármaco está justificado. En un trabajo previo hemos estudiado la interacción entre los componentes de formulaciones ternarias inyectables y termosensibles (Pluronic-βLap-RMβCD) capaces de generar sistemas depot en el interior del tumor con perfiles de cesión de fármaco controlados. La modelización mediante redes neurales artificiales de la composición de estos sistemas, junto a la optimización mediante algoritmos genéticos ha permitido seleccionar una formulación con las propiedades *in vitro* adecuadas para administración intratumoral (3). En este estudio hemos evaluado la capacidad del sistema ternario optimizado para disminuir el tamaño tumoral *in vivo* en tumores de mama inducidos por inyección de células MCF-7, así como la posible toxicidad sistémica tras su implantación.

Materiales y Métodos: La composición de la formulación se obtuvo mediante la modelización y posterior optimización de los parámetros: temperatura de gelificación, capacidad de solubilización de fármaco y constante de liberación en función de la composición ternaria del sistema utilizando redes neuronales artificiales y algoritmos genéticos (3). El sistema optimizado de composición (19.2% PF127 y 7% RMβCD) cargado y sin cargar con fármaco se caracterizó en cuanto a capacidad de solubilización de β-Lap, propiedades reológicas y perfil de cesión de fármaco en PBS usando células de difusión horizontales. La actividad antitumoral de la formulación, así como el posible efecto sinérgico del Pluronic fueron evaluados frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Para ello se ha estudiado la proliferación celular mediante un kit comercial (MTT), a los 2 y 4 días después del tratamiento. La apoptosis celular se estudió mediante citometría de flujo usando el kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC (BD Biosciences) y Western blot. La efectividad antitumoral del sistema fue evaluada *in vivo* usando ratones homocigotos para la mutación combinada severa de deficiencia inmune espontánea (SCID) a los que se le ha inducido un tumor mamario mediante la inyección subcutánea de células MCF-7 transfectadas con el vector luciferasa-pcDNA3, con el fin de estudiar la evolución del tamaño tumoral por luminiscencia. Quince días después de la inducción del tumor se administraron dosis (14.17 βLap (μg)/peso ratón (g)) del sistema intratumoral cada 5 días. La toxicidad hepática y renal, así como la apoptosis tumoral se evaluaron mediante inmunohistoquímica.

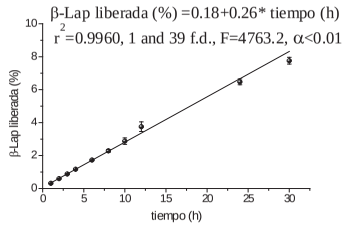


Figura 1. Perfil de cesión de β-Lap *in vitro* a partir del sistema optimizado

Resultados y discusión: La formulación óptima es líquida a temperatura ambiente, presenta una temperatura de gelificación de 29ºC y solubiliza 1.90 ± 0.05 mg de β-Lap por ml, que a 37ºC se cede de forma controlada (Figura 1). Estas propiedades la hacen adecuada para una posible administración intratumoral. Ni el Pluronic ni la ciclodextrina modifican su actividad antitumoral como lo demuestran los resultados de proliferación celular y apoptosis.

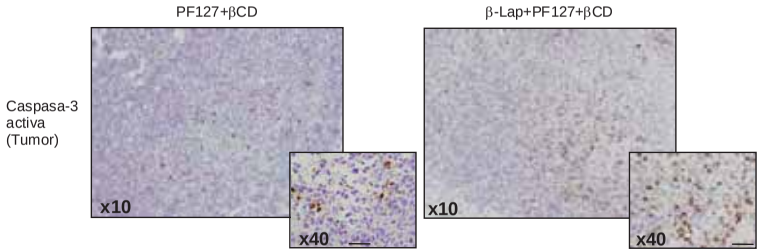


Figura 2. Detección inmunohistoquímica de la expresión de caspasa-3 activa en tumores representativos de los ratones tratados con la formulación no cargada (izquierda) y cargada con fármaco (derecha).

La elevada hidrofobicidad del fármaco favorece su transporte pasivo a través de la membrana celular lo que explica que no se observe ningún efecto del Pluronic sobre la actividad antitumoral. Así mismo, la formulación optimizada cargada con β-Lap muestra un elevado nivel de apoptosis celular, incrementándose los valores de caspasa-3 activa y disminuyendo los de pro-caspasa-3, mientras que con el sistema sin cargar no se observa la presencia del factor apoptótico, caspasa-3 activa.

Las diferencias en el tamaño tumoral entre tumores tratados con el sistema cargado de fármaco y el no cargado fueron estadísticamente significativas a partir del día 15 de tratamiento. Como se desprende de los cortes histoquímicos de los tumores extraídos para ambos casos (Figura 2), la actividad proapoptótica del fármaco se mantiene *in vivo* mostrándose un marcado incremento de la muerte celular (células teñidas de marrón) en los tumores tratados con la formulación optimizada cargada.

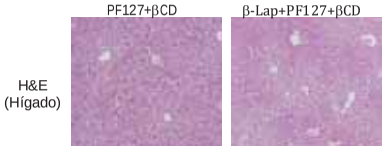


Figure 3. Tinciones hematoxilina y eosina (H&E) de tejido hepático de ratones tratados con la formulación no cargada (izquierda) y cargada con fármaco (derecha).

La figura 3 muestra los cortes histológicos correspondientes al tejido hepático de los ratones tratados con la formulación no cargada y cargada con fármaco. Como puede apreciarse, no se observan diferencias en cuanto a la estructura del tejido, lo que implica ausencia de toxicidad. De la misma manera los cortes correspondientes al tejido renal tampoco mostraron anomalías, de lo que se deduce que la actividad del fármaco se realiza de forma local y la formulación no presenta toxicidad sistémica.

La formulación de β-Lap diseñada y optimizada mediante redes neurales artificiales y algoritmos genéticos se presenta como una alternativa interesante para el tratamiento de tumores sólidos ya que, es fácilmente inyectable, gelifica a temperatura corporal y es capaz de liberar una elevada dosis de fármaco localmente y por un período de tiempo prolongado. Este sistema presenta actividad antitumoral *in vitro*, incrementando significativamente la muerte de células de cáncer de mama MCF-7. Su actividad se mantiene *in vivo* disminuyendo de manera significativa el tamaño tumoral y promoviendo la apoptosis tumoral sin que se observe síntomas de toxicidad sistémica.

Referencias:

(1) E.P. Goldberg et al. Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery. J. Pharm.Pharmacol 2002; 54: 159-180.

(2) E. Rodrigues de Almeida et al. Toxicological assessment of beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. Phytother. Res. 2009; 23: 1276-1280.

(3) P. Díaz-Rodríguez, M. Landin. Smart design of intratumoral thermosensitive β-lapachone hydrogels by Artificial Neural Networks. Int.J.Pharm. 2012; 433: 112-118.

(4) F. Wang,et al.. Modulating β-lapachona release from polymer millrods through cyclodextrin complextion. J. Pharm. Sci. 2006;95(10): 2309-2319.

Agradecimientos:

Este estudio ha sido financiado por la Xunta de Galicia (PGIDIT04BTF203011PR) y el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2012- 39878-C02-01) P.D-R (AP2010-1913) agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte su financiación mediante la beca FPU.

SISTEMAS CERAMICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE VEGF: INFLAMACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

P. Díaz-Rodríguez[1], P. González[2], J. Serra[2], M. Landin[1]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, España.
[2]Departamento de Física Aplicada. E.T.S.E. Industriales. Universidad de Vigo, España.

Introducción:
La vascularización es un proceso clave en la osteointegración de las prótesis ya que facilita la llegada de nutrientes, oxígeno, factores solubles y células al tejido en formación (1). La incorporación de factores de crecimiento, adhesión y transcripción en sistemas implantables y su posterior liberación de forma controlada debe facilitar la recuperación de la función ósea (2). Una de las alternativas más prometedoras a la hora de desarrolla una nueva prótesis es la de incorporar factores de crecimiento angiogénicos que favorezcan la formación de nuevos vasos y faciliten la recuperación de un tejido funcional. Entre ellos, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es de los más utilizados (3). El mecanismo de señalización intercelular de los receptores de VEGF promueve, además, un incremento de la masa ósea y facilita la restauración de la función del tejido debido a la correlación existente entre osteogénesis y angiogénesis (4). Las cerámicas de carburo de silicio biomórfico (bioSiCs) se fabrican mediante un sencillo procedimiento a partir de recursos naturales, manteniendo la microestructura jerárquica biológica del material de origen. Presentan una porosidad y tamaño de poro dependientes de la madera de partida y un módulo de Young similar al del hueso.
En este trabajo se evaluó la carga y cesión de diferentes bioSiCs con VEGF. La biocompatibilidad y la actividad biológica de estos sistemas se evaluó utilizando cultivos de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de médula ósea.
Materiales y Métodos: Los bioSiCs se fabricaron a partir de madera de pino (*Pinus pinnaster*), roble (*Quecus robur*) y sapelli (*Entandrophagma cylindricum*). La carga de los sistemas con 380ng de rhVEGF (PrepoTech) se llevo a cabo mediante la adicción volumétrica de una solución de proteína en PBS y 0.1% de seroalbúmina bovina (BSA). Los perfiles de cesión de VEGF se obtuvieron en PBS (pH 7.4) con agitación constante y en medio de cultivo a 37ºC en presencia de células. La cuantificación de VEGF se realizó mediante ELISA (RayBiotech). Las células madre mesenquimales se obtuvieron generando un gradiente con Ficoll (5), a partir de médula ósea donada por el servicio de Ortopedia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. La respuesta celular a los bioSiC se estudió mediante el análisis de la proliferación celular (MTT) y apoptosis (caspasa-3). Se evaluó la inflamación producida y la posible diferenciación celular mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los genes que codifican para el TNF-α, el receptor 1 de VEGF, la ALP y el GAPDH.
Resultados y Discusión: La figura 1 muestra el perfil de liberación de VEGF en PBS con 0.1% de BSA con el fin de evitar la degradación del factor de crecimiento. Como se desprende de los resultados experimentales, se consigue una cesión prolongada del factor de crecimiento durante los cinco primeros días de ensayo sin que se observe una brusca liberación inicial. Tras este tiempo la cantidad de proteína cuantificada por ELISA se reduce posiblemente debido a la degradación del factor de crecimiento. Este fenómeno no se observa cuando la liberación se realiza en el medio de cultivo en el que probablemente, la estabilidad de la proteína se vea favorecida.

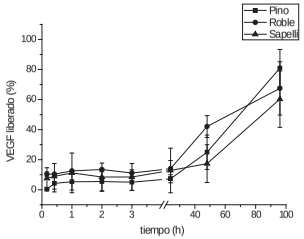


Figura 1. Perfil de liberación de VEGF en PBS pH 7.4 con agitación oscilante.

Los resultados de proliferación celular no muestran diferencias significativas entre los BioSiCs cargados con VEGF y los no cargados. Lo mismo ocurre cuando se comparan cultivos de células madre mesenquimales en medios con VEGF y sin VEGF, lo que indica que la presencia del factor VEGF no favorece la proliferación celular de las células madre mesenquimales, ni cuando se encuentra adsorbido en la superficie cerámica ni cuando se incorpora en forma de solución.
La evaluación de la apoptosis se ya ha llevado a cabo cuantificando los niveles de caspasa-3, una enzima proteolítica, clave en fase final del proceso de apoptosis (4). Como se puede observar en la figura 2, los niveles de apoptosis en las muestras no son significativamente más elevados que los del control negativo (células cultivadas sobre pocillo) y control positivo (células en presencia de la misma dosis de VEGF pero en el medio de cultivo).

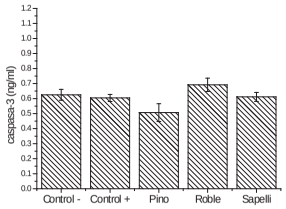


Figura 2. Niveles de caspasa-3 obtenidos tras 48 horas de cultivo El control negativo se corresponde a células cultivadas con medio de cultivo solo y el control positivo a células cultivadas con medio de cultivo enriquecido con VEGF.

La potencial diferenciación de las células madre a células endoteliales vasculares y su efecto sobre una posterior diferenciación hacia osteoblastos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Se seleccionó como gen control el GADPH (6). La expresión de uno de los receptores de VEGF específicos de células endoteliales sanguíneas (receptor1 de VEGF; VEGFR-1) (4) se cuantificó en función del control positivo (expresión de VEGFR-1 de células con 380ng de VEGF en el medio de cultivo) a los 5 días de acuerdo con el método ΔCt (6).
Los resultados experimentales (Figura 3) indican que la liberación sostenida de VEGF a partir de los bioSiCs promueve de manera satisfactoria la diferenciación hacia células endoteliales. Además, la adicción del factor de crecimiento en forma de solución no favorece la diferenciación (nivel de expresión 1) mostrando niveles de expresión similares a los del control negativo.
Los resultados de expresión de TNF-α, cuya presencia al igual que la IL-1β favorece la resorción ósea e induce la diferenciación hacia osteoclastos, no muestran valores estadísticamente diferentes a los del control negativo, lo que indica que los discos de carburo de silicio cargados no inducen una respuesta inflamatoria en las células madre mesenquimales.
La inducción hacia osteoblastos se evaluó mediante la cuantificación de la expresión de un gen asociado a osteoblastos, la fosfatasa alcalina (ALP). De acuerdo con los resultados obtenidos la expresión de ALP tras 10 días de cultivo tanto en las células cultivadas con VEGF en el medio como las cultivadas en presencia de bioSiC presenta el mismo nivel de expresión que el control negativo, lo que indica que no se induce la diferenciación a osteoblastos.

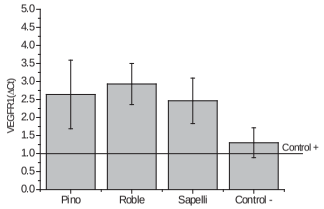


Figura 3. Niveles de expresión de VEGFR1 normalizados en función de la expresión del control positivo.

Todos los bioSiCs producidos incorporan y liberan de manera controlada VEGF, con adecuada respuesta celular y sin diferencias significativas entre ellos. Estos materiales cargados inducen la diferenciación de células madre mesenquimales a células vasculares, no provocan alteración significativa en los marcadores de inflamación pero tampoco facilitan su diferenciación a osteoblastos.

Referencias:
(1) E. Wernike et al. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo, European Cells and Materials 19: 30-40 (2010).
(2) J.R. Porter et al., Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies, Biotechnol. Prog. 25 (6): 1539-1560 (2009).
(3) M. Bahramsoltani et al., Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF-2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay, Clinical Hemorheology and Microcirculation 46. 189–202 (2010)
(4) Bilezikian et al., Principles of bone biology. Academic Press in Elsevier 237-261; 1133-1143 (2008).
(5) Chang et al., The Efficiency of percoll and ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential, Chang Gung Med J 32: 264-275 (2009).
(6) H.D. VanGuilder et al., Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, BioTechniques 44 (5): 619-626 (2008).

Agradecimientos:
Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FEDER POCTEP0330IBEROMARE1. P.D-R (AP2010-1913) agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte su financiación mediante la beca FPU. Agradecemos la colaboración de R. Couceiro en el suministro y manipulación de las células madre mesenquimales.

APLICACIÓN DE LA ICH Q8 A LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA: ESPACIO DE DISEÑO.

W. Rezquellah[1], E. García-Montoya[1-2], P. Pérez-Lozano[1,2], A. Fàbregas[1,2], C. Carrillo[2], J.M. Suñé - Negre[1-2], J.R. Ticó[1-2] , M. Miñarro[1-2]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Barcelona, España
[2]Servicio de Desarrollo del Medicamento, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España

Introducción:
La validación de la limpieza es un tema de cumplimiento imprescindible en el entorno GMP de fabricación de medicamentos y más aún en una planta piloto donde se desarrollan productos en investigación (PEI) que pudieran llegar a formar parte de un ensayo clínico. Los factores particulares de la producción de medicamentos en una planta piloto (equipos multiproducto, diferentes principios activos con distintas propiedades físico-químicas o toxicológicas o de seguridad, fórmulas nuevas no repetitivas, lead time de desarrollo, etc.) hacen que la operación de limpieza en la planta piloto se haya tomado como una consigna fundamental a cumplir para poder asegurar la calidad de los productos elaborados, la ausencia de contaminación cruzada y una demostración de la consistencia del proceso de limpieza y por ende de fabricación (Ref. 1-3).

Materiales y Métodos:
Con el fin de determinar el método óptimo de limpieza de los equipos de fabricación en la planta piloto SDM, se ensayaron varios procedimientos de limpieza utilizando diferentes condiciones basadas en cuatro factores principales: la temperatura, la concentración del detergente, tiempo de contacto del detergente sobre la superficie y la acción mecánica o el frotado (tabla 1). Estos factores se dedujeron a partir de los métodos de limpieza utilizados en la planta piloto. Para determinar las condiciones se llevó a cabo un diseño de experimentos (DoE) para deducir las interacciones y factores principales que pudieran resultar significativos en la operación.

Factor	Nivel Inferior	Nivel Superior
Detergente (%)	0,0	10,0
Tiempo de contacto (min)	0,0	10,0
Temperatura (ºC)	34,0	70,0
Acción mecánica (min)	0,0	1,0

Tabla 1. Factores principales del procedimiento de limpieza bajo estudio.

El equipo utilizado para la validación se dedujo a partir del análisis de riesgos previo realizado con todos los equipos de la planta piloto: máquina de compresión RIVA (8 punzones).

Para el análisis del equipo se escogieron 8 puntos que se consideraron críticos, incluyendo 3 accesibles y 5 de acceso difícil. Para ello se utilizó una plantilla de 25 cm^2, para aquellos puntos que tenían un tamaño y forma adecuados, para el resto se muestreó por completo la superficie (figuras 1 y 2).

Figura 1. Pieza de apertura (5,5 cm^2)

Figura 2. Placa de protección (25 cm^2)

Para cada muestreo, se utilizaron 2 *swabs* tipo Texwipe75, el primero mojado en solución y el segundo seco, siguiendo el patrón que se muestra en figura 3.

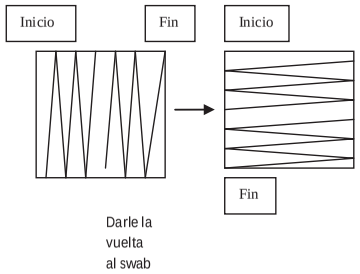


Figura 3. Esquema del procedimiento de muestreo de residuos.

La respuesta estudiada fue el nivel de residuos del API indicador que se calculó previamente (4). La especificación se calculó utilizando el criterio del umbral de preocupación toxicológica (5) y el resto de métodos habituales (6-8), con lo cual el límite a cumplir fue 0,4 µg/cm2. El análisis se realizó por HPLC (4).

Resultados y Discusión:
El grafico de Pareto (Figura 4) obtenido mediante el programa estadístico *Statgraphics* mostró que ningún factor afectaba significativamente a la cantidad de residuos remanentes, aun así el factor más importante para retirar los residuos fue la combinación (CD) de temperatura (C) y acción mecánica (D) y de los factores individuales el (B) tiempo de contacto.

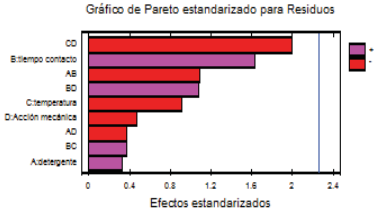


Figura 4. Efectos estandarizados.

Concretamente el tiempo de contacto (B) influye positivamente en el resultado, es decir a mayor tiempo de contacto, más residuo se detecta lo cual es lógico, al resecarse el residuo resulto más difícil de retirar. En el caso de temperatura y acción mecánica la situación es opuesta: combinando los dos factores en su nivel alto podemos obtener menos residuos.

En la Figura 5 se relacionan los dos factores, tiempo de contacto y concentración del detergente: vemos que la menor cantidad de residuos se encuentra cuando menor concentración de detergente y menor tiempo de contacto, es decir si se limpia inmediatamente.

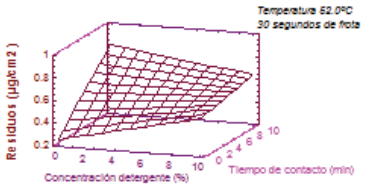


Figura 5. Residuo según la variación de dos factores: la concentración del detergente y la acción mecánica.

Como conclusión, puede decirse que, aunque no haya ningún factor que influya significativamente en el nivel de residuo, según el programa de tratamiento estadístico de datos *Statgraphics*, se ha podido optimizar el método de limpieza, y el método óptimo recomendado es el mostrado a continuación:

Factor	*Nivel*
Detergente (%)	5,0
Tiempo de contacto (min)	0,0
Temperatura (ºC)	67,0
Acción mecánica (min)	1,0

Estas condiciones se han probado sobre tres equipos diferentes y se han muestreado sus puntos críticos para los API con los que se estaban trabajando, y se ha obtenido un resultado de apto para todos ellos. Con lo cual queda establecido el procedimiento general para la limpieza de los equipos del SDM.

Referencias:
(1) Taruna Arora, et al. Quality by design for biotechnology products – Part 1. Biopharm International. Volume 22, Issue 11 (visto el día 03/08/2012).
(2) Rezkellah, W.; García-Montoya, E.; Pérez-lozano, P.; Suñé-Negre, J.M; Miñarro, M; Ticó, J.R. Applying quality management to cleaning validation. GMP Reviews. 2011; 10 (2): 10 – 13.
(3) Rezkellah, W.; García-Montoya, E.; Pérez-lozano, P.; Suñé-Negre, J.M.; Miñarro, M.; Ticó, J.R. GMPs for the 21st century and claning validation. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences. 2011; 16 (3): 78-83.
(4) Validación de limpieza de equipos de fabricación en una planta piloto universitaria. Póster, Congreso SEFIG, Madrid 2011 Febrero 2-4.
(5) Dolan, D. G. et al. "Application Of The Threshold Of Toxicological Concern Concept to Pharmaceutical Manufacturing Operations", Regulatory Toxicology and Pharmacology 43, 1-9 (2005).
(6) Forsyth. Cleaning validation: Factors affecting recovery data and material of construction grouping. Journal of validation technology Autumn 2009; 15, 4; proQuest Health and Medical complete pg.91.
(7) Forsyth, O'Neill, Hartman. Material of construction based on recovery data for cleaning validation. Pharmaceutical Technology. (October 2007) .
(8) Richard J. Forsyth. Equipment Hold- Time for cleaning validation. Pharmaceutical technology. (Dec 20, 2007).

EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN EN EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (SLN™)

A. Fàbregas[1,2], M. Miñarro[1,2], J.M. Suñé-Negre[1,2], J.R. Ticó[1,2], E. García-Montoya[1,2], P. Pérez-Lozano[1,2], R. Sarrate[2], N. Sánchez[2], C. Carrillo[2]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Barcelona, España
[2]Servicio de Desarrollo del Medicamento, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España

Introducción: Las SLN™ constituyen un sistema coloidal de tipo emulsión o/w para uso como vectores no virales en vehiculización de fármacos y/o ácidos nucleicos. Están compuestas de lípidos en estado sólido a temperatura fisiológica, los cuales deben tener el estatus de lípidos G.R.A.S. (*Generally Recognized As Safe*). El tamaño máximo para su endocitosis por células diana está alrededor de los 150 nanómetros de diámetro. En el caso de vehiculización de ácidos nucleicos, estos pueden quedar insertados en el interior del lípido o lípidos matriciales, o unidos en superfície, por lo que es necesario escoger el lípido adecuado que permita, o bien su liberación controlada en la célula diana en el primer caso, o evitar la opsonización, degradación enzimática o unión inespecífica a proteínas plasmáticas, en el segundo. En cualquier caso, es necesario un lípido catiónico, es decir, con carga positiva, que permita la unión de DNA o RNA, de carga negativa, mediante interacción electrostática. En el caso que se presenta, las SLN™ se proponen como eventuales transportadores de ácidos nucleicos. Se compara el tamaño de partícula obtenido usando como matriz lipídica Compritol® 888 ATO (glicerol behenato) y Ácido Esteárico. Se ha utilizado el método de la microemulsión en caliente para su obtención. La estructura e interacción entre los diferentes lípidos debe evaluarse para conocer en qué grado pueden ser determinantes para el tamaño de partícula obtenido, y por lo tanto en su eventual capacidad para transfectar eficientemente células diana.

Materiales y Métodos:
Compritol® 888 ATO (Gattefossé), Ácido Esteárico de origen vegetal (Merck), Octadecilamina (Acros), Lutrol® 68 (Basf), Agua ultrapura (Millipore).
Las SLN™ se obtienen por medio del método de la microemulsión en caliente. La composición en lípidos constituye un 4% del producto final. El componente de la matriz lipídica (Compritol® 888 ATO o Ácido Esteárico) se calienta unos 10 ºC por encima de su punto de fusión. Se procede de forma análoga para el lípido catiónico (Octadecilamina), mezclándolo con Lutrol® F68 (óxido de polipropileno) como tensiactivo no iónico, y el agua ultrapura. El Compritol® 888 ATO o Ácido Esteárico, según el caso, se vierten, una vez fundidos, sobre el resto de componentes, y la mezcla se agita mecánicamente para formar una emulsión. Posteriormente, se vierte en agua fría (2-3ºC) y se agita de forma mecánica, formándose las SLN™. Estas se concentran y purifican mediante centrifugación y filtrado, respectivamente.
El tamaño de partícula se analiza por triplicado para cada lote, mediante difracción láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments), y se expresa como diámetro medio (D [3,2]) en nanómetros (nm).

Resultados y Discusión: Los resultados de determinación del tamaño de partícula para las SLN™ fabricadas con Compritol® 888 ATO y Ácido Esteárico como matrices lipídicas se muestran en la tabla 1.

LÍPIDO	TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm) D[3, 2]
Compritol® 888 ATO	122
Ácido esteárico	129

Tabla 1. Diámetro medio de las nanopartículas obtenidas con los diferentes lípidos.

El valor de diámetro medio obtenido indica un mayor tamaño de partícula en el caso del Ácido Esteárico. Si se desglosa el intervalo entre 50 y 300 nm en diferentes tramos se obtiene el porcentaje de nanopartículas en cada uno de ellos, tal como se muestra en la tabla 2. Su representación gráfica se muestra en la Figura 1.

Distribución según tamaño	Compritol® ATO 888	Ác. Esteárico
50-100 nm	27%	26%
100-150 nm	26%	24%
150-200 nm	15%	14%
200-300 nm	15%	13%

Tabla 2. Resultados para el tamaño de partícula para los dos lípidos, representados como el porcentaje para cada tramo respecto del total de producto obtenido.

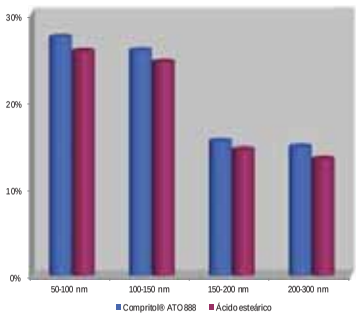


Figura 1. Porcentaje de SLN™ fabricadas utilizando Compritol® 888 ATO y Ácido Esteárico, para intervalos de tamaño de partícula.

Para las nanopartículas obtenidas en cada intervalo de tamaño, el mayor porcentaje lo forman aquellas comprendidas entre 50 y 100 nm, ligeramente por encima del porcentaje de nanopartículas entre 100 y 150 nm, tanto para el Compritol® 888 como para el Ácido Esteárico.
El resultado es compatible con la necesidad de conseguir SLN™ no mayores de 150 nm, pues la mayor proporción de SLN™ se encuentra en el rango adecuado. Si se representan los resultados de nanopartículas obtenidas entre 50-300 nm tal como se muestran en la figura 2, aparece un perfil acampanado y simétrico, a modo de distribución gaussiana. El intervalo que comprende nanopartículas entre 120 y 138 nm incluye el porcentaje más elevado para los dos lípidos (8,73%), aunque el Compritol® 888 ATO se ve ligeramente favorecido en cuanto al porcentaje obtenido respecto del total de producto.

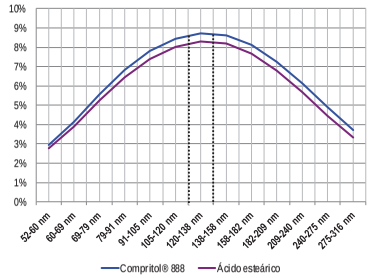


Figura 2. Distribución del tamaño de partícula en porcentaje, dentro del intervalo de 50-300 nm de diámetro. Las líneas discontinuas incluyen el tramo de tamaño con el mayor porcentaje en nanopartículas.

Para comprobar si la diferencia en tamaño medio de partícula es significativa entre ambos lotes, se realiza un contraste de hipótesis partiendo de los datos de la tabla 1.
Puesto que el valor-P para la prueba (0,0128) es menor que el nivel de significación (0,05), se concluye que existe diferencia estadísticamente significativa entre un lote y otro con un 95,0% de nivel de confianza.
Así, en función de los resultados, es más favorable la utilización de Compritol® 888 ATO como matriz lipídica para la fabricación de SLN™ en cuanto a la obtención de nanopartículas de menor tamaño, puesto que posteriormente se deberá tener en cuenta que el diámetro medio aumentará por la adición de la molécula de DNA/RNA, aunque este incremento dependerá básicamente del número de bases de la secuencia nucleotídica.

Referencias

(1) H. Bunjes. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2011:16:405-411.
(2) P. Ekambaram et al. Solid lipid nanoparticles: a review. Scientific Reviews and Chemical Communications. 2012:2(1):80-102.
(3) D.J. Gary et al. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery (Review). Journal of Controlled Release. 2007:121:64-73.
(4) P. Severino. Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. Journal of Drug Delivery. Vol 2012. Article ID 750891. 10 pages.
(5) E. Vighi et al. Re-dispersable cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors. Characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007:67:320-328.

CARACTERÍSTICAS FARMACÉUTICAS DE EMULSIONES TÓPICAS DE ROMERO

Beatriz Conde Valentín[1,3], Amalia Mª Rodríguez Bayón[1,2], Carmina Rodríguez Fernández[3], Mª Elvira Franco Gil[1]
1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. 2. Grupo de Biotransformaciones.
3. Departamento de Microbiología II.
Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid (España)
beatrizconde@pdi.ucm.es; amalia@farm.ucm.es; carmina@farm.ucm.es; elvirafg@farm.ucm.es

Introducción

Actualmente, existe un interés creciente sobre el uso de compuestos naturales que muestran actividad antioxidante y conservante. Los polifenoles obtenidos de diferentes plantas se encuentran entre estos compuestos de origen natural, y muestran unas excelentes propiedades antioxidantes y antimicrobianas [1]. Entre esas plantas, una de las que muestran mayor interés debido, a su elevado contenido en polifenoles, es el *Rosmarinus officinalis* L. [2- 4].

La oxidación lipídica y el crecimiento microbiano, en los productos farmacéuticos y cosméticos, puede conllevar: a) alteraciones de sus características organolépticas, b) cambios en la estabilidad de los preparados, y c) pérdida de su actividad farmacológica o cosmética, debido a alteraciones de sus componentes activos.

Objetivos

1) Incorporar un extracto acuoso liofilizado de *Rosmarinus officinalis* L. en dos emulsiones O/A de aplicación tópica. 2) Comparar las características organolépticas de ambas emulsiones. 3) Estudiar la liberación de dicho extracto desde las dos emulsiones.

Materiales y Métodos

Extracto liofilizado de Rosmarinus officinalis L.

El extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* L. liofilizado utilizado en este trabajo es un polvo amarillo-anaranjado de baja densidad y elevada solubilidad acuosa, que debe protegerse de la luz debido a su carácter fotosensible.

Dicho extracto de romero (ER) fue obtenido a partir de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. por secado, pulverización, suspensión en agua miliQ estéril, calefacción y filtración [5]. Tras su liofilización fue almacenado a -20ºC., resguardado de la luz, hasta su uso.

Formulaciones que contienen el extracto de Rosmarinus officinalis L. liofilizado

El ER se formuló en dos emulsiones O/A (F1 y F2) de aplicación tópica. La composición de la formulación 1 (F1) es: Vaselina filante (40%), Tefosé 1500®(10%), Tween 80® (5%), ER (1%) y agua destilada (c.s.p. 100%). La formulación 2 (F2) está compuesta por: Vaselina líquida (8%), Labrafil 1944 cs® (3%), Tefosé 63® (15%), ER (1%) y agua destilada (c.s.p. 100%). El extracto liofilizado (ER), previamente reconstituido en agua destilada hasta una concentración de 300 mg/mL, fue incorporado en la fase acuosa de cada emulsión. Las emulsiones se elaboraron siguiendo un procedimiento estandarizado de temperatura y agitación [6].

Estudios "in vitro" de liberación del extracto de Rosmarinus officinalis L.

Se investigó la liberación "i*n vitro*" del extracto de romero desde cada una de las emulsiones O/A. Para cada formulación se realizó un ensayo a 37ºC, utilizando tres celdas de difusión (superficie = 10,75 cm^2). En cada celda se colocaron 10 g de emulsión, como fase dadora. Separando esta fase de la aceptora (150 mL de solución amortiguadora fosfato-citrato pH 5,5) se colocó una membrana de celofán. Se mantuvieron las condiciones "sink" mediante agitación constante a 100 rpm. Se tomaron 18 muestras no repuestas (1 mL/muestra) de la solución aceptora a lo largo de las 3 horas de duración del ensayo. El ER liberado se cuantificó por espectrofotometría UV (λ=279 nm).

Resultados y Discusión

Estudio de las características organolépticas

Se estudiaron las características organolépticas de las dos formulaciones y se procedió a su comparación.

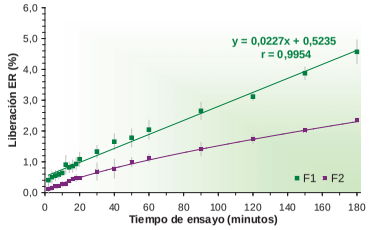
Formulación 1: La emulsión presenta un ligero color amarillento, olor dulzón, tipo "campestre". Es bastante fluida, de fácil extensión, con cierta textura oleosa y, al aplicarla, deja una sensación algo pegajosa. Su aspecto es homogéneo.

Formulación 2: Ésta, presenta ligero color amarillento, algo más brillante que la formulación 1. Mismo olor dulzón, tipo "campestre". Es ligeramente fluida, aunque más consistente que la formulación 1. Se extiende fácilmente, pero tarda bastante tiempo en dejar de apreciarse en el lugar de aplicación, dejando un ligero residuo blanquecino. También presenta un aspecto homogéneo.

Estudios de liberación "in vitro"

Formulación 1: El porcentaje de extracto liberado desde cada formulación, frente al tiempo de ensayo (minutos) se representa en la **figura 1**. Puede observarse que, al final del ensayo, la formulación 1 ha liberado el 4,57% del ER en ella contenido.

Figura 1: *Porcentaje de liberación "in vitro" del ER desde ambas formulaciones (F1 y F2)*



Las ecuaciones obtenidas al ajustar los datos de liberación a las cinéticas de orden cero, Peppas e Higuchi se muestran en la **tabla 1**. Como puede apreciarse, el mejor ajuste corresponde a la cinética de orden cero (r = 0,9954) liberándose el extracto a una velocidad constante de 23 μg/min.

Tabla 1: *Cinéticas de liberación del ER desde la formulación 1.*

	Cinética de orden cero (min; %)	Cinética de Peppas (min; mg)	Cinética de Higuchi ($min^{1/2}$; mg/cm^2)
Ecuación	y = 0,0227x + 0,5235	$y = 0,0020x^{0,5659}$	y = 0,0315x – 0,0355
Coeficiente de correlación (r)	0,9954	0,9872	0,9888

Formulación 2: Permitió la liberación de 2,35% del extracto incorporado en la emulsión (**figura 1**). Los datos de liberación del extracto ER se ajustaron a las cinéticas de orden cero, Peppas e Higuchi. Las ecuaciones de estos ajustes se muestran en la **tabla 2**. Como se puede observar, la cinética de Peppas permite el mejor ajuste (r = 0,9951). Al cabo de las tres horas de duración del ensayo, la cantidad liberada acumulada normalizada por la cantidad inicial fue de 0,024 mg (**figura 2**).

Figura 2: *Liberación "in vitro" del ER desde la formulación 2. Cinética de Peppas.*

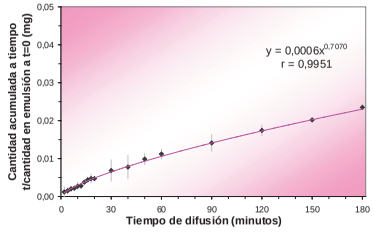


Tabla 2: *Cinéticas de liberación del ER desde la formulación 2.*

	Cinética de orden cero (min; %)	Cinética de Peppas (min; mg)	Cinética de Higuchi ($min^{1/2}$; mg/cm^2)
Ecuación	y = 0,0126x + 0,2035	$y = 0,0006x^{0,7070}$	y = 0,0190x – 0,0309
Coeficiente de correlación (r)	0,9912	0,9951	0,9948

Conclusiones

1. Las formulaciones y el proceso de elaboración propuesto permiten la incorporación del extracto acuoso liofilizado de *Rosmarinus officinalis* L. en dos emulsiones O/A de administración epicutánea.
2. El extracto dota a la emulsión de particulares características organolépticas, especialmente color (amarillo parduzco) y olor ("dulzón, campestre").

La formulación 2 tarda más en desaparecer del lugar de aplicación que la formulación 1 y deja un ligero residuo blanquecino, pese a tener menor contenido oleoso y la misma facilidad de extensión que la formulación 1.

3. En condiciones epicutáneas de pH y temperatura las dos emulsiones muestran distinta capacidad de liberación "in vitro" del extracto acuoso de romero. La formulación 1 llega a liberar el 4,57% del extracto en ella incorporado, siguiendo una cinética de orden cero (velocidad de liberación = 23 μg/min).

La formulación 2, más consistente que la formulación 1, libera tan sólo el 2,35% del extracto contenido en ella siguiendo una cinética de Peppas.

Referencias

[1] Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. Food Chemistry, Athens, 95: 44-52, (2006)
[2] Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C., Vojnov, A. *Free Radical Research* 40(2): 223-231, (2006)
[3] Emmanuel, V., Adrain, V., Sultana, N. Int. J. Pharmacol. 6: 387-392, (2010)
[4] Soler-Rivas, C., Marín, F.R., Santoyo, S., García- Risco, M., Señorásn F.J., Reglero, G. J. Agric. Food Chem. 58: 1144–1152, (2010)
[5] Conde Valentín, B., Franco Gil, M. E., Rodríguez Fernández, C., Rodríguez Bayón, A. M. SPLC-CRS-Local Chapter Meeting, Lisboa (2010)
[6] Rodríguez Bayón, A.M.; Franco Gil, M.E., Paños Pérez, I.M. V SPLC-CRS-Local Chapter Meeting (2002) Sevilla.

Agradecimientos

B.C.V. agradece al Ministerio de Educación, cultura y deporte por la concesión de la beca FPU 2011 (AP2010-0818).

HIDROGELES PARA LA LIBERACIÓN COLÓNICA DE ACETONIDO DE TRIAMCINOLONA: ESTUDIO IN VIVO EN MODELO DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA COLÓNICA EN RATAS

M. Gago-Guillan[1], V. Merino Sanjuan[2], F. J. Otero Espinar[1].
[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, España.
[2]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España.

Introducción:

Son muchas las patologías que afectan a la última porción del tracto gastrointestinal, entre las que podemos destacar enfermedades inflamatorias, del tipo de la colitis ulcerosa o la Enfermedad de Crohn por su creciente incidencia en la población (1).

En los últimos años, con el fin de mejorar su tratamiento, se ha avanzado en los conocimientos relacionados con la liberación selectiva de fármacos en el colon. Se han desarrollado diferentes formulaciones persiguiendo principalmente dos objetivos: conseguir una mayor concentración del fármaco en la zona dañada, con el consiguiente aumento del efecto, y la disminución de la absorción sistémica del fármaco en las primeras porciones del tracto digestivo, reduciendo de esta manera un gran número de efectos secundarios. Una posible alternativa terapéutica para conseguir estos objetivos son las formulaciones basadas en la degradación enzimática colónica. Entre estos sistemas se encuentran los hidrogeles de polisacáridos naturales como la goma Garrofina y la goma Xantana. Estos polímeros presentan una biocompatibilidad elevada y en presencia de los fluidos corporales forman una red polimérica con la capacidad de retener al fármaco en su interior, consiguiendo que apenas se libere fármaco en los primeros tramos del sistema digestivo. Una vez que el hidrogel alcanza el colon, la acción de las enzimas de la flora degrada la red polimérica, liberando la totalidad del fármaco retenido en el lugar de acción, con el consiguiente aumento del efecto (2). El fármaco ensayado es el Acetónido de Triamcinolona, un corticoide con efecto antiinflamatorio que presenta los efectos adversos a nivel sistémico típicos de este grupo farmacológico.

Materiales y Métodos:

Materiales :goma Xantana y Garrofina (Inagarbe), Acetónido de Triamcinolona (Fagron), TNBS (Sigma-Aldrich), etanol y propilenglicol (Merck).

Métodos:

Elaboración de los comprimidos: Para la elaboración de los comprimidos se han mezclado la Goma Xantana y la Goma Garrofina al 50%. A esta mezcla se le ha añadido un 1% de Acetónido de Triamcinolona. Sobre porciones de 500 mg del polvo obtenido se ha aplicado una fuerza de 7,5 toneladas durante 10 minutos en un punzón de infrarrojos de 1,3 mm de diámetro y con la ayuda de una prensa hidráulica Mega B20. Los comprimidos obtenidos fueron torneados utilizando una Dremel 3000 para darle forma capsular y ajustar el peso a los 30 ± 0,3 mg. Para los comprimidos placebo se ha seguido el mismo procedimiento sin la adición del fármaco.

Inducción de la inflamación colónica: Para el estudio se han empleado ratas Wistar de 250 - 320 g de peso. Para la inducción de la inflamación colónica se adormecen las ratas con isofluorano. Se introduce 8 cm de una cánula adecuada por vía rectal y a través de ella, se administran 0,5 ml de una disolución de TNBS 0,13 M disuelto en etanol al 50% (v/v). Tras la administración las ratas se separan en jaulas individuales. La dosificación del tratamiento ha sido de una administración diaria los días 3, 4 y 5 contados a partir de la inducción del proceso inflamatorio. A los 9 días se sacrifican los animales por sobredosis de pentobarbital y se procede a la evaluación del daño.

Diseño del experimento y evaluación de la actividad: El experimento se ajusta a un modelo multifactorial aleatorizado con 5 factores que se corresponden con el tratamiento recibido: comprimido placebo, comprimido con Acetónido de Triamcinolona, 30 mg de espuma rectal Proctosteroid® como formulación de referencia, 0,5 ml de una disolución de Acetónido de Triamcinolona al 0,6% en una mezcla de propilenglicol y suero salino en proporción 80:20, y 0,5 ml de una disolución placebo de la misma composición que la anterior pero sin fármaco. Se han hecho 5 replicados para cada grupo de tratamiento.

La actividad del tratamiento se evaluó respecto al edema colónico (relación peso colon/peso corporal el día 9), a la actividad mieloperoxidasa del tejido colónico tras el sacrificio y a una puntuación calculada a partir del control diario de los animales teniendo en cuenta la perdida de peso, presencia de heces y su aspecto, y presencia de sangrado.

CONTROL	RANGO	PUNTOS
% PESO PERDIDO	<1%	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-20%	3
	>20%	4
ASPECTO HECES	Heces abundantes y formes	0
	Heces blandas	2
	Heces líquidas o ausencia	4
PRESENCIA SANGRE	Ausencia	0
	Sangre en heces	2
	Sangre abundante en heces	4

Tabla 1: Correspondendia de valor de puntuación con las observaciones diarias.

La actividad mieloperoxidasa se ha medido por el método descrito en el trabajo de C. Mura (3) con alguna modificación: la reacción se detuvo con la adición de 15 µl de H_2SO_4 2N y la longitud de onda de lectura en el lector de placas ha sido de 450 nm.

Para el calculo de puntuación se ha tenido en cuenta tres parámetros: el porcentaje de pérdida de peso

con respecto al día 0, prensencia de heces y aspecto de las mismas en la jaula, y presencia o ausencia de sangre. Se ha preestablecido unos rangos para para cada uno de los parámetros control (Tabla 1) para asignarles un valor numérico, así se obtiee una puntuación entre 0 y 12, indicativa del grado de la enfermedad, correspondiendo el valor 0 a la ausencia de la misma y el 12 al mayor grado de inflamación.

Resultados y Discusión:

Tal como se observa en la figura 1 se ha obtenido una gran variabilidad en la respuesta para las diferentes formulaciones estudiadas, probablemente causado por una respuesta muy variable obtenida para la inducción de la inflamación entre los diferentes animales.

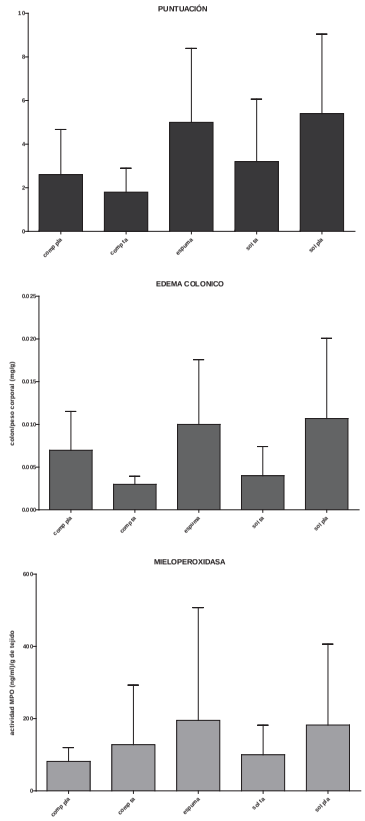


Figura 1. Valores de puntuación, edema colónico y de actividad mieloperoxidasa para los distintos grupos de tratamiento al noveno día de la inducción de la inflamación.

Ello no ha permitido obtener diferencias estadísticamente significativas entre grupos, si bien se han observado ciertas tendencias que será necesario corroborar. Atendiendo a los resultados obtenidos para la puntuación, que se muestran en la Figura 1, podemos observar que con los hidrogeles de Xantana/Garrofina conteniendo Triamcinolona se obtiene el valor mas bajo, lo que indica una sintomatología mas leve en comparación con los tratamientos espuma rectal y solución. Ocurre lo mismo para la evaluación del edema colónico, los hidrogeles con Acetónido de Triamcinolona son los que tienen el valor mas bajo para la relación peso de colon/peso corporal, lo que indica que la agresión de la inflamación sobre los tejidos ha sido la menor de todos los tratamientos ensayados. La actividad mieloperoxidasa obtenida para todos los tratamientos ha sido reducida y en todos los casos se han obtenido valores muy próximos al obtenido en tejido sano.

Los resultado obtenidos con los hidrogeles, en los parámetros evaluados, son similares a los encontrados por C. Mura et al. (3) en la evaluación de la actividad de micropartículas conteniendo 5-ASA e inferiores a los que obtiene en los animales sin tratar. Aunque es necesario analizar los resultados con cierta cautela, dada las diferencias en el tiempo de ayuno empleado durante la etapa de inducción del edema en ambos estudios, la comparación puede se orientativa. Llama la atención los valores obtenidos para los factores con los hidrogeles placebo, en todos los casos bastante similar a los hidrogeles con TA. Una de las causas puede ser la propia degradación de los polisacáridos naturales a nivel colónico dando lugar a derivados del ácido araquidónico que ha demostrado poseer propiedades protectoras de la mucosa del colon. Estos polisacáridos se encuentran en el grupo denominado fibra saludable.

Sin embargo, para a poder confirmar y comparar la actividad antiinflamatoria de estas formulaciones sería necesario ampliar el número de la población de animales empleado en el estudio.

Referencias:

1. Armada, P.C., García-Mayor, R.V., Larrañaga, A., Seguín, P. “Prevalence and incidence of Crohn's disease in Galicia, Spain”. Medicina Clinica, 130 (18), pp. 715 (2008).
2. Gago Guillan, M. et al. “Evaluación de hidrogeles a base de polisacáridos naturales como sistemas de liberación de fármacos”. X Congreso de la SEFIG 2011, Madrid
3. C Mura et al. “N-Succinyl-chitosan systems for 5-aminosalicylic acid colon delivery: In vivo study with TNBS-induced colitis model in rats”. International Journal of Pharmaceutics 416 (2011) 145-154.

Agradecimientos:

Programa Isabel Barreto de la Xunta de Galicia y Ayudas de movilidad del MEC para programas de Doctorado con Mención hacia la excelencia.
Al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia.

MICROPARTÍCULAS DE NEVIRAPINA Y ALGINATO CÁLCICO: ELABORACIÓN Y ESTUDIOS *IN VITRO*.

P. Gandía, I. Usach, V. Melis, J.E. Peris.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España.

Introducción: La infección causada por el VIH no tiene cura, pero algunos medicamentos retrasan o frenan la progresión de la enfermedad, siendo el cumplimiento del paciente decisivo para mantener la carga viral plasmática indetectable. El tratamiento de elección en el momento actual consiste en una combinación de, al menos, tres fármacos, por lo que un factor importante en la adherencia al tratamiento es la comodidad en la administración.

La nevirapina (NVP) es un fármaco antirretroviral empleado en el tratamiento de la infección por VIH en combinación con otros antirretrovirales. La pauta habitual de administración de NVP en adultos es de un comprimido 2 veces al día, por lo que la obtención de un preparado de liberación sostenida podría reducir la pauta a 1 toma diaria y facilitar el cumplimiento de los pacientes.

El objetivo de este trabajo ha sido la obtención, mediante gelificación iónica, de micropartículas poliméricas conteniendo NVP, capaces de suministrar una liberación sostenida del antirretroviral tras su administración oral con el fin de disminuir la frecuencia de dosificación y favorecer la adherencia al tratamiento.

Material y métodos

Elaboración de las micropartículas: Se elaboraron diferentes lotes de micropartículas conteniendo NVP mediante gelificación iónica de alginato sódico con calcio, según el siguiente esquema:

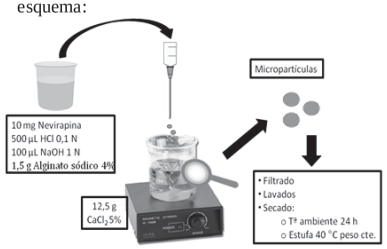


Figura 1. Esquema de elaboración de las micropartículas.

Análisis morfológico y determinación del tamaño de partícula: Se observaron las micropartículas mediante microscopía óptica y electrónica, y se determinó su tamaño mediante un micrómetro.

Contenido en nevirapina y porcentaje encapsulado: Se extrajo la NVP de las micropartículas con HCl 0,1 N y se determinó su absorbancia a 315 nm.

Perfil de liberación in vitro: Los ensayos de liberación in vitro se efectuaron en un aparato tipo II (paletas) según USP, a 37 °C ± 0,5 °C, con una velocidad de rotación de 50 rpm y 200 mL de medio de disolución. Se ensayaron 35 mg de micropartículas en 6 medios: pH 1,2; tampón de fosfatos 50 mM pH 6,8; tampón de fosfatos 10 mM pH 6,8; tampón TRIS 50 mM con 0,9% de NaCl pH6,8; medio de Hank´s (HBBS) pH 7,4 y agua destilada.

La cantidad de NVP disuelta a los tiempos de muestreo se determinó mediante medición de la absorbancia a 315 nm (medio con pH 1,2) y 282 nm (medios con pH 6,8 y 7,4). A partir de las curvas de disolución se determinaron los siguientes parámetros: tiempo de disolución 50% (TD50%), tiempo de disolución 70% (TD70%) y tiempo medio de disolución (MDT).

Métodos estadísticos: Se empleó el test ANOVA de un factor seguido de la prueba de Tukey. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuándo el nivel de significación fue inferior a 0,05.

Resultados y discusión

Micropartículas de alginato cálcico y Nevirapina: Las micropartículas presentaron una forma ovalada, de superficie rugosa y coloración blanco-amarillenta (Figura 2).

Figuras 2a y 2b. Imágenes de las micropartículas obtenidas mediante microscopia óptica (izqda.) y electrónica (dcha.).

El tamaño medio de las micropartículas fue 698 ± 27 µm (Figura 3).

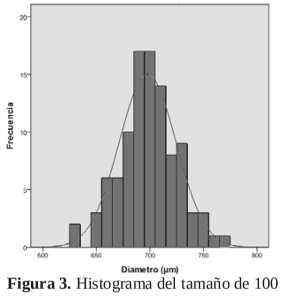


Figura 3. Histograma del tamaño de 100 micropartículas.

En la tabla 1 se recogen los resultados de encapsulación obtenidos para 6 lotes representativos. Las micropartículas obtenidas presentaron una riqueza del 7,99% y permitieron la encapsulación de una elevada proporción de la NVP inicial, con un valor superior al 85%. Así de los 10 mg iniciales de NVP, solo 1,45 mg quedaron sin encapsular, encontrándose una parte (0,89 mg) en el medio acuoso utilizado para la gelificación y el resto adherido al material empleado en la elaboración.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de encapsulación de NVP en micropartículas de alginato cálcico.

	Micropartículas			
Lote	Masa Total (mg)	Riqueza (%)	NVP encapsulada (mg)	NVP respecto inicial (%)
1	94,6	8,47	8,01	80,1
2	107,0	7,69	8,23	82,3
3	116,2	7,71	8,96	89,6
4	118,1	7,94	9,38	93,8
5	109,1	7,58	8,27	82,7
6	98,9	8,57	8,48	84,8
Media	107,3 ± 9,3	7,99 ± 0,43	8,55 ± 0,52	85,53 ± 5,15

Ensayos de liberación in vitro: la NVP se disuelve rápidamente en los distintos medios de disolución utilizados, encontrándose el 100% disuelto antes de los 5 minutos. Sin embargo, las micropartículas de NVP presentan diferentes velocidades de disolución según el medio de disolución ensayado (Figura 4).

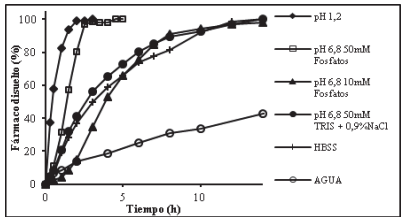


Figura 4. Curvas de disolución correspondientes a las micropartículas de NVP para cada medio de disolución ensayado.

En la tabla 2 se recogen los valores de TD50%, TD70% y MDT. A pH 1,2, la disolución fue muy rápida, con un valor TD70% = 0,7 h, y también fue rápida la liberación al emplear tampón fosfato 50 mM a pH 6,8 (TD70% = 1,9 h). Sin embargo, la liberación en agua destilada fue muy lenta (TD70% > 30 h). La liberación rápida a pH 1,2 puede atribuirse a la protonación de los grupos carboxílicos del alginato, con lo que se impide la interacción iónica con los iones calcio y se favorece la desestructuración de las micropartículas. Sin embargo, a pH 6,8 el alginato se halla ionizado, por lo que debería mantenerse la estructura de las micropartículas durante un tiempo prolongado por acción de los iones calcio. La relativamente rápida disolución de NVP a partir de las micropartículas al emplear tampón de fosfatos 50 mM puede atribuirse al efecto secuestrante del ion fosfato sobre los iones calcio, que se traduce en una desestructuración de las micropartículas y una rápida disolución de NVP. De hecho, el empleo de tampón de fosfatos con una menor concentración (10 mM) enlentece significativamente la liberación de NVP (TD70% = 5,4 h), obteniéndose perfiles de liberación semejantes cuando se emplean medios de disolución libres de fosfato, como el tampón TRIS o HBSS.

Tabla 2. Tiempos de disolución 50 %, 70 % y tiempo medio de disolución (media ± d.e., n = 4). En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

	Parámetros		
Medios de Disolución	TD50% (h)	TD70% (h)	MDT (h)
pH 1,2	$0,4 \pm 0,1^{a}$	$0,7 \pm 0,2^{a}$	$0,56 \pm 0,12^{a}$
pH 6,8 50mM Fosfatos	$1,4 \pm 0,2^{b}$	$1,9 \pm 0,4^{b}$	$1,46 \pm 0,30^{b}$
pH 6,8 10mM Fosfatos	$3,9 \pm 0,3^{c}$	$5,4 \pm 0,3^{c}$	$4,54 \pm 0,24^{c}$
pH 6,8 50mM TRIS + NaCl	$2,6 \pm 0,1^{d}$	$4,6 \pm 0,3^{d}$	$3,67 \pm 0,13^{d}$
HBSS	$3,1 \pm 0,2^{e}$	$5,6 \pm 0,3^{c}$	$4,30 \pm 0,16^{c}$
AGUA	$20,7 \pm 1,5^{f}$	> 30	---
Sig. estadística	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

--- : No se pudo determinar.
a,b,c,d,e,f : Los valores con distinto superíndice son estadísticamente diferentes.

Conclusiones

- Se han elaborado micropartículas de alginato y nevirapina, con un tamaño medio de 698 µm y una riqueza media en nevirapina del 7,99 %, empleando una metodología simple y reproducible.
- Las micropartículas liberan la nevirapina más rápidamente a un pH fuertemente ácido (pH 1,2) que a valores de pH próximos a 7. No obstante, la composición del tampón empleado en los ensayos de disolución *in vitro* condiciona en gran medida la liberación del fármaco, favoreciéndose la liberación en presencia de concentraciones relativamente elevadas de fosfatos.

Bibliografía

Panel on antiretroviral guidelines for adult and adolescent. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. March 27, 2012.

Microcápsulas Elaboradas Con Alginato Modificado Con RGD: Desarrollo De Materiales Biomiméticos Para La Mejora Del Comportamiento Celular.

A. Garate[1,2], E. Santos[1,2] , G Orive[1,2], R.M. Hernández[1,2] , J.L. Pedraz[1,2]

[1] Grupo NanoBioCel, Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Vitoria, 01006, España. [2]CIBER-BBN, Centro de Investigación Biomédica en Red. Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Vitoria, 01006, España.

Introducción: Durante muchos años, se han utilizado polímeros y biomateriales para la encapsulación celular, siendo el objetivo principal generar una matriz con capacidad para transportar las células de una forma segura y eficaz (1). Sin embargo, con el uso de estos biomateriales inertes la viabilidad de las células encapsuladas podría estar comprometida debido a la falta de interacción entre el polímero y la célula. El alginato es un polímero muy utilizado en esta tecnología y en estudios anteriores se ha comprobado que la inclusión del tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD), derivado de la fibronectina, en las cadenas de alginato, puede incrementar la viabilidad, proliferación y diferenciación por medio de la adhesión celular, mejorando así la funcionalidad del sistema. A pesar de que se han realizado diferentes estudios para evaluar la eficacia del RGD en la mejora de la funcionalidad de las células encapsuladas (2), se han obtenido resultados diferentes en función del tipo de célula que se encapsula y la proporción de RGD que se incorpora al alginato. El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la incorporación de distintos porcentajes de residuos RGD en la matriz de alginato utilizada para la encapsulación de dos líneas celulares, mioblastos C2C12 secretores de EPO y fibroblastos BHK secretores de VEGF. De esta manera se pretende ampliar el conocimiento del comportamiento celular en microcápsulas elaboradas con alginato modificado y ver los beneficios que se pueden obtener mediante la elaboración de este tipo de microcápsulas.

Materiales y métodos: El alginato de baja viscosidad y alto contenido en ácido gulurónico (UPLVG) fue modificado químicamente mediante la química de carbodiimida (3). El número total de residuos RGD por cada cadena de alginato, definido como grado de sustitución (DS), fue modificado variando la concentración del péptido RGD en la reacción. Se prepararon tres tipos de alginato modificado con diferentes grados de sustitución: DS1 (0.112 mM), DS5 (0.56 mM) y DS10 (1.12 mM). Los mioblastos C2C12 y los fibroblastos BHK modificados genéticamente para secretar EPO y VEGF respectivamente fueron encapsulados por separado en microcápsulas elaboradas con alginato sin modificar (RGD DS0) y alginato modificado con RGD DS1, DS5 y DS10. Para la elaboración de las microcápsulas se utilizó un generador electrostático y se siguió el procedimiento descrito por Lim y Sun con algunas modificaciones.

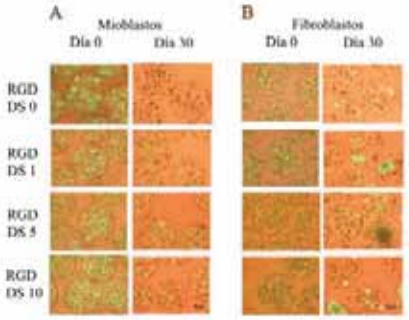


Figura 1. Imágenes de Mioblastos (A) y Fibroblastos (B) en microcápsulas elaboradas con distintos tipos de alginato modificado con RGD. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio óptico los días 0 y 30.

La viabilidad celular se determinó de forma cualitativa mediante la tinción LIVE/DEAD (Figura 1). El número exacto de células vivas por cápsula fue analizado mediante citometría de flujo, utilizando "Trucount tubes" para determinar la cantidad exacta de células vivas y empleando el kit LIVE/DEAD para diferenciar las células vivas y muertas. La determinación de la cantidad de EPO o VEGF secretada se realizó utilizando los kits de ELISA correspondientes. Para determinar la proliferación celular se llevó a cabo el estudio de la BrdU (Bromoxiuridina), análogo de la Timidina. Para analizar la interacción célula-matriz se examinó el citoesqueleto de las células encapsuladas mediante la tinción con F-actina.

Resultados y Discusión: En el caso de los mioblastos (Figura 2A) se observa un descenso de la viabilidad con el paso del tiempo en todos los tipos de microcápsulas, siendo aquellas elaboradas con alginato modificado con RGD DS1 las que presentan mayor número de células vivas el día 30 ($p<0.001$). En el caso de los fibroblastos (Figura 2B), el grupo DS5 es el que presenta una mayor viabilidad a día 30 comparándolo con los grupos restantes ($p<0.001$). Los estudios de secreción del producto terapéutico pusieron de manifiesto que en el caso de los mioblastos

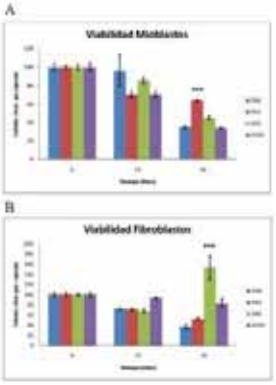


Figura 2. Número de células vivas por cápsula en el caso de los mioblastos (A) y en el caso de los fibroblastos (B).

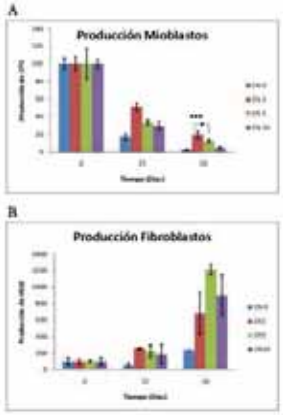


Figura 3. (A) Producción de EPO (B) Producción de VEGF.

(Figura 3A), las microcápsulas con mayor secreción de EPO son las elaboradas con alginato modificado con RGD DS1 ($p<0.05$). En el caso de los fibroblastos (Figura 3B), las microcápsulas con secreción más elevada de VEGF son las elaboradas con alginato modificado con RGD DS5. Los resultados del ensayo de proliferación (datos no mostrados) corroboran los obtenidos en los ensayos anteriores.

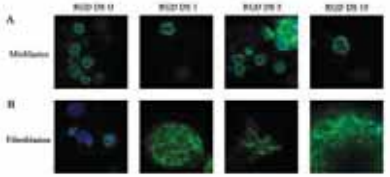


Figura 4. Tinción F-actina de las microcápsulas elaboradas con diferentes tipos de alginatos inmovilizando mioblastos (A) y fibroblastos (B). Las fotos fueron realizadas con el microscopio confocal el día 30.

La tinción de F-actina permite detectar la presencia de elongaciones de los filamentos celulares de los mioblastos, siendo éstas más numerosas al incrementar los niveles de RGD (Figura 4A). En los fibroblastos (Figura 4B), los resultados no fueron tan claros, probablemente debido a los agregados celulares.

Conclusiones: La densidad óptima del péptido de adhesión ha resultado ser diferente en los dos tipos celulares, obteniendo la mayor viabilidad y producción del factor terapéutico con el grupo RGD DS1 en el caso de los mioblastos y el grupo RGD DS5 en el caso de los fibroblastos. Estos resultados ponen de manifiesto que la densidad óptima del ligando de adhesión RGD varía en función del tipo de célula, por lo que se requiere una evaluación individualizada con el fin de determinar la densidad óptima de RGD a incorporar en el alginato.

Referencias:

(1) de Vos et al., *Biomaterials* 18:273-278, 1997.
(2) Orive G et al., *J.Control.Release* 135: 203-210, 2009.
(3) Rowley et al., *Biomaterials* 20:45-53, 1999.

Agradecimientos:
Este proyecto ha sido parcialmente financiado por la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (UFI 11/32). A. Garate agradece al "Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación)" por su beca predoctoral.

Controlled delivery of Neuregulin-1 and Fibroblast growth factor-1 from polymeric microparticles in small and large animal models of myocardial infarction

E. Garbayo[1], F. Rocha[1], B. Pelacho[2], P. Diaz-Herraez[1], Simón-Yarza T[1], J.J. Gavira[2], G. Abizanda[2], F. Prósper[2], M.J. Blanco-Prieto[1]

[1]Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, University of Navarra, Spain
[2]Hematology, Cardiology and Cell Therapy, Clinica Universidad de Navarra and Foundation for Applied Medical Research, University of Navarra, Spain.

Introduction: Myocardial infarction (MI) is a major health concern worldwide, and therefore, extensive research has been performed to find new treatments. Neuregulin-1 (NRG-1) and acidic-fibroblast growth factor (FGF-1) have been identified as factors involved in cardiac repair after MI (1,2). However, their *in vivo* therapeutic value is limited due to their short half-life and high instability after systemic administration. An alternative strategy based on the use of biocompatible and biodegradable microparticles (MP), able to release the cytokines in a sustained and controlled manner could represent a valuable therapeutic approach. Our group had explored new therapeutic strategies for MI treatment based on the use of MP that will release different combinations of cytokines and factors involved in cardiac stem cell activation (3,4). One of these strategies is the use of NRG-1-MP and FGF-1-MP to promote cardiac repair. The efficacy of NRG-1-MP and FGF-1-MP in a rat MI model has been recently assessed demonstrating that MP promoted cardiac repair and improved cardiac performance (4).

Objetive The objectives of this work were (1) To characterize the mechanisms by which NRG-1-MP and FGF-1-MP improved cardiac performance in a rat myocardial infarction model (2) To test the beneficial effect of NRG-1-MP and FGF-1-MP in a preclinical large animal model of ischemia-reperfusion.

Material and Methods: All experiments were performed in accordance with the guidelines established by the Research Ethical Committee of the University of Navarra. Preparation, characterization and efficacy assessment of NRG-1-MP and FGF-1-MP were done as previously described (4). To analyze the effect of growth factor loaded MP on resident cells as well as on cardiac progenitor cells immunofluorescence studies were done. Cardiomiocytes in replication 1 week and 3 months after treatment were identified with antibodies against the proliferation marker ki67 and cardiac troponine (cTnT). Six serial sections from each animal were analyzed for the number of cells ki67+ cTnT+ cells present in the infart and peri-infart zone. To identify cardiac progenitor cells 1 week and 3 month after treatment, heart sections were stained with antibodies against the stem cell antigen c-kit and CD45 a blood-cell lineage marker. Six serial sections from each animal were analyzed for the number of cells C-kit+ CD45- and C-kit+ CD45+ present in the infart and peri-infart zone.

To confirm the beneficial effect of growth factor loaded MP in a large animal model of MI, a scale up of the MP preparation process was done. Various MP formulation parameters (polymer quantity, drug loading…) were adjusted to preserve MP size and to maintain or improve encapsulation efficiencies. Particle size was measured by laser difractometry. Encapsulation efficiencies were quantified by Western blot. Released cytokine bioactivity was evaluated *in vitro* by determining the induction of H9C2 cell proliferation. Efficacy of NRG-1-MP and FGF-1-MP were investigated in a preclinical model of chronic MI. A total of 24 minipigs were enrolled in the study. Myocardial infarction was created by temporary balloon occlusion of the LAD coronary artery followed by reperfusion. One week after infarction, animals were randomized divided into 3 groups: NRG-1-MP, FGF-1-MP and Non loaded-MP. The NOGA® XP Cardiac Navigation System was used to implant the MP in the infarcted heart. Three months later pigs were sacrificed to perform histological analysis. Cardiac function was assessed by echocardiography and MRI.

Results: To characterize the mechanisms by which the cytokine loaded MP exerted its action, tissue cardiomyocyte proliferation was examined by double immunostaining for cTnT and Ki-67+. A significant increase in the number of adult cardiomiocytes Ki-67^{+} was detected in the hearts treated with NRG-1, 3 months post-treatment (Fig. 1). The number of adult cardiomiocytes in replication 1 week after treatment with NRG-1 MP is currently being evaluated.

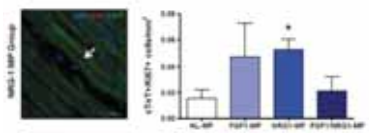


Fig 1: NRG-1-MP treatment induces cardiomyocytes proliferation. Representative image of a proliferating Ki-67+ adult cardiomyocyte in the NRG1-MP group (cTnT: green; Ki-67: pink; Nuclei: blue) and quantification of total double positive cells in the infarcted area of the four-treated groups, 3 months post-injection. A significant higher number of proliferative cardiomyocytes was detected in the NRG-1 group.

Furthermore, c-Kit^{+}CD45^{-} progenitor cells were also detected in the myocardium, although tissue quantification did not show significant differences among groups, 3 months post-injection. However, a significant increase was detected 1 week post-implantation in the NRG-1-MP group in comparison with the NL-MP control group (Fig. 2). Antibody staining of myocardium revealed that these progenitor cells could be identified as isolated or clustered cells that were probably recruited towards the ischemic myocardium.

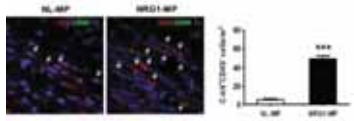


Fig 2: NRG-1-MP treatment induces stem cell homing. c-Kit+CD45- progenitor cells were detected in the heart tissue (cKit: red; CD45: green; Nuclei: blue) along the infarcted area, 1 week after MP-treatment. A significant greater number of progenitor cells was detected in the NRG1-MP group than in the NL-MP control group. Data is represented as mean±SEM, *P<0.05 and **P<0.01 vs. NL-MP control group.

The proposed growth factor loaded MP strategy tested in a small animal model of MI was next tried in a large MI animal model. Regarding the scale up of the MP preparation process, MP were prepared by TROMS with a compatible size for heart injection of 5 µm. Concerning to the entrapment efficiency, growth factors were efficiently encapsulated, reaching values of 77.6±12.3% for FGF-1 and 92 ±8% for NRG. Variations on the MP parameters during the scaling up process showed no effect on the particle size. The bioactivity of the released cytokines was evaluated *in vitro* by determining the induction of H9C2 proliferation. A 1.3 and 2.1-fold increase in cell density was observed when stimulated with FGF-1 and NRG-1, respectively. Proliferation rates of cells treated with the free-cytokines were similar to the ones released by microparticles, indicating that both cytokines retained its biological activity after microencapsulation.

NRG-1-MP, FGF-1-MP and non-loaded MP were injected into the infarcted myocardium using NOGA® XP Cardiac Navigation System 1 week after the infarct. The long-term functional efficacy of growth factor-loaded MP treatment is currently being evaluated. Next, histological studies will be performed to fully characterize the effectiveness of the treatment with NRG-1-MP and FGF-1-MP

Conclusions:

- Controlled delivery of NRG-1 and FGF-1 from MP promoted cardiac repair through activation of endogenous regeneration in a rat myocardial infarction model.

- Growth factor loaded MP have been successfully scaled-up to be tested in preclinical large animal model of ischemia-reperfusion.

References:

(1) Liu X *et al.*, Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2006, 48:1439-1447.
(2) Palmen M *et al.*, Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion. J Am Coll Cardiol. 2004, 44:1113-1123.
(3) Formiga FR *et al.*, Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. J Control Release. 2010,147:30-37.
(4) Formiga FR *et al.*, Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogeneous regeneration. Submitted to JACC.

Acknowledgments: Juan de la Cierva Program, CAN, FUN.

EMPLEO DE NANOSUSPENSIONES DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA PARA MEJORAR SU CARGA Y LIBERACIÓN A PARTIR DE LENTES DE CONTACTO MEDICADAS

García Millán E., Quintans Carballo M., Cabanas Montenegro S., Otero Espinar F.J.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

Introducción

Las lentes de contacto han demostrado un interesante potencial como sistemas de liberación controlada de medicamentos, sobre todo para tratar afecciones oftálmicas de la zona anterior. Desde el punto de vista de los sistemas de liberación, las lentes blandas de contacto son hidrogeles y se consideran como insertos oftálmicos insolubles especiales. Habitualmente para incluir el fármaco en las lentes se incuban en una disolución acuosa de fármaco durante un período de tiempo suficiente para que se incorpore la dosis necesaria. Sin embargo, dada la naturaleza hidrofílica de los hidrogeles y de las soluciones de carga, los fármacos poco hidrosolubles sólo pueden acceder en dosis muy reducidas. El acetónido de triamcinolona (TA) es un glucocorticoide sintético con elevada potencia antiinflamatoria y efecto prolongado que se emplea habitualmente en el tratamiento de patologías oculares (1). Posee reducida hidrosolubilidad por lo que plantea problemas para ser incluido en lentes en dosis adecuadas. Para incrementar la dosis y mejorar el control de liberación de TA proponemos el uso como medio de carga de nanosuspensiones de TA estabilizadas. Éstas permiten incrementar la solubilidad acuosa del fármaco y dado el reducido tamaño de sus partícula pueden facilitar su difusión a través de los poros del hidrogel manteniendo sus propiedades ópticas.

Materiales y métodos

Materiales

Lentes blandas de contacto desechables (Hilafilcon B, Bauch & Lomb). 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA, Merck), ácido metacrílico (AM, Merck), etilenglicoldimetacrilato (EGDMA, Sigma-Aldrich). Irgacure® 2959 (CIBA), Poloxamer 407 (Pluronic F127®; 9.840 – 14.600 Da, Sigma-Aldrich), alcohol polivinílico (PVA; 30.000 – 70.000 Da. Sigma-Aldrich), TA (Fagron), acetona, (Panreac).

Elaboración de las lentes blandas de contacto de TA

Las lentes blandas se elaboraron mediante foto-polimerización. Para ello se mezclaron los monómeros HEMA y AM con el agente reticulante EGDMA y el iniciador Irgacure 2959 en las proporciones indicadas La disolución resultante se inyectó en un molde. Los hidrogeles se forman por fotopolimerización al irradiar la disolución con luz ultravioleta durante 30 minutos. La lámina formada se introduce en agua hirviendo durante 15 min, se troquela en pequeños cilindros y se mantienen en agua limpia hasta la completa eliminación de los monómeros residuales.

Elaboración de nanosuspensiones de TA

Nos basamos en un método de precipitación controlada descrito en trabajo previo (2) en el que se emplea se una mezcla Pluronic F127® y PVA al 10% (p/v) como fase acuosa y como fase organica una disolución del fármaco en acetona al 0.1% (p/v). Para obtener las nanosuspensiones con diferentes contenidos en TA, se procedió a diluir las convenientemente. El contenido de principio activo en las nanosuspensiones se determino mediante espectrofotometría a 242 nm en las muestras convenientemente diluidas y filtradas (membranas de 0,45 µm Sartorius®. El tamaño medio de partículas se determinó utilizando el equipo Zetasizer Malvern (Nano ZS 6.0, Malvern Instruments).

Caracterización de SCLs

Transparencia óptica

Se determinó en las lentes después de ser cargadas con el principio activo. Para ello las lentes de contacto se fijaron en la cara interna de una cubeta de cuarzo conteniendo agua milliQ y se midió la transmitancia a una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro UV-Visible de red de diodos Agilent 8453).

Determinación de la carga de TA en SCLs

Las lentes de contacto fabricadas y las comerciales se sumergieron en las nanosuspensiones de TA durante 4 días. Pasado este tiempo, la cantidad de TA cargado por cada lente de contacto, se calculó por diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad final de la solución de carga, determinada por espectrofotometría UV a 242 nm. Los resultados se expresaron como la cantidad de TA (mg) en cada SCLs entre el peso (g) de cada SCLs en su estado inicial. Cada ensayo se ha realizado por triplicado.

Ensayos de liberación de TA de SCLs cargadas

Las lentes de contacto cargadas con TA se introdujeron en un vial en el que previamente se añadieron 5 ml de fluido lacrimal simulado (6.7 g/l NaCl, 2.18 g/l NaHCO3, 1.38 g/l KCl, 0.084 g/l CaCl2•2H2O, pH 8). Los viales se colocaron en el incubador (VWR Incubating Mini Shaker, pais) con una agitación orbital de 100 r.p.m. y una temperatura de 37°C . Se tomaron muestras, a intervalos de tiempo determinándose la concentración de TA mediante espectrofotometría a 242 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

	0%H20	20%H20	40%H20
HEMA	6,218g	4,974g	2,218g
EGDMA	0,095g	0,076g	0,038g
MA	0,103g	0,082g	0,0412
Agua	0g	1,2mL	2,4mL
Irgacure	0,011	0,011g	0,011g

Tabla 1. Composición de las lentes blandas fabricadas.

Resultados y discusión

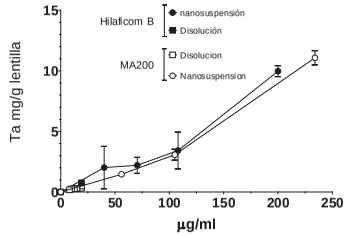


Figura 1. Cantidad de TA cargada por las lentes en función de la cantidad de fármaco contenido en el medio de carga

En la figura 1 se muestra la capacidad de incorporación de fármaco en las lentes de contacto en función de la cantidad presente en el líquido de carga. Los datos de carga de concentraciones menores de 20 µg/ml corresponden a sistemas constituidos por disoluciones de TA, mientras que las superiores son las nanosuspensiones. Como se observa el empleo de nanosuspensiones mejora de manera significativa el fármaco incorporado en las lentes comerciales y en las fabricadas por nosotros observándose un incremento prácticamente lineal de la carga en función de la cantidad de fármaco en las soluciones/suspensiones. No se observan diferencias en el TA cargado entre las lentes comerciales y las fabricadas por nosotros

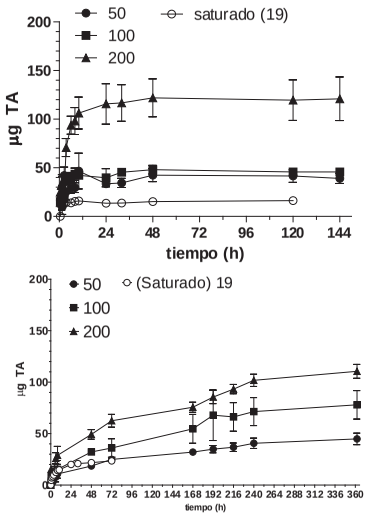


Figura 1. Perfiles de liberación del TA a partir de las lentes comerciales (superior) y fabricadas (inferior) con las diferentes cargas.

Por otra parte todas las lentes cargadas con las disoluciones y nanosuspensiones preservaron su transparencia óptica obteniéndose valores de trasmitancia a 600 nm para todas ellas superiores al 90%.

En la figura 2 se observan los perfiles de liberación obtenidos con las diferentes lentes y cargas. La liberación a partir de las lentes comerciales se produce en su práctica totalidad en menos de 12 horas observándose diferencias significativas en función de la solución empleada para su carga, siendo mayor la liberación de las lentes cargadas a partir de nanosuspensiones de 200 µg/ml.

Las lentes MA 200 elaboradas son capaces de controlar la liberación de manera más efectiva y gradual observándose una liberación a las 12 muy inferior a las comerciales. En este caso a los 6 días las lentes continúan liberando principio activo. En este caso existe también una influencia significativa de la concentración empleada en el proceso de carga sobre la cantidad liberada, siendo nuevamente la cargada con nanosupensiones de 200 µg/ml con la que se consigue una mayor liberación, como consecuencia del incremento en la carga

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que el empleo de nanosuspensiones estabilizadas de TA como medio de carga permite incrementar de manera considerable la dosis de fármaco incorporado tanto por las lentes comerciales como por las elaboradas para el estudio. Además las lentes cagadas con las nanosuspensiones dan lugar a mayores niveles de fármaco liberado durante tiempos más prolongados.

Es posible utilizar ambas lentes, las comerciales o las elaboradas como soporte para la liberación ocular de TA, siendo las comerciales más adecuadas si se necesita una liberación más rápida y las elaboradas más prolongada.

Agradecimientos:

El trabajo fue financiado por Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2009-14609-C02-02).

Referencias

[1] Jermak CM, Dellacroce JT, Heffez J, Peyman GA. Triamcinolone acetonide in Ocular Therapeutics. Survey of Ophthalmology. 2007; 52 (5): 503-522.

[2] García Millán, E., Blanco Méndez, J., Otero Espinar, F.J. Elaboración de nanosuspensiones de acetónido de triamcinolona mediante técnicas de precipitación controlada. X Congreso SEFIG, Madrid 2011.

OPTIMIZACIÓN DE LA CARGA Y LIBERACIÓN DE CORTICOIDES A PARTIR DE LENTES BLANDAS DE CONTACTO DE pHEMA MEDIATE MODIFICACIONES EN SU COMPOSICIÓN

García Millán E., Koprivnik S., Otero Espinar F.J.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela

Introducción

Los avances en el desarrollo de las lentes blandas de contacto han permitido la carga de fármacos en dosis terapéuticas y controlar y mantener su liberación en el tiempo con el objetivo de mejorar la eficacia del tratamiento ocular por medio de una mayor biodisponibilidad, menor absorción sistémica y un mejor cumplimiento del régimen de dosificación.

Las lentes de contacto blandas son hidrogeles, una red reticulada de monómeros solubles en agua. La base de muchos tipos de lentes de contacto blandas es el polihidroxietilmetacrilato (pHEMA) reticulado con etilenglicoldimetacrilato (EGDMA). Los hidrogeles pHEMA se caracterizan por un contenido relativamente alto de agua, estabilidad térmica y química, propiedades mecánicas moldeables y permeabilidad al oxígeno, muy importantes para un uso seguro diario [1, 2]. En los hidrogeles, el fármaco se incorpora a la red polimérica por un mecanismo de absorción, pero la falta de interacciones específicas limita tanto la cantidad de fármaco cargada como la capacidad de controlar la liberación [3].

El fármaco seleccionado para su estudio ha sido acetónido de triamcinolona (TA), un corticosteroide utilizado por su acción antiinflamatoria en diversas patologías oculares como alergias, uveítis o inflamaciones postoperatorias.

El objetivo de este trabajo ha sido la síntesis y optimización de hidrogeles de pHEMA con el fin de mejorar la propiedades de carga y liberación ocular de TA por medio de la incorporación de diferentes proporciones de dos comonómeros, ácido metacrílico (AM) y N-vinil-2-pirrolidona (NVP).

Materiales y métodos

Materiales

2-hidroxietil metacrilato (pHEMA), ácido metacrílico (AM) y N-vinil-2-pirrolidona (NVP) (Merck, Alemania); etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), 2,2'-azo-bis(isobutironitrilo) (AIBN) (Sigma-Aldrich, España) y Acetónido de Triamcinolona (Fagron, España).

Métodos

Síntesis de hidrogeles mediante polimerización termoinducida

El agente reticulante EGDMA (80 Mm, 1%) y diferentes cantidades de los monómeros funcionales AM y VN (0, 100 y 200 mM; 0 – 2.5%) fueron disueltos en HEMA (6 ml; 96,5% - 99%) bajo agitación magnética constante durante 45 minutos (Tabla 1). Se incorporó el agente iniciador AIBN (10 mM) durante 15 minutos más. Cada solución de monómero resultante fue inyectada en un molde constituido por dos placas de vidrio (10x10cm) cubiertas internamente por una lámina de propileno y separados por un marco de silicona de 1mm de ancho. Los moldes se colocaron en una estufa a 50ºC durante 12 horas seguido de 24 horas a 70ºC. Tras la polimerización, cada hidrogel fue sumergido en agua hirviendo durante 15 minutos con el objetivo de eliminar los monómeros no reaccionantes y facilitar el corte de los hidrogeles en discos de 10 mm de diámetro. Para la limpieza de estos discos se sumergieron en una solución de NaCl 10 mM durante una semana, posteriormente en HCl 10 mM durante un día y en agua un día más [3].

Hidrogel	Monómero funcional	HEMA:EGDMA:Func.monomero (Volume ratio)
0	----	5910:90:0
MA100	AM-100mM	5860:90:50
MA200	AM-200mM	5810:90:100
NVP100	NVP-100mM	5845:90:75
NVP200	NVP-200mM	5780:90:150

Tabla 1. Composición de diferentes hidrogeles sintetizados variando el tipo y proporción de monómero funcional

Estudios de carga de TA en los hidrogeles

Los estudios de carga de TA en los diferentes hidrogeles sintetizados se llevó a cabo por inmersión de los mismos en disoluciones de diferente concentración de fármaco (8 – 19 µg/ml) en NaCl al 0,9% o PBS (10 ml) durante cuatro días. El contenido en TA se determinó por espectrofotometría UV a λ = 242 nm tras ser filtradas por filtros de membrana (0,45 µm Sartorius®, Alemania). Cada ensayo ha sido realizado por triplicado [3].

Estudios de liberación de TA de los hidrogeles

Los hidrogeles cargados fueron sumergidos en un vial conteniendo 5 ml de fluido lacrimal simulado (FLS; 6.7 g/l NaCl, 2.18 g/l $NaHCO_3$, 1.38 g/l KCl, 0.084 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pH 8) bajo agitación orbital a 100 rpm y 37ºC. A intervalos de tiempo predeterminados, se tomaron muestras de 1 ml que era reemplazado con la misma cantidad de FLS. La determinación de la concentración de TA se realizó mediante espectrofotometría a λ = 242 nm. Cada ensayo ha sido realizado por triplicado [3].

Resultados y discusión

A efectos de incorporación de fármacos, los hidrogeles se comportan normalmente como adsorbentes microporosos dando lugar a isotermas de clase C (4), caracterizadas por un tramo lineal inicial en el que el coeficiente de reparto entre soluto y adsorbente se mantiene constante. Estas isotermas aparecen cuando el soluto penetra en el interior del adsorbente y desaparece de la superficie y, en este caso, la concentración crítica C_{gel}^{∞}, representa la saturación de los lugares internos y se caracteriza por la aparición de una meseta.

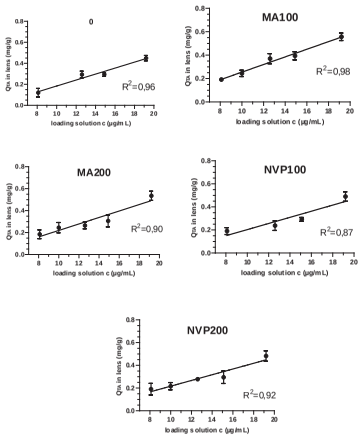


Fig.1. Isotermas de adsorción de TA a partir de disoluciones de NaCl 0.9%.

Solución de carga	Hidrogeles	Cantidad cargada (mg/g) media ± SD	Kp media ± SD
0,9% NaCl	0	0,449 ± 0,026	22,9 ± 0,8
	MA100	0,557 ± 0,031	27,3 ± 2,0
	MA200	0,536 ± 0,042	26,0 ± 3,4
	NVP100	0,491 ± 0,040	23,4 ± 2,5
	NVP200	0,506 ± 0,072	24,5 ± 3,0
PBS pH 7,4	0	0,465 ± 0,020	23,8 ± 2,5
	MA100	0,585 ± 0,044	24,9 ± 3,1
	MA200	0,667 ± 0,038	27,2 ± 1,7
	NVP100	0,501 ± 0,068	25,2 ± 4,0
	NVP200	0,583 ± 0,035	27,8 ± 3,5

Tabla 2. Diferentes hidrogeles sintetizados con sus respectivos valores de cantidad de TA cargada y coeficientes de reparto.

Como podemos ver en la figura 1, las isotermas de adsorción obtenidas se ajustan bien a una línea recta indicando que nos encontramos en el tramo inicial de una isoterma tipo C y que nos encontramos aún en la zona en la que no existe saturación de los lugares de adsorción. Isotermas similares se obtuvieron empleando PBS como medio de carga. Los menores valores de TA cargado se obtienen con los hidrogeles que no incluyen co-monómeros obteniéndose diferencias significativas con los elaborados con MA (α<0,05). Sin embargo, no existen diferencias de carga entre NVP y MA por lo que podemos asumir que no se producen interacciones especiales entre TA y los co-monómeros y que la mayor carga con respecto a los que no los incorporan pueden deberse a diferencias en la hidratación de las lentes.

La tendencia del TA por la red polimérica se determinó a través del coeficiente de partición que hemos calculado a partir de la pendiente de las isotermas y se muestran en la tabla 2. Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que existe una elevada fracción de TA unida a la red polimérica, siendo ligeramente superior en las que incorporan MA. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para otros corticoides como la dexametasona en hidrogeles de pHEMA [5]. Por ello podemos concluir que el fármaco posee una gran afinidad por el polímero.

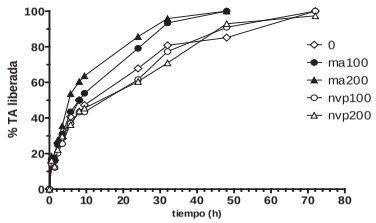


Fig 2. Perfiles de liberación de TA a partir de los hidrogeles cargados

Todos los hidrogeles han mostrado un perfil de liberación similar en las horas iniciales del ensayo donde empiezan a liberar el fármaco de manera inmediata en cuanto se sumergen en FLS, sin observarse efecto burst ni periodo de latencia. Sí se observan diferencias significativas a partir de las 5 horas, donde los hidrogeles de AM presentan mayores tasas de liberación, siendo MA200 son los que mayor cantidad de TA liberan. Esto es debido a que a pH 8, más del 99% de los grupos funcionales de AM se encuentran ionizados generando fuerzas de repulsión en el interior del hidrogel dando como resultado una mayor relajación e hinchamiento de la red polimérica, lo que facilita la liberación de TA.

Conclusiones

Las lentes de pHEMA se comportan como adsorbentes porosos en los procesos de carga, sin alcanzarse la saturación del proceso para las concentraciones estudiadas. Ello significa que si se consiguen concentraciones de carga superiores a la máxima empleada (saturación a 20ºC) puede favorecerse la entrada de dosis mayores. Las lentes incorporan cantidades significativas del corticoide TA en los procesos de carga, existiendo un reparto favorable hacia la red polimérica. La inclusión de los co-monómeros MA y NVP mejoran la carga de TA e incrementan ligeramente la afinidad de la red polimérica por el fármaco, sobre todo el MA. Estas lentes poseen un efectivo control de la liberación que puede modularse en función del tipo y proporción de co-monómero empleado.

Bibliografía

[1] J.-F. Rosa dos Santos, R. Couceiro, A. Concheiro, J.-J. Torres-Labandeira, C. Alvarez-Lorenzo, Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylated-β-cyclodextrin) hydrogels: Synthesis, cytocompatibility, mechanical properties and drug loading/release properties, Acta Biomater., 4 (2008) 745-755.

[2] C. Alvarez-Lorenzo, H. Hiratani, J.L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco, C. Souto, A. Concheiro, Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol, Journal of Pharmaceutical Sciences, 91 (2002) 2182-2192.

[3] C. Alvarez-Lorenzo, F. Yanez, R. Barreiro-Iglesias, A. Concheiro, Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems, Journal of Controlled Release, 113 (2006) 236-244.

[4] C.H. Giles, D. Smith, A. Huitson, A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical, Journal of Colloid and Interface Science, 47 (1974) 755-765.).

[5] Kim J, Chauhan A: Dexamethasone transport and ocular delivery from poly(hydroxyethyl methacrylate) gels. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 353: 205–22.

UTILIZACIÓN DEL SISTEMA SEDEM PARA OPTIMIZAR LA ELABORACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS ORALES POR COMPRESIÓN DIRECTA

D. Puñal Peces[1], E. García Montoya[2], JM Suñé Negre, P Pérez Lozano, R. Sarrate, N Sánchez, JR Ticó, M Miñarro

[1] Desarrollo Industrial, Laboratorios ROVI, España/ Doctorando Programa de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España
[2] SDM. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Barcelona, España.

Introducción:
El sistema SEDEM es una herramienta que ha demostrado su utilidad para desarrollar fórmulas de elaboración por compresión, obteniéndose fórmulas que pueden ser elaboradas mediante compresión por vía directa y para caracterizar excipientes [1-6].

En este trabajo se ha partido de una fórmula de comprimidos elaborados por granulación vía húmeda actualmente comercializada. El objetivo es rediseñar el proceso de elaboración de la fórmula, manteniendo la dosis de principio activo, de tal forma que pueda ser elaborado por compresión directa, con la consiguiente reducción de costes directos (horas de elaboración) e indirectos (consumo de energía o limpieza de equipos de producción).

Materiales y Métodos:
Para este estudio se ha partido de un producto existente en el mercado actualmente cuyo principio activo es una molécula perteneciente a la familia de los "agonistas de serotonina", cuya indicación principal es el tratamiento del dolor de cabeza en los ataques de migraña.

Para la caracterización del API y de los 19 excipientes candidatos a emplear, se ha utilizado el sistema de experto SEDEM.

El sistema SEDEM se basa en la evaluación experimental y en la cuantificación de una serie de parámetros relacionados con las propiedades físicas de las sustancias pulverulentas. Los parámetros y propiedades, se encuentran detallados en diferentes publicaciones [1-6].

Tras la cuantificación, se elaboran una serie de promedios, a partir de los cuales se elabora un cálculo final: el IGC o Índice de Buena Compresibilidad, que cuantifica la idoneidad de la materia para ser comprimida (en escala de 1 a 10).

Tras la evaluación del principio activo estudiado se pretende seleccionar, desde un punto de vista teórico, el excipiente(s) que mejor corrige las carencias del principio activo a fin de diseñar el mejor comprimido posible mediante compresión directa.

Resultados y Discusión:

Primeramente se ha caracterizado el API. Tras el estudio se comprueba que presenta propiedades deficientes para la compresión directa. El valor de IGC obtenido es 4.30, lo cual indica claramente que no es una materia apta para su compresión directa de forma natural. En la tabla 1 se muestran los resultados de dicha evaluación y en la figura 1 se muestra la representación gráfica de los parámetros SEDEM.

PARAMETRO	PROPIEDAD FÍSICA	VALOR	PRO-MEDIO
Dimensional	Da	5.80	7.25
	Dc	8.70	
Compresibilidad	Ie	4.79	6.79
	Ic	6.67	
	Icd	8.93	
Deslizamiento / Fluidez	IH	5.00	1.89
	α	0.67	
	t"	0.00	
Lubrificación / Estabilidad	HR	0.90	5.43
	H	9.96	
Lubrificación / Dosificación	Pf	0.00	1.38
	Iθ	2.75	
Índice de Buena Compresión (IGC)			4.30

Tabla 1: Resultados de los parámetros y promedios del API.

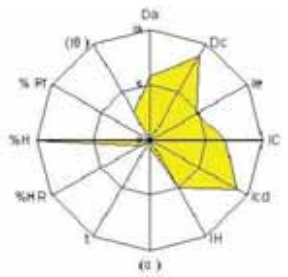


Figura 1. Representación gráfica de las propiedades físicas evaluadas del API.

Tras la evaluación del API, se observa que presenta unas propiedades deficientes (menor a 5) para los parámetros de "Deslizamiento/Fluidez" y "Lubrificación / Dosificación".

Para cada excipiente incluido en el estudio, se desarrolla una fórmula completa (Almotriptán + Excipiente + Lubricantes) usando el sistema de experto. Todas las fórmulas con un IGC mayor a 5, serían viables (8) De las que se seleccionaron tres fórmulas y se hicieron lotes piloto. Posteriormente se llevaron a cabo las determinaciones analíticas necesarias para evaluar si se satisfacen las mismas especificaciones que el producto original. En la tabla 2 se muestran las fórmulas probadas experimentalmente. En la figura 2 se muestra el perfil de disolución de las fórmulas seleccionadas y elaboradas por compresión vía directa.

	MATERIA	FUNCIÓN	CANTIDAD
FÓRMULA A	API	API	37.4 %
	Primogel	Lubrificante/ Deslizante	5.0 %
	Pruv		1.0 %
	Emcompress	Excipiente de compresión	56.6%
FÓRMULA B	API	API	31.9 %
	Primogel	Lubrificante/ Deslizante	5.0 %
	Pruv		1.0 %
	Lactosa Fast Flow	Excipiente de compresión	62.1 %
FÓRMULA C	API	API	30.7 %
	Primogel	Lubrificante/ Deslizante	5.0 %
	Pruv		1.0 %
	Spherolac 100	Excipiente de compresión	63.3 %

Tabla 2. Fórmulas propuestas por el diagrama Sedem que han sido probadas experimentalmente en este estudio.

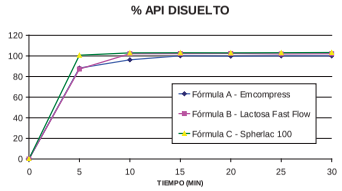


Figura 2. Perfil de liberación de las tres fórmulas elaboradas

Conclusión
Como se ha evidenciado las 3 fórmulas fueron viables, con los beneficios que ello supondría a la compañía

Referencias:

[1] J.M. Suñé Negre, M. Roig Carreras, R. Fuster García, C. Hernández Pérez, R. Ruhí, Roura, E. García Montoya, M. Miñarro Carmona, P. Pérez Lozano, J.R. Ticó Grau, 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] Pilar Pérez, Josep M. Suñé-Negre, Montserrat Miñarro, Manel Roig, Roser Fuster, Encarna García-Montoya, Carmen Hernández, Ramón Ruhí, Josep R. Ticó, A new expert systems (SeDeM diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products, Eur. J. Pharm. Biopharm. 64 (3) (2006) 351–359.
[3] J.M. Suñé Negre, P. Pérez Lozano, M. Miñarro Carmona, M. Roig Carreras, R. Fuster García, C. Hernández Pérez, R. Ruhí, E. García Montoya, J.R. Ticó Grau, Application of the SeDeM Diagram and new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2008) 1029–1039.
[4] J.E. Aguilar-Díaz, E. García-Montoya, P. Pérez-Lozano, J.M. Suñé-Negre, M. Miñarro, J.R. Ticó, The use of the SeDeM diagram expert system to determine the suitability of diluents-disintegrants for direct compression and their use in formulation of ODT, Eur. J. Pharm. Biopharm. 73 (2009) 414–423.
[5] M. Suñé Negre, P. Pérez Lozano, M. Miñarro Carmona, M. Roig Carreras, R. Fuster García, C. Hernández Pérez, R. Ruhí, E. García Montoya, J.R. Ticó Grau, Optimization of parameters of the SeDeM diagram expert system: Hausner index (IH) and relative humidity (%RH), European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2011; 79: 464-472.
[6] Aguilar-Díaz J E, García-Montoya E, Suñé-Negre J M, Pérez-Lozano P, Miñarro M, Ticó JR. Predicting orally disintegrating tablets formulations of ibuprophen tablets. An application of the new SeDeM-ODT expert system. Eur J Pharm Biopharm, 2012; 80, 638-648

SOLUBILIZACIÓN DE ETOXZOLAMIDA CON POLÍMEROS DE CICLODEXTRINA PARA LIBERACIÓN CONTROLADA EN ADMINISTRACIÓN OCULAR

M.J. García-Fernández[1], N. Tabary[2], B. Martel[2], A. Concheiro[1], C. Alvarez-Lorenzo[1]

[1]Departmento Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España
[2]Unité Matériaux Et Transformation (UMET), Ingénierie des Systèmes Polymères, Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve D'Ascq, France

Introducción:
El glaucoma es una enfermedad progresiva que, al cursar con una elevación de la presión intraocular, provoca compresión y daño de las fibras del nervio óptico. El tratamiento de elección consiste en administrar fármacos que reducen la presión intraocular. La administración por vía sistémica requiere dosis altas para alcanzar concentraciones eficaces en las estructuras oculares, lo que puede causar efectos secundarios graves. Este es el caso de los inhibidores de la anhidrasa carbónica, un enzima ampliamente distribuido en diversos órganos y tejidos del cuerpo humano, por lo que los efectos secundarios del tratamiento por vía oral son numerosos (1). Por otra parte, la aplicación tópica ocular cuenta con importantes limitaciones por la reducida biodisponibilidad ocular y la corta duración de efectos. Además, en el caso de los fármacos de elevada permeabilidad corneal, se hace necesario aplicar procedimientos de hidrosolubilización adecuados. En este trabajo se evalúan las posibilidades que ofrecen los polímeros de ciclodextrina (CD) como transportadores capaces de formar complejos de inclusión con el inhibidor de la anhidrasa carbónica etoxzolamida (EtOX; solubilidad en agua 21.38 mg/L; LogP= 2.01). Para preparar los polímeros, se partió de α-CD, β-CD, γ-CD, metil-β-CD, e hidroxipropil-β-CD y se utilizó como agente reticulante ácido cítrico, siguiendo un procedimiento de química verde previamente desarrollado (2). Como control, para evaluar la eficacia del proceso de complejación, se preparó un polímero de maltrodextrina. Una vez sintetizados los polímeros, se evaluó su capacidad para solubilizar EtOX en medio salino y para ceder de forma controlada el fármaco, utilizando como referencia las CDs de partida.

Materiales y Métodos:
Polimerización. Se prepararon disoluciones en agua (200 mL) de cada una de las CDs y de maltrodextrina (Laisa Roquette, France; 20 g) con ácido cítrico (Sigma Aldrich, Francia; 20 g) e hipofosfito sódico dihidrógeno (Sigma Aldrich, Francia; 6 g). El agua se evaporó en un rotavapor a 60ºC-80ºC hasta obtener un film en las paredes del balón. A continuación se llevó a cabo la polimerización, sumergiendo el balón en un baño de aceite a 140ºC y aplicando vacío durante 30 minutos. El polímero resultante (Figura 1) se redispersó en agua (200 mL) y el sistema se filtró a vacio para eliminar la fracción insoluble. La disolución resultante se concentró en rotavapor y se dializó frente a agua (2 L) utilizando una membrana de MWCO 6000-8000 Da (Spectra/Por Dialysis®, France). El medio se cambió cada 12 h. Transcurridos tres días, la disolución se concentró de nuevo en rotavapor y se liofilizó.

Figura 1: *Esquema de la estructura de un polímero de CD en el que se utilizó ácido cítrico como reticulante (2).*

HET-CAM test. La biocompatibilidad se evaluó depositando 0.3 ml de una disolución al 10% de los polímeros en la membrana corioalantoidea de huevos incubados siguiendo el protocolo ICCVAM (3).
Solubilización. Se prepararon disoluciones de CD, maltrodextrina, polímero de CD y polímero de maltrodextrina en NaCl 0.9%, cubriendo un amplio intervalo de concentraciones, y a las que se añadió EtOX en exceso (1 mg/mL). Los sistemas se mantuvieron 48 h bajo agitación magnética, se filtraron (membrana de 0.45μm) y se diluyeron con mezcla etanol:NaCl 0.9% (0.7:0.3) para cuantificar la cantidad de EtOX disuelta por espectrofotometría UV (303nm; Shimadzu UV 1800, Japón).
Ensayos de difusión. Se prepararon disoluciones de EtOX con cada una de las CD (0.75 y 1.5%) y los polímeros sintetizados (1.5% y 3%) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de difusión utilizando tubos células de difusión Franz-Chiez utilizando una membrana de diálisis de MWCO 500-1000 Da (Spectra/Por® Cellullose Ester, Spectrum lab, Francia) como separador entre los compartimentos dador (3 ml de disolución) y receptor (7 ml de NaCl 0.9% con SDS 0.3%).

Resultados y Discusión:
Polimerización. Los polímeros de CD presentaron un contenido en CD próximo al 50% en peso.
HET-CAM test. Todos los polímeros de CD superaron el test *in vitro* de referencia para evaluar la compatibilidad con tejidos oculares sin causar daño en la membrana corioalantoidea.
Solubilización. Las CDs libres en disolución incrementaron de manera muy notable la solubilidad de ETOX en NaCl 0.9%, en particular la β-CD y la hidroxipropil-β-CD (Figura 2). La maltodextrina también mejoró la solubilidad, lo que indica que el fármaco puede interaccionar hidrofóbicamente con los anillos de glucopiranosa.

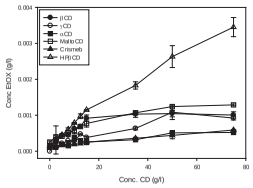


Figura 2: Diagrama de solubilidad de EtOX en NaCl 0.9% en presencia de distintas CDs y maltodextrina.

La polimerización aumentó la capacidad solubilizante, principalmente la de γCD (Figura 3).

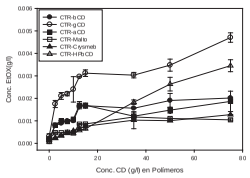


Figura 3: Diagrama de solubilidad de EtOX en NaCl 0.9% en presencia de polímeros de diferentes CDs y maltodextrina.

Ensayos de difusión. La formulación de EtOX en dispersiones de CDs y de sus polímeros proporcionó perfiles de cesión sostenida durante al menos 24 h (Figura 4).

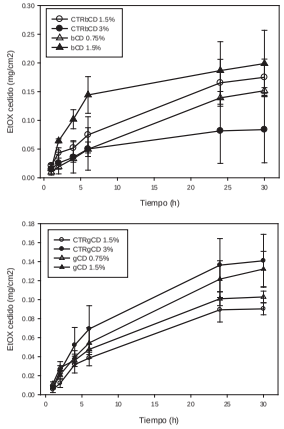


Figura 4: Perfiles de cesión de EtOX a partir de formulaciones conteniendo CDs y sus polímeros.

Conclusiones:
Las CDs y sus polímeros obtenidos por condensación con ácido cítrico mostraron una elevada capacidad para hidrosolubilizar EtOX y para regular el proceso de difusión del fármaco.

Referencias:
(1) Ribeiro A, et al. Receptor-based biomimetic NVP/DMA contact lenses for loading/elutiong carbonic anhydrase inhibitors. J. Membr. Sci. 383: 60-69 (2011).
(2) Blanchemain N, et al. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. Carbohyd. Polym. 90: 1695-1703 (2012).
(3) NICEATM-ICCVAM, In vitro test method for detecting ocular corrosives and severe irritants. http://iccvam.niehs.hih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_hetcam.htm 2012.

Agradecimientos
Trabajo financiado por la Xunta de Galicia (10CSA203013PR), MICINN (SAF2011-22771) y FEDER. M.J.G.F. agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España una beca para movilidad de estudiantes de programas de doctorado con Mención hacia la Excelencia.

β-CYCLODEXTRIN-CONJUGATED HYDROGELS FOR OCULAR RELEASE OF A NOVEL ANTIBACTERIAL N-ALLYL THIOSEMICARBAZONE

R.J. Glisoni[1,2], M.J. García-Fernández[3], M. Pino[4], G. Gutkind[2,4], A.G. Moglioni[2,5], C. Alvarez-Lorenzo[3], A. Concheiro[3], A. Sosnik[1,2]

[1]BIONIMED, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Argentina. [2]CONICET, Argentina. [3]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Spain. [4]Department of Microbiology and [5]Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Introduction:
In the last decades, soft contact lenses (SCLs) have been thoroughly investigated as a technology platform for the localized sustained release of drugs in the treatment of ocular pathologies [1]. SCLs can improve the bioavailability and prolong the half life of ophtalmic drugs in the ocular mucosa. On the other hand, the search for new antimicrobial agents for the treatment of ocular pathologies is under constant development. This work investigated the synthesis of two types of hydrophilic networks functionalized with β-CD for the localized release of a novel antimicrobial 5,6-dimethoxy-1-indanone N4-allyl thiosemicarbazone [2,3]; namely: i) networks of pHEMA-co-β-CD prepared through conventional free radical polymerization using a polymerizable β-CD derivative (mono-MA-β-CD) [4]; and ii) networks prepared by direct cross-linking of HP-β-CD and HP-β-CD/HPMC (1.0% w/v) with EGDE [5].

Materials and Methods:
Materials. 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Methacrylic acid anhydride (MAA), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), 2,2'-azo-bis(isobutyronitrile) (AIBN), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA, 98%), ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE, 50%), hydroxypropylmethyl cellulose K4M (HPMC K4M) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (Madrid, Spain). Beta-cyclodextrin (β-CD) and hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) were supplied by Roquette-Laisa (Valencia, Spain). 5,6-Dimethoxy-1-indanone N4-allyl thiosemicarbazone (TSC) was synthesized and purified as reported in our previous work [2].

Synthesis of crosslinked pHEMA-co-β-CD networks. Mono-MA-β-CD previously synthesized (0.0, 0.6 and 1.2 g) was solubilized in HEMA (constant volume of 6.0 mL; final concentration of mono-MA-β-CD was 0%, 10% and 20% w/v, respectively). Two methods were employed to incorporate TSC: (i) during-copolymerization loading (DP) and (ii) post-copolymerization loading (PP). In the case of DP systems, TSC (6.0 mg) was firstly solubilized in HEMA (6.0 mL) and mono-MA-β-CD, yielding a final TSC concentration of 1.0 mg/mL in the mixture. Then, EGDMA (8.0 mM) and AIBN (10.0 mM) were added and the mixture injected into a mold of 0.4 mm thickness. Then, the molds were dried heated at (i) 50 ºC (12 h) and (ii) 70 ºC (24 h). In the case of PP systems, the same production procedure was followed, though without the addition of TSC. After polymerization, pHEMA sheets were weighed and immersed in boiling water (1 L) for 15 min to remove unreacted monomers and to facilitate the cutting of 10-mm disks.

Synthesis of super-hydrophilic hydrogels (SHHs) of HP-β-CD and HP-β-CD/HPMC. HP-β-CD (4.8 g), NaOH solution (0.2M, 16 mL) and EGDE (crosslinker agent, 8 mL) were thoroughly mixed. The final reaction mixture (24 mL) was divided into aliquots A and B (12 mL each). HPMC K4M (0.12 g) was added exclusively to aliquot B (12 mL), yielding a final concentration of 1% w/v. Then, aliquots A and B were stirred (15 min), poured into thin-glass tubes (diameter of 5 mm) and heated at 50 °C (12 h). SHHs were obtained by breaking down the tubes and washing the crosslinked networks with (i) water (12 h), (ii) 10 mM HCl (12 h) and (iii) water (24 h). Finally, SHHs were cut into 5 mm diameter disks with a scalpel and dried in an oven at 40 °C (24 h).

In vitro release in artificial lacrimal fluid. Disks were loaded with TSC by soaking into a TSC suspension in water (250 μg/mL, 10 mL), stirred at 25 ºC for 24 h or 96 h, and then immersed into artificial lacrimal fluid (10 mL) at 25 ºC and the TSC released was monitored by UV-Vis spectrophotometry (λabs = 331 nm)

Antibacterial activity of TSC-loaded hydrogels. The agar diffusion method of Müller-Hinton (pH 7.2-7.4, 25 ºC; 4 mm of agar height) was used to evaluate the antimicrobial activity of (i) free TSC (200 μg of TSC in a paper disk), (ii) TSC-free SCLs and SHHs and (iii) TSC-loaded SCLs and SHHs, against *Pseudomona aeruginosa* (strain 9027) and *Staphylococcus aureus* (strain 6538P). The turbidity standard of 0.5 in the McFarland scale is used to adjust the turbidity of the inoculum. The incubation temperature was between 35 and 37 ºC for 24 h.

Results and Discussion:
The networks resultant of the application of the two synthetic procedures were transparent and showed high affinity for water. Immersion in artificial lachrymal fluid resulted in a 93 to 43% degree of swelling for pHEMA networks of low to high content in mono-MA-β-CD. The swelling of SHHs reached 400%.
Regardless of the method used for the drug loading (DP or PP), pHEMA networks slowly released TSC (**Figure 1A-C**). SHHs showed the smallest TSC loading capacity (**Figure 1D**). This result was expected owing to the extremely low aqueous solubility of the drug and the high hydrophilicity of these hydrogels. On the other hand, it is important to stress that pHEMA-co-β-CD and SHHs systems sustained the release of the loaded TSC for at least two weeks (**Figure 1**) and maintained concentrations within the antimicrobial therapeutic window.

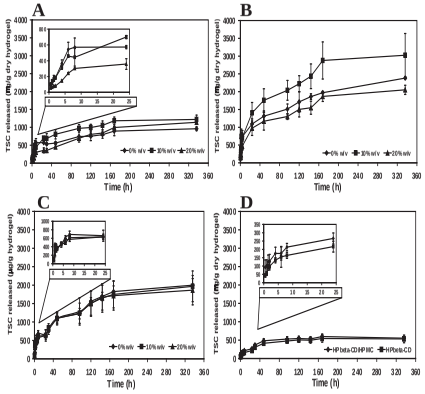


Figure 1. (A-C) TSC release kinetics from pHEMA-based SCLs prepared with different percentage of mono-MA-β-CD and **(D)** SHHs based on HP-β-CD and HP-β-CD/HPMC. **(A)** DP method, **(B)** PP method with stirring of 24 h in TSC suspension, **(C)** PP method with stirring of 96 h in TSC suspension and **(D)** PP method with stirring of 24 h in TSC suspension. Figure insets show the release during the first 24 h.

Finally, the microbiological evaluation showed the inhibition of bacterial growth, although the inhibition zones were not large surface at 24 h of incubation (**Figure 2**). These results suggest that TSC levels were within the therapeutic window and could be evaluated in animal models with promising results.

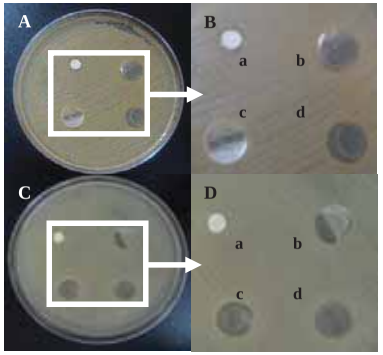


Figure 2. Antibacterial activity in **(A,B)** *Staphylococcus aureus* and **(C,D)** *Pseudomona aeruginosa* cultures after 24 h of incubation on agar Müller-Hinton. **(a)** Paper disk loaded with 200μg of TSC (positive control), **(b)** SCL without TSC (negative control), **(c)** TSC-loaded SCL obtained by the PP method and **(d)** TSC-loaded SCL obtained by the DP method.

Conclusions. Incorporation of the safe pharmaceutical excipient CD to hydrophilic networks can open novel possibilities of development networks suitable as ocular bandages or SCLs that can host therapeutic amounts of a novel TSC that displays a broad antibiotic spectrum. The systems engineered provided a well-controlled sustained release for at least two weeks. Moreover, they inhibited the growth of two prominent bacteria associated with ocular infections.

References
[1] Alvarez-Lorenzo C., et al. J. Drug Del. Sci. Tech., 20, 237–248 (2010).
[2] Glisoni R.J, et al. New J. Chem. 34, 2047-2058 (2010).
[3] Glisoni R.J, et al. Pharm. Res. 29, 739-755 (2012).
[4] Rosa dos Santos J.F., et al. Acta Biomater., 4, 745-755 (2008).
[5] Rodriguez-Tenreiro C., et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 66, 55-62 (2007).

Acknowledgments: R. Glisoni thanks the doctoral scholarship of CONICET. Work supported by the Iberoamerican Thematic Network "Red iberoamericana de nuevos materiales para el diseño de sistemas avanzados de liberación de fármacos en enfermedades de alto impacto socioeconómico (RIMADEL)" of the CYTED Program, and by FEDER, Xunta de Galicia (10CSA203013PR) and MICINN (SAF2011-22771), Spain.

PELETS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PROPRANOLOL A BASE DE COPRECIPITADOS DEL FÁRMACO CON EUDRAGIT L100 O S100

L.C.L. Sá-Barreto[1], R. Martínez-Pacheco[1,2], J.L. Gómez-Amoza[1,2]
[1]Departmento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, España
[2]Instituto de Farmacia Industrial. Universidad de Santiago de Compostela, España

Introducción:
Las formas orales multiparticulares de liberación controlada cuentan con numerosas e importantes ventajas sobre las de tipo monolítico (1). Sin embargo, para conseguir un control eficaz y duradero del proceso de cesión requieren, en especial si contienen fármacos hidrosolubles, el recubrimiento con materiales adecuados de las pequeñas unidades que las componen, lo que supone un claro incremento de complejidad tecnológica en su elaboración (2). Partiendo de estos hechos, el objetivo de este estudio es evaluar la utilidad de pelets de estructura matricial elaborados por extrusión-esferonización, en los que un fármaco catiónico de marcada hidrosolubilidad (propranolol) se incorpora coprecipitado con un copolímero aniónico (Eudragit L100 o Eudragit S100), como sistemas de liberación controlada.

Materiales y Métodos:
Materiales: Eudragit L100 y Eudragit S100 (cedidos por Evonik), Trietilcitrato (Merck), Propranolol ClH (Roig Farma S.A.), Avicel PH101 (Guinama).
Preparación y caracterización de los coprecipitados: Disolución secuencial del copolímero, el agente plastificante (trietilcitrato) y el fármaco en mezcla de 2-propanol:acetona:agua 73:24:3 a 50ºC con agitación mecánica. Eliminación del disolvente en estufa con circulación forzada de aire a 40ºC durante 4 días. Pulverización del coprecipitado formado y selección de la fracción granulométrica 50-140 µm. La composición de los coprecipitados objeto de estudio se presenta en la Tabla 1. La caracterización de los coprecipitados se llevó a cabo por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (TA Instruments Q100, muestras de 3-4 mg, cápsulas cerradas en atmósfera de nitrógeno con flujo 50 mL min^{-1} y velocidad de calefacción 10ºC min^{-1}) y por difracción de rayos X (Siemens D5005, monocromador de grafito y ánodo de Cu, intervalo 3-60º2Θ, velocidad de barrido 0.01º2Θ s^{-1}).
Preparación y caracterización de los pelets: Para la preparación de las formulaciones, cuya composición se detalla en la Tabla 1, se aplicó el siguiente procedimiento: mezclado de los componentes sólidos (Turbula T2C, 30 rpm, 10 min), humectación de las mezclas con agua (malaxadora Kenwood, 10 min), extrusión de las masas humectadas (Caleva 25, malla 1 mm, 60 rpm), esferonización de los pelets (Caleva 120, plato de 12 cm con hendiduras de 1 mm, 10 min a 1200 rpm) y desecación en estufa con circulación forzada de aire (40ºC, 24 h). La caracterización de los pelets incluyó tamaño y forma (Microscopía óptica, Olympus SZ-CTV, 625 pelets, diámetro de Feret y circularidad), friabilidad (Friabilómetro USP, 25 rpm 15 min, 100 perlas de vidrio de 4 mm de diámetro), microestructura (porosimetría de intrusión de mercurio, Micromeritics Autopore II 9215) y velocidad de disolución de propranolol (Turu Grau USP29, tampón pH 1.2 0-1.5 h y tampón pH 6.8 1.5-12 h, 900 mL, 50 rpm).

Código	Componentes de los coprecipitados				Avicel PH 101 (%)	Agua (mL/ 100g)
	Prop. ClH(%)	TEC (%)	L100 (%)	S100 (%)		
L6P3	5,0	0,9	30	-	64,1	72
L9P3	3,3	0,9	30	-	65,8	74
L12P3	2,5	0,9	30	-	66,6	75
S6P3	5,0	0,9	-	30	64,1	67
S9P3	3,3	0,9	-	30	65,8	67
S12P3	2,5	0,9	-	30	66,6	68

Tabla 1. Composición de las formulaciones en pelets objeto de estudio.

Resultados y Discusión: Los termogramas DSC obtenidos con los coprecipitados (Figura 1) muestran la desaparición del pico endotérmico de fusión del fármaco, claramente visible para las mezclas físicas copolímero-fármaco de igual composición, que sugiere que el propranolol en los coprecipitados se encuentra predominantemente en estado amorfo. Los resultados de los estudios de difracción de rayos X ratifican esta afirmación. Para todas las formulaciones objeto de estudio, se obtuvieron pelets de características morfológicas y de resistencia mecánica adecuadas, sin que se observasen fenómenos de erosión o aglomeración significativos (Tabla 2).
Las curvas acumuladas de intrusión de mercurio (Figura 2) muestran aspectos comunes para las distintas formulaciones evaluadas, con un fuerte predominio de poros de tamaño comprendido entre 1 y 0,1 µm. No obstante, hay que destacar que la porosidad de los pelets elaborados con la variedad Eudragit S100 resulta claramente mayor que la de sus equivalentes obtenidos con la variedad L100.

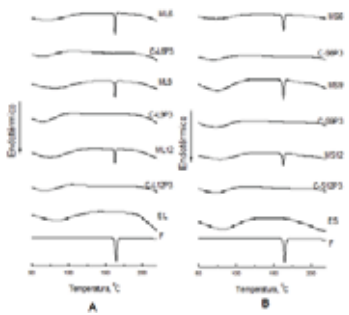


Figura 1.- Termogramas DSC de los coprecipitados (C) y de las mezclas físicas (M). (A) Eudragit L100; (B) Eudragit S100.

Código	Diámetro de Feret (µm)	Circularidad	Friabilidad (%)
L6P3	893,45 (110,87)	0,97(0,02)	0,09
L9P3	865,34 (87,96)	0,98(0,02)	0
L12P3	710,57 (199,48)	0,97(0,03)	0
S6P3	645,60 (152,00)	0,97(0,04)	0,06
S9P3	670,45 (130,64)	0,95(0,04)	0,02
S12P3	560,95 (164,83)	0,88(0,07)	0,08

Tabla 2.- Características granulométricas, morfológicas y de resistencia mecánica de las formulaciones objeto de estudio.

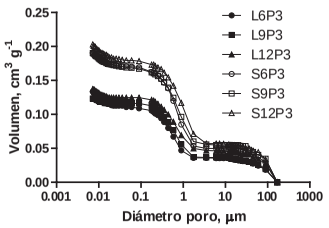


Figura 2.- Curvas acumuladas de intrusión de mercurio correspondientes a las formulaciones objeto de estudio.

En la Figura 3 se han condensado las curvas medias acumuladas de disolución de propranolol. En medio ácido, todas las formulaciones muestran un claro efecto *burst* cuya magnitud es fuertemente dependiente de la variedad polimérica y, en menor medida, de la proporción de fármaco incorporado. La diferente intensidad de las interacciones fármaco-polímero (derivada de la distinta proporción de grupos carboxilo/ester de las dos variedades de Eudragit) podría justificar este comportamiento.

En medio de disolución pH 6.8, se observan diferencias muy marcadas en los perfiles de disolución de propranolol en función de la variedad polimérica incorporada a los pelets. Así, las formulaciones elaboradas con Eudragit L100 ceden el fármaco de acuerdo con una cinética de orden 1, sin que existan diferencias importantes atribuibles a la proporción fármaco/polímero. En cambio, con la variedad S100 se obtienen cinéticas orden 0 con velocidades de disolución comprendidas entre 2.5 y 4.5% de la dosis de propranolol/hora. Estas diferencias en el comportamiento de los dos Eudragit deben atribuirse a un efecto combinado del diferente perfil pH-solubilidad y de la diferente capacidad viscosizante de las dos variedades (3) y de la, ya comentada, diferente porosidad de los pelets que originan.
La formulación que contiene Eudragit S100 con la menor proporción fármaco/polímero permite minimizar el efecto *burst* (<10%) y mantener, durante períodos de tiempo sucientemente prolongados, una liberación de propranolol a velocidad constante.

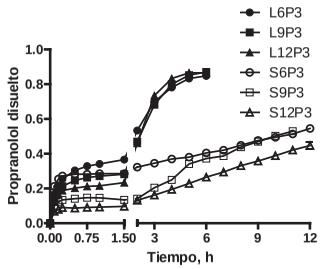


Figura 3.- Curvas medias acumuladas de disolución de propranolol de las formulaciones objeto de estudio.

Referencias:
(1) Gómez-Carracedo y col., Eur. J. Pharm. Biopharm., 67 (2007) 236-245.
(2) Asghar L.F.A. y col., J. Pharm. Pharm. Sci., 9 (2006) 327-338.
(3) Evonik Technical Information. Info 7.3/E (October 2011).

Agradecimientos:
- A Evonik por el suministro desinteresado de las muestras de Eudragit.
- Este estudio se ha desarrollado dentro del proyecto 07CSA006203PR (Xunta de Galicia).

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSA PARA MODULAR EL PASO DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

M. González-Alvarez[1], I. Gonzalez-Alvarez[1], C. Coll[2], E. Aznar[2], F. Sancenón[2], R. Martínez-Máñez[2], M. Bermejo[1]

[1]Depto. de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández, Elche.
[2]Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València
[3]CIBER en Biotecnología, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER_BBN)

Introducción: Las nanopartículas de sílice mesoporosa han demostrado desde hace unos años un gran potencial como componentes de formas farmacéuticas por su capacidad para albergar en su interior gran cantidad de fármaco, versatilidad y su biocompatibilidad. En un sistema básico, el fármaco se almacena en los poros y la liberación de la especie encapsulada se produce por difusión. A este sistema se le puede añadir una funcionalización externa con distintas moléculas que actúan como puertas moleculares lo cual permite una liberación controlada de la carga en respuesta a diferentes estímulos externos. En este sentido, el objetivo de este trabajo es la obtención de dispositivos nanoscópicos con función de puerta molecular que sean capaces de internalizarse en la célula y cuya apertura esté controlada por un proceso enzimático. Estos materiales híbridos deben ser capaces de incluir la carga en el interior de los mesoporos hasta que estén en presencia de las enzimas en el interior de la célula. De esta manera se pretende conseguir modular el paso de sustancias a través de la barrera hematoencefálica que está muy limitado para gran número de fármacos entre los que se incluyen fármacos hidrófilos y fármacos sustrato de transportadores efflux como la glicoproteína P

Materiales y Métodos: Para la preparación de estos materiales se selecciona como soporte las nanopartículas de sílice mesoporosa MCM-41 por sus características de porosidad homogénea, biocompatibilidad y facilidad de funcionalización. Este material se sintetiza mediante la polimerización del tetraetil ortosilicate sobre moléculas de bromuro de hexadeciltrimetilamonio que es un surfactante que actúa como agente director de la estructura. Posteriormente, se elimina el tensioactivo mediante calcinación en aire a temperaturas de 550ºC lo cual da lugar a la formación de los poros del sólido. En esas cavidades se introduce el colorante control (Safranina) o los fármacos elegidos (Metoprolol, Atenolol, Celiprolol o Cortisol). La carga del material se lleva a cabo realizando una suspensión de nanopartículas en una disolución acuosa del compuesto a introducir. Esta mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. De esta manera el fármaco difunde hacia el interior de los poros. El último paso consiste en funcionalizar la superficie externa del material con las moléculas orgánicas seleccionadas para que actúen como puertas moleculares. En este caso se ha elegido el Glucidex® 47 que es un hidrolizado de almidón disponible comercialmente que contiene 5% glucosa 50% maltosa, 45% oligosacáridos y polisacáridos. Estos derivados de almidón se hidrolizan específicamente con amilasas que están presentes, entre otros sitios, en los lisosomas celulares. Como técnica de anclaje de los derivados de almidón se ha empleado la sililación.

La caracterización de los materiales se ha llevado a cabo mediante técnicas estandard en la química del estado sólido: difracción de Rayos-X de polvo y microscopia electrónica de transmisión (TEM)

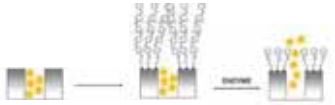


Figura 1. Mecanismo de liberación del fármaco en presencia de amilasas

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron resuspendiendo 5 mg de sólido en 12.5 mL de H2O y 5 mL de sólido en una disolución de enzima α-amilasa. Se determina el perfil de liberación recogiendo alícuotas de las suspensiones a los tiempos prefijados, filtrándolas con filtros de teflón y determinando la cantidad de fármaco mediante la técnica analítica necesaria. La figura 1 muestra un esquema de cómo se produciría la liberación del fármaco contenido en el interior de las nanopartículas.

Para los estudios de permeabilidad a través de la barrera hemtoencefálica se ha utilizado la línea celular MDCK. Las células 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 encapsulado en las nanopartículas se mantuvo en incubación 2.5 h con agitación, pasadas las cuales, 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.

Resultados y Discusión: Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por difracción de Rayos-X de polvo y microscopía electrónica de transmisión. Los difractogramas de polvo de los sólicos MCM-41, MCM-41 calcinada y los sólidos finales muestra los picos de reflexión a los valores esperados (figura 2). Las imágenes de TEM de la MCM-41 calcinada y de los sólidos finales muestran que el material sintetizado corresponde a partículas esféricas con diámetros de 100 a 200 nm que muestran la típica porosidad de la matriz MCM-41. Los datos de los difractogramas de rayos X de polvo y de TEM demuestran que tanto el cargado de los poros como la posterior funcionalización externa no modifican la estructura tridimensional inicial del material mesoporoso.

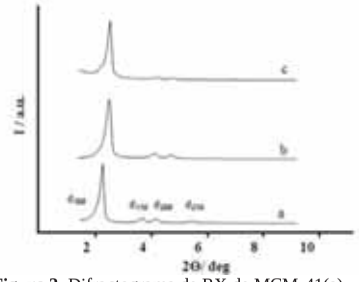


Figura 2. Difractograma de RX de MCM-41(a), MCM41 calcinado (b) y el sólido híbrido(c).

Los ensayos de liberación se iniciaron estudiando la liberación del material híbrido cargado con el fármaco en ausencia de enzima a pH= 7.5. Los resultados obtenidos para todos los sólidos indicaron que la liberación del compuesto es prácticamente nula incluso después de 24 horas. Ensayos de idénticas características realizados en presencia de la enzima α-amilasa a pH= 7.5 revelaron que se producía la liberación continua de los distintos fármacos durante un período de varias horas. La figura 3 muestra los resultados obtenidos para el material híbrido cargado con Metoprolol

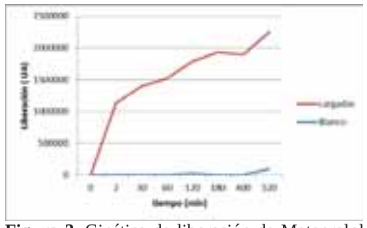


Figura 3. Cinética de liberación de Metoprolol desde una suspensión de nanopartículas de sílice mesoporosa funcionalizada con Glucidex®47 en ausencia y presencia de enzima.

Los ensayos de permeabilidad en monocapas MDCK revelaron que el encapsulamiento de los fármacos daba lugar a diferencias en su permeabilidad respecto al fármaco libre. Los resultados más prometedores se han obtenido con el celiprolol el cual cuando está encapsulado en la nanopartícula permite el paso al compartimento receptor de cantidades de fármaco significativamente superiores

En conclusión, se han preparado con éxito nanoparticulas porosas de metoprolol, celiprolol, atenolol y cortisol, se ha comprobado la funcionalidad del mecanismo de activación de la cesión y se ha determinado su capacidad de internalizarse en la barrera hematoencefálica. Lo que demuestra que esta estrategia es prometedora para incrementar el paso de sustancias a través de la barrera hematoencefalica

Referencias:

(1) Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J. M.; Amorós, P. Enzyme-Responsive Controlled Release Using Mesoporous Silica Supports Capped with Lactose. Angew. Chem., Int. Ed. 2009, 48, 5884–5887. 73. Park, C.; Kim, H.; Kim, S.;

(2) Bernardos,A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Pérez-Payá, E., Guillem, C.; Amorós, P. Enzyme-Responsive Intracellular Controlled Release Using Nanometric Silica Mesoporous Supports Capped with "Saccharides". ACS Nano, 2010, 4 (11), 6353-6368

(3) Mangas-Sanjuán, V.; González-Alvarez, M.; González-Alvarez, I.; Bermejo, M.V. Drug penetration across the blood¿brain barrier: an overview. Therapeutic delivery, 2011

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS BLOQUE (PLGA-PEG-PLGA) TERMOSENSIBLES PARA EL DISEÑO DE PREPARADOS INYECTABLES INTRAOCULARES DE LIBERACIÓN PROLONGADA.

JB. Fariña, A. González, C. Monzón, A., V. Valeron, A. Santoveña, A. Oliva y M. Llabrés.
Departmento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna, España

Introducción.

La necesidad de administrar medicamentos biotecnológicos en preparados inyectables de liberación modificada, ha llevado al desarrollo de ha llevado al desarrollo y optimización de sistemas poliméricos termosensibles que responden a pequeños cambios en la temperatura de su entorno con transiciones reversibles sol-gel. Este tipo de sistemas permiten preparar dispersiones acuosas que fluyen como líquidos a temperatura ambiente y gelifican a la temperatura corporal (~37ºC) formando un deposito de cuyas propiedades físico-químicas depende la velocidad y el tiempo al que se cede el principio activo. Son varios los polímeros, copolimeros y combinaciones de estos que se han utilizado con estos fines y que permiten prolongar la liberación desde días hasta meses, cabe resaltar por su baja toxicidad los hidrogeles de poloxameros y sus mezclas con el ácido hialurónico (1) o los copolímeros bloque de polietilenglicol (PEG) y poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) que se ensamblan en copolímeros tribloque tipo A-B-A (PEG-PLA-PEG o PEG-PLGA-PEG) o B-A-B (PLGA-PEG-PLGA (2). Estos últimos aparte de su baja toxicidad, son biodegradables y si se adecúan las condiciones de preparación y su composición, permiten ajustar la liberación a los requisitos específicos deseados. El objetivo del presente trabajo es la síntesis y caracterización de copolímeros tribloque de PLGA-PEG-PLGA con composición monomérica, PM y biocompatibilidad adecuados para preparar hidrogeles termosensibles, con propiedades reológicas aptos para la administración parenteral y el control de la liberación de fármacos de diferente naturaleza.

Materiales y Métodos.

Reactivos: Polietilenglicol 1000 y 1500 (Fluka), D,L Lactida y Glicolida (Aldrch), etilhexanoato de estaño (Sigma). Síntesis del PLGA-PEG-PLGA: Se utilizo el método propuesto por Zentner y cols (2), utilizando un mini reactor que permitió un control preciso del tiempo y temperatura de proceso, vacío y agitación. Las variables utilizadas para modificar las propiedades del copolímero fueron el PM del PEG de partida, el tiempo de vacío. Caracterización de los copolímeros: Los monómeros residuales en el polímero se analizaron por UPLC, en fase inversa y detector UV-VIS. El PM y la distribución de PM de los copolímeros por cromatografía de permeación en gel (GPC) en tetrahidrofurano utilizando 4 columnas en serie y con doble detección (Refractometro diferencial y Difracción de Luz Laser Multiángulo (MALLS). La proporciones de láctico/glicólico/PEG de los polímeros se determinaron por ^{1}H-RMN en cloroformo deuterado. Preparación de los Hidrogeles: Con el objetivo de preparar hidrogeles que presenten transiciones reversibles sol-gel en el entorno de los 37ºC se prepararon dispersiones acuosas con los copolímeros obtenidos con concentraciones entre el 10% y el 25% (p/p). Caracterización de los hidrogeles: Las propiedades de gelificación de los hidrogeles preparados a diferentes concentraciones se estudiaron determinando las temperaturas críticas mínimas de gelificación (LCGT) y de disolución (LCST) y máxima de disolución (UCST) y construyendo los diagramas de fase. Las propiedades viscoelásticas se estudiaron con un reómetro Bholin de geometría plato-plato. La estabilidad se estudio por GPC. La biocompatibilidad de los polímeros se evaluó de acuerdo al test HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) siguiendo el protocolo NICEATM-ICCVAM (3). La bioadhesividad de los polímeros se evaluó con un analizador de textura TA-TX Plus de acuerdo con el método propuesto por Blanco y cols (4)

Resultados y Discusión.

Los resultados del análisis de los polímeros por la técnica de UPLC utilizada nos permiten afirmar que el contenido residual de estos en lactida es < 0,5% (p/p). Las propiedades de los copolímeros obtenidos, PM, polidispersividad y composición, en función de las condiciones de síntesis recogen en la Tabla 1. El copolímero A se preparó partiendo de PEG de PM 1000 y manteniendo la conexión del vacío en el reactor abierta durante las ocho horas de síntesis, mientras que el copolímero B se preparó con PEG de PM 1500 y una vez alcanzado el vacío deseado se cerro la conexión del reactor. En la tabla 2 se recogen los resultados de bioadhesión de los copolímeros determinados por triplicado, sobre piel curtida de cabra paquistaní (4). Como puede observarse la bioadhesividad del copolímero B es muy superior a la del A y se mantiene cuando se diluye hasta cuatro veces.

PROPIEDADES		COPOLÍMERO	
		A	B
PM	Mn	3086	4356
	Mw	3307	4908
	Mz	3582	5473
Polidispersividad		1.07	1.13
1H-RMN	LA	33,1%	15,7%
	GA	12,8%	14,8%
	PEG	54,1%	69,5%

Tabla 1: PM relativos a patrones de poliestireno determinados por GPC, polidispersividad y composición monomérica de los copolímeros sintetizados. LA (Láctico). GA (glicólico)

COPOLIMERO	A	B
Trabajo de biadhesión (N·mm)	0.600 (0.100) 0.004 (0.001)*	2.050 (1.060) 1.207 (0.485)*

Tabla 2: Trabajos de bioadhesión evaluados por triplicado con un analizador de textura TA-TX Plus, para los copolimeros concentrados y diluidos y diluidos (1:4) *.

La biocompatibilidad de los copolímeros se determinó de acuerdo al test HET-CAM que nos da una idea de la iritación ocular potencial, mientras que el copolímero B no indujo hemorragia, lisis ni coagulación, el A indujo coagulación cuando se comparó con controles negativos de suero salino isotónico. En la Figuras 1 y 2 se recogen los diagramas de fase de los hidrogeles A y B. Como puede observarse, el hidrogel A no presenta transiciones sol-gel en los intervalos de temperatura estudiados

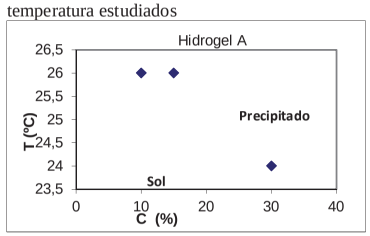


Figura 1. Diagrama de fase de las soluciones acuosas del copolímero A.

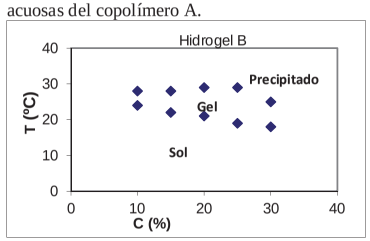


Figura 2. Diagrama de fase de las soluciones acuosas del copolímero B.

En la Figura 3 se recoge la evolución de los módulos elástico y viscoso (G' y G'') con la Tª para el hidrogel B al 25%(p/p). Se observa igualdad entre ambos a la temperatura de gelificación (entre 23,4 y 23,9ºC)

Las condiciones de síntesis universalmente aceptadas para obtener este tipo de copolímeros (2) deberían permitir obtener lotes reproducibles al menos en lo se refiere a su PM y propiedades reológicas. Cuando se controlan los parámetros

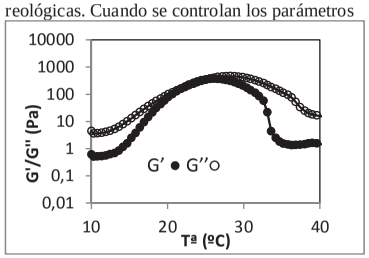


Figura 3. Evolución de G' y G''con la Tª para el hidrogel B al 25% (p/p).

que intervienen en el proceso a través de un mini reactor químico y se cambia el PM del bloque de PEG (de 1 a 1,5 kDa) las propiedades del copolímero obtenido cambian sensiblemente en lo referido a su PM relativo y a su composición final en láctico y glicólico. Cuanto mayor es el contenido en LA y el tamaño de las cadenas de PLGA mayores son las interacciones hidrofóbicas y más bajas son las temperaturas de gelificación (2). El copolímero A es apto para elaborar geles termosensibles para administración intraocular por su biocompatibilidad y por los valores de las temperaturas a las que se producen las transiciones de sol a gel de sus dispersiones acuosas aunque siendo posible aún optimizar sus propiedades para elevar sus LCGTs.

Referencias:

(1) Lee Y, Chung H, Yeo S, Ahn C, Lee H, Messersmith P, Park T. Thermo-sensitive, injectable……., The Royal Society of Chemistry. 2010; 6:977-983.
(2) Chien S, Pieper, R, Webster, DC, Sing J.. Triblock copolymers: synthesis, characterization, and delivery of a model protein. Int. J. Pharm 2005; 288: 207-218.
(3) NICEATM-ICCVAM. In vitro……., http: //iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_hetcam.htm, accessed June 2011
(4) H. Blanco-Fuente, B. Vila-Dorrio, S. Anguiano-Igea, F.J. Otero-Espinar, J. Blanco-Mendez, Tanned leather: A good model f…Int. J. Pharm. 1996; 138, 103-112

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-17083). Nuestro agradecimiento al Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago por su colaboración en la evaluación de la biadhesividad y biocompatibilidad de los copolímeros.

LIBERACIÓN DE KETOPROFENO Y DEXKETOPROFENO TROMETAMOL EN COMPRIMIDOS MATRICIALES DE PADAS Y MANITOL

Margarit Bellver M.V.[1], Rodríguez Galán I.C.[1], García Izquierdo M.L[1], López Navarro A., Rodríguez Galán A.[2]

[1] Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad Farmacia. Universidad de Granada.

[2] Departamento de Ingeniería Química, ETSEIB. Universidad Politécnica de Cataluña. España.

Introducción: Estudios precedentes de la poliesteramida biodegradable y biocompatible poli-(L-alanina-dodecanodioll-L-alanina-sebácico) (PADAS) ponen de manifiesto sus características farmacotécnicas apropiadas (capacidad de flujo y compresibilidad del polvo; resistencia a la rotura y a la erosión del polímero comprimido y resistencia a la disgregación) para formar comprimidos matriciales inertes con cualidades para el control de la liberación (1). Aspecto estudiado en formulaciones de comprimidos de diclofenaco sódico (2).

En este trabajo, se evalúa la aplicación de PADAS como soporte matricial insoluble, para controlar la liberación de ketoprofeno y dexketoprofeno trometamol, analizando la influencia de los fármacos modelo y del diluyente manitol, sustituyente parcial del soporte polimérico en los comprimidos.

Materiales y Métodos: Los comprimidos se formulan con ketoprofeno (K) (Fagron Ibercia), dexketoprofeno trometamol (DK-T), poli-(L-alanina-dodecanodiol-L-alanina-sebácico) (P) preparado por polimerización interfacial, según método descrito por Paredes et al. (3), con un tamaño medio de partícula de 60-125 µm, manitol (M) y estearato magnésico (Guinama, Valencia). Mezclados y homogeneizandos los componentes de las formulaciones indicadas en la tabla 1 se comprimen en prensa hidráulica (Specac) a 5 tons de presión durante 1 minuto. obteniendo comprimidos cilíndricos de caras planas y 10 mm de diámetro.

Tabla 1. Formulaciones de comprimidos con ketoprofeno o dexketoprofeno trometamol.

COMPOSICIÓN POR COMPRIMIDO (mg)						
Componentes	200 P F	150 PM F	100 PM F	50 PM F	0 PM F	Fármaco puro
FÁRMACO (K o DK-T)	100	100	100	100	100	100
PADAS	200	150	100	50	0	—
MANITOL	-----	47	97	147	197	—
ESTEARATO MAGNÉSICO	-----	3	3	3	3	—

También se elaboran cápsulas gelatinosas duras con 100 mg de K o DK-T para determinar el perfil de disolución de los fármacos y comprimidos sin polímero (fórmula 0 PM F) que permiten apreciar la influencia del manitol en la disolución de los fármacos.

Los ensayos de disolución se realizan en el aparato II de paletas en un dispositivo semiautomático (Sotax AT 7 Smart). Con 1000 ml de tampón de fosfato pH 6,8 a 37ºC como medio de disolución; velocidad de rotación de las paletas de 50 rpm. Cada formulación se analiza por sextuplicado durante 24 h. La concentración de K y DK-T se determina por espectrofotometría UV (Perkin Elmer Lambda 2) a una longitud de onda de 259,1 nm y 260 nm respectivamente. Los resultados de disolución-liberación se ajustan a las ecuaciones cinéticas de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

Resultados y Discusión: Las curvas de porcentaje de ketoprofeno liberado/tiempo (fig 1) y DK-T/tiempo (fig.3) ponen de manifiesto la influencia del tipo de fármaco y la presencia de manitol en el comportamiento matricial de la poliesteramida. PADAS retiene al K y prolonga su liberación, cediendo al medio de disolución el 81,36 (%) de la dosis la fórmula 200P K, es decir solo poliesteramida. La sustitución parcial del polímero por manitol incrementa de forma moderada la liberación de K, detectando al final del ensayo el 97,36 % y 100 % de la dosis para las fórmulas con 100 y 50 mg de PADAS respectivamente.

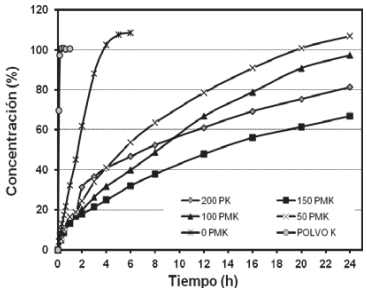


Figura 1. Perfiles de liberación de ketoprofeno

La menor cantidad de manitol incorporada (47 mg/comprimido) en la formulación 150 PM K origina una liberación lenta y gradual de K siendo el 66,89 (%) de la dosis a las 24 h. Tras el ensayo de liberación, los comprimidos con 150 mg de polímero mantienen su morfología y una superficie ligeramente erosionada. La disminución del contenido en polímero matricial (100 PM K) incrementa la erosión en superficie sin llegar a romperse la estructura matricial (fotografías de la fig. 2).

Figura 2. Comprimidos de ketoprofeno con PADAS después de 24 de ensayo.

El estudio cinético (tabla 2) indica que en las formulaciones con PADAS la liberación de K se ajusta mejor a la cinética de Higuchi y el valor del exponente n sugiere que el mecanismo principal de liberación de ketoprofeno es la difusión controlada.

Tabla 2. Parámetros de liberación comprimidos ketoprofeno.

PARÁMETROS CINÉTICOS							
CINÉTICAS		200 PK	150 PMK	100 PMK	50 PMK	0 PMK	Caps. K
ORDEN CERO	K_0	3,13	2,64	4,03	4,46	---	---
	r^2	0,866	0,943	0,967	0,932	---	---
ORDEN UNO	K_1	-0,06	-0,04	-0,13	-0,14	-0,64	-21,65
	r^2	0,973	0,988	0,940	0,988	0,931	0,963
HIGUCHI	K_H	17,114	13,963	20,978	23,702	---	---
	r^2	0,979	0,998	0,990	0,994	---	---
KORSMEYER-PEPPAS	K_{KP}	16,25	12,59	13,26	3,27	---	---
	r^2	0,961	0,997	0,997	0,991	---	---
	n	0,55	0,53	0,64	0,65	---	---
PARÁMETROS IN VITRO							
ABC in Vitro (% · h)		1380,12 ±166,32	1065,76 ± 23,04	1477,93 ± 50,62	1732,06 ± 39,45	446,82 ±47,44	93,55 ±1,60
ED (%)		57,51 ± 6,93	44,41 ± 0,96	61,58 ± 2,11	72,17 ± 1,64	74,47 ± 7,91	93,55 ±1,57
TMD (h)		10,20 ± 1,66	13,34 ± 0,23	9,22 ± 0,51	6,68 ± 0,40	1,53 ± 0,47	0,064 ±0,016

Los comprimidos con DK-T sin manitol (200 PDK-T), y los de formulación 150 PM DK-T alcanzan el Cmax a las 6 h del ensayo. Sin embargo, los comprimidos mantienen su forma hasta el final del ensayo (24 h) como muestra las fotografías de la figura 3.

Figura 3. Comprimidos de dexketoprofeno trometamol tras 24 h de ensayo.

Aun siendo de liberación convencional, la velocidad es algo más lenta que en fórmulas con menor cantidad de PADAS (fig. 3). La poliesteramida no consigue retener el DK-T ajustándose los datos de liberación al modelo cinético de primer orden (r^2=0,992).

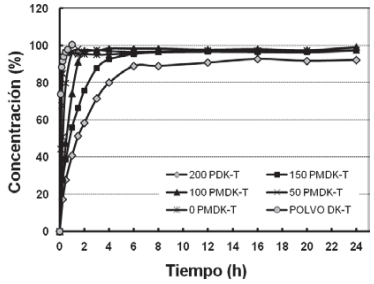


Figura 4. Perfiles de liberación de dexketoprofeno trometamol

La incorporación de manitol en la formulación incrementa la velocidad de liberación, encontrando en el medio de disolución la totalidad de la dosis (100 %) entre la 1 y 4 h de ensayo y la liberación se origina según una cinética de primer orden (tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de liberación de dexketoprofeno trometamol.

PARÁMETROS CINÉTICOS							
CINÉTICAS		200 PDK-T	150 PMDK-T	100 PMDK-T	50 PMDK-T	0 PMDK-T	Caps. DK-T
ORDEN CERO	K_0	13,85	14,08	---	---	---	---
	r^2	0,854	0,735	---	---	---	---
ORDEN UNO	K_1	-0,36	-0,53	-1,79	-3,33	-8,60	-5,17
	r^2	0,992	0,965	0,983	0,999	0,972	0,877
HIGUCHI	K_H	38,43	41,10	---	---	---	---
	r^2	0,987	0,941	---	---	---	---
KORSMEYER-PEPPAS	K_{KH}	38,67	5,60	---	---	---	---
	r^2	0,969	0,968	---	---	---	---
	n	0,49	0,41	---	---	---	---
PARÁMETROS IN VITRO							
ABC in Vitro (% · h)		2026,27 ± 17,15	2199,12 ± 56,40	2290,27 ± 91,16	2301,05 ± 22,23	561,96 ±10,36	90,17 ± 1,73
ED (%)		84,43 ± 0,72	91,63 ± 2,35	95,43 ± 3,80	95,88 ± 0,93	93,66 ±1,73	90,17 ±1,73
TMD (h)		3,74 ± 0,17	2,01 ± 0,56	1,10 ± 0,91	0,99 ± 0,22	0,38 ± 0,10	0,098 ± 0,02

Conclusiones: El polímero PADAS puede considerarse un excipiente soporte matricial adecuado para la elaboración de comprimidos. Controla y prolonga la liberación de ketoprofeno y el manitol permite modular esa liberación. Muestra muy poca eficacia para retener el dexketoprofeno trometamol en la matriz.

Referencias:

(1) Rodríguez et al. XXIX Cong Int. SFML, Granada 2010.

(2) Morales Jerez M. L. Tésis de licenciatura. Granada 2010.

(3) Paredes N et al., J. Appl. Polymer Sci., 69 : 1547-1549, 1998.

Agradecimientos: Trabajo financiado por la Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia 2006 FQM 1370) y por la CICYT (Proyecto MAT 2006- 02406).

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE TRANSFERSOMAS® DE ACETAZOLAMIDA PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

M.J. Cózar-Bernal, A.M. Rabasco, N. Abad, M.L. González-Rodríguez
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

Introducción

Actualmente el fármaco de elección en el tratamiento del glaucoma agudo es acetazolamida (ACZ) por su efectividad en el control de la presión intraocular.

Para facilitar su administración tópica, debido a su baja solubilidad y permeabilidad (clase IV, BCS) y ante la dificultad de los liposomas convencionales para atravesar intactos determinadas capas de la piel o mucosas quedando acumulado el fármaco en el lugar de aplicación, Cevc y Blume propusieron, en 1992, el diseño de vesículas elásticas, Transfersomas®, que poseen una membrana altamente deformable, y son capaces de atravesar el estrato córneo sin ser destruidas, accediendo así a estructuras más internas.

Para ello, se incluyen en su composición los denominados "activadores del borde o margen" en el interior de la matriz fosfolipídica, con el fin de incrementar la elasticidad y deformabilidad de la vesícula (El Zaafarany y cols., 2010). Este tipo de sustancias son habitualmente tensioactivos de cadena única, capaces de ofrecer un elevado radio de curvatura que desestabilicen las bicapas lipídicas de las vesículas e incrementen su deformabilidad (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005).

En el presente trabajo se desarrollan Transfersomas® de ACZ y posteriormente se caracterizarán en cuanto a eficacia de encapsulación, tamaño vesicular, índice de polidispersión y potencial zeta, evaluando la influencia de la adición de tensioactivos de distinta naturaleza, así como la adición de un agente portador de carga positiva a las vesículas y de colesterol.

Materiales y Métodos

Materiales

ACZ (Acofarma, España), colato, desoxicolato y taurocolato sódico, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina semisintética, estearilamina y colesterol (Sigma Aldrich, Alemania), Hepes, acetato de sodio, lauril sulfato sódico y demás disolventes (Panreac Química S.A., España).

Estudios de solubilidad

Con el fin de obtener una formulación capaz de incorporar la máxima cantidad de fármaco, ACZ se repartirá entre la bicapa lipídica y el compartimento acuoso de las vesículas.

En primer lugar se llevará a cabo un estudio en placas de solubilidad (*Solvinert, Millipore)* en presencia de Hepes, adicionándole distintos tensioactivos: colato sódico, desoxicolato sódico y taurocolato sódico, que formarán parte de la bicapa y que van a conferir a los liposomas la deformabilidad deseada.

La incorporación de fármacos poco solubles en medio acuoso, como es el caso de ACZ, en formulaciones de liposomas, resulta un tanto compleja. Normalmente, este tipo de compuestos forman parte de la bicapa lipídica de las vesículas. Sin embargo, la adición de una fracción de la dosis en el compartimento acuoso puede ser beneficiosa en términos de estabilidad e incremento de la encapsulación del fármaco. Para ello se ha recurrido a un estudio de cosolvencia con PEG400 y glicerina, con el fin de favorecer la incorporación del fármaco en el espacio acuoso.

Elaboración de vesículas multilaminares

Los Transfersomas® se elaboraron utilizando la técnica de evaporación en capa fina o Bangham (*TLE, Thin Layer Evaporation*).

La mezcla de lípidos (fosfolípidos y colesterol), el activador del borde y la ACZ se disolvieron en una mezcla de cloroformo: metanol (3:2 v/v) El disolvente orgánico se evaporó bajo presión a 58 ºC hasta obtener una fina película. Ésta se hidrató con una solución de Hepes/PEG400 (70:30) mediante cinco ciclos intermitentes de vortex y calor a 50 ºC. Tras su elaboración, se sometieron al proceso de extrusión con el fin de obtener poblaciones unilaminares más homogéneas. Las vesículas se almacenaron a 4 ºC hasta su uso.

Caracterización de los sistemas

Para caracterizar correctamente los sistemas elaborados se procedió secuencialmente al estudio de tamaño por espectroscopía de correlación fotónica. Se determinó la carga superficial utilizando un *Zetasizer Nano ZS*. La eficacia de encapsulación se determinó por dos métodos, extracción en fase sólida y extracción por centrífuga.

Para cuantificar de forma precisa la ACZ, se desarrolló un método analítico isocrático de fase reversa por HPLC, cuya fase móvil está compuesta por acetonitrilo y solución de acetato sódico 0.05 M ajustada a pH 4.1 (10:90 v/v), utilizando un flujo de 0.8 mL/min.

Resultados y Discusión

Tras el estudio de solubilidad de ACZ en los tensioactivos seleccionados, se puede observar en la figura 1, que en los tres casos, conforme aumenta la concentración de tensioactivo, se incrementa la solubilidad de la ACZ en Hepes.

No obstante, dicho incremento no es tan considerable en presencia de taurocolato sódico debido a la diferente capacidad de estos tensioactivos para autoasociarse en estructuras agregadas (Mithani y cols., 1996). Se ha obtenido una mayor solubilización del fármaco en el caso de desoxicolato sódico debido a que se encuentra en una concentración superior al intervalo de CMC, adquiriendo una conformación de hélice, a diferencia de los otros tensioactivos, que poseen estructura micelar mayoritariamente (Cross y cols., 2011).

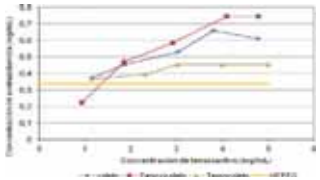


Figura 1. *Cantidad de ACZ solubilizada en función de la concentración de tensioactivos.*

Para incrementar la cantidad de fármaco solubilizado en el compartimento acuoso, se estudió la solubilidad de ACZ en disolventes no polares (PEG 400 y glicerina), obteniéndose que una disolución al 10% p/v de PEG 400 solubiliza 1.77 veces mejor que la disolución al 10% p/v de glicerina (Kawakami y cols., 2006). Por ello, seleccionamos la disolución al 10% p/v de PEG 400 como codisolvente. Posteriormente, se estableció el porcentaje de éste en la mezcla PEG 400/Hepes. Como se observa en la figura 2, a medida que aumenta la proporción de PEG 400, se incrementa la cantidad de ACZ solubilizada. También se aprecia que con este cosolvente al 40% y al 80%, se consigue aumentar mucho más la solubilidad del fármaco. En relación a este hecho, hay que valorar, ante todo, que la formulación de estas vesículas estará destinada a la administración oftálmica y, por consiguiente, no debe superar una proporción del 40% por lo que estableceremos la proporción 60/40 (Rowe, 2009).

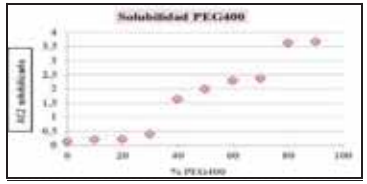


Figura 2. *Cantidad de ACZ solubilizada en función de la proporción de PEG 400.*

Con respecto a la caracterización física de los sistemas vesiculares (tabla 1) podemos observar una clara diferencia entre Transfersomas® extruidos y sin extruir (302 nm *vs* 1343 nm) mostrando un índice de polidispersión mucho más homogéneo las formulaciones extruidas.

En cuanto a los valores de potencial zeta, no se ven modificados por el proceso de la extrusión.

	Tamaño (nm)		IP		Potencial zeta (mV)	
	SE	E	SE	E	SE	E
Cargados	1343 ± 381.1	302 ± 0.47	1 ± 0	0.09 ± 0.02	14.6 ± 0.9	16.7 ± 0.65
	SE	E	SE	E	SE	E
Blancos	1139 ± 0.23	339.2 ± 9.46	1 ± 0	0.05 ± 0.004	15.6 ± 0.9	17.7 ± 0.65

Tabla 1. *Datos de tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta para lotes sin extruir (SE) y extruidos (E).*

Para cuantificar la ACZ encapsulada se han desarrollado y comparado dos métodos de extracción. Como se observa en la tabla 2, la eficacia de encapsulación obtenida tras tratar las muestras con ambos métodos, tiene valores similares en vesículas sin extruir. Sin embargo, en las muestras extruidas, la eficacia de encapsulación se ve aumentada más de un 200% cuando la extracción se hace con centrífuga.

	Extracción Fase sólida		Extracción Centrífuga	
	SE	E	SE	E
EE (x ± sd)	18.1 ± 10.5	10.5 ± 4.7	16.1 ± 5.3	26.8 ± 3.6

Tabla 2. *Datos de eficacia de encapsulación para lotes sin extruir (SE) y extruidos (E).*

Conclusiones

A través de los resultados obtenidos puede concluirse que los sistemas elaborados presentan buenas características físicas para atravesar intactos la barrera corneal, pudiendo presentarse como alternativa al tratamiento del glaucoma por vía tópica.

Bibliografía

Cevc y Blume. *Biochim Biophys Acta* 1104: 226-232 (1992).
Cross y cols., *Trends Biochem Sci 36:* 117-125 (2011).
El Zaafarany y cols., *Int J Pharm* 397: 164-172 (2010).
Honeywell-Nguyen y Bouwstra, *Drug Discov Today: Technol* 2: 67-74 (2005).
Kawakami y cols., *Eur J Pharm Sci* 28: 7-14 (2006).
Mithani y cols., *Pharm Res* 13: 163-167 (1996).
Rowe y cols., Handbook of pharmaceutical excipients. 6ª ed. (2009).

Agradecimientos: Este trabajo se ha desarrollado bajo la cofinanciación del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

CYCLOSPORINE A-LIPID NANOSYSTEMS FOR ORAL ADMINISTRATION

M. Guada, E. Imbuluzqueta, A. Estella-Hermoso de Mendoza, M.C. Dios-Viéitez, M.J. Blanco-Prieto
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,
University of Navarra, 31080 Pamplona, Spain.

Introduction

Cyclosporine A (CyA) is a neutral cyclic peptide consisting of 11 aminoacid residues, widely used for the prevention of transplant organ rejection and also for the treatment of several autoimmune disorders. The molecule was first isolated from the fungal extract of *Tolypocladium inflatum* (1). Its structure and its high molecular weight (1203 Da) confer poor biopharmaceutical properties on this substance such as low water solubility and low permeability trough biological barriers (2). Therefore, it is a challenge to formulate an appropriate delivery system that improves its bioavalaibility and thus drug efficacy. To date, lipid nanosystems (LN) seem to be a very promising strategy to overcome the limitations associated with certain drug characteristics including low solubility, poor permeability, instability in the gastrointestinal medium, P-glycoprotein efflux and presystemic drug metabolism (3). Based on this, the main objective was to develop and characterize lipid nanocarriers for CyA oral administration. These novel nanosystems are aimed to modify the biodistribution of the drug, and thus prevent renal toxicity and enhance its oral bioavailability. In order to evaluate the encapsulation efficiency of the new delivery systems obtained, it was necessary to develop and validate an analytical method to quantify CyA in lipid matrices and also in biological samples for future *in vivo* studies. The method was based on ultra high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS).

Material and methods

Development and validation of the UHPLC–MS/MS method

The UHPLC system consisted of an Acquity UPLC™ system (Waters Corp., Milford, MA, USA). Chromatography was performed on an Acquity UPLC® BEH C18 column (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm; Waters, USA) with a mobile phase system consisting of a gradient elution program of a 2 mM ammonium acetate solution with 0.1% formic acid and methanol and with a flow rate of 0.6 mL/min. Column temperature was maintained at 50 °C. The mass spectrometer detection was performed on an Acquity™ TQD (Triple Quadrupole Detector) mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA) with an electrospray ionization (ESI) interface operated in positive mode. The apparatus was set up for multiple reaction monitoring (MRM) to monitor the transition of *m/z* 1220.69→1203.7 for CyA and the transition of *m/z* 646→58 for amiodarone, used as internal standard (IS). The method was validated in terms of linearity, accuracy and between- and within-day precision for both lipid matrices and biological samples.

Application of the UHPLC–MS/MS method to determinate CyA in blood samples

This study was performed in two groups of BALB/c mice (n=6). Animals were given a single dose of 10 mg/kg of CyA as commercial formulations either orally (p.o.) (Sandimmun Neoral®) or intravenously (i.v.) (Sandimmun®). Whole blood samples were withdrawn at 0 h (only after i.v. administration), 1 h, 2 h, 5 h, 8 h, 24 h and 48 h. Finally, samples were pretreated with a protein precipitation method and CyA was quantified by the UHPLC-MS/MS method.

Preparation and characterization of the LN formulations

LN were prepared by hot homogenization followed by ultrasonication method (4). Briefly, 200 mg of lipid (Precirol® ATO 5) and 5 mg of CyA were melted at 70 °C (slightly above of the lipid melting point). Then, 10 mL of a surfactant aqueous solution (mixtures of 2% polyvinyl alcohol (PVA) and 2% sodium taurocholate (TC)) (table 1), preheated at the same temperature were added and homogeneously dispersed by ultrasonication for 4 min. Finally, the formed emulsion was cooled in an ice bath in order to obtain a nanoparticle suspension, washed three times and lyophilized. Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of the LN were evaluated by dynamic light scattering technique and laser Doppler electrophoresis, respectively, using a Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK). Encapsulation efficiency (EE) was determined by the UHPLC-MS/MS method described above.

Results and discussion

Validation of the UHPLC–MS/MS method

The method was linear in the range of 0.001 µg/mL-2.5 µg/mL ($r \geq 0.99$) in methanol and whole blood. Accuracy and precision expressed in coefficient of variation were below 15%. Recoveries in the case of whole blood samples were above 98.72%. This analytical method proved to be suitable and sensitive enough to allow a complete pharmacokinetic study of CyA in mice and to evaluate the contained drug in the new LN formulations.

Blood concentration-time profile of CyA in commercial formulations

CyA blood concentration was quantified in order to determine the pharmacokinetic behavior of the drug when administered as Sandimmun® or Sandimmun Neoral®. Figure 1 depicts the concentration-time course of CyA after its oral and intravenous administration. The drug followed the typical blood concentration-time profile of these administration routes. This study will be a benchmark for comparison with the pharmacokinetic behavior of CyA administered as new nanocarrier systems, and confirmed the suitability of the UHPLC–MS/MS method developed.

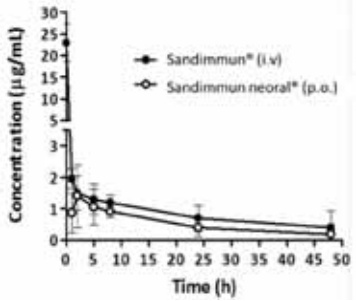


Figure 1. CyA concentration-time profiles after i.v and p.o administration of Sandimmun® and Sandimmun Neoral®, respectively, in BALB/c mice (n=6).

Characterization of LN formulations

Table 1 summarizes the characteristics of the LN formulations developed. Nanoparticles containing PVA in the formulation presented mean diameters below 250 nm, which make them suitable for oral administration However, LN formulated with 100% of TC (LN (0:100)) showed a larger particle size, probably due to the inadequate surfactant effect of TC in this condition. Therefore, this formulation was discarded for further studies. PDI were below 0.2 in all the cases, indicating that LN with a narrow size distribution were obtained. Moreover, zeta potential was negative in all LN formulations, decreasing when the TC concentration in the formulation was increased (-23.0 mV for LN with 0% of TC to -37.5 mV for LN with 100% of it, table 1). Finally, all formulations achieved a high drug encapsulation close to 100%.

Table 1. Physico-chemical characteristics of LN formulations loaded with CyA

LN Formulation (PVA:TC)	Size (nm)	Zeta Potential (mV)	EE (%)
LN (100:0)	241.8	-23.0	99.99
LN (75:25)	223.0	-26.8	99.99
LN (50:50)	227.9	-27.5	97.17
LN (25:75)	220.1	-30.5	99.99
LN (0:100)	537.7	-37.5	91.55

PVA: polyvinyl alcohol, TC: sodium taurocholate, EE: encapsulation efficiency

These LN formulations will be evaluated in future *in vivo* studies, designed to reduce the variability in bioavailability observed with commercially available oral CyA formulations and to avoid toxicity due to high concentrations.

References

(1) Survase SA, Kagliwal LD, Annapure US, Singhal RS. Biotechnol Adv 2011 8;29(4):418-435.
(2) Italia JL, Bhardwaj V, Ravi Kumar MNV. Drug Discov Today 2006 9;11(17-18):846-854.
(3) Harde H, Das M, Jain S. Expert Opin Drug Deliv 2011 Nov;8(11):1407-1424.
(4) Estella-Hermoso de Mendoza A, Préat V, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. J Controlled Release 2011 12/20;156(3):421-426.

Acknowledgements

Caja Navarra Foundation, Ibercaja, University of Navarra (FUN). M. Guada thanks "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" for the fellowship grant.

ESTUDIOS PRELIMINARES DE FORMULACIONES LIPOSOMALES OFTÁLMICAS CON VITAMINA C PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE OJO SECO

M. Caballo-González[1], M. Vicario-de-la-Torre[1], B. de-las-Heras[2], M. Guzmán[3], J.M. Benítez-del-Castillo[4], R. Herrero-Vanrell[1], I.T. Molina-Martínez[1]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
[2]Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
[3]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España.
[4]Unidad Superficie e Inflamación Ocular (USIO), Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, España.

Introducción

El Síndrome de Ojo Seco (SOS) es una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que cursa con síntomas de disconfort, alteraciones visuales e inestabilidad en la película lagrimal con riesgo de dañar la superficie ocular[1].

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para el SOS debido a la compleja composición y carácter dinámico de la película lagrimal. Las lágrimas artificiales constituyen el tratamiento de elección en cualquier estadio de la enfermedad. Los sustitutos lagrimales comercializados no incluyen la totalidad de los componentes de la lágrima natural. No obstante, ha incrementado el número de formulaciones oftálmicas con sustancias para mejorar la película lagrimal desestabilizada, como es el caso de la vitamina C. El ácido ascórbico presenta propiedades antioxidantes protegiendo la superficie ocular del daño oxidativo y favorece la producción de lágrima natural[2]. En solución acuosa es altamente inestable por lo que se recurre al empleo de derivados como son el ascorbato sódico, el palmitoil-L-ascórbico y la sal trisódica 2-fosfo-ascórbica (SAP).

Debido a la importancia de la película lipídica se han desarrollado formulaciones con lípidos en forma de liposomas, capaces de incorporar los dos derivados de la vitamina C, palmitoil-L-ascórbico y SAP, incluidos en la bicapa lipídica o en el núcleo acuoso de las vesículas respectivamente.

El objetivo de este estudio es el desarrollo de formulaciones de administración tópica ocular con una composición semejante a la lágrima natural capaces de estabilizar el film lipídico mejorando la calidad de la lágrima.

Materiales y Métodos

Materiales

Fosfatidilcolina (PC) obtenida de lecitina de soja (Phospholipon 90G®, Phospholipid GmbH). Colesterol (Cht), α-tocopherol (Vit. E), ácido ascórbico, ascorbato sódico, palmitoil-L-ascórbico y sal trisódica 2-fosfo-L-ascórbico (Sigma Chemical Co.).

Estudios preliminares de estabilidad de soluciones con ácido ascórbico y derivados

Determinación del % remanente de ácido ascórbico, ascorbato sódico y SAP en soluciones acuosas (PBS isotónico pH 7,2) por espectrofotometría UV-Vis respectivamente. Muestras protegidas de la luz y almacenadas a temperatura ambiente (25°C) y nevera (2-7°C).

Método de preparación de las formulaciones liposomales

Se han elaborado dos formulaciones liposomales (F-1 y F-2) de acuerdo con la técnica de evaporación del solvente orgánico[3] modificada por Benitez et al[4].

Los componentes de la bicapa lipídica de la **formulación liposomal F-1** son PC:Cht:Vit E:palmitoil-L-ascórbico 8:1:0,8:0,9 (ratio mg/mL). Como medio de dispersión se ha empleado PBS isotónico (280 mOsm/L).

La bicapa lipídica de la **formulación liposomal F-2** contiene PC:Cht:Vit E 8:1:0,8 (ratio mg/mL) utilizándose como medio de dispersión una solución de SAP en PBS isotónico.

A fin de homogeneizar el tamaño y la estructura de las vesículas formadas, se ha procedido a la sonicación y posterior extrusión (Extruder®) en cascada a través de filtros de policarbonato (Nucleopore Lipex Biomembrane™), 10 ciclos a través de membranas con tamaño de poro de 0,8 µm y 10 ciclos a través de membranas con tamaño de poro de 0,22 µm.

La concentración de PC y vitamina C expresada como ácido ascórbico en F-1 y F-2 ha sido de 40 mg/ml y 300 µg/ml respectivamente.

Caracterización de las formulaciones liposomales

Se ha analizado el tamaño de las vesículas lipídicas por espectroscopia de correlación fotónica empleándose un equipo Zetasizer 3000HR (Microtrac Inc).

Del mismo modo se ha estudiado el pH (Crison GLP 21) a temperatura ambiente y osmolaridad (Knauer K-7000) a una temperatura de 33ºC[5].

Estudios de tolerancia in vitro

La tolerancia *in vitro* de las formulaciones se ha determinado a través de medidas de viabilidad celular en dos líneas celulares: conjuntiva humana (IOBA-NHC) y córnea humana (Human Corneal-Limbal Epithelial Cells).

La evaluación de la tolerancia se ha basado en la técnica del MTT a tiempos de exposición cortos (15 minutos) para simular tratamientos breves y largos (1 y 4 horas) para simular tratamientos crónicos. Como control positivo de viabilidad se ha empleado células tratadas con una solución de cloruro de bezalconio (BAC) al 0,005% y como control negativo (viabilidad del 100%) células sin tratar[6].

Resultados y Discusión

Estudios preliminares de estabilidad de soluciones con ácido ascórbico y derivados

El SAP presenta una estabilidad en solución acuosa durante al menos 7 días, sin presentar diferencias significativas con la concentración inicial (p>0,05) tanto a temperatura ambiente como a 2-7°C. Sin embargo, las soluciones de ácido ascórbico y ascorbato sódico muestran una reducida estabilidad en ambas condiciones de almacenamiento (Fig. 1 y Fig. 2).

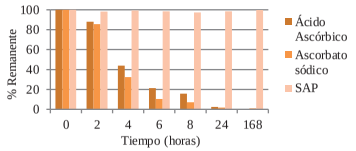


Figura 1. Estabilidad de las soluciones de ácido ascórbico, ascorbato sódico y SAP en PBS isotónico almacenadas a temperatura ambiente (25°C).

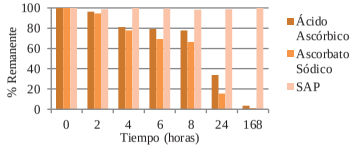


Figura 2. Estabilidad de las soluciones de ácido ascórbico, ascorbato sódico y SAP en PBS isotónico almacenadas en nevera (2-7°C).

Caracterización de las formulaciones liposomales

Las formulaciones liposomales F-1 y F-2 presentan una distribución de tamaño de partícula unimodal (Fig. 3) con valor de diámetro medio volumen 149,6±9,6 nm para F-1 y de 169,7±5,5 nm para F-2.

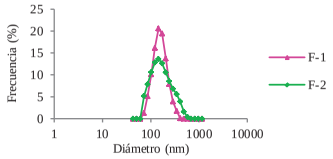


Figura 3. Distribución de tamaño de partícula de las formulaciones liposomales F-1 y F-2 (n=3).

El valor de pH de ambas formulaciones resultó ser próximo a la neutralidad y una tonicidad fisiológica (Tabla 1).

Formulación liposomal	pH	Osmolaridad (mOsm/L)
F-1	7,03 ± 0,04	289,1 ± 4,4
F-2	7,09 ± 0,13	285,7 ± 3,0

Tabla 1. Valores de pH y osmolaridad F-1 y F-2 (promedio ± DE) (n=3).

Estudios de tolerancia in vitro

Los valores de viabilidad celular medios son superiores al 80% en ambas líneas celulares ensayadas (cornea y conjuntiva) para los distintos tiempos de exposición ensayados (Fig. 4 y Fig. 5).

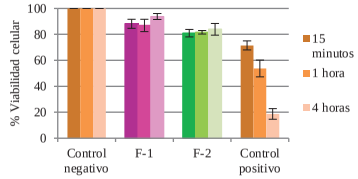


Figura 4. Valores de viabilidad celular de las formulaciones F-1 y F-2 en la línea celular de córnea humana.

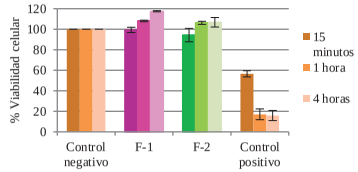


Figura 5. Valores de viabilidad celular de las formulaciones F-1 y F-2 en la línea celular de conjuntiva humana.

Conclusiones

Las formulaciones liposomales F-1 y F-2 desarrolladas en el presente trabajo presentan propiedades óptimas para su aplicación por vía tópica oftálmica. Los estudios de viabilidad celular confirman una tolerancia adecuada en células que conforman la superficie ocular.

Ambas formulaciones presentan características apropiadas para el tratamiento de los síntomas del Síndrome de Ojo Seco.

Referencias

1. Report of The Definition and Classification of Dry eye Disease. *The Ocular Surfac.* 2007; 5(2):75-92.
2. Horrobin DF. et al. Med Hipotheses. 1980; 6:225-32.
3. Bangham AD. et al. *Journal of Molecular Biology.* 1965; 13(1):238-252.
4. Benitez JM. et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(E-Abstract 375).
5. Purslow C. et al. Eye & Contact Lens. 2005 ; 31:117-23.
6. Urtti A. et al. *Pharmaceutical Research.* 1998; 15:1275-1280.

Agradecimientos

FIS PI10/00645 y PI10/00993 y Grupo de Investigación UCM 920415 (GR35/10-A).
Dr. Ilene K. Gipson (Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA-EEUU) por la línea celular de córnea humana.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF SURFACE-MODIFIED PLGA NANOPARTICLES FOR CANNABINOIDS ORAL DELIVERY

I. Muñoz-Rubio, L. Martín-Banderas, J. Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, M.A. Holgado
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville,
c/ Profesor García González, nº 2, 41012 Seville, Spain
holgado@us.es

Introduction: PLGA nanoparticles (PLGA-NPs) have proved to be very efficient in improving drug absorption after oral administration. However, PLGA-NPs have some difficulties which tends to limit their intracellular uptake leading a lower bioavailability, such as a slight negative surface charge or the recognition on the reticulo-endothelial system (RES) of hydrophobic particles as foreign (1). To solve these limitations, modification of NP surface properties can be achieved either by coating NP surface with hydrophilic stabilizing, bioadhesive polymers and surfactants or by incorporating biodegradable copolymers containing a hydrophilic moiety (2).

In the present work CB13, 1-Naphthalenyl[4-(pentyloxy)-1-naphthalenyl] methanone have been employed as a model drug. It is a CB1/CB2 dual agonist which displays potent antihyperalgesic activity in animal models and limited brain penetration. On the other hand, CB13 is a cannnabinoid derivate highly lipophilic which belongs to class II compounds, and as a consequence of its poor solubility and dissolution in the gastrointestinal fluids, is incompletely absorbed (3). The objective of our work is to elaborate CB13-loaded-PLGA NPs and to modify their surface in order to improve CB13 oral bioavailability.

Materials and Methods: 1-Naphthalenyl[4-(pentyloxy)-1-naphthalenyl]methanone (CB 13) (Tocris, Great Britain), Resomer® RG 502 H (PLGA) (Boehringer Ingelheim, Germany), Chitosan low MW, Span® 60, Tween® 80, Pluronic® F-68 and Coumarin-6 and Nile-red as fluorochromes (Sigma-Aldrich, Germany). Eudragit RSPO (Mw: 32,000 g/mol) was a generous gift from Evonik Röhm GmbH (Germany). Acetone PRS, HPLC-grade acetonitrile, acetic acid and DMSO were purchased from Panreac (Spain); threalose and HCl were obtained from VWR (Spain). Vitamin E (BASF Chem Trade GmbH, Germany) and lecithin (Cargill Texturizing Solutions, Spain).

Formulation of the PLGA particles:

The NPs were prepared by a nanoprecipitation method (4). Briefly, a co-solution of PLGA (1.5% w/v) and Span®60 (0.5% w/v) in acetone was added dropwise at 5 mL/h using a syringe pump into 15 mL Pluronic® F68 aqueous solution (0.5% w/v) under magnetic stirring. After acetone evaporation, the suspension was centrifuged to collect the NPs. After washing twice, the NPs were re-suspended in a threalose aqueous solution (5% w/v) used as cryoprotectant and then, the NPs were freeze-dried. For CB13-PLGA loaded NPs, the polymer and drug were co-dissolved in acetone.

NPs surface modification:

To produce surface modified-PLGA NPs, four mucoadhesive additives were assayed: Chitosan, Eudragit RSPO, Lecithin, and Vitamin E. Additives, at different concentrations, were co-dissolved in the polymer solution, except for chitosan, which was added in an additional step (after NP formation).

Characterization methods: the mean particle size and particle size distributions were measured at room temperature by laser scattering (Partica LA-950 V2, Horiba). Geometry and surface morphology were determined by scanning electron microscopy (SEM) (Philips XL-30, Philips Electron Optics) and transmission electron microscopy (TEM) (Philips CM-10, USA). NPs surface charge was evaluated by measuring zeta potential values (ZP) at r.t. (Malvern Mastersizer 2000). CB13 content was determined by HPLC (Hitachi LaChrom® (D-7000) Series) and expressed in terms of entrapment efficiency (EE %).

For *in vitro* drug release, NPs samples were suspended in phosphate buffer (pH=7.4) containing 0.1%w/v of Tween® 80, maintained at 37 ºC and stirred mechanically. Aliquots were withdrawn at fixed time intervals and filtered upon centrifugation at 10000 rpm. The filtered sample was injected into the HPLC apparatus for the evaluation of CB13 (5).

Ex vivo assays were also carried out in order to evaluate the mucoadhesion properties of each sample. For this purpose the falling liquid film technique was carried out (6).

Results and Discussion: The main physicochemical characteristics of PLGA-NPs surface-modified (CB13-loaded or non-CB13-loaded) were listed in Table 1 in terms of particle size (nm), drug encapsulation efficiency (%) and ZP (mV). Related to particle size, NPP method allowed obtaining particles in the nanoscale range with almost narrow particle size distribution in all formulations. Studying each formulation in deep, there are obtained expected results. For PLGA-Eu-NPs, was obtained the smallest particle size. However, when NPs were incubated in CS (PLGA-CS-NPs) mean diameter of the nanoparticles increased up to 45 %.

Different values for ZP were obtained as a function of the additive employed. ZP values for plain PLGA-NPs were used as control. PLGA-Tc-NPs and PLGA-Lc-NPs showed slighter negative value. However, the PLGA-Eu-NPs and PLGA-CS-NPs ZP values were strongly positive. So, these two formulations are *a priori* the most suitable for an oral administration.

PLGA-NPs	Size ± SD (nm)	ZP ± SD (mV)	EE ± SD (%)
Control NPs Blank	289,65 ± 97,90	-32,70 ± 0,50	-
Control NPs CB13	22,34 ± 113,55	-35,60 ± 1,10	71,04 ± 2,33
Eu-NPs Blank	09,65 ± 113,33	16,10 ± 1,40	-
Eu-NPs CB13	25,31 ± 131,80	11,80 ± 0,60	85,45 ± 3,09
CS-NPs Blank	37,75 ± 116,33	57,70 ± 2,90	-
CS-NPs CB13	20,07 ± 193,00	59,00 ± 1,10	91,59 ± 0,87
Lc-NPs Blank	96,65 ± 103,50	-21,00 ± 1,70	-
Lc-NPs CB13	37,79 ± 125,10	-16,10 ± 0,40	80,85 ± 1,98
Tc-NPs Blank	20,97 ± 119,70	-18,80 ± 0,40	-
Tc-NPs CB13	43,71 ± 173,20	-17,10 ± 0,50	77,78 ± 2,82

Table 1. Physicochemical characteristics and drug loading of PLGA-NPs surface-modified.

SEM and TEM micrographs for CB13-PLGA-NPs surface-modified NPs showed in all cases spherical and smooth particles (data not shown).

Results obtained for drug content are summarized in Table 1. In terms of entrapment efficiency (EE %), high values were achieved for all formulations of NPs developed, due to the poor solubility of CB13 in the external aqueous phase. In all cases EE was superior to 70%, reaching a higher value to 90% for PLGA-CS-NPs.

The representative CB13 *in vitro* release profile from PLGA-NPs surface modified showed the typical drug release mechanisms in PLGA-based delivery systems. Moreover, after conducting the test during 15 days, no hydrolysis products were detected CB13 or degradation, indicating that the system keeps the CB13 in the structure of the developed nanocarrier (data not shown).

Finally, the results of mucoadhesion properties for PLGA-Eu-NPs and PLGA-CS-NPs are shown in figure 3. For this assay, NPs were died with nile red. A freshly excised porcine small intestine 15 cm pieces were cut from the intestine (duodenum, jejunum and ileum sections) and washed with physiological saline (37°C). Then, 600 µL of NPs suspension in PBS (or dye solution, as control) were added dropwise, this step was repeated ten times. The fluorescence intensity of the final residual solution was measured with a plate reader (λex = 380/40 nm, λem = 460/40 nm). As it can be seen in figure 1, CS-PLGA NPs showed the higher mucoadhesion strength. These results were in accordance with ZP values obtained.

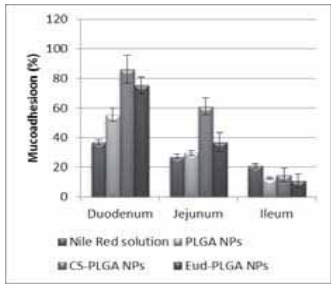


Figure 1. Mucoadhesion strength of PLGA NPs containing CB13 (error bar: SD)

Conclusions: Different additives to modify the surface of CB13 loaded-PLGA nanoparticles have been employed in order to improve CB13 oral bioavailability. After *in vitro* and *in vivo* evaluation, NPs containing chitosan and Eudragit RSPO were the most suitable formulations. For these additives, NPs were 300-420 nm in diameter and presented positive ZP values which improved the mucoadhesion strength to the intestinal mucosa as *ex vivo* assays demonstrated.

References:

(1) F. Danhier et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, J. Control. Release, 2012; 161: 505-22.

(2) Martin-Banderas et al. Functional PLGA nanoparticles for oral drug delivery: recent strategies and developments. Mini Rev Med Chem 2012 (in press).

(3) E.K. Dziadulewicz et al. Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl) methanone: A potent, orally bioavailable human CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration. J. Med. Chem., 2007; 50: 3851-6.

(4) H. Fessi et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, Int. J. Pharm. 1989; 55: R1–R4.

(5) M. Hombreiro-Perez et al. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling J. Control. Release 2003; 88: 413-28.

(6) Belgamwar et al. Formulation and evaluation of oral mucoadhesive multiparticulate system containing metoprolol tartarate: an in vitro-ex vivo characterization. Curr. Drug Deliv. 2009; 6(1):113-121.

Acknowledgments: Financial support from Junta de Andalucía, Spain, Project P09-CTS-5029, is gratefully acknowledged. I. M-R. is specially grateful for the financial support from Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Spain.

ESTUDIO COMPARATIVO DE FORMULACIONES DE GEMCITABINA ELABORADAS MEDIANTE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DE DISOLVENTES Y FLOW FOCUSING®

J.L. Arias[1], L. Martín-Banderas[2], M.M. Durán-Lobato[2], J. Álvarez-Fuentes[2], M. Fernández-Arévalo[2], M.A. Holgado[2]
[1]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
[2]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España.
e-mail: holgado@us.es

Introducción: Uno de los principales problemas relacionados con la quimioterapia empleada en clínica actualmente es la reducida acumulación que el agente antitumoral alcanza en la masa de células malignas. Diversos factores contribuyen a esta situación, por ejemplo, una intensa metabolización (y aclaramiento presistémico), junto a una extensa distribución de la sustancia activa en el organismo. Además, los antineoplásicos utilizados suelen caracterizarse por una escasa especificidad de acción (1). Un claro ejemplo de esta situación lo constituye la gemcitabina: molécula que tiene una muy rápida metabolización sistémica ($t_{1/2}$ < 17 min) (2). Recientemente, se ha propuesto su incorporación en coloides biodegradables de naturaleza polimérica para optimizar su eficacia y seguridad en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (2, 3). Su vehiculización en estos sistemas intenta asegurar la concentración de la dosis de este quimioterápico en la masa tumoral, a la vez que pretende una mínima biodistribución. En este sentido, la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) puede presentar interesantes posibilidades como matriz biocompatible y biodegradable, ampliamente utilizada en el diseño de nanopartículas (NPs) para el transporte de fármacos (4).
El objetivo de la presente contribución es diseñar y optimizar NPs de PLGA conteniendo clorhidrato de gemcitabina, como *nanocarriers* de este antineoplásico. Para ello, se compararon dos técnicas de síntesis mediante diversas caracterizaciones fisicoquímicas: el método de doble emulsión con evaporación de disolventes (DE/SEV) y la novedosa técnica de *Flow Focusing*® (FF).

Materiales y Métodos: El agua utilizada en todos los experimentos fue desionizada y filtrada antes de su uso (Milli-Q, Millipore, Francia). Todos los reactivos utilizados tenían calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania).
En los dos métodos de síntesis de NPs de PLGA se utilizó idéntica cantidad polímero (2.5%, p/v) disuelto en etilacetato. Se desarrollaron 2 formulaciones (sin carga de fármaco y cargadas) para cada método de elaboración empleado. La síntesis de NPs de PLGA mediante DE/SEV y FF ha sido previamente puesta a punto por nuestro grupo de investigación (5), siendo las únicas variantes introducidas en este trabajo: (a) la velocidad de agitación (8000 rpm) en el método DE/SEV, y (b) las velocidades del fluido enfocante (mezcla agua:etanol 1:1, 2 mL/min) y del fluido enfocado (emulsión A/O, fase acuosa: solución de gemcitabina, fase oleosa: PLGA en etilacetato, 0.1 mL/h), para el método de FF.
La caracterización fisicoquímica de las NPs obtenidas se realizó mediante SEM y PCS (geometría), y electroforesis (potencial zeta, ζ, en función del pH del medio de dispersión). La incorporación de gemcitabina en las partículas de PLGA y su posterior liberación *in vitro* (37 ºC y pH 7.4, método de diálisis) se cuantificó mediante un método validado de espectrofotometría UV-Vis (269 nm). La vehiculización de este principio activo se indicó en términos de *entrapment efficiency* (*EE* %). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión: El método de síntesis basado en la técnica FF permitió obtener NPs con una distribución de tamaños notablemente homogénea (655 ± 79 nm, índice de polidispersión: 0.054). Sin embargo, la técnica de DE/SEV condujo a la preparación de micropartículas con una heterogénea distribución de tamaños (3800 ± 1300 nm, índice de polidispersión: 0.257). En ambos casos, la incorporación de gemcitabina en las partículas no tuvo una clara influencia en la geometría de éstas, mostrando siempre una morfología esférica.
Por otro lado, en comparación con el método DE/SEV, se lograron valores de *EE* (%) de gemcitabina muy superiores mediante el método FF (figura 1). Por ejemplo, cuando la concentración utilizada de fármaco era 1 mM, este parámetro pasó de 57.5 ± 5.2 % (DE/SEV) a 97.3 ± 0.1 % (FF). Como puede apreciarse en la figura, existe un efecto positivo de la concentración de agente antitumoral utilizada sobre la incorporación alcanzada en las partículas de PLGA. De forma complementaria, las determinaciones de los valores de potencial zeta de las partículas de PLGA (cargadas con gemcitabina y sin carga) tuvieron como objetivo principal la estimación cualitativa del tipo de vehiculización obtenida en los dos tipos de síntesis: adsorción superficial o absorción en matriz.

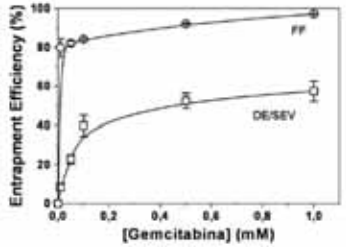


Figura 1. Valores de *EE* (%) de gemcitabina en las partículas de PLGA en función del método de elaboración: DE/SEV (□) y FF (○).

Como puede apreciarse en la figura 2, los perfiles electrocinéticos de las partículas cargadas con fármaco coinciden con aquéllos correspondientes a las partículas sin carga. Estos resultados ponen de manifiesto que el tipo de incorporación lograda ha sido la absorción en matriz. Por otro lado, queda patente que el tipo de síntesis utilizada no influye en las propiedades electrocinéticas en función del pH (ζ) de las partículas de PLGA.

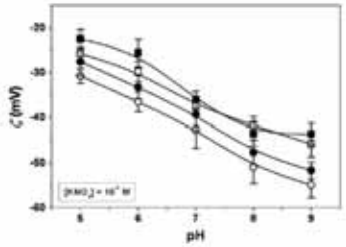


Figura 2. Potencial zeta (ζ, mV) de las partículas de PLGA sin fármaco (método DE/SEV: ■, método FF: ●) y con gemcitabina (método DE/SEV: □, método FF: ○), en función del pH y a fuerza iónica constante (KNO_3 10^{-3} M).

Por último, la preparación de las partículas de PLGA mediante la técnica FF asegura una liberación de gemcitabina mucho más sostenida en el tiempo, lo cuál unido al tamaño nanométrico del sistema, hace que esta estrategia de formulación sea *a priori* la más idónea para fines terapéuticos. La figura 3 muestra cómo en ambos casos el perfil de liberación es bifásico, si bien más rápido en el caso de las micropartículas (DE/SEV, completo en 72 h). La liberación de gemcitabina desde las nanopartículas preparadas mediante FF transcurre con una primera fase de liberación rápida del fármaco situado más externamente en la matriz (≈ 30 % en 6 h), seguida de una fase lenta (completa en 102 h) debida a la difusión de este agente y a la degradación polimérica.

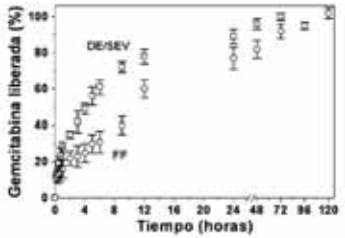


Figura 3. Perfiles de liberación de gemcitabina (%) desde las partículas de PLGA preparadas mediante DE/SEV (□) y FF (○), en una solución tampón NaOH-KH_2PO_4 (pH 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 ºC.

Conclusiones: Se han comparado dos estrategias de síntesis de partículas de PLGA cargadas con gemcitabina. Este estudio ha demostrado que el método FF es claramente mejor que el DE/SEV: se obtienen partículas más pequeñas, con una mayor capacidad de carga del antitumoral y con un perfil de liberación mucho más sostenido en el tiempo. La utilidad de estas nanopartículas en la mejora de la actividad de gemcitabina se encuentra en evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Referencias:

(1) Davis ME et al. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nat. Rev. Drug Dicov. 2008;7:771-82.
(2) Reddy LH, Couvreur P. Novel approaches to deliver gemcitabine to cancers. Curr. Pharm. Design. 2008;14:1124-37.
(3) Arias JL et al. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. Biomacromolecules. 2011;12:97-104.
(4) Holgado MA et al. Possibilities of poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) in the formulation of nanomedicines against cancer. Curr. Drug Targets. 2011;12:1096-111.
(5) Cózar-Bernal MJ et al. Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. J. Microencapsul. 2011;28:430-41.

Agradecimientos: Ingeniatrics Tecnologías S.L., Sevilla, España; Proyecto FIS 11/02571 (Instituto de Salud Carlos III, España).

CYCLODEXTRIN-POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES FOR THE ORAL DELIVERY OF CAMPTOTHECIN

J. Huarte, S. Espuelas, J.M. Irache

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology; University of Navarra,

Pamplona, Spain

Introduction:

Camptothecin (CPT) is a topoisomerase I inhibitor that was first isolated from the bark of *Camptotheca acuminata* in 1966. Athough it shows powerful anticancer activity, it has great limitations such as poor solubility and stability [1].

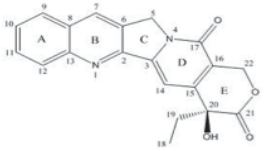


Figure 1. Camptothecin. Chemical structure.

When administered orally, camptothecin and its analogues display a high variability and a low bioavalability due to their physicochemical characteristics and their presystemic metabolism wich has been related with the fact that they are substrates of both the intestinal P-glycoprotein (P-gp) and the cytochrome P450 enzyme complex (CYP 450) [2].

Recently, the combination between cyclodextrins and poly(anhydride) nanoparticles have been found to be effective to increase the *ex vivo* permeability [3] and the oral bioavailability [4] of paclitaxel. These cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles would conduct the loaded drug to the surface of the enterocyte in which their cargo would be released. Then, the presence of the oligosaccharide would inhibit the activity of both P-gp and CYP450 allowing the absorption of the anticancer drug.

The aim of this work was to prepare and characterize CPT-loaded nanoparticles. For this purpose, three different cyclodextrins have been studied: sulfopropylated-β-cyclodextrin (SP-NP), hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-NP) and methyl-β-cyclodextrin (M-NP).

Materials and Methods:

Materials

Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) or poly(anhydride) (Gantrez® AN 119; MW 200,000) was kindly gifted by ISP (Barcelona, Spain). Sulfopropylated-β-cyclodextrin was provided by Cyclolab (Hungary), hydroxypropyl-β-cyclodextrin and methyl-β-cyclodextrin were provided by Sigma (Spain). CPT was purchased from 21CEC PX PHARM Ltd (UK). Acetone was obtained from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Deionized water (18.2MΩ resistivity) was prepared by a water purification system (Wasserlab, Pamplona, Spain). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

CPT-CD-PVM/MA nanoparticles preparation

Nanoparticles containing CPT were prepared by a solvent displacement method previously described [3] with some modifications. Briefly, 100 mg of poly(anhydride), 18 mg of cyclodextrin and a 4.5mg of CPT (1:1 molar ratio of CD:CPT) were dispersed in 5 ml of acetone. Inmediately, the nanoparticles were formed by the addition of ethanol and water. After elimination of the organic solvents, the resulting suspensions were filtered through a 0.45 µm membrane and purified twice by centrifugation. The supernatants were removed and the pellets resuspended in water. Finally, the formulations were frozen and freeze-dried (Genesis 12EL, Virtis, USA) using sucrose (5%, w/w) as cryoprotector.

Characterization of nanoparticles

The particle size and the zeta potential of nanoparticles were determined in a Zeta Plus apparatus (Brookhaven Instruments Corporation). The morphological examination of the nanoparticles was performed by SEM. The amount of CPT loaded was quantified by HPLC from digested nanoparticles.

In vitro release studies

In vitro release studies were carried out under sink conditions after the dispersion of the nanoparticles in simulated gastric (SGF) and intestinal fluids (SIF) containing 1% (w/v) of Tween 80 as surfactant. At different times, samples were taken and centrifuged through Vivaspin tubes at 3000xg for 20 min. Supernatants were recovered and analyzed by HPLC.

Results and Discussion:

The main physicochemical characteristics of the nanoparticles are summarized in Table 1. Nanoparticles displayed spherical shape with a slightly rough surface, sizes between 130 and 170 nm and a negative surface of around -40 mV. The amount of CPT incorporated in the nanoparticles ranged from 34 to 50 µg/mg depending on the cyclodextrin used. The encapsulation efficiency ranged between 40 and 63 %.

Table 1. *Physico-chemical characteristics of CPT-CD nanoparticles. Data expressed as mean±SD (n=3).*

Formulation	Size (nm)	Zeta Potential (mV)	CPT loading (µg/mgNP)	EE (%)
SP-NP	157±4	-37±2	34±2.5	41±3.1
HP-NP	128±9	-40±1	50±2.6	63±3.3
M-NP	168±5	-44±1	43±3.5	52±4.3

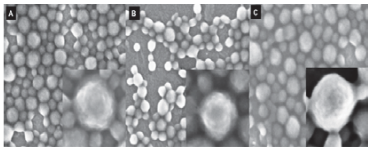


Figure 2. *Scanning Electron Microscopy (SEM) of freeze-dried nanoparticles. A: SP-NP; B: HP-NP; C: M-NP.*

Figure 3 shows the release profile of CPT from SP-NP, HP-NP and M-NP. The *in vitro* release profile of the three formulations exhibited a biphasic pattern, characterized by an initial non release period when the nanoparticles were incubated in the SGF followed by a rapid release of about 50-60% of the loaded drug when the nanoparticles were dispersed in the SIF. The release then is mantained and complete after 18 hours of incubation.

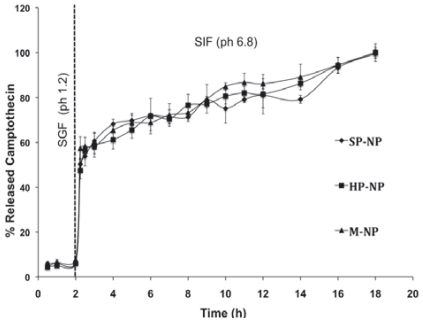


Figure 3. *In vitro release profile of CPT from SP-NP, HP-NP and M-NP. Data expressed as mean±SD (n=3).*

Conclusions:

SP-NP, HP-NP and M-NP are able to load camptothecin. The three types of nanoparticles show gastroresistant properties and they only release the loaded anticancer drug under simulated intestinal conditions.

References:

[1] Wall, M.E.W., et al., J. Am. Chem. Soc., 1966. 88: p. 3888–3890.

[2] Drengler, R.L., et al., J.Clin. Oncol., 1999. 17 (2): p. 685-96.

[3] M. Agüeros, et al., Eur. J. Pharm. Sci., 38 (4) (2009), pp. 405–413.

[4] M. Agüeros, et al., J. Con. Rel., 145 (1) (2010), pp. 2–8.

Acknowledgements:

This work was supported by the Asociación de Amigos of the University of Navarra and the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project SAF2008-02538).

PREPARACION Y CARACTERIZACION DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA Y QUITOSANO CON NIMESULIDA

C. Huerta, M.J. Peñas, L. Ludeña, M.R. Aberturas, J. Molpeceres

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid.

Introducción

La nimesulida (NS) (4-nitro-2-fenoxi-metano-sulfon-anilida) es un inhibidor selectivo de COX-2 clasificado como fármaco clase II dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (1). Su perfil toxicológico a nivel gastrointestinal es comparable al que presentan otros AINEs pero su riesgo hepatotóxico es mayor. La EMA publicó en el 2012 un documento en el que se establece la eficacia clínica de la NS para uso sistémico en tratamientos a corto plazo (2). Algunos autores han puesto de manifiesto la sobreexpresión de COX-2 en células tumorales (3). Existen trabajos publicados que sugieren que la incorporación de la NS en nanopartículas (NP) puede representar una alternativa para obtener una liberación controlada del fármaco y reducir así los efectos adversos del mismo cuando es administrado (4).

La finalidad de este trabajo es mejorar el potencial terapéutico de la NS para el tratamiento coadyuvante y prevención del cáncer de próstata, mediante su incorporación en NP capaces de actuar como depósitos del fármaco y de prolongar sus efectos sobre las células tumorales de la próstata.

Materiales y métodos

Preparación de las NP

Las NP de ácido poliláctico glicólico (PLGA, RG-504) y quitosano (CS) cargadas con NS (NPCS) fueron obtenidas mediante el método de evaporación del disolvente.

La fase orgánica que contiene PLGA y NS se dispersa utilizando ultrasonidos en una fase acuosa con PVA. Posteriormente se elimina el disolvente orgánico de la emulsión utilizando un rotavapor y las NP obtenidas se centrifugan a 12000g durante 15 min para eliminar el PVA en exceso de la fase acuosa. El residuo obtenido se resuspende con una disolución de CS en ácido acético. Tras incubar las NPCS 15 min en un baño a 37°C, se vuelven a centrifugar a 20000g durante 15 min. Como formulaciones control se prepararon NPCS sin NS (NPBCS) siguiendo el mismo esquema experimental.

Caracterización de las NP

El porcentaje de fármaco encapsulado se obtuvo mediante espectrofotometría UV-Vis a 230 nm. El rendimiento del proceso de elaboración de las NPCS se determinó a partir del peso de los residuos secos obtenidos tras centrifugar las NPCS a 20000g durante 15 min.

Para realizar el análisis morfológico de las partículas se emplearon técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM; Philips XL-20). El tamaño de partícula y el potencial zeta fueron medidos en equipos Microtrac UPA y Zetatrac, respectivamente. La capacidad de retención y la cinética de liberación de la NS a partir de las NPCS se determinaron a temperatura ambiente (37ºC) y utilizando un tampón PBS de pH 7.4.

Los estudios de permeabilidad se llevaron a cabo utilizando el modelo PAMPA con diferentes concentraciones de NS (control) y NPCS. El sistema se incuba durante 6 h a temperatura ambiente. A continuación se miden mediante espectrofotometría UV-Vis las cantidades de NS encontradas en los compartimentos donador y receptor en el rango de 600-190 nm.

La viabilidad celular y la eficacia de la NS se valoraron mediante un ensayo MTT realizado con cultivos de células de cáncer de próstata (PC-3).

Resultados y discusión

Las NPCS obtenidas son esféricas y de superficie lisa. Presentan PVA residual asociado a su superficie (Fig. 1).

El tamaño de partícula obtenido para las NPCS y NPBCS fue de 393nm y 374nm y el potencial zeta, 10.07±4.45 mV y 7.56±2.24 mV, respectivamente.

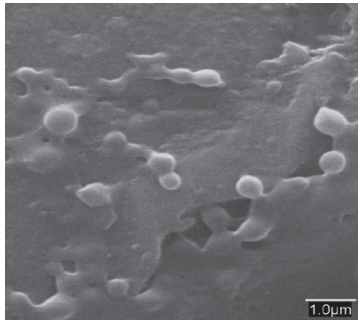


Figura 1.- *Fotografía electrónica de barrido de NPCS.*

Las NPCS encapsulan un 82.71±6.79% del fármaco añadido inicialmente. Con respecto a la cantidad de fármaco presente en el producto final, las NPCS presentan un porcentaje de captación del 98.75±0.85%. El porcentaje de recuperación de la NS fue de un 84.07±11.72%. En cuanto al rendimiento del proceso de obtención de las NPCS y NPBCS el valor obtenido fue de un 68.57±16.36% y 70.04±8.04%, respectivamente.

En condiciones *sink* las NPCS liberaron la práctica totalidad del fármaco tras la primera hora de incubación. (Fig. 2).

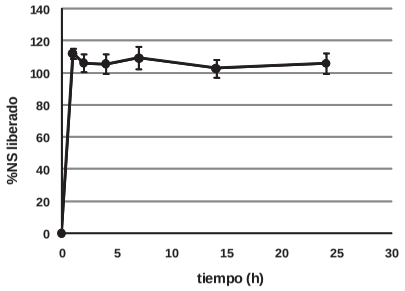


Figura 2.- *NS liberada por las NPCS.*

Los resultados obtenidos en el estudio de liberación inmediata ponen de manifiesto la afinidad de la NS por el polímero (Fig. 3).

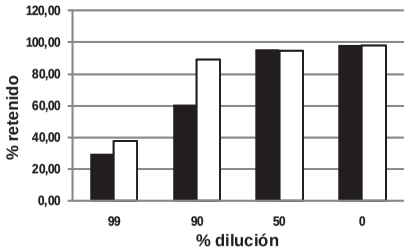


Figura 3.- *NS retenida por NPCS en los estudios de liberación inmediata con agua milliQ (barras blancas) o pH 7.4 PBS (barras negras) (n=3).*

Los estudios de permeabilidad demuestran que la NS pasa a través de barreras lipídicas de forma rápida (P_e=1-1.5x10^{-5} cm/s) aunque disminuye ligeramente en los estudios realizados con las NPCS (Fig. 4).

Tal y como recoge la figura 5, la NS y las NPCS muestran un marcado efecto citotóxico sobre las células de cáncer de próstata (PC-3). Sin embargo, las NPCS demostraron ser más eficaces que el fármaco libre. En los cultivos realizados, las NPBCS no presentaron un efecto citotóxico significativo lo que demuestra el potencial terapéutico de la formulación estudiada.

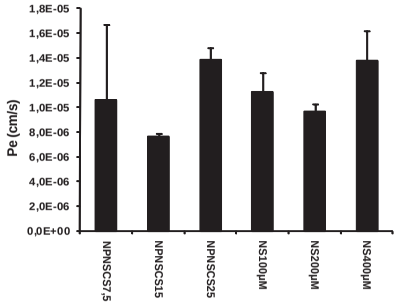


Figura 4.- *Coeficiente de permeabilidad de la NS en forma libre o unido a NPCS (n=4).*

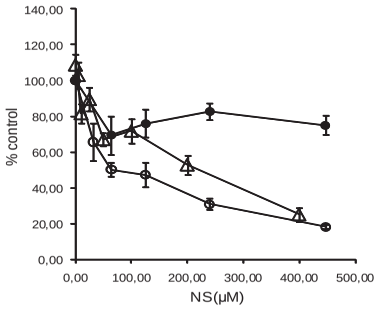


Figura 5.- *Viabilidad celular a las 48 h en presencia de NPBCS (círculo negro), NS (triángulos) y NPCS (círculo blanco) (n>6).*

Conclusiones

Se han obtenido NP esféricas con tamaños de particular inferiores a 0,5 µm. La NS se incorpora de forma eficaz en las NP y muestra una liberación dependiente de la dilución realizada. La permeabilidad del fármaco cuando está incluido en las NPCS se ve ligeramente disminuida. Los estudios realizados con células PC-3 demostraron que la formulación desarrollada podría constituir una contribución eficaz en el tratamiento del cáncer de próstata.

Referencias

(1) Bernareggi et al., *Nimesulide-Actions and Uses. Pharmacokinetics of nimesulide.* 63-120, 2005.

(2) Article 31 of Directive 2001/83/EC. Procedure number: EMEA/H/A-31/1261.

(3) Yoshimura et al., *Cancer* **89:** 589-596, 2000.

(4) Pushpendra et al, *International Journal of Drug Delivery Technology* **1(1)**: 24-27, 2009.

DELIVERING GSE 24.2 PEPTIDE FROM BIODEGRADABLE NANOPARTICLES FOR APPLICATION IN DEFECTIVE TELOMERASE DISORDERS

S.P. Egusquiaguirre[1,2], C. Manguán-García[3], L. Pintado-Berninches[3], R. Hernández[1,2], J.L. Pedraz[1,2], R. Perona[3], M. Igartua[1,2]

[1]NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country, School of Pharmacy, Vitoria, 01006, Spain
[2]Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria, 01006, Spain
[3]Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM C/Arturo Duperier, 4 Madrid 28029, IDIPaz and CIBER de Enfermedades Raras CIBERER, Valencia Spain.

INTRODUCTION

Defective telomerase disorders are rare inherited diseases characterized by defects in telomere maintenance, caused by mutations in different components of the telomerase complex (1). It has been described that the peptide GSE 24.2, corresponding to an internal domain of DCK1 gene (encoding dyskerin, a component of telomerase complex), is able to induce telomerase reactivation (2). However, peptides are unstable and prone to degradation when administered, and so, lose their activity. Moreover, GSE 24.2 site of action is localized inside the nucleus, and thus it must be appropriately internalized inside cells and reach the nucleus. Therefore, in this study a method to overcome these shortcomings has been proposed, by the encapsulation of GSE 24.2 into biodegradable nanoparticles, elaborated with poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA NPs) and the addition of different polycations.

EXPERIMENTAL METHODS

Nanoparticle elaboration:
PLGA NPs containing GSE 24.2 were prepared by the solvent extraction technique using a W/O/W double emulsion system (3). Briefly, the NPs were developed emulsifying 0.5% (w/v) GSE 24.2 aqueous solution containing PEG 400 with 2 ml of a 5% (w/v) PLGA (Resomer® RG503) solution in dichloromethane by 30 s sonication at 50W (Branson Sonifier®). This primary emulsion was then added to 10 ml of a 5% (w/v) polyvinyl alcohol aqueous solution and sonicated 60 s at 50W to obtain the W/O/W emulsion. Finally, this second emulsion was poured into a 2% (v/v) isopropanol aqueous solution and left under magnetic stirring for 2 h to allow the evaporation of the organic solvent. The resulting NPs were recovered by centrifugation, washed three times in distilled water and lyophilized after the addition of trehalose. For the preparation of the cationic NPs, different coating polymers were used: polyethyleneimine (PEI), chitosan (CS) and dextran (DX). Different concentrations of CS and DX were dissolved in the PVA aqueous solution, whilst PEI was dissolved in dichloromethane.

Nanoparticles characterization:
PLGA NPs were characterized in terms of size and ζ potential by Dynamic Light Scattering and Laser Doppler Micro-Electroforesis, respectively. Particle morphology and surface characteristics were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). GSE 24.2 encapsulation efficiency, surface adsorbed peptide and i*n vitro* release profile were evaluated by micro-BCA assay kit. The structural integrity of GSE 24.2 extracted from NPs was assessed with polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The cytotoxicity of NPs was assayed in HeLa and murine embryonic fibroblasts (MEF) cell lines. Intracellular uptake was performed in F9 cell line and i*n vitro* biological activity of GSE 24.2 using F9 A353V cells harbouring a DKC1 mutation.

RESULTS AND DISCUSSION

As exposed in table 1, PLGA NPs size was around 220 nm with a narrow size distribution (polydispersity index (PDI) <0.1). ζ potential values confirmed the presence of polycation chains shielding a positive charge at the NPs surface, resulting in cationic PLGA NPs, with the exception of CS, which acquires positive charge in acidic media.

Formulation	Size (nm)	PDI	ζ Potential	EE (%)	SAP (%)
PLGA	231.2	0.126	-20.1	60.27	28.64
PLGA-CS	243.9	0.151	-3.05	18.89	9.36
PLGA-PEI	221.9	0.144	+30.4	86.42	23.33
PLGA-DX	226.2	0.095	+24.4	30.48	4.32

Table 1: Characteristics of GSE 24.2 PLGA NPs.

As observed in SEM images (Figure 1), small spherical particles in the nanometer size range with smooth surface were obtained.

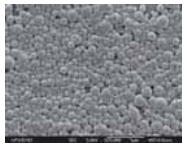


Figure 1: Morphology of GSE 24.2 PLGA NPs.

According to the GSE 24.2 structural integrity study with SDS-PAGE (Figure 2), no configuration or conformational damage of the peptide occurred during the encapsulation process. Therefore, the biological activity of GSE 24.2 incorporated into PLGA NPs should be maintained.

Figure 2: SDS-PAGE of GSE 24.2 PLGA NPs.

The cytotoxicity test (Figure 3) displayed an acceptable viability for PLGA NPs and CS PLGA NPs, and greater toxicity for PEI and DX PLGA NPs.

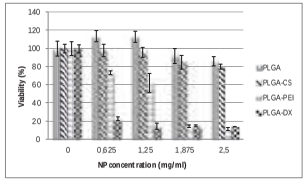


Figure 3: *In vitro* cytotoxicity of GSE 24.2 PLGA NPs in MEF cells.

As demonstrated by the *in vitro* release studies (Figure 4), a biphasic GSE 24.2 release profile with an initial burst effect of 20% was observed. This first phase is followed by a second constant slow release phase, until nearly 100% of the loaded GSE 24.2 is released.

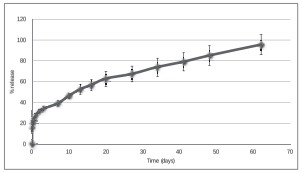


Figure 4: *In vitro* release profile of GSE 24.2 - PLGA NPs.

To check if GSE 24.2 PLGA NPs were able to be internalized in F9 cells, intracellular localization was assayed (Figure 5). During the first 48 hours of incubation, results illustrated an important confocal internalization of NPs inside cells and nucleus.

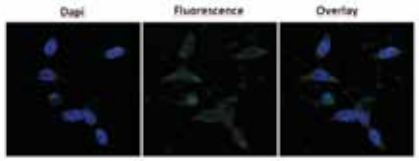


Figure 5: Intracellular localization of GSE 24.2 PLGA NPs.

Finally, the bioactivity of GSE 24.2 encapsulated into PLGA NPs was assessed *in vitro* by the incubation of 15 µg of the peptide with F9 A353V cells. As exposed in figure 6, GSE 24.2 incorporated into PLGA NPs preserves the *in vitro* biological activity, rescuing DNA damage. Moreover, the addition of PEI seems to, slightly; enhance the DNA rescue, probably due to the positive charge on the surface of NPs which could increase internalization.

Formulation	% DNA rescued
PLGA	20,09 ± 0.07
PLGA-PEI	38,21 ± 0.11

Figure 6: *In vitro* biological activity of GSE 24.2 PLGA NPs.

CONCLUSION

From the data obtained, we can conclude that GSE 24.2 peptide has been successfully encapsulated into biodegradable NPs. In addition, structural integrity and biological activity of GSE 24.2 are maintained after the encapsulation, and also an acceptable viability was obtained. Finally, PLGA NPs are efficiently uptaken by F9 cells and are able to be internalized within the nucleus.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was partially supported by the University of the Basque Country (UPV/EHU) (UFI 11/32), FISP11-00949 and F. Ramón Areces. S.P. Egusquiaguirre thanks the Basque Government *(Gobierno Vasco, Departamento de Educación, Universidades e Investigación)* for the fellowship research grant and C.Manguan-García is supported by CIBERER.

REFERENCES

(1) Walne A.J. et al. *Br J Haematol.* **145(2)**:164-172, 2009
(2) Machado-Pinilla R. et al., *Blood.* **111(5)**:2606-2614, 2008
(3) Gutierro I et al., *Vaccine.* **22;21(1-2)**:67-77, 2002

NOVEL THERMOREVERSIBLE AND pH-DEPENDENT HYDROGELS FOR CONTROLLED DRUG RELEASE

E. Moreno[1,2,3] and J. Schwartz[1,2], J.M. Irache[1], E. Larrañeta[1], P.A. Nguewa[2], C. Sanmartín[2,3], S. Espuelas[1,2]

[1]Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, University of Navarra, Spain

[2]Tropical Health Institute, University of Navarra, Spain

[3] Organic and Pharmaceutical Chemistry Department, University of Navarra, Spain

Introduction:

Thermosensitive hydrogels are aqueous polymer solutions that are transformed into gels through temperature changes. Under physiological conditions, gels are formed upon heating to body temperature and can maintain their integrity for a period of time. These hydrogels may provide the advantage of easier administration and could have several biomedical applications such as drug controlled release, cell immovilization and tissue regeneration (1-2).

In this work, we synthesized a new serie of random X—Y copolymers that form thermosensitive and pH-dependent hydrogels whose gelation temperature and mechanical properties can be controlled by the molar relationship of X and Y polymers and copolymer concentration in water.

Material and Methods:

Synthesis of the X—Y colopymer

Briefly, 2.0 g of Y were added into a one-necked glass flask and dissolved in 150 mL of anhydrous THF with a mechanical stirrer. Then, different amounts of X were added to the solution (Xm/Y molar ratios: 1, 2, 5, 10 and 20; Xm=X monomer) and they reacted for 48 hours at room temperature under magnetic stirring. The organic solvent was eliminated by evaporation and the residue was mixed with cold ethyl ether to precipitate the polymer. Later, the polymer precipitate was filtered and dried at room temperature under vacuum.

FT-IR analysis

The IR spectra were obtained on a Thermo Nicolet FT-IR Nexus spectrophotometer.

Preparation of the X—Y hydrogels and phase diagrams measurements

The copolymers were prepared in 10 mL glass vials at concentrations of 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 7.5 and 10 wt.% in deionized water to a final volume of 2 mL. The vials were kept in continuous stirring at room temperature until complete dissolution (24-72 hours). Then, NaOH was added carefully in order to adjust the pH (6-7.5). Finally, the solutions were kept in a water bath at different temperatures to allow gel formation. The temperature at which the polymer solution stopped flowing upon the vial inversion (during at least 30 seconds) was visually observed and recorded as the gelation temperature.

Viscosity analysis

Viscosity measurements of the X—Y hydrogels were carried out at different temperatures using a Haake Viscotester 550 rotational viscometer with a SV2 rotor and equipped with a thermostatic bath Thermo Phoenix II.

In vitro cytotoxicity of X—Y copolymer

MTT assay was used to test the cytotoxicity of X—Y hydrogels on J774.2 macrophages after 20 hours of treatment in Transwell microplates. The solution with the copolymer was placed in the apical side whereas the macrophages were located in the basolateral side.

Results and Discussion:

All synthesized copolymers showed pH-dependent (6-7.5) gelation behaviour. Therefore, their sol-gel transition temperatures could be modulated by manipulation of the Xm/Y molar ratios and concentrations of the copolymers (Figures 1 and 2). The gelation temperature tended to decrease when the Xm/Y ratio increased till Xm/Y of 20, when the gelation occurred at room temperature. At a fixed Xm/Y value, the sol-gel temperature decreased at higher copolymer concentrations (Figure 2). In all cases, gels reverted to solution upon cooling.

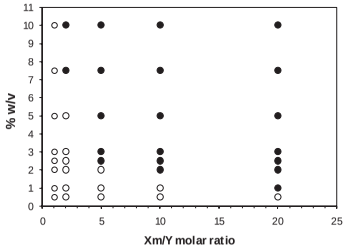


Figure 1: Influence of Xm/Y molar ratios and concentrations in sol-gel transition phases (○ indicates sol. and ● indicates gel).

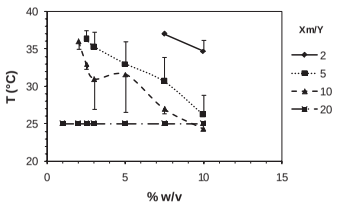


Figure 2: Influence of Xm/Y molar ratios and concentrations in the gelation temperature.

The gelation temperature was confirmed by viscosity measurements (Figure 3). The viscosity is an important parameter that could affect the drug release. As expected, the viscosity sharply increased around gelation temperature, reaching higher values and faster at high polymer concentrations (i.e. 3.5 Pa.s for the Xm/Y=5 copolymer at 10% vs. 1.2 Pa.s at 3%, Figure 3a) and lower Xm/Y ratios (Xm/Y=5 in Figure 3a vs. Xm/Y=10 in Figure 3b).

Both, viscosity values and gel transition temperature will determine which copolymer concentration and Xm/Y ratio will be chosen according to their use.

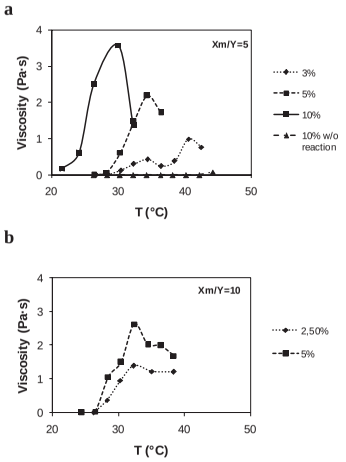


Figure 3: Viscosities vs. temperature profile at different concentration of hydrogel prepared with Xm/Y=5 (a) and Xm/Y=10 (b) copolymers.

Biocompatibility of new polymers is a requisite for biomedical application. Thus, cytotoxicity of the hydrogels was evaluated by an MTT assay using J774.2 macrophages (Figure 4). For X—Y hydrogels with a molar ratio of 5, cell viability was slightly higher than hydrogels with a molar ratio of 10, although in all the experiments cell viability was > 70%.

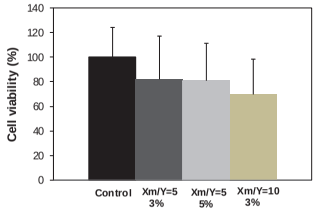


Figure 4: In vitro cytotoxicity of synthesized X—Y copolymer. The results represent the means ± SD for n = 4.

Overall, we have synthesized a new series of random X—Y copolymers that are able to form non-toxic, pH-sensitive and thermosensitive hydrogels. The gelation temperature can be manipulated as a function of the Xm/Y molar ratio between 30 and 37 ºC. The viscosity can be controlled by the copolymer concentration. Thus, they could be used as vehicles for controlled topical, ocular or subcutaneous delivery of drugs.

References:

(1) Liu, C., Gong, C.Y., Pan, Y.F., Zhang, Y.D., Wang, J.W., Huang, M.J., Wang, Y.S., Wang, K.., Gou, M.L., Tu, M.J., Wei, Y.Q., Quian, Z.Y. Synthesis and characterization of a thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic PCL-Pluronic (L35)-PLC block copolymers. Colloids and Surfaces; 302: 430-438 (2007).

(2) Garripelli, V.K., Kim, V.K., Namgung R., Kim, W.J., Repka, M.A., Joa, S. A novel thermosensitive polymer with pH-dependent degradation for drug delivery. Acta Biomaterialia; 6: 477-485 (2010).

SKIN PENETRATION STUDIES OF CHITOSAN HYDROGELS CONTAINING NOVEL DISELENIDE DRUG AGAINST CUTANEOUS LEISHMANIASIS

[1,2]J Schwartz & [1,2]E Moreno, [1]JM Irache, [2,3]C Sanmartín, [2]P Nguewa, [1,2]S Espuelas.
[1]Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, [2]Tropical Health Institute, [3]Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, University of Navarra, Spain

Introduction: Leishmaniasis is a zoonotic infection caused by parasitic protozoans from the genus *Leishmania* and transmitted by means of sandfly bite to vertebrate hosts including man. Chemotherapy remains the primary tool for treatment of human leishmaniasis. However, currently available drugs present serious problems regarding side-effects, variable efficacy, and cost (1). Local therapy can be of value in nondisseminated disease (CL) because it offers significant advantages over systemic therapy such as fewer adverse effects and ease of administration (2). The diselenide (diSe) compound 2a (4-bis-aminophenyl-diselenide) showed stronger *in vitro* antileishmanial activity than miltefosine, while showing negligible toxicity against mammalian cells (3). The aim of this work was to develop topical formulations that are able to carry the 2a drug into the skin dermis, where parasites are mainly located in CL (2). Chitosan was selected as the main component of the hydrogels because of its biodegradability and bioadhesive properties (4), which make it suitable for the treatment of ulcerative lesions. Furthermore, this polymer has shown antimicrobial activity, which could boost the drug effect. In this work we optimised hydrogels based on chitosan- β-CDs-cyclodextrins (CDs) networks that are suitable to load hydrophobic drugs (i.e. diSe compound). Including the diSe drug in the hydrogels was possible due to the presence of β-CDs within the hydrogel network.

Materials and Methods: Chitosan hydrogels containing the diSe drug (3, 4 and 5 mg/ml) and PM (15 and 30 mg/ml) were prepared by adding a β- glycerolphosphate (β-GP) solution (5 and 15%), as well as methyl-β-cyclodextrin (M-β-CD, 5.74%) or a hydroxipropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD, 6.4 and 19.8%) solution in different concentrations to several concentrations of chitosan (1 and 1.5%), which had been previously dissolved in 2% of lactic acid. Chitosans of different molecular weights (95/100 and 95/200) were used. The amount of CDs introduced was adjusted to maintain a 3:1 molar ratio with the diSe drug. The skin permeation experiments across intact pig ear skin were performed in Franz diffusion cells (Hanson Research Microette, membrane surface of 4.909 cm2 and volume of the receptor fluid of 4 ml). The stratum corneum (SC, 20 µm), the epidermis (E, 80 µm) and the dermis (D) were separated using the microtome cryostat Leica CM 1900 (Leica Microsystems). The different skin layers were pretreated with nitric acid before determining the diSe drug concentration in each layer.

Results and Discusion: In order to optimize formulations for the treatment of CL, the influence of several parameters on skin drug permeation (drug concentration, chitosan molecular weight and CD concentration and type), was assessed. The formulations that we evaluated in the Franz cells with the diSe drug (3, 4 or 5 mg/ml) were composed of chitosan 95/100 or 95/200 (1 or 1.5%), β-GP 5% and β- or α-CDs (6.4 or 12.8% and 5.74%, respectively) (see figs. 1 to 5). As expected, formulations containing a higher amount of the diSe drug (4 mg/ml) led to higher levels of this compound in the D and in the E, where the amount of drug was around 2 times higher in the E than in the D (fig. 1).

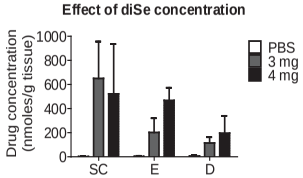


Fig. 1: Effect of drug concentration on the penetration of DiSe across the skin.

Higher levels of the diSe drug were found in the SC and in the D at higher concentrations of HP-β-CD (nearly 2 and 1.5 times more, respectively) (fig. 2). Our data for permeation across intact skin are consistent with several studies previously published, in that dermal and transdermal delivery of hydrophilic drugs entrapped in the HP-β-CD structure were greater than that observed for conventional formulations (6).

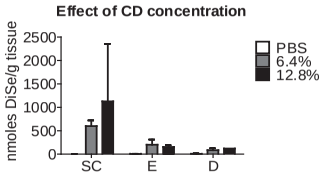


Fig. 2: Effect of CD concentration on the penetration of DiSe across the skin.

Entrapment of the diSe drug in the structure of the M-β-CD resulted in improved topical delivery into and across intact skin when compared with formulations that contained HP-β-CD. Se levels were 1.7 times higher in the D when the hydrogel contained M-β-CD than when it contained HP-β-CD (fig. 3).

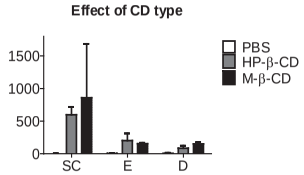


Fig. 3: Effect of CD type on the penetration of DiSe across the skin.

Formulations containing chitosan 95/200 (higher molecular weight) resulted in an improved topical delivery of the drug across the skin. The levels of Se in the E were 1 time higher when the hydrogel contained chitosan 95/200 (fig. 4).

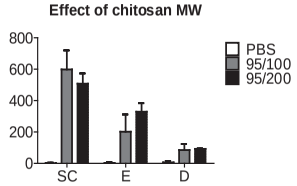


Fig. 4: Effect of formulation on the penetration of DiSe across the skin.

Finally, the effect of the formulation was studied. For this purpose, a solution containing only HP-β-CD 12.8%, β-GP 5% and the diSe drug (5 mg/ml), was compared with a hydrogel that contained chitosan 95/100 1.5%, HP-β-CD 12.8%, β-GP 5% and the diSe drug (5 mg/ml). The levels of the diSe compound from the hydrogel were higher in the different skin layers, especially in the SC (1.7 times higher), but also in the D (1.35 times higher) (fig. 1e).

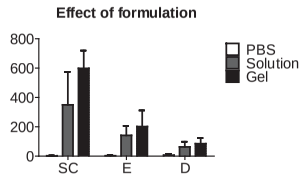


Fig. 5: Effect of CD type on the penetration of DiSe across the skin.

DiSe drug levels in the receptor compartment were very low or under the limit of detection within the first hours. They peaked at 24h, but levels were still very low (data not shown). This is of great importance because it proves that the formulation enters the D, but it does not reach substantial levels in the receptor compartment, which simulates the blood circulation under the skin. Therefore, the drug does not enter the blood circulation and this prevents systemic side effects. Drugs topically applied for the treatment of CL must be able to target the *Leishmania* parasites within the phagolysosome of the infected macrophages in the deep dermal layer of the skin (7). Our topical formulations based on chitosan- β-GP hydrogels led to the delivery of the diSe drug to the dermis of the skin in the *in vitro* assay (see figs. 1 to 5). Therefore, the diSe drug is a good candidate for topical treatment of CL.

References:

(1) Gupta S et al. Drug delivery strategies for therapy of visceral leishmaniasis. Expert opinion on drug delivery 2010;7(3):371.
(2) Carneiro G et al. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. Expert opinion on drug delivery 2012;9(9):1083
(3) Plano D et al. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. Eur J Med Chem 2011;46(8):3315.
(4) Sezer A et al. Topical drug delivery using chitosan nano- and microparticles. Expert opinion on drug delivery 2012;9(9):1129
(5) Larrucea E et al. Interaction of tenoxicam with cyclodextrins and its influence on the in vitro percutaneous penetration of the drug. Drug Dev Ind Pharm 2001;27(3):251.

Acknowledgements:
-The first author of this work is supported by the ADA grant (Asociación de Amigos, University of Navarra).

ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE PIZOTIFENO MALATO DESDE SISTEMAS MATRICIALES

C.E. Serna Jiménez[1], S. del Rio Sancho[1], M.A. Calatayud Pascual[1], C. Balaguer Fernández[1], A. Femenía Font[1], V. Merino[2], A. López Castellano[1]

[1] Instituto de Ciencias Biomédicas. Dpto. de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, España.

[2] Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Centro Mixto Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Introducción: El pizotifeno malato es un principio activo utilizado para la prevención de migraña así como para aumentar el apetito. Por su seguridad se utiliza habitualmente en pacientes de corta edad.

Este estudio forma parte del desarrollo de nuevas formas de administración del pizotifeno, en concreto de parches transdérmicos.

Objetivos: Evaluar la absorción transdérmica del pizotifeno incorporado en parches transdérmicos, formulados con los promotores químicos ácido decenoico o ácido oleico.

Materiales y Métodos: El estudio de absorción transdérmica se llevó a cabo con tres parches: control (sin promotor químico), con ácido decenoico y con ácido oleico. La composición de los mismos se muestra en la Tabla 1.

	Parche Control	Parche Ac. Oleico	Parche Ac. Decenoico
PVP K90	17.0	17.0	17.0
Plastoid E35H	10.0	10.0	10.0
Propilenglicol	51.7	51.7	51.7
Etanol	20.0	15.0	15.0
Ácido oleico	-	5.00	-
Ácido decenoico	-	-	5.00
Pizotifeno malato	1.34	1.34	1.34

Tabla 1: Composición en % (p/p) de los parches de pizotifeno utilizados en el estudio.

Los experimentos de absorción transdérmica se realizaron en células de Franz utilizando como modelo de piel oreja de cerdo, a 37 ± 1 ºC y durante 56 horas. Las muestras se analizaron mediante un método HPLC previamente validado [1]. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por medio del ajustado de la segunda ley de Fick. El fármaco retenido en piel se determinó al finalizar los experimentos. Asimismo se realizó la caracterización física de los parches determinando la elongación hasta rotura, la resistencia máxima, la bioadhesión, humectación y desecación [2].

Resultados y Discusión: A partir de los datos obtenidos del análisis de las muestras se representaron las curvas de las cantidades de fármaco acumuladas en el compartimento frente al tiempo, representativas del proceso de absorción (Figura 1).

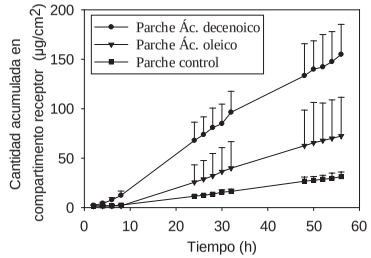
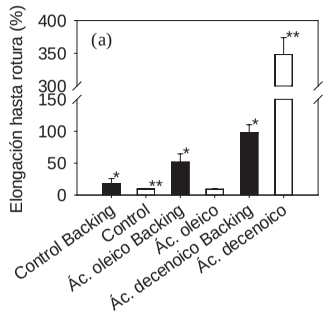
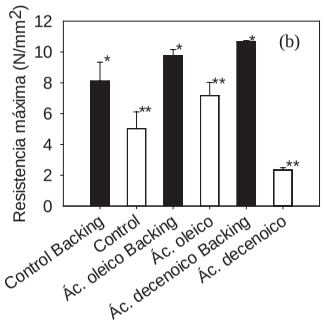


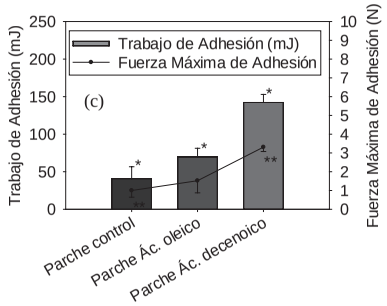
Figura 1. Cantidades acumuladas de pizotifeno (µg/cm^2) en el compartimento receptor frente al tiempo (h).

El flujo en el estado estacionario de pizotifeno a través de la piel con el parche control fue de 0.60 ± 0.18 µg/(cm^{2}h). Los parches que contenían ácido decenoico y ácido oleico proporcionaron unos flujos de 3.41 ± 0.44 y 1.81 ± 1.20 µg/(cm^{2}h), respectivamente.

La caracterización física de los parches puede observarse en la figura 2.







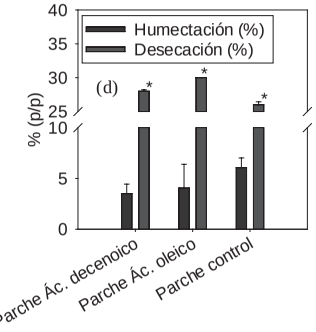


Figura 2. Caracterización física de los parches de pizotifeno formulados: (a) Elongación hasta rotura; (b) Resistencia máxima; (c) Trabajo y fuerza máxima de adhesión; y (d) Humectación y desecación. "*" y "**" presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí mismos ($p<0.05$; ANOVA; Dunnet T3).

De los 3 parches formulados, el que contenía ácido decenoico presentó los mayores valores de elongación hasta rotura y bioadhesión, y el valor más bajo de resistencia máxima. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la humectación de los parches, no obstante los porcentajes de desecación sí que resultaron diferentes, obteniendo el parche control el valor de desecación más bajo, seguido por el parche de ácido decenoico.

Conclusiones: Se desarrollaron 3 parches transdérmicos de pizotifeno. El parche que contiene ácido decenoico parece óptimo para administrar el fármaco, tanto por sus características físicas, como por el efecto observado sobre la absorción transdérmica del fármaco.

Referencias:

(1) Serna-Jiménez, C.E. et al. HPLC-UV analytical method for determination of pizotifen after in vitro transdermal diffusion studies. Biomedical Chromatography 26: 769-774 (2012).

(2) Balaguer-Fernández, C. et al. Development and evaluation of occlusive systems employing polyvinyl alcohol for transdermal delivery of sumatriptan succinate. Drug Delivery 17 (2): 83-91 (2010).

Agradecimientos:

- Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060108).
- Universidad CEU Cardenal Herrera (beca FPDI).
- Universidad CEU Cardenal Herrera (PRCEU-UCH34/10)

DESARROLLO FISICOQUÍMICO DE NANOCOMPUESTOS MAGHEMITA/POLI(D,L-LACTIDA-*CO*-GLICOLIDA) PARA FINES FARMACOTERAPÉUTICOS

B. Pérez-Artacho[1], A.V. Delgado[2], A. Fini[3], M. López-Viota[1], J.L. Arias[1]
[1]Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España.
[2]Dpto. de Física Aplicada, Universidad de Granada, España.
[3]Dpto. Scienza dei Metalli, Elettrochimica e Tecniche Chimiche, Università degli Studi di Bologna, Italia.

Introducción: Numerosos estudios se centran actualmente en el uso de coloides para la formulación de nanosistemas transportadores de fármacos (1). Así, se pretende lograr la acumulación masiva y específica de la dosis de principio activo en el lugar de acción, junto con una minimización de los problemas de estabilidad y seguridad asociados a su uso (2). En este trabajo se describe una técnica reproducible para la síntesis de nanocompuestos de maghemita (γ-Fe_2O_3) y poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) como sistema transportador de fármacos. La γ-Fe_2O_3 se eligió por su carácter no tóxico y superparamagnético que confiere al sistema sus propiedades magnéticas, mientras el PLGA se seleccionó como matriz biocompatible y biodegradable, con capacidad para el transporte de principios activos.

Materiales y Métodos: El procedimiento seguido en la síntesis de las nanopartículas de γ-Fe_2O_3 se fundamentó en la síntesis mediante co-precipitación química y oxidación de nanopartículas de magnetita (3). La síntesis de los nanocompuestos se basó en un método de emulsión con evaporación de disolvente puesto a punto por nuestro grupo de investigación (4). Las nanopartículas de PLGA se sintetizaron de igual forma. Brevemente, se añadió bajo agitación mecánica, una solución de PLGA (250 mg) en acetato de etilo, a una solución acuosa de polivinilalcohol (3%, p/v) que contiene los núcleos magnéticos (125 mg). Posteriormente, se redujo la velocidad de agitación, dejando evaporar completamente el disolvente.
En cuanto a la caracterización fisicoquímica de los nanocompuestos, su geometría se determinó mediante microfotografías FeSEM y HRTEM y mediante PCS. Además, Se utilizó la difractometría de rayos X para determinar la estructura cristalina de las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA. Las propiedades eléctricas superficiales de los nanocompuestos se analizaron mediante electroforesis en función del pH. Por otro lado, las propiedades termodinámicas superficiales se estudiaron a partir de determinaciones de ángulo de contacto con agua, formamida y α-bromonaftaleno, junto con un adecuado tratamiento termodinámico. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA se investigaron mediante la obtención y análisis de su ciclo de histéresis. Finalmente, se investigó la estabilidad térmica de los nanomateriales mediante DSC y TGA.

Resultados y Discusión: Gracias a la metodología de síntesis desarrollada, se obtuvieron partículas completamente esféricas con un tamaño medio de 135 ± 50 nm, muy adecuado para la vía de administración parenteral.
La eficacia del recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos se demostró comparando el potencial zeta (ζ) de los nanocompuestos con el de los nanomateriales que los constituyen. En efecto, la figura 1 muestra valores de ζ prácticamente iguales para los nanocompuestos y el polímero puro.

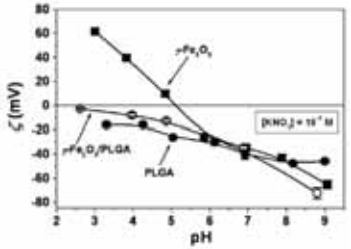


Figura 1. Valores de potencial zeta (ζ, mV) de las nanopartículas de γ-Fe_2O_3, PLGA y γ-Fe_2O_3/PLGA en función del pH y a fuerza iónica constante.

El estudio de las propiedades termodinámicas de las nanopartículas confirmó los resultados obtenidos en la caracterización electroforética con respecto a la eficacia del recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos. La figura 2 muestra nuevamente la similitud entre los nanocompuestos y las nanopartículas de polímero puro, así como las diferencias con los núcleos magnéticos. De hecho, en esta figura puede apreciarse cómo el carácter hidrófilo de los núcleos de óxido de hierro se pierde al quedar englobados en la matriz polimérica hidrófoba.

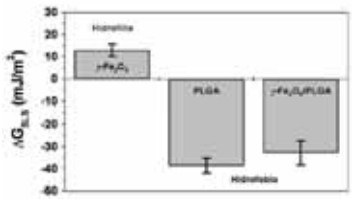


Figura 4. Carácter hidrófilo/hidrófobo de γ-Fe_2O_3, PLGA y nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA.

La difractometría de rayos X nos permite afirmar que la estructura cristalina de los núcleos magnéticos se mantiene tras su inclusión en la matriz de PLGA (figura 3). Este es un aspecto muy importante ya que las propiedades magnéticas de las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA dependen fundamentalmente de esta estructura cristalina.

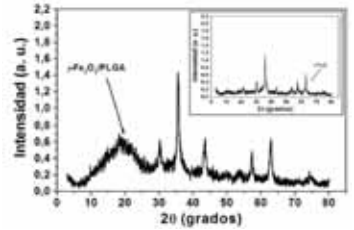


Figura 3. Difractograma de rayos X de los nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA. Figura insertada: difractograma de rayos X de γ-Fe_2O_3.

En cuanto a las propiedades magnéticas, la figura 4 muestra el ciclo de histéresis de los nanocompuestos. Los valores de susceptibilidad inicial (χ_i = 2.51 ± 0.11) y magnetización de saturación (206 ± 12 kA/m) demuestran la elevada capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético que exhiben las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA.

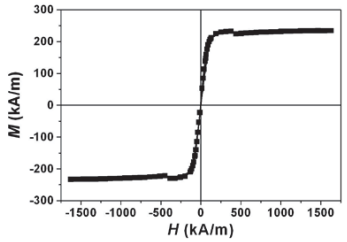


Figura 4. Ciclo de histéresis de las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA.

Finalmente, se llevó a cabo una evaluación preliminar de la estabilidad térmica de las nanopartículas γ-Fe_2O_3/PLGA (figura 5). Como puede apreciarse en esta figura, los nanocompuestos se caracterizan por un perfil térmico muy estable hasta temperaturas próximas a 330 ºC. De esta manera, podría postularse la posibilidad de someter las formulaciones basadas en estas nanopartículas a procedimientos de esterilización mediante calor.

Figura 1. Termograma DSC (a) y TGA (b) de los nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA.

Conclusiones: Se ha desarrollado una metodología reproducible para la síntesis de nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA. La extensa caracterización química, electrocinética y termodinámica ha demostrado la eficacia de la metodología de formulación desarrollada. El estudio de las propiedades magnéticas demuestra la excelente capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético que presenta este tipo de nanopartículas. Por lo tanto, puede señalarse que estos nanocompuestos deben ser útiles en el diseño de sistemas transportadores de fármacos.

Referencias:

(1) Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. Mini Rev. Med. Chem. 2011;11:1-17.
(2) Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm. Res. 2006;23:1417-50.
(3) Bee A et al. Synthesis of very fine maghemite particles. J. Magn. Magn. Mater. 1995;149:6-9.
(4) Pérez-Artacho B et al. Maghemite/poly(D,L-lactide-*co*-glycolyde) composite nanoplatform for therapeutic applications. J. Nanopart. Res. 2012;14:768(10 págs.).

Agradecimientos: Proyecto FIS 11/02571 (Instituto de Salud Carlos III, España).

NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS MAGNÉTICAMENTE PARA EL TRANSPORTE EFICAZ DE ANTITUMORALES EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON

M. López-Viota[1], A. Gonzalez[2], K. Rudzka[2], J.A. Muñoz-Gamez[3], A. Carazo[3], J.L. Arias[1], J.L.Viota[3], A.V. Delgado[2]

[1]Dpto.de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España

[2]Dpto. de Física Aplicada, Universidad de Granada, España.

[3]Unidad de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España.

Introducción: Los nanotubos de carbono son nanopartículas cilíndricas compuestas por una o varias capas de grafeno enrrolladas, formadas por varios anillos de átomos de carbono perfectamente estructurados. Su tamaño varía desde un diámetro de pocos nanómetros hasta varios milímetros de longitud. Debido a la baja solubilidad que presentan este tipo de nanopartículas en cualquier solvente común, es necesario funcionalizarlas, bien con polielectrolitos o bien con nanopartículas. De este modo se consigue aumentar su solubilidad y su biocompatibilidad.

Siguiendo los resultados descritos por Yang y cols. [1], en este trabajo estudiamos la posibilidad de combinar ambos tipos de funcionalización: con polímeros (PEG) y con nanopartículas magnéticas. Estudiaremos la capacidad que tienen estas nanopartículas compuestas de vehiculizar un fármaco como la doxorubicina, y comprobaremos su eficacia como vehículos transportadores de fármacos in vitro, en cultivos celulares de cáncer de colon. Además analizaremos la capacidad de liberar fármacos recubriendo los compuestos con receptores específicos sobre expresados por células tumorales como es el ácido fólico.

Materiales y Métodos: La síntesis y funcionalización de partículas se realizaron en agua Milli Q. Los productos químicos necesarios para la síntesis de nanopartículas fueron adquiridos a Sigma Aldrich, y los nanotubos de carbono fueron comprados en cheaptubes.com.

Síntesis de nanopartículas magnéticas: Las nanopartículas de magnetita fueron obtenidas de acuerdo con el método de coprecipitación descrito por Massart [2]. Brevemente, a temperatura ambiente se prepara una solución 1 M de Cl3Fe en un volumen de 40 mL y otra solución de HCl 2 M de Cl2FE 2M. Amabas soluciones se mezclan bajo agitación mecánica en una solución acousa 0.7 M de amonia. El resultado es un precipitado de color negro. El proceso de limpieza consiste en decantar magnéticamente este precipitado, redispersándolo en medio acuoso, hasta conseguir que la conductividad del sobrenadante sea inferior a 2 µS/cm.

Los nanotubos de carbono fueron dispersados con la ayuda de un ultrasonidos en una solución acuosa a pH 2 de ácido nítrico.

La funcionalización de los nanotubos con las nanopartículas magnéticas fue efectuada añadiendo gota a gota, una suspensión acousa de nanopartículas magnéticas al 1 % en volumen, sobre una suspensión acousa a pH natural de nanotubos de carbono, con la ayuda de un vortex. La mezcla se dejó reposar en contacto toda la noche. La funcionalización con PEG se realizó suspendiendo los nanotubos de carbono en una solución de PEG, a pH natural.

Caracterización eléctrica superficial. Las medidas de la carga eléctrica superficial se realizaron en un dispositivo Malvern NanoZS. Las suspensiones fueron preparadas añadiendo una gota de la suspensión sobre la solución al pH determinado y medidas 24 h después de preparar la suspensión.

Cantidad de doxorrubicina y ácido fólico adsorbida/absorbida por las nanopartículas. La concentración de doxorubicina retenida por las partículas fue determinada mediante medidas de absorbancia óptica en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11 UV-vis spectrophotometer (Perkin-Elmer, USA). Las medidas fueron realizadas a la longitud de onda de máxima absorbancia.

Microscopía confocal. La liberación de fármaco antitumoral en las células de colon fueron evaluadas por microscopia confocal en un dispositivo Leica Fluorescence Microscope (Bensheim, Germany) utilizando un objetivo de inmersión 63X.

Experimentos in vivo. El estudio de liberación de doxorubicina en cultivos in vivo fue realizado sobre células de cáncer de colon DLD-1, mantenidas en monocapa en medio de cultivo RPMI, suplementada con un 10 % de serum bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, incubados a 37 º C bajo una atmósfera del 5 % de CO_2.

Resultadosy Discusión: La eficiencia del recubrimiento de los nanotubos de carbono con nanopartículas magnéticas fue seguida mediante microscopía de transmisión de alta resolución. como se puede observar en la Fig. 1.

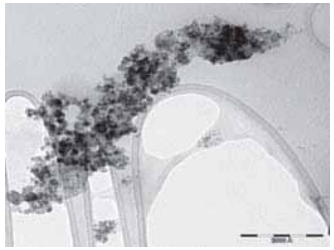


Figura 1. Figura de Microscopia de Transmision de nanotubos de carbono recubierto de nanopartículas magnéticas.

La funcionalización superficial de los nanotubos con PEG y con nanopartículas magnéticas fue evaluado en términos de la modificación de su carga superficial, como se puede ver en la Fig, 2.

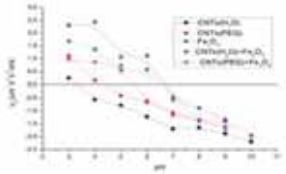


Figura 2. Movilidad electroforética de suspensiones de nanotubos de carbono Transmision de nanotubos de carbono recubierto de nanopartículas magnéticas.

La Fig. 3 muestra la adsorción del fármaco doxorrubicina, claramente se observa a partir de las medidas de movilidad electroforética en función de la concentración de fármaco y esta es tanto más positiva cuanto mayor es la concentración de fármaco. Por último, la incorporación de uno de los receptores específicos sobre expresado en líneas celulares de cáncer, como el ácido fólico ha sido seguida en términos de medidas de movilidad electrocinética (ver Fig. 4). Como puede apreciarse, las partículas funcionalizadas con PEG y sin PEG muestran punto isoeléctrico, en las proximidades de pH 4 y pH 5.5 respectivamente.Finalmente la liberación de doxorrubicina por los nanotubos de carbono in vitro en cultivos celulares de células DLD-1, se muestran en la Fig. 4. Como puede apreciarse, la liberación de fármaco es mayor en presencia de ácido fólico comparada con la misma formulación de nanopartículas sin funcionalizar con ácido fólico.

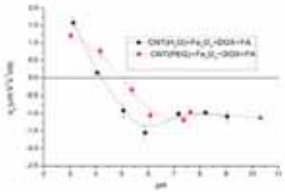


Figura 3. Movilidad electroforética de suspensiones de nanotubos de carbón recubiertos con nanopartículas magnéticas, doxorubicina, y ácido fólico, con y sin PEG.

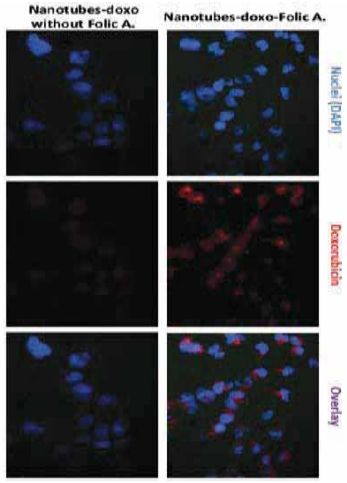


Figura 4. Imagen confocal de la liberación de doxorrubicina por nanotubos de carbono recubiertos de PEG y funcionalizados con nanopartículas magnéticas, doxorubicina, recubiertos y sin recubrir con ácido fólico.

Referencias:

(1) YangF., y cols. Magnetic functionalized carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasic treatment.Eur J Cancer;4, 7. (2011)

(2) R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, IEEE Trans. Magn.17: 1247-1248 (1981)

Aradecimientos: Proyectos FIS 11/02571 y FIS2010-19493 (Instituto de Salud Carlos III, España).

COMPARATIVE STUDY OF CANNABINOIDS PLGA NANOPARTICLES FOR ORAL DELIVERY

I. Muñoz-Rubio, L. Martín-Banderas, J. Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, M.A. Holgado

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, c/ Profesor García González, nº 2, 41012 Seville, Spain
luciamartin@us.es

Introduction: The International Association for the Study of Pain (IASP) defines neuropathic pain (NP) as that resulting from disease or damage of the peripheral or central nervous systems, and from dysfunction of the nervous system (1). Drug treatments currently available, normally opioids and anti-inflammatory drugs, are not effective in many clinical situations. Cannabinoids have different antinociceptive mechanism, providing a new line for the treatment of NP that is unresponsive to actual treatments. The problem is that these actives present unfavourable characteristics for their oral administration: not adequate physicochemical properties, stability or solubility problems (2). In this work, a comparative study of physicochemical characteristics and in vitro behaviour of different poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles (NPs) containing two cannabinoids is described.
The selected cannabinoids are 1-Naphthalenyl[4-(pentyloxy)-1-naphthalenyl] methanone (CB13), a CB1/CB2 dual agonist (the selective activation of peripheral cannabinoid CB1 receptors has the potential to become a valuable therapy for chronic pain) which displays potent antihyperalgesic activity in animal models, and limited brain penetration (3); and Δ^9-tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC or THC), which is the cannabinoid with major psychoactive activity (4).

Materials and Methods: 1-Naphthalenyl[4-(pentyloxy)-1-naphthalenyl] methanone (CB 13) and Δ^9-tetrahydrocannabinol (Tocris, Great Britain), poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50) Resomer® RG 502 (Mw: 12,000; inherent viscosity: 0.24 dl/g), Resomer® RG 502H (Mw:12,000; inherent viscosity: 0.19 dl/g), Resomer® RG 504 (Mw:48,000; inherent viscosity: 0.5 dl/g), Resomer® RG 504H (Mw: 48,000; inherent viscosity: 0.53 dl/g) and PLGA 75:25, Resomer® RG 752S (Mw: 15.000; inherent viscosity: 0.24 dl/g), were obtained from Boehringer Ingelheim (Germany), Span® 60, Tween® 80, Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich, Germany). Acetone PRS, HPLC-grade acetonitrile and HPLC-grade methanol were purchased from Panreac (Spain); threalose and HCl were obtained from VWR (Spain).

Formulation of the PLGA particles:

The NPs were prepared by the nanoprecipitation method (NPP) (5) in which a co-solution of PLGA (1.5% w/v) and Span® 60 (0.5% w/v) in acetone was added dropwise at a constant rate into 15 mL Pluronic® F68 aqueous solution (0.5 % w/v) under magnetic stirring. After acetone evaporation, the particle suspension was centrifuged to collect the NPs. Then, the NPs were re-suspended in a threalose aqueous solution (5% w/v) used as cryoprotectant and they were freeze-dried.
For CB13 and THC-PLGA loaded NPs, the polymer and drug were co-dissolved in acetone.

Characterization methods:

The particle size was calculated by a laser scattering method (Partica LA-950 V2, Horiba). The study of the geometry and surface morphology was performed by scanning electron microscopy (SEM) (Philips XL-30, Philips Electron Optics). The electrical characteristics, zeta potential (ZP), of the particle surface were measured with a Malvern-Mastersizer 2000. CB13 and THC content was determined by HPLC (Hitachi LaChrom® (D-7000) Series) and expressed in terms of entrapment efficiency (EE %).
In order to show if there are significant differences between the formulations developed, ANOVA statistics studies were realised in terms of size and zeta potential. A value of $p < 0.001$ was considered to be significant.
For in vitro drug release, NPs samples were suspended in phosphate buffer (pH=7.4) containing 0.1%w/v of Tween® 80, maintained at 37 ºC and stirred mechanically. Aliquots were withdrawn at fixed time intervals and filtered upon centrifugation at 10000 rpm. The filtered sample was injected into the HPLC apparatus for quantifying of drugs (6).

Results and Discussion: The physicochemical characteristics of PLGA-NPs (CB13-loaded and THC-loaded) were listed in Table 1.
Related to particle size, it was obtained particles in the nanoscale range for all formulations assayed. No statistical differences in size were obtained (p= 0.0017). This result could be explained due to the method preparation of the PLGA-NPs, nanoprecipitation (NPP). In spite of the differences in the formulations, NPP allows to obtain NPs with narrow particle size distribution (7).
Moreover, the NPs surface charge (zeta potential-ZP) was negative for all samples assayed. The ANOVA test shows statistical differences between the formulations developed (p= 0,0006) because the different PLGA used (Resomer ®) confer to PLGA-NPs different surface charges.
Besides, results obtained for drug content show high values of EE % for all formulations of NPs developed.

Resomer	Drug	Th. drug % w/w	Size (nm) ± SD	Potencial Zeta (mV) ± SD	EE (%)
R502	THC	1,5	308,34 ± 127,30	−33,40 ± 0,30	77,7648
R502	THC	3,3	330,74 ± 110,40	−28,90 ± 0,40	79,1469
R502	CB13	15	319,60 ± 111,30	−19,48 ± 0,40	83,1356
R502	CB13	33	352,39 ± 161,20	−20,23 ± 0,20	81,7009
R502H	THC	1,5	215,71 ± 115,80	−42,90 ± 0,40	88,8813
R502H	THC	3,3	259,76 ± 63,80	−42,20 ± 1,00	94,6954
R502H	CB13	15	236,08 ± 96,20	−40,19 ± 0,20	89,9016
R502H	CB13	33	279,82 ± 105,60	−38,49 ± 0,10	84,9772
R504	THC	1,5	313,58 ± 109,40	−38,50 ± 0,40	70,3875
R504	THC	3,3	359,64 ± 140,70	−34,50 ± 0,20	64,0488
R504	CB13	15	368,24 ± 138,10	−42,29 ± 0,30	77,7050
R504	CB13	33	426,08 ± 194,80	−41,30 ± 0,40	69,6371
R504H	THC	1,5	304,59 ± 121,60	−40,58 ± 0,20	63,9855
R504H	THC	3,3	310,54 ± 115,30	−34,80 ± 0,20	70,5174
R504H	CB13	15	385,74 ± 128,40	−45,28 ± 0,80	56,7229
R504H	CB13	33	410,84 ± 132,10	−41,49 ± 0,60	53,5276
R752S	THC	1,5	438,49 ± 156,20	−39,48 ± 0,50	65,7645
R752S	THC	3,3	576,74 ± 228,90	−34,40 ± 0,40	73,3286
R752S	CB13	15	336,35 ± 114,50	−38,49 ± 0,50	64,8486
R752S	CB13	33	530,40 ± 184,20	−35,39 ± 0,50	62,9563

Table 1. Physicochemical characteristics and drug loading of CB13 and THC PLGA-NPs.

In Figures 1a and 1b are shown, as examples, SEM and TEM micrographs, for CB13 and THC-PLGA NPs, respectively. As it can be seen, spherical and smooth particles were obtained in all cases with a similar size.

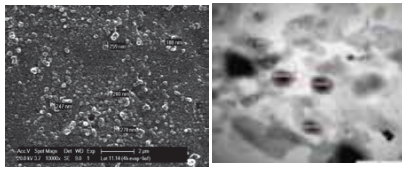


Figure 1. Microphotographies of PLGA-NPs obtained by (a) SEM and (b) TEM

Finally, the CB13 and THC *in vitro* release profiles from PLGA-NPs showed the typical drug release mechanisms in PLGA-based delivery systems (Data not shown).
After 2 h of assay, hydrolysis degradation products of CB13 and THC were not detected and only a well-defined peak appeared on its respective chromatograms, indicating that developed PLGA NPs allows to retain cannabinoids in their structures, reaching the proposed objectives.

Conclusions:
Results obtained allow to conclude that the proposed method (NPP) has been able to produce cannabinoid-PLGA-NPs in a nanometer range, with appropriate surface characteristics and adequate EE % values. Furthermore, the *in vitro* dissolution studies of the assayed formulations show adequate and controlled release profiles of the PLGA-NPs.

References:
(1) J. Scadding. Neurophatic pain. ACNR, 2003; 3: 8-12.
(2) N. Attal et al. Are oral cannabinoids safe and effective in refractory neuropathic pain? Eur. J. Pain, 2003; 8: 173-177.
(3) E.K. Dziadulewicz et al. Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone: A potent, orally bioavailable human CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration. J. Med. Chem., 2007; 50: 3851-3856.
(4) R. Mechoulam et al. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. Tetrahedron Lett. 12 (1967) 1109-1111.
(5) H. Fessi et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, Int. J. Pharm., 1989; 55: R1–R4.
(6) M. Hombreiro-Perez et al. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling J. Control. Release, 2003; 88: 413-428.
(7) H. Xie et al. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. J. Nanobiotechnology, 2010; 8: article 18.

Acknowledgments:
Financial support from Junta de Andalucía, Spain, Project P09-CTS-5029, is gratefully acknowledged.

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF SURFACE-MODIFIED PLGA NANOPARTICLES FOR ORAL ADMINISTRATION CONTAINING A SYNTHETIC CANNABINOID

M.M. Durán-Lobato, I. Muñoz-Rubio, M.A. Holgado, J. Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, L. Martín-Banderas

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

luciamartin@us.es

Introduction: CB13, a cannabinoid drug which produces high antihyperalgesic activity is a highly lipophilic compound with low water solubility (~0.001–0.002 mg/mL). As a consequence, this compound is incompletely absorbed when administered orally (1). Particles comprised of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been widely studied as therapeutic delivery vehicles to improve bioavailability of lipophilic compounds and present special interest in oral delivery. However, PLGA nanoparticles (PLGA NPs) present some drawbacks *e.g.* their limited ability to interact with the mucosa. Strategies to improve this interaction and escape clearance mechanisms, thus improving in vivo biodistribution of PLGA nanoparticles, have been developed. Most of them are based on nanoparticle surface engineering which can be achieved by surface coating or incorporating biodegradable copolymers in the formulation (2). In this work, chitosan, vitamin E, lecithin and Eudragit have been evaluated in vitro and in vivo as additives to improve CB13-loaded PLGA NPs bioavailability by means of particle surface modification.

Materials and Methods: The NPs were prepared by the nanoprecipitation method (NPP) (3). For CB13-PLGA loaded NPs, the polymer and drug were co-dissolved in acetone at a 20 % w/w concentration. To produce surface modified PLGA NPs: chitosan, Eudragit RSPO, Lecithin, and vitamin E were co-dissolved in the polymer solution except for chitosan which was added in an additional step (after NP formation). For this purpose, NPs were incubated in a chitosan solution overnight (0.25 % w/v chitosan in acetic acid 1% v/v) and then collected by centrifugation. Cell viability CB13 loaded-PLGA nanoparticles and surface modified nanoparticles were measured by MTT assay in Human colon adenocarcinoma cells, Caco-2 cells (American Type Culture Collection) as described previously (4). The cells were incubated with the CB13-loaded NP suspensions or CB13 at concentrations ranging from 0.025 to 25 mg/mL for 24 and 48h. Cells without particles were used as a negative control and cells incubated with DMSO as a positive control. Cell viability was calculated as the percentage of absorbance referred to the control mean value of absorbance. To quantitatively measure in vitro cellular uptake of nanoparticles, Caco-2 cells were cultivated in culture flasks until 80% confluence. Then, the medium was changed with nile red-loaded NPs suspension in culture medium (500, 250 and 100 mg/mL). After 2 h of incubation, the suspension was removed and the flasks were washed with medium. The cells were removed with a trypsin solution (1x) and the amount of fluorescence present in each well was then measured using a flow cytometer (Cytomics FC 500 MPL). As a qualitative cellular uptake study, cells were seeded in a chamber (250 uL of a 4 mg/mL NPs suspension) (Ibidi, Germany) until 80 % of confluence. After that, cells were incubated with a medium suspension containing nile red NPs for 2 h. Then, cells were washed with PBS and then fixed with paraformaldehyde (PFA) The nuclei were counter stained with Hoescht 33258 and observed by confocal laser scanning microscope (CLSM) (Zeiss LSM 410). To determine the NPs biodistribution, fluorescently labeled particles were orally administered to unchallenged twelve weeks CD/57 male mice (25 - 30 g). Seven groups of three mice per group were treated with 4 mg of labeled NPs in 0.2 mL sterile saline by oral gavage. After 1 and 4 days, organs were collected and homogenized on ice in PBS and analyzed for fluorescent particles on a plate reader (Biotek, Winooski, Vermont) at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively.

Results and discussion: After NPP synthesis PLGA NPs resulted in 320-420 nm with almost narrow size distribution. NPs treated with chitosan and Eudragit showed positive zeta potential (ZP) values. On the other hand, plain PLGA NPs and those elaborated with lecithin and vitamin E resulting in negative ZP. In order to increase the mucoadhesion properties to retain drugs at a site of action positively charged NPs are required. In this sense, CS-PLGA and Eud-PLGA are *a priori* the most suitable NPs for CB13 oral drug delivery.

MTT assays after 24 and 48 h demonstrated that formulations assayed were non cytotoxic.

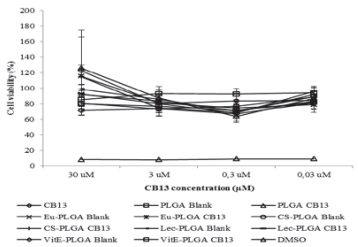


Figure 1. Caco2 cell viability after 48h of incubation with surface-modified PLGA NPs containing CB13

Cellular uptake of NPs was studied qualitatively and quantitatively by CLSM and flow cytometry (figure 3), respectively. Figure 2 show CLSM microphotographs where it is possible to observe the internalization of NPs into Caco2 cell, used as gastrointestinal mucosa model.

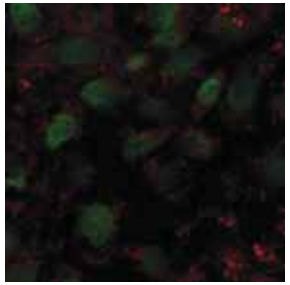


Figure 2. CLSM images of Caco2 cells after 2h exposure with plain PLGA NPs (red: nile red NPs; green: nuclei)

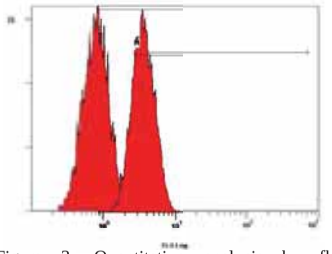


Figure 3. Quantitative analysis by flow cytometry of uptake rate in Caco-2 cells after 30 and 120 min incubation of CB13 loaded-PLGA nanoparticles.

NPs biodistribution was evaluated after 1 and 4 days after oral administration into mice. NPs accumulation into heart, liver, kidney, lung, spleen and brain were quantified by fluorescence measurements. Results obtained are summarized in figure 3. NPs were accumulated mainly in spleen and liver followed by brain, kidney, lungs and heart. Nevertheless, chitosan-PLGA NPs showed the lower accumulation in all the analyzed organs.

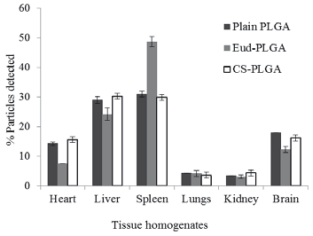


Figure 3. Tissue distribution graphically represented as a measure of percentage of particles detected of the total particles (n=3) (error bars indicate SD): (a) 24 hours and (b) 4 day

Successful *in vivo* drug delivery for oral administration may require not just a well-defined nanostructure but also a low cytotoxicity, cellular uptake efficacy by the gastrointestinal gut and long circulating efficacy. In present work, various PLGA NPs coated with CS, Eudragit RSPO and other additives were successfully elaborated. CS-PLGA and Eu-PLGA NPs resulted positively charged and were effectively uptaken by Caco2 cell. In vivo distribution assays demonstrated a lower amount of CS-PLGA NPs sequestered in spleen, liver and kidney. Based in the above results, these polymeric NPs are presented as good candidate for oral delivery of CB13.

References:

(1) Gardin, A. et al. Cannabinoid Receptor Agonist 13, a Novel Cannabinoid Agonist: First in Human Pharmacokinetics and Safety. Drug Metab. Dispos. **2009**; 37: 827-833. (2) des Rieux, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. J. Control. Release, **2006**, 116, 1-27. (3) Fessi H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm. **1989**; 55: R1–R4. (4) Vihola, H. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam), Biomaterials 26 (**2005**) 3055–3064

Acknowledgments:

L. M.-B. and M. D. L. are especially grateful to the Junta de Andalucía (Spain) (Project Nr. P09-CTS-5029) and IV Plan Propio (Universidad de Sevilla). We thank also Microscopy and NMR services of CITIUS (University of Seville) for technical assistance.

INCORPORACIÓN DE FLAVONOIDES EN LIPOSOMAS, MEMBRANAS DE ERITROCITOS Y NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA, VEHÍCULO Y EFICIENCIA ANTIOXIDANTE.

J. Morales[1], P. Bustos[1], E Lemp[2], A. Zanocco[2], G. Günther[2].
[1]Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Universidad de Chile.
[2]Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Universidad de Chile.

Introducción: Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En muchos estudios se han descrito sus propiedades beneficiosas para la salud, destacando el rol que cumplen en la prevención de enfermedades cardíacas y cáncer. Las propiedades farmacológicas de los flavonoides están relacionadas a su efecto antioxidante, protegiendo a los organismos vivos que sufren estrés oxidativo, del daño que producen radicales libres y otras especies reactivas, incluyendo al oxígeno excitado. El oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) es el estado de mayor energía del oxígeno molecular, normalmente presente en sistemas en los cuales hay un desbalance entre el sistema antioxidante y la producción de especies oxidantes. Las reacciones del $O_2(^1\Delta_g)$ son importantes en los sistemas biológicos, en los cuales puede ejercer un papel nocivo (dañando valiosas biomoléculas) y/o un papel benéfico, principalmente debido a su uso en la terapia fotodinámica del cáncer.
Los flavonoides se han propuesto como antioxidantes en formulaciones para productos farmacéuticos y de alimentos funcionales. Sin embargo, el uso de estos compuestos es limitado por restricciones de solubilidad en agua e inestabilidad bajo ciertas condiciones de temperatura, luz y pH.
El objetivo de este trabajo fue estudiar y caracterizar la incorporación de flavonoides en sistemas microheterogéneos de interés farmacéutico (liposomas, fantasmas de eritrocitos y nanopartículas de sílice) y evaluar sus propiedades antioxidantes frente al oxígeno molecular singulete.

Materiales y Métodos: Quercetina (QUER), canferol (CANF) y morina (MOR) fueron seleccionados como flavonoides de estudio. Liposomas unilamelares de DPPC, POPC y mezcla de ambos, obtenidos por extrusión y sonicación, fueron preparados en el laboratorio. Las membranas de eritrocitos (gosth) fueron obtenidas por hemólisis de sangre de voluntarios sanos. Nanopartículas de sílice fueron sintetizadas por hidrólisis de TEOS y posterior modificación superficial con grupos NH_2.
Se evaluó la incorporación de flavonoides en liposomas y membranas de eritrocitos mediante la determinación del coeficiente de reparto y modulación de la fluidez de la membrana, utilizando pruebas fluorescentes (laurdan y DPH) que se ubican a distintas profundidades en la bicapa.
En las nanopartículas de sílice se determinó la eficiencia de incorporación de estos antioxidantes, dependiendo del tamaño, potencial superficial por modificaciones estructurales y pH del medio de dispersión.
En todos los sistemas propuestos se estimó la capacidad antioxidante frente a oxígeno molecular singulete, generado por fotosensibilización, mediante determinación de la reactividad química bajo condiciones experimentales de estado estacionario.

Resultados y Discusión: La Tabla 1 muestra los resultados del reparto de los flavonoides estudiados en sistemas hidrofílico / lipofílico (sistema octanol / medio tamponado; liposoma / fase acuosa externa. Los hidroxilos de estos compuestos tienen una fracción ionizada dependiendo del pKa del grupo sustituyente y del pH del medio. Los resultados muestran que en un medio tamponado a pH 7,4, sólo el hidroxilo ubicado en posición 3 del anillo C de morina se encontraría ionizado, y el de quercetina y canferol, se encontrarían parcialmente desprotonados. Al aumentar el pH del medio, aumentaríamos la ionización de este hidroxilo en C-3 y también del OH ubicado en la posición 5 del anillo A. A pH fisiológico, este hidroxilo que se encuentra ionizado, favorecería su interacción con la superficie de liposomas con carga positiva (DODAC). Los liposomas de POPC / DPPC sintetizados, poseen un potencial zeta negativo, interacción membrana – flavonoide modulada por el efecto de la densidad electrónica de los grupos hidroxilos que no se encuentran ionizados a este pH.

FLAV	log D (distribución) o log P (partición)		
	Octanol / tampón pH 7.4	Liposomas POPC/DPPC (7:3)	Liposomas DODAC
QUER	2.8	3.8	4.5
MOR	1.9	5.0	5.4
CANF	3.5	4.5	5.2

Tabla 1: Valores obtenidos para el coeficiente de reparto de los flavonoides

En cuanto al efecto de flavonoides sobre la modulación de la fluidez de membranas (Figura 1 y Figura 2), se observa que para liposomas con los antioxidantes incorporados, existe un decremento de los valores de la polarización generalizada de Laurdan (GP), en comparación a los datos obtenidos en liposomas blancos (Figura 1). Esto se debe al cambio en el acceso del agua en el microentorno donde está ubicada esta prueba fluorescente por presencia del flavonoide. Así, los flavonoides y laurdan compartirían una ubicación similar en la membrana. Sin embargo, no se aprecia cambio en la temperatura crítica por presencia de los tres flavonoides en la bicapa, resultado que es corroborado con los datos de la anisotropía de DPH en eritrocitos (Figura 2). La anisotropía es utilizada para obtener datos sobre la estructura y dinámica de la porción hidrocarbonada (zona hidrofóbica) de las membranas, evaluando la microviscosidad.

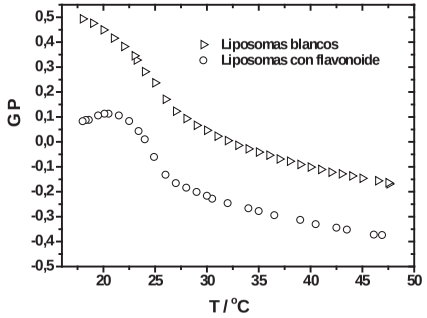


Figura 1: Variaciones de GP de laurdan en liposomas POPC/DPPC. Efecto de la incorporación de flavonoide morina.

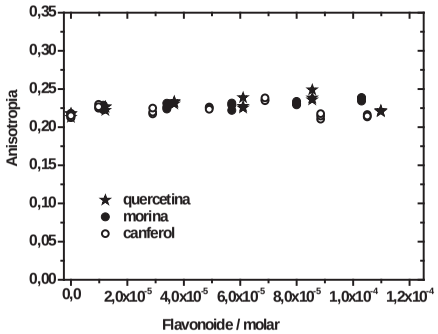


Figura 2: Cambios de la anisotropía (DPH) en membranas de eritrocitosValores obtenidos para el coeficiente de reparto de los flavonoides.

Respecto a la reactividad de estos antioxidantes con oxígeno excitado (Tabla 2), los valores obtenidos en medio microorganizados presentan diferencias de magnitudes con los de medio homogéneo, sin embargo, el orden de reactividad es similar:
morina>quercetina>canferol.
La inhomogeneidad característica de las bicapas lipídicas propicia un medio de óptimo para la reacción de flavonoides con oxígeno molecular singulete con similitudes a un medio con menor polaridad que el etanol, otorgado por la presencia de grupos gliceroles en las membranas fosfolípidicas. Los valores obtenidos en membranas de eritrocitos mantienen la tendencia a los resultados obtenidos para liposomas. La membrana de los eritrocitos contiene –al igual que todas las membranas naturales- una gran cantidad de proteínas, las cuales otorgan un medio ambiente distinto.

FLAV	Constante experimental(k_{EXP}) / s^{-1}		
	Liposomas POPC	Liposomas POPC/DPPC (7:3)	Membrana Eritrocitos
QUER	4.3×10^{-4} (1.6×10^{-5})	3.6×10^{-4} (9.5×10^{-6})	6.3×10^{-4} (7.8×10^{-5})
MOR	5.4×10^{-3} (1.6×10^{-4})	3.6×10^{-3} (1.5×10^{-4})	2.6×10^{-3} (9.4×10^{-5})
CANF	1.3×10^{-4} (5.9×10^{-6})	1.7×10^{-4} (8.1×10^{-6})	1.6×10^{-4} (1.7×10^{-5})

Tabla 2: Constantes experimentales de reactividad química en medios microheterogéneos.

La incorporación de los flavonoides en nanopartículas de sílice se incrementa (90-95%) cuando se modifica la superficie del vehículo con grupo NH_2, en comparación con las nanopartículas porosas con grupos OH, donde el porcentaje de antioxidante adsorbido se encuentra por debajo del 10%. Sin embargo, las nanopartículas con grupos NH_2 tienen problemas de dispersión en medio acuoso, lo cual puede ser mejorado con la adición de PEG, agente que también favorece la cesión de los compuestos antioxidantes.

Referencias:

Javier Morales, Germán Günther, Antonio L Zanocco, Else Lemp. Singlet Oxygen Reactions with Flavonoids. A Theoretical - Experimental Study. Plos one (ISI). Julio 2012. Volume 7. Issue 7. e40548

Agradecimientos:

Proyecto VID I09/05-2 Universidad de Chile.
Proyecto Fondecyt de Iniciación N° 11121172.

OPTIMIZATION OF O/W NANO-EMULSIONS SUITABLE FOR DRUG DELIVERY BY A CENTRAL COMPOSITE FACTORIAL DESIGN

G. Morral Ruíz[1*], P. Melgar-Lesmes[1], M.L. García[2], C. Solans[3*], M.J. García-Celma[1*]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Unidad I+D asociada al CSIC, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain.
[2] Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain.
[3]Departamento de Nanotecnología Química y Biomolecular, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain.
[*]Centro de Investigación de Biomedicina en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).

Introduction: Nano-emulsions are a class of emulsions with a uniform and very small droplet size ranging between 20 and 200 nm[1]. Owing to their small size, some nano-emulsions are optically transparent or translucent appearing microemulsions but they are non-equilibrium systems and therefore require energy input for their formation. Nevertheless, in spite of being thermodynamically unstable dispersions, they may exhibit a long kinetic stability. All of these characteristic properties make nano-emulsions idoneous systems for different applications in chemical, cosmetical and pharmaceutical fields[2,3]. The choice of composition variables as well as the suitable preparation method plays a key role in the formation of nano-emulsions with a small droplet size and low polydispersity index. In this context, experimental design is a useful tool to evaluate the influence of different composition variables collectively, contrasting to the conventional method in which one only variable is studied while the others remain constant and the combined effect of all variables is not taken into consideration[4]. **The aim** of this research has been to study the formation of O/W nano-emulsions in water (W)/ nonionic surfactant (S)/ nonionic cosurfactant (coS)/ oil systems with biocompatible components suitable for drug delivery and to optimize these nano-emulsions through the study of composition parameters by a central composite factorial design.

Materials and methods: The phase diagrams of water/ Cremophor® EL: Poloxamer 188/ saturated medium chain triglyceride systems were determined visually at 25ºC by stepwise addition of one component to the mixture of the other components. After each addition the samples were stirred, homogenized and kept at 25ºC.

Nano-emulsions were prepared at 50ºC by the Phase Inversion Composition (PIC) emulsification method[5] through the addition of water to oil/surfactant /cosurfactant mixtures under mechanical stirring at 2500 rpm using a vibromixer.

The mean droplet sizes and polydispersity index of nano-emulsions were determined at 25ºC just after preparation by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Zetasizer nano Zs (Malvern Instruments, UK).

Nano-emulsions formulations were optimized by a central composite factorial design which allows generating a specific response surface through the statistical analysis of the selected variables. In this study, we selected the droplet size and polydispersity index as dependent variables and three composition parameters (S, CoS and water concentration) which were studied at five different levels as independent variables. Therefore, a matrix with a total of 16 experiments was designed using Statgraphics Centurion software. Response surfaces were represented by a second-order polynomial regression model as shown in the following equation:

$$y=b_0+b_1(x_1)+b_2(x_2)+b_3(x_3)+b_{12}(x_1x_2)+b_{13}(x_1x_3)+b_{23}(x_2x_3)+b_{11}(x_1)^2+b_{22}(x_2)^2+b_{33}(x_3)^2$$

where y corresponds to the measured response, x_i to the influence of independent variable i and b_{ii} to the effect derived of interaction between different independent variables. The significance of the effects and interactions between variables were performed through the analysis of variance (ANOVA).

Results and Discussion: A liquid isotropic region corresponding to nano-emulsions and microemulsions was identified in the water/ Cremophor® EL: poloxamer 188/ saturated medium chain triglyceride systems as shown in Fig.1.

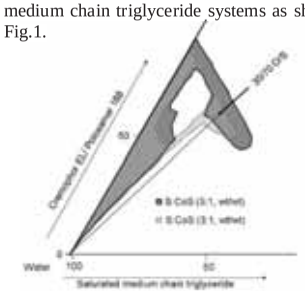


Figure 1: Liquid isotropic region (shadowed areas) determined visually at 25ºC in the water/ Cremophor® EL: poloxamer 188/ saturated medium chain triglyceride systems.

In order to optimize the nano-emulsion formulations, a central composite factorial designed was developed. Surfactant concentration (corresponding to O/S ratio expressed in %S), cosurfactant concentration (corresponding to S/CoS ratio and expressed in % CoS) and water concentration were selected as the most influencing factors that might affect the physicochemical properties of nano-emulsions. Droplet size and polydispersity index were selected as main nano-emulsion properties to evaluate. Experimental matrix with droplet size and polydispersity index values obtained by DLS for each experiment is plotted in table 1.

Table 1: Experimental field for a central composite design matrix: Formulation variables and measured response (mean droplet size and polydispersity index) in nano-emulsion systems.

Run	Surfactant concentration (wt.%)	Water concentration (wt.%)	Cosurfactant concentration (wt%)	Mean Droplet size (nm)	Polydispersity index
1	80.0	85.0	25.00	55.40	0.197
2	90.0	85.0	16.66	30.67	0.175
3	85.0	90.0	20.83	26.75	0.108
4	85.0	90.0	20.83	26.84	0.144
5	85.0	98.4	20.83	21.64	0.109
6	85.0	81.6	20.83	51.17	0.190
7	76.6	90.0	20.83	34.92	0.112
8	90.0	85.0	25.00	36.02	0.176
9	85.0	90.0	13.81	25.75	0.095
10	85.0	90.0	27.84	25.75	0.161
11	90.0	95.0	25.00	19.68	0.097
12	80.0	95.0	16.66	23.56	0.112
13	80.0	85.0	16.66	44.00	0.174
14	90.0	95.0	16.66	17.79	0.066
15	93.4	90.0	20.83	24.14	0.131
16	80.0	95.0	25.00	25.26	0.106

To evaluate the statistical significance of the effects and their interactions derived of the influence of independent variables in nano-emulsion properties, ANOVA statistical test were performed for each factor by Pareto charts (Fig.2).

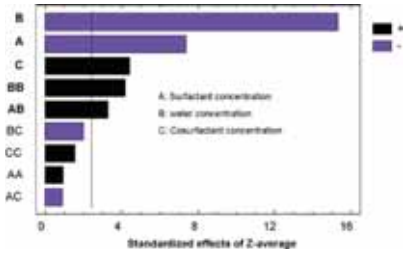


Figure 2: Pareto chart of the standardized effects on the mean droplet size of O/W nano-emulsions.

Factorial design showed five statistically significant effects in the nano-emulsion droplet size with a *p* value lower than 0.05. Thereby, the concentration of surfactant and water provided a negative effect in the mean droplet contrasting to the cosurfactant concentration which showed a positive effect.

To establish the relationship between the factors and the response, quadratic polynomial equation was calculated and the three-dimensional response surface was plotted (Fig 3).

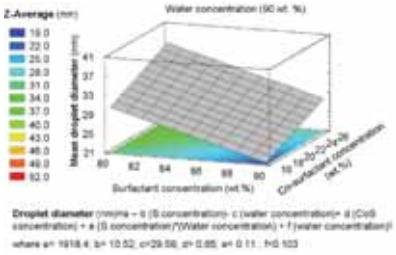


Figure 3: Response surface of nano-emulsion droplet diameter as a function of surfactant and co-surfactant concentration.

As shown in Fig 3, for a constant concentration of water (90wt%), the formation of O/W nano-emulsions with a small droplet diameter is achieved with low concentration of CoS but high concentration of surfactant. Moreover, a lineal correlation between surfactant and co-surfactant concentration with the droplet size was observed.

Therefore, we can conclude that low concentrations of poloxamer 188 and high concentrations of surfactant are required to obtain O/W nano-emulsions with the smallest droplet size and low polydispersity index.

References:

(1) Solans C. et al. Nano-emulsions. *Cur Op Colloid Inter Sci.* 10: 102-110 (2005).
(2) Sadurní N. et al. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications *J. Pharm. Sci.* 26: 438-445 (2005).
(3) Morral G. et al. Formation of Pegylated polyurethane and Lysine-coated polyurea nanoparticles obtained from O/W nano-emulsions. *Langmuir* 28: 6256-6264 (2012).
(4) Montgomery D. *Design and Analysis of Experiments*, 7th Edition. Whiley and Sons eds., New York, 2010.
(5) Solè I. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J Colloid Interface Sci.* 344:417-23 (2010).

Aknowlegments:
The authors acknowledge the sponsorship of the Spanish Ministry of Education and Science, DGI (CTQ 2011- 29336 - C03 - 03 / PPQ), "Generalitat de Catalunya" DURSI (Grant 2009 SGR-961) and CIBER-BBN.

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE FRACCIONAMIENTO DEL ACIDO HIALURÓNICO POR ULTRASONIDOS PARA SU EMPLEO EN LA ELABORACIÓN DE HIDROGELES DE HA/PLURONIC F-127

A. Oliva[1], C. Monzón, A. Santoveña, M. Llabrés, J. Fariña
[1]Departmento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38200, Tenerife, España

Introducción

El ácido hialurónico (HA) es un polímero natural compuesto de cadenas lineales de β-1,3-N-acetilglucosamina y α-1,4 ácido glucurónico con un peso molecular de hasta 6 millones de Dalton. El HA es un importante componente de la matriz extracelular en el tejido conectivo te y particularmente abundante en el humor vítreo y fluidos sinoviales. Debido a su immunoneutralidad ha sido ampliamente utilizado como material biocompatible y biodegradable para la administración de fármacos, en procesos de regeneración de tejidos, sutura de heridas y como promotor de la absorción de fármacos y proteínas (Cho et al, 2003). Sin embargo, los hidrogeles de HA muestran unas pobres propiedades mecánicas con una rápida degradación *in vivo* debido a su elevada capacidad de adsorción de agua y a la degradación enzimática por la hialuronidasa (Lee et al, 2010). Los hidrogeles de HA/Pluronic-F127 representan un tipo de hidrogeles con una transición sol-gel dependiente de la temperatura, con unas excelentes propiedades de adhesión a los tejidos y podrían ser una alternativa para la administración de fármacos (Lee et al, 2010). Para la síntesis de este tipo de hidrogeles se requiere HA de bajo peso molecular (~130kDa). En este punto, los ultrasonidos han sido aplicados en procesos de degradación de polímeros, reacciones de copolimerización, reacciones químicas de diferente naturaleza, purificación de polímeros dado que permite eliminar las fracciones de elevado peso molecular y en el fraccionamiento de HA. En este tipo de estudios, el peso molecular es uno de los factores determinantes de la eficacia del proceso que puede ser controlado durante la degradación por ultrasonidos. A diferencia de la degradación física o química, la degradación por ultrasonidos es un proceso no aleatorio y reproducible si se mantienen constantes las condiciones del proceso y además, sus efectos son permanentes (Mahalik et al. 2005, Grönroos et al. 2008). La velocidad y extensión de la degradación dependen de la concentración de polímero, duración y potencia del ultrasonido y de la naturaleza química del disolvente y del polímero. Hay varios modelos que describen la evolución del peso molecular durante la sonicación, la mayoría de ellos basados en la cinética de distribución continua (Madrás y col. 2003). El objetivo de este trabajo fue obtener HA de bajo peso molecular a partir de un proceso de fraccionamiento por ultrasonidos para utilizarlo posteriormente como producto de partida en la síntesis de hidrogeles de HA/Pluronic. En segundo lugar, comprobar si el proceso de degradación del HA por ultrasonidos sigue un proceso no aleatorio aplicando el modelo de Madras y col. (2003) basado en cinéticas de distribución continua.

Materiales y Métodos

Fraccionamiento del ácido hialurónico (HA) comercial

Se utilizó una solución al 1% de HA (Fluka) en tampón fosfato (PBS) sumergida en un baño de agua-hielo a una temperatura entre 0-4ºC que fue sonicada utilizando una sonda de ultrasonidos (SONIFIER™ 150) a una frecuencia de 35kHz y una densidad de potencia de 0,2 W/mL. Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo regulares durante 3 horas y se analizaron inmediatamente por duplicado.

Determinación del peso molecular absoluto

Se utilizó un cromatógrafo Waters compuesto por una bomba (modelo 600E), un inyector automático (Wisp 700), una columna Ultrahydrogel lineal (Waters), y un refractómetro diferencial (Modelo 410) conectado en línea a un detector de dispersión de luz laser multiángulo (Treos ®, Wyatt Technology). Ambos detectores fueron calibrados previamente. Se asignó un valor de dn/dc de 0,155 mL/g para el ácido hialurónico y sus derivados. La adquisición y análisis de los datos se realizó a través del programa ASTRA® (Wyatt Technology).

Modelo teórico

Considerando que la rotura de la cadena del polímero (*P*x) se produce en el punto medio dando lugar a dos cadenas hijas de pesos moleculares similares, el proceso puede ser descrito como:

$$P(x) \rightarrow 2P(x/2 \quad \text{Ec. 1}$$

Asumiendo que la constante de degradación *K* (M) viene dada por:

$$K\,(M) \rightarrow k(M - M_{Lim}) \quad \text{Ec. 2}$$

Esta expresión indica que la degradación no progresa cuando se alcanza un peso molecular límite (M_{Lim}) y la velocidad de degradación k, es independiente del peso molecular.

Aplicando una cinética de distribución continua, considerando los momentos de la distribución de los pesos moleculares y asumiendo unas condiciones iniciales adecuadas (para más detalles ver Konaganti y Madras 2010), obtenemos:

$$Ln\left(\frac{\frac{1}{M_O}-\frac{1}{M_{Lim}}}{\frac{1}{M_t}-\frac{1}{M_{Lim}}}\right) = Ln\,(H_1) = kM_{Lim}t \quad \text{Ec. 3}$$

Donde M_t representa la variación del peso molecular (en número) con el tiempo de sonicado t, en función de un peso molecular inicial (M_o) y un peso molecular límite que corresponde a la cadena más pequeña que se puede obtener en el proceso de degradación (M_{Lim}).

Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra el ajuste de la variación del peso molecular (en número) con el tiempo, considerando el modelo de Madras y col (2003).

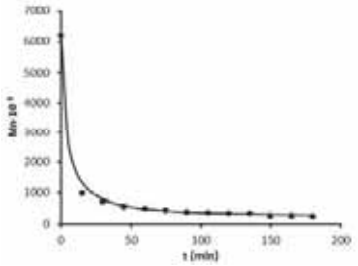


Figura 1. Variación del peso molecular en número con el tiempo de sonicado de acuerdo con el modelo de Madras y col.

Como puede verse, el peso molecular desciende rápidamente en una primera fase, antes de 30 minutos, pasando de 6700kDa a menos de 1000kDa y posteriormente progresa lentamente hasta alcanzar un peso molecular límite.

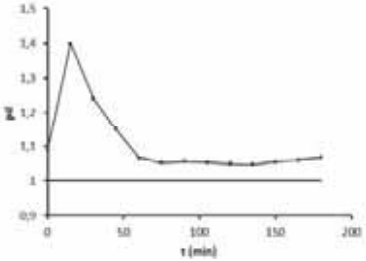


Figura 2. Variación de la polidispersidad del HA con el tiempo de sonicado.

Por el contrario, la polidispersidad (pd) se aproxima a la unidad (pd media de 1,055) lo que pone de manifiesto que el fraccionamiento de HA por ultrasonidos permite obtener polímeros monodispersos (Figura 2).

La representación del Ln (H_1) vs tiempo permite obtener la constante de velocidad del proceso $4{,}47\cdot10^{-8}$ ($mol\cdot g^{-1}\cdot min^{-1}$), mientras que el peso molecular límite fue de 257kDa (Figura 3). Este resultado confirma que la rotura del HA por ultrasonidos sigue un proceso no aleatorio, donde la cadena inicial se fragmenta en dos cadenas hijas y así sucesivamente, hasta un peso molecular límite.

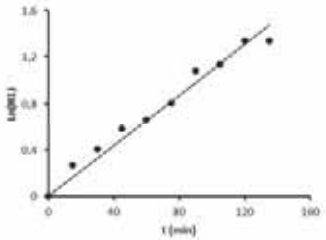


Figura 3. Representación del ln (H1) frente al tiempo de sonicado de acuerdo con el modelo de Madras y col.

Los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones de trabajo del ultrasonido es posible obtener HA de bajo peso molecular (en peso), ~270kDa, prácticamente monodisperso, aunque lejos del objetivo inicial, ~130kDa. Dado que la velocidad y extensión de la degradación del HA depende de varios factores, es necesario optimizar las condiciones de trabajo por ultrasonido para obtener HA de peso molecular inferior a 150kDa.

Referencias:

1) Cho, K et al., Int. J. Pharm. 260:83-91 (2003).
2) Lee, Y et al., Soft Matter 6:977-983 (2010).
3) Mahalik JP, Madras G, Ind. Eng. Chem. Res. 44:6572-6577 (2005)
4) Grönroos A et al., Ultrason. Sonochem.15: 644-648 (2008)
5) Chattopadhyay S, Madras G, J. Appl. Polym. Sci. 88:2812-2822 (2003)
6) Konaganti VK, Madras G, Ultrason. Sonochem.17: 403-408 (2010)

Agradecimientos:

- Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitivdad de España (Proyecto SAF2010-17083)

DEVELOPMENT OF NANOCONJUGATES FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY: DEFINITION OF AN ADEQUATE FREEZE-DRYING PROTOCOL

M Oliva[1,2,3], M Enjuanes[2,3], F Andrade[4], MI Giannotti[1,2,5], F Sanz[1,2,5]

[1] Biomedical Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Zaragoza.
[2] Nanoprobes & Nanoswitches Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona.
[3] Pharmaceutical Technology Department, Universitat de Barcelona, Barcelona.
[4] Laboratory of Pharmaceutical Technology, LTF/CICF. University of Porto, Porto, Portugal.
[5] Physical Chemistry Department, Universitat de Barcelona, Barcelona.

moliva@ibecbarcelona.eu

Introduction:

Fabry disease is an X-linked recessive disorder caused by a deficiency of lysosomal hydrolase α-galactosidase A (GLA). Current enzyme replacement therapy (ERT), with exogenously administered recombinant enzyme, has a limited treatment efficacy because the enzyme may be opsonized, due to the lack of effective protein delivery systems that allow the controlled release of GLA into the lysosomes. In that respect, we have recently developed functional trimethyl chitosan (TMC)-based polyelectrolyte complexes (PECs) through self-assembly and ionotropic gelation, able to release the enzyme at acidic pH [1]. These PEC nanoparticles were stable and active under physiological conditions, and were efficiently internalized by human endothelial cells and mostly accumulated in lysosomal compartments. The superior physicochemical characteristics of these PECs together with their excellent cellular uptake properties indicate their enormous potential as advanced protein delivery systems for the treatment of Fabry disease. However, stability in liquid medium during storage was found to be a major limitation for these systems. To overcome this problem, lyophilization should be an appropriate method for isolating PECs in solid state.
The aim of this work was therefore to establish the adequate conditions for freeze-drying (FD) TMC/GLA PECs. To this end, dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM) analyses were performed in a routine way to all samples in order to evaluate the suitability of the assayed methods.

Experimental:

Polyelectrolyte complexes formation:
Recombinant GLA (obtained by transient gene expression in the HEK 293F cell line and purified by affinity chromatography [2]) was kindly supplied by Dr. J.L. Corchero and Prof. A. Villaverde from the Institute for Biotechnology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona (IBB, UAB).
TMC was synthesized in our lab from commercially available middle-viscous chitosan (Fluka) with a deacetylation degree of 87% (as determined by 1H NMR), following a two-step method described in the literature [3].
For PECs preparation, penta-sodium triphosphate (TPP, Fluka), used to induce ionotropic gelation, was first dissolved in a GLA solution (100 μg/mL in 10 mM HEPES buffer pH 7.4) to a concentration of 23 μg/mL. Afterwards, a solution of TMC at a concentration of 35 μg/mL (in 10 mM HEPES buffer pH 7.4) was added in a volume ratio 70:30 for PECs formation, followed by vortex mixing for 5" and incubation at room temperature for at least 60 min [1].

Freeze drying of PECs: Here we use a LyoMega-30 freeze-dryer (Telstar, Terrassa), equipped with product temperature probes. FD vials (12 mL) were filled with 6mL sample.
In a previous study [4], different freeze-drying protocols were tried, defining a constant condenser temperature of -80ºC and a vacuum limit of 300 μmHg. The eutectic point was found to be -27.4 ± 0.8ºC, so that freezing at -35ºC seemed a reasonable safety limit. Conditions of the most suitable protocol are listed in Table 1.

Freezing	Slow, -35ºC
Sublimation	+20ºC, 8 h
Secondary drying	+30ºC, 10 h
Temperature holds	No

Table 1. *Freeze-drying conditions.*

In this work the convenience of using a cryoprotector is studied. A 5% (w/v) mannitol solution was prepared, and added to PEC suspensions at a 0%, 30%, 50% and 70% (v/v).

PECs characterization:
In order to characterize FD-PECs, 5 mL of ultrapure water were injected inside the vials for resuspension. Whenever further dilution was needed, 10mM HEPES buffer (pH 7.4) was used to this end, in order to maintain the pH conditions.
- ***Size and ζ-potential*:** The average size (D), polydispersity index (PDI), and ζ-potential values for the PEC suspensions were determined by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) equipped with a He-Ne laser (λ = 633 nm) as the incident beam, using folded capillary cells.

- ***Morphology*:** Imaging of PECs was done with a Multimode® VIII AFM (Nanoscope® V controller), operated in the PeakForce QNM® (Quantitative Nanomechanical Property Mapping) mode. Nanoscope® and PeakForce QNM® are trademarks from Bruker. V-shaped Si3N4 cantilevers with a pyramidal SiO2 tip (nominal spring constant 0.58 N/m, nominal tip radius 5 nm) were used for imaging. Scanning was performed at 1 Hz frequency with a resolution of 512x512 pixels. A drop (35 μL) of the suspension sample was placed on top of freshly cleaved highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) and left for 30 min. Then, the solution was removed and replaced with 10 mM HEPES buffer pH 7.4 for imaging under a controlled liquid environment.

Results and Discussion:

The results obtained from the DLS analysis of FD-PECs after redispersion are summarized in Table 2.

Sample	*Size (d, nm)*	*ΔSize (3 weeks)*	*PdI*	*Zeta (mV)*
PECs	238,1	+18,7%	0,154	17,6
FD-PECs (0%)	158,1	+7,9%	0,299	16,0
FD-PECs (30%)	425,5	-51,9%	0,458	22,6
FD-PECs (50%)	331,7	-47,2%	0,429	23,2
FD-PECs (70%)	274,2	-7,3%	0,465	23,0

Table 2. *Mean values resulting from DLS analysis of freeze-dryed samples at different cryoprotector %. ΔSize (3 weeks) column shows the diameter increase after 3 weeks in suspension, storage at 4ºC.*

A notable diameter increase after freeze-drying is observed in PECs with cryoprotector. Even if this effect decreases by increasing mannitol concentration, no higher percentages were used, since it would reduce excessively PECs amount in the final drug presentation. Moreover, a PdI around 0,5 was found when using cryoprotector, despite Zeta potential was >20 mV, which excludes particle aggregation.
On the other hand, when mannitol solution was employed, PECs diameter was reduced after 3 weeks storage at 4ºC (particularly those with lower %), whereas PECs and FD-PECs diameter increased. Moreover, resuspended FD-PECs without cryoprotector, seem to be more stable in terms of particle size than freshly prepared PECs. A comparison of DLS results between PECs and FD-PECs without cryoprotector is shown in Figure 1.

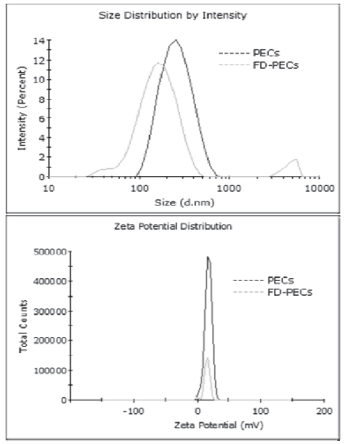


Figure 1. *a) Size and b) ζ-Potential distributions of PECs and redispersed FD-PECs (0%) resulting from DLS analysis.*

AFM characterization confirmed some of the assumptions made from DLS results. When no cryoprotector was used, FD-PECs exhibited similar morphology to freshly prepared PECs, as shown in Figure 2, confirming the suitability of freeze-drying without cryoprotectors. Conversely, when PECs were free-dried using 50% and 70% (v/v) mannitol 5% (w/v) solution, big particles were observed, rather than aggregate of smaller particles. No images were obtained from FD-PECs (30%), probably due to tip-sample interactions, which hindered continuous scanning.

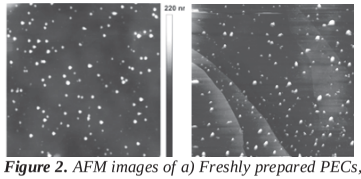


Figure 2. *AFM images of a) Freshly prepared PECs, and b) FD-PECs without cryoprotector. Scan area was 10x10 μm in both cases.*

References:

1. Giannotti MI *et al.* 2011. Biomacromolecules. 12(7):2524.
2. Corchero JL *et al.* 2011. Biotechnol Prog. 27(5):1206.
3. Sieval AB *et al.* 1998. Carbohydr. Polym. 36:157.
4. Oliva M *et al.* 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Istambul (Turkey), 19-22 March 2012.

Acknowledgements: Financial support from CIBER-BBN (FABRY project) and Fundació La Marató de TV3 (NanoFabry project) is gratefully acknowledged.

ESTIMATING THE NUMBER OF CAPSULES PER MILLILITER AND THE NUMBER OF CELLS PER CAPSULE

E. Santos[1,2], J.L. Pedraz[1,2], R.M. Hernandez[1,2], G. Orive[1,2]
[1]NanoBioCel, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain, [2]Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN)
Corresponding email (G. Orive): gorka.orive@ehu.es

Introduction: Cell microencapsulation has been studied over the 3 last decades as a potential treatment for several diseases such as type I diabetes, Parkinson, Alzheimer and genetic disorders among others (1,2).
The number of microcapsules administered with each dose or the number of cells per capsule are two often omitted parameters that add uncertainty to all studies carried out in the field of cell microencapsulation. Current strategies for capsule and cell-counting provide meaningful intra- and inter-individual variability, as well as tedious procedures that result exhausting for researchers.
The possibility to estimate the number of capsules within a specific volume (p.e. number of capsules/mL) according to the capsule diameter, makes much easier, for example, designing in vitro assay protocols where certain number of capsules per well are required or identifying the minimum number of capsules that results effective in a given treatment. Moreover, estimating the average number of encapsulated cells per capsule represents a valuable and useful tool when it comes to working with microcapsules. This would enable us to exert more accurate and standardized relations between the capsule doses and the number of cells employed in both plate assays and the animal practice.
The present study aims to establish a well define mathematical model to estimate the number of capsules per milliliter and the number of cells per capsule according to the particle diameter and the initial cell load. This is intended to become a general standard guide in the field of cell microencapsulation.

Material and Methods: C_2C_{12} myoblasts derived from the skeletal muscle of a C3H mouse were encapsulated into alginate-poly-L-lysine-alginate (low-viscosity high guluronic acid alginate, FMC Biopolymer, Norway) microcapsules (APA) using an electrostatic droplet generator following a brief modification of Lim & Sun's procedure (3).
Microcapsule counting was performed from microcapsule pellets of 100 µL in 1.5 mL tubes. According to particle diameter, capsules were resuspended in the minimum volume of PBS required to achieve analyzable aliquots. These aliquots were subsequently examined using inverted optical microscopy (Nikon TSM). For cell-counting, enclosed cells from microcapsule pellets of 100 µL were firstly de-encapsulated using 500 µg/mL of alginate lyase (Sigma-Aldrich) and filtered through a 40 µm mesh filter. Resulting cell suspensions were counted by using a neubauer chamber.
All statistical computations were performed using SPSS 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Observed values were tested for potential regression.

Results and Discussion: Taking into account that alginate gel beads are deformable bodies, it may be assumed that no voids are left within certain volume of sedimented microcapsules. Thus, knowing the volume of a single sphere, the number of capsules per milliliter may be easily calculated. From this value, if we assume that a specific volume of pre-gelled solution results in the same volume of sedimented microcapsules, it is possible to deduce the number of cells per capsule by just knowing the initial cell load in the pre-gelled cell suspension. Thus, the following table is built with calculated values for some of the most widely employed capsule diameter and cell loads:

		cells/cap		
DIAMETER	caps/mL	$2x10^6$ cells/mL	$5x10^6$ cells/mL	$10x10^6$ cells/mL
1000	1910	1047	2618	5236
700	5568	359	898	1796
450	20959	95	239	477
350	44545	45	112	224
200	238732	8	21	42
100	1909859	1	3	5

Table 1. Estimated number of microcapsules per milliliter and cells per microcapsule depending on the microcapsule diameter and initial cell load.

Since all empirical procedures for cell-counting entail an intrinsic variability, the error accumulated through serial procedures may distort the real number of cells per capsule. In fact, taking the theoretical values proposed in Table 1 into account, below are shown the equations to obtain the maximum and minimum expectable values (MMEV) of cells per capsule for a typical cell-counting routine with 3 procedures:

$$MMEV = T\left[\pm\frac{(1+x)}{(1-y)}(1+z)\right]$$

Equation 1. Where, x = variability of the 1st procedure (%) (p.e. counting of cells to prepare pre-gelled alginate suspensión), y = variability of the 2nd procedure (%) (p.e. measuring of capsule pellet to be de-encapsulated), z = variability of the 3rd procedure (%) (p.e. counting of de-encapsulated cells), T = Theoretical value (see the table) and $MMEV$ = Maximum and minimum expectable values.

Therefore, the estimated number of cells per capsule represents a reliable central point to set as reference.
On the other hand, from calculated values of Table 1, it is possible to draw a well defined mathematical function to describe the relation between the number of capsules contained in a specific volume of sedimented particles and the capsule diameter. Such relation is shown in Eq. 2:

$$Capsules/mL = 1.91\times10^{12}\phi^{-3}$$

Equation 2. Where, ϕ = capsule diameter.

Following the same principle explained above, simple mathematical functions may be attributed to each cell load to estimate the number of cells per capsule. Correction coefficient (Z), namely the quotient of the difference between the volume of the initial pre-gelled solution and the resulted volume of particles, must be applied when these two volumes do not match up with each other. In the following example, Eq. 3 defines the curve for the load of 5 x 10^6 cells/mL:

$$Cells/Capsule = Z\left(3.595\times10^{-6}\phi^{3}\right)$$

Equation 3. Where, ϕ = capsule diameter, and Z = correction coefficient.

In order to validate our mathematical model, we counted manually the number of capsules sedimented in known volumes and compared against the proposed mathematical function for several particle diameters. As seen in Figure 1A, empirical results fitted perfectly the equation ($p<0.001$). Figure 1B shows that, when the number of cells per capsule was manually counted, observed values were adjusted to the proposed equation ($p<0.001$).

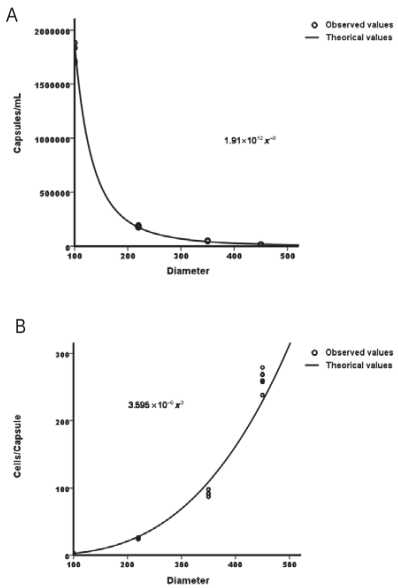


Figure 1. Validation of the mathematical model for the number of capsules per milliliter (A) and the number of cells per capsule (B).

Conclusion: This work proposes a mathematical model to establish well defined estimations of the number of capsules per milliliter and the number of cells per capsule. This may be a valuable and useful tool for the handling of microcapsules in the lab routine.

References:

(1) Acarregui A et al. Biodrugs 2012; 26 (5): 283-301
(2) Hernandez R.M et al. Drug. Deliv. Rev. 2010, 62, (7-8), 711-730.
(3) Lim, F, Sun A. *Science* **210**: 908-909, 1980

Acknowledgments:
Authors would like to thank the Department of Mathematics of the University of the Basque Country (UPV-EHU) for their invaluable help and advice.

EASY TO HANDLE, POWDER FORM MICROPARTICLES AS A CHOLERA VACCINE APPROACH

M Pastor[a,b], I. Marquínez[a,b], A Talavera[c], JL Pedraz[a,b], A Esquisabel[a,b]
[a]NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country, School of Pharmacy, Vitoria-Gasteiz, Spain
[b]Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Spain
[c]Instituto Finlay. Centro de Investigación – Producción de Vacunas. Ciudad de la Habana, Cuba.

Introduction

Nowadays, cholera remains to be a huge problem, causing 100 000-120 000 deaths per year (1). Recent outbreaks in Sierra Leone, Haiti and Democratic Republic of Congo have pointed out the urge for a massive oral cholera vaccination campaign. Bearing in mind the economical situation of the developing countries, the requirement for a low cost vaccine is imperative. Hence, the development of a powdered vaccine such as spray dried microparticles would be a step forward towards a cheap vaccine due to its easy transport and feasibility to administer as a suspension, especially for elderly population and children.

The goals of this study have been, i) to apply the spray drying technology for microparticle (MP) elaboration, ii) to characterize the MP elaborated, iii) to perform *in vivo* assays in order to analyse whether the exerted immune response is comparable to the heat killed *Vibrio cholerae* (VC) protection.

Material and Methods

Microparticle preparation: A spray drying technique was chosen for the elaboration of microparticles (MPs). Briefly, spray drying conditions were set as following, 60 or 80ºC as inlet temperature, pump performance at 5% and 600 L/h of spray flow rate. Cellulose acetate phthalate (Aquacoat®) 7.5% (w/V) suspension was prepared and 1.5% (w/w) of triethyl citrate was added as polymer plasticizer. When required, 0.1% of low viscosity alginate was poured into the formulation. The resulting suspension was fed into the system in order to obtain the microparticles. Four different MP were elaborated, Aquacoat® MP prepared at 60ºC as inlet temperature, Aquacoat® MP at 80ºC, Aquacoat® alginate MP at 60ºC, Aquacoat® alginate MP at 80ºC.

The MPs obtained were characterized in terms of size, surface morphology, encapsulation efficiency (EE), antigenicity and gastro-resistance, as previously described (2).

In vivo assays: based on the *in vitro* results, the MPs elaborated at 80ºC were selected for the following rat experiments. Two different doses were assayed in the study, 30 and 60 mg for the following batches: Aquacoat® MP and Aquacoat® alginate MP or VC.

Sprague Dawley rats were administered *per os* with MPs or VC at weeks 0 and 2. At weeks 0, 2, 4, 8, 12, 15, 20 and 22 blood samples were collected from the femoral vein. Total IgG and IgM were determined by ELISA for all the sampling times.

Results and Discussion

A spray drying technique was successfully applied for the elaboration of MP as previously reported by our research group (2). The main properties of MP are summarized in Table 1. All MPs displayed a particle size around 6 µm and high encapsulation efficiency values (>90%). In this regard, it is postulated that particle sizes below 10 µm are the most adequate ones in order to ensure gut residence and slow release of the antigen that will finally trigger IgA secretion (3).

Table 1. Main characteristics of MP elaborated (n=3), where d means diameter, EE encapsulation efficiency and EY encapsulation yield.

Formulation	*d (µm)*	*EE (%)*	*EY(%)*
Aquacoat® MP, 60ºC	6.4 ± 0.2	89.8 ± 9.6	56.8 ± 5.6
Aquacoat® alginate MP, 60ºC	6.5 ± 0.5	90.2 ± 5.3	47.6 ± 5.7
Aquacoat® MP, 80ºC	6.1 ± 0.2	94.9 ± 6.0	61.4 ± 7.5
Aquacoat® alginate MP, 80ºC	6.3 ± 0.3	95.1 ± 4.3	57.9 ± 6.2

Antigenicity preservation is believed to be the most important property in order to study whether antigen capability remains unchanged after encapsulation. As shown in Fig. 1, upon encapsulation, VC kept its antigenicity values when compared to the standard VC suspension (100%). Moreover, 60 and 80ºC inlet temperature groups showed similar values.

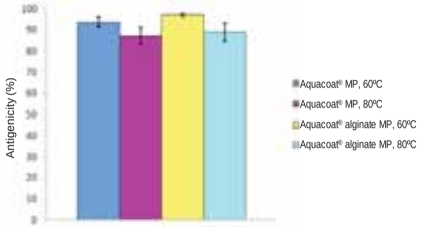


Fig.1. Antigenicity value in comparison to VC cellular suspension.

In order to verify that Aquacoat® led to gastro-resistant formulation, MPs were mixed for 2 h with HCl and replaced with neutral medium. As displayed in Fig.2, all formulations ratified their gastro-resistance, as MPs did not release more than the 10% of the VC content in acidic medium, whereas VC was liberated in neutral environment, reaching around 30% after 24 hours of the study.

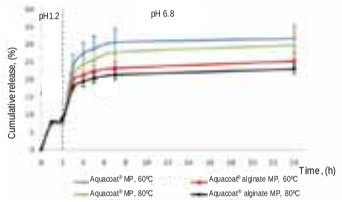


Fig. 2. Gastro resistance assay for Aquacoat® MPs with and without alginate, prepared either at 60ºC or 80ºC.

The *in vivo* assay demonstrated that Aquacoat® MPs were capable of evoking a suitable immune response that would protect against cholera infection as shown in the total IgG secretion represented in Fig. 3. Antibody production increased after the administration of the first dose of the vaccine. At weeks 4 and 8, the rats receiving 60 mg of Aquacoat® MPs and Aquacoat® alginate MPs displayed lower antibody levels than the groups receiving the equivalent dose of VC. Nevertheless, this difference was not detected for serum samples at the following weeks. At the 12th week, 30 mg of Aquacoat® alginate MP exerted higher antibody titres than 60 mg of Aquacoat® MPs or Aquacoat® alginate MPs.

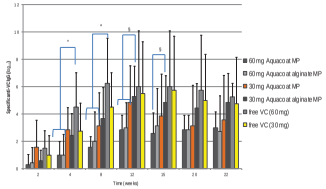


Fig.3. Serum total Anti-VC IgG levels expressed as log_{10} of the last reciprocal dilution above pre-immune OD492 plus 2 S.D. * and § represents statistically significant differences between groups (p<0.05).

At the 15th week, this difference was only detectable for rats receiving 60 mg of Aquacoat® MPs. At the end of the study, no difference could be achieved for any group. Thus, as far as IgG is concerned, spray dried cholera vaccine developed the same antibody response as VC suspension. Similar results were reported by Borde and co-workers (4); as they administered freeze dried VC, the exerted immune response was very similar to the commercially available heat killed VC along with toxin B subunit.

Regarding IgM production, at the 4th week groups receiving 60 and 30 mg of Aquacoat® MPs evoked lower IgM production than 30 mg Aquacoat® alginate MPs and the lowest VC dose. As the assay went on, this difference was no longer observable. At the end of the experiment, 60 mg of Aquacoat® alginate MPs showed lower protection values than the lower dose of VC. It could be concluded that, especially 30 mg of Aquacoat® alginate MPs were able to mimic the IgM production of VC. Yeh *et al.* described in an earlier work that VC PLGA microparticles were able to induce IgM and IgG response against VC. However, they achieved higher immunoglobulin levels than VC when adding amphotericin B to the formulation.

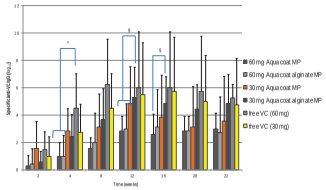


Fig.4. Serum Anti-VC IgM levels. * and § points out the statistically significant differences detected in the study (p<0.05).

Conclusions

Spray drying was found to be an appropriate technique for MP elaboration in terms of size, high encapsulation efficiency, VC loading, antigenicity and gastro-resistance. The subsequent *in vivo* study demonstrated that MP with or without alginate were able to induce a suitable immune response, comparable to that of VC alone. Besides that, groups administered with 30 mg of Aquacoat® alginate MPs were especially capable of exerting the same immune response as the heat killed VC. Altogether, it might be concluded that spray drying of VC along with Aquacoat® and alginate leads to an easy to handle and transport powder product that is able to mimic VC immune response.

References

(1) World Health Organization, Cholera. Fact Sheet num 107 (2011) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/index.html

(2) Año G, Esquisabel A, Pastor M, Talavera A, Cedré B, Fernández S, Sifontes S, Aranguren Y, Falero G, García L, Solís RL, Pedraz JL. Vacine. 29; 5758-5764 (2011).

(3) Johansen P, Storni T, Lorna R, Qiu Z, Der-Sarkissiant, Smith KA, Manolova V, Lang KS, Senti G, Müllhaupt B, Gerlach T, Speck RF, Bot A, Kündig TM. PNAS, 105, 5189-5194 (2008).

(4) Borde A, Larsson A, Holmgen J, Nygren E. Eur. J. Pharm. Biopharm., 79, 3, 508-518 (2011).

(5) Yeh MK, Liu YT, Chen JL, Chiang CH. J. Control. Rel., 82, 237-247 (2002).

Acknowledgements

M. Pastor thanks the Basque Government (Department of Education, Universities and Research) for the fellowship grant. The authors would like to thank FMC Biopolymer for kindly provide Aquacoat®. This project was partially supported by the Basque Government (Consolidated Groups, IT-407-07). The authors gratefully acknowledge the support of University of the Basque Country UPV/EHU (UFI11/32).

HIDROGELES pHEMA/CICLODEXTRINAS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE ACETÓNIDO DE TRIAMCINOLONA

Pourantru P., García Millán E., Sobarzo Sánchez E., Otero Espinar F.J.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

Introducción

Las lentes blandas de contacto de poli-(hidroxietil-metacrilato) han demostrado un interesante potencial como sistemas de liberación ocular controlada de medicamentos para tratar afecciones oftálmicas de la zona anterior. Para ello, es necesario incorporar el fármaco en la dosis adecuada y que éste se libere a una velocidad adaptada para obtener dosis terapéuticas durante tiempos más o menos prolongados (1).

El acetónido de triamcinolona (TA) es un glucocorticoide sintético con elevada potencia antiinflamatoria y efecto prolongado que se emplea habitualmente en el tratamiento de patologías oculares. Pero debido a su reducida hidrosolubilidad, plantea problemas para ser formulado a dosis elevadas en formulaciones acuosas (2).

Una aproximación interesante para mejorar las prestaciones de las lentes de pHEMA como sistemas de liberación es la incorporación de ciclodextrinas (CD) en la estructura de los hidrogeles durante la fase de polimerización, bien en mezcla física o unida químicamente a los monómeros formadores del hidrogel. La formación de complejos de inclusión CD-fármaco en el interior del hidrogel debe favorecer la afinidad del fármaco y la estructura del hidrogel lo que redundaría en mejorar las propiedades de carga y/o liberación (1).

La elaboración de los hidrogeles con ciclodextrina unída covalentemente se basa en el empleo de β-CD modificadas químicamente que se unen covalentemente a los monómeros de 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) en relación estequimétrica 1:1.

El objetivo de este estudio ha sido optimizar la carga y la liberación de TA de los hidrogeles mediante la variación de su composición en cuanto a la cantidad de agua incorporada, la ausencia o presencia de CDs y el empleo de CDs unidas químicamente a la red del hidrogel.

Materiales y métodos

Materiales

2-polihidroxietilmetacrilato (pHEMA), ácido metacrílico (AM) (Merck); Etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (Aldrich), Irgacure®2959 (BASF), Acetónido de triamcinolona (Fagron) y Kleptose HPβCD (Roquette).

Hemos utilizado dos monómeros de HEMA a los que se unen covalentemente las CDs, para lo que hemos empleado dos tipos de espaciadores, uno de ello un cromóforo (HEMA-CD(2)) que actúa como marcador (Fig 2). La síntesis de HEMA-CDs se realizó usando derivados monosubstituidos de ácido, ester y amida y halometil CDs e hidroxil derivados de HEMA en condiciones básicas, $(N(CH_3)_3)$ o Cs_2CO_3, en DMF a temperature ambiente. La formación de los derivados de CDs-HEMA se caracterizó mediante RMN y masas.

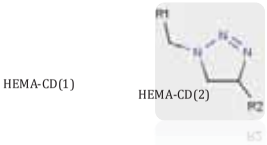


Fig1. Estructuras de las CDs modificadas quimicamente, R1 representa la CD y R2 el HEMA.

Elaboración de los hidrogeles mediante fotopolimerización

El agente reticulante EGDMA (80 mM, 1%), el monómero funcional AM (200 mM, 2.5%) y las disoluciones acuosas (en función de la cantidad de agua) de las diferentes CDs estudiadas fueron disueltos en HEMA (6 ml; 96.5%) bajo agitación magnética constante durante 45 min (Tabla 1 y 2). Posteriormente se incorporó el iniciador Irgacure®2959 (10 mM) durante 15 min más. La solución de monómeros resultante fue inyectada en un molde constituido por dos placas de vidrio (10x10 cm) impregnadas internamente con diclorodimetilxilano y separados por un marco de silicona de 1 mm de ancho. Los moldes se irradiaron con una lámpara UV durante 30 minutos. Tras la polimerización, los hidrogeles fueron lavados hasta eliminación de los monómeros no reaccionantes.

La superficie de las lentes se caracterizo mediante un PERFILÓMETRO ÓPTICO 3D Z-20 (Zeta instruments).

	0% H_2O	20% H_2O	40% H_2O
HEMA (g)	6,218	4,974	2,218
EGDMA (g)	0,095	0,076	0,038
AM (g)	0,103	0,082	0,0412
Agua (ml)	--	1,2	2,4
Irgacure (g)	0,011	0,011	0,011

Tabla 1. Composición de los hidrogeles sintetizados en función de la cantidad de agua incorporada, con el fin de modificar la microestructura de las lentes.

	0%H_2O 5%CD	20%H_2O 5% CD	40%H_2O +5% CD	40%H_2O HEMA-CD
HEMA (g)	6,218	4,968	3,73	1,865 (5% HEMA-CD / 95% HEMA)
EGDMA (g)	0,095	0,076	0,057	0,0285
AM (g)	0,103	0,0824	0,0618	0,0309
AGUA (ml)	--	1,2	2,4	1,2
CD (g)	0,3	0,24	0,18	
Irgacure (g)	0,011	0,011	0,011	0,0055

Tabla 2. Composición de los hidrogeles sintetizados conteniendo CDs y HEMA-CD..

Estudios de carga de TA en los hidrogeles

Los estudios de carga de TA en los diferentes hidrogeles sintetizados se llevó a cabo por inmersión de los mismos en una disolución suturada del fármaco (10 ml) en Nacl al 0,9% durante cuatro días. El contenido en TA se determinó por espectrofotometría UV a λ = 242 nm tras ser filtradas por filtros de membrana (0,45 µm Sartorius®, Alemania). Cada ensayo ha sido realizado por triplicado.

Estudios de liberación de TA de los hidrogeles

Los hidrogeles cargados fueron sumergidos en un vial conteniendo 5 ml de fluido lacrimal simulado (FLS; 6.7 g/l NaCl, 2.18 g/l $NaHCO_3$, 1.38 g/l KCl, 0.084 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pH 8) bajo agitación orbital a 100 rpm y 37ºC. A intervalos de tiempo predeterminados, se tomaron muestras de 1 ml del medio de liberación y este volumen extraído era reemplazado con la misma cantidad de FLS. La determinación de la concentración de TA se realizó mediante espectrofotometría a λ = 242 nm. Cada ensayo ha sido realizado por triplicado.

Resultados y discusión

En la imagen obtenida en los estudios de perfilometría (figura 3) se observa que la incorporación de agua en el proceso de síntesis de las lentes de pHEMA dan lugar a la formación de poros superficiales que se adentran profundamente en el hidrogel. Dichos poros presentan un diámetro medio de 1.74±0.69 y 4.29±9.36 para AM200 40% agua y AM200 20% de agua, ocupando un 3.5% de la superficie del hidrogel (figura 4). La formación de poros es debido a que durante la etapa de polimerización aumenta la hidrofobicidad del polímero por lo que el agua deja de ser miscible formándose gotas que dan lugar a la formación de pequeños poros en el hidrogel que alcanzan a la superficie.

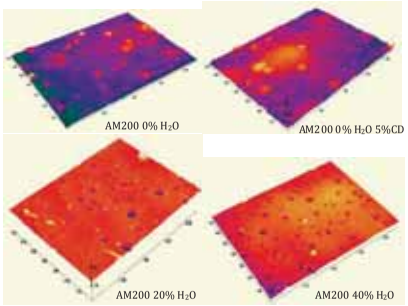


Figura 3. Imágenes topográficas de la superficie de los hidrogeles

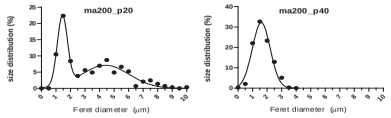


Figura 4. Distribución de tamaño de poro superficial estimado mediante análisis de imagen.

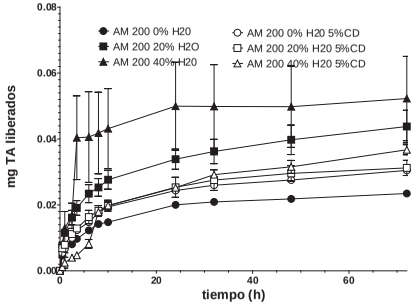


Fig 2. Velocidad de liberación de TA a partir de los hidrogels elabarados con y sin CD..

Los hidrogeles que contienen mayor proporción de agua son los que más cantidad de TA incorporan (datos no mostrados) y liberan probablemente debido a que la formación de poros facilita la difusión del fármaco tanto durante el proceso de carga como en la liberación. Por otra parte no se observó una influencia significativa de la presencia de CD en la incorporación de TA en el hidrogel aunque sí que da lugar a perfiles de cesión más lentos y controlados, lo que sugiere que aunque no incremente la afinidad por el polímero la posible formación de complejos CD-TA de gran tamaño molecular, dificulta la difusión del fármaco a través del hidrogel.

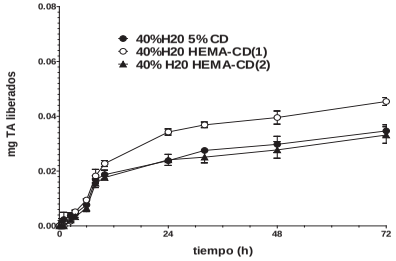


Fig 4. Liberación de TA a partir de los hidrogeles fabricados con un 40% de agua, sintetizados empleando CD en mezcla física o unida mediante enlaces covalentes.

El análisis estadístico de los resultados ha demostrado que no hay diferencias significativas, en cuanto a la carga de TA, entre hidrogeles contenido un 5% HPβCD o HEMA-CD-1. En cambio, sí se han encontrado diferencias entre éstos y HEMA-CD-2, que carga menos cantidad de fármaco que los anteriores. Esto podría deberse a la presencia del grupo cromóforo empleado como espaciador ya que debido al alto tamaño molecular de la TA podría dificultar el intercambio del fármaco entre el medio y la cavidad de la ciclodextrina. En cuanto a la liberación (fig. 4) apenas existen diferencias entre los tres hidrogeles con idénticos perfiles hasta las 10 horas. A partir de este período los elaborados con HEMA-CD-1 liberan cantidades ligeramente superiores.

Conclusiones

A partir de los resultados mostrados podemos concluir que la incorporación de agua permite modular la microestructura de los hidrogeles y de esa manera modificar los procesos de carga y difusión de la TA.

La incorporación de CDs en mezcla física o unida al HEMA no modifica significativamente el proceso de carga, salvo la que incluye el grupo cromóforo si bien permiten ejercer un mayor contol sobre la liberación del fármaco

Referencias

[1] Rosa dos Santos JF, Couceiro R, Concheiro A, Torres-Labandeira JJ, ÁLVAREZ Lorenzo C. Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylated-β-cyclodextrin) hydrogels: Synthesis, cytocompatibility, machanical properties and drug loading/release properties. Acta Biomaterialia. 2008; (4): 745-755.

[2] Jermak CM, Dellacroce JT, Heffez J, Peyman GA. Triamcinolone acetonide in Ocular Therapeutics. Survey of Ophthalmology. 2007; 52 (5): 503-522.

THE EFFECT OF PLGA MICROPARTICLES CONTAINING EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) ON THE HEALING OF FULL-THICKNESS EXCISIONAL WOUNDS IN DIABETIZED WISTAR RATS

G. Gainza[1,2], F.B. Gutierrez, J.J. Aguirre, M. Igartua[1,2], R.M. Hernández[1,2], J.L. Pedraz[1,2]
[1]NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country, School of Pharmacy, Vitoria, 01006, Spain
[2]Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria, 01006, Spain.

INTRODUCTION

Non-healing diabetic foot ulcer (DFU), a chronic ulceration commonly suffered by diabetic patients, has become a problem to health care systems. The ulcers are characterized by an atypical extracellular matrix (ECM) synthesis and remodelation, re-epithelization disturbance and a recurrent inflammatory response (1). The Epidermal Growth Factor (EGF) is essential for a correct dermal and epithelial regeneration (2). However, the short half-life of rhEGF *in vivo* requires multiple administrations and this restricts its clinical application. The encapsulation of rhEGF into polymeric microspheres (MS) represents a promising strategy to overcome this limitation (3).

In the current work, rhEGF Poly-Lactic-co-Glycolic-Acid (PLGA) MS were optimized and evaluated for the treatment of a full-thickness wound model in diabetized Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Microspheres preparation

EGF-MS were prepared using a w/o/w double emulsion/solvent evaporation method. Briefly, a dichloromethane:acetone (3:1) solution containing 5% (w/v) of PLGA (Resomer RG503) was emulsified by sonication for 15 s at 50 W with an 1% (w/v) rhEGF aqueous solution containing Human Serum Albumin (HSA), polyetilenglycol 400 and sodium alginate (v/v). The resulting emulsion (w/o) was poured into 15 mL of 5% polyvinyl alcohol (PVA) and 5% NaCl aqueous solution and emulsified by a paddle stirrer during 60 s to perform the double emulsion (w/o/w). Finally, 800 ml of an aqueous solution of 5% NaCl and 0.6 mM of Calcium chloride was added and stirred for 30 min. The MS were then collected by filtration and lyophilized.

Lastly, the rhEGF-MS were sterilized by γ-irradiation (rhEGF-MS-γ) and the influence of the sterilization process was studied.

Microspheres characterization

After MS preparation the following parameters were measured: size distribution, surface morphology, zeta potential, encapsulation efficiency (EE) and *in vitro* rhEGF release estimated by ELISA. The *in vitro* biological activity and wound healing assay were performed using BALB/C 3T3 fibroblasts.

In vivo wound healing study

Wistar rats were diabetized by a single i.p. administration of 0.5% streptozocin. One week after, 2 full-thickness excisional wounds were made in the dorsum of each rat. Animals were sacrificed on days 7, 11 and 17 after wounding. Lastly, wound closure (%), re-epithelization grade and restoration of the inflammatory process were analyzed. The experimental groups were set as, (i) blank control, (ii) vehicle control, (iii) blank MS control, (iv) 75 µg of non-encapsulated rhEGF twice a week and (v) 75 µg rhEGF-MS. All the treatments were applied in the wound by injection.

RESULTS AND DISCUSSION

Microspheres characterization

Table 1 show that rhEGF-MS, before and after γ-sterilization, presented similar size and zeta potential values. Nevertheless, the EE decreased after the sterilization process. Some authors attribute this decrease to a degradation of the drug during the sterilization process (4).

Table1: Characteristics of the MS.

Formulation	Size (µm)	Z (mV)	EE (%)
rhEGF-MS	12.18	-25.50	68.82
rhEGF-MS-γ	14.94	-28.50	60.01

SEM photographs showed regular and smooth surfaces in both cases (Figure1).

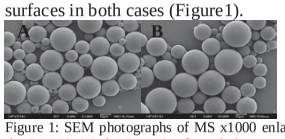


Figure 1: SEM photographs of MS x1000 enlargement. (A) rhEGF-MS. (B) rhEGF-MS-γ formulation.

No difference was found between both accumulative released profiles (Figure 2).

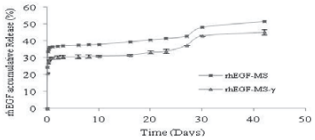


Figure 2: rhEGF released from MS.

In vitro Cell culture assays

Bioactivity of released EGF

As shown in Figure 3 the biological activity of EGF was not significantly affected during the microencapsulation or the sterilization processes.

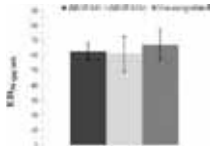


Figure 3: ED_{50} of the rhEGF released from MS.

Wound healing assay

In the presence of rhEGF, Balb/c 3T3 fibroblasts closed the wound faster than control group. No differences were detected between rhEGF released from MS and non-encapsulated rhEGF (Figure 4).

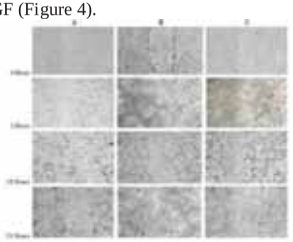


Figure 4: Wound healing assay. (A) fresh serum free medium, (B) rhEGF released from the MS (C) non-encapsulated rhEGF.

In vivo studies

Wound closure

Figure 5 shows that 7 and 11 days after wounding, rhEGF-MS group showed a statistically significant decrease of the wound area in comparison with the other experimental groups. By days 14 and 17 all the groups closed.

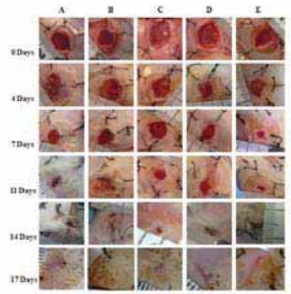


Figure 5: Wound closure during the experiment. (A) Blank control, (B) Vehicle control, (C) Blank MS control, (D) Non-encapsulated EGF group and (E) EGF MS group.

Re-epithelization grade

For rhEGF-MS and Blank control group there was a complete re-epithelization on the 11th day. For the other groups the re-epithelization was not complete until the end of the study.

Resolution of the inflammatory process

EGF-MS treated groups left the acute-inflammatory phase on the 7th day. By the 11th day after wounding EGF-MS and Blank control showed a complete recovery and healing. At the end of the study, all the experimental groups showed a complete recovery (*Figure 6*).

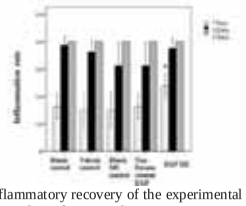


Figure 6: Inflammatory recovery of the experimental groups on days 7, 11 and 17 after wounding.

CONCLUSION

In this study EGF containing microspheres have been optimized. Neither the microencapsulation nor the γ-sterilization processes affected significantly the activity of the rhEGF. The *in vivo* results demonstrate the potential use of rhEGF-loaded microspheres to promote a faster wound healing on the excision region of rats than control groups.

REFERENCES

(1) Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW. J Invest Dermatol 2000 Aug;115(2):225-233.
(2) Ulubayram K, Cakar AN, Korkusuz P, Ertan C, Hasirci N. Biomaterials 2001 6/1;22(11):1345-1356.

(3) Huang S, Deng T, Wang Y, Deng Z, He L, Liu S, et al. Acta Biomaterialia 2008 7;4(4):1057-1066.
(4) Fernández-Carballido A, Puebla P, Herrero-Vanrell R, Pastoriza P.. Int J Pharm 2006 4/26;313(1-2):129-135.

ACKNOWLEDGMENTS
G. Gainza thanks the "Universidad del País Vasco- UPV-EHU" for the Fellowship Grant.

ACCIÓN CODISOLVENTE DEL METAMIZOL MAGNÉSICO EN MEZCLAS ACUOSAS Y NO ACUOSAS

MA. Peña, B. Escalera, AB Sánchez, A. Reíllo
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Alcalá de Henares, España

Introducción: En la solubilización de los principios activos son diversos los factores que influyen, durante la primera fase de este proceso, el sólido sufre una desestructuración de su red cristalina, y en la segunda, las moléculas del soluto se separan superando sus fuerzas cohesivas, en el disolvente se crean cavidades para acomodar al soluto. En esta etapa se absorbe calor, por lo que su contribución a la solubilidad es desfavorable, por otro lado, las moléculas de soluto se introducen en las cavidades creadas en el disolvente. Se produce la solvatación, es decir, la interacción entre el soluto y el disolvente mediante fuerzas de van der Waals y/o enlaces de hidrógeno. Esta segunda etapa contribuye favorablemente a la solubilidad porque el proceso es exotérmico (1). La solubilidad se relaciona directamente con las magnitudes termodinámicas del modo (ec. 1):

$\Delta G^S = \Delta H^S - T\Delta S^S = - RT \ln X_2$ (ec. 1)

ΔG, es la energía libre, ΔH, la entalpía, ΔS, la entropía, X_2 la fracción molar del soluto, que representa la solubilidad.

Esas magnitudes termodinámicas sirven para interpretar el mecanismo de acción codisolvente y para comprobar si existen relaciones de compensación entalpía-entropía (ΔH-ΔG).

Materiales y Métodos: En este trabajo se ha utilizado el metamizol Mg (Fagron), antiinflamatorio no esteroideo (pirazolonas), y dos mezclas binarias que contienen un codisovente común. Acetato de etilo, etanol (grado espectrofotométrico. Panreac, Monplet & Esteban, España), y agua destilada.

Métodos: Las disoluciones saturadas se preparan a 15º-35ºC y se sitúan en baños provistos de agitación (Heto SH 02/100, AT 110) hasta alcanzar el equilibrio de solubilidad. La fase sólida se separa por filtración (0,2 µm). La concentración disuelta se mide en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2001PC) a la longitud de onda de máxima absorción seleccionada. Se determina la entalpía (ΔH^F) y temperatura de fusión (T^F) por calorimetría diferencial de barrido (Mettler TA 4000).

Para realizar el análisis de *compensación entalpía-entropía*, se determinan las magnitudes termodinámicas de disolución utilizando el método de Krug et al. (2,3). Se representa $\ln X_2$ frente a ($1/T-1/T_{mh}$), donde T es la temperatura experimental y T_{mh} la media armónica del intervalo de temperatura empleado. Las gráficas obtenidas son lineales, a partir de la pendiente y ordenada en el origen se obtienen la entalpía (ΔH^S) y la energía libre de disolución (ΔG^S):

$\Delta H^S = -R$ pendiente (ec. 2)
$\Delta G^S = -R\ T_{mh}$ pendiente (ec. 3)

Los valores de las entalpías y entropías de mezcla se calculan con las ecs. 4 y 5, (T^F=152,59ºC, ΔH^F= 260,83 J/g):

$\Delta H^M = \Delta H^S - \Delta H^F$ (ec.4)
$\Delta S^M = \Delta S^S - \Delta S^F$ (ec. 5)

El porcentaje de contribución entálpico-entrópico (ζ_H y ζ_{TS} respectivamente) para cada fase del proceso de solubilidad se calcula (4):

$\zeta_H = (|\Delta H|/|\Delta H|+|T\Delta S|)\ 100$ (ec.6)
$\zeta_{TS} = (|T\Delta S|/|\Delta H|+|T\Delta S|)\ 100$ (ec.7)

Resultados y Discusión: Las magnitudes termodinámicas de disolución y mezcla se muestran en esta tabla.

Tabla I. Funciones termodinámicas del proceso aparente de disolución y mezcla (KJ/mol)

% Et.	ΔG^S	ΔH^S	ΔS^S	ΔH^M	$\%\xi_H$	$\%\xi_{TS}$
0	49,34	42,36	-26,4	-23,4	83,67	*16,33*
30	32,65	25,80	-24,3	-39,9	77,33	*22,67*
60	31,34	23,75	-25,4	-42,2	75,76	*24,24*
80	30,08	21,36	-27,8	-44,4	72,44	*27,56*
90	24,87	15,63	-30,9	-50.1	62,43	*37,57*
100	52,11	40,72	-38,4	-25,1	77,8	*22,2*
90	52,64	40,38	-41,2	-25,4	76,44	*23,56*
80	52,35	39,57	-42,9	-26,2	75,33	*24,67*
70	40,87	27,50	-44,7	-38,2	67,1	*32,9*
50	42,07	27,12	-49,9	-38,7	64,34	*35,66*
30	28,47	13,52	-49,9	-52,2	47,4	*52,6*
0	28,35	13,84	-48,7	-52	48,78	*51,22*

El cambio entálpico (ec. 6) involucra los requerimientos energéticos del proceso global de disolución. La entropía aumenta por la ubicación del soluto en el seno del disolvente, también debe considerarse la posible organización por asociación de las moléculas del disolvente alrededor de las partículas del soluto, lo cual disminuye la entalpía.

Para el proceso de mezcla, los valores de entalpía y de entropía son negativos, la entalpía soluto-disolvente es exotérmica, ésta magnitud es superior a la de formación de cavidades. La estructuración de las moléculas alrededor de los grupos no polares del soluto (hidratación hidrofóbica) contribuye a disminuir el calor neto de mezcla (ΔH^E) en solución acuosa hasta valores negativos (**Tabla I**).

La **Figura 1** muestra el perfil de solubilidad se observa un único máximo de solubilidad situado en el segmento más polar de la mezcla de solventes. Dicho máximo alcanza su mayor valor en el porcentaje 40% etanol-agua, aunque se trata de un máximo muy amplio. La **Figura 2** representa la variación de la entalpía de disolución con la proporción de etanol. El descenso de la entalpía en etanol-agua, se relaciona con el incremento de solubilidad observado (**Tabla I**).

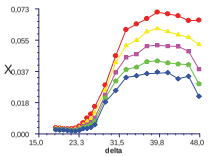


Figura 1. Solubilidad metamizol Mg, en función de la polaridad y de la T

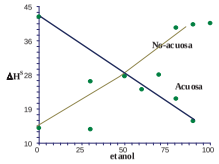


Figura 2. Calor de disolución frente a proporción de etanol de ambas mezclas

Las fuerzas que dirigen el proceso de solubilidad durante la fase de disolución son de naturaleza predominantemente entálpica (**Tabla I, Figura 2**).

La **Figura 3** representa la compensación entalpía-entropía. En las dos mezclas se obtiene una relación lineal. Esta relación indica que existe un único mecanismo responsable de la variación de solubilidad, la entalpía, cuando se añade el codisolvente.

El mecanismo de disolución depende de la naturaleza de la mezcla disolvente, y de la proporción de codisolvente en la mezcla. Los resultados apoyan la hipótesis de que la compensación entalpía-entropía es característica de la solubilidad de fármacos en mezclas disolventes, tanto acuosos como no acuosos. Los resultados también permiten identificar mecanismos comunes que explican la acción codisolvente. En anteriores trabajos en las mezclas acuosas se observaron dos mecanismos, entalpía y entropía, cada uno de ellos dominante a una cierta proporción de codisolvente que depende de la hidrofobicidad del fármaco (5-7).

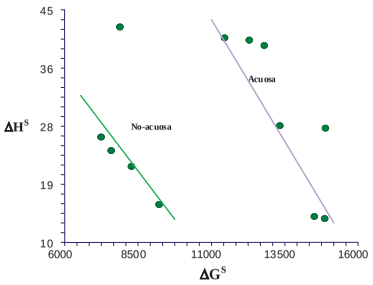


Figura 3. Compensación entalpía-entropía

Referencias:

(1) James KC. Solubility and related properties in drug and pharmaceutical sciences. Marcel Dekker. New York. 1986.

(2) Krug et al. Enthalpy-entropy compensation 1.Some fundamental statistical problems associated with the analysis of Van´t Hoff and Arrhenius data. J Phys Chem. 80(21):2341-2351 (1976).

(3) Krug et al. Enthalpy-entropy compensation 2.Separation of the chemical from the statistical effect. J Phys Chem. 80(21):2341-2351 (1976).

(4) Perlovich et al. Thermodynamics of solutions III. Comparison of the solvation of naproxen with other NSAIDS. Eur J Pharm. Biopharm.57:411-420 (2004).

(5) Bustamante et al. Thermodynamics in amphiprotic and amphiprotic-aprotic solvent mixtures. Pharm & Pharmacology. 1:505:507 (1995).

(6) Bustamante et al. Enthalpy-entropy compensationfor the solubility of drus in solvent mixtures: paracetamol, acetanilde and nalidix acid in dioxane-water. J. Pharm. Sci. 87:1590-1596 (1998).

(7) Peña et al. Thermodynamics of cosolvent action: Phenacetin, salicylic acid and probenecid. J.Pharm.Sci. 98:1129-1135 (2009).

BIOAVAILABILITY OF QUERCETIN ENCAPSULATED IN POLYMERIC NANOPARTICLES.

R. Peñalva, I. Esparza, E. Rincón, M. Agüeros, JM Irache
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology; University of Navarra,
31008 Pamplona (Spain)

Introduction: Quercetin, 3,3',4',5'-7-pentahydroxy flavone, is one of the most abundant flavonoids in plants. It has been demonstrated a wide variety of pharmacological effects, such as dilating coronary arteries, decreasing blood lipids, anti-platelet aggregation, anti-oxidation, anti-anaemia and anti-inflammative activity [1]. In spite of the potentially beneficial effects of quercetin, it shows a very low absorption in the gastrointestinal tract, and thus, its oral bioavailability is lower than 10% [2]. Quercetin has affinity for drug transporters, including P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein2 (MRP2) and cytochrome P450 (CYP3A); all of them highly expressed in the gut epithelium [1], [3]. In addition, quercetin is easily degraded in the presence of factors such as light and oxygen. [1], [3].
In order to overcome these problems, the aim of this work was to study the encapsulation of this flavone in nanoparticles in order to improve its stability and increase its oral bioavailability.

Material and Methods: Two different types of quercetin-loaded polymeric nanoparticles (NP-A and NP-B) were prepared following a patented procedure (PCT/ES2011/070118).
For the characterization, the size, zeta potential, morphology and shape of the resulting nanoparticles were evaluated. The size and surface charge of nanoparticles were determined by Laser Doppler Electrophoresis using a ZetaPlus, (zeta potential and size analyzer Brookhaven Instruments Corporation). The morphology of nanoparticles was observed by scanning electron microscopy (Zeiss DSM 940A, Germany). The amount of quercetin encapsulated in nanoparticles was quantified by HPLC [4].

In vitro release studies
"In vitro" release studies were carried out under sink conditions after dispersant of nanoparticles in simulated gastric (SGF) and intestinal fluids (SIF) containing 1% (p/v) Tween 80 as surfactant. At different times, samples were taken and centrifuged in a Mikro 220R centrifuge for 15 min at 10000 rpm. Supernatants were recovered and analyzed by HPLC [4].

Pharmacokinetic studies in rats
The oral bioavailability of quercetin was determined in male Wistar rats. The animals were fasted overnight before experiment with free access to water. The study was conducted after administration of a single dose of 25 mg/kg quercetin to rats in the following formulations: (i) Solution, (quercetin-PEG 400:water (40:60 by vol)), (ii) Suspension (quercetin-water suspension), (iii) NP-A (quercetin loaded nanoparticles in pol A) and (vi) NP-B. (quercetin loaded nanoparticles in pol B) In addition, the flavonoid was also administered i.v. at the same dose. At different times, 250 µL of blood samples were extracted. The amount of quercetin in plasma was determined by HPLC.
The pharmacokinetic analysis of concentration–time data, obtained after the administration of the different flavonoid formulations, was analyzed using a noncompartimental model using WinNonlin 6.0 software (Pharsight Corporation, Mountain View, USA).

Results and discussion: The main physico-chemical characteristics of the nanoparticles are summarized in Table 1. Nanoparticles displayed spherical shape with sizes around 300 nm and a negative surface charge. The amount of quercetin incorporated in these nanoparticles was dependent on the polymer used and ranged from 24 µg/mg NP-A to 80 µg/mg NP-B. The encapsulation efficiency in both cases was closed to 80 %.

Table 1 *Physico-chemical characteristics of quercetin-loaded nanoparticles. Data expressed as mean ± SD (n=3).*

Formulation	Size (nm)	Zeta potential (mV)	QU loading (µg/mgNP.)	EE (%)
NP-A	251 ±9	-29.5 ±0.9	23.9 ±0.8	79.4±0.9
NP-B	352 ±4	-45.5 ±0.7	79.1 ±6.9	92.4±1.2

Regarding the *in vitro* release studies of quercetin, Figure 1 shows the release profile of this component when loaded in NP-A and NP-B. The *in vitro* release profile of NP-A and NP-B exhibited a biphasic pattern, characterized by an initial non release period when the nanoparticles were incubated in the SGF

followed by a rapid release when the nanoparticles were dispersed in SIF .

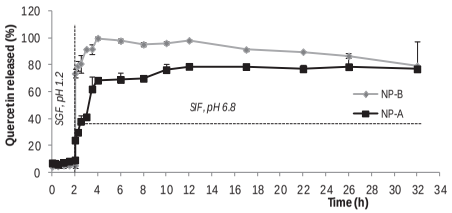


Figure 1 *In vitro release profile of quercetin from NP-A and NP-B. Data expressed as mean ± SD (n=3)*

Figure 2 shows the plasma concentration of quercetin (ng/mL) *vs.* time (hour) for the different formulations tested. When the formulations loaded on nanoparticles were evaluated, the curves were characterized by a rapid increase in quercetin plasma concentrations till the Cmax was reached. Then, constant levels were maintained until 8 hours and finally the quercetin plasma concentration declined slowly with time. The flavonoid plasma levels when loaded in nanoparticles (NP-A and NP-B) were significant higher than those observed for either the solution or suspension of the flavonoid ($p<0.05$)

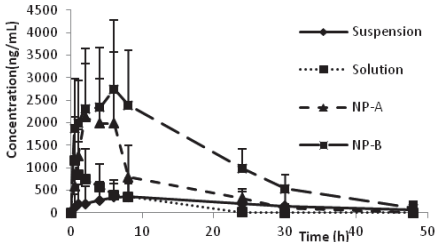


Figure 2. *Quercetin plasma levels after the oral administration of a single dose of 25 mg/kg. in different formulations: (i) Solution (quercetin after their dissolution in a mixture PEG 400-H_2O (40:60 by vol.)) (ii) Suspension (quercetin dispersed in water) (iii) NP-A (quercetin-loaded nanoparticles in pol A) and (iv) NP-B (quercetin-loaded nanoparticles in pol B). Data expressed as mean±SD (n=6).*

Table 2 summarizes the pharmacokinetic parameters. Significant differences were found by comparing AUCs. In fact, AUCs obtained for both nanoparticle formulations were significantly higher than for both the solution and the suspension of quercetin used as control ($p<0.05$).

On the other hand, the oral bioavailability of quercetin formulated as solution was calculated to be about 2% which is in line with previously reporting data [2]. For the quercetin suspension, this parameter was significantly reduced. On the contrary, the relative oral bioavailability of quercetin when loaded in nanoparticles was between 3 and 6 times higher than the value observed for the PEG:water solution of the flavonoid. In any case, the highest bioavailability was found for NP-B.

Table 2. *Pharmacokinetic parameters of QUE in rats for the different formulations tested. (i) I.V. (i.v administration of quercetin after their dissolution in a mixture PEG 400-H_2O (40:60 by vol.)) (ii) Solution (oral administration of quercetin after their dissolution in a mixture PEG 400-H_2O (40:60 by vol.)) (iii) Suspension (oral administration of quercetin dispersed in water) (iv) NP-A (QUE-loaded nanoparticles in pol A) and (v) NP-B (QUE-loaded nanoparticles in pol B).*

Formulation	T max (h)	C max (µg/mL)	AUC [(µg/mL)h]	Fr (%)
I.V.	0 ± 0	59.1 ± 14.8	633.8 ± 152.0	
Solution	1.5 ± 1	1.7± 0.7	8.5 ± 4.6	100
Suspension	6.8 ± 1.7	0.4 ± 0.08	3.9 ± 1.8	45.3
NP-A	3.6 ± 1.9	3.0 ± 1.4*	25.1 ± 18.5*	296.6*
NP-B	6.3 ± 2.3	3.1 ± 1.2*	51.1 ± 20.6*	603.7*

*$p<0.05$ all groups vs Solution (U-Mann Whitney test)

Conclusions: NP-A and NP-B are able to load quercetin. Both types of nanoparticles show gastro-retentive properties and they only released the loaded flavonoid under simulated intestinal conditions. Both types of nanoparticles increased the oral bioavailability of quercetin in comparison with the traditional approaches of formulation based on solutions or conventional suspensions of the flavonoid.

References:

[1] Boots A.W. et al. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. Eur. J. Pharmacol. 2008; 585: 325-327.

[2] Li H. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. J. Control. Release. 2009; 133: 238-244.

[3] Erlund E. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nut. Res.. 2004; 24: 851-874.

[4] Nollet LML. Food analysis by HPLC Marcel Dekker, cop. 2000; 14(24)575-620

Acknowledgements

This work is supported by ADICAP (INNPACTO Project, IPT-2011-1717) from the Ministry of Science and Innovation and by the Government of Navarra in Spain. Rebeca Peñalva is financially supported by the "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" (ADA).

ENTRAMADOS IMPRINTED PARA CESIÓN SOSTENIDA DE HIDROXITIROSOL EN LENTES DE CONTACTO Y EN ENVASES ACTIVOS

L. Pereiro Expósito, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España.

Introducción:

Los agentes antioxidantes tienen un gran interés en la prevención y tratamiento de patologías de la piel y del globo ocular (1). Además, se utilizan habitualmente como aditivos alimentarios para prolongar la vida útil de los alimentos, previniendo la alteración de sus propiedades organolépticas. Cualquiera de estas aplicaciones plantea problemas de formulación, dado que los agentes antioxidantes presentan, en general, una baja hidrosolubilidad y son químicamente lábiles. Una molécula todavía poco estudiada pero que encierra notables posibilidades debido a su elevada actividad antioxidante (considerado como el segundo agente más potente) y reconocida biocompatibilidad e inocuidad es el hidroxitirosol, que se extrae del aceite de oliva (2). Se pretende sintetizar hidrogeles acrílicos, diseñados con los grupos químicos más adecuados para interaccionar con el hidroxitirosol, que cuenten con elevada capacidad de carga de antioxidante y que puedan controlar la cesión durante periodos de tiempo prolongados, con vistas a dos aplicaciones: a) confección de lentes de contacto blandas medicadas potencialmente útiles para la prevención de retinopatías y cataratas, y b) confección de películas adecuadas para ser incorporadas a estructuras laminares que puedan servir como materiales de envases activos. Para optimizar la afinidad del entramado por hidroxitirosol se aplicó la técnica de imprinting molecular, que consiste en incorporar el fármaco a la disolución monomérica, de manera que los monómeros se reordenen espacialmente y que, tras la polimerización y la eliminación de las moléculas que han actuado como molde, se formen cavidades con afinidad por el fármaco.

Materiales y Métodos:

Síntesis de los hidrogeles: Se prepararon mezclas de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA): 2-butoxietilmetacrilato (BEM) 40:60 vol/vol, y se les incorporó ácido acrílico (AAc) en distintas proporciones (Tabla 1). Como agente reticulante se utilizó etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) y como iniciador de la polimerización azoisobutironitrilo (AIBN). A alícuotas de estas mezclas se les añadió hidroxitirosol acetato (Seprox Biotech, Madrid) para preparar entramados imprinted (Tabla 1). La composición de los entramados no imprinted fue la misma, salvo que no se incorporó fármaco durante la síntesis. La polimerización transcurrió a 70ºC durante 48 horas. Todos los entramados se lavaron en agua en ebullición durante 30 minutos, se cortaron en piezas de 10x10 mm y se secaron a 40ºC durante 24h. Finalmente, los entramados se acondicionaron en bolsas de plástico herméticamente cerradas y protegidas de la luz.

Caracterización de los hidrogeles: Se registró la temperatura de transición vítrea (T_g) de los hidrogeles secos en un DSC Q100 (TA Instruments, UK) y la transmitancia a 600 nm de los hidrogeles húmedos en un espectrofotómetro Agilent 8453 (Alemania). La biocompatibilidad se evaluó mediante el ensayo de HET-CAM [3]. El grado de hinchamiento en agua a temperatura ambiente se obtuvo por diferencia entre los pesos húmedo (*Ws*) y seco (*Wd*) de los hidrogeles, aplicando la ecuación: $Q = (Ws - Wd)x100/Wd$

Cesión a partir de entramados imprinted recién preparados: Piezas de entramado se sumergieron en 30 ml de agua y se conservaron en viales topacio a temperatura ambiente, bajo agitación magnética y protegidos de la luz. A distintos tiempos, se tomaron muestras de 3 ml de cada vial y se registró su absorbancia a 280 nm (Agilent 8453, Alemania). Las muestras se devolvieron a los correspondientes viales. El ensayo se prolongó durante 23 días, y transcurrido este tiempo, las piezas se pesaron y se lavaron exhaustivamente con mezcla etanol:agua 50:50 para completar la extracción de hidroxitirosol. Como controles se utilizaron piezas de entramados no imprinted.

Carga y cesión a partir de entramados no imprinted e imprinted recargados: Piezas de entramados no imprinted e imprinted una vez extraído el hidroxitirosol, se incubaron en disoluciones de agente antioxidante de concentración (0.2 g/l, 10 ml) y se monitorizó la concentración de hidroxitirosol remanente en el medio de carga durante 1 semana a temperatura ambiente. Una vez cargados, se evaluó la cesión a partir de los entramados en las condiciones indicadas.

Tabla 1. Composición química de los hidrogeles.

Hidrogel	1	2	3	4
2-HEMA	2.2 ml	2.2 ml	2.2 ml	2.2 ml
BEM	3.3 ml	3.3 ml	3.3 ml	3.3 ml
Ac. Acrílico	0.5 ml	0.5 ml	0	0
EGDMA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
AIBN	16 mg	16 mg	16 mg	16 mg
Hidroxitirosol acetato	0	100 mg	0	100 mg

Resultados y Discusión:
Caracterización de los hidrogeles: La temperatura de transición vítrea (T_g) de todos los entramados, tanto imprinted como no imprinted, se situó en el intervalo 54-57 ºC.
En agua, los entramados mostraron un grado de hinchamiento de 1-2%. Una vez hidratados, presentaron una elevada transparencia óptica con valores de transmitancia a 600 nm superiores al 90%.
El proceso de lavado tras la polimerización, mediante inmersión en agua en ebullición durante 30 minutos, resultó ser suficiente para la eliminación de monómeros residuales, como se confirmó al registrar la absorbancia UV-vis del medio en la región 190-220 nm durante el ensayo de cesión de los entramados imprinted y no imprinted recién lavados. Es interesante destacar que tras este procedimiento de limpieza, los entramados imprinted todavía retienen más del 50% del hidroxitirosol incorporado durante la síntesis. Por lo tanto, el procedimiento es adecuado para extraer los monómeros residuales, permitiendo el uso directo de los entramados imprinted. En la Figura 1 se muestra el perfil de cesión de hidroxitirosol a partir de estos entramados.

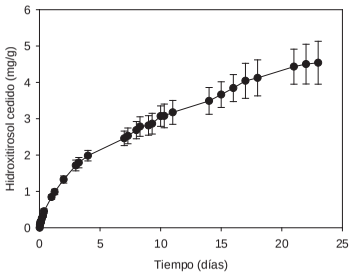


Figura 1. Perfiles de cesión de hidroxitirosol en agua a partir del entramado imprinted tipo 2 (Tabla 1).

Los entramados mostraron una elevada afinidad por el hidroxitirosol acetato, que puede unirse a los componentes poliméricos a través de interacciones hidrofóbicas tipo π-π (con BEM) y puentes de hidrógeno (con ácido acrílico). En agua a temperatura ambiente, la cesión se sostuvo durante más de un mes. Los ensayos preliminares de carga de los entramados no imprinted y de recarga de los imprinted ponen de manifiesto que pueden incorporar cantidades suficientes del agente antioxidante. Además, los entramados mostraron una elevada biocoimpatibilidad el ensayo HET-CAM.

Conclusiones: La incorporación de monómeros funcionales a entramados de HEMA permite modular el grado de hinchamiento y la incorporación de olopatadina sin alterar las propiedades mecánicas. La presencia del fármaco en la mezcla de polimerización no causó cambios en las propiedades mecánicas, ópticas ni de biocompatibilidad de los entramados, que presentan características adecuadas como lentes de contacto medicadas.

Referencias:

(1) Yadav, U.C.S. y col. Emerging role of antioxidants in the protection of uveitis complications. Curr. Med. Chem. 18:931-942 (2011).
(2) Killeen, M.J y col. Hydroxytyrosol: An examination of its potential role in cardiovascular disease, inflammation, and longevity. Agro. Food Industry Hi-Tech., 22:16-19 (2011).
(3) NICEATM-ICCVAM, In vitro test method for detecting ocular corrosives and severe irritants. http://iccvam.niehs.hih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_hetcam.htm, 2012.

Agradecimientos:
Trabajo financiado por la Xunta de Galicia (10CSA203013PR), FEDER y MICINN (SAF2011-22771; INNPACTO IPT-060000-2010-14, MIPFOOD project).

DISEÑO Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS DE UN CANNABINOIDE.

L. Prieto[1], A. I. Torres-Suárez[1,2]
[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica; [2]Instituto de Farmacia Industrial. Universidad Complutense de Madrid, España.

Introducción: Los cannabinoides son un grupo de compuestos que derivan de la planta Cannabis sativa, siendo los más importantes Δ 9-tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD). La investigación en cannabinoides ha experimentado en los últimos años un gran auge, planteándose su posible utilización en el tratamiento de diferentes patologías como las nauseas y vómitos asociados a la quimioterapia, la anorexia en pacientes con SIDA, el dolor neuropático, la esclerosis múltiple, el glaucoma y el cáncer. Estos efectos son consecuencia de la estimulación de receptores CB1 (localizados preferentemente a nivel del SCN) y CB2 (asociados preferentemente al sistema inmune). Nuestro equipo de investigación ha comprobado el elevado efecto citotóxico de THC y CBD en un modelo xenográfico de glioma humano inducido en ratones[1], y ha desarrollado con ambas moléculas nanopartículas poliméricas[2] y micropartículas biodegradables para su liberación prolongada durante 3 semanas tras su administración subcutánea[3].
El objetivo del presente trabajo es el diseño y desarrollo de nanocápsulas lipídicas (LNCs) como un sistema eficaz de vehiculización de cannabidiol. Estas LNCs facilitarían la dosificación del principio activo y, su acceso a biofase potenciando los efectos antitumorales de esta molécula.
Materiales y Métodos:
1.- Elaboración de LCNs: para la elaboración de las nanoparticulas lípidicas se ha utilizado el método de inversión de fases[4], realizándose tres ciclos de temperatura. Como componentes lipídicos se utiliza Labrafac WL 1349 (triglicéridos de ácido cáprico-caprílico), Lipoid S75-3 (lecitina de soja con un 69% de fosfatidilcolina) y Solutol HS 15 (mezcla de polietilenglicol 660 e hidroxiestearato de polietilenglicol 660).
La temperatura de inversión se fases se ha determinado por conductimetría, realizándose medidas cada 2ºC, entre 45ºC y 95ºC, bajo agitación magnética.
Se elaboran tres lotes de LNCs blancas y cargadas con CBD según las fórmulas de la tabla 1, con el fin de evaluar la influencia de la composición lipídica sobre el tamaño de las LNCs. Una vez obtenidas, las nanocápsulas se esterilizan mediante filtración utilizando una membrana de 0,22µm y se conservan a 4ºC en forma de suspensión acuosa.

Para la elaboración de las LNCs cargadas, se incorpora entre un 4% y un 9% de CBD a la fase lipídica.

	% Fase lipídica		
Componente	**L-1**	**L-2**	**L-3**
Solutol	65.7	41.5	26.1
Labrafac	28.8	50.4	65.1
Lipoid	5.5	8.1	8.8

Tabla 1. Composición lipídica de los tres lotes de LNCs.

2. Caracterización de las LNCs: se determina el tamaño medio y la distribución de tamaños de la suspensión de nanopápsulas, por dispersión dinámica de luz láser, utilizando un equipo Zetatrac NPA152, con el que también se mide el potencial Z de las nanocápsulas blancas y cargadas con activo. El aspecto de las LNCs se observa por microscopía electrónica de trasmisión (TEM), tiñendo previamente las muestras con acetato de uranilo al 2% y utilizando un microscopio Jeol 100CX.
Resultados y Discusión:
Con las tres fórmulas ensayadas se obtuvieron suspensiones acuosas de nanopartículas blancas, con apariencia turbia azulada al incidir sobre ellas la luz.

Formulaciones		Tamaño medio (nm)	Potencial Z (mv)
L-1	Blanca	22.25	20.89
	CBD	24.73	12.84
L-2	Blanca	40.80	21.59
	CBD	42.20	21.49
L-3	Blanca	108.9	1.77
	CBD	119.7	-3.71

Tabla 2: Tamaño medio y potencial Z de las distintas formulaciones de nanoparticulas blancas y cargadas con CBD.

Según se recoge en la tabla 2, al disminuir el porcentaje de Solutol y aumentar, en consecuencia, el porcentaje de Labrafac, aumenta el tamaño de las LNCs; de manera que la modificación de las proporciones de estos dos componentes resulta una forma eficaz de controlar el tamaño de las nanocápsulas obtenidas. Mientras que Labrafac constituye el núcleo de las nanocapsulas, Solutol actúa en la formulación como agente surfactante hidrófilo

y quedaría localizado en la superficie exterior de las nanocápsulas, aportándolas estabilidad física ya que presenta una temperatura de solidificación de 35ºC. En concreto, con las fórmulas estudiadas, se obtienen nanocápsulas con un tamaño medio de 22.25nm, 50.80nm y 108.9nm, y una muy estrecha distribución de tamaños, como puede observarse en las gráficas A y C de la figura 1.

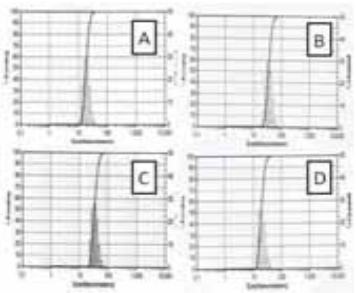


Figura 1: distribución de tamaños de las nanopartículas: L-1 blancas (A) y con CBD (B); L-2 blancas (C) y con CBD (D)

Esta estrecha distribución de tamaños también queda patente por microscopía electrónica (figura 2 A), observándose esferoides lipídicos con una elevada uniformidad de tamaño.

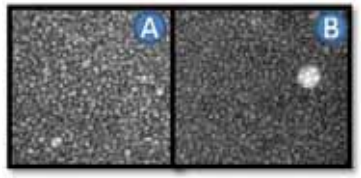


Figura 2. Aspecto de las nanocápsulas al microcopio electrónico: L-1 blancas (A) y L-1 con CBD (B).

La figura 3 representa la variación de la conductividad en función de la temperatura para la mezcla de fase lipídica y CBD. Como se puede observar la TIF se encuentra alrededor de los 76.4C, valor sólo ligeramente superior al que, según la bibliografía, presenta la mezcla de lípidos sin principio activo (TIF =74.3ºC)[4]. Teniendo en cuenta este valor se elaboraron los tres lotes de nanocápsulas cargadas de CBD.

Con las tres fórmulas estudiadas se obtuvieron suspensiones de nanocápsulas de CBD, verificado visualmente por presentar un claro efecto Tyndall y una tonalidad azulada debido a la dispersión de Rayleigh, especialmente marcado en el caso del Lote 2.

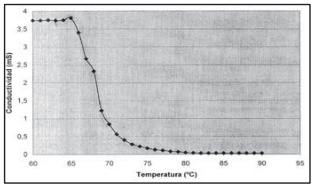


Figura 3. Resultados de la determinación de la TIF de la mezcla lipídica-CBD.

Las LCNs cargadas con CBD presentan características similares a las LNCs blancas. Aunque se obtuvieron valores de tamaño medio ligeramente superiores, las diferencias no fueron significativas (figura 1.B y D). Tampoco se observaron diferencias por microscopía electrónica (figura 2.B) de manera que la presencia del principio activo no afecta a las características de las nanocápsulas obtenidas.

Conclusión: Se han puesto a punto tres protocolos para la obtención de LNCs de CBD que permiten obtener nanocápsulas con tamaños medios de 20nm, 50nm y 100nm. Estudios posteriores permitirán determinar la influencia del tamaño de partícula en la eficacia de las nanocápsulas desarrolladas como vehículos para la administración de cannabidiol.

Referencias:

(1) D. Hernán et al. Microspheres of cannabinoids: a tool for improving their administration in pharmacological studies. Cannabinoids in biology and Medicine. Jerusalem, 2010.

(2) M.R. Aberturas et al. Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with a cannabinoid model drug. 1st Conference on Innovation in Drug Delivery: from biomaterials to devices. Nápoles, 2007.

(3) D. Hernán et al. Poly-ε-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. J Controlled Release, 161 (3) 927–932, 2012.

(4) B.Heurtault et al. A Novel Phase Inversión-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. Pharm. Research, 19 (6)875-879, 2002

Agradecimientos: al Centro Nacional de Microscopía Electrónica, por su ayuda en la realización de las fotografías.

APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL A LA OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACETAZOLAMIDA A PARTIR DE TRANSFERSOMAS®

M.J. Cózar-Bernal, A.M. Rabasco, N. Abad, M.L. González-Rodríguez

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Sevilla, España

Introducción

Acetazolamida (ACZ) es el fármaco de elección empleado en el tratamiento de ataques agudos de glaucoma y para el control de la presión intraocular (PIO) post-quirúrgica.

Actualmente se está investigando la vía tópica como alternativa a la vía oral. Este fármaco presenta tanto baja solubilidad (0.7 mg/mL) como permeabilidad (clase IV, BCS).

Para solventar estas dificultades, con el fin de que pueda atravesar intacto determinadas capas de la mucosa, se han diseñado vesículas elásticas o Transfersomas®, capaces de cruzar el estrato córneo sin ser destruidas, accediendo así a estructuras más internas.

Los Transfersomas® son liposomas modificados que incluyen en su composición los denominados "activadores del borde o margen" en el interior de la matriz fosfolipídica, con el fin de incrementar la elasticidad y deformabilidad de la vesícula (El Zaafarany y cols., 2010). Este tipo de sustancias son habitualmente tensioactivos de cadena única, capaces de ofrecer un elevado radio de curvatura que desestabiliza las bicapas lipídicas de las vesículas e incrementa su deformabilidad (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005).

El diseño experimental (DOE) es una estrategia que implica la utilización de elementos matemáticos y estadísticos (González-Rodríguez y cols.) con objeto de obtener la máxima información a través de datos experimentales y encontrar las condiciones óptimas para la ejecución de un determinado proceso experimental (Lewis y cols., 1999).

En el presente trabajo se pretende optimizar las condiciones del método de extracción de ACZ de las vesículas formuladas por centrifugación con el fin de evaluar la eficacia de encapsulación de los Transfersomas®. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio de cribado de distintos factores, con el objetivo de conocer aquellos que influyen significativamente en las respuestas seleccionadas.

Materiales y Métodos

Materiales

ACZ (Acofarma, España), desoxicolato sódico, colesterol y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina semisintética (Sigma Aldrich, Alemania), Hepes, acetato de sodio, lauril sulfato sódico y demás disolventes (Panreac Química S.A., España).

Elaboración de vesículas multilaminares

Los Transfersomas® se elaboraron utilizando la técnica de evaporación en capa fina o Bangham (*TLE, Thin Layer Evaporation*).

La mezcla de lípidos (fosfolípidos y colesterol), el desoxicolato (activador del borde) y la ACZ se disolvieron en una mezcla de cloroformo: metanol (3:2 v/v) El disolvente orgánico se evaporó bajo presión a 58 ºC hasta obtener una fina película. Ésta se hidrató con una solución de Hepes/PEG400 (60:40) mediante cinco ciclos intermitentes de vortex y calor a 50 ºC. Las vesículas se almacenaron a 4 ºC hasta su uso.

Optimización de la eficacia de encapsulación

Se ha desarrollado y optimizado un método de separación de fracciones (encapsulada y no encapsulada) y su posterior cuantificación.

Este método consiste en centrifugar la dispersión liposomal (*Eppendorf Centrifuge 5804R*) a una velocidad apropiada (8000 - 12000 r.p.m), durante un tiempo y temperatura adecuados (Chimanuka y cols., 2002; Fang y cols., 2008).

Tras someter las muestras a las distintas condiciones, se separa el sobrenadante del precipitado y se realizan distintos tratamientos previos a su cuantificación por HPLC:

1) El sobrenadante se filtra y se cuantifica directamente por HPLC, determinando así la cantidad de fármaco no encapsulado.
2) Al precipitado se le añade una solución de lauril sulfato sódico (LSS) 0.5% p/v para facilitar la destrucción de las vesículas (Bhardwaj y cols., 2010) y se determina la cantidad de fármaco encapsulado por HPLC.

En la tabla 1 se recogen las variables estudiadas en el proceso de optimización.

Para cuantificar de forma precisa la ACZ, se desarrolló un método analítico de fase reversa por HPLC, utilizando un cromatógrafo *Hitachi HPLC Elite Lachrom.*

Factores	Niveles		
	-1	**0**	**+1**
Tiempo (minutos)	60	90	120
Volumen de muestra (mL)	0.4	0.7	1
T de centrifugación (ºC)	2	4	6
Velocidad centrifugación (rpm)	8000	10000	12000

Tabla 1. *Factores seleccionados para el estudio, con sus niveles correspondientes.*

Resultados y Discusión

La determinación de la cantidad de ACZ encapsulada en las vesículas requiere la destrucción de las mismas con una solución de LSS una vez sedimentadas tras el proceso de centrifugación.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas del proceso de centrifugación, se procedió al estudio mediante la aplicación del DOE. En la tabla 2 se recogen las condiciones fijadas para cada uno de los experimentos, así como los resultados obtenidos de porcentaje de fármaco encapsulado. Como se aprecia, se obtienen porcentajes de encapsulación comprendidos entre un 26.5 y 52.4%.

Exp	r.p.m.	ºC	min	mL	x (%) ± sd
1	8000	2	60	0.4	38.5 ± 2.17
2	8000	4	90	0.7	52.4 ± 3.79
3	8000	6	120	1.0	35.5 ± 6.86
4	10000	2	90	1.0	32.5 ± 1.22
5	10000	4	120	0.4	41.7 ± 1.89
6	10000	6	60	0.7	43.5 ± 0.60
7	12000	2	120	0.7	39.7 ± 4.84
8	12000	4	60	1.0	26.5 ± 3.46
9	12000	6	90	0.4	34.5 ± 4.05

Tabla 2. *Matriz ortogonal L9 de Taguchi y resultados de eficacia de encapsulación (x) de ACZ (sd: desviación estándar).*

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de las medias (ANOM), obteniéndose como resultados más concluyentes que únicamente dos de los factores (velocidad y volumen) ejercen significación estadística en la eficacia de encapsulación, ya que los valores obtenidos se encuentran fuera de los límites de error establecidos en el diseño. Por tanto, la temperatura y el tiempo de centrifugación no influyen en la eficacia de encapsulación del fármaco, puesto que los valores se encuentran dentro del intervalo, lo que significa que esas diferencias son debidas a errores experimentales.

En lo que respecta a la velocidad, se obtiene una relación inversamente proporcional con la respuesta analizada, es decir, los valores de atrapamiento aumentan conforme disminuye la velocidad. Este hecho podría atribuirse a la destrucción de los liposomas cuando se utilizan velocidades de centrifugación muy elevadas.

En relación al volumen de muestra, existe un valor máximo de eficacia de encapsulación, que se corresponde con la utilización de 0.7 mL. Este estudio ha sido corroborado con un ANOVA.

Una vez analizados los distintos factores de la matriz experimental en cuanto a su significación estadística respecto a las distintas respuestas, se procedió al estudio de la optimización de dichos parámetros, con el fin de conseguir una mayor eficacia de encapsulación del fármaco.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas bajo las cuales se debe realizar el proceso de centrifugación para obtener una eficacia de encapsulación elevada en las muestras, es estudian las medias marginales (figura 2) donde se representan secuencialmente los factores de la matriz con sus respectivos valores de eficacia de encapsulación. Dado que lo que se pretende es maximizar la respuesta, es decir, obtener valores máximos de atrapamiento del fármaco, se seleccionan los datos mayores de los distintos factores.

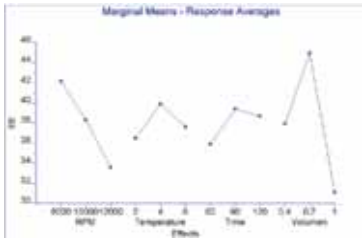


Figura 2. *Representación gráfica de las medias marginales de los parámetros estudiados para la respuesta "eficacia de encapsulación".*

Conclusiones

Las condiciones de centrifugación que se aplicarán a partir de este momento para sucesivos estudios serán:

- Velocidad de centrifugación: 8000 rpm
- Temperatura: 4 ºC
- Tiempo de centrifugación: 60 minutos
- Volumen de muestra: 0.7 mL

Bibliografía

Bhardwaj y cols., *Int J Pharm* 388: 181-189 (2010).

Chimanuka y cols., *J Pharm Biomed Anal* 28: 13-22 (2002).

El Zaafarany y cols., *Int J Pharm* 397: 164-172 (2010).

Fang y cols., *Int J Pharm* 356: 144-152 (2008).

González-Rodríguez y cols., *J Pharm Sci* 101: 3845-3863 (2012).

Honeywell-Nguyen y Bouwstra, *Drug Discov Today: Technol* 2: 67-74 (2005).

Lewis y cols., Marcel Dekker, New York (1999).

Agradecimientos: Este trabajo se ha desarrollado bajo la cofinanciación del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Evaluación de la utilidad de un polímero hiperramificado (Hybrane H1500) para la elaboración de pelets de liberación controlada por extrusión por fusión.

Elena Raviña Eirín, José Luis Gómez Amoza, Ramón Martínez Pacheco

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

Introducción

La extrusión por fusión es una técnica ampliamente utilizada en el sector alimentario y en la industria de plásticos (1), que sólo en los últimos años ha sido objeto de atención en el ámbito farmacéutico. Por ello, hoy se dispone de un número reducido de excipientes adecuados para esta finalidad.

Los polímeros hiperramificados han sido objeto de estudios muy recientes, centrados mayoritariamente en su uso como materiales de recubrimiento en formas de liberación controlada (2,3).

Tomando estos hechos como punto de partida, en este trabajo se han evaluado las posibilidades que ofrece un polímero hiperramificado con estructura de poliesteramida (Hybrane H1500) como excipiente base para la elaboración de pelets de estructura matricial de liberación controlada, elaborados por extrusión por fusión, conteniendo cafeína (CAF) como fármaco modelo de elevada hidrosolubilidad.

Materiales y métodos

Materiales:

Principio activo: Cafeína (Guinama), lote: 0012939

Excipiente: Hybrane H1500 (DSM New Jersey, USA), insoluble en agua y con temperatura de transición vítrea de 78ºC, lote: HvH

Métodos

Formulaciones objeto de estudio. Se han elaborado y evaluado 12 formulaciones de pelets, en las que se combinan 3 proporciones de CAF/H1500 y 4 tamaños de partícula, cuyas características se detallan en la tabla 1.

Elaboración de las formulaciones. La mezcla de excipiente y principio activo (Turbula® T2C 15 min., 30 rpm) se introdujo en un extrusor Randcastle RCP 0375 equipado con tornillo sin fin girando a 30rpm y con temperaturas de 105, 110, 115 y 115ºC en las zonas de control. Los pelets se obtuvieron mediante corte manual del extruido. Las fracciones con tamaño inferior a 1mm se obtuvieron por pulverización del extruido en mortero y posterior separación por tamización.

% H1500	% CAF	Tamaño medio (µm±SD)	ED 24h
90	10	168±37	14,56
90	10	373±72	9,89
90	10	763±132	6,08
90	10	1609±343	2,80
80	20	170±37	13,33
80	20	403±65	9,98
80	20	825±109	5,59
80	20	1912±299	2,33
70	30	168±38	11,99
70	30	361±66	8,21
70	30	806±122	4,12
70	30	1978±369	1,54

Tabla 1. Composición y propiedades de las formulaciones objeto de estudio.

Caracterización de las formulaciones:

Difractometría de rayos X. La cristalinidad de muestras de fármaco, polímero, formulaciones y mezclas físicas equivalentes se evaluó en un equipo Philips PW1710 en el intervalo 0-70º2θ.

Tamaño de partícula. Se determinó por microscopía óptica (Estereomicroscopio Olympus SZ-CTV conectado a una videocámara JVC TK-S350), el diámetro medio de Feret de, al menos, 600 pelets de cada formulación.

Velocidad de disolución. Los perfiles de disolución de CAF a partir de muestras de 200 mg de pelets se obtuvieron en aparato tipo II, USP 29 (Turu Grau DT-6, Barcelona, España). Los ensayos se llevaron a cabo en 900 ml de agua destilada, a 37ºC, con las paletas girando a 50 rpm. La cantidad de CAF disuelta a cada tiempo de muestreo se determinó por espectrofotometría UV directa (Agilent 8453) a 273 nm. Los perfiles de disolución se caracterizaron a través de la eficacia de la disolución 0-24 horas (ED_{24h}).

Análisis de los resultados. Para la evaluación de los efectos de las variables bajo estudio sobre ED_{24h} se acudió a la regresión múltiple secuencial (SPSS, v.15) y a la construcción de la correspondiente superficie de respuesta.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos en la caracterización de las formulaciones objeto de estudio. Cabe destacar que, para cualquiera de las proporciones fármaco-polímero ensayadas, no fue necesaria la incorporación de un agente plastificante para obtener pelets de homogeneidad y de propiedades morfológicas adecuadas.

Los difractogramas de rayos X (Figura 1) indican que el proceso de extrusión provoca una moderada dispersión del fármaco en el seno del polímero, siendo menor la cantidad de fármaco dispersada a medida que aumenta la proporción de fármaco en la formulación.

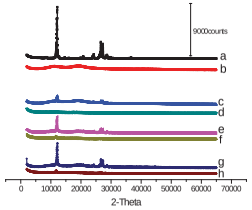
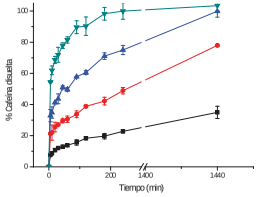
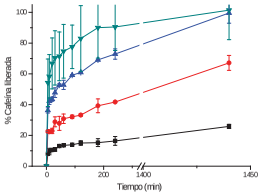


Figura 1. Difractogramas de Rayos X de las formulaciones indicadas: (a) Cafeína, (b) Hybrane H1500 (c) mezcla física 10% CAF-90%H1500, (d) 10% CAF-90%H1500 pelet, (e) mezcla física 20% CAF-80%H1500, (f) 20% CAF-80%H1500 pelet, (g) mezcla física 30% CAF-70%H1500, (h) 30% CAF-70%H1500 pelet.

a)



b)



c)

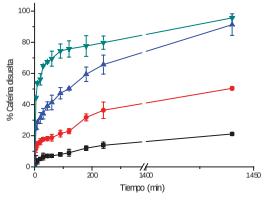
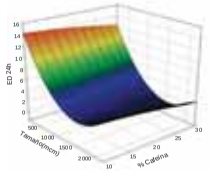


Figura 2. Curvas acumuladas de disolución de CAF para las formulaciones indicadas.(a) 10% CAF-90%H1500, (b) 20% CAF-80%H1500, (c) 30% CAF-70%H1500. Pelets: (■)≈2mm; (●)1000-500µm; (▲)500-250 µm; (▼) <250µm.

En la Figura 2 se recogen las curvas acumuladas de disolución de CAF a partir de cada una de las 12 formulaciones analizadas.

Cabe destacar la amplia variedad de perfiles de disolución de fármaco que se obtienen con este tipo de formulaciones. Como reflejo de la velocidad global de disolución se tomó el parámetro ED_{24h} cuya superficie de respuesta muestra la clara incidencia del tamaño de los pelets sobre la velocidad de disolución de cafeína y la ligera influencia del porcentaje del fármaco sobre el valor de este parámetro (Figura 3).



ED_{24h}=17.10-2E-2xTamaño+5.78E-6xTamaño^2-3E-3x%Caf

R^2=0.988

Figura 3. Superficies de respuesta para el parámetro ED_{24h}.

La observación de los diferentes perfiles de disolución sugiere que hay un mecanismo común de liberación del fármaco en todas las formulaciones. El polímero portador experimenta, en medio acuoso, una progresiva gelificación/hidratación provocando la liberación del fármaco a través de la estructura matricial que se origina, aspecto que ratifica el ajuste, más que aceptable, de los perfiles de disolución a la cinética de raíz cuadrada de Higuchi. Además, las partículas de mayor tamaño permiten una importante prolongación del proceso de disolución de un fármaco tan marcadamente hidrosoluble (22 mg/ml) como la cafeína.

Conclusiones

El Hybrane H1500 permite una fácil extrusión por fusión sin necesidad de incorporar agentes plastificantes y utilizando temperaturas relativamente bajas. Las formulaciones de pelets de cafeína/ Hybrane H1500 obtenidas por EF permiten obtener una amplia variedad de velocidades de disolución del fármaco, controladas por difusión del fármaco a través de la estructura hidratada/gelificada del polímero portador en el medio de disolución y fuertemente dependientes del tamaño de los pelets.

Referencias

1. Kaufman,H.S., & Falcetta, J.J. (1977). **Introduction to polymer science and technology: An SPE textbook (1st Ed.).** New York: John Wiley & Son.
2. Suttiruengwong, S.et al., **Hyperbranched Polymers as Drug Carriers: Microencapsulation and Release Kinetics.** Pharm. Dev. Tech. (2006), 11(1), 55-70.
3. Mallepally, Rajendar Reddy et al., **Enzymatic degradation of hyperbranched polyesters.** J. Appl. Polym. Sci. (2009), 112(4), 1873-1881.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Xunta de Galicia (07CSA006203PR).

IMPLANTES INYECTABLES DE POLOXAMINA, HEPARINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO PARA CESIÓN CONTROLADA DE PROTEÍNAS

M.I. Rial-Hermida, S. Blanco-Dorado, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. 15782-Santiago de Compostela, España.

Introducción: La elevada incidencia de las enfermedades degenerativas que afectan al sistema musculoesquético dota de gran interés a la preparación de andamiajes o *scaffolds* que promuevan la regeneración del tejido o el órgano afectado. Las poloxaminas (Tetronic®) son copolímeros tribloque ramificados que cuentan con un grupo central etilendiamina del que parten cuatro cadenas con bloques hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) e hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (PPO) (Figura 1). Esta arquitectura hace que sus dispersiones acuosas se comporten como sistemas sensibles al pH y a la temperatura (1) y experimenten transiciones de sol a gel a la temperatura corporal formando depots útiles para cesión controlada de proteínas (2). Por otra parte, se ha observado que la conjugación con heparina (glucosaminoglucano aniónico) mejora la capacidad de diversos polímeros para interaccionar con proteínas morfogénicas, lo que resulta en un control más preciso de su cesión y de la actividad osteogénica (3).

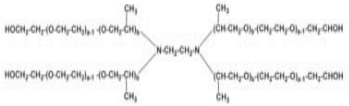


Figura 1. Estructura de una poloxamina

El objetivo de este trabajo fue preparar sistemas inyectables utilizando poloxamina Tetronic® 908 y heparina en forma de mezcla física y de conjugados químicamente unidos y evaluar in vitro su utilidad para liberación sostenida de proteínas. También se prepararon sistemas ternarios poloxamina/heparina/ácido hialurónico y se evaluaron las posibilidades que ofrece la incorporación de este último glucosamino-glucano para modular las propiedades mecánicas y de cesión de los geles. El ácido hialurónico actúa como promotor de la organización estructural de tejidos y aumenta la expresión de marcadores de diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos (4), pero forma hidrogeles de baja resistencia mecanica *in vivo*. La combinación de los tres polímeros podría dar lugar a geles con propiedades mejoradas como scaffolds óseos.

Materiales y Métodos:

Materiales: Tetronic ® 908 (T908) de BASF (Alemania); hialuronato sódico (AH) de Guinama (España); heparina sódica de la mucosa intestinal porcina (HEP) de Calbiochem (Alemania); anhídrido succínico, 4-dimetilaminopiridina, dioxano, MES (ácido 4-morfoniloetanosulfónico), N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) de Sigma-Aldrich (Alemania); trietilamina y n-hexano de BDH (Inglaterra); HCl 37 % y azul de toluidina de Panreac (España); membrana de diálisis Spectra/Por (MWCO=3500) de laboratorios Spectrum (Holanda), seroalbúmina Bovina (BSA) de Acros (Bélgica); BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific (EE.UU.); agua purificada por ósmosis inversa (MilliQ®, Millipore, España). Todos los restantes reactivos fueron de calidad analítica.

Preparación de los geles: Se prepararon geles, en tampón fosfato de pH 7.4, a partir de mezclas físicas y conjugados con las composiciones que se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los hidrogeles

Hidrogel	Composición
1	T908 20%
2	AH 1%
3	HEP 12%
4	Conjugado T908-HEP 32%
5	Conjugado T908-HEP 32% + AH 0,5%
6	Mezcla física T908 20% + HEP 12%
7	Mezcla física T908 20% + HEP 12% + AH 0,5 %

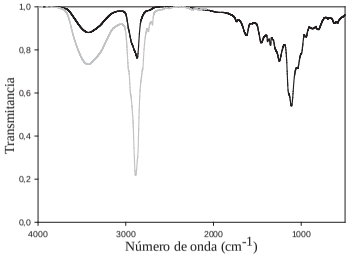
La conjugación se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar se carboxiló la poloxamina disolviendo 0,46 mmoles de T908, 2,49 mmoles de anhídrido succínico, 1,99 mmoles de 4-dimetilaminopiridina y 2 mmoles de trietilamina en 300 ml de 1,4 dioxano anhidro agitando durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó el dioxano en rotavapor y el residuo se redisolvió en cloroformo. La conjugación con la heparina se llevó a cabo por el método EDC/NHS, haciendo reaccionar 0,24 mmoles de T908 carboxilado, 0,27 mmoles de heparina, 1,0935 mmoles de EDC y 0,5535 mmoles de NHS en 200 ml de tampón MES pH5,6 durante 24 h, Finalmente, se dializó durante 3 días y el producto resultante se liofilizó. El contenido en heparina del conjugado se determinó colorimétricamente

utilizando, como reactivo cromogénico, el azul de toluidina.

FTIR análisis: Se registraron los espectros de infrarrojos (FTIR) del T908, la heparina, el conjugado y la mezcla física, en comprimidos de KBr, en un espectrofotómetro Bruker modelo IFS-66v (USA).

Incorporación y cesión de BSA: Se dispersaron 50 mg de seroalbúmina en 8 g de gel mediante agitación a 4ºC. Porciones de 2 g de cada gel se llevaron a un baño a 37ºC, en el que se mantuvieron bajo agitación oscilante a 50 rpm y se tomaron muestras durante 7 días. La cantidad de BSA cedida se determinó utilizando el kit BCA.

Resultados y Discusión:

Preparación y caracterización de los geles: Las dispersiones de poloxamina sin y con HEP y de conjugado T908-HEP, sin y con AH, dieron lugar a geles homogéneos y semitransparentes cuando la temperatura se incrementó hasta 37º C. La HEP sola no dio lugar a geles ni a temperatura ambiente ni a 37ºC. El porcentaje de heparina conjugada detectado por el método colorimétrico fue próximo al 100%, lo que indica que el conjugado está constituido por T908:HEP 60:40 p/p.

En el espectro FTIR del conjugado T908-heparina (Figura 2), se observó una banda a 1625 cm^{-1} atribuible al enlace carbonilo o al grupo amida monosustituído de la heparina y otra a 1735 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace carbonilo de la poloxamina conjugada. También se aprecia una banda a 3421 cm^{-1}, que puede corresponder a la vibración de los grupos hidroxilo de la heparina conjugada.