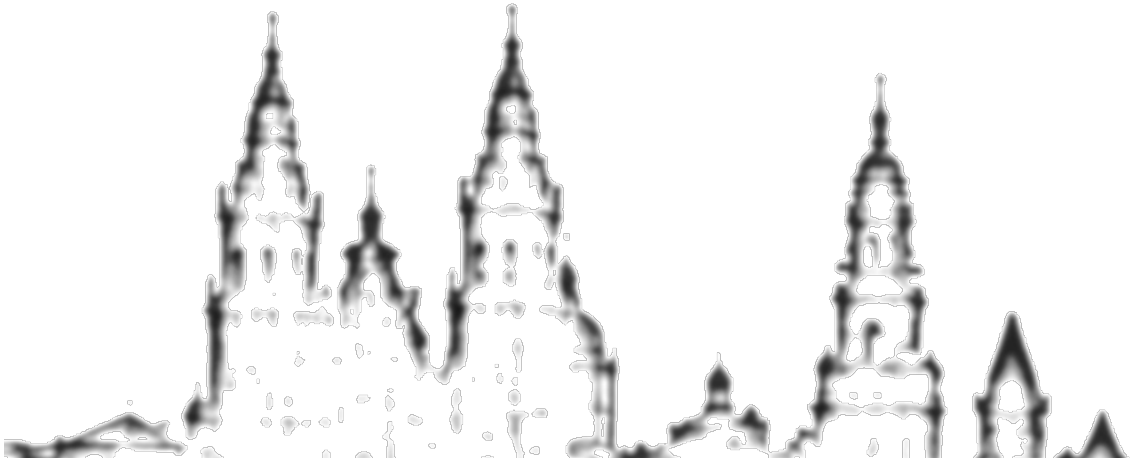
LIBRO DE COMUNICACIONES

XIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica



Santiago de Compostela, 23-25 de enero de 2019

Índice

Comité Organizador 3

Comité Científico 4

Programa 5

Conferencias Plenarias 6

Comunicaciones Orales 15

Comunicaciones Flash 37

Comunicaciones Póster 87

Índice de Autores 251

Comité Organizador

Presidente: Angel Concheiro Nine

Secretaria: Carmen Alvarez Lorenzo

Tesorera: Mª Esther Gil Alegre

Vocales:

Carlos García González

José Luis Gómez Amoza

Mariana Landín Pérez

Francisco Otero Espinar

Comité Científico

Mª José Alonso Fernández

José Luis Arias Mediano

Emilia Mª Barcia Hernández

Mª del Val Bermejo Sanz

José Blanco Méndez

José B. Fariña Espinosa

Mª José García Celma

Rosa Mª Hernández Martín

Juan M. Irache Garreta

Mª Rosa Jiménez-Castellanos

José Martínez Lanao

Matilde Merino Sanjuan

Mª Ángeles Peña Fernández

Programa

MIÉRCOLES, 23 de Enero	
14:30	Entrega de documentación
15:15	Apertura del congreso
SESIÓN 1 **Moderadora: C. Alvarez Lorenzo**	
15:30-16:20	**A. Sosnik.** ***Polymeric amphiphiles: Targeting pediatric tumors and beyond***
16:20-17:10	**A. Rodríguez-Gascón.** ***Gene therapy: evidence, challenges and perspectives***
17:10	Pausa café / **Sesión posters**
SESIÓN 2 **Moderadora: E. Barcia Hernández**	
17:40	**Oral 1 M. Llabrés**
17:55	**Oral 2 B. Sánchez**
18:10	**Oral 3 C. Reboredo**
18:30-19:20	**J. Mano.** ***Nano to macro-polymeric particles for the release of active agents***
19:20	Entrega Premio SEFIG
19:45-21:15	**Farmacia Monacal. Encuentro en San Martín Pinario**

JUEVES, 24 de Enero	
8:45	Recepción
SESIÓN 3 **Moderadora: C. Tros de Ilarduya**	
9:00-9:50	**G. Battaglia.** ***Phenotypic and chemotactic targeting: toward the design of precision nanomedicines***
9:50	**Oral 4 M. Durán**
10:05	**Oral 5 M. García-Fuentes**
10:20	**Flash F1-F8**
11:15	Pausa café / **Sesión posters**
SESIÓN 4 **Moderadora: A. Sánchez Navarro**	
11:45-12:35	**P. Taboada.** ***Approaches for combined therapeutics and theranosis using sensitive nanoparticles***
12:35	**Oral 6 L. Saludas**
12:50	**Oral 7 M. Gaspar**
13:05	**Oral 8 C. García-González**
13:30	COMIDA **S. M.Pinario**
SESIÓN 5 **Moderador: J. Fariña Espinosa**	
15:00-15:50	**A. Goyanes.** ***3D printed medicines: A digital pharmacy era***
15:50-16:40	**J.A. Lopes.** ***QbD and process analytics for pharmaceutical development and drug products manufacturing***
16.40	**Flash F9-F16**
17:35	Pausa café / **Sesión posters**
SESIÓN 6 **Moderador: A.M. Rabasco Alvarez**	
18:00-19:00	**Mesa redonda: Las TICs en la docencia. MOOCs y píldoras de conocimiento** **B. García Antelo, L. Casal Otero**
19:00	**Asamblea SEFIG**
21:30	CENA DEL CONGRESO **Hostal Reyes Católicos**

VIERNES, 25 de Enero	
8:45	Recepción
SESIÓN 7 **Moderadora: R. Hernández Martín**	
9:00 – 9:50	**Rocío Herrero Vanrell.** ***Microparticulate drug delivery systems for the treatment of ophthalmic diseases affecting the optic nerve and the retina***
9:50	**Oral 9 D. Garcia**
10:05	**Oral 10 E. M. Arias**
10:20	**Flash F17-F24**
11:15	Pausa café / **Sesión posters**
SESIÓN 8 **Moderador: J. González Plágaro**	
11:45-13:00	**Mesa redonda: Protección del conocimiento y transferencia de tecnología.** **S. Torrente, J.L. Villaverde, A. Goyanes**
13:00	**Premio Comunicación Flash**
13:15	**Clausura**

Conferencias Plenarias

Polymeric amphiphiles: Targeting pediatric tumors and beyond

Alejandro SOSNIK

Laboratory of Pharmaceutical Nanomaterials Science, Department of Materials Science and Engineering, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Email: alesosnik@gmail.com; sosnik@technion.ac.il

Nanotechnology made sound contributions to the treatment of disease in general and cancer in particular due to the ability to target drug-loaded nanomaterials by the enhanced permeation and retention effect (passive targeting). Furthermore, the design of nanocarriers surface-modified with ligands recognized by receptors overexpressed in specific cell types (e.g., cancer cells) is an extensively investigated (though still unrealized in the clinical practice) strategy for active targeting and reduce off-target accumulation and toxicity; e.g., sugared nanocarriers improved the diagnosis and chemotherapy of solid tumors overexpressing glucose transporters (e.g., breast cancer). In my presentation, I will overview the different strategies pursued in my laboratory to design novel amphiphilic nanomaterials with improved features to overcome different biological barriers and active targeting capabilities.

Keywords: Amphiphilic nanocarriers; drug delivery; biological barriers.

Gene therapy: evidence, challenges and perspectives

Alicia RODRÍGUEZ GASCÓN

Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy. Paseo de la Universidad nº 7. 01006 Vitoria.

Email: alicia.rodriguez@ehu.eus

Gene therapy can be defined as a novel approach to treat, cure, or ultimately prevent disease by changing the expression of a person's genes [1]. It consists of using recombinant nucleic acids as the active pharmaceutical ingredient, where the effect is directly related to either the recombinant nucleic acid sequence it contains, or to the product of genetic expression of this sequence [2]. The American Medical Association reports that around 4000 diseases have been linked to gene disorders (including cancer, AIDS, cystic fibrosis, and Parkinson and Alzheimer diseases). The promise of successful treatment with gene therapy could therefore positively affect millions of lives [2].

Therapeutic nucleic acids traditionally used is a plasmid DNA. Newer tools include directly acting nucleic acid sequences such as microRNA, RNA interference (RNAi) via short hairpin RNAs (shRNA) or molecular scissor approaches in order to repair, add or delete a genetic sequence via gene silencing, exon skipping, gene regulation or gene knock-down [4]. Alternatively, RNA delivery is also especially attractive for developing gene therapy treatments to cure pathological processes, in form of protein encoding messenger RNA (mRNA) or short interfering RNA (siRNA). Nucleic acid delivery is a complex process, and its success largely depends on the design of an adequate delivery system that guarantees that the genetic material reaches the target cell and triggers the transfection process. Therefore, the most important, and most difficult, challenge in gene therapy is the issue of delivery. The ideal gene delivery system should be taken up efficiently and broadly in the target tissue after administration by a less-invasive method. Additionally, the vector should be well tolerated and should not cause adverse effects, such as inflammation, immune response or integrational toxicity. Among gene delivery systems, most gene therapy clinical trials have used viral vectors, but they are currently limited to serious diseases that have no cure, due to their potential risk associated with immunogenicity and mutagenesis, which makes necessary studies to extend safeness and effectiveness concerns. Non-viral vectors are less immunogenic, do not induce major inflammatory responses, are safe and easy to produce in large scales, although their main limitation is still the lower transfection efficacy and the short-term expression [5].
In the last years, gene therapy has experienced a remarkable expansion thanks to the development of more efficient and safer gene transfer vectors and to the advances in the cell therapy field. After years of research and development, gene therapies are now becoming a commercial reality with several products approved by the European and American regulatory authorities [2,6].

References

[1] American Medical Association. Gene Therapy. http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/genetics-molecular-medicine/current-topics/gene-therapy.

[2] Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. Front Med (Lausanne). 2017,26;4:182.

[3] Hampson G, Towse A, Pearson SD, Dreitlein WB, Henshall C Gene therapy: evidence, value and affordability in the US health care system. J Comp Eff Res. 2018,7:15-28.

[4] Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A[2]. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. Eur J Pharm Biopharm. 2016,109:184-193.

[5] Rodríguez Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy, Gene Therapy Francisco Martin Molina, IntechOpen, DOI: 10.5772/52704. Available from: https://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/non-viral-delivery-systems-in-gene-therapy.

[6] Touchot N, Flume M. Early Insights from Commercialization of Gene Therapies in Europe. Genes (Basel). 2017,8(2). pii: E78.

Nano to macro- polymeric particles for the release of active agents

João F. MANO

Department of Chemistry. CICECO. University of Aveiro. 3810-193 Aveiro. Portugal.

Email: jmano@ua.pt

The spatiotemporal control of the delivery of bioactive agents is necessary to enhance their therapeutic efficacy. Biodegradable and biocompatible polymeric particles have been widely used to encapsulate molecules that could then be released in a controlled or sustained way. This lecture will explore a range of technologies for the processing and application of particles for drug release ranging from the nano to the macro-scale sizes. Although the methodologies proposed are transversal for many pharmaceutical and bioengineering applications examples will especially focus the area of tissue engineering and regenerative medicine. Nanoparticles can be used to deliver differentiation factors to direct the faith of stem cells. We discovered that naringin, a naturally occurring flavanone, encapsulated in nanomiceles could be internalised and released in mesenchymal stem cells, promoting the differentiation and augmenting the pro-osteogenic effect over that of free drug and standard induction methods, thus indicating the potential of this system to enhance stem cell–based bone regeneration.

Micro and macro-particles should be prepared using other methodologies. We proposed the use of superhydrophobic substrates as platforms to produce hydrogel or polymeric particles able to encapsulate molecules with a high loading efficiency. Several examples are presented in this context using natural based polymers and synthetic biodegradable polymers. The mild conditions that the particles may be formed allows for the encapsulation of living cells, extending the applicability of the technology.

Liquefied capsules are also an interesting system where drugs or cells may be encapsulated and released in a controllable fashion. We have been using the layer-by-layer technique (LbL) for the production of the multilayer shell that is enveloping the capsules. The mechanical and transport properties of the multilayers could be tuned, and the use of stimuli-responsive polymers in the construction of the shells permits to develop smarter delivery systems. The technology was also adapted to encapsulate living cells, and the resulting compartmentalized cell microfactories can be produced for distinct biomedical applications.

Phenotypic and chemotactic targeting: toward the design of precision nanomedicines

Giuseppe BATTAGLIA

Department of Chemistry, Department of Chemical Engineering, and Institute of Physics of Living Systems, University College London, WC1H 0AJ, London, United Kingdom

Email: g.battaglia@ucl.ac.uk

Possibly, the most defining feature of a drug is its ability to interact with its biological target as selectively as possible, and indeed most drug discovery tools are fined to identify those molecules that bind with the highest affinity. Drug discovery is a highly rigorous process that spans across structural and cell biology, bioinformatics, computational and medicinal chemistry. It is now evolving and merging with -omic technologies to promise personalised therapies. Alongside drug development, we have also advanced our ability to deliver drugs combining the high selectivity of active molecules with molecularly engineered carriers equipped with the necessary attributes to navigate biological environments. A critical element of such a nanomedicinal effort is the introduction of ligands that enable targeting and selectivity to guide carriers across biological barriers. However, tight control on the selectivity of drugs and nanomedicines' interaction with biological systems is paramount for the development of targeted therapies. The large number of synthetically tuneable parameters makes it difficult to identify optimal design "sweet spots" without rational guiding principles. Here I address this problem combining super-selectivity theory (SST) with analytical models from soft matter and polymer physics into a unified theoretical framework. Starting from an archetypal system, a polymer stabilized nanoparticle functionalised with targeting ligands, we use our model to identify the most selective combination of parameters in terms of particle size, brush polymerisation degree and grafting density, as well as tether length, binding affinity and ligands number. I further discuss how to combine multivalent interactions into multiplexed systems which act holistically as a function of the density of more than one receptor type, so as to achieve binding only when multiple receptors are expressed above a threshold density. I christen this as "phenotypic" targeting and I propose its use for drugging unique cell populations enabling personalised therapies. I will show few examples of phenotypic targeting in both blood brain barrier crossing, cancer targeting and immune cell recognition. Finally I will combine phenotypic targeting with chemotaxis amplifying molecular interaction to create organotropic diffusion profile. I will show this with a fully synthetic, organic, nanoscopic system that exhibits attractive chemotaxis driven by enzymatic conversion of glucose. This is achieved this by encapsulating glucose oxidase alone or in combination with catalase into nanoscopic and biocompatible asymmetric polymer vesicles (known as polymersomes). I will show that these vesicles self-propel in response to an external gradient of glucose by inducing a slip velocity on their surface, which makes them move in an extremely sensitive way toward higher-concentration regions. I will finally demonstrate that the chemotactic behaviour of these nano- swimmers, in combination with LRP-1 (low-density lipoprotein receptor–related protein 1) targeting, enables a fourfold increase in penetration to the brain compared to non-chemotactic systems. .

References: Battaglia et al ***ChemRxiv***. 2018 DOI: 10.26434/chemrxiv.5647969.v1; Rizzello et al ***BioRxiv***, 2017 DOI:10.1101/119297; Joseph et al. ***Science Adv.*** 2017, 3, 8, e1700362; Messager et al. ***Angew. Chem. Int. Ed,*** 2016, 37, 11272-11275; Simón-Gracia et al. ***Biomaterials*** 2016, 104, 247–257; Ruiz Perez et al. ***Science Adv.*** 2016, e1500948; Tian et al. ***Sci. Rep.*** 2015, 5, 11990; Robertson et al. ***ACS Nano***, 2014, 8, 4650–4661; Colley et al ***Mol. Pharmac.*** 2014, 11, 1176; Madsen et al. ***J. Am. Chem.*** Soc. 2013, 135, 14863–14870; Wang et al. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 2012, 51, 11122-11125; LoPresti et al. ***ACS Nano*** 2011, 5 (3),1775–1784; Murdoch et al. ***Nanomedicine*** 2010, 5, 1025-1036

Approaches for combined therapeutics and theranosis using sensitive nanoparticles

Pablo TABOADA

Colloids and Polymers Physics Group, Faculty of Physics and Health Research Institute, Universidade de Santiago de Cosmpostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Email: pablo.taboada@usc.es

Recent advances in nanotechnology and biotechnology have contributed to the development of sensitive multifunctional nanoparticles able to produce different and complementary therapeutic outcomes and/or to be simultaneously used as imaging and therapeutic tools, opening a new filed of research coined as Theranostics [1]. Theranostics as an integrated treatment strategy for individual patients encompasses personalized medicine, pharmacogenomics, and molecular imaging, in order to develop an efficient new targeted therapy and optimize drug selection via a better molecular understanding of wide world extended diseases such as cancer, cardiovascular or infectious diseases. Furthermore, Theranostics aims to monitor the response to the treatment, to increase drug efficacies and safety through an exquisite control of drug administration profiles and reléase rates, and to reduce the necessary treatment of patients, resulting in significant cost savings for the overall healthcare system [2]. In the present talk, different approaches to configure sensitive theranostic-based nanoparticles and nanodevices as well as the basic requirements these systems must successfully fullfil will be introduced. An special emphasis will be done in those nanoplatforms possessing hybrid structures in which their physcial and chemical properties can be modulated either by internal and/or external stimuli in order to optimise their outcomes. The underlying physical concepts behind the potential therapeutic capabilities of these nanosystems will be briefly commented, and their activity exemplified by several recently successful multimodal nanoplatforms developed by us and others [3-5].

Acknowledgements

P.T thanks Ministerio de Ciencia, Educación e Innovación by research Project MAT2016-80266-R and FEDER for additional funding.

References

[1] Lim, E.-K.; Kim, T.; Paik, S.; Haam, S.; Huh, Y.-M.; Lee, K. Chem. Rev. 2015, 115, 327.

[2] Xie, H. G.; Frueh, F. W. Per. Med. 2005, 2, 325.

[3] Topete, A.; Alatorre-Meda, M.; Iglesias, P.; Villar-Alvarez, E.; Barbosa, S.; Costoya, J. A.; Taboada, P.; Mosquera, V. ACS Nano, 2014, 8, 2725.

[4] Argibay, B.; Trekker, J.; Himmelreich, U.; Beiras, A.; Topete, A.; Taboada, P. et al. Sci. Rep. 2017, 7, 40758.

[5] Villar-Alvarez, E.; Cambón, A.; Pardo, A.; Mosquera, V. X.; Bouzas-Mosquera, A.; Topete, A.; Barbosa, S.; Taboada, P.; Mosquera, V. ACS Omega, 2018, in press.

3D Printed Medicines: a digital pharmacy era

Alvaro GOYANES

FabRx Ltd., London, United Kingdom

Email: a.goyanes@FabRx.co.uk

3D printing (3DP) is an increasingly growing manufacturing technology that provides the ability to fabricate structures of precise geometries from a 3D model by deposition of many thin layers. 3DP is nowadays used as a production tool or for rapid prototyping in many areas(1). In the pharmaceutical field, the advantages of 3D printing lie in the potential for the fabrication of unit dosage forms with tailored doses, shapes, sizes and/or drug combinations, potentially revolutionising the way that medicines are designed, used and manufactured. This technology is predicted to cause a change from the mass manufacture of limited dose range medicines toward tailored-to-patient medicines prepared at hospital or community pharmacies, to meet the therapeutic needs of each individual patient (2, 3).

3DP comprises an array of different additive manufacturing technologies, some of which can be adapted for use in the pharmaceutical field, e.g. fused-deposition modelling (FDM), selective laser sintering (SLS) or stereolithography (SLA). The feasibility of using different 3D printing technologies to fabricate medicines and medical devices with pharmaceutical-grade polymers have already been demonstrated and the drug release profiles obtained can be modified by careful selection of the excipients and the digital design of the formulations.

To enable integration of 3DP into pharmacy practice, it is necessary to evaluate, develop and adapt these novel manufacture technologies to meet the high quality standards that are regulated by the pharmaceutical industry, leading to new challenges and opportunities .

This presentation will cover both academic research work developed at University College London (UCL) - School of Pharmacy and industrial development at FabRx, spin off company from UCL.

References

1. Basit AW, Gaisford S. 3D Printing of Pharmaceuticals: Springer International Publishing; 2018.
2. Trenfield SJ, Awad A, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW. 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. Trends Pharmacol Sci. 2018;39(5):440-451.
3. Awad A, Trenfield SJ, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW. Reshaping drug development using 3D printing. Drug Discovery Today. 2018;23(8):1547-1555.

Quality-by-design and process analytics for pharmaceutical development and drug products manufacturing

João A. LOPES

Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisbon, Portugal.

Email: jlopes@ff.ulisboa.pt

The actual regulatory context of the pharmaceutical industry is gradually changing paving the way to the real transposition for a XXI century industry, specifically adopting the concepts of digitalization or industry 4.0 [1]. Examples of the changes operated in the last decade include the recent guidelines issued by the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q8 to Q11 and the imminent release of Q12 (product life cycle management) [2]. Additionally, the primary and secondary manufacturing industry are gradually migrating from the more frequent batch processing to continuous processing, who ultimately requires a more scientific solid understanding of the underlying mechanisms governing manufacturing and relation with product attributes [3]. Linked with continuous manufacturing is the need for investment in real-time high-throughput process monitoring (to ensure process, drug and drug products quality) that can result on parametric release, thus reducing the burden in terms of quality control while fastening batches' approval. In parallel, realities like new materials, personalised medicines or different drug products distribution chains are already around the corner. All these issues, reflect for instance on analytical methods, that should gradually shift from the lab to the manufacturing areas or even to the patients domain. Process analytics are nowadays considered a commodity and therefore methodologies for appropriate data handling, management and efficient use are mandatory. The generation of high volumes of information per product batch requires appropriate handling, such as that guaranteed by chemometric methods (data-driven) [4]. Data becomes in this context more relevant, and consequently new challenges in terms of ensuring data integrity arise. Moreover, with the increasing introduction of biologics and structurally complex drug products (e.g., based on nanocarriers), manufacturing sites are being gradually equipped with highly selective hyphenated analytical methods that generate huge amounts of complex data [5]. This communication addresses some of the actual challenges ranging from pharmaceutical development to manufacturing of bulk, bio and nanostructured products.

Acknowledgements

The author acknowledges iMed.ULisboa's grant UID/DTP/04138/2013.

References

[1] Gaertner, R. 2017, Manufacturing-Chemist Pharma (http://tiny.cc/9zw2qy).

[2] ICH, 2018 (https://tinyurl.com/65e2yjf).

[3] Silva, A.F.; Sarraguça, M.C.; Fonteyne, M.; Vercruysse, J.; De Leersnyder, F.; Vanhoorne, V.; Bostijn, N.; Verstraeten, M.; Vervaet, C.; Remon, J.P.; De Beer, T.; Lopes, J.A. 2017 Int. J. Pharm., 528, 242-252.

[4] Brereton, R.G.; Jansen, J.; Lopes, J.A.; Marini, F.; Pomerantsev, A.; Rodionova, O.; Roger, J.M.; Walczak, B.; Tauler, R. 2017, Anal. Bioanal. Chem., 409, 5891-5899.

[5] Sainz, V.; Peres, C.; Ciman, T.; Rodrigues, C.; Viana, A. S.; Afonso, C. A.; Barata T.; Brocchini, S.; Zloh, M.; Gaspar, R. S.; Florindo, H. F.; Lopes, J.A. 2016 RSC Adv., 6, 104502 - 104512.

Microparticulate drug delivery systems for the treatment of ophthalmic diseases affecting the optic nerve and the retina

Rocío HERRERO VANRELL

Innovación, Terapia y Desarrollo Farmacéutico en Oftalmología (Innoftal), Grupo de Investigación UCM 920415. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Email: rociohv@ucm.es

Pathologies involving the back of the eye are related to irreversible blindness. Most of them involve the retina and/or the optic nerve. This is the case of age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy (DR), glaucoma and retinal inherited diseases. Due to their chronicity effective treatment of vitreoretinal diseases require successive intraocular injections causing significant inconvenience to patients and adverse effects. The risk of suffering these side events increases with the number of injections.

Drug delivery systems which are able to provide therapeutic concentrations in the intraocular tissues remain one of the major challenges in the treatment of retinal pathologies. Microparticulate intraocular drug delivery devices are innovating therapeutic tools in the treatment of posterior segment diseases, as they are able to encapsulate and deliver active substances during long term periods of time [1,2]. According to their structure they are named microcapsules (reservoir) and microspheres (matrix). Injection of microparticles can be performed with small gauge needles (25-32G). Different amounts of particles can be administered allowing a personalized therapy to be provided. Biodegradable microparticles are preferred as they disappear from the site of injection. Among the biodegradable polymers to prepare microparticles the poly(lactide-co-glycolide) PLGA is the most employed.

Since several years ago, PLGA microspheres have become popular in intraocular drug delivery. To this, different active substances have been encapsulated in biodegradable microspheres to provide effective concentrations in the intraocular tissues. Also, simultaneous long term release of different drugs have been achieved with the use of multiloaded microspheres. The combination of different technological strategies will be useful to achieve a more adequate therapy.

Acknowledgements

MAT2013-43127-R and MAT2017-83858-C2-1 MINECO/AEI/FEDER, UE; Complutense University Research Group UCM-920415; Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RETICS (Oftared) RD16/0008 ISCIII-FEDER; Spanish Fund for Health Research PI17/00079.

References

[1] R. Herrero-Vanrell, I. Bravo-Osuna, V. Andres-Guerrero, M. Vicario-de-la-Torre, I.T. Molina-Martinez, The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies. Prog. Retin. Eye Res. 42 (2014) 27-43.

[2] I. Bravo-Osuna, V. Andrés-Guerrero, A. Arranz-Romera, S. Esteban-Pérez, I. T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell. Microspheres and intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina. Adv Drug Deliv Rev 126 (2018) 127-144.

Comunicaciones Orales

Métodos de aprendizaje automático y clasificación biofarmacéutica

Matías LLABRÉS MARTINEZ [(1)], Alexis OLIVA MARTÍN [(1)]

1. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultat de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38200 La Laguna, Tenerife.

Email de contacto: mllabres@ull.edu.es

1.- Introducción

Las clasificaciones biofarmacéutica (BCS) [1] y biofarmacéutica de disposición (BDDCS) [2] de un fármaco a partir de sus propiedades físico-químicas y descriptores moleculares, es un problema que por su complejidad no ha sido resuelto. Aparte de las causas debidas a la interacción entre las propiedades moleculares de los fármacos y los procesos de solubilización y permeación gastro-intestinal, el análisis de los datos, tanto experimentales como de los descriptores moleculares (parámetros *in-silico*) presenta serias dificultades debido al solapamiento de las distribuciones marginales de los parámetros [2] de las distintas clases.

Los métodos de aprendizaje automático supervisado (*supervised machine learning*) son de uso habitual en el I+D farmacéutico, pero su aplicación a la clasificación biofarmacéutica ha sido muy escasa. Khandelwal y cols. [4] aplicaron loa métodos partición recursiva, árboles aleatorios y máquinas de soporte vectorial en el análisis de BDDCS de los fármacos listados en la OMS. Los valores de exactitud obtenidos fueron insatisfactorios, a pesar del número de descriptores moleculares utilizados.

En esta comunicación se aborda el problema analizando independientemente la permeabilidad y la solubilidad, utilizando solamente aquellos descriptores moleculares que son valores calculados de propiedades físico-químicas de los fármacos.

2.- Base de datos y metodología

Se utiliza la base de datos publicada por Benet y cols. [2; *versión on-line*], que recoge más de 900 fármacos clasificados siguiendo el criterio BDDCS. De esta base se seleccionaron los fármacos administrados por vía oral y se eliminaron aquellos registros con datos incompletos. El número de fármacos analizados fueron 687 (275, 230, 139 y 43 para las clases I, II, III y IV respectivamente).

Para validar los resultados, los datos se dividieron aleatoriamente, estratificados por la clase biofarmacéutica, en dos grupos: datos de aprendizaje (2/3) y datos de evaluación (1/3).

2.1.- Descriptores moleculares

Sólo se utilizaron los descriptores moleculares incluidos en la base de datos: masa molecular (**MW.Drug**); logarítmos de los números de dosis basados en la solubilidad en agua (**AcLogDose**) y basado en la solubilidad mínima en el intervalo de pH 3,0-7,5 (**VcLogDose**); coeficiente de reparto octanol/agua calculado (**CLogP**); número de átomos aceptores de protones (**HBA**) y donante de protones (**HBD**); área polar de la molécula (**PSA**) y cociente entre la masa molecular y PSA (**PSAD**). En [2] se detallan los procedimientos utilizados.

2.2.- Métodos de aprendizaje supervisados

Se seleccionaron dos métodos entre los disponibles en ***R*** [4]: el método de partición recursiva implementado en la librería **rpart** [4], y la máquina de soporte vectorial implementado en la librería **kernlab** [5]

2.3.- Evaluación de los resultados

A partir de la matriz de confusión se calcularon: la exactitud (probabilidad de identificar correctamente un fármaco como de alta permeabilidad o alta solubilidad) y su intervalo de confianza; la exactitud que se obtendría aleatoriamente en ausencia de información; la probabilidad de que ambas medidas difiera; el coeficiente kappa y el valor de probabilidad de la prueba de Mcnemar (función **confussionMatrix** disponible en la librería **caret** [6])

3.- Resultados y discusión

La figura 1 muestra las distribuciones conjuntas de tres descriptores en función de la clase. Los dos gráficos de la izquierda muestran los datos de los fármacos "solubilidad alta", clase I (círculos) y clase III (triángulos); en los gráficos de la derecha se muestran los fármacos "solubilidad baja", clase II (círculos) y clase III (triángulos). Obsérvese: el grado de solapamiento es muy variable y dependiente de las distribuciones marginales; la notable correlación entre PSA y CLogP dentro de las clases I y III, y entre CLogP y VcLogDose dentro de las cuatro clases.

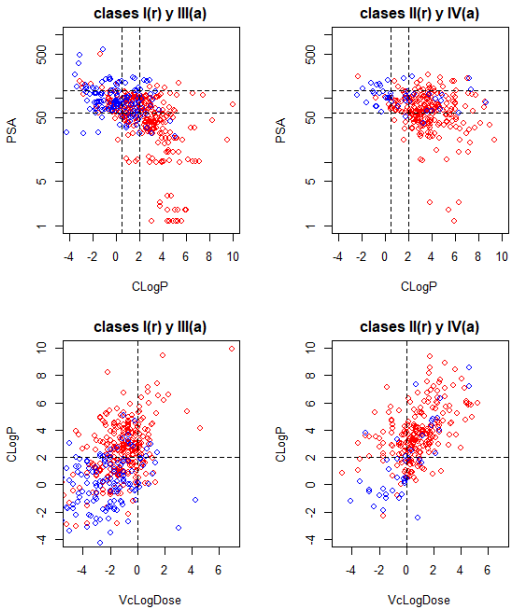


Fig. 1: Distribuciones conjuntas de PSA y CLogP y de CLogP y VcLogDose

Tabla 1. Estadísticos derivados de las matrices de confusión

Estadístico	permeabilidad		solubilidad	
	rpart	ksm	rpart	ksvm
Exactitud	0,811	0,837	0,771	0,771
kappa	0,488	0,516	0,504	-0,206
Ex. LCinf	0,753	0,782	0,711	0,427
Ex. LSup	0,859	0,883	0,824	0,560
Exactitud N	0,736	0,736	0,604	0,736
P exactitud	0,005	0,000	0,000	1,000
P Mcnemar	0.222	0,000	0,018	0,192

Los resultados se resumen en la tabla 1. Los criterios de decisión obtenidos por partición recursiva se muestran en la figura 2.

Obsérvese en la tabla 2 que los resultados obtenidos para la clasificación de fármacos según la permeabilidad con la máquina de soporte vectorial son mejores que los obtenidos con la partición recursiva (valor de P de la prueba de Mcnemar); ocurre lo contrario con la predicción de la solubilidad.
Los resultados obtenidos mejoran los publicados previamente [4], pero aún es necesario investigar otros descriptores moleculares sí como los criterios para la selección del kernel de la máquina de soporte vectorial.

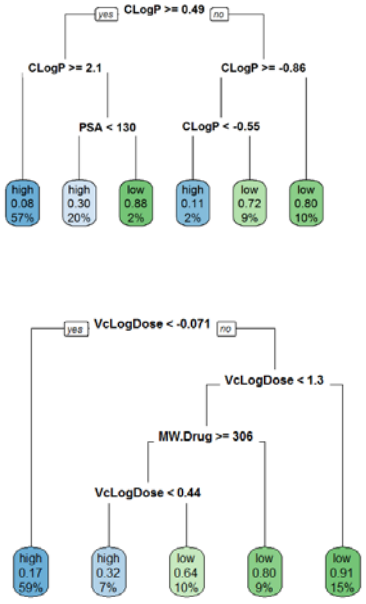


Fig. 2: Árboles de decisión para la permeabilidad y solubilidad.

5.- Referencias

[1] G. L. Amidon y cols. Pharm. Res. 12 (1995) 413
[2] C.-Y. Wu y L. Z. Benet. Pharm. Res. 22 (2005) 22
[3] L. Z. Benet, F. Brocatelli, T. I. Oprea, The AAPS Journal 13 (2011) 519.
[4] A. Khandelwal y cols. Pharm. Res. 24 (2007) 2249
[5] www.r-project.org
[6] T. Therneau y cols. (2018)
[7] A. Karatzoglou y cols. (2018)
[8] M. Khun y cols. (2018)

Development of *in vitro* dissolution tools predictive of the *in vivo* behaviour of pharmaceutical formulations: Candesartan *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC).

Andrés FIGUEROA-CAMPOS[(1,2)], Bárbara SÁNCHEZ-DENGRA[(1)], Virginia MERINO[(2)], Isabel GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(1)], Marta GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(1)], Marival BERMEJO[(1)]

1. Engineering: Pharmacokinetics and Pharmaceutical Technology Area. Miguel Hernandez University, San Juan de Alicante, Alicante, 03550, Spain.
2. Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Valencia University, Valencia, Valencia, 46100, Spain.

Email de contacto: barbarasanchezdengra@gmail.com

1.- Introduction

An *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) is a mathematical relationship which, after being validated, is able to relate an *in vitro* characteristic of a drug (e.g. dissolution), with a characteristic of its biological behaviour *in vivo* (e.g. absorption).

IVIVCs can be useful tools during products development in order to ensure the bioequivalence of new generic formulations or as a quality guarantee during the products fabrication process.

The objective of this work is to establish a level A IVIVC for three Candesartan oral immediate release formulations (Reference, A and B).

2.- Materials and methods

Plasma profiles of Candesartan for all the formulations were deconvoluted by Loo-Riegelman method to obtain the individual fractions absorbed (f_a). [1]

Fractions dissolved (f_{diss}) were obtained in several conditions in USP II and USP IV apparatus. The most biopredictive *in vitro* experiment was chosen by comparison of dissolution profiles with the f2 similarity factor. [2,3]

Levy plot was constructed to estimate the time scaling factor [4] and two two-steps IVIVCs were obtained.

On the other hand, the program Berkeley-Madonna was used for obtaining a one-step IVIVC.

Finally, the percentages of prediction error (%PEs) were calculated as a predictability measure for validating the correlations. [5]

3.- Results and discussion

In vivo biological behaviour of Candesartan can be described by means of a two-compartment model.

Dissolution profiles obtained in USP IV apparatus with media of pH 1.2, 4.5 and 6.8 modified with 0.2% Tween 20 were selected as biopredictive for preparing the IVIVCs.

Figure 1 shows the experimental and predicted plasma profiles for all the formulations by means of all three correlations (linear 2-step, polynomial 2-step and 1-step).

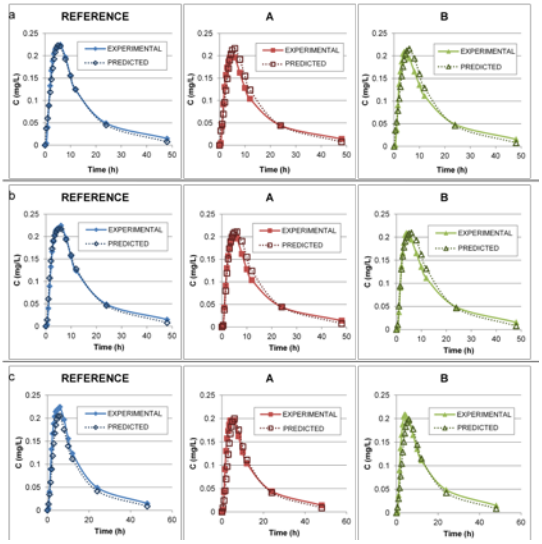


Fig.1. Experimental and predicted plasma profiles for all Candesartan formulations by means of all three IVIVCs (a: Linear two-step, b: polynomial two-step and c: one-step).

Table 1 shows the results of the internal validation. All three IVIVCs are valid because the %PEs are under the limits: the individual %PE of each formulation for each parameter does not exceed 15% and the mean %PE of all formulations for each parameter is less than 10%.

a	LINEAR TWO-STEP IVIVC					
Formulation	AUC 0→t			Cmax		
	EXP	PRED	%EP	EXP	PRED	%EP
REFERENCE	3.765	3.597	4.48	0.225	0.223	0.76
A	3.303	3.468	5.00	0.196	0.217	10.33
B	3.508	3.581	2.09	0.209	0.215	3.06
Total			3.86			4.71

b	POLYNOMIAL TWO-STEP IVIVC					
Formulation	AUC 0→t			Cmax		
	EXP	PRED	%EP	EXP	PRED	%EP
REFERENCE	3.765	3.671	2.52	0.225	0.218	3.07
A	3.303	3.505	6.12	0.196	0.211	7.56
B	3.508	3.650	4.03	0.209	0.210	0.30
Total			4.22			3.64

c	ONE-STEP IVIV					
Formulation	AUC 0→t			Cmax		
	EXP	PRED	%EP	EXP	PRED	%EP
REFERENCIA	3.765	3.236	14.07	0.225	0.205	8.81
A	3.303	3.138	5.00	0.196	0.200	1.84
B	3.508	3.226	8.04	0.209	0.198	5.05
Total			9.04			5.24

Table 1. Results of the internal validation of all three IVIVCs (a: Linear two-step, b: polynomial two-step and c: one-step)

4.- Conclusions

In this work, three level A IVIVCs have been obtained, whose percentages of prediction error are lower than the pre-established limits, so they are valid and biopredictive.

Because of that, all three could be used in the industry as substitutes of human bioequivalence studies, after their approval by the competent agencies (EMA or FDA).

The correlation considered more appropriate, at this moment, is the linear IVIVC obtained by the two-step method.

5.- Acknowledgements

SAF2016-78756(AEI/FEDER, EU)

FPU17/00530 - Bárbara Sánchez-Dengra

6.- References

[1] J Domenech Berrozpe, I Diez Martin, C Peraire Guitart, *Administración extravasal: aproximación compartimental*, En: Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética - Volumen I: LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalenica (J. Domenech Berrozpe, Ed.), Editorial Síntesis, Madrid (España), 2015, 297-366.

[2] European Medicines Agency. Guideline on the investigation of bioequivalence. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf

[3] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System - Guidance for Industry, https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf

[4] JM Cardot, BM Davit, AAPS Journal, 14(3),491-9, 2012.

[5] I González-García, V Mangas-Sanjuán, M Merino-Sanjuán, M Bermejo, *Correlaciones in vitro-in vivo: conceptos generales, metodologías y su aplicación en las guías regulatorias*, En: Metodologías biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos (I González-Álvarez, MA Cabrera-Perez, M Bermejo), Universidad Miguel Hernández, Elche (España), 2015, 181-203.

Zein nanoparticles with mucus-permeating properties as oral carriers for protein delivery

Cristian REBOREDO [(1)], Ana Luisa MARTÍNEZ-LÓPEZ [(1)], Carlos Javier GONZÁLEZ NAVARRO [(2)], Juan Manuel IRACHE [(1)]

1. Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain.
2. Centre for Nutrition Research, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain.

Email: creboredo@alumni.unav.es

1.- Introduction

Oral administration of therapeutic proteins and peptides has been a recurrent approach during the last decades. However, this route presents important drawbacks, including acidic pH conditions, enzymatic degradation and the presence of a mucus layer that covers the absorptive epithelium.

Nanoparticles have been proposed as oral carriers to promote the oral bioavailability of biomacromolecules due to their capability to protect the loaded compound against the harsh conditions of the gut [1]. However, when orally administered, an important fraction of the given dose of nanoparticles remain trapped in the mucus layer, far away from the absorptive membrane [2].

The use of nanoparticles with mucus-permeating properties may be an interesting approach to solve this problem. In this context, the aim of this work was to develop and evaluate zein-based nanocarriers for the oral delivery of biomacromolecules (using insulin as model) with mucus-permeating properties.

2.- Material and methods

2.1.- Nanoparticles formulation and characterization

For the preparation of nanoparticles, zein, lysine and insulin were first incubated in ethanol 60%. Then, nanoparticles were obtained by addition of water and coated with PEG 35.000 by incubation at room temperature. Finally, nanoparticles were purified and dried by spray-drying using mannitol as protectant. The particle size, polydispersity index (PDI) and zeta-potential were determined by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler anemometry, respectively. The surface hydrophobicity of the nanoparticles was evaluated by the Rose Bengal [3].

2.2.- Insulin payload and release kinetics in simulated fluids

Nanoparticles were first digested with ethanol 70% and insulin was quantified by Elisa. Release studies were performed under sink conditions by incubation in simulated gastric and intestinal fluids (SGF and SIF respectively). The amount of insulin released from nanoparticles was quantified by Elisa.

2.3.- Mucus diffusion studies

The diffusion of nanoparticles through pig intestinal mucus, as an in vitro measurement of their mucus-permeating properties, was assessed by the Multiple Particle Tracking (MPT) technique [4].

2.4.- *In vivo* efficacy of the nanoparticles in animal model of *C. elegans*

Efficacy studies were performed in *C. elegans*, quantifying the fatty tissue decrease in worms cultured in high glucose (0.5%) medium through a Nile Red staining technique [5].

3.- Results and discussion

Table 1 summarizes the physicochemical properties naked and PEG-coated nanoparticles. PEG-coated nanoparticles showed the same size than naked nanoparticles. The size of nanoparticles increased by encapsulation of insulin. In all cases, the insulin payload was about 90 µg/mg.

Figure 1 shows the influence of the PEG-to-zein ratio in the hydrophobicity and mucus diffusion properties of nanoparticles. Likely, the hydrophobicity of nanoparticles

decreased by increasing the PEG-to-zein ratio. In a similar way, a lower hydrophobicity produced a higher capability of nanoparticles to diffuse in pig intestinal mucus.

Table 1. Physicochemical properties of the formulations. P/Z ratio: PEG-to-zein ratio (in %); Size in nanometers; PDI: polydispersion index; insulin loading (IL; in µg/mg nanoparticles.

	P/Z ratio (%)	Size (nm)	PDI	IL (µg/mL)
NP	-	190	0.06	-
NP-PEG5	5	191	0.05	-
NP-PEG75	75	187	0.05	-
I-NP	-	202	0.13	87
I-NP-PEG5	5	210	0.08	89
I-NP-PEG75	75	232	0.09	89

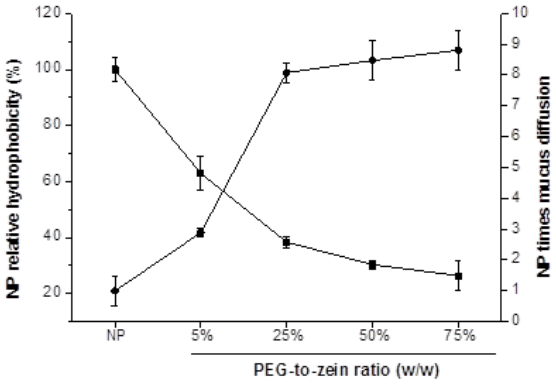


Figure 1. Influence of the PEG-to-zein ratio on the hydrophobicity and the mucus diffusion of the resulting nanoparticles. Data expressed as mean ± S.D. (n = 3).

Figure 2 shows the effect of insulin-loaded nanoparticles over the fat storage in *C. elegans*. Insulin induced by itself a decrease in the accumulation of fat by worms, when growth with a medium rich in glucose. However, this decrease increased significantly when the protein was administered after its encapsulation in naked zein nanoparticles ($p < 0.05$) or in PEG-coated nanoparticles ($p<0.01$). Likely, I-NP-PEG5 produced a similar effect to orlistat, employed as positive control.

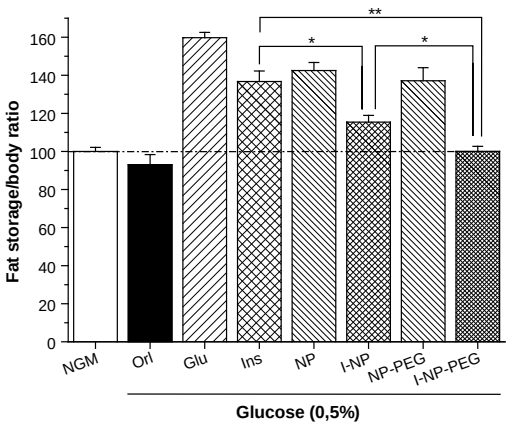


*Figure 2. Effect of nanoencapsulated insulin on fat storage by C. elegans (L4) under high glucose conditions (20 mM). Orl: orlistat; NP: empty nanoparticles; NP-PEG: empty nanoparticles coated with PEG at a P/Z ratio of 5%; I-NP: nanoparticles loaded with insulin; I-NP-PEG: nanoparticles loaded with insulin and coated with PEG at a P/Z ratio of 5%. Data expressed as the mean ± S.D. (n=3). *p<0.05; **p<0.01*

4.- Conclusions

The coating of zein nanoparticles with PEG 35000 yielded mucus-permeating nanocarriers, without affecting their capability to encapsulate insulin. When evaluated in a model of *C. elegans*, fasted with high levels of glucose, nanoencapsulated insulin decreased about 40% the levels of fat accumulation, compared with a solution of the protein.

5.- Acknowledgements

Cristian Reboredo acknowledges to the ADA-University of Navarra for a Ph.D. scholarship.

6.- References

[1] P. Mukhopadhyay, et al., *Prog. Polym. Sci.*, 37, 1457–1475 (2012).

[2] L. M. Ensign, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, no. 6, 557–570 (2012).

[3] S. Doktorovova *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 606–612 (2012).

[4] J. Grießinger *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 96, 464–476 (2015).

[5] D. Lucio *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 121, 104–112 (2017).

In vitro and *In vivo* evaluation of bio-inspired Protein-Metal nanosystems as oral delivery carrier

Matilde DURÁN-LOBATO [(1)], Juan CUNARRO [(1)], Sulay TOVAR [(1)], Carlos DIÉGUEZ [(1)], María J. ALONSO [(1,2,3)]

1. Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseased (CIMUS), Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain.
2. Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain.
3. IDIS Research Institute, School of Pharmacy, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain.

Contact e-mail: matilde.duran.lobato@usc.es

1.- Introduction

In spite of the high relevance of protein/peptide therapeutics in the current healthcare market scenario, the path from bench to beside still remains elusive for an oral peptide product [1]. This most preferred administration route is hampered by the restrictive GI barriers, the need of bio-safe ingredients and scalable technologies, and the associated cost/benefit ratio [2]. Aiming at confronting these challenges, we designed and evaluated protein-metal nanosystems (Me-NSs) inspired on physiological materials and produced with industry-transferable methodologies.

2.- Materials and Methods

Protein-metal nanosystems were produced by an aqueous-based precipitation technique, and the resulting formulation was characterized regarding its physicochemical properties by direct measurement of particle size distribution, PDI (DLS) and zeta potential (ZP) (LDA). The association efficiency (AE%) of the protein was analyzed by separating the nanosystems from its suspending medium by ultracentrifugation and analyzing both pellet and supernatant content by HPLC. The morphological evaluation of the formulation was carried out in a transmission electron microscope (TEM). The colloidal stability in Simulated Intestinal Fluid (SIF), protein release in SIF and protection against proteolysis were evaluated as described elsewhere [3, 4]. Finally, the *in vivo* evaluation of efficacy was performed by intrajejunal (i.j.) administrations of either formulation or a free protein solution (negative control) (n=8). A s.c. injection of the free protein was administered as positive control (n=3). The reference parameter was monitored for 8h. All the experiments were performed in triplicate and the results presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed with GraphPadPrism.

3.- Results and discussion

The obtained final nanosystems presented a nanometer size below 100 nm with neutral ZP, which falls within the desired range of nanocarrier properties expected to favor mucodiffusion and interaction with biological barriers in an oral drug delivery scenario. A remarkable association efficiency of around 100% with 10% final protein loading was obtained. TEM imaging (Fig. 1) interestingly revealed square-shaped nanoparticles of significantly lower size than measured by DLS.

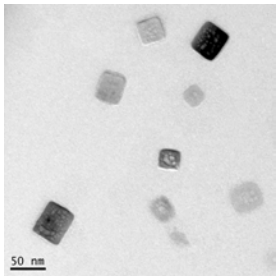


Fig. 1: TEM image of Me-NSs.

Further *in vitro* evaluation demonstrated the colloidal stability of the nanocarriers and a controlled protein release profile in SIF over 4h of study. These are both key properties to ensure a proper performance of an oral nanocarrier, expected to navigate through intestinal fluids and the mucus, reach the intestinal epithelium and finally release its protein cargo.

Additionally, the formulation was able to significantly protect the loaded protein against enzymatic degradation *vs.* a solution of free protein in pancreatin supplemented SIF, which would allow the formulation to maximize the amount of protein reaching its final target spot.

Finally, the *in vivo* efficacy evaluation (Fig. 2) led to a remarkable decrease of the reference parameter up to 80%, showing clear differences

vs. the negative control even at the end of the measurement period (8h).

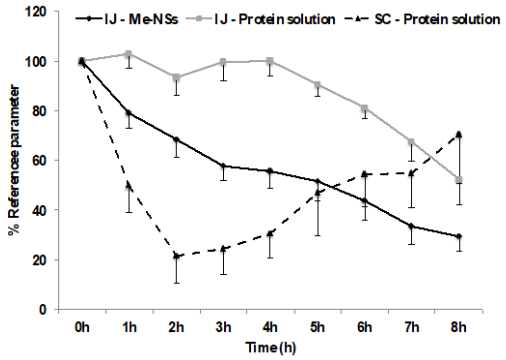


Fig. 2: In vivo evaluation of the effect of the formulation in rats.

4.- Conclusions

Overall, the results demonstrated the potential of Me-NSs as a bio-inspired and effective oral protein/peptide nanocarrier aiming at industrial translation.

5.- Acknowledgments

European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement nº NMP4-LA-2012-281035.

6.- References

[1] S. Mitragotri, P.A. Burke, R. Langer. Nat. Rev. Drug. Discov. 13(9), 655-72, 2014.

[2] D. Brayden, M.J. Alonso. Adv. Drug. Deliv. 106, 193-195, 2016.

[3] Z. Niu, E. Samaridou, E. Jaumain, et al. J. Control. Release, 276:125-139, 2018.

[4] L. Thwala, A. Beloqui, N. Csaba, et al. J. Control. Release, 243, 109-120, 2016.

Polyphosphazene interpolymer complexes with optimized intracellular trafficking properties for gene delivery

Wei-Hsin Hsu[1,2], Esther G. Traba[1], Delyan P. Ivanov[2], Noemi Csaba[1], Pilar Sanchez[3], Cameron Alexander[2], Marcos Garcia-Fuentes[1]

1. Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) and Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Universidade de Santiago de Compostela, Spain
2. School of Pharmacy, University of Nottingham, Nottingham, UK
3. Neurooncology Unit, Instituto de Salud Carlos III (UFIEC), Madrid, Spain

Email de contacto: marcos.garcia@usc.es

1.- Introduction

Polyphosphazenes are highly flexible materials of interest in drug delivery applications, but their typical nucleophilic modification reaction cannot be applied when introducing groups with more than one nucleophilic centre due to crosslinking reactions [1]. In this work we apply a thiol-ene click reaction scheme to synthesize a small library of ionizable, both cationic and anionic, polyphosphazenes for gene delivery applications.

2.- Materials Methods

2.1.- Polymer synthesis

A clickable precursor Poly(allylamino-phosphazene) was prepared by thermal ring-opening polymerization of hexachlorocyclophosphazene (Sigma, Spain) and nucleophilic substitution by allylamine. We prepared cationic and anionic polyphosphazenes via thiol-ene addition of α, γ-thiolated alkylamine and carboxylic acids, respectively. The obtained polymers were characterized by ^{1}H- and ^{13}P-NMR and size exclusion chromatography.

2.2.- Polyplex formation

Nanoparticles were formed by complexation of cationic polymers with a plasmid DNA (pDNA) coding for GFP and luciferase or with siRNA. Additionally, some formulations included a second anionic polyphosphazene. The polyplexes were characterized for size, zeta potential and morphology.

2.3.- Cell and spheroid cultures

Transfection and cytotoxicity was first screened in U87MG 2D-monolayers. Intracelluar trafficking was analyzed by using Cy3-labelled polymer and Cy5-labelled pDNA and confocal laser scanning microscopy. For additional physiological relevance, the formulations were tested 3D-spheroids of U87MG. Transfection efficiency and also any related toxicity were evaluated by spheroid size, resazurin and membrane-permeability assays using light sheet microscopy.

2.4.- Animal testing

All in vivo experiments were approved by the Research Ethics and Animal Welfare Committee at the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, (PROEX 224/14). The experiment comprised a subcutaneous xenograft model of glioblastoma in athymic nude Foxn1nu mice injected with U87MG cells in Matrigel (BD). The tumors were treated with 5 doses of themozolamide and siRNA polyplexes either with a therapeutic or a scrambled sequence. Tumor progression was evaluated for 25 days.

3.- Results and discussion

Various functional side-chains were successfully added on the polyphosphazenes via a thiol-ene click reaction. Based on this reaction, a small library of compounds was synthesized and screened for transfection

efficiency and toxicity. It was found that polyphosphazenes with primary amines (CA-PPZ) produced the most efficient polyplexes. Besides, significant improvements in efficacy/toxicity ratios could be achieved by adding a specific second anionic polyphosphazene (6MHA-PPZ) to these polyplexes. Based on data, we wanted to understand why this anionic compound was improving nanocarrier performance.

Studies based on photon correlation spectroscopy and nanoparticle tracking analysis confirmed that addition of 6MHA-PPZ increased significantly the scattering signal, but neither particle size nor particle concentration was significantly changed. Based on these results we hypothesized that 6MHA-PPZ induces a more compact structure of the polyplex. This hypothesis has been confirmed by FRET studies performed with Cy3-CA-PPZ and Cy5-pDNA.

Intracellular trafficking studies performed in 2D U87MG also indicated a clear reduction in the co-localization of the polyplexes with the endosomal compartment in the presence of 6MHA-PPZ (Manders' overlap coefficient reduced from 0.53 to 0.28; $p<0.05$). Based on this result, we considered that 6MHA-PPZ might produce a pH-dependent destabilization of the endosomal compartment. This hypothesis was confirmed when we performed hemolysis studies at pH 5.5 and 7.4. Complexes having 6MHA-PPZ show negligible hemolytic character at the later pH but had hemolytic properties similar to polylysine at pH 5.5. This pH-dependent hemolysis seems to be related to the physicochemical properties of the polymer. Indeed, 6MHA-PPZ has the highest change in ionization degree across the endosomal pH range (6-7.4).

Finally, we wanted to investigate whether 6MHA-PPZ might aid in releasing the genetic cargo intracelularly. Confocal laser scanning microspy studies using Cy3-CA-PPZ and Cy5-pDNA showed that the co-localization of pDNA and CA-PPZ was significantly higher in the absence of 6MHA-PPZ, indicating a possible role in pDNA release in the cell. In vitro studies based on gel electrophoresis displacement assays confirmed that pDNA is bound less strongly in the formulations with 6MHA-PPZ since it can be released by a polyelectrolyte competitor (heparin) at lower ratios.

All these favorable properties result in optimized polyplexes with improved transfection efficacies in more complex models such as 3D tumor spheres and capable of inducing significant therapeutic effects in xenograft glioblastoma models.

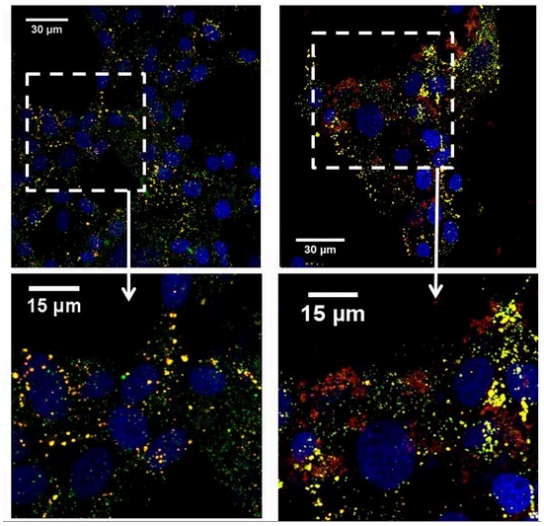


Fig. 1: Intracellular distribution of Cy3-CA-PPZ (green) and Cy5-pDNA (red) after 48 h upon delivery of CA-PPZ:pDNA (left) or CA-PPZ/6MHA-PPZ:pDNA complexes (right).

4.- Conclusions

Herein we describe a new synthetic polymer 6MHA-PPZ with properties that improve intracellular trafficking. Interpolymer polyplexes of cationic polyphosphazenes and 6MHA-PPZ show great therapeutic perspectives as highly efficient gene nanocarriers.

5.- Acknowledgements

We thank EC-Erasmus Mundus for a grant to WHH. This work was funded by Fundación BBVA 2014-PO0110 MINECO-RETOS and MAT2017-84361-R).

6.- References

[1] Harry R. Allcock Science, 193, 1214-1219, 1976.

Cardiac repair after transplantation of cardiomyocytes combined with microparticles in a mouse myocardial infarction model

Laura SALUDAS [1,2], Elisa GARBAYO [1,2], Manuel MAZO [2,3], Gloria ABIZANDA [2,3], Beatriz PELACHO [2,3], Felipe PRÓSPER [2,3], María J. BLANCO-PRIETO [1,2]

1. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Navarra, Pamplona, Spain
2. Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain
3. Hematology, Cardiology and Cell Therapy, Clínica Universidad de Navarra and Foundation for Applied Medical Research, Pamplona, Spain

Email de contacto: lsaludas@alumni.unav.es

1.- Introduction

Cell therapy has already shown a great potential to repair the heart after a myocardial infarction (MI) [1]. Cells exerts a therapeutic effect mainly through the secretion of a wide variety of molecules, known as the paracrine effect [2]. However, transplanted cells experience a poor survival and engraftment in the ischemic tissue, which severely limits their therapeutic potential [3,4]. In this work, we propose the combination of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (CM-iPS) with microparticles (MPs) to develop an effective strategy for cardiac repair after a MI.

2.- Methods

MPs were prepared by the multiple emulsion solvent evaporation method using Total Recirculation One Machine System (TROMS) and characterized. MPs were functionalized by coating with different biomimetic molecules. Zeta potential was measured to confirm that particles were successfully coated. Next, CM-iPS were adhered to the surface of MPs. Particles with the most favourable coating for cell adhesion were selected for further studies. *In vitro* survival of cells alone and adhered to MPs was compared by Live/Dead and Alamar Blue assays at 1 and 4 days. Finally, complexes (150,000 CM-iPS and 0.150 mg of MPs) were injected in a mouse MI model to evaluate their reparative potential. Cardiac remodelling was assessed at 2 days and 2 months post-treatment. The survival in the ischemic tissue, electrical coupling and cardiac phenotype of CM-iPS was evaluated after 1 week and 2 months by immunofluorescence.

3.- Results and Discussion

3.1.- *In vitro* studies

3.1.1.- MPs preparation, characterization and functionalization

MPs showed uniform sizes with a mean particle size of 10 µm and a zeta potential of -20 mV. The functionalization of MPs with collagen type I (30 µg/ml) and poly-D-lysine (100 µg/ml) increased zeta potential to +23 mV and was selected as the most favourable coating for the adhesion of CM-iPS.

3.1.2.- In vitro cell survival

In vitro cell survival revealed an increased survival of cells when adhered to MPs compared to cells alone at both 1d and 4d.

3.2.- *In vivo* studies

3.2.1.- Cell fate

One week after administration in a mouse MI model, cells could be detected in the infarct and peri-infarct area. Indeed, when cell survival was analysed after 2 months, some cells could still be detected (<1%) (FIG.1). In a previous study, cells could not be any longer detected in the heart after 1 month when administered alone [5], which reveals the potential of MPs to enhance the survival

and engraftment of cells. Electrical coupling and cardiac phenotype of transplanted cells is currently being investigated.

3.2.2.- Cardiac remodelling

The administration of cells combined with MPs significantly increased left ventricle wall thickness compared to MPs alone after 2 months. In consonance, a tendency towards a reduced infarct size was observed in the CM-iPS+MPs group.

4.- Conclusions

MPs are effective scaffolds to enhance cell survival and engraftment. The transplantation of CM-iPS adhered to MPs prevented left ventricle negative remodelling in a mouse MI model. This strategy could represent a promising approach for cardiac regenerative applications.

5.- Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2013-42528-R, SAF2017-83734-R) and the "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra".

6.- References

[1] C.L. Hastings, E.T. Roche, E. Ruiz-Hernandez, K. Schenke-Layland, C.J. Walsh et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 84, 85-106, 2015.

[2] L. Saludas, S. Pascual-Gil, F. Prósper, E. Garbayo, M.J. Blanco-Prieto, Int. J. Pharm., 523, 454-475, 2017.

[3] M. Yanamandala, W. Zhu, D.J. Garry, T.J. Kamp, J.M. Hare et al., J Am Coll Cardiol 2017, 70, 766-775.

[4] H.K. Awada, M.P. Hwang, Y. Wang, Biomaterials, 82, 94-112, 2016.

[5] O Iglesias-García, S. Baumgartner, L. Macrí-Pellizzeri, J.R. Rodríguez-Madoz, G. Abizanda et al., Stem Cells Dev., 24, 484-496, 2015.

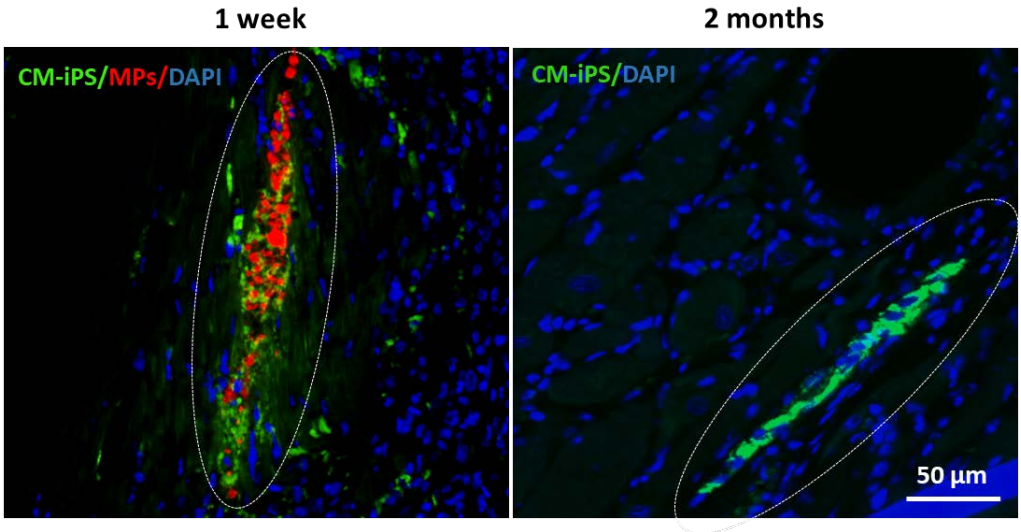


Fig. 1: In vivo cell fate. Representative images of CM-iPS survival in the infarct and peri-infarct area at 1 week and 2 months post-administration.

Rifabutin formulations with improved therapeutic effect in murine tuberculosis model of infection: influence of the administration route

M. Manuela GASPAR [(1)], Ana ALVES [(2)], Jacinta O. PINHO [(1)], Magda FERREIRA [(1)], António ALMEIDA [(1)], Ana GRENHA [(2,3)]

1. Departamento Farmácia Galénica Tecnologia Farmacêutica, Research Institute for Medicines iMed.ULisboa, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Portugal
2. Centro de Investigação em Biomedicina, University of Algarve, Faro, Portugal
3. Centro de Ciências do Mar, Faculty of Sciences and Technology, University of Algarve, Faro, Portugal

Email de contacto: mgaspar@ff.ulisboa.pt

1.- Introduction

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death among infectious diseases worldwide. Although the development of new antimycobacterial drugs is an obvious and necessary strategy to fight TB, the therapeutic improvement of already approved drugs constitutes an alternative approach. In the present work, rifabutin (RFB), a first-line drug against TB, was chosen aiming at reaching maximized concentrations at infected sites, while reducing associated toxic effects and treatment duration. For this purpose, two different delivery systems and routes of administration were tested: liposomes, the most successful lipid system with many liposomal formulations already on the market with proven safety and efficacy, for parenteral route; and spray-dried microparticles based on the polysaccharide locust bean gum (LBG), for pulmonary delivery. Both RFB-loaded formulations were tested in a murine mycobacterium tuberculosis model of infection. Their antimycobacterial effect was compared to free RFB delivered intravenously and to a combination of RFB and isoniazid (INH), the latter being another first-line anti TB drug, administered by the oral route.

2.- Materials and Methods

2.1.- Animals

BALB/c mice (6–8 weeks old) were obtained from Charles River (Barcelona, Spain). All animal experiments were carried out with the permission of the local ethical committees of the Faculty of Pharmacy and of the Institute of Molecular Medicine in accordance with the EU Directive (2010/63/UE) and Portuguese laws (DR 113/2013, 2880/2015 and 260/2016).

2.2.- Materials

Lipids for liposome preparation were obtained from Avanti Polar Lipids (USA), LBG for microparticle preparation was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). RFB was acquired from CHEMOS GmbH (Germany). Middlebrook 7H9 broth and 7H11 agar, BACTO Middlebrook and albumin-dextrose-catalase enrichments were obtained from Difco Laboratories (Detroit, Mi, USA.). All other reagents were of analytical grade.

2.3.- Methods

RFB liposomes were prepared by an active loading technique using an ammonium sulphate gradient [1]. LBG microparticles loaded with INH and RFB (LBG/INH/RFB = 10/1/0.5, w/w) were prepared by spray-drying, according to a previously reported protocol [2]. For *in vivo* studies, the *M. tuberculosis* strain H37Rv was used. Quantification of inoculum was prepared as described previously [1].

2.4.- Infection of animals

Each mouse was infected by i.v. injection with 5×104 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv. Treatment started 2 weeks after the infection and mice received the formulations under study for two weeks. RFB in the free form (F3) or incorporated in liposomes (F4) was administered in the lateral tail vein of mice at dose of 20 mg/kg of body weight. Dry powder microparticles loaded with RFB and INH were administered by inhalation using a simple apparatus. Forty mg of dry powder was put in the device and each mouse received the formulation by inhalation during 2 min, five times per week (F5). INH and RFB were also administered orally at a dose of 10 mg/kg of body weight for each antibiotic (F2). Three days after the last treatment mice were

sacrificed, spleens, livers and lungs were removed, homogenized, serially diluted and plated on Middlebrook 7H11 agar medium for CFU counting. One group of mice infected and non-treated was sacrificed at the beginning of treatment and another one at the end of treatment. CFU counts in liver, spleen and lung of all infected and non-treated animals were analyzed. From CFU counts, the growth index was calculated using the difference between the log10 CFU at the end of treatment and the log10 CFU at the beginning of treatment [3].

3.- Results and Discussion

Table 1 shows the physicochemical properties of RFB liposomes in terms of loading capacity, encapsulation efficiency (EE), mean size (Ø), polydispersity index (PI) and zeta potential (ζ).

Table 1. Characterization of RFB liposomes prepared with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoyl (7:3).

(RFB/Lip)f (nmol/µmol)	EE (%)	Ø (µm) (PI)	ζ (mV)
46 ± 6	72 ± 5	0.10 (<0.15)	-33 ± 1

RFB liposomes presented an EE higher than 72%, were negatively charged and had mean size of 0.1 µm, with a polydispersity index below 0.15, demonstrating the high homogeneity of liposomal suspension.
Table 2 displays the properties of spray-dried LBG/INH/RFB microparticles, in particular the fine particle fraction (FPF), association efficiency and loading capacity.

Table 2. Characterization of spray-dried LBG/INH/RFB microparticles.

FPF (%)	Association efficiency (%)	Loading Capacity (%)
INH: 38 ± 2 RFB: 38 ± 2	INH: 94 ± 3 RFB: 102 ± 1	INH: 8.2 ± 0.3 RFB: 4.4 ± 0.1

The association efficiency was above 94% for both antibiotics, resulting in loading capacities of 8.2% and 4.4% for INH and RFB, respectively. MMAD was around 6 µm probably due to incomplete disaggregation of microparticle aggregates during aerosolization. Nevertheless, the FPF of 38% was determined, indicating the ability of this fraction (< 5 µm) of microparticles to reach the respiratory zone of the lung.

In Fig. 1 is shown the antimycobacterial effect of different formulations under study in terms of Growth Index. According to the obtained results, the i.v. administration of RFB in liposomes (F4) displayed the highest antimycobacterial effect. Nevertheless, the pulmonary administration of LBG/INH/RFB microparticles (F5) displayed higher therapeutic effect than the oral co-administration of RFB and INH, particularly in the lungs: -0.15 (F5) and 0.28 (F2), respectively. The pulmonary route, although reducing the bacterial infection in a lower extent than i.v. administration of RFB liposomes, constituted also a valuable approach to fight TB when compared to infected mice receiving RFB in the free form by the oral route.

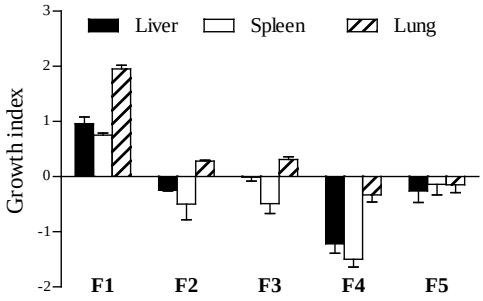


Fig. 1. *Influence of rifabutin formulation on growth index in liver, spleen and lungs of BALB/c mice infected with M. tuberculosis. Formulations under study: F1 - control group (infected and non-treated); F2 - mice receiving RFB/INH by the oral route; F3 - mice receiving RFB by i.v. route; F4 - mice receiving RFB liposomes; F5 - mice receiving inhalation of LBG/INH/RFB microparticles.*

4.- Conclusions

A therapeutic improvement of RFB, either incorporated in liposomes or in spray-dried microparticles, in combination with another antibiotic, over the oral anti-biotherapy in clinic use for the treatment of tuberculosis. Moreover, macroscopically, for all treated mice no statistically significant differences in terms of tissue indexes were observed.

5.- Acknowledgments

Fundação para a Ciência e Tecnologia through projects: PTDC/DTP-FTO/0094/2012, UID/BIM/04773/2013, UID/Multi/04326/2013.

6.- References

[1] M.M. Gaspar, *et al*., Int. J. Antimicrobial Agents, 31:37-45, 2008.
[2] S. Rodrigues, *et al*., Int. J. Pharm., 529(1-2):433-441, 2017.
[3] M.M. Gaspar, *et al*., Nanomedicine: NBM, 11(7):1851-1860, 2015.

From the printer to the lungs: Inkjet-printed aerogel microspheres for pulmonary delivery of salbutamol sulfate

Clara LÓPEZ-IGLESIAS [(1)], Ángel CONCHEIRO [(1)], Ayça ALTAY [(2)], Ruggero BETTINI [(2)], Carmen ÁLVAREZ-LORENZO [(1)], Carlos A. GARCÍA-GONZÁLEZ [(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Grupo I+D Farma (GI-1645), Facultad de Farmacia and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain
2. Food and Drug Department, University of Parma, Parco Area delle Scienze 27/A, 43124 Parma, Italy

Email de contacto: carlos.garcia@usc.es

1.- Introduction

Inkjet printing is as an emerging technique in the biomedical field offering cost-effective solutions for flexible production and the design of personalized medicine solutions. In particular, novel formulations in the form of porous particles are sought for the treatment of respiratory disorders using the pulmonary route. For these purposes, large porous particles with aerodynamic diameters targeting 1-5 µm for penetration to the deep lung, but with geometric diameters greater than 5 µm are ambitioned to reduce the tendency for particle aggregation [1].

Aerogel particles, i.e. highly porous and light-weight nanoporous powders, in the form of microspheres are particularly promising as carriers for the pulmonary route. However, no aerogel microspheres with a relevant particle size for pulmonary administration have been reported so far [2].

In this work, a protocol for the preparation of aerogel microspheres by thermal inkjet printing followed by supercritical drying is presented [3]. Alginate aerogel particles were loaded with salbutamol sulphate, a bronchodilator used for the treatment of asthma attacks and chronic obstructive pulmonary disease, as a model drug for sustained pulmonary delivery.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

Alginic acid sodium salt (brown algae, MW 403 kDa, Sigma Aldrich); salbutamol sulfate (SS, Fagron); calcium chloride ($CaCl_2$, Merck); ethanol (Merck); CO_2 (Praxair); phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4.

2.2.- Inkjet printing of aerogel microspheres

Aqueous alginate solutions (0.35 % (w/w), 2.5 mL) were loaded in the cartridge of a modified thermal inkjet printer (HP Deskjet 340). Alginate solution picodroplets were ejected from the cartridges and put in contact with a gelation bath ($CaCl_2$ 0.5 M, 25 mL) containing salbutamol sulfate (0.35% (w/w)).

The obtained gel particles underwent a water-to-ethanol solvent exchange. Then, aerogels were obtained by extraction of the gel solvent with a continuous flow (5 g/min, 3.5 h) of supercritical CO_2 (40 ºC, 120 bar).

2.2.- Characterization

The morphology and texture of the aerogels were studied by Scanning Electron Microscopy (SEM) and low-temperature N_2 adsorption-desorption analysis, respectively. Particle size distribution was calculated by particle counting from the SEM pictures.

For the release tests, 6 mL-diffusion Franz cells were used. Aerogels were evenly distributed on top of a cellulose membrane (0.45 µm pore size) in the donor compartment. The receptor chamber was filled with PBS medium at pH 7.4 at 37ºC and stirred at 100 rpm. SS concentrations in the aliquots were determined by UV/Vis.

In vitro aerodynamic assessment of the aerogel particles was performed using a next generation impactor (NGI) and a single-dose dry powder inhaler as device. The median mass aerodynamic diameter (MMAD) was determined by weighing each stage of the NGI. The SS content at each stage was determined using an HPLC protocol.

3.- Results and Discussion

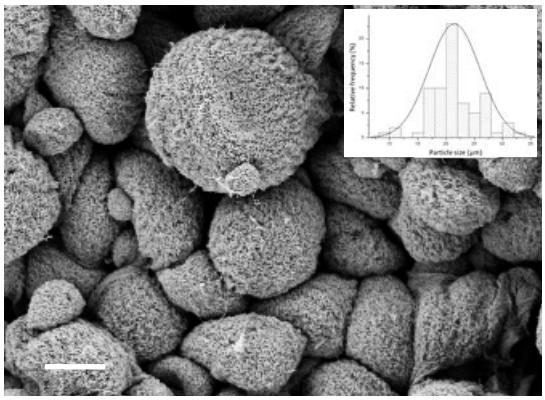


Fig. 1: Morphology of SS-loaded alginate aerogel microspheres obtained by inkjet printing. Scale bar: 10 µm. Inset: Particle size distribution of the aerogels.

SS-loaded aerogel microspheres were in the form of free-flowing powder with a bulk density of 0.01 g/cm^3. Aerogel microspheres had homogeneous particle sizes (Fig. 1) with diameters of 23.8±4.5 µm (inset). The overall porosity of the particles was of 97.7% and the MMAD of 4.0±1.5 µm according to the impactor tests. The particle homogeneity and the aerodynamic diameters of aerogels fall in the target specifications for effective pulmonary deposition.

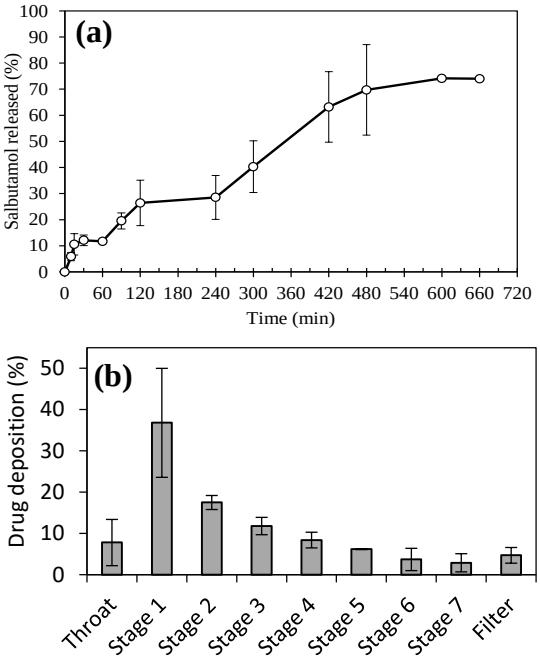


Fig. 2: Evaluation of aerogel performance for pulmonary delivery: (a) In vitro release profile of SS from aerogels (PBS pH 7.4, 37ºC) and (b) drug deposition profile by NGI.

SS content in the alginate aerogel microspheres was of 3% (w/w), a value compatible with the normal salbutamol doses used in dry powder inhalers (50-100 µg per doses). SS release profile showed a modified release profile (Fig. 2). After an initial burst of 10% of the payload during the first hour, a sustained release of the remaining drug took place during 10 hours. Drug deposition profile (Fig. 2b) of the aerogels showed that more than 50% of the SS was deposited at stages with a particle size cut-off below 5 µm (stage 2 and higher). This performance of the drug formulation is of interest for the treatment of pulmonary diseases, e.g., to fit the patient rhythm in nighttime asthma treatments.

4.- Conclusions

Thermal inkjet printing prompted the engineering of reproducible and highly porous alginate-based microspheres of potential use as carriers in pulmonary delivery. The processing technique was compatible with the incorporation of salbutamol sulphate in the aerogel carrier for ulterior sustained release. The material obtained by this innovative processing technique can be relevant for the treatment of several pulmonary diseases like asthma, chronic obstructive pulmonary disease or cystic fibrosis.

5.- Acknowledgements

Work supported by Xunta de Galicia [ED431F 2016/010 & ED431C 2016/008], MINECO [SAF2017-83118-R], AEI, and FEDER. C.A. García-González acknowledges to MINECO for a Ramón y Cajal Fellowship [RYC2014-15239].

6.- References

[1] A.M. Healy, M.I. Amaro, K.J. Paluch, L. Tajber, Adv. Drug Del. Rev. 75, 32-52, 2014.

[2] C.A García-González, M. Alnaief, E. Smirnova, Carbohydr. Polym., 86, 1425-1438, 2011.

[3] C. López-Iglesias, A.M. Casielles, A. Altay, R. Bettini, C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García González, Chem. Eng. J., In press.

Co-delivery of neuroprotectants from a microparticulate drug delivery system. Potential combination therapy in glaucoma.

David GARCIA-HERRANZ[(1),] Alicia ARRANZ-ROMERA[(1,3)], Benjamin M DAVIS[(2,4)], Li GUO[(2)], Irene T. MOLINA-MARTÍNEZ [(1,3)], Irene BRAVO-OSUNA[(1,3)], M. Francesca CORDEIRO[(2,4)], Rocio HERRERO-VANRELL [(1,3)]

1. Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology, InnOftal (UCM920415), Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain.
2. Glaucoma and Retinal Neurodegeneration Rearch, UCL Institute of Ophthalmology, London EC1V 9EL, United Kingdom.
3. Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria en Enfermedades Oculares Oftared Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC).
4. Western Eye Hospital, Imperial College London, United Kingdom

Contact e-mail: davgar07@ucm.es

1.- Introduction

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disorder and one of the leading causes of irreversible blindness globally and for which intraocular pressure is the only modifiable risk factor [1]. Although neuroprotective active substances have been suggested to have therapeutic potential, drug delivery for the treatment of glaucoma remains an unmet clinical need. The aim of the present work was to develop a multi-loaded PLGA-microspheres (MSs) incorporating three recognised neuroprotective agents (dexamethasone (DX), melatonin (MEL) and coenzyme Q10 (CoQ10)) in a single formulation (DMQ-MSs). Moreover, we evaluated the effect of a single intraocular administration of this multi-loaded intraocular drug delivery system (IODDS) on RGCs (retinal ganglion cells) survival using a well-established rodent model of ocular hypertension.

2.- Materials and Methods

2.1.- Physicochemical characterization

MSs were characterised in terms of production yield (%), mean particle size and size distribution, morphological evaluation, encapsulation efficiency and *in vitro* release studies.

2.2.- *In vivo* study

All procedures described were performed in agreement with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and under protocols approved by the U.K. Home Office. IOP elevation was performed in the left eyes of twenty-five Dark Agouti rats by episcleral injection of hypersaline solution as previously described (Morrison's ocular hypertension model) [2]. Animals were randomized into 4 treatment groups (n = 5 each). Intravitreal injections of microspheres (DMQ-MSs and Empty-MSs) were administered before IOP elevation surgery in left eyes of 10 rats (Table 1), with no treatment given to 5 OHT-only and 5 bilaterally naïve animals.

Table 1: Suspension of administered MSs

	DMQ-loaded MSs
AMOUNT OF MSs (mg)	0.1
DOSES (µg drug)	DX / MEL /CoQ10 11.5 / 4.6 / 3.6
VOL. INYECTED (µL)	4
MSs suspension (w/v) %	2.5

After animals were sacrificed (23 days post-surgery), eyes were enucleated and dissected retinal whole mounts were

stained for the RGCs specific nuclear-localised transcription factor Brn3a as previously described [3]. Automated quantification of Brn3a labelled RGCs was completed according to an algorithm [4].

2.- Results and Discussion

MSs microencapsulation technique led to a high production yield (> 72% in all cases) with mean particles size of 29.04±1.89 μm for the multi-loaded MSs and 24.72±0.79 μm for the empty-MSs. Morphological investigation confirmed the presence of spherical particles. Table 2 summarizes the encapsulation efficiency data.

Table 2: Encapsulation efficiency data (mean ± SD)

FORMULATION	ENCAPSULATION EFFICIENCY					
	μg DX/mg MSs	μg MEL/mg MSs	μg Q10/mg MSs	EE DX (%)	EE MEL (%)	EE CoQ10 (%)
Empty-MSs	-	-	-	-	-	-
DMQ-MSs	115.86±0.62	45.80±1.86	35.71±1.53	78.20±0.42	61.83±2.51	96.42±4.12

The active agents were released *in vitro* in a controlled fashion up to 30 days. Intravitreal administration of DMQ-MSs was found to significantly ($p = 0.0155$) promote RGCs survival. Moreover, RGCs density of animals treated with the DMQ-MSs was similar to naïve retinas suggesting this formulation has a significant neuroprotective activity in this model.

3.- Conclusions

This study presents a novel, effective and well-tolerated IODDS comprising PLGA polymeric microparticles for the simultaneous co-delivery of three neuroprotectants. *In vivo* efficacy studies revealed that the multi-loaded MSs protected the RGCs from death. These findings indicate that combination therapy using this novel formulation may be a promising neuroprotective strategy for the treatment of multifactorial retinal diseases such as glaucoma.

4.- Acknowledgments

This work was supported by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MAT2013-43127-R and MAT2017-83858-C2-1-R), ISCIII-FEDER "Una manera de hacer Europa" RETICS: RD16/0008, and UCM Research Group 920415. First author DGH thanks UCM for the fellowship granted (CT17/17-CT17/18). Author AAR thanks MINECO for the fellowship granted (BES-2014-070041) and for the mobility grant (EEBB-17-12525). Authors are grateful to the technical SEM and TEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

5.- References

[1] S.R. Flaxman, R.R.A. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M.V. Cicinelli, A. Das, J.B. Jonas, J. Keeffe, J.H. Kempen, J. Leasher, H. Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, A. Silvester, G.A. Stevens, N. Tahhan, T.Y. Wong, H.R. Taylor, S. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease, Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis, Lancet Glob Health, 5 (2017) e1221-e1234.

[2] J.C. Morrison, C.G. Moore, L.M. Deppmeier, B.G. Gold, C.K. Meshul, E.C. Johnson, A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage, Exp Eye Res, 64 (1997) 85-96.

[3] F.M. Nadal-Nicolas, M. Jimenez-Lopez, M. Salinas-Navarro, P. Sobrado-Calvo, J.J. Alburquerque-Bejar, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso, Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats, PLoS One, 7 (2012) e49830.

[4] B.M. Davis, L. Guo, J. Brenton, L. Langley, E.M. Normando, M.F. Cordeiro, Automatic quantitative analysis of experimental primary and secondary retinal neurodegeneration: implications for optic neuropathies, Cell Death Discov, 2 (2016) 16031.

IN VITRO DRUG PERMEATION STUDY FROM DILUTED, CONCENTRATED AND HIGHLY CONCENTRATED EMULSIONS BASED ON CUBIC LIQUID CRYSTALS FOR TOPICAL APPLICATION

Eva María ARIAS [(1)], Pere GUIRÓ [(2)], Carlos RODRIGUEZ[(3,4)], Conxita SOLANS[(3,4)], Elvira ESCRIBANO-FERRER[(1)], María José GARCÍA-CELMA[(1,4)].

1. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physicochemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences. University of Barcelona, Joan XXIII, 08028, Barcelona, Spain.
2. Almirall SA, Carrer de Laureà Miró, 390, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Barcelona.
3. Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain.
4. Center for Biomedical Research Network in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain.

Email de contacto: mjgarcia@ub.edu

1.- Introduction

Highly concentrated emulsions constitute an interesting class of emulsions because of the large internal phase volume fraction, higher than 0.74, value corresponding to the highest packing density of monodisperse spherical droplets [1]. Due to their high internal phase ratio, the droplets are polydisperse and show strongly deformed polyhedral foam-like microscopic appearance. Other terms for such systems are “high-internal-phase ratio emulsions” or HIPRE, and gel-emulsions since they can exhibit viscoelastic and plastic properties characteristic of physical gels and high viscosity as a result of the abrupt increase in adhesive forces acting between liquid droplets.

The continuous phase of HIPREs surrounding the droplets can be constituted by liquid crystalline nanostructures and they have been proposed as controlled drug delivery systems [2].

The aim of this research was to formulate emulsions with different oil content and constant non-ionic surfactant/water weight ratio as well as determine the presence of cubic liquid crystalline structures in the emulsions and their influence on skin permeation.

2.- Materials and methods

2.1.- Materials

Cremophor RH40 (Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil) from BASF was used as surfactant. Miglyol 812® from Fagron Ibérica S.A.V. was used as oil component. Water was deionized by MilliQ® filtration. Diclofenac sodium (DS) was purchased from Aarti. Phosphate buffer solution pH 7.4 (PBS) was used as receptor solution in the release and permeation studies. The hydrophilic membrane used in the release studies was Cellu SepT3® (MWCO 12000-14000 Da), from Orange Scientific. The lipophilic membrane used in release studies was Strat-M, from Millipore. Dermatomed human skin (0.4 mm), from Biopredict International was used in permeation studies.

2.2.- Methods

- Emulsions were prepared by stepwise addition of oil to mixtures of surfactant and water under continuous stirring at 25^{0}C and characterized by visual appearance, optical microscopy and rheology.

- Liquid crystalline structures were characterized by Small-Angle X-Ray scattering (SAXS).

- Quantification of DS was carried out by HPLC (Shimadzu equipment, Nexera X2).

- DS release and skin permeation (n=3) was studied with Franz diffusion cells [3] (Microette Plus, Hanson Research, USA) 32^{0}C, 600 rpm, PBS pH 7.4 was the receptor solution. Cellulose membrane and Strat-M and human skin were used.

3.- Results and Discussion

3.1.- Emulsions preparation and characterization

The phase diagram of the water/Cremophor RH40/Miglyol 812 system was studied and a diluted emulsion (10 wt% of oil), a concentrated emulsion (40 wt% of oil) and a HIPRE (85 wt% of oil) with the same surfactant/water ratio (Rsw) of 40:60 were selected. The appearance and rheometry results suggested the presence of mesophases.

3.2.- Liquid crystal characterization

Cubic liquid crystalline structures in emulsions were identified by Small-Angle X-Ray scattering (SAXS) as shown in Figura 1.

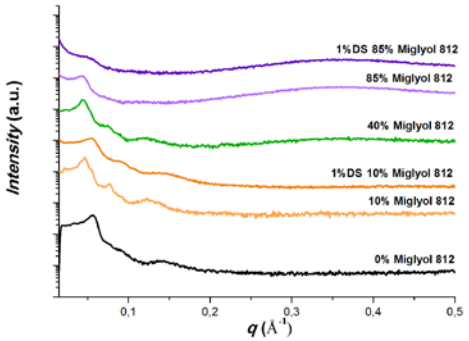


Fig. 1: SAXS scattering patterns (25 ºC) of samples with Rsw=40:60.

3.3.- Drug release studies

DS release was studied from: a) The selected emulsions with cubic liquid crystals, b) emuslions with the same oil content but without liquid crystals c) aqueous micellar solutions. The results pointed that the emulsions with liquid crystals presented lower release.

3.4.- Skin permeation

In the assays carried out with human skin the amount of DS quantified in the receptor solution after 24 hours was negligible for the diluted and the highly concentrated emulsion. The emulsion with 10wt% of Miglyol 812 showed the highest retention in epidermis and dermis ($p<0.05$, Mann-Whitney test). No correlation could be observed between the profiles obtained with DS permeation through human skin and the artificial membranes. DS permeation through lipophilic (Strat-M) and hydrophilic (cellulose acetate) membranes was significantly higher than DS permeation through human skin for all the formulations tested.

4.- Conclusions

An O/W HIPRE and two emulsions with a lower oil content but the same surfactant/water ratio and were prepared and characterized in the water /Cremophor RH40/Miglyol 812 system and 1%DS was successfully incorporated.

SAXS patterns evidenced the presence of cubic liquid crystalline phases in the emulsions. Emulsions with Rsw=40:60 showed a sustained release of DS which could be attributed to the oil content and the presence of cubic liquid crystalline structures where DS was strongly retained, compared with the other formulations studied .

The low permeation of DS from the emulsion with liquid crystals and the retention in skin layers suggest these formulations suitable for topical application.

5.- Acknowledgment

Characterization has been performed in the Nanostructured Liquid Characterization Unit, (IQAC-CSIC, NANBIOSIS ICTS of the CIBER-BBN). Financial support from MINECO (grant CTQ 2016-80645-R) and Generalitat de Catalunya (grant 2017SGR-1778 and DI-060) is acknowledged.

6.- References

[1] Llinàs *et al*. J. Colloid Interf Sci, 394: 337–345, 2013.

[2] Rodríguez *et al.* J. Colloid Interf Sci, 218(1): 88-96, 2000.

[3] Franz TJ. J Invest Dermatol 64, 190-195, 1975.

Comunicaciones Flash

Silk fibroin – hyaluronic acid sponges as interventional implants for trapping glioblastoma infiltrative cells

Mathie NAJBERG [1,2], Muhammad HAJI MANSOR [1], Céline Bouré [1], José-Luis CENIS [3], Frank BOURY [1], Carmen ALVAREZ-LORENZO [2], Emmanuel GARCION [1]

1. CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France
2. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R + D Pharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Email de contacto: mathie.najberg@univ-angers.fr

1.- Introduction

Glioblastoma (GBM) is a devastating tumor of the central nervous system. Despite a heavy treatment, recurrence is inevitable, and the application of a significant and effective therapeutic strategy remains a challenge [1]. Among innovative approaches, the breakthrough concept of cancer cell trap offers new hopes and opportunities [2]. A possibility of interest would be to attract these residual cancer cells surrounding the surgical cavity (or to confine them) in a biomimetic polymeric scaffold delivering a chemo-attractive protein. To test this hypothesis, a biocompatible scaffold with physico-chemical properties relevant to brain tissues and capable to release the GBM-related chemokine SDF-1α has been designed. The natural polymers silk fibroin (SF) and hyaluronic acid (HA) have been selected as candidate materials because of their biocompatibility and bio-physicochemical properties. Mixtures of SF, HA and heparin (hep) has also been realized as Heparin is a natural chelating agent of SDF-1 [3].

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

Hyaluronic acid (HA) (Mw 360,000 g/mol) was purchased from Guinama (Valencia, Spain), and heparin sodium salt (Mw 15,000 ± 2,000 g/mol) from Calbiochem (Billerca MA, USA), N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS) from Acros Organics (New Jersey, USA). Silk fibroin (SF) 8 wt% in aqueous solution was provided by Imida (Murcia, Spain). SDF-1α was purchased from Miltenyi Biotec (Paris, France)

2.2.- Methods

Sponges were prepared with 4 different compositions: HA, SF, SF with HA (SF-HA), and SF with HA and hep (SF-HA-hep) by a freeze-drying method. First, the polymers were mixed and crosslinking with N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) in a 96-well plate to obtain small cylinders of 6 mm of diameter (Fig. 1). Then, plates were freeze-dried and sponges were demolded.

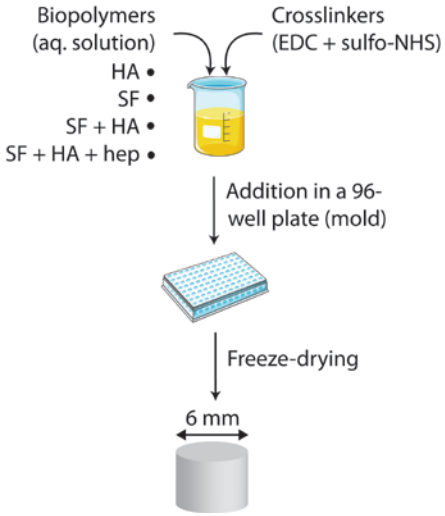


Fig. 1: Preparation of the sponges.

Their swelling ability and degradation in PBS, morphology (porosity, pore size and connectivity) and texture have been evaluated. The liberation of the protein of interest, SDF-1α, have been associated to

SF-HA and SF-HA-hep sponges and its liberation in PBS have been studied with an ELISA assay. Moreover, the cytocompatibility of the sponges on fibroblasts (NIH/3T3) and human glioblastoma cells (U87MG) has been studied. Finally, the infiltration and adhesion of the U87MG in the sponges have been evaluated by immunofluorescence with DAPI.

3.- Results and Discussion

Sponges showed high porosity near 90% relevant for cell integration, with pores diameters around 60 µm and can uptake up to ca. 22 times their weight in water. Moreover, swollen sponges had a Young modulus between 6 kPa and 22 kPa which is the same order of magnitude that the one of the brain (ca. 1 kPa) [4]. SDF-1α was adsorbed on both SF-HA and SF-HA-hep sponges with an uptake of 94% and 99% respectively. Sponges have been found cytocompatible after 24h with U87MG and NIH/3T3 cells and we showed that U87MG cells were able to deeply infiltrate the sponges (Fig. 2).

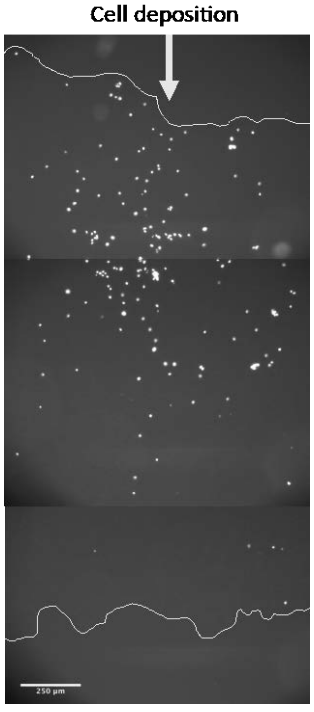


Fig. 2: Infiltration of U87MG cells in HA sponge. Cells have been placed on the top of the sponge and dyed with DAPI after fixation.

4.- Conclusion

We have been able to produce cytocompatible sponges presenting a porous morphology with high connectivity and pores large enough for cells to invade the interior of the sponges. Moreover, they presented a high water uptake with textures close to the one of the brain. Finally, SDF-1 was able to adsorb strongly on the sponges.

5.- Acknowledgments

This work was financially supported by "Région Pays de la Loire", the University of Angers, MINECO (SAF2017-83118-R) and AEI (Spain), the Erasmus Mundus Joint Doctorate (NanoFar), and FEDER. The authors thank IMIDA (Murcia, Spain) for the kind provision of silk fibroin.

6.- References

[1] O. Chinot, W. Wick, W. Mason, Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, et al., N. Engl. J. Med. 370, 709-722, 2014

[2] B. van der Sanden, F. Appaix, F. Berger, L. Selek, J.-P. Issartel & D. Wion, Future Oncol., 9, 817-824, 2013

[3] S. Prokoph, E. Chavakis, K.R. Levental, A. Zieris, U. Freudenberg, S. Dimmeler, C. Werner, Biomaterials, 33 , 4792–4800, 2012.

[4] C. Wang, X. Tong & F. Yang, F. Mol. Pharm. 11, 2115-2125, 2014

Increased oral bioavailability of resveratrol by its encapsulation in casein nanoparticles

Rebeca PEÑALVA [(1)], Jorge MORALES [(1)], Carlos J. GONZÁLEZ-NAVARRO [(2)], Juan M. IRACHE [(1)]

1. Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, 31008 Pamplona, Spain
2. Centre for Nutrition Research, University of Navarra, 31080 Pamplona, Spain.

Email: jmorales.3@alumni.unav.es

1.- Introduction

Resveratrol (Rsv) is a natural polyphenol that consists of two aromatic rings which are linked through a methylene bridge [1].

Resveratrol has a vasorelaxant effect because inhibits the synthesis of thromboxane A2 and enhances nitric oxide signalling in the endothelium [2]. It has also been demonstrated that resveratrol possesses cancer chemopreventive and chemotherapeutic activity [3], related with its inhibitory effect over cyclooxygenase, NF-kB and protein kinase C, among others.

Resveratrol also possesses some drawbacks that limit its use. Thus, resveratrol shows a very low aqueous solubility and is very sensitive to degradation by exposure to oxygen, light, temperature and oxidative enzymes. Another limiting factor is its poor oral bioavailability (less than 5%) due to its rapid metabolism and elimination [4].

The aim of this work was to prepare, characterize and evaluate the capability of casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of resveratrol.

2.- Materials and methods

2.1.- Preparation and characterization of resveratrol loaded nanoparticles

Resveratrol-loaded casein nanoparticles (Rsv-NP-C) were prepared by coacervation [5]. Briefly, 600 mg sodium caseinate and 60 mg lysine were dissolved in 40 mL purified water. In parallel, 26 mg resveratrol were dissolved in 2.6 mL ethanol and added to the casein solution. Under magnetic stirring, nanoparticles were formed by the addition of 24 mL of an aqueous solution of calcium chloride (0.8% w/v). The resulting suspensions were purified by ultrafiltration and dried in a Büchi Mini Spray Drier B-290 apparatus.

Empty nanoparticles (NP-C) were prepared in the same way, but in the absence of resveratrol.

For the characterization of the resulting nanoparticles the size, the polydispersity index and the drug loading were determined. To quantify the amount of resveratrol encapsulated in nanoparticles an HPLC-UV method was used.

2.2.- In vivo pharmacokinteic studies

Pharmacokinetic studies were performed in male Wistar rats (protocol number 014-10 [February 2010]). Previous to the oral administration of the formulations, animals were fasted overnight to avoid interference with the absorption, allowing free access to water.

The experimental groups (n=6 rats per group) were as follows: (i) resveratrol solution in PEG 400:water (Rsv-Sol) and (ii) resveratrol-loaded casein nanoparticles (Rsv-NP-C). Each animal received the amount of resveratrol equivalent to a dose of 15 mg/kg body weight. A control group of animals treated intravenously with a PEG 400:water solution of the polyphenol (15 mg/kg) was also used.

Blood samples were collected at set times after administration and analysed by HPLC [6].

3.- Results and Discussion

3.1.- Characterization of nanoparticles

Table 1 shows the characterization of casein nanoparticles used in this study. For empty nanoparticles, the mean size was around 140 nm and the zeta potential was negative. When resveratrol was encapsulated into casein nanoparticles, the resulting average size significantly increased (210 nm), whereas the negative zeta potential was slightly more negative than for empty nanoparticles (-19 mV vs. -12 mV). The resveratrol loading was calculated to be 31 µg/mg nanoparticles, with an encapsulation efficiency close to 70%.

Table 1: Physicochemical characterization of nanoparticles. NP-C: empty nanoparticles, Rsv-NP-C: resveratrol-loaded casein nanoparticles. D.L: loading of resveratrol.

Formulation	Size (nm)	Zeta (mV)	D.L. (µg/mg)
NP-C	140	-12	-
Rsv-NP-C	210	-19	31

3.2.- Pharmacokinetic studies

Figure 1 shows the plasma concentration levels of resveratrol as a function of time after a single oral administration of 15 mg/kg to rats. Casein nanoparticles provided higher and more prolonged resveratrol plasma levels tan the oral solution. Table 2 represents pharmacokinetic parameters determined. The oral bioavailability of resveratrol when encapsulated was found to be 10 times higher than when administered as a solution.

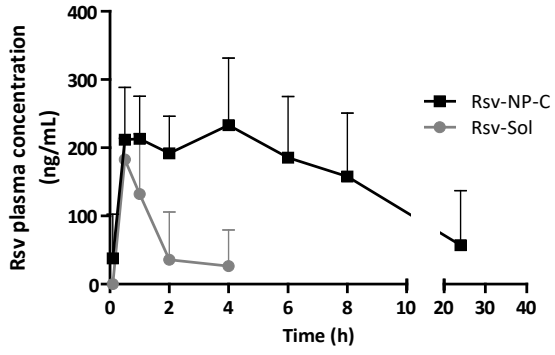


Fig. 1: Resveratrol plasma concentration vs. time after a single oral administration of 15 mg/kg for the different formulations tested. i) Resveratrol PEG400:water solution (Rsv-sol) (●), ii) Resveratrol-loaded casein nanoparticles (Rsv-NP-C) (■). Data expressed as mean± SD, (n= 6).

Table 2: pharmacokinetic parameters of resveratrol formulated as a solution, after either intravenous or oral administration (Rsv-iv and Rsv-Sol) or loaded in casein nanoparticles (Rsv-NP-C) as a single dose of 15 mg/kg to Wistar rats.

Form.	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	AUC (µg h/mL)	Fr (%)
Rsv-iv	15.2	0.1	10.5	100
Rsv-Sol	0.2	0.6	0.28	2.6
Rs-NP-C	0.3	1.8	2.75	26

4.- Conclusions

Casein nanoparticles offered sustained levels of resveratrol for at least 8 hours: increasing significantly the oral bioavailability of the polyphenol (10 times higher than when incorporated in a conventional formulation).

5.- Acknowledgments

This work was supported by the Regional Government of Navarra and the Spanish Ministry of Science and Innovation and Gobierno de Navarra.

6.- References

[1] R.F. Guerrero, M.C. García-Parrilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, Nat. Prod. Commun, 4, 635-658, 2009.

[2] F. Orallo, F. Alvarez, M. Camiña, JM. Leiro, E. Gómez, P. Fernández, Mol. Pharmacol., 61, 294-302, 2002.

[3] MA. Valetonic, Adv. Cancer Res.,137, 171-188, 2018.

[4] J.M. Planas, I. Alfaras, H. Colom, M.E. Juan, Arch. Biochem. Biophys., 527, 67-73, 2012.

[5] R. Penalva, I. Esparza, M. Agüeros, C.J. González-Navarro, C. Gonzalez-Ferrero, J.M. Irache. Food Hydrocolloids, 44, 399-406, 2015.

[6] R. Penalva, J. Morales, C.J. González-Navarro, E. Larrañeta, G. Quinonces, I. Peñuelas, J.M. Irache. Int. J. Mol. Sci. 19(9), 2018.

Enemas termosensibles para administración de hUCESC-CM: una prometedora estrategia en el tratamiento de la CU

Lorena GARCÍA DEL RÍO [(1)], Patricia DÍAZ RODRÍGUEZ [(1)], Juan SENDÓN LAGO [(2)], Francisco J. VIZOSO [(3)], Noemí Eiró [(3)], Mariana LANDÍN [(1)], Román PÉREZ FERNÁNDEZ[(2)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,Universidade de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela.
2. Departamento de Fisiología, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, 15706-Santiago de Compostela.
3. Unidad de Investigación, Fundación Hospital de Jove, 33290-Gijón.

Email de contacto: lorena.garcia.delrio@rai.usc.es

1.- Introducción

La Colitis Ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta principalmente a la región colónica[1]. Se caracteriza por el desarrollo de úlceras crónicas, recurrentes asociadas a niveles altos de citoquinas proinflamatorias. Se ha demostrado recientemente, que el secretoma obtenido a partir de células madre cervicales uterinas humanas (hUCESC-CM) posee elevada actividad antiinflamatoria y regenerativa en otros tipos de ulceraciones como la uveitis[2]. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad del secretoma de hUCESC-CM en CU. Para ello, se desarrolló un enema termosensible compuesto por Pluronic® F127 (PF127) y F68 (PF68) y Methocel® K4M (MK4M) optimizado mediante herramientas de Inteligencia Artificial (Redes Neuronales Artificiales y Algoritmos Genéticos), cuyas propiedades físicas permitan adhesión a la mucosa colónica y una cesión rápida de las proteínas del hUCESC-CM sobre ésta.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Desarrollo y optimización del ET

Se estableció un diseño experimental balanceado para 3 componentes (porcentajes de PF127 y PF68 y MK4M) empleando el software Dataform® v3.1 (Intelligensys Ltd, UK). La composición de los 10 hidrogeles elaborados en PBS se incluyen en la Tabla 1. Se llevaron a cabo estudios de texturometría y reometría para determinar los siguientes parámetros: jeringabilidad, bioadhesión, viscosidad, temperatura de gelificación (Tg) y módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G"). También se realizaron ensayos para cuantificar la velocidad de cesión de cada hidrogel empleando BSA como proteína modelo. Los software FormRules® v.4.03 e INForm® v.5.01 (Intelligensys Ltd, UK) permitieron modelizar los datos y obtener una formulación optimizada en cuanto a jeringabilidad, viscosidad, biodhesión, Tg y velocidad de cesión.

Hidrogel	Composición (%)		
	PF127	PF168	MK4M
1	17	5	0.25
2	15	0	0.5
3	19	2.5	0
4	15	2.5	0.25
5	17	0	0.5
6	19	5	0
7	19	5	0.25
8	17	2.5	0.5
9	15	0	0
10	17	2.5	0

Tabla 1: Composición de los hidrogeles

2.2.- Obtención, caracterización y carga del ET

La formulación optimizada (ET) se sometió a ensayos texturométricos, reológicos y de estabilidad (3 meses en nevera o a temperatura ambiente (TA). Adicionalmente, se evaluó su velocidad de cesión empleando BSA. Por último, se cargó el ET con hUCESC-CM liofilizado (ET-hUCESC-CM).

2.3.- Ensayo *in vivo*

Se indujo CU en ratones (C5BL/6) añadiendo DSS (3% p/v) en el agua durante 9 días. Los ratones se dividieron en 5 grupos: 1) ratones sanos; 2) ratones con CU no tratada; 3) ratones con CU tratada con ET; 4) ratones con CU tratada con Claversal®; 5) ratones con CU tratada ET-hUCESC-CM. Durante

los 6 días siguientes, cada formulación se administró por vía rectal utilizando agujas flexibles de 24Gx1.5" (75 µl/2 veces al día). A los 16 días de ensayo los ratones se sacrificaron y se cuantificaron los niveles de TNFα, IL-6, INFα e IL-10 de la mucosa colónica mediante técnicas de PCR. Asimismo, se evaluó su histología y longitud.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Desarrollo y optimización del ET

FormRules® ha sido capaz de predecir la variabilidad de los diferentes parámetros texturométricos y reológicos evaluados según la composición. Así, la jeringabilidad, viscosidad y bioadhesión vienen determinadas principalmente por la presencia de PF127. Por lo que valores bajos de jeringabilidad y viscosidad se obtendrán empleando concentraciones de PF127 <17%, mientras que formulaciones que tengan un porcentaje de este polímero superior al 17% tendrán una elevada capacidad de biodhesión. La Tg está condicionada fundamentalmente por la proporción de PF188 empleada, obteniéndose sistemas con Tg elevadas cuando este ingrediente se encuentra a una concentración alta (>2.5%). Finalmente, la velocidad de cesión vendrá condicionada por los tres ingredientes, pero principalmente por el PF127. Así, proporciones bajas de P127 (<17%), altas de P188 (>2.5%) y muy bajas o altas de MK4M (<0.13; 0.25-0.5) conllevarán tiempos de cesión cortos (5-10 min). Los sistemas presentaron valores de G' > G" a 37 ºC a frecuencia angular variable, por lo que fueron estables. Sobre esta base, el software INForm® modelizó y optimizó la formación, permitiendo encontrar la composición que diese lugar a baja jeringabilidad y viscosidad y elevada bioadhesión, junto a una Tg y velocidad de cesión adecuada. Así, la composición del hidrogel optimizado fue: 16.34%, 2.55% y 0.26% de PF127, PF68 y MK4M respectivamente.

3.2.- ET: propiedades reológicas, de cesión y estabilidad

El ET obtenido presentó valores de jeringabilidad y viscosidad bajos, así como una bioadhesión, Tg y velocidad de cesión altas, corroborando así las características predichas por el modelo y permitiendo su validación. El ET a 37 ºC presentó valores de G' > G", por lo que fue estable.

3.3.- Efecto antiinflamatorio *in vivo*

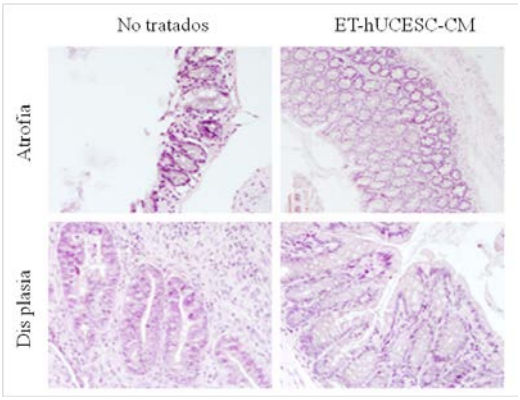


Figura 1: Longitud colónica a los 16 días.

El ET-hUCESC-CM redujo de manera significativa la atrofia y displasia epitelial con respecto al grupo control (Figura 1), así como el edema y la producción e infiltración de células proinflamatorias.

4.- Conclusiones

El empleo de HIA ha permitido diseñar un ET de características deseadas, líquido para su administración, gelificado a Tª corporal y estable a 4ºC, que permite la administración rectal de hUCESC-CM, cuyas propiedades antiinflamatorias se han demostrado por primera vez en un modelo de CU.

5.- Agradecimientos

Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva, ED431C2017/09-FEDER), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-69221-R), Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (PI17/02236) y Fundación para la Investigación con Células Madre Uterinas (FICEMU).

5.- Referencias

[1] AC. Santos Akkari, EV. Ramos Campos, AF. Keppler, LF. Fraceto, E. de Paula, GR. Tófoli, DR. Araújo, Colloids Surf. B. Biointerfaces, 138, 138-47, 2015.

[2] MA. Bermúdez, J. Sendón Lago, S. Seoane, N. Eiró, F. González, J. Saa, F. Vizoso, R. Pérez Fernández, Exp. Eye. Res, 149, 84-92, 2016.

Desarrollo de Nanocompuestos Poliméricos con Potencial Aplicación en Hipertermia Magnética Antitumoral

Fátima FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ[(1)], Gracia GARCÍA-GARCÍA[(1)], Silvia FUERTE-RODRÍGUEZ[(1)], Laura CABEZA[(2-4)], José C. PRADOS[(2-4)], Jóse L. ARIAS [(1,3,4)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España.
3. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.
4. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: fatimaferal@correo.ugr.es

1.- Introducción

La actividad investigadora en el diseño de coloides magnetopoliméricos para aplicaciones biomédicas ha logrado significativos avances en el transporte de agentes terapéuticos, la hipertermia y el diagnóstico mediante imagen. Estos avances comienzan a cristalizar en la prometedora aplicación de la nanoteranosis [1]. Estos estudios se han visto lastrados por insuficientes estudios *in vitro* e *in vivo*.

La presente investigación analiza una metodología de formulación de nanopartículas (NPs) basadas en núcleos de maghemita (γ-Fe_2O_3) dentro de una matriz de poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA). Se ha evaluado la respuesta magnética del coloide, prestando especial atención a su comportamiento frente a un gradiente electromagnético alterno de alta frecuencia (GEMAAF, capacidad para la hipertermia). Finalmente, se han realizado estudios *in vitro* en las líneas celulares CCD-18 (de fibroblastos de colon humano) y T-84 (de carcinoma de colon humano), como primera aproximación a la evaluación de su toxicidad y capacidad como nanoagente hipertérmico antitumoral, respectivamente.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Reactivos químicos de calidad analítica (Panreac Química S.L.U., España; y, Merck KGaA, Alemania).

2.2.- Formulación y caracterización de NPs magnéticas de PLGA

Los núcleos de γ-Fe_2O_3 se prepararon mediante oxidación de NPs de magnetita obtenidas por coprecipitación química (9 ± 3 nm) [1].

La preparación de los nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA se basó en el método de emulsificación con evaporación del disolvente, ampliamente utilizado en la obtención de NPs de PLGA (260 ± 10 nm) [2], pero incluyendo los núcleos magnéticos en la fase acuosa (0.25%, p/V) (n = 3).

El tamaño de partícula se caracterizó mediante espectroscopia de correlación de fotones, y las propiedades eléctricas superficiales (potencial zeta, ζ) y su dependencia con la composición del medio de dispersión se evaluaron mediante electroforesis (Malvern Autosizer® 4700, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). La respuesta magnética también se estudió (magnetómetro Quantum Design MPMS XL Squid, Quantum Design Inc., EE.UU.).

2.3.- Estudio *in vitro* de citotoxicidad

Se realizó el ensayo MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] para evaluar la citotoxicidad de las NPs γ-Fe_2O_3/PLGA en las líneas CCD-18 y T-84, empleando diferentes concentraciones de éstas (50 ng/mL a 100 μg/mL) [3].

2.4.- Capacidad para la hipertermia

Se analizó la respuesta de preparaciones coloidales γ-Fe_2O_3/PLGA (5 mg/mL) expuestas a un GEMAAF (frecuencia, e intensidad: 250 kHz, y 4 kA/m). El método MTT [3] evaluó la citotoxicidad asociada a la hipertermia de las NPs (grupo 1) en comparación con diferentes grupos control: *2* (incubación con NPs, sin GEMAAF), *3* (sin NPs, con GEMAAF) y *4* (sin NPs, sin GEMAAF).

3.- Resultados y Discusión

La inclusión de los núcleos de γ-Fe_2O_3 en la matriz polimérica no acrecentó

significativamente su tamaño (280 ± 10 nm), manteniéndose así su idoneidad para la vía parenteral. La Fig. 1 recoge cómo la carga eléctrica de la γ-Fe_2O_3 queda plenamente oculta en la matriz polimérica, siendo indistinguibles los comportamientos de los nanocompuestos y las NPs de PLGA (eficacia de la metodología de formulación). La composición del medio de dispersión parece influir en la electroforesis del coloide, cuestión aprovechable según la vía de administración.

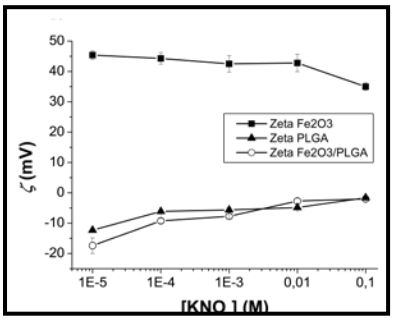


Fig. 1: Valores de ζ (mV) de NPs de γ-Fe_2O_3 (■), PLGA (▲), y γ-Fe2O3/PLGA (○) según la concentración molar de KNO_3, a pH 6.

Los ensayos MTT revelaron que las NPs no eran tóxicas en las líneas celulares estudiadas [CCD-18, y T-84 (Fig. 2)] dentro del rango de concentraciones investigado.

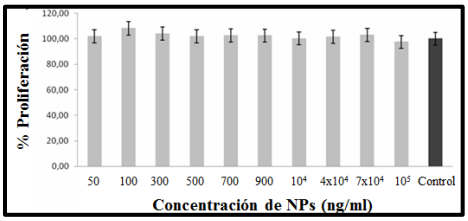


Fig. 2: Efecto citotóxico (proliferación, %) de la concentración de NPs γ-Fe_2O_3/PLGA en células T-84, tras 24 h de incubación.

El análisis del ciclo de histéresis de las NPs γ-Fe_2O_3/PLGA permitió definir una interesante respuesta magnética para fines biomédicos [susceptibilidad inicial: $(0.11 \pm 0.01) \times 10^{-3}$ m^3/Kg, y magnetización de saturación: 7.2 ± 0.6 Am^2/Kg]. La Fig. 3 revela la adecuada capacidad para la hipertermia del coloide: temperatura mínima de hipertermia (42 ºC) alcanzada tras 30 min, y temperatura máxima de 46 ºC no sobrepasada durante todo el ensayo (3 h). Cabe concluir que una dispersión acuosa de estas NPs es capaz de alcanzar temperaturas a las que son sólo sensibles las células T-84, sin comprometer la supervivencia del tejido sano (existente a ≈ 52 ºC) [1].

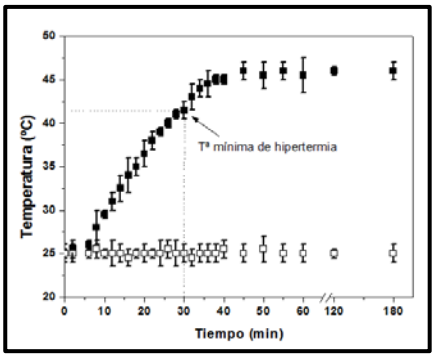


Fig. 3: Evolución de la temperatura (ºC) en función del tiempo (min) de una dispersión acuosa de NPs de γ-Fe_2O_3/PLGA (■), y de una preparación control (medio acuoso sin NPs, □), bajo la influencia de un GEMAAF.

La Fig. 4 revela una marcada hipertermia en la línea T-84, en comparación con los grupos control considerados.

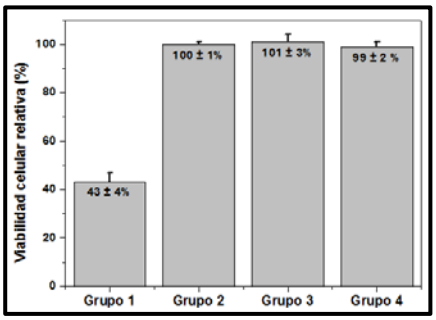


Fig. 4: Efecto hipertérmico in vitro de los nanocompuestos en comparación con los grupos control 2, 3 y 4.

4.- Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología reproducible y óptima para la formulación de NPs magnetopoliméricas con potencial aplicación en hipertermia. Actualmente se investiga si las NPs pueden servir en teranosis.

5.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).

6.- Referencias

[1] LH. Reddy, JL. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Chem. Rev., 112, 5818-5878, 2012.

[2] E. Pretel, J.L. Arias, L. Cabeza, C. Melguizo, J. Prados, M. Mallandrich, J. Suñer, B. Clares, Int. J. Pharm. 530, 155-164, 2017.

[3] M. Muñoz de Escalona, E. Sáez-Fernández, J.C. Prados, C. Melguizo, J.L. Arias, Int. J. Pharm., 504, 11-19, 2016.

Síntesis y caracterización de nanotransportadores metálicos

Beatriz PARERA [(1)], Julián LÓPEZ – VIOTA [(2)], Margarita LÓPEZ – VIOTA [(1)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja S/N 18071. Granada. España.
2. Vircell microbiologist. Granada. Spain

Email de contacto: bparera@correo.ugr.es

1.- Introducción

Las sustancias activas puras son, generalmente insuficientes para la administración al organismo sin que estén incluidas en un vector, por lo que, a lo largo de las últimas décadas, se han desarrollado nuevas formas farmacéuticas.

El propósito de estos vectores es guiar el fármaco al órgano diana para concentrarlo allí y minimizar la distribución sistémica. De esta forma, se logrará un efecto farmacológico óptimo.

Aquí mostramos un estudio de síntesis de nanopartículas mediante coprecipitación química [1], conjugación con proteínas específicas y caracterización de las mismas mediante el estudio de las propiedades eléctricas superficiales.

2.- Materiales y métodos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma – Aldrich (Madrid, España) y todos los procesos de síntesis fueron llevados a cabo con agua ultrapura desionizada (Mili – Q).

El objetivo propuesto se inicia con la síntesis de un núcleo metálico estable a escala nanométrica y con características magnéticas. La magnetita será el compuesto principal de dicho núcleo.

Posteriormente se realiza un recubrimiento polimérico con ácido metacrílico y a continuación se conjugan las nanopartículas sintetizadas con una suspensión de nanopartículas de óxido de cobre. Se realiza un estudio de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas resultantes determinando valores de movilidad electroforética en función del pH en un intervalo de 3 a 11.

Por último, se completa el estudio conjugando de manera hidrofóbica y covalente, proteínas específicas sobre la superficie de las nanopartículas.

La proteína utilizada para este estudio es la A, proteína de superficie capaz de reconocer en la matriz extracelular moléculas como los anticuerpos, teniendo como función dificultar la opsonización y la fagocitosis [2].

3.- Resultados y discusión

Se han obtenido resultados de tamaño, morfología, carga eléctrica superficial y absorbancia óptica.

2.1.- Tamaño y morfología de nanopartículas

A lo largo de todo el proceso de síntesis del sistema se comprobó el tamaño y la morfología de las nanopartículas de nuestra suspensión, para asegurarnos que fuese uniforme.

TIPO DE PARTÍCULA	TAMAÑO MEDIO DE PARTÍCULA
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	124,0±16,7nm
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE	8,0±2,0nm
NANOPARTÍCULAS DE LÁTEX MAGNÉTICO Y ÓXIDO DE COBRE	230,5±55,1nm

Tabla 1: Tamaño medio de nanopartículas sintetizadas

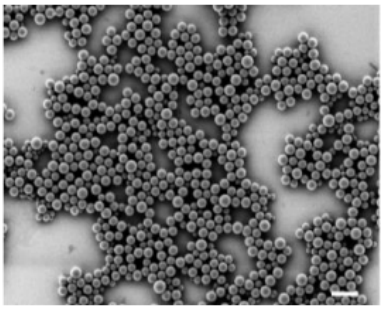


Fig. 1: Microfotografía SEM de las partículas de látex magnético sintetizadas. Barra de error 500nm.

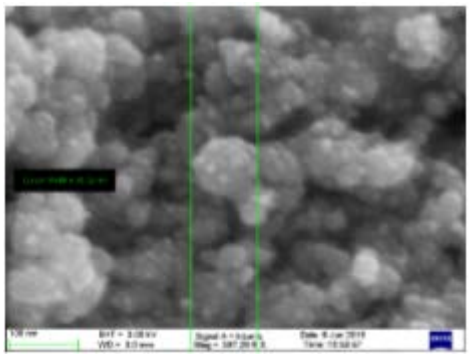
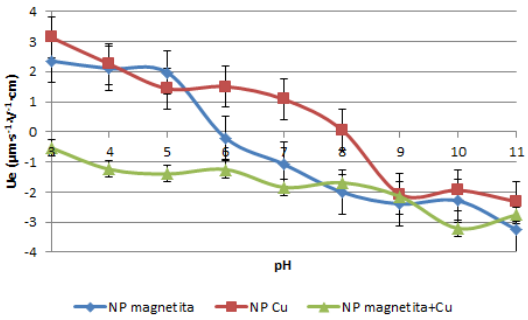


Fig. 2: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas de látex magnético recubiertas con óxido de cobre.

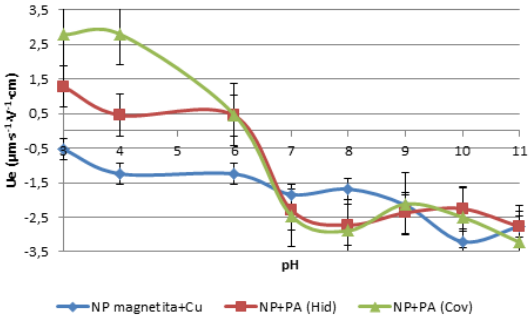
2.3.- Propiedades eléctricas superficiales

Con el fin de determinar los cambios en las propiedades eléctricas superficiales de los distintos tipos de partículas con las que hemos trabajado, se efectuaron medidas de movilidad electroforética. En la Gráfica 1 mostramos la dependencia de la movilidad electroforética de las nanopartículas en función del pH. Conociendo los puntos isoeléctricos de ambos tipos de partículas pudimos conjugarlas electrostáticamente de manera adecuada.



Gráf. 1: Medidas de movilidad eletroforéticas de las nanopartículas de magnetita, cobre y las resultantes de la conjugación de ambas.

La adsorción superficial de proteína A se llevó a cabo desde dos puntos de vista diferentes: hidrofóbica y covalentemente. En la Gráfica 2 observamos el cambio sobre la superficie de las nanopartículas al conjugarlas con la proteína A. estos resultados nos muestran un punto isoléctrico de nanopartícula más ácido que los obtenido anteriormente, lo que nos lleva a decir que se ha conjugado correctamente la proteína. De igual modo se comprobó que se había absorbido la proteína realizando un ensayo espectrofotométrico del sobrenadante resultante de la combinación, obteniendo una concentración (absorbancia óptica) de prácticamente 0.



Gráf. 2: Medidas de movilidad electroforética en función del pH de las nanopartículas de latex magnético y cobre y las conjugadas con la proteína A de manera hidrofóbica y covalente.

4.- Conclusiones

El revestimiento realizado de las nanopartículas es crucial para determinar sus propiedades, su estabilidad, solubilidad y focalización.

Además, la vinculación a moléculas biológicas, como las utilizadas en este trabajo, pueden actuar como etiquetas para dirigir las nanopartículas a sitios específicos controlados.

El diseño propuesto y llevado a cabo recientemente, proporciona unos resultados adecuados para su posterior utilización en el campo biomédico, ya que nuestra proteína puede ser capaz de conjugarse con un anticuerpo monoclonal de un determinado microorganismo que, en contacto con su respectivo antígeno, será capaz de reconocerlo y unirse a él.

5.- Referencias

[1] Massart, R. “Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media.” IEEE Transactions Magnetics. Vol 17 (2): 1247 – 1248. 1981.

[2] Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller. “Staphylococcus y cocos grampositivos relacionados”. Microbiología Médica 6 Ed. Elsevier – Mosby. pp. 209 – 223. 2009.

Tolerogenic nanocarriers for the treatment of Type 1 Diabetes

Ana OLIVERA [1,2], Cristina CALVIÑO-SAMPEDRO [3], Rubén VARELA-CALVIÑO [3], Dolores TORRES [2], María José ALONSO [1,2]

1. Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain
2. Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain
3. Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Spain

Contact email: ana.olivera@usc.es

1.- Introduction

Nowadays, type 1 diabetes is considered an autoimmune disorder. In this context, promising new therapies based on the modulation of the immune system are emerging [1]. Due to the complex regulatory network of the autoimmune processes, targeted and specific therapies are desired to avoid off-target effects as systemic immunosuppression. For that, the application of nanotechnology could help to reach the desired cell population and furthermore, it offers the possibility of co-delivering auto-antigenic molecules and immunomodulatory molecules to promote a specific tolerogenic effect [1,2]. In this report, we describe the development of nanocapsules loaded with an immunomodulatory molecule. Furthermore, we show their *in vitro* and *in vivo* evaluation in human dendritic cells (hDCs) and in a type 1 diabetes mouse model, respectively.

2.- Materials and Methods

2.1.- Nanosystem development

2.1.1.- Preparation
Nanocapsules containing the immunomodulatory molecule (loaded NCs) were prepared using the solvent displacement technique. Blank NCs were also prepared as a control.

2.1.2.- Characterization
Once formed, all the formulations were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and the zeta potential values were obtained by Laser Doppler Anemometry (LDA), measuring the mean electrophoretic mobility, both in a Zetasizer® NanoZS (Malvern Instruments, United Kingdom).

2.1.3.- Stability
For assessing the stability in culture conditions, blank NCs were diluted 1/20 in RPMI cell culture medium and maintained at 37ºC during the study. For the storage stability assay, blank NCs were maintained at 4ºC along the study. At different time points in each case, the formulations were characterized regarding its physicochemical characteristics.

2.2.- In vitro evaluation in hDCs

2.2.1.- Cells
Human blood samples were provided by the Galician Blood Transfusion Centre. Monocytes were isolated by centrifugation at 400g during 30 min and then differentiated to hDCs using a cytokines mixture.

2.2.2.- Toxicity
The toxicity of blank NCs was assessed using the MTS assay. The NCs concentrations tested were: 25, 50, 100, 200, 400 and 900 µg/ml at time points of 2, 6 and 24 h of incubation.

2.2.3.- Allogenic T cell activation
hDCs were incubated with 200 µg/mL of blank or loaded NCs during 24 h. After that, these hDCs were co-cultured with allogenic $CD8^+$ lymphocytes during 1 week. Then, the activation of the lymphocytes was measured by the surface markers expression evaluated by flow cytometry.

2.2.- In vivo evaluation in non-obese diabetic mice (NOD mice)

Female NOD mice at 4 weeks of age-normoglycemic were injected intraperitoneally with a dose of 50 mg/Kg of NCs (dose of immunomodulatory molecule of 0.05 mg/kg). Administrations were done every two weeks between the beginning of the study and 8 weeks of age, and every 3 weeks from 8 weeks of age until 30 week of age (12 animals per group). Mice were monitored weekly for urine glucose until 30 weeks. Mice were considered diabetic after two consecutive glucosuria.

3.- Results and discussion

3.1.- Nanosystem development

All prototypes showed a particle size around 200 nm and a surface charge around +50 mV, as it is shown in Table 1.

Table 1. Physicochemical characterization of blank and loaded NCs (PDI: polydispersity index)

Prototype	Size (nm)	PDI	ζ (mV)
Blank NCs	224 ± 13	0.1	+55
Loaded NCs	222 ± 11	0.1	+56

All prototypes maintained their physicochemical characteristics during 24 h in culture conditions. Furthermore, the formulations were stable up to 7 months under storage at 4ºC.

3.2.- *In vitro* evaluation in hDCs

Upon the incubation with NCs for 24 h, a dose-dependent toxicity profile in hDCs was obtained and no toxicity was observed until 200 µg/mL.

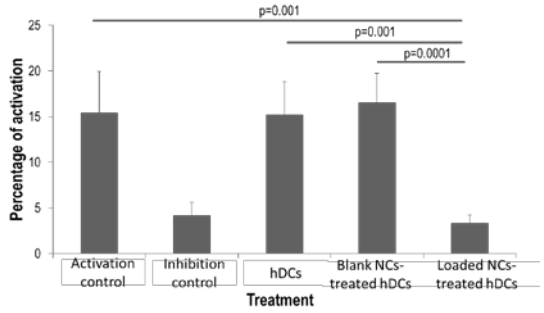


Figure 1. Activation of $CD8^+$ lymphocytes after its co-culture with pretreated hDCs (Bonferroni post-hoc test)

Allogenic T cell activation assays indicated that the NCs were able to maintain the activity of the immunomodulatory molecule and be effective in terms of inducing a tolerogenic profile in hDCs, which was associated to the inhibition of $CD8^+$ T cell activation (Figure 1).

3.3.- *In vivo* evaluation in NOD mice

Drug-loaded NCs decreased the incidence of diabetes in NOD mice compared to the free drug and the non-treated control (Figure 2).

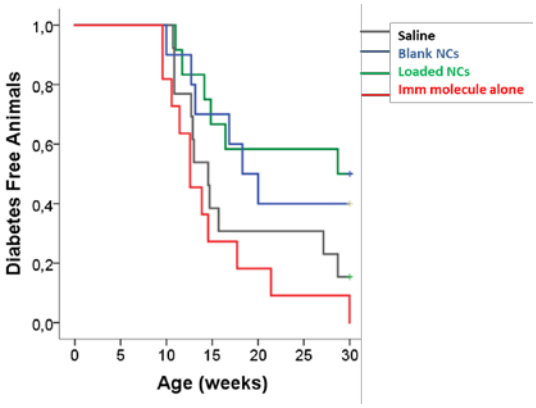


Figure 2. Delay in diabetes onset after the administration of NCs.

4.- Conclusions

NCs were successfully developed in terms of physicochemical properties and loading capacity of the selected immunomodulatory molecule. These NCs showed the ability to inhibit T cell activation, thereby inducing a tolerogenic profile in hDCs. Finally, they promoted a delay in diabetes onset in NOD mice. These results indicate that the use of immunomodulatory nanocarriers maybe a potential alternative in the treatment of type 1 diabetes.

5.- Acknowledgements

Research reported in this publication was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness [grant agreement number 646142]. The first author is also supported by a FPI grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (grant number BES-2015-071236).

6.- References

[1] T.G. Dacoba, A. Olivera, D. Torres, J. Crecente-Campo, M.J. Alonso, Seminars in Immunology, 2017.

[2] S.D. Miller, D.M. Turley, J.R. Podojil, Nature Reviews Immunology, 7, 665-677, 2007.

Combination of alkyl-lysophospholipid edelfosine and squalenoyl-gemcitabine

Carlos Rodríguez-Nogales [1,2], Víctor Sebastián [3,4], Silvia Irusta [3,4], Didier Desmaële [5], Patrick Couvreur [5], María J. Blanco-Prieto [1,2]

1. Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, University of Navarra, Pamplona 31008, Spain

2. Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona 31008, Spain

3. Department of Chemical and Environmental Engineering & Institute of Nanoscience of Aragon (INA), University of Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain

4. Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, Madrid 28029, Spain.

5. Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry Cedex 92290, France

Email de contacto: crodriguez.31@alumni.unav.es

1.- Introduction

The current limitations of conventional chemotherapy have prompted the implementation of nanomedicine to improve cancer treatment [1,2]. Squalenoyl prodrugs display an amphiphilic structure that allows them to self-assemble into stable nanosystems [3,4]. Among the squalenoyl nanoassemblies (NAs) investigated, considerable activity has centered on squalenoyl-gemcitabine (SQ-gem) NAs as they have shown an improved anti-cancer activity compared to free gemcitabine *in vivo* [5]. We suggest that the co-encapsulation of another drug with a complementary therapeutic target may enhance the anticancer potential of the SQ-gem NAs. In order to achieve a successful multidrug approach, we selected edelfosine (EF), an alkyl-lysophospholipid with proven anticancer activity in several tumors with an amphiphilic structure similar to phospholipids [6,7].

Here, we investigate whether the physical mixture of these two compounds (*i.e.* SQ-gem and EF) could lead to the formation of a functional multidrug nanomedicine.

2.- Material and methods

Nanocomposites were formulated by nanoprecipitation method from an ethanolic solution and characterized by dynamic light scattering. An UHPLC/MS/MS method was optimized to perform the simultaneous determination of SQ-gem and EF. The morphology of squalenoyl nanocomposites was characterized by Transmission electron microscopy and the distribution of elements throughout SQ-gem/EF NAs was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

3.- Results and discussion

By modifying the ratio of SQ-gem and EF in the squalene-based nanocomposites, it was possible to select the best nanoformulation in terms of size distribution. At a molecular ratio of SQ-GEM and EF 1:1, NAs displayed reproducible and homogeneous formulation batches of 51 ±1 nm. This approach allowed nanocomposites with very high total drug contents of 67.28 wt % to be formulated, containing both gemcitabine (22.49 wt %) and EF (44.73 wt %). According to this, the XPS depth profile results indicated that, as layers of the particles are gradually removed, the EF concentration increased, confirming

that EF is correctly co-encapsulated (Fig. 1). Thus, the physical mixture of SQ-gem and EF resulted in a considerable particle size reduction over SQ-gem NAs of 121±14 nm, as well as, a substantial increment in the drug content.

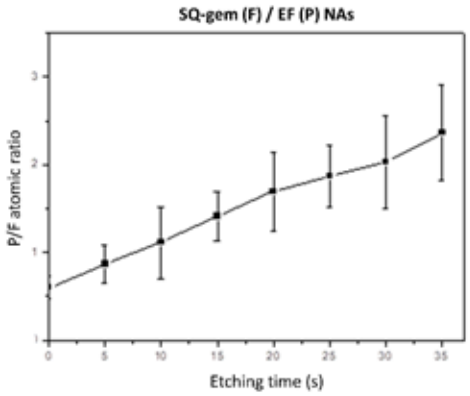


Fig. 1: P (phosphorus)/F (fluorine) atomic ratio of SQ-gem/EF NAs obtained by XPS depth profile.

Very importantly, the characteristic supramolecular organization of SQ-gem NAs was no longer observed with the SQ-gem/EF NAs. The Morphology analysis revealed that the interaction of SQ-gem and EF led to nanostructures with an oval or round shape, suggesting a multilamellar conformation (Fig. 2).

The in-depth characterization allowed us to demonstrate the successful design and formulation of a novel kind of nanosystem. In addition, the presence of EF considerably improved the stability of SQ-gem NAs so that EF acts not only as a second antitumor agent but also as a NP stabilizer.

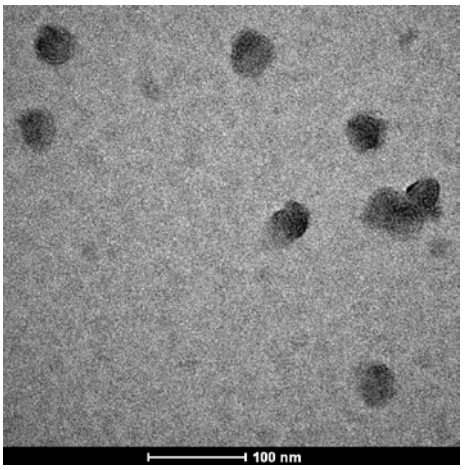


Fig. 2: Transmission electron microscopy of SQ-gem/EF NAs.

4.- Conclusion

The successful co-assembly between SQ-gem and EF represent a step ahead toward a feasible NA that embodies the properties of a new generation of only drug-based nanomedicines. Further studies *in vitro* and *in vivo* will allow to elucidate the applicability of this multidrug nanomedicine for cancer therapy.

5.- Aknowledgements

Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) (CI14142069BLAN) and Fundación Caja Navarra/Obra Social La Caixa are gratefully acknowledged. CIBER-BBN is an initiative funded by the VI Spanish National R&D&i Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions and financed by the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with assistance from the European Regional Development Fund.

6.- References

[1] J. Shi, P.W. Kantoff *et al., Nat. Rev. Cancer*, 17, 20–37, 2016.

[2] C. Rodríguez-Nogales, Y. González-Fernández *et al., ACS Nano*, 12, 7482-7496, 2018.

[3] A. Maksimenko, F. Dosio *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E217–E226, 2014.

[4] F. Dosio, L.H. Reddy *et al*,, Bioconjug. Chem. 21, 1349–1361, 2010.

[5] L.H. Reddy, C. Dubernet *et al., J. Control. Release.* 124, 20–27, 2007.

[6] Y. González-Fernández, E. Imbuluzqueta *et al., Cancer Lett.* 388, 262–268, 2017.

[7] A. Estella-Hermoso de Mendoza, V. Préat *et al., J. Control. R elease.* 156, 421–426, 2011.

On-demand design of polymeric nanocapsules and implications in their biodistribution in zebrafish

José CRECENTE-CAMPO [(1)], Jorge GUERRA-VARELA[(2)], Mercedes PELETEIRO [(3)], Carlha GUTIÉRREZ-LOVERA[(2)], Iago FERNÁNDEZ-MARIÑO, Andrea DIÉGUEZ-DOCAMPO[(3)], África GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ[(3)], Laura SÁNCHEZ [(2)], María J. ALONSO [(1)]

1. Center for Research in Molecular Medicine & Chronic Diseases (CIMUS), School of Pharmacy, Universidade de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
2. Department of Zoology, Genetics & Physical Anthropology, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
3. Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO) (Centro Singular de Investigación de Galicia), Universidade de Vigo. Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS), Campus Universitario, Vigo, 36310, Spain

Contact e-mail: jose.crecente@usc.es

1.- Introduction

The lack of knowledge about the consequences of small physico-chemical modifications in the biological activity of the nanosystems has limited the progress of nanomedicine. Despite of the high number of articles studying the influence of the particle size and surface charge in the cellular uptake and in the biodistribution of different nanosystems, it has been difficult to withdraw universal conclusions [1]. On the contrary, each particular nanosystems need to be specifically evaluated to avoid misleading comparisons. In this work, we have developed polymeric nanocapsules (NCs) with different surface charge and two particles sizes, and we have analyzed how these modifications affect their uptake by macrophages and their biodistribution in a zebrafish model.

2.- Materials and methods

NCs were prepared by the solvent displacement technique [2]. To obtain the lower particle sizes, the organic phase was injected in the aqueous phase.

The *in vitro* assays were performed in mouse macrophage cell line RAW 264.7 (RAW). Cell viability studies were done using the MTS test. The interaction with the NCs was evaluated by flow cytometry.

The *in vivo* assays were carried out on 48 hpf Tg(mpeg1:EGFP) zebrafish embryos (they present green-fluorescent macrophages). DiD (red) labeled NCs were injected intravenously or intramuscularly to evaluate possible differences in biodistribution and macrophage interaction.

3.- Results and discussion

3.1. Nanocapsules design and characterization

Four different new nanosystems were developed and fully characterized (Table 1). The different polysaccharides in the shell of the NCs allowed the preparation of positive (+) and negative (-) charged NCs. Besides, with a modification of the solvent displacement technique, NCs of differentiated particle size could be designed (S, <100 nm and M, > 100 nm).

Table 1: Physicochemical properties of the developed nanosystems (n=5)

Nanosystem	Size (nm)	PDI	Z-pot. (mV)
NCs S (-)	69 ± 6	0.18	- 33 ± 8
NCs M (-)	246± 16	0.12	- 25 ± 11
NCs S (+)	72 ± 5	0.16	+ 37 ± 4
NCs M (+)	172± 11	0.11	+ 34 ± 4

3.1. Nanocapsules toxicity and interaction with macrophages

An influence of the particle size and surface charge was observed in the toxicity of the NCs. Thus, positively charged NCs showed a higher toxicity compared with their negative counterparts and also a higher uptake (Fig.1). This effect was already reported in the literature for similar nanosystems [3]. However, the influence of small

modifications in the nanometric range over the uptake of nanoparticles is not clear, existing reported conflictive results [4]. In this study, we observed a clear correlation between the higher toxicity of small particle sizes and their higher internalization (also confirmed using confocal microscopy).

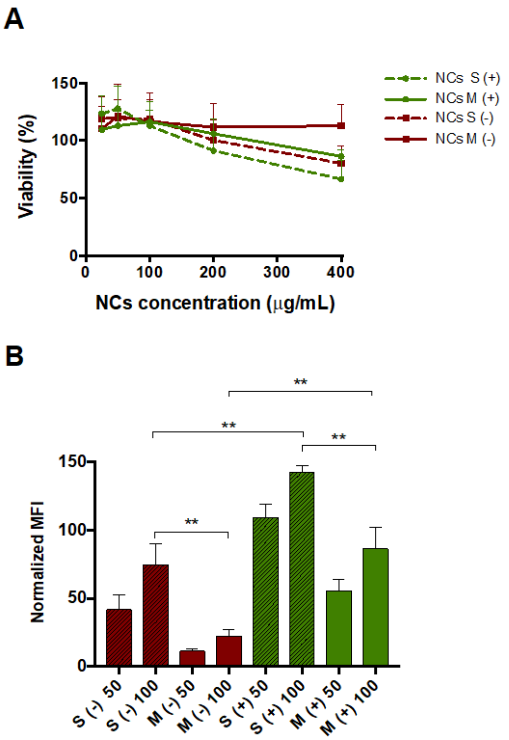


Fig. 1: Cytotoxicity (A) and interaction (B) of the nanocapsules with macrophages.

3.1. Nanocapsules biodistribution in zebrafish

NCs were labeled with DiD to follow their distribution once they were administered in zebrafishes, either by intramuscular or intravenous routes (Fig. 2).

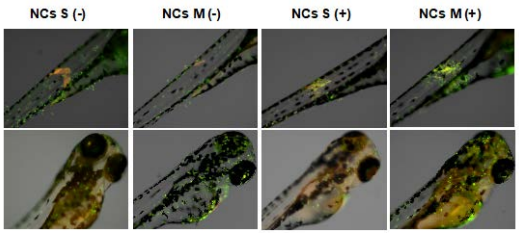


Fig. 2: Biodistribution of the different nanosystems in zebrafish after intramuscular (upper row) and intravenous injection (lower row).

Positive NCs recruited more macrophages after intramuscular injection, especially the medium size ones. Probably a partial aggregation and the positive charge contribute to this recruitment. Besides, the dissemination of the NCs throughout the muscle is much faster in the S NCs, indicating that the small size favors the spreading along the tissue.

4.- Conclusions

The particle size and the surface charge has a clear impact in the uptake by macrophages and the biodistribution of polymeric NCs. Small particles sizes (S) interacted more with macrophages *in vitro* and disseminate in a higher extend *in vivo* than M NCs. Regarding the surface charge, (+) charges favor the interaction and recruitment of macrophages but the dissemination might be slightly more limited compared with (-) NCs.

5.- Acknowledgments

This work was funded by “Ministerio de Economía y Competitividad”. Diseño de nanovacunas terapéuticas basadas en péptidos. Aplicación de la nanotecnología al desarrollo de vacunas para autoinmunidad (NANOT-AID). Refs. BIO2014-53091-C3-1R and 2-R and Grupos de referencia competitiva (ED431C 2017/09, ED431C 2016041, Xunta de Galicia).

6.- References

[1] N. Benne, J. van Duijn, J. Kuiper, W. Jiskoot, B. Slütter, Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines, J. Control. Release. 234 (2016) 124–134.

[2] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions, Colloid Polym. Sci. 275 (1997) 46–53.

[3] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, Biomaterials. 31 (2010) 3657–3666.

[4] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, Nanomedicine. (2016). doi:10.2217/nnm.16.5.

Evaluación de la biosimilitud analítica de fármacos biosimilares: Bevacizumab

Alexis OLIVA MARTÍN [(1)], Matías LLABRÉS MARTÍNEZ [(1)]

1. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38200, La laguna, Tenerife, Spain

Email de contacto: amoliva@ull.edu.es

1.- Introducción

El procedimiento descrito en *Guidance on scientific considerations in demostrating biosimilarity to a reference product* [1] se basa en establecer tres etapas que el producto candidato debe pasar de forma sucesiva: etapa 1, ensayos analíticos y funcionales; etapa 2, ensayos en animal de laboratorio; etapa 3, ensayos clínicos. Los ensayos analíticos y funcionales tienen por finalidad probar la equivalencia de los atributos de calidad, entendiendo por tal aquellos parámetros utilizados en el control del proceso de manufactura y en el control de producto acabado.

El método sugerido por el FDA para probar la equivalencia analítica para los atributos de calidad del nivel 1 se basa en comparar varios lotes del medicamento de referencia (R) y del medicamento biosimilar (T) utilizando un modelo longitudinal de efectos aleatorios [2]. El modelo estadístico utilizado para interpretar las observaciones para el producto de referencia es:

$$X_{Rij} = \mu_R + L_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec.(1)}$$

Donde $L_i \sim N(0,\sigma_L^2)$ es el efecto aleatorio del lote i (i = 1…, m), y $\varepsilon_{ij} \sim N(0,\sigma^2)$ es el error asociado a la determinación j del lote i. La hipótesis nula a ensayar es la de no equivalencia,

$$H_0 : \mu_T - \mu_R \le \delta \quad \text{o} \quad \mu_T - \mu_R \ge \delta \quad \text{Ec.(2)}$$

En el documento del FDA citado se indica además que nk = 1 para i = 1… k, es decir sólo una muestra por lote, para ambos productos, donde el margen de similitud, δ, es una función de σ_R (δ=1,5·σ_R), siendo σ_R la desviación estándar del producto de referencia. El objetivo de este trabajo fue la aplicación del método propuesto por el FDA para la evaluación de la biosimilitud analítica para atributos de nivel 1 utilizando datos reales y simulados de varios lotes comerciales de bevacizumab. Para ello se utilizó el contenido de proteína, expresado como porcentaje del valor declarado, como atributo de nivel 1.

2.- Material y Métodos

En este estudio se incluyeron tres lotes de un producto comercial de bezacizumab con cuatro muestras por lote. El parámetro analizado fue el contenido de proteína; el método de determinación está descrito con detalle en [3].

Para la estimación de los parámetros del modelo, μ_R y σ_R, se utilizó la librería nlme de R [4].

3.- Resultados y Discusión

Para aplicar el test propuesto por el FDA y con fines ilustrativos, se asignó arbitrariamente un número de lote a cada una de las observaciones experimentales (caso #1). En este caso, la μ_R y σ_R obtenidos para el producto R fueron 99.6% y 0,90%, respectivamente (Tabla 1). En este ejemplo, la diferencia de medias $|\mu_R - \mu_T|$ fue de 1,35%. Dado que conocemos μ_R y δ, para el producto R podemos calcular los límites de aceptación para el contenido medio del producto biosimilar (μ_T = 98.26-100.96%). Sin embargo, este resultado varía dependiendo de la variabilidad de los lotes de referencia utilizados en la estimación de σ_R. En la práctica podemos encontrarnos con una paradoja, una situación con una elevada variabilidad no cumpla el ensayo de equivalencia si se utiliza una σ_R estimada

utilizando lotes con una menor variabilidad. Para confirmar este hecho, se realizó una simulación Monte Carlo con el programa R asumiendo una distribución uniforme. En el caso #2, el contenido de proteína varió en el intervalo comprendido entre los dos valores experimentales extremos, mientras que el caso #3, corresponde a los dos valores más próximos al contenido medio. En los dos casos se tomaron 12 valores y se calculó μ_R y σ_R, proceso que se repitió 2000 veces. La Fig. 1 muestra los histogramas obtenidos para ambos parámetros y escenarios. En el caso #2, los valores obtenidos para μ_R y σ_R, fueron 99,5% y 0,85%, respectivamente, mientras que para el caso #3, el contenido medio (μ_R) fue similar al obtenido en los dos casos anteriores, mientras que σ_R fue 0,10%. En este caso, los límites de aceptación para la media del producto biosimilar (μ_T) son mucho más estrechos que los obtenidos en los dos escenarios previos (Tabla 1). Si utilizamos el margen de similitud calculado de acuerdo con el caso #2, solo hay una probabilidad del 86,4% de rechazar la hipótesis nula de no equivalencia considerando el producto biosimilar como el propio producto de referencia. Sin embargo, la probabilidad es solamente del 15,54% cuando utilizamos un margen de similitud de 0,15, obtenido en el caso #3.

Caso	$\hat{\mu}_R$	$\hat{\sigma}_R$	δ	μ_T
#1	99,61	0,90	1,35	98.26-100,96
#2	99,50	0,85	1,28	98,22-100,78
#3	99,66	0,10	0,15	99,51-99,81

Tabla 1. Límites de aceptación obtenidos en los diferentes casos para el contenido medio del producto biosimilar (μ_T).

4.- Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran el impacto que tiene la selección de los lotes del producto de referencia sobre la estimación de σ_R y, en consecuencia, sobre el margen de similitud, penalizando productos biosimilares adecuados.

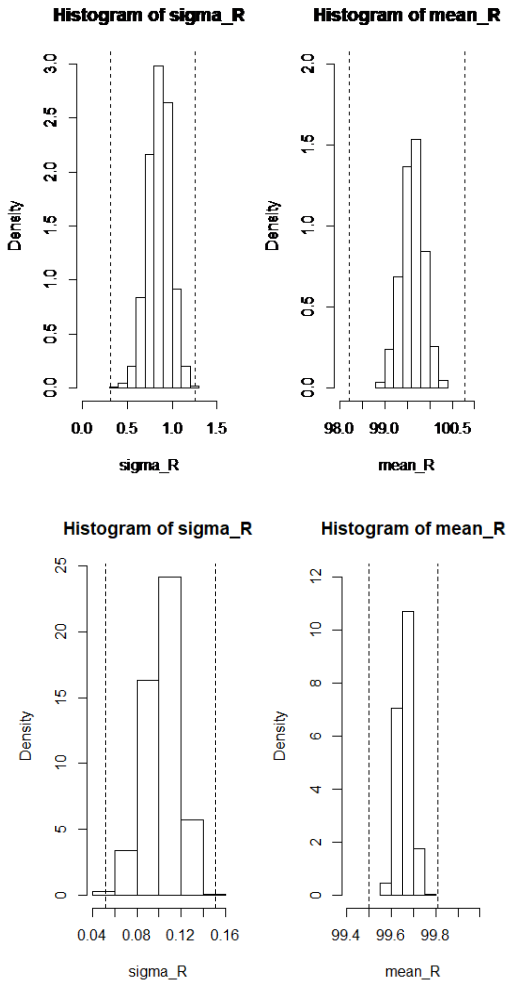


Fig. 1: Histogramas obtenidos para μ_R y σ_R,: caso #2 (superior) y caso #3 (inferior). Las líneas verticales muestran los intervalos de confianza del 95% para σ_R., mientras que para μ_R representa el margen de similitud en función de σ_R.

5.- Referencias

[1] FDA. Guidance on scientific considerations in demostrating biosimilarity to a reference product. US FDA 2015

[2] N. Lair, J. Ware, Biometrics 33, 132-58, 1982.

[3] A. Oliva, J. Fariña, M Llabrés, J. Chromatogr. B 1032, 206-212, 2016

[4] R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing,Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

Diseño y Optimización de nanoestructuras lipídicas mediante herramientas de Inteligencia Artificial

Helena ROUCO [(1)], Patricia DIAZ-RODRIGUEZ [(1)], Santiago RAMA-MOLINOS [(1)], Carmen REMUÑÁN-LÓPEZ [(1)], Mariana LANDIN [(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, Praza Seminario de Estudos Galegos, s/n. Campus sur, 15782 Santiago de Compostela, España.

Email de contacto: helena.rouco@rai.usc.es

1.- Introducción

Los transportadores lipídicos nano-estructurados (NLC) constituyen la segunda generación de nanopartículas lipídicas. Se diferencian de estas en que incluyen un lípido líquido, dando lugar a matrices sólidas con mejor capacidad de carga y estabilidad [1]. El desarrollo de NLC optimizados no es una tarea sencilla, debido al gran número de variables involucradas en su producción.

En este trabajo se propone la aplicación de herramientas de Inteligencia Artificial, de probada utilidad en el diseño y optimización de otras formas farmacéuticas [2,3] en el desarrollo de NLC cargados con rifabutina (RFB). Éstas, no han sido empleadas hasta la fecha en el diseño de nanosistemas lipídicos.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Rifabutina (RFB) (Carbosynth Ltd, UK), Tween® 80 (Sigma Aldrich, Alemania), ácido oleico (Merck, Portugal), Precirol® ATO5 (Gattefossé, Francia), Epikuron® 145V (Cargill, España).

2.2.- Diseño experimental

Se empleó el software Dataform® V3.1 (Intelligensys Ltd, UK) para el establecimiento de un diseño experimental reducido de 5 variables a 3 niveles: porcentaje de lípido líquido (ácido oleico, LL), Tween®80, RFB, Epikuron® 145V y velocidad de agitación (rpm) (Tabla 1). Los porcentajes de LL, Epikuron® 145V y RFB están referidos a 300 mg de matriz lipídica y el Tween® 80 a 10 mL de fase acuosa.

	LL (%)	Tween® 80 (%)	Epikuron® (%)	Veloc. (rpm)	RFB (%)
1	40	1.5	0.5	13400	5
2	57.5	3	1	16800	3.75
3	75	1	0	20400	2.5
4	40	1	0	20400	5
5	75	3	0.5	13400	3.75
6	57.5	1.5	1	16800	2.5
7	40	1.5	0	13400	5
8	57.5	1	1	16800	2.5
9	75	3	0.5	20400	3.75
10	75	1.5	1	13400	5
11	40	3	0	20400	2.5
12	57.5	1	0.5	16800	3.75
13	57.5	1	0.5	13400	3.75
14	75	3	0	20400	2.5
15	40	1.5	1	16800	5

Tabla 1. Condiciones empleadas en la manufactura de NLC.

2.3.- Formulación de NLC

Los NLC se obtuvieron a través de homogenización en caliente, empleando un Ultra-turrax T25 (IKA Labortechnik, Alemania), y posterior enfriamiento de una mezcla constituida por una fase oleosa (RFB, ácido oleico, Precirol® ATO 5) y una fase acuosa (agua purificada, Tween®80, Epikuron® 145V).

2.4.- Caracterización de NLC

El tamaño, índice de polidispersión (PdI) y potencial zeta (ZP) se evaluaron a 25±1ºC en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). La eficiencia de encapsulación (EE) y la carga de fármaco (DL) se determinaron empleando NLC purificadas en columnas Sephadex G-25/PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) mediante HPLC. Esta caracterización se llevó a cabo con NLC recién preparadas y tras un mes de almacenamiento a 5±1ºC.

2.5.- Modelización mediante herramientas de Inteligencia artificial y análisis estadístico

La base de datos obtenida se modelizó empleando dos programas: FormRules® v4.03 (NFL), que genera reglas "IF-THEN" que explican el efecto de las variables en los resultados del proceso, e INForm® v5.01 (ANN/algoritmos genéticos), que permite estimar las condiciones óptimas de formulación. Para confirmar esta predicción, se prepararon NLC con los parámetros optimizados. La caracterización se realizó con los NLC frescos y tras 1 mes de almacenamiento. Estos datos se compararon empleando un ANOVA de una vía (IBM SPSS 24).

3.- Resultados y discusión

3.1.- Caracterización de NLC

Las formulaciones obtenidas presentaron un tamaño de partícula comprendido entre 135.0±0.0 y 387.4±32.3 nm, un PdI entre 0.16±0.03 y 0.33±0.02 y un ZP entre -12.2±2.3 y -20.0±1.3 mV). La EE y el DL variaron considerablemente oscilando entre 51.4±4.0 y 110.6±8.9% y entre 1.2±0.1 y 5.3±0.0%, respectivamente.

3.2.- Modelización mediante herramientas de Inteligencia artificial

FormRules® modelizó de forma satisfactoria todos los outputs estudiados, obteniéndose valores de coeficiente de determinación (R^2) superiores al 70% y valores de f superiores al f crítico en todos los casos, indicando una adecuada predictibilidad y un buen funcionamiento del modelo [2]. Tal y como se puede deducir de las reglas "IF-THEN" obtenidas (datos no mostrados), el tamaño de los NLC varía en función de la cantidad LL, RFB y Tween® 80 empleados. Los porcentajes de LL y Tween® 80 también han mostrado tener influencia sobre el PdI, ZP, EE y DL. Además, este último parámetro se ha visto afectado por la cantidad de fármaco y la velocidad empleada durante la formulación.

Las reglas "IF-THEN" definen un espacio de diseño caracterizado por un alto contenido en LL, una velocidad de agitación suave y un porcentaje intermedio de Tween® 80. Un sistema de este tipo permitiría incorporar un 5% de RFB manteniendo un tamaño y una monodispersión adecuados.

Los modelos generados mediante INForm® presentaron también una adecuada capacidad de predicción. De acuerdo con los mismos, los NLC formulados con un 75% de LL, 1.9% de Tween® 80, 0.5% de Epikuron® 145V, 5% de RFB y una velocidad de 14892 rpm presentarían 152 nm de tamaño, PdI de 0.23, ZP de -19 mV, EE de 100% y DL de 5%. Además, mantuvieron estas propiedades tras un mes de almacenamiento a 5±1ºC. Los NLC obtenidos con estos parámetros optimizados presentaron un tamaño de 176.0±16.5 nm, PdI de 0.22±0.03, ZP de -16.6±0.4 mV, EE de 95.2±2.7% y DL de 4.7±0.1%, confirmando la predicción obtenida mediante INForm®. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las muestras a tiempo cero y un mes, demostrando así la estabilidad de los sistemas.

4.- Conclusiones

La Inteligencia Artificial ha probado ser de gran utilidad para delimitar el espacio de diseño de NLC. Las reglas "IF-THEN" obtenidas mediante NFL facilitaron la comprensión de las interacciones físico-químicas existentes entre los diferentes componentes de las formulaciones, mientras que los modelos de ANN y los algoritmos genéticos posibilitaron la estimación de las condiciones óptimas de formulación para la obtención de NLC con las características deseadas.

5.- Agradecimientos

Programa Interreg V-A POCTEP (0245_IBEROS_1_E) UE (FEDER), Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva, ED431C 2016/008 y ED431C 2017/09-FEDER).

6.- Referencias

[1] M. Muchow, P. Maincent, R.H. Müller, Drug Dev Ind Pharm, 34, 1394-1405, 2008.

[2] R. Rodríguez-Dorado, M. Landin, A. Altai, P. Russo, R.P.Aquino, P. Del Gaudio, Int J Pharm,538, 97-104, 2018.

[3] P. Diaz-Rodriguez, M. Landin, Int J Pharm, 433, 112-118, 2012.

Printfills: 3D printed systems using Fused Deposition Modelling and Injection Volume Filling.

Vicente LINARES, Marta CASAS, Isidoro CARABALLO

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, c/Profesor García González Nº2 41012 Seville, Spain.

Email de contacto: caraballo@us.es

1.- Introduction

Fused deposition modelling (FDM) has become a very attractive technology for development of pharmaceutical systems. Drug release profiles from FDM printed tablets are easily controlled by varying factors such as geometry, polymer selection or drug load [1,2]. However, FDM has the limitation of the impossibility to print thermally sensitive drugs [3] and the need to incorporate the drug to the polymeric filament as a previous step of manufacture. We hypothesize that the integration of FDM with Injection Volume Filling (IVF), which allows incorporating solutions/dispersions at room temperature to the extruded scaffold, could offer an easy, automatized and versatile technology to manufacture tailored drug delivery platforms.

The aim of this work is to design and characterize colon-specific drug delivery systems manufactured in a simple and automated 3D printer which combines two different 3D printing technologies FDM and IVF. This new kind of printed pharmaceutical dosage forms have been called **printfills**: printed systems filled with a liquid or semisolid.

2. - Materials and Methods

2.1.-Materials

Polylactic acid was used as printer filament for FDM (Leon3D, Spain). Hydroxypropyl methyl cellulose Methocel^{TM} K4M (Colorcon LTD., UK) was used to prepare drug loaded hydrogels for IVF. Anhydrous theophylline (Acofarma, Spain) was used as model drug. Eudragit FS30D (Evonik, Germany) was chosen as delayed release polymer.

2.2.-Methods

2.2.1.- Preparation of drug printable ink

HPMC (1% w/v) gel was prepared in hot water (90º C) shaking until a dispersion was formed. The dispersion was cooled for 24 h and volumes of HPMC gel and ethanol (25:75 v/v) were thoroughly mixed. Theophylline was added until complete dissolution (20 mg/ml) [4].

2.2.2.-3D printing process

Printfills were manufactured with a REGEMAT 3D V1 printer (Spain) with FDM and IVF. Printable gel was loaded into a syringe with 0.25 mm diameter tip. The printing settings for FDM were as follows: layer thickness 0.35 mm, perimeter speed 8 mm/s, infill speed 8 mm/s and feeding rate 1.2 mm/s to produce printfills with height of 7.35 mm and diameter of 14 mm. IVF parameters were: deposit speed 1 µl/s, retract speed 1 µl/s and purge 50 µl. Extruded scaffolds were formed by 21 layers, with 4 sealing perimeters and 2 bottom solid layers. A volume of 200 µl of hydroalcoholic drug gel was injected in the extruded structure. 350 µl of Eudragit FS30D dispersion was injected into the top layer of the structure. Printfills were dried at room temperature to evaporate solvent for 24 h.

2.2.3.-Printfills characterization

Printfills were weighted in a precision balance (Scaltec, type SBC31) and thickness and diameter were measured using a digital micrometer. The surface of the printfills was evaluated using a scanning electron microscope (FEI TENEO, USA) at 5 kV.

2.2.4.-Dissolution testing

The dissolution studies were carried out using a USP Apparatus I Sotax AT7 (Allschwil, Switzerland) at 37 ± 0.5 ºC and 50 rpm. The printed systems were firstly exposed to pH 1.2 during 2 hours. After that,

a switch solution was added to achieve pH 7.5. Filtered samples were withdrawn at specific interval times. Drug released was measured in a UV–Vis spectrophotometer at 272 nm. The assay was performed in triplicate. Drug release data ($M_t/M_\infty \leq 0.8$) were analysed according to kinetic equations.

3. - Results and Discussion

3D printed systems have been successfully performed using FDM and IVF. Figure 1 shows FDM extruder and the two syringes of IVF used with drug dispersion and Eudragit FS30D, respectively.

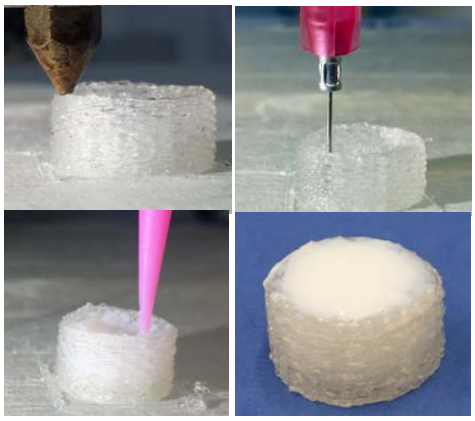


Fig. 1. FDM and IVF technologies of the 3D printer and the final printfill obtained.

Results from physical testing of printfills indicate the accuracy and reproducibility of weight and dimensions of systems made. SEM microphotographs of printed systems confirm the sealing of the structure in the perimeter and the homogeneity of the film performed in the upper side of the scaffold (Figure 2).

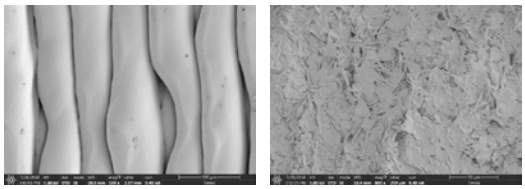


Fig. 2. SEM microphotographs of printfills with detail of sealed perimeters and enteric film.

Mean percentages of drug released are shown in Figure 3. After 2 h in pH 1.2, colonic printed tablets released only 2.3% of theophylline. Once the switch solution was added changing pH to 7.5, drug release suddenly increased. Around 80% of drug release was achieved after 8 h of dissolution test. The obtained results indicate that, after the lag time, drug is released with an intermediate kinetics between zero order and diffusional kinetics, as shown by Korsmeyer time exponent (n=0.8749). Printfills without enteric polymer showed a fast drug release profile with more than 60% of drug dissolved in the first 5 minutes.

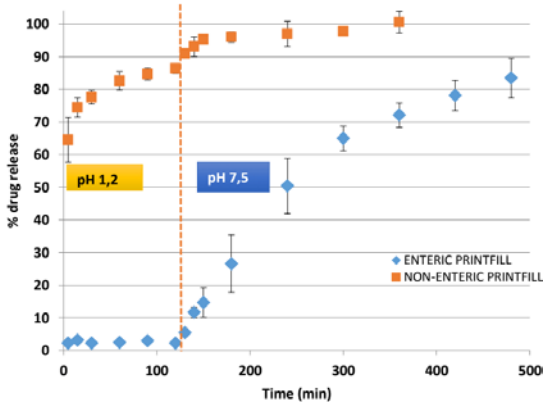


Fig. 3. Mean dissolution profiles from both enteric printfills and non-enteric printfills.

4.- Conclusions

Pharmaceutical dosage forms have been manufactured for the first time with a 3D printer combining Fused Deposition Modelling and Injection Volume Filling. The integration of these two techniques allows an easier incorporation of drug/excipient liquid systems to the extruded scaffold at room temperature, avoiding other intermediate processes. In vitro studies show the ability for colon specific drug delivery of the performed printfills.

5. - Acknowledgments

We thank the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (Project MAT2016-77345-C3-3-P) for financial support.

6.- References

[1] G. Verstraete et al., Int. J. Pharm. 536, 318–325, 2018.
[2] P.R. Martinez et al., Int. J. Pharm. 532, 313–317, 2017.
[3] G. Kollamaram et al., Int. J. Pharm. 545, 144-152, 2018.
[4] V. Linares et al., 11th World Meet. Pharm. Biopharm. Pharm. Technol. 2018.

3D printed PLA scaffolds dually loaded with prednisolone-dexamethasone for regenerative medicine

Xián FARTO-VAAMONDE[(1)], Giulia AURIEMMA[(2)], Rita Patrizia AQUINO[(2)], Angel CONCHEIRO[(1)], Carmen ALVAREZ-LORENZO[(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R+D Pharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
2. Department of Pharmacy, University of Salerno, Via Giovanni Paolo II 132, 84084 Fisciano (SA) Italy

Email de contacto: xianfartov@gmail.com

1.- Introduction

Bone is the second most commonly transplanted tissue worldwide. Limitations in donors availability and risk of immune rejection of allografts have prompted research on bone scaffolds that act as temporary extracellular matrix, providing structural support while guiding cell attachment, proliferation and differentiation [1]. Compared to conventional techniques, fused deposition modelling (FDM) 3D printing has the advantages of more precise pore size and distribution, high interconnectivity and high mechanical strength [2]. Additionally, the scaffolds can be personalized to each patient regarding shape, drugs and doses.

The aim of this work was to elucidate the influence of the mode of incorporation of prednisolone (an anti-inflammatory drug) and dexamethasone (an osteoinductive agent) on the drug release profile from poly(L-lactic acid) (PLA) porous bone scaffolds prepared using FDM 3D printing. Two strategies to load the drugs were investigated: (i) soaking of raw PLA filaments into a drug solution; and (ii) soaking of the preformed 3D scaffold into the drug solution. Finally, dually loaded scaffolds were prepared by combining these two strategies, obtaining scaffolds with tunable drug release profiles.

2.- Materials and Methods

2.1.- Scaffold Preparation

PLA porous scaffolds were prepared using a commercial FDM 3D printer (Regemat3D, Spain). A cylindrical template (.stl file) was designed as follows: diameter = 10 mm, height = 5 mm, pore size = 0.6 mm, layer height = 0.35 mm, and total layers = 14. The infill pattern was diagonal. The printer was equipped with a nozzle of 0.41 mm in diameter and set at extrusion temperature of 220 °C.

2.2.- Drug Loading

Drug loading was performed by soaking either raw PLA filaments or 3D printed blank scaffolds in a solution of prednisolone (5% w/v) or dexamethasone (1% w/v) in methanol/ethyl acetate 50:50 vol/vol mixture at 37ºC for 24 h under oscillatory movement. Loaded PLA filaments were fed into the 3D printer to produce loaded scaffolds, which were named as FPred#S2 or FDex#S2. Scaffolds loaded after printing were named as S2Pred or S2Dex. Dually loaded scaffolds were prepared by first soaking raw PLA filaments in the solution of dexamethasone, print them into scaffolds and finally soaking the produced scaffolds in the prednisolone solution (2.5% w/v) for 15 min. These scaffolds were designed as FDex#S2Pred.

2.3.- Scaffolds Characterization

Morphological analysis was conducted with an Olympus SZ-CTV optical stereo microscope (Tokyo, Japan) and with FESEM (Ultra Plus, Zeiss, Germany).

Mechanical properties were studied using a TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) by applying successive compression cycles along their short axis (20 Kg force, cylinder probe 20 mm, movement 0.5 mm/s).

2.3.- Drug Release

Drug release studies were carried out, in triplicate, in PBS pH 7.4 - ethanol (30:70 v/v) under sink conditions at 37ºC and 50 rpm. At predetermined times, 1 mL samples were withdrawn and drug concentrations were determined in a Waters 996 HPLC equipment with a Sunfire C18 column, using mobile phase water-methanol (40:60 v/v), flow 1 mL/min, Tª 40ºC. Absorbance was measured at 242 nm.

3.- Results and Discussion

3.1.- Scaffold Preparation

3D drug-loaded scaffolds were prepared by means of FDM 3D printing using two different strategies: either loading raw PLA filaments that were then printed, or first printing a blank scaffold to subsequently load it. Methanol-ethyl acetate 50:50 vol/vol was chosen as solvent since this mixture dissolve the drugs and swell PLA without dissolving it.

3.2.- Scaffold Characterization

Scaffolds showed a good reproducibility and the main difference between them was seen in their color (Figure 1).

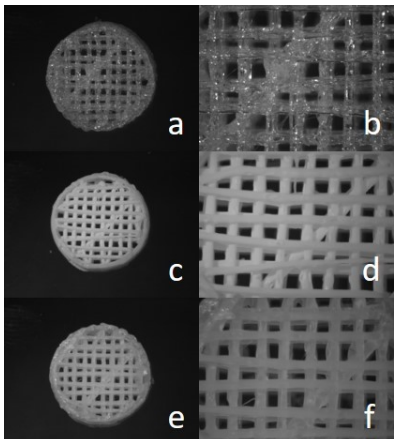


Fig. 1: Steromicroscopy images of dexamethasone-loaded scaffolds at 1.5X and 4x magnifications: FDex#S2 (a-b), S2Dex (c-d) and FDex#S2Pred (e-f).

All the scaffolds showed a linear elastic behaviour, without temporary nor permanent deformations being observed. In general, mechanical properties were similar to those of bone tissue.

3.3.- Drug Release

Scaffolds prepared with loaded filaments provided a very sustained release as the drug is trapped inside the filament. Differently, scaffolds loaded once printed showed a burst release of the drug since it is mainly located on the surface of the scaffold. Dually-loaded scaffolds showed fast release of prednisolone and sustained release of dexamethasone (Figure 2).

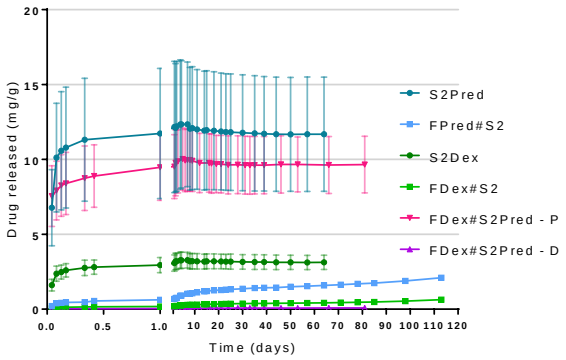


Fig. 2: Drug release profiles of the different scaffolds in PBS pH 7.4 - ethanol (30:70 v/v).

4.- Conclusion

The designed scaffolds show high reproducibility and good mechanical properties. The loading procedure determines drug release pattern, from burst to sustained release. Both loading strategies can be used to obtain dually-loaded scaffolds that show a combination of the two release patterns. This can be helpful for tuning bone remodeling through an adequate distribution of different drugs in the scaffold.

5.- Acknowledgements

This work was supported by MINECO (SAF2017-83118-R), Xunta de Galicia (ED431C 2016/008), AEI and FEDER.

6.- Referencias

[1] A.V. Do, B. Khorsand, S.M. Geary & A.K. Salem. Advanced healthcare materials, 4, 1742-62, 2015.

[2] S. Wüst, R. Müller & S. Hofmann. Journal of functional biomaterials, 2, 119-154, 2011.

[3] B. D. Ulery, L. S. Nair & C. T. Laurencin. Journal of polymer science Part B: polymer physics, 49, 832-864, 2011.

Transporte de fluidos en andamiajes porosos: influencia de la conectividad de los poros

Víctor SANTOS-ROSALES [(1)], Carlos A. GARCÍA-GONZÁLEZ [(1)], José Luis GÓMEZ-AMOZA[(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Grupo I+D Farma (GI-1645), Facultad de Farmacia e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña

Email de contacto: victor.santos.rosales@rai.usc.es

1.- Introducción

La funcionalidad de los andamiajes utilizados en ingeniería de tejidos se encuentra fuertemente condicionada por la arquitectura de su red porosa. La porosidad, la distribución de tamaños de poro y su interconectividad, parámetros utilizados habitualmente para caracterizar la estructura porosa de estos sistemas, son determinantes a la hora de facilitar la infiltración de células y el transporte de fluidos que suministren los nutrientes necesarios para su supervivencia [1]. Independizar los efectos, sobre estas propiedades, de la conectividad de los poros del de los otros parámetros es, en la práctica, irrealizable dada la estrecha relación existente entre ellos. Una alternativa consiste en modelizar estructuras que presenten diferentes conectividades manteniendo constantes los valores de los otros parámetros. El objetivo de este trabajo es modelizar estas estructuras y cuantificar los efectos de la conectividad de los poros sobre las propiedades de transporte de fluidos a través de estas estructuras porosas. Dicho estudio se aplica al procesado de un andamiaje de ε-policaprolactona (PCL) por espumado supercrítico con propiedades de conectividad optimizadas.

2.- Métodos

2.1.- Diseño de las estructuras

Se diseñaron, utilizando el software PoreXpert v 1.6.567, estructuras cúbicas constituidas por 1000 poros de forma cúbica unidos por estrangulamientos de forma cilíndrica. La porosidad de estas estructuras se fijó en 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 y, para cada una de ellas, se ensayaron 4 valores de conectividad: 0.50, 0.67, 0.83 y 0.92 (la conectividad es igual a 1 si de cada poro cúbico sale un estrangulamiento en las direcciones $\pm x$, $\pm y$ y $\pm z$). En todos los casos, el tamaño medio de los estrangulamientos fue 20.22 micras mientras que el de los poros cúbicos (utilizados para ajustar el valor de porosidad) osciló entre 121.81 y 178.64 micras.

2.2.- Caracterización de las estructuras

Se estimó la permeabilidad, de acuerdo con lo indicado en [2], asumiendo que el flujo tiene lugar en la dirección $-z$. La captación de agua por las estructuras se estimó aplicando la ecuación de Bosanquet de acuerdo con la metodología descrita en [3].

2.3.- Procesado y caracterización de andamiaje por espumado supercrítico

Andamiajes de PCL fueron procesados en presencia de CO_2 supercrítico (39 ºC, 140 bar). Tras un tiempo de contacto de 5 h con CO_2 y despresurización posterior a 1.8 g/min, se obtienen andamiajes porosos caracterizados por porosimetría de intrusión de mercurio y microtomografía de rayos X.

2.4.- Análisis estadístico

Los datos de permeabilidad (P) y de captación de agua (A) se ajustaron por regresión lineal múltiple secuencial (Statistica 8.0, StatSoft Inc) a un modelo cuadrático en el que las variables independientes son la porosidad (e) y la conectividad de los poros (c).

3.- Resultados y discusión

En la Fig 1 se presenta, a modo de ejemplo, la estructura modelizada correspondiente a una porosidad de 0.3 y una conectividad de

0.83 y las distribuciones de conectividad para las estructuras modelizadas con este valor de porosidad (para los otros valores de porosidad las distribuciones de conectividad son similares).

La permeabilidad indica la capacidad de un material para permitir el paso de un fluido [4]. De la observación de la Fig 2, que presenta los resultados obtenidos para este parámetro, se deduce que la conectividad de los poros condiciona en mayor medida la permeabilidad que la porosidad.

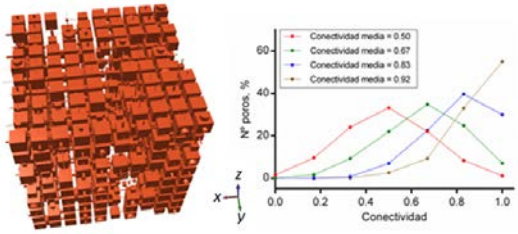


Fig 1. Estructura modelizada con porosidad 0.3 y conectividad 0.83 (izda) y distribuciones de la conectividad de los poros (dcha).

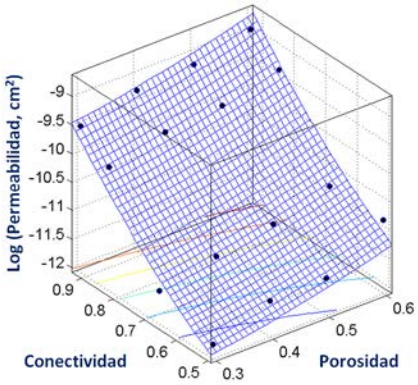


Fig 2. Superficie de respuesta correspondiente a la permeabilidad (los puntos representan el valor medio de los valores estimados para cada una de las condiciones). La ecuación ajustada es:
$Log(P) = -13.09 + 2.45\ e^2 + 3.95\ c^2$;
$F_{1,\ 14\ g.l.} = 86.15$; $\alpha < 0.01$; $R^2 = 0.930$

La velocidad a la que se satura de fluido el medio poroso está muy condicionado por la conectividad de los poros (Fig 3) hasta el punto que, cuando la conectividad es elevada, esta velocidad es prácticamente independiente de la porosidad del sistema.

En base a estos análisis se prepararon andamiajes de PCL (Fig 4) con alta conectividad de poro (90%) y porosidad (70%) por espumado supercrítico. Además, la distribución de tamaños de poro es unimodal y en torno a 400-500 µm, resultando en una capacidad de infiltración celular de un 93%. La combinación de estos efectos resultará en un andamiaje con propiedades adecuadas para colonización celular y para el transporte de fluidos para suministro de nutrientes.

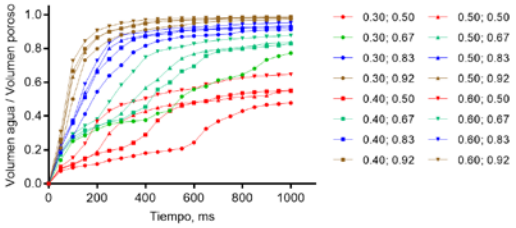


Fig 3. Fracción de volumen poroso ocupado por agua en función del tiempo para las distintas estructuras modelizadas (la leyenda indica la porosidad y, a continuación, la conectividad de los poros).

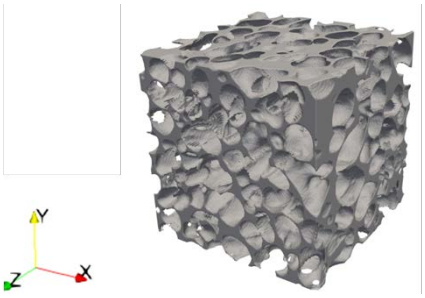


Fig 4. Reconstrucción 3D a partir de datos de microtomografía de andamiaje de PCL obtenido por espumado supercrítico. Lado cubo: 3 mm.

4.- Agradecimientos

Proyecto financiado por Xunta de Galicia [ED431C 2016/008 & ED431F 2016/010], MINECO [SAF2017-83118-R], AEI y FEDER. V. S.-R. agradece a la Xunta de Galicia (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria) por una ayuda predoctoral [ED481A-2018/014]. C.A. G.-G. agradece al MINECO por una ayuda Ramón y Cajal [RYC2014-15239].

5.- Referencias

[1] G.S. Offeddu et al, *Acta Biomaterialia*, 41, 193-203, 2016.

[2] L. Nogueiras-Nieto et al, *Journal of Controlled Release*, 156, 337–344, 2011.

[3] A. Gómez-Carracedo et al, *International Journal of Pharmaceutics*, 388, 101–106, 2010.

[4] M.R. Dias et al, *Journal of Biomechanics*, 45, 938-944, 2012.

Esponjas de quitosano-gelatina como andamios celulares para el tratamiento y prevención de la Osteomielitis

Patricia DIAZ-RODRIGUEZ[(1)], Lidia CASANOVAS SANTOS[(1)], Xosé Antón VÁZQUEZ-ÁLVAREZ[(2)], Mariana LANDIN[(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidadade de Santiago de Compostela, Praza Seminario de Estudos Galegos s/n 15782 Santiago de Compostela, España
2. Departamento de Tecnología de los Alimentos, Instituto de Investigaciones Marinas, Centro Superior de Investigaciones Científicas, C/Eduardo Cabello Nº 6 36208. Vigo, España

Email de contacto: patricia.diaz.rodriguez@usc.es

1.- Introducción

El hueso es un órgano esencial del organismo que juega un importante papel en la protección, el movimiento y el soporte de otros órganos vitales [1]. Representa además el segundo tejido más trasplantado después de la sangre [2]. A pesar de los avances producidos en cuanto a la profilaxis de la infección durante la cirugía, la infección ósea (osteomielitis) postoperatoria continúa siendo un problema relevante en la práctica ortopédica y dental [3].

Para el tratamiento de las osteomielitis crónicas generalmente es necesario el desbridamiento de los tejidos infectados y el relleno del espacio muerto con tejido blando y sistemas de liberación de antibióticos mediante cirugía. La utilización de sistemas de poli(metilmetacrilato) cargados con antibióticos es la estrategia terapéutica más empleada. Sin embargo, estos dispositivos requieren de un proceso quirúrgico posterior para su eliminación lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas tecnológicas basadas en la vehiculización de antibióticos como relleno óseo [4].

El objetivo del presente trabajo es obtener sistemas de liberación de antibiótico capaces no solo de evitar o erradicar la osteomielitis sino también de permitir la colonización celular y la regeneración ósea.

2.- Materiales y métodos

Para el desarrollo de los sistemas se propone emplear pellets biodegradables formados por mezclas de Resomer LC703S® (LC: Evonik) y Polietilenglicol 6000 (PEG: Merk) cargados con ciprofloxacino (Fagron) obtenidos mediante extrusión por fusión en un equipo de tornillo simple. Se emplearon proporciones variables de LC:PEG (80:20, 70:30) en la elaboración de los pellets con la finalidad de modular la cesión de fármaco en función de los requisitos de la formulación. Se evaluó la distribución de tamaño de los pellets y se caracterizaron mediante DSC.

Con el fin de lograr estructuras tridimensionales capaces de promover el crecimiento celular, se emplearon los pellets como moldes para la obtención de esponjas de quitosano-gelatina (extraídos de recursos marinos) como se muestra de manera esquemática en la Figura 1A. Para la producción de los moldes, se fundieron parcialmente los pellets utilizando acetona y calor y se caracterizaron tras este proceso en cuanto a su porosidad total. Su aspecto se muestra en la Figura 1B.

Obtenidos los moldes, se adicionó una solución polimérica sobre éstos, que contenía una mezcla en proporción 2:3 de quitosano al 2% p/v en 1% v/v de ácido acético y gelatina al 2% p/v en agua desionizada con 0.1% v/v de glutaraldehído (Sigma Aldrich). Se incubaron las estructuras durante 10 minutos a 50ºC. Una vez reticuladas, se congelaron y liofilizaron las muestras, obteniéndose las estructuras de la Figura 1C. Se caracterizó su porosidad, actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y cesión de fármaco en PBS a 37ºC.

3.- Resultados y discusión

De manera exitosa se han obtenido extruidos biodegradables de LC:PEG capaces de incorporar ciprofloxacino sin promover su degradación.

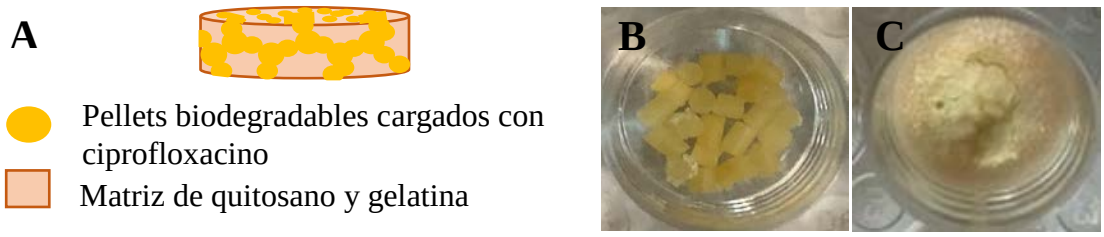


Fig. 1 A) Esquema de la estructura de los andamios, B) Molde formado por pellets biodegradables obtenidos mediante extrusión por fusión, C) Estructura final del andamio.

El empleo de proporciones variables de ambos polímeros, con temperaturas de fusión tan diferentes de acuerdo con la caracterización DSC, ha hecho necesario ajustar las condiciones de extrusión para cada una de las mezclas elaboradas.

Los pellets obtenidos a partir de los extruidos se caracterizaron por poseer un diámetro medio de 1.74 mm y una longitud media de 1.86 mm no observándose diferencias significativas en función de la composición.

Las esponjas quitosano-gelatina sin pellets se caracterizaron por poseer una porosidad mayor del 95 ± 1%. La incorporación de los pellets biodegradables reduce su porosidad, observándose valores próximos al 50%, similar para todas las composiciones.

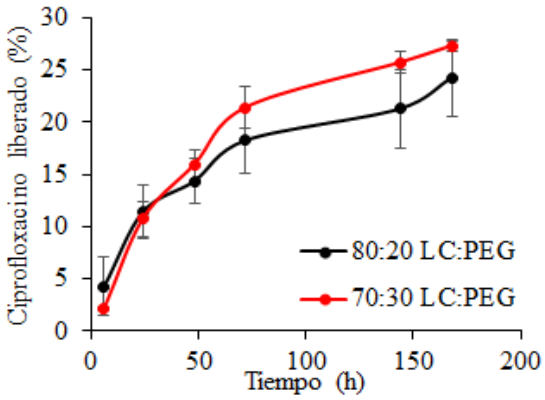


Fig. 2 Perfiles de liberación de los andamios conteniendo pellets cargados con ciprofloxacino y proporciones variables LC:PEG.

En la Figura 2 se muestran los perfiles de liberación de ciprofloxacino a partir de los andamios desarrollados. Tanto los sistemas formados con proporciones LC:PEG 80:20 como 70:30 siguen una cinética de liberación de Higuchi ($r^2 \geq 0{,}92$) lográndose una cesión sostenida del principio activo que no llega a alcanzar el 30% a los siete días.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los andamios cargados frente a *Staphylococcus aureus*. Se observaron halos de inhibición de 3,20 ± 0,11 mm y 3,57 ± 0,21 mm para andamios 80:20 y 70:30 respectivamente. Por el contrario, las esponjas y andamios control no mostraron ningún efecto antibacteriano.

4.- Conclusiones

Los sistemas desarrollados presentan unas adecuadas propiedades físicas y terapéuticas y se postulan como prometedoras alternativas para el tratamiento y prevención de la osteomielitis. Además, la composición polimérica de las esponjas, quitosano y gelatina, debería permitir la adhesión y colonización celular de los sistemas.

5.- Agradecimientos

Programa Interreg V-A POCTEP (0245_IBEROS_1_E) UE (FEDER).

6.- Referencias

[1] J.R. Porter, T.T. Ruckh, K.C. Popat. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnology Progress, 25, 1539-1560, 2009.

[2] M.A. Fernandez-Yague, S.A. Abbah, L. McNamara, D.I. Zeugolis, A. Pandit, M.J. Biggs. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies. Advanced Drug Delivery Reviews, 84, 1-29, 2015.

[3] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola. The significance of the infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. Biomaterials, 27, 2331-2339, 2006.

[4] J.A. Inzana, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. Biomaterials, 81, 58-71, 2015.

Effect of the ultrastructure of fibroin/dextran films on the controlled release of proteins

Jose Manuel AGEITOS, Amelia PULGAR, Noemi CSABA, Marcos GARCIA-FUENTES

Centre for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) and Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Universidade de Santiago de Compostela, Avda. Barcelona s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Email de contacto: josemanuel.ageitos@usc.es

1.- Introduction

For many drug delivery applications, the devices need to be formed of biocompatible materials that are also preferably biodegradable. In the case of microporous materials, most of the biocompatible materials are suboptimal for drug delivery because they cannot control drug release or/and they require organic solvents for film preparation. Silk-based materials have attracted attention in this area due to their versatility, and excellent safety record [2]. SF can be combined with other polymers [3] and processed in several forms and methods, including some performed entirely in aqueous environments [4,5]; Dextran sulphate (DSS) is a complex, branched anionic polymer of anhydroglucose, which has the ability to form complexes with cationic polymers, stabilize many proteins and to increase the loading efficiency of certain drugs, thus, SF/DSS blend is an ideal material for the development of green medical technologies.

In the current study, we evaluate the effect of the anionic biopolymer dextran sulphate on the physical properties of SF/DSS blend films formed by a green, water-only method, and how it affects the molecular and microscopic structure of the system and its capacity for providing controlled release of a model protein, the horseradish peroxidase II (HRP).

2.- Materials and methods

SF was purified from silkworm cocoons as previously described [3–5], and several blend SF/DSS ratios were employed for film formation. SF solutions were left to dry overnight in a fume hood. SF/DSS films were water-annealed in a sealed chamber saturated with water-vapor for 12 h to induce β-sheet formation. The changes on the structure of SF/DSS films were studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR, VARIAN FT-IR 670) and field emission scanning electron microscopy (FESEM, UltraPLus, Carl Zeiss). We also tested the physical and chemical properties of the different films, both as prepared and after incubation in simulated physiological medium. HRP was labelled with fluorescein isothiocyanate and HRP release from the SF blend films was investigated (EnVision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer) and fitted to different mathematical kinetic models. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

3.- Results and discussion

We have found that DSS forms nano and microdomains in SF, resulting into micro- and nanostructured films (Fig. 1) with different physical and structural properties. DSS acted as a functional porogen upon exposure to aqueous media forming sponge like structures. Besides, DSS catalysed the formation of β-sheets in SF, a secondary structure related with water insolubility and high mechanical performance. Those water-annealed films had β-sheet contents comparable to methanol processed materials [6]. The size of nano- and microdomains varied with the blend ratio employed (Fig. 1A). High blend ratios showed a higher swelling ratio (Fig. 1B), porosity, and β-sheet content. They also resulted in slower mass loss rate and modified protein release kinetics as compared to pure SF films (Fig. 1C). Since HRP has affinity for DSS, SF/DSS blend films can operate as a complex drug release material combining prolonged release kinetics and the capacity to protect and stabilize labile bio pharmaceuticals.

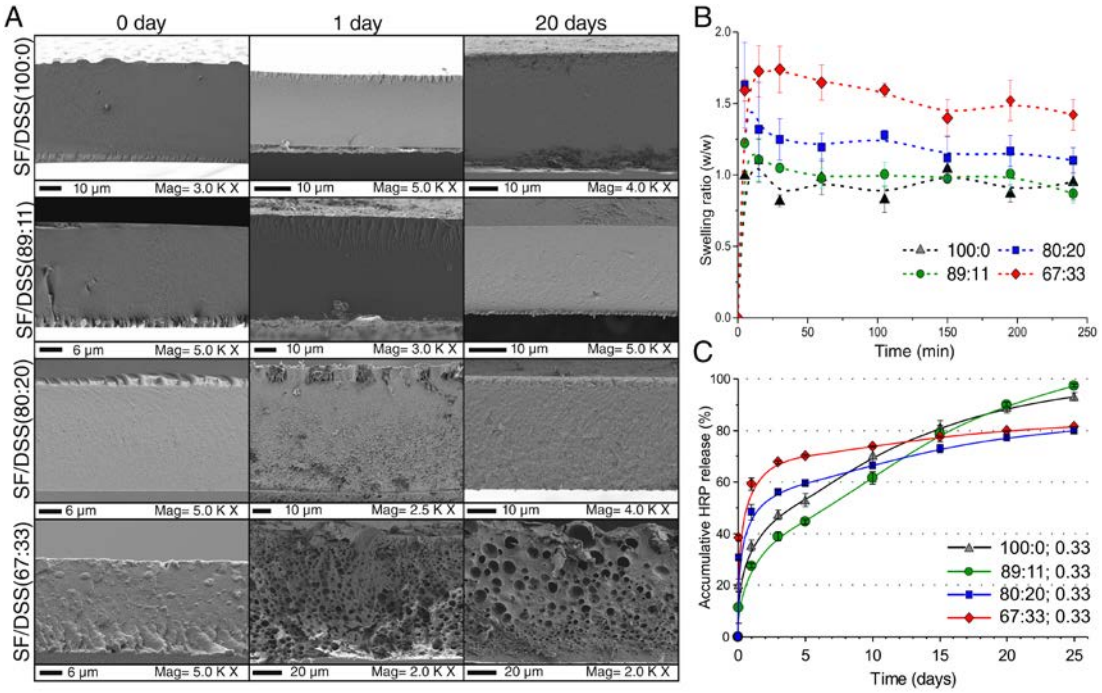


Fig. 1: A. Scanning electron micrograph of SF/DSS blend films sections before and after immersion in liquid media. B. Time course studies of the swelling ratio of SF/DSS blend films in solution C. Cumulative release profile of FTIC-HRP loaded (0.33% of SF) SF/DSS films.

3.- Conclusions

We have found that DSS forms nano and microdomains in fibroin, and depending on concentration, act as active porogens and as modifiers of SF structure. Blend ratio modulates physicochemical properties of SF/DSS matrices. Moreover, we found that it is possible to modulate protein release kinetics in SF film matrices by changing their DSS content. SF/DSS blends represent a highly flexible system for sustained protein delivery with added value as compared to pure SF films.

4.- Acknowledgements

This work was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-58189-R, FEDER Funds; MAT2017-84361-R, FEDER Funds) and and Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva, FEDER Funds).

5.- References

[1] M.K. Kim, H.W. Kwak, H.H. Kim, T.R. Kwon, S.Y. Kim, B.J. Kim, Y.H. Park, K.H. Lee, Surface modification of silk fibroin nanofibrous mat with dextran for wound dressing, Fibers Polym. 15, 1137–1145, 2014.

[2] M. Yang, Y. Shuai, W. He, S. Min, L. Zhu, Preparation of Porous Scaffolds from Silk Fibroin Extracted from the Silk Gland of *Bombyx mori* (*B. mori*)., Int. J. Mol. Sci. 13, 7762–75, 2012.

[3] M. Garcia-Fuentes, A.J. Meinel, M. Hilbe, L. Meinel, H.P. Merkle, Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering, Biomaterials. 30, 5068–5076, 2009.

[4] T. Yucel, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials for sustained drug delivery, J. Control. Release. 190, 381-397, 2014.

[5] X. Hu, K. Shmelev, L. Sun, E.S. Gil, S.H. Park, P. Cebe, D.L. Kaplan, Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing, Biomacromolecules. 12, 1686–1696, 2011.

[6] S. Hofmann, C.T. Wong Po Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, H.P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, J. Control. Release. 111, 219–227, 2006.

Necesidad de la Formulación Magistral como herramienta de tratamiento en la práctica de la Clínica Veterinaria

Gema J. CABAÑERO RESTA[(1)], M. GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(3)], I. GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(3)], Virginia MERINO SANJUÁN[(1,2)]

1. Departament de Farmacia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de Valencia Avda Vicente Andrés Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia.
2. Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València.
3. Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad Miguel Hernández, Carretera Valencia-Alicante km 87, 03550, San Juan de Alicante, Alicante.

Email de contacto: gema.cabanero.resta@gmail.com

1.- Introducción

La Formulación Magistral es una rama del ámbito farmacéutico en la cual el profesional (farmacéutico o profesional sanitario bajo su dirección) es capaz de elaborar tratamientos individualizados para pacientes concretos. [1]. Aunque ésta ha sido usada sobre todo para el tratamiento de ciertas patologías o grupos de población en medicina humana (pediatría, enfermedades raras, cosmética, etc.) [2-3], también puede presentar elevado interés en el campo veterinario.

El objetivo del presente trabajo es revisar aspectos relacionados con la necesidad de formulación individualizada en animales y el grado de conocimiento del profesional farmacéutico en este campo.

2.- Materiales y Métodos

Revisión bibliográfica de artículos científicos, páginas de organismos oficiales, revistas de difusión, tanto farmacéuticas como veterinarias, e informes económicos sobre productos veterinarios y formulación magistral en veterinaria.

3.- Resultados y discusión

El problema para formular en la clínica veterinaria radica en que los mecanismos de eliminación de fármacos en los animales pueden llegar a ser muy diferentes a los valorados en humanos, con marcadas diferencias entre especies. A su vez cabe la posibilidad de que llegue a ser diferente entre las distintas razas de la misma especie, con las dificultades para hallar los excipientes adecuados que eso conlleva, entre otros obstáculos [4]. El sector de los animales de consumo humano presenta además una problemática adicional, ya que es imprescindible la consideración de que el medicamento administrado no sea perjudicial para la salud humana [5]. Por ello, es esencial que el formulista conozca la especie a la que va dirigido, el tipo de producto que se está usando y para qué se usa. Esto no resulta fácil ya que en España la formulación veterinaria no es demasiado usada, bien por falta de conocimiento de las facilidades que ofrece, o bien porque la legislación actual no resulta clara. Recientemente, desde Facultades, Colegios profesionales y proveedores se está intentando ofrecer más formación en este aspecto, puesto que hasta hace relativamente poco no se realizaban formaciones adaptadas para cubrir las necesidades del sector veterinario, ni se encontraba la materia prima adecuada para dar servicio al mismo.

Según el "Informe sobre la situación socioeconómica y laboral del sector veterinario de animales de compañía en España", se aprecia que la facturación del medicamento veterinario ha ido creciendo en los últimos años [6]. En otros países también se prevé que esta demanda siga aumentando.

Con respecto a la formulación, un estudio de mercado publicado en Junio de 2018 indica que "Norte América y otras regiones de la FDA registrarán un aumento del 7% desde ahora hasta 2024. Además de mostrar como

en un futuro no muy lejano, en Canadá, USA y otros países de la FDA, las 2/3 partes del mercado global en términos de ventas serán correspondientes a formulación veterinaria" [7].

En España, la formulación en veterinaria sólo está permitida en animales de compañía y caballos de uso deportivo, y en caso de que tras seguir la cascada de dispensación, el veterinario no encuentre un medicamento adaptado a las necesidades del animal a tratar, ni autorizado en España, ni en Europa, ni de uso humano; es decir, se halle ante un vacío terapéutico [8]. Un ejemplo de ello podría ser el Trilostano en cápsulas, usado para el tratamiento del Síndrome de Cushing, que aunque esté disponible a diferentes dosis como medicamento comercializado (Vetoryl®), en ocasiones no coinciden con las dosis que el animal necesita (por peso, por necesidad ajuste de dosis mes a mes, etc.).

4.- Conclusiones

La necesidad de considerar el bienestar animal está aumentando y se debe contemplar la formulación magistral como arsenal terapéutico adaptado a cada raza, peso y particularidades metabólicas, como ya se hace en otros países, donde hay farmacias íntegramente dedicadas a ella [9].

Para ello, sería necesario una comunicación estrecha entre profesionales farmacéuticos y veterinarios con el fin de conseguir mejorar la calidad asistencial a los animales. El profesional elaborador necesita incrementar sus conocimientos sobre las necesidades específicas que puedan tener los distintos grupos de animales a tratar, como pueden ser las intolerancias hacia los diferentes excipientes/productos; mientras que el profesional veterinario prescriptor debe ser consciente de las facilidades y posibilidades que el tratamiento individualizado ofrece. De esta manera, colaborando de forma conjunta, se podrían establecer unas buenas pautas de calidad, seguridad y eficacia en la formulación de este tipo de preparados.

Por su parte, desde los Colegios Profesionales, debería cuidarse más la formulación [10] y para ello se deberían de poder ofrecer servicios adaptados a la misma, como facilitar el acceso por parte de los colegiados a bases de datos de formulación internacional, realizar formaciones adecuadas y adaptadas a las circunstancias actuales y construir los puentes de comunicación entre los diferentes sectores.

5.- Referencias

[1] Ley 29/2006 de Garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. «BOE» núm. 178, de 27/07/2006.

[2] E. de Benito, "Llegamos donde la industria del medicamento no lo hace. Farmacéuticos de hospital recurren a fórmulas magistrales para tratar enfermedades raras", Madrid, 8 Oct. 2017, El País Digital.

[3] C. Martínez Fdez-Llamazares, "La Formulación Magistral en España, una opción de futuro", Grupo de Trabajo de Formulación Magistral, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. ISSN 0567-7114, Nº503 (DIC), 2010, pág. 54-56.

[4] Jhon D. Ruiz.B. M.V." Factores fisiológicos que modifican la acción de los fármacos en medicina veterinaria", Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín. Colombia, Rev Col Cienc Pec Vol. 14: 1, 2001.

[5] G. Davidson, "Veterinary Compounding: Regulation, Challenges, and Resources", Clinical Pharmacy Services, North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, Raleigh, NC 27607, USA, 2017.

[6] O. Gutiérrez aragón, G. Berbel Giménez, "Informe sobre la situación socioeconómica y laboral del sector veterinario de animales de compañía en España, el deterioro de la profesión tras el incremento del IVA y propuesta de soluciones", E.U. Mediterrani, 21 de Febrero de 2018, Informe CEVE.

[7] https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-animal-health-market

[8] D. Flores, E. Abarca. "La formulación de medicamentos individualizados en veterinaria. Aspectos legales relevantes", Clin. Vet. Peq. Anim, 2017, 37 (1): 7 – 14, AVEPA.

[9] http://www.uscompoundingvet.com/

[10] Grupo de trabajo del CGCOF, Rev. Farmacéuticos, Vol.428, pág. 24, Jul-Agosto 2017.

In situ gelling artificial tear for dry eye disease treatment

José J. LÓPEZ-CANO [1,2], Duygu ACAR [1], María CABALLO-GONZÁLEZ, Manuel GUZMÁN-NAVARRO [3], José M. BENÍTEZ-DEL-CASTILLO [2,4], Rocío HERRERO-VANRELL [1,2], Irene T. MOLINA-MARTÍNEZ [1,2]

1. Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology, InnOftal (UCM920415), Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain
2. Sanitary Research Institute of the San Carlos Clinical Hospital (IdISSC) and the Ocular Pathology National Net (OFTARED) of the Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain
3. Biomedical Sciences Department, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Unit, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain
4. Ocular Surface and Inflammation Unit, San Carlos Clinical Hospital, Madrid, Spain

Contact e-mail: josejavl@ucm.es

1.- Introduction

Artificial tears are widely employed in the treatment of dry eye disease (DED). The artificial tear formulations currently available in the market generally have a short ocular residence time, requiring repeated daily administration.

This study aimed at developing an artificial tear formulation with *in situ* gelling properties to provide an extended ocular residence time. Antioxidant and osmoprotectant components were incorporated into the formulation for their beneficial effects in the treatment of DED. The tolerance of the artificial tear was assessed in animals.

2.- Materials and methods

2.1.- Preparation and characterization of the artificial tear

The unpreserved artificial tear prepared in this study contained the *in situ* gelling polymer gellan gum, hydroxypropyl methylcellulose, trehalose, levocarnitine, vitamin C, electrolytes and borates. The formulation was characterized in terms of its physicochemical properties: pH, osmolarity, surface tension, and viscosity. The rheological studies were performed with rotational and oscillatory measurements after mixing the formulation with simulated tear fluid [1].

2.2.- *In vivo* tolerance studies

In vivo tolerance studies of the artificial tear were performed by macroscopic evaluation and grading of clinical signs (from 0 to 2) in rabbits (n=6), in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research, according to the protocol described previously by Enríquez de Salamanca et al. [2].

3.- Results and discussion

3.1.- Characterization of the artificial tear

The artificial tear had a neutral pH and a surface tension value similar to that of natural tears [3,4]. The results obtained in the physicochemical characterization of the artificial tear are reported in Table 1. The results are expressed as mean ± standard deviation.

Table 1. Physicochemical properties of the artificial tear formulation

pH	7.06 ± 0.01
Osmolarity	275.80 ± 0.35 mOsm/L
Surface tension	46.97 ± 0.50 mN/m
Viscosity*	3.64 ± 0.02 mPa.s

**Within the shear rate interval of 200–1000 s^{-1}.*

In the rheological studies, gel behavior with viscoelastic properties was observed.

3.2.- *In vivo* tolerance studies

The formulation did not cause any discomfort or clinical signs in rabbits (grade 0).

4.- Conclusions

In this study, an artificial tear formulation incorporating an *in situ* gelling polymer was developed. The results revealed that the artificial tear demonstrates suitable physicochemical properties for topical ophthalmic administration.

The novel formulation with *in situ* gelling properties resulted well tolerated in rabbits.

5.- Acknowledgments

This study was supported by the EDEN Project (642760; MSCA-ITN-2014-EJD; Horizon 2020) granted by the European Commission; FEDER-CICYT FIS-PI17/00079 and FIS-PI17/00466; and the Research Group UCM 920415 (InnOftal).

6.- References

[1] Kesavan K, Nath G, Pandit JK. Preparation and in vitro antibacterial evaluation of gatifloxacin mucoadhesive gellan system. Daru. 2010;18(4):237-246.

[2] Enríquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2006;47(4):1416-1425.

[3] Miller D. Measurement of the surface tension of tears. Arch Ophthal. 1969;82:368-371.

[4] Nagyová B, Tiffany JM. Components responsible for the surface tension of human tears. Curr Eye Res. 1999;19(1):4-11.

Cyclosporine loaded inserts of hyaluronan and hydroxypropyl-β-cyclodextrin as new platforms for an efficient ocular delivery

Maria Aurora GRIMAUDO [1, 2], Sara NICOLI [1], Patrizia SANTI [1], Angel CONCHEIRO [2], Carmen ALVAREZ-LORENZO [2]

1. Food and Drug Department, University of Parma, V.le Parco delle Scienze 27/A, Parma, Italy
2. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R+DPharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

Contact email: mariaaurora.grimaudo@studenti.unipr.it

1.- Introduction

Cyclosporine is one of the most used immune-modulators for the treatment of different disorders affecting the eye. Conventional topical ocular administration is very challenging due to its unfavorable physic-chemical properties [1].

The aim of this work was to design cyclosporine inserts using hyaluronan (HA) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) for sustaining drug release and achieving an efficient accumulation into sclera. Four different formulations were studied in terms of loading efficiency, release patterns and penetration capability into excised porcine sclera.

2.- Materials and methods

2.1.- Materials

Cyclosporine ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$, MW 1202.61 Da) was purchased from ThermoFisher Scientific (Karlsruhe, Germany). Sodium hyaluronate (HA, MW 360,000 Da) was from Guinama (La Pobla de Valbona, Spain). Hydroxypropyl β-cyclodextrin (HPβCD, Kleptose® HP oral grade, MW 1391 g/mol) was from Roquette (Lestrem, France). Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE, MW 526 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich® (Saint Louis, MO, USA). Buffered solution was simulated lachrymal fluid (SLF; CaCl2 0.06 mg/ml, $NaHCO_3$ 2.18 mg/ml, NaCl 6.7 mg/ml, pH 7.4 adjusted with HCl 1 N).

2.2.- Cyclosporine-loaded inserts preparation

HA (4.3% w/v) and HPβCD solutions were both prepared in KOH 2 mM and mixed to obtain a final HA concentration of 4% w/v (final HPβCD concentrations, 0.15-0.75-1.5-3% w/v). PEGDE was then added as cross-linker to HA-HPβCD dispersions (0.1 vol/vol ratio). After 12 h at 25°C, gels were cast on a Petri dish (Ø=5 cm) and dried for 48 h at 37°C. Inserts were cut as 9 mm discs, immersed in ethanol (1 ml) overnight to remove the cross-linker in excess and dried for 20 min at room temperature. Inserts were then immersed into 1 ml of 5 mg/ml cyclosporine in EtOH:H20 75:25 vol/vol mixture overnight and finally dried for 2 h at 40°C (formulations coded as F1-F2-F3-F4).

2.3.- Release studies

2.3.1.- Vial method

Cyclosporine-loaded inserts (n=2 for F1-F2, n=3 for F3-F4) were placed in 5 ml SLF at 37°C under magnetic stirring. 0.3 ml of the release medium were sampled at predetermined time points up to 8 h and immediately replaced with the same volume of fresh SLF. Drug was quantified using an HPLC-UV method [2].

2.3.2.- Inclined plane

Cyclosporine-loaded inserts (n=3) were placed on a support by applying 20 µl of 0.9% NaCl and then the setup was inclined at 45°. SLF was flushed onto the inserts at 60 µl/min flow rate at room temperature, using a syringe pump. Samples were collected every 10 min up to 1 h and the drug quantified.

2.4.- Penetration studies into porcine sclera

Scleral tissue was mounted on Franz diffusion cells and the receptor filled with 4 ml of NaCl 0.9% solution at 37°C, magnetically stirred. Inserts were applied on

the sclera after applying 25 µl of 0.9% NaCl solution on the tissue to assure insert adhesion. After 8 hours (n=3), cyclosporine was extracted from the sclera by adding 1 ml of mixture CH_3CN:1% CH_3COOH (87:13) overnight at room temperature.

3.- Results

Four formulations with different content in HPβCD (Table 1) were prepared to analyse the effect of the HA:HPβCD ratio on drug release patterns.

Insert	HA: HPβCD ratio (w/w)	Thickness (µm)	Cyclosporine content (mg_{drug}/cm^2)
F1	96.4:3.6	275±66	0.19±0.12
F2	84.2:15.8	295±30	0.13±0.08
F3	72.7:27.3	283±78	0.12±0.07
F4	57.1:42.9	320±80	0.11±0.07

Table. 1: Composition of cyclosporine-loaded inserts.

Drug release from inserts was firstly tested using an experimental setup involving the flow-through of simulated lacrimal fluid on the formulations (inclined plane). All inserts profiles provided almost linear release rate in the first 1 h.

Using vial method, cyclosporine release from F1 and F2 was controlled only in the first 40 min, followed by a fast and almost complete release within 90 min. Differently, F3 and F4 formulations released cyclosporine in a controlled manner for at least 4 h.

No penetration into isolated sclera occurred in 8 h for F3 and F4 inserts, while detectable drug amounts were found into the sclera by testing F1 and F2 (32.7±5.1 and 5.6±4.9 $\mu g_{drug}/g_{sclera}$, respectively).

4.- Discussion

As shown in Table 1, the amount of drug loaded into inserts is not related to the theoretical amount of HPβCD, suggesting a weak interaction of cyclosporine to cyclodextrin. Insert pieces of 10 mg (area 0.636 cm^2) could provide the same amount as 2 or 1 drop of Restasis® (0.5 mg/ml) and Ikervis® (1 mg/ml) commercially available eye drops, respectively. An advantageous higher ocular bioavailability could be obtained with the designed inserts considering that ocular clearance is faster for eye drops than for the drug being released from the insert.

Vial method highlighted that the mechanism of drug release from inserts depends on matrix swelling, diffusion and matrix erosion. The very slow kinetic observed for F3 and F4 could ascribed to the large size of the peptide hindering its passage through matrix pores and the slower erosion rate of the inserts once immersed in SLF in comparison to F1 and F2.

The amounts of cyclosporine accumulated into excised porcine sclera resulted above the therapeutic levels of cyclosporine for the treatment of diseases affecting the eye (300 ng_{drug}/gs_{clera}) [3].

5.- Conclusions

Overall, the obtained results demonstrated the suitability of inserts of HA and HPβCD cross-linked with PEGDE as innovative platforms for cyclosporine loading and release to the ocular surface.

6.- Acknowledgements

The financial support of Italian Ministry of Education, University and Research (PRIN2010H834LS), Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO, SAF2017-83118-R), Agencia Estatal de Investigacion (AEI, Spain), Xunta de Galicia (ED431C 2016/008) and FEDER are gratefully acknowledged.

7.- References

[1] F. Lallemand, M. Schmitt, J.L. Bourges, R. Gurny, S. Benita, J.S. Garrigue, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 117, 14-28, 2017.

[2] M.A. Grimaudo, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, S. Nicoli, Molecular Pharmaceutics, 15, 571-584, 2018.

[3] R.L. Kaswan, Transplantation Proceedings, 20, 650-655, 1988.

Biodegradable *in-situ* crosslinked hydrogel as a transfection vector in a retinal cell line

Sergio ESTEBAN-PÉREZ [(1)], Sean MCMAHON [(4)], Udo GREISER [(4)], Vanessa ANDRÉS-GUERRERO[(1,2,3)], Wenxin WANG [(4, 5)], Rocío HERRERO-VANRELL [(1,2,3)], Irene BRAVO-OSUNA [(1,2,3)]

1. Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology, InnOftal, (UCM-920415), Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid

2. Sanitary Research Institute of the San Carlos Clinical Hospital (IdISSC)

3. Ocular Pathology National Net (OFTARED) of the Institute of Health Carlos III, Spain.

4. Charles Institute of Dermatology, School of Medicine and Medical Science, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland.

5. Blafar Ltd., Dublin, Ireland.

Email de contacto: seresteb@ucm.es

1.- Introduction

Inherited retinal diseases are related to irreversible blindness. Gene therapy is one of the most attractive therapeutic approaches for this kind of pathologies. Hyperbranched poly-amine-ester polymers (HPAEs) (1) belong to non-viral and safe transfection vectors. Hyaluronic acid is a biocompatible polymer widely employed in ophthalmic formulations. The aim of the present work is the development of a biodegradable *in-situ* crosslinked hydrogel as a transfection agent combining HPAEs and hyaluronic acid for the treatment of retinal cell pathologies.

2.- Materials and methods

2.1.- HPAE synthesis and characterization

The HPAE, constituted by PEG diacrylate and hexamethylenediamine, was synthesized (Michael addition reaction) and monitored by GPC. The polymer was characterized in terms of molecular weight (Mw), branching degree (GPC) and molecular structure (NMR). Moreover, the ability to create polyplexes of the HPAE was studied using the electrophoretic shift mobility assay (ESMA).

2.2.- Hydrogel elaboration and characterization

The hydrogel was elaborated by the combination of both polymers (HPAE and thiolated hyaluronic acid) ratio 1:1.

Once obtained, the hydrogel was characterized in terms of degradation rate (Shaking bath 100 rpm, PBS, 37°C) and *in vitro* tolerance in a retinal cell line (hTERT-RPE1) after exposure time of 24 hours. Also, preliminary studies of intracellular DNA internalization were performed in the retinal cell line (hTERT-RPE1).

3.- Results and discussion

The polymer presented a branched structure with a molecular weight of 31338 Da and a Mark-Houwink alpha value of 0.17. The NMR data indicated the presence of vinyl groups. The ESMA indicated that the HPAE was capable to make polyplexes with the DNA in a ratio of 100:1 (HPAE: DNA).

The hydrogel took 300 hours until complete degradation in the assayed conditions. It resulted well tolerated in the hTERT-RPE1 cell line with values close to 100% after exposure times of 24 hours.

The hydrogel showed DNA internalization in the hTERT-RPE1 cell line after 96 hours of exposure.

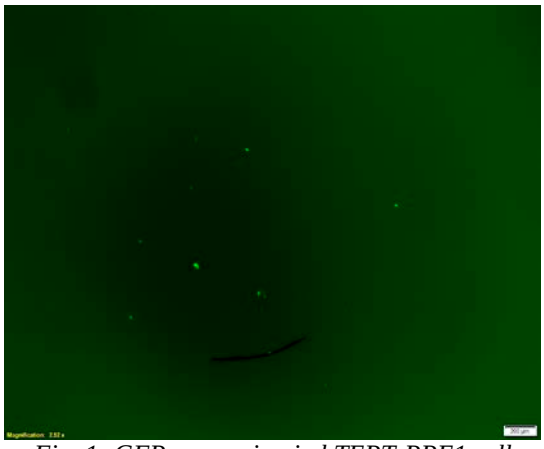


Fig. 1: GFP expression in hTERT-RPE1 cell line

4.- Conclusions

The biodegradable hydrogel resulted well tolerated in the retinal cell line of hTERT-RPE1. This novel polymer combination can be a good candidate to transfect retinal pigment epithelium cells.

5.- Acknowledgments

Research Group UCM-920415; MSCA-RISE- 3D- NEONET, MINECO/ AEI/ FEDER, UE (MAT2013-42127-R; MAT2017-43127-R); RETICS: RD16/0008; ISCIII-FEDER-RETICS(OFTARED) (RD16/0008)

6.- References

1. Zhou D, Cutlar L, Gao Y, Wang W, O'Keeffe-Ahern J, McMahon S, et al. The transition from linear to highly branched poly(beta-amino ester)s: Branching matters for gene delivery. Science advances. 2016;2(6):e1600102.

Estabilización de sistemas semi-sólidos de ácidos grasos omega 3 de pescado mediante ciclodextrinas

Mirian SANCHEZ [(1)], Patricia VAZQUEZ-LOUREIRO[(2)], Raquel SENDON [(2)], Ana RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIROS[(2)] y Mariana LANDIN [(1)]

1. Departamento Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia.
2. Departamento Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia.
Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida 15782.

Email de contacto: miriansanchezfernandez@usc.es

1.- Introducción.

En la actualidad el empleo de los aceites de pescado está teniendo una gran importancia debido a su alto contenido en ácidos grasos ω-3, sustancias que juegan un papel fundamental como componentes de las membranas celulares en el cerebro, la retina y otros órganos, siendo necesarios para su buen funcionamiento[1]. Ello ha llevado al interés en su incorporación a formulaciones sólidas y semisólidas, por cuyos elevados contenidos en DHA y EPA (ω-3) resultarían adecuadas como nutracéuticos o adyuvantes terapéuticos. Sin embargo, el desarrollo de éstas se enfrenta a la problemática relacionada con su estabilidad, que conlleva su oxidación y la producción de productos altamente volátiles de característico mal olor y sabor.

El objetivo del presente trabajo es abordar el problema de la estabilidad de formulaciones semisólidas que incorporan aceites de pescado como fuente de ácidos grasos mediante el empleo de ciclodextrinas. Estos excipientes permiten la inclusión de moléculas de carácter lipídico, dando lugar a complejos más solubles y estables, lo que debe redundar en la mejora de las propiedades organolépticas de las formulaciones elaboradas [2].

2.- Material y Métodos

2.1.- Materiales

El aceite de pescado enriquecido en ω-3 como fase orgánica (O), ha sido proporcionado por la empresa Biomega S.L y se almacenó en nevera a una temperatura de 5ºC. Como fase acuosa se emplearon disoluciones acuosas de ciclodextrinas alfa (CDα) y beta (CDβ), maltodextrina (MD) y alginato 155 ($Alg._{155}$) comerciales proporcionados por Roquette SA., Sigma Aldrich SA. y HMC que se mantuvieron a temperatura ambiente.

2.2.- Preparación sistemas semisólidos.

Las formulaciones semisólidas se preparan siguiendo la siguiente pauta:

Fase acuosa: Se elabora una disolución acuosa de CD mediante agitación con un Homogenizador a 300 rpm durante 45s. Se incorpora la MD en agitación y se agrega una dispersión de $Alg._{155}$ a la concentración adecuada.

Fase oleosa: Se incorpora a la fase acuosa en la proporción necesaria manteniendo la agitación y elevando la velocidad hasta los 1300rpm durante 1,5 min adicionales.

Se emplearon CDα y CDβ por su capacidad de formar complejos de inclusión, lo que debe mejorar la estabilidad, solubilidad y las características organolépticas de los complejos formados con el aceite de pescado.

Se seleccionó MD, debido a que interviene en la formación de películas y en la mejora las características organolépticas. El $Alg._{155}$ actúa como agente gelifícate, mejorando la extensibilidad.

Se estableció un diseño experimental balanceado para 5 variables empleando para ello el software DataForm v3.1 (Intelligensys Ltd, UK). La composición de las 18 formulaciones se presenta en la Tabla 1.

Las formulaciones se caracterizaron en cuanto a sus características organolépticas y texturométricas a tiempo 0 y se almacenaron a 25ºC y 60%± 5% HR y 40ºC 75%± 5% HR durante 90 días. Adicionalmente, se evaluaron los principales compuestos volátiles derivados de la degradación de los ácidos grasos. Se repitieron los análisis de caracterización a los 30, 60 y 90 días.

Tabla 1. Composición de las formulaciones estudiadas, para un volumen total O+W de 50ml.

	O (ml)	CDα (g)	CDβ (g)	Alg. 155 (g)	MD (g)
1	25,000	-	10,500	0,025	0,300
2	37,500	9,000	9,000	0,019	0,225
3	12,500	3,000	-	0,013	0,150
4	25,000	9,000	9,000	0,025	0,300
5	37,500	10,500	-	0,019	0,225
6	12,500	-	3,000	0,013	0,150
7	37,500	-	3,000	0,013	0,300
8	12,500	9,000	9,000	0,025	0,225
9	25,000	10,500	-	0,019	0,150
10	37,500	3,000	-	0,019	0,150
11	25,000	5,250	5,250	0,013	0,300
12	12,500	-	18,000	0,025	0,225
13	37,500	-	3,000	0,013	0,150
14	25,000	10,500	-	0,025	0,300
15	12,500	9,000	9,000	0,019	0,225
16	12,500	3,000	-	0,013	0,300
17	25,000	-	18,000	0,025	0,225
18	37,500	5,250	5,250	0,019	0,150

2.3.- Análisis texturométrico.

Se llevó a cabo la evaluación de la dureza, adhesión y cohesión de las formulaciones semisólidas a los diferentes tiempos de muestreo con un Texturómetro TA TX plus.
Se registraron las curvas de tres ciclos a una velocidad de 1mm/s, y una distancia de penetración de 5mm durante 0.01s, aplicando una fuerza de activación de 0.02N.

2.4.- Análisis de compuestos volátiles de degradación mediante PT&GC-MS.

Se cuantificó una selección de volátiles característicos de la degradación de los ácidos grasos mediante un sistema de Purga-trampa acoplado a cromatografía de gases con espectrometría masas. Los productos seleccionados fueron: 1-penten-3-ona, hexanal, octano, (*E*,*E*)-heptadienal y heptanal, cuyo olor característico es rancio, plástico e incluso olor a quemado[3]. En todos los análisis se empleó la 2-heptanona como patrón interno. La obtención de la curva de calibrado y los análisis posteriores se llevaron a cabo con los siguientes parámetros: tiempo de purga, 20 min, Tª muestra, 60ºC y el flujo de la purga, 40 mL/min. El horno para el análisis GS-MS está programado con un gradiente de temperatura de 35ºC a 200ºC y una rampa de 10ºC/min durante 30 min.

3.- Resultados y Discusión

Las formulaciones recién elaboradas mediante evaluación sensorial dieron unos resultados más positivos al emplearse la CDα que con la CDβ. La percepción de olor a pescado o rancio es muy inferior comparada con el aceite sin tratar o con semi-sólidos expuestos a temperatura de 40ºC durante 30 días.
Al duplicar la cantidad de ciclodextrina con respecto a un volumen constante de fase organica y fase acuosa se produce un aumento de la cohesion disminuyendo de este modo la extensibilidad. En la figura 1 se presentan los cromatogramas correspondientes a los volátiles de muestras de aceites de pescado a tiempo 0 (A) y tras su almacenaje a 40ºC durante 30 días (B), observándose un aumento en la intensidad de los picos que representan a los diferentes volátiles de cadena larga.

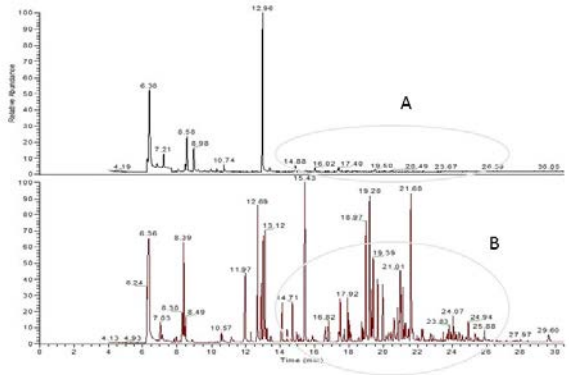


Fig. 1. Cromatogramas de semi-sólido a t=0 y tras 30 días a Tª 40ºC.

La incorporación de los ácidos grasos en la estructura de las ciclodextrinas debe reducir la aparición o el incremento en la concentración de estos volátiles

4.- Agradecimientos

Este trabajo está financiado por el POCTEP programa Interreg España-Portugal (0302_CVMAR_I_1_P) UE, (FEDER).

5.- Referencias

[1] W. E. Connor, *Am. J. Clin. Nutr.*, *71*(1), 171S-175S, 2000.

[2] D. Duchêne, A. Bochot, S. C.Yu, C. Pépin, *Int. J. Pharm. 266*(1-2), 85-90, 2003.

[3] G.Venkateshwarlu, M. B. Let, A. S Meyer, C. Jacobsen, *J. Agric. Food Chem.*, *52*(2), 311-317, 2004.

Comprimidos lipídicos con activos antioxidantes microencapsulados: obtención y evaluación *in vitro*

Christian Raúl HUAMÁN CASTILLO [(1)], Susana IGLESIAS [(2)], Florentina Niuris ACOSTA CONTRERAS [(2)], Ángeles María HERAS CABALLERO[(2)], María Esther GIL-ALEGRE[(1,3)]

1. Depto. de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.
2. Depto. de Química en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Complutense de Madrid.
3. Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Universidad Complutense de Madrid.

Email de contacto: christian.rhc@outlook.com

1.- Introducción

En los últimos años, ha aumentado el interés en los antioxidantes naturales que están presentes en los frutos y verduras, los cuales contribuyen a la protección contra el estrés oxidativo en los humanos [1]. De este modo, los antioxidantes naturales obtenidos a partir de recursos botánicos han resultado ser una alternativa interesante a los antioxidantes sintéticos debido a preocupaciones de seguridad y limitación de uso [2]. Existen diversos factores que pueden afectar la estabilidad de estos bioactivos naturales, estos pueden ser la temperatura, pH, oxígeno, actividad del agua, enzimas y presencia de otros nutrientes (como proteínas) [3]. Además, solo una pequeña cantidad de estos bioactivos naturales logran absorberse debido a un tiempo insuficiente de residencia gástrica, baja permeabilidad y/o baja solubilidad. El objetivo de este trabajo fue elaborar comprimidos de matriz lipídica que contienen micropartículas (MP) con actividad antioxidante para la administración por vía oral.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales:

Antioxidantes naturales hidrófilos: Las muestras se encuentran congeladas a -20°C ± 5°C, para su uso se descongelan a 5°C ± 3°C.

Polímero: polisacárido de origen natural, con un peso molecular de entre 60 a 80 kDa.

Agente entrecruzante: tripolifosfato sódico (TPP)

Excipientes de comprimidos: diluyente lipídico y agente emulsionante.

2.2 Métodos:

Obtención de micropartículas: Secado por atomización

Caracterización de micropartículas:

-Morfología y tamaño: Microscopia electrónica de barrido.
-Capacidad antioxidante total en MP: Método de Poder de reducción antioxidante del ión férrico (FRAP).
-Estudio de cesión *in vitro:* Técnica de difusión en bolsa de diálisis en medios con valores de pH de 1,2 y 6,8

Obtención de comprimidos: Moldeo

Estudio de cesión *in vitro* de comprimidos: En medios con valores de pH de 1,2 y 6,8, y a 100 rpm

3.- Resultados y discusión

3.1.- Obtención de micropartículas:

En la tabla 1 se muestran la proporción de los componentes de las soluciones que fueron atomizadas para la formación de las micropartículas.

Tabla 1: Composición de micropartículas

MP	Antioxidante (%)	Polisacárido (%)	TPP (%)
MP1	8	92	---
MP2	8	90,3	1,7

3.2.- Morfología y tamaño:

Las micropartículas presentan forma esférica y un tamaño menor a 10 µm.

3.3.- -Capacidad antioxidante total en MP:

Fue expresada en unidades de µmol Trolox/g de micropartícula.

Tabla 2: Resultados de capacidad antioxidante

Micropartículas	µmol Trolox /g
MP1	9232
MP2	11502

3.4.- Estudio de cesión *in vitro* de MP

En las Fig. 2 y 3 se representan los resultados del estudio de cesión de las MP.

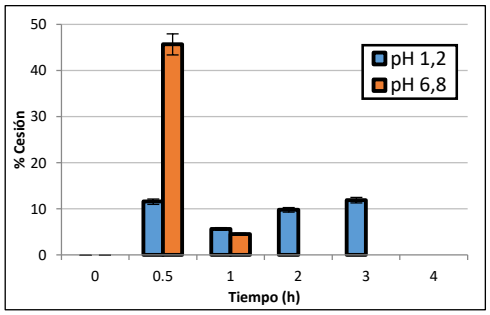


Fig. 2: Capacidad antioxidante cuantificada a cada tiempo de muestreo en el estudio de cesión de las MP1 (sin entrecruzante).

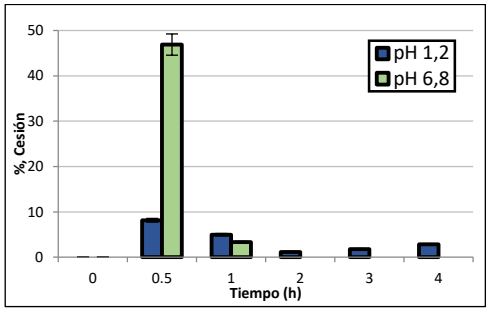


Fig. 3: Capacidad antioxidante cuantificada a cada tiempo de muestreo en el estudio de cesión de las MP2 (con entrecruzante)

3.5.- Obtención de comprimidos:

Se utilizaron excipientes compatibles con las MP.

Tabla 3: Fórmula de comprimidos

Componentes	**%**
Micropartículas	20 – 30
Agente emulsionante	5 – 10
Diluyente	60-75
Total	**100**

3.6.- Estudio de cesión *in vitro* de comprimidos:

En las Fig. 4 y 5 se representan los resultados obtenidos en el estudio de cesión de los comprimidos en diferentes medios

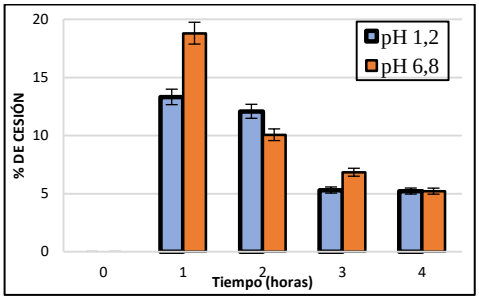


Fig. 4: Estudio de Cesión: comprimidos MP1

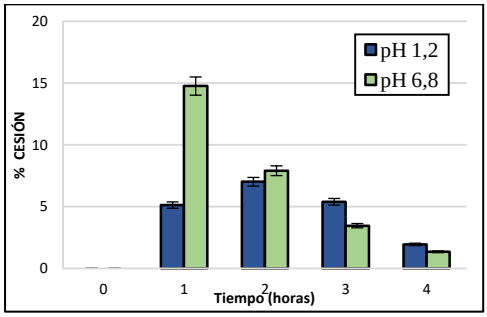


Fig. 5: Estudio de Cesión: comprimidos MP2

4.- Conclusiones

El entrecruzamiento del polímero en el comprimido MP2 reduce la cesión del activo antioxidante a pH 1,2, mientras que no afecta la cesión a pH 6,8. El uso del entrecruzante puede ejercer un efecto gastro-protector en caso de que sea necesario.

5.- Referencias

[1] S Chen, X Shen, S Cheng, *et al*. Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties, PLOS One, 8(11), 2013.

[2] P Dhar, P Bajpai, A Tayade, O Chaurasia, *et al*. Chemical composition and antioxidant capacities of phytococktail extracts from trans-Himalayan cold desert. BMC Complement Altern Med, 13:259, 2013.

[3] FM Hashem et al. Formulation and In Vitro and In Vivo Evaluation of Lipid-Based Terbutaline Sulphate Bi-layer Tablets for Once-Daily Administration. AAPS PharmSciTech, 17(3):727-34, 2016.

Nanocápsulas de quitosano microencapsuladas: una plataforma versátil para la administración de moléculas terapéuticas por vía pulmonar

Estefanía FERNÁNDEZ-PAZ[(1)], A. Victoria MARCOS[(1)], Helena ROUCO[(2)], Patricia DÍAZ-RODRÍGUEZ[(2)], Noemi CSABA[(1)], Carmen REMUÑÁN-LÓPEZ [(1)]

[1]Grupo NANOBIOFAR, [2]Grupo ID-FARMA; Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela.

Email de contacto: estefania.fernandez.paz@rai.usc.es

1.- Introducción

Para lograr un tratamiento eficaz de patologías pulmonares como la tuberculosis, y enfermedades para las que resulta interesante la terapia génica, es deseable la administración de los fármacos y ácidos nucleicos directamente en el pulmón [1-3]. En el caso de la tuberculosis, el tratamiento actual consiste en la administración oral diaria de dosis elevadas de dos o más antibióticos durante un mínimo de seis meses. Estos fármacos, por degradación y/o efecto de primer paso hepático, no suelen alcanzar concentraciones eficaces en el pulmón [4]. Para ello, las moléculas activas deben incluirse en un sistema de liberación dotado de adecuadas propiedades aerodinámicas para su administración por vía pulmonar.

En este trabajo proponemos una plataforma de administración pulmonar consistente en nanocápsulas de quitosano (NCs CS) microencapsuladas en microesferas de manitol (MS Ma). A estas NCs se les asoció un antibiótico (rifabutina, RFB) y un plásmido modelo (pCMV-βGal), en el núcleo oleoso y en la superficie de las NCs CS, respectivamente.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Quitosano ultrapuro (CS, Protasan® UPCL 113, grado deacetilación: 75-90%, Pm<150 KDa); lecitina (Epikuron® 145V); Miglyol® 812; pCMV-βGal (10µg/µL); rifabutina (CHEMOS GmbH); D-Manitol (Pm: 182.17 g/mol); acetona y etanol grado HPLC, y agua ultrapura (MilliQ plus, Millipore Ibérica).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Preparación y caracterización de NCs

Se utilizó la técnica desplazamiento del disolvente [5]. Una fase oleosa a base de lecitina, etanol, Miglyol® y acetona se añadió sobre una fase acuosa de CS, bajo agitación magnética [CIMAREC i Multipoint, Fisher Scientific]. Los disolventes orgánicos fueron eliminados por rotaevaporación. En el caso de las NCs CS conteniendo RFB (NCs CS-RFB), ésta fue añadida en la fase oleosa (sin acetona). La incorporación de plásmido se realizó por adsorción en superficie de las NCs mediante incubación durante 1 hora. Las NCs fueron caracterizadas morfológicamente mediante Microscopía Electrónica de Transmisión [TEM, Jem-2010 Electron Microscope, a 120 KV]. Los tamaños, índices de polidispersión y potenciales zeta fueron determinados utilizando un Zetasizer® [Nano–ZS, Malvern Instruments].

2.2.2.- Determinación de la eficacia de encapsulación de RFB

Las NCs CS-RFB se centrifugaron a 21580 RCF (x g), durante 1 hora, a 15 ºC [Optima™ TLX Ultracentrifuge, TLA100.3, Beckman]. La cantidad de RFB del subnadante se determinó por espectrofotometría UV-visible, a $\lambda_{máx}$: 320 nm [espectrofotómetro lector de placas, FLUOstar Omega, BMG Labtech]. La eficacia de encapsulación (E.E.) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$E.E.\ (\%) = (P_{RFB\ total} - P_{RFB\ libre})/P_{RFB\ total} \times 100$$

Donde: $P_{RFB\ total}$ = cantidad teórica de RFB y $P_{RFB\ libre}$ = cantidad de RFB en el subnadante tras centrifugación de la suspensión de NCs.

2.2.3.- Determinación de asociación de plásmido

La asociación de plásmido a las NCs se determinó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa (1% de agarosa con SYBR® Safe DNA gel stain, 70V, 90 min) y

cuantitativamente, por fluorescencia [Qubit® 3.0 Fluorometer, Invitrogen Life Tecnologies] del plásmido libre presente en el subnadante tras centrifugar las NCs.

2.2.4.- Microencapsulación de las NCs

Las NCs CS fueron microencapsuladas en MS Ma mediante atomización Büchi [Büchi® Mini Spray Dryer B-290, Suiza] utilizando las siguientes condiciones: $T_{Entrada}$ = 105°C, Aspiración = 100% (70% en NCs CS-RFB), y Flujo = 5 mL/min. Se prepararon también MS control. El rendimiento se determinó por gravimetría. La caracterización morfológica de las MS se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido [SEM, Fesem Ultra-Plus, Zeiss].

2.2.5.- Liberación de las NCs a partir de las MS

Cantidades de 100 mg de polvo se incubaron en 3 mL de agua MilliQ, bajo agitación magnética (a 300 r.p.m.) y se tomaron muestras a 0.5, 1, 2 y 4 horas. Las NCs liberadas se caracterizaron en cuanto a morfología, tamaño y potencial Z, utilizando los procedimientos ya descritos.

3.- Resultados y discusión

Las NCs CS conteniendo RFB y plásmido presentan morfologías (Fig. 1) y tamaños (< 200 nm) similares a las NCs CS control. Los potenciales Z de las NCs CS-plásmido y NCs CS-RFB disminuyen (+35 mV y +40 mV, respectivamente) en comparación al de las NCs CS (+60 mV).

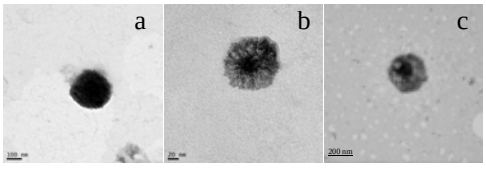


Fig. 1: Microfotografías TEM de (a) NC CS, (b) NC CS-pCMV-βGal y (c) NC CS-RFB.

Las NCs CS microencapsuladas presentan morfología y tamaño (2-3 µm) adecuado para administración pulmonar (Fig. 2).

La E.E. de RFB es elevada (92.07%). La carga del plásmido es de un 31.4 % en relación a la cantidad de CS empleado en la preparación de las NCs.

En medio acuoso, las NCs se liberan fácilmente desde las MS, manteniendo sus características morfológicas y físico-químicas.

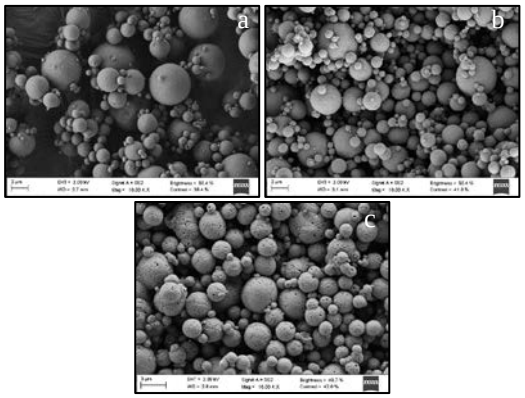


Fig. 2: Microfotografías SEM de (a) MS Ma control y MS conteniendo (b) NCs CS y (c) NCs CS-RFB.

4.- Conclusiones

Se prepararon NCs CS conteniendo plásmido y RFB que fueron microencapsuladas en MS Ma, que presentan tamaño y morfología adecuados para administración pulmonar. Esta nueva plataforma micro-nanoestructurada presenta una gran versatilidad e interés para la asociación de moléculas terapéuticas de distinto tamaño y solubilidad. Las NCs se recuperan fácilmente en medio acuoso.

5.- Agradecimientos

Financiación: ISCIII (Acción Estratégica de Salud, PS09/00816) y Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva-Fondos FEDER, ED43LC2017/09).

6.- Referencias

[1] T. A. Skvortsov, D. V. Ignatov, K. B. Majorov y col., Acta naturae, 5 (2) (17), 62-69, 2013.

[2] A. Misra, A. Hickey, C. Rossi y col., Tuberculosis, 91(1), 71-81, 2011.

[3] Ema.europa.eu. (2018). European Medicines Agency-[online], http://www.ema.europa.eu/ema/

[4] H. Adi, P.M. Young, H.-K. Chan y col., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 40, 239-247, 2010.

[5] C. Prego, M. García, D. Torres y col., Journal of Controlled Release, 101, 151-162, 2005.

Microencapsulación de Redes Metal-Orgánicas (MOFs) cargadas con Isoniazida: Una nueva estrategia para el tratamiento de la Tuberculosis

Cristina FERNÁNDEZ-PAZ [(1)], Pablo SALCEDO-ABRAIRA [(2)], Teresa SIMÓN-YARZA [(3)], Patricia HORCAJADA [(2)], Carmen REMUÑÁN-LÓPEZ [(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela.
2. Unidad de Materiales Porosos Avanzados, Fundación IMDEA Energía, Parque Tecnológico de Móstoles , 28935 Móstoles.
3. Institut Lavoisier, Université de Versailles St. Quentin, 78035 Versailles Cedex- París.

Email de contacto: cristina.fernandez.paz@rai.usc.es

1.- Introducción

La Tuberculosis (TB) es la principal causa de muerte originada por patologías infecciosas. El uso tradicional de fármacos antituberculosos (antiTB) por vía oral ha originado resistencias serias y generalizadas, lo que hace que la terapia sea difícil ya que los antiTB presentan baja estabilidad y absorción oral, elevado metabolismo hepático, dificultad para alcanzar los granulomas e internalizarse en las bacterias e incumplimiento posológico del paciente debido a efectos secundarios y duración del tratamiento [1]. Las Redes Metal-Orgánicas (o MOFs por sus siglas en inglés) son materiales híbridos cristalinos porosos, formados a partir de unidades inorgánicas (ej. cationes) y ligandos orgánicos polidentados (ej. carboxilatos), que han mostrado gran potencial para el suministro de fármacos y como agentes de contraste [2]. En particular, el trimesato de hierro (III) mesoporoso nanoparticulado MIL-100-(Fe) [3] muestra buena biocompatibilidad "in vivo", así como cargas excepcionales y administración controlada de fármacos [4]. En este trabajo se propone una nueva plataforma para la administración de antiTB por vía pulmonar, que consiste en las MOFs cargadas con el antiTB de primera línea Isoniazida (H) [H-MIL-100-(Fe)] en microsferas (MS) de manitol (Ma).

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación adicional.

2.2.- Métodos

2.2.1.- MOFs cargadas con H

Las nanopartículas (NPs) de MIL-100-(Fe) se prepararon mediante síntesis hidrotermal asistida por microondas [3]. La H se encapsuló en las NPs de MIL-100-(Fe) por simple impregnación. El tamaño medio, distribución de tamaño de partícula y potencial ζ se determinaron en agua Milli-Q empleando Dynamic Light Scattering (DLS) y Anemometría Láser Doppler (LDA). Todas las muestras se caracterizaron mediante difracción de rayos X, análisis termogravimétrico, espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y adsorción de N_2.

2.2.2.- Microencapsulación de MOFs

Las NPs de MIL-100-(Fe) y H-MIL-100-(Fe) fueron dispersadas en soluciones acuosas de Ma y después atomizadas [4]. La morfología de las MS obtenidas fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para demostrar la presencia y localzación de las NPs en MS, se realizó un estudio de microscopía confocal de fluorescencia.

2.2.3.- Liberación de MOFs a partir de MS de Ma

Las MS se incubaron en agua Milli-Q y tampón fosfato salino (PBS, pH=7.4) bajo agitación bidimensional a 37ºC. A distintos tiempos se caracterizaron las NPs liberadas mediante DLS, potencial ζ, TEM y DRX. La cinética de liberación de la H y la degradación de las NPs se investigaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [5].

3.- Resultados y discusión

La H se encapsuló exitosamente en las MIL-100-(Fe) (28.9 ± 2.8 p/p). Las partículas dispersadas en agua exhiben tamaños nanométricos (~130 nm) y cargas superficiales negativas (- 25 mV).

Las MS presentan forma esférica y tamaño en torno a 3 µm (Fig. 1).

Fig. 1: Microfotografías SEM de MS de Ma y MS de Ma con MIL-100-(Fe) y H-MIL-100-(Fe).

Las MOFs se encuentran localizadas en el interior de las MS (Fig. 2).

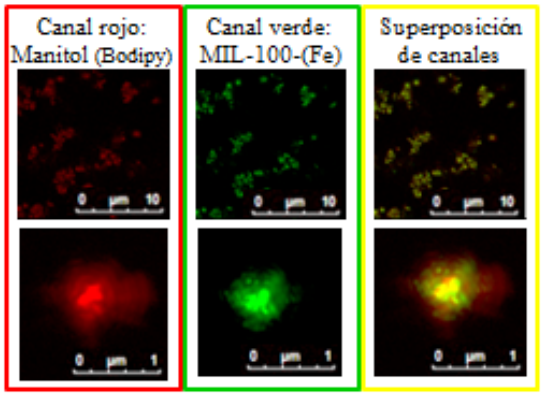


Fig. 2: Imágenes de confocal de polvos secos: Ma_{Bodipy} (canal rojo), NPs MIL-100-(Fe) (canal verde) y MS de Ma_{Bodipy} con NPs MIL-100-(Fe).

Tras 72 h de liberación, las MIL-100-(Fe) presentaron una alta estabilidad en agua (manteniendo su cristalinidad y tamaño), liberando un 25% de la carga farmacológica; mientras que en PBS, las NPs se degradaron progresivamente liberando más rápidamente el fármaco (Fig. 3).

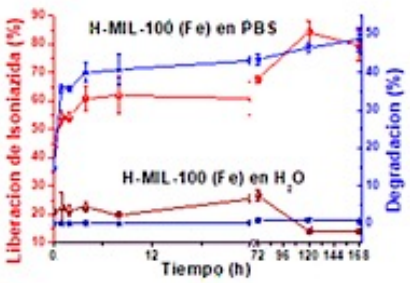


Fig. 3: Liberación de H (rojo) y degradación de las NPs (azul).

4.- Conclusiones

Las NPs de H-MIL-100-(Fe) fueron exitosamente formuladas en MS de Ma para su administración pulmonar. Las NPs MOFs se encuentran confinadas en el interior de las MS. En agua y PBS, las MS se disuelven, liberando las NPs de H-MIL-100(Fe) así como de su carga activa (en 3 días).

5.- Agradecimientos

Financiación: ISCIII (Acción Estratégica de Salud, PS09/00816) y Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva-Fondos FEDER, ED43LC2017/09). P.H. agradece a la fundación Ramón y Cajal (2014-16823).

6.- Referencias

[1] V. Dartois, Nature Reviews Microbiology, 12, 159-167, 2014.

[2] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre y col., Nature Materials, 9, 172-178, 2010.

[3] A. García-Márquez, A. Demessence, A. E. Platero-Prats y col., European Journal of Inorganic Chemistry, 32, 5165-5174, 2012.

[4] A. Grenha, B. Seijo, C. Remuñán-López, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 427-497, 2005.

[5] T. Baati, L. Njim, F. Neffati y col., Chemical Science, 4, 1597-1607, 2013.

Transfection of pulmonary cells by pDNA-polycationic - solid lipid hybrid nanoparticles

Diana P GASPAR [1,2], Jorge VÍTOR [3], Lídia M GONÇALVES [1], Pablo TABOADA [4], Carmen REMUÑÁN-LÓPEZ [2], António J ALMEIDA [1]

1. Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal
2. Nanobiofar Group, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
3. Biochemistry and Human Biology Department, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Portugal
4. Colloids and Polymers Physics Group, Condensed Matter Physics Department, Faculty of Physics, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

E-mail address: diana.gaspar89@gmail.com

1.- Introduction

Plasmid DNA has a great potential for gene therapy, but it is rapidly eliminated by nucleases following its administration. Therefore, the development of delivery systems that can protect pDNA is critical for its clinical use [1]. Herein, microencapsulated cationically modified solid lipid nanoparticles (SLN) suitability as a novel pDNA carrier for pulmonary administration as well as a transfection agent was investigated.

2.- Methods

2.1.- Preparation of pDNA-polycationic SLN

Cationically SLN were prepared by a hot high shear homogenization method [2] using glyceryl dibehenate or tristearate as lipid components and chitosan (CS) as surface charge modifier. A model plasmid, pEGFP-C1, was adsorbed by electrostatic interaction.

2.2.- Nanoparticle characterization

Adsorption and stability of pEGFP-C1 onto the CS-SLN was investigated by agarose gel electrophoresis. The physical properties of modified NPs were performed using a Zetasizer® Nano SZ (Malvern Instruments, UK). Their morphology was examined by transmission electron microscopy (TEM) (JEOL Microscopy, 2010, Japan).

2.3.- *In vitro* biocompatibility and transfection studies

Cytotoxicity of NPs was assessed using MTT reduction in lung cell lines (A549 and Calu-3). Transfection was evaluated by using the pEGFP-C1 as reporter vector encoding GFP gene.

2.4.- Microencapsulation of hybrid SLN

To prepare the polycationic SLN-loaded dry powders, suspensions of NPs in excipients (mannitol and trehalose) were spray-dried using a laboratory-scale spray-dryer (Büchi® Mini spray-dryer, B-290, Switzerland) and a previously developed technique [3].

2.5.- Dry powders characterization

Dry powders morphology was assessed by scanning electron microscopy (SEM, EVO LS15 Zeiss). Aerodynamic properties were were also studied.

2.6.- Release of hybrid SLN from microspheres and pEGFP-C1 integrity

Release studies of NPs from microspheres were performed following their incubation in PBS pH7.4 with 0.1% of lung surfactant (Curosurf®). The recovered NPs physical properties and morphology were analyzed as well as the integrity of the associated pEGFP-C1 following the spray-drying process. For that, NPs, after being recovered, were incubated with chitosanase followed by a specific endonuclease digestion.

3.- Results and Discussion

SLN coating with a CS layer resulted from the deposition of CS (positively charged polymer) onto the negatively charged SLN surface (ca. -17 mV). The SLN:CS were loaded with pEGFP-C1 by electrostatic interaction, which were further coated with a second CS layer (SLN:CS:pDNA:CS) to avoid pDNA degradation due to direct exposition to the environment. The incorporation efficiency of pEGFP-C1 was 100%. The CS layers produced a size increase within the nanometer range (0.29±0.01 nm for glyceryl dibehenate and 0.17±0.01 nm for glyceryl tristearate NPs) with a positive zeta potential due to the external CS layer. TEM images showed that SLN were efficiently coated by CS layers (Fig. 1A). As expected, the pEGFP-C1 attached to SLN:CS was largely unprotected while the plasmid attached to NPs with an outer CS layer was fully protected from BstBI hydrolysis and after chitosanase digestion. After incubation of polycationic NPs with A549 and Calu-3 cells, no evidence of acute cytotoxicity was observed when compared with a negative control. Moreover, these modified particles had the ability to transfect lung cell lines (Fig. 1B).

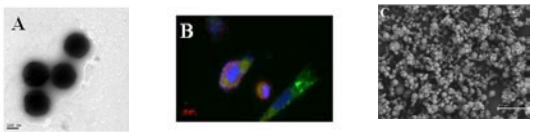


Fig. 1: (A) TEM micrograph of hybrid NPs; (B) Fluorescence microscopy analysis of pEGFP-C1 expression after transfection mediated by NPs; (C) SEM micrographs of microspheres obtained by spray-drying.

Hereafter, NPs were spray-dried with the inert excipients mannitol and trehalose, in a one-step spray-drying process. These excipients demonstrated to have a protective effect during spray-drying process preventing NPs from melting and aggregation. SEM micrographs (Fig. 1C) showed that microspheres are spherical with well-defined limits and a smooth surface. Their d_{aer} were in the optimal range particle size for NPs achieving the alveolar region [4]. NPs recovered from microspheres maintained the nano-range size and shape, therefore it is expected that when these systems reach the deep lung, they will be dissolved after landing on the aqueous lung epithelium and NPs will be released. pDNA was protected by hybrid NPs during spray-drying process with no signs of degradation (Fig. 2).

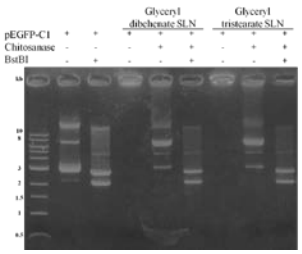


Fig.2: Electrophoresis of pEGFP-C1 associated to NPs following chitosanase and endonuclease digestions after recovery from microspheres.

4.- Conclusions

Stable microencapsulated polycationic SLN loaded with pEGFP-C1 were successfully produced, providing protection and fully activation to the associated pDNA. These hybrid systems are a promising system for gene delivery, able to withstand further formulation into dry powders for inhalation.

5.- Acknowledgements

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (Portugal), ISCIII (Acción Estratégica de Salud, PS09/00816) and Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva-FEDER, ED43LC2017/09).

6.- References

[1] A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, M.Á. Solinís, J.L. Pedraz, E. Echevarría, J.M. Rodríguez, A.R. Gascón. Int J Pharm. 385, 157-162, 2010.

[2] D.P. Gaspar, V. Faria, L.M.D. Gonçalves, P. Taboada, C. Remuñán-López, A.J. Almeida. Int J Pharm. 1-2, 199-209, 2016.

[3] D.P. Gaspar, M.M. Gaspar, C.V. Eleutério, A. Grenha, M. Blanco, L.M.D. Gonçalves, P. Taboada, A.J. Almeida, C. Remuñán-López. Mol Pharm. 9, 2977-2990, 2017.

[4] S. Al-Qadi, A. Grenha, D. Carrión-Recio, B. Seijo, C. Remuñán-López. J Control Release. 3, 383-390, 2012.

Comunicaciones Póster

Development of a generic mometasone furoate semisolid formulation

Eloy PENA RODRÍGUEZ[(1)], Francisco FERNANDEZ-CAMPOS[(1)], Barbara BLANCO-FERNANDEZ[(1)], Maria del Carmen MORENO[(1)], Adoración GARCIA[(1)], Jordi GONZALEZ[(1)]

1. Reig Jofre Laboratories, Avda Gran Capita 6, 08970 Sant Joan Despi, Barcelona, Spain

Email de contacto: Francisco.fernandez@reigjofre.com

1.- Introduction

Semisolid formulations are the gold-standard formulations in skin disorders [1]. Every year, new topical products are launched, confronting the lack of a regulation for generic topical formulation. Generic products need to be equivalent in terms of the their qualitative (Q1) and quantitative (Q2) composition with the reference one [2-3]. Moreover, microstructure characteristics (Q3) also alters their performance and should be evaluated. Nowadays, the lack of strong correlations between *in vitro* and *in vivo* models is forcing to test their equivalence in clinical trials.

The aim of this work is to develop a generic mometasone furoate emulsion. The stability and the skin absorption and release profiles in comparison with the reference drug (Elocom®) will be evaluated.

2.- Methods

2.1.-Emulsion preparation (RJ)

Mometasone furoate (0.1%) was formulated in a W/O emulsion. Briefly, the oil phase (paraffin, propylene glycol monostearate, stearyl alcohol and ceteareth-20) and aqueus phase (mometasone furoate, hexylene glycol, water) were dispersed at 70-75ºC. The aqueous phase was added to the oil phase and mixed by mechanical stirring. Then, titanium dioxide and aluminium starch octenylsuccinate were added and mixed. The emulsion was packed in aluminium tubes.

2.2.- Emulsion characterization and stability studies

RJ emulsion was stored at 25ºC/60% HR, 30ºC/65% HR and 40ºC/75% HR climate chambers. Appearance, pH, viscosity and mometasone furoate content were determined after its fabrication and at several times [4].

Mometasone furoate quantifications were performed by HPLC-PDA (Waters, Spain). Briefly, emulsions (0.7 g) were dispersed in ACN (10 mL) and centrifugated (10 min, 3,000 rpm). The supernatants were further diluted with ACN (1:2.5). The mobile phase and column used were water: ACN (45:55) at 1.8 mL/min and a C8 coupled with a C8 pre-column respectively (254 nm, injection volume 20 µL). Beclometasone dipropionate (50 mg/mL) was used as an internal standard.

2.3.- *In vitro* drug release and skin absorption studies

The release studies were performed using vertical Franz diffusion cells. Briefly, RJ/Elocom® (0.3 g) were seeded on nylon membranes (37 ºC, 0.45µm pore size, area 2.54cm^2) or abdominal human dermotomed skin (32 ºC, 0.4 mm thick) in the release and permeation studies respectively. Ethanol 50% (100ml) was used as receptor medium. 400 µL samples were withdrawn at prestablish times and replaced with new medium. Mometasone furoate was quantified by LC-MS/MS.

3.- Results and discussion

A viscous emulsion was obtained with a pH of 5.4. Samples in long term stability and accelerated stability were evaluated (Fig. 1A-C). The mometasone content and aspect of the emulsion remained constante at all the time points and conditions. All pH values remained within the specification range of 4-6. Emulsion viscosity had similar values among temperatures (no statistical differences), but a large variability could be observed, probably due to lipid crystalline arrangement differences. A moderate viscosity range was found intrabatch, due to intrinsic manufacturing process variability. Release profile of RJ emulsion wascompared to Elocom® (41793 mPa.s) (Fig.1D).

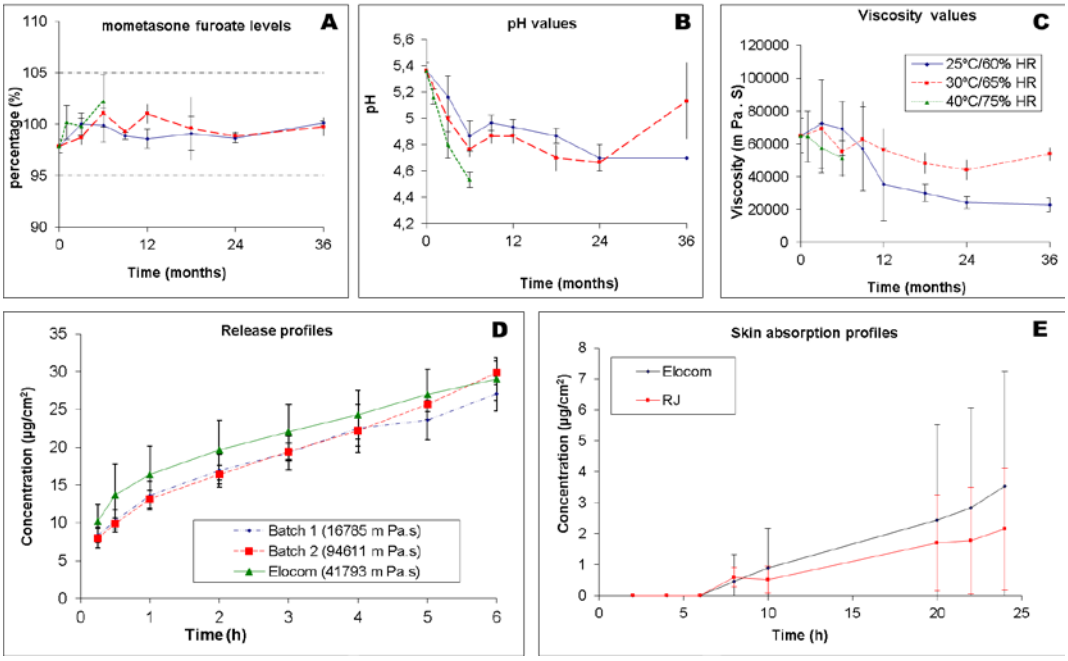


Fig. 1. Mometasone furoate content (A), pH (B) and viscosity (C) of the emulsion over time. Mometasone release (D) and skin permeation (E) profiles of the emulsion and the reference product.

The effect of intrabatch viscosity variability in the release profile was also tested out. No statistical differences were found in the diffusion constants between batches or Elocom®, despite the viscosity differences (Anova). There were no differences in the skin absoption profiles between RJ and the Elocom® (Fig.1E). Moreover, skin absorption parameters did not exhibit statistical differences (Kruskal-Wallis test). Thus, it could be assumed that both emulsions will perform equally in clinical studies.

Tabla 1. Skin absorption parameters.

Formulation	Elocom®	RJ	p-value
J/sup (µg/h/cm^2)	0.03	0.04996	0.547
T_{lag} (h)	5.3	6.2379	0.064
P_2 (h^{-1})	0.02	0.02672	0.491
P_1 (cm)	0.001	0.00234	0.093
K_p (cm/h)	2.8895^{E-05}	4.9962^{E-05}	0.547

4.- Conclusions

A mometasone furoate emulsion was successfully produced with a good stability profile. No statistical differences were found between the innovative and the reference formulation in the release profiles or skin absorption parameters.

5.- References

[1] S. Wiedersberg, C.S. Leopold, R.H. Guy, Eur J Pharm Biopharm 68, 453 – 466, 2008.

[2] FDA. Draft guidance on acyclovir ointment,http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm296733.pdf .

[3] V.P. Shah, A. Yacobi, M.E. Lane, Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies for Topical Products: Current Challenges and Future Prospects, in: Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration (V.P. Shah, H.I. Maibach, J. Jenner, Eds), Springer, New York (USA), 2014, 389-396.

[4] Stability Testing of new Drug Substances and Products. Q1A (R2). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1999.

Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) para la caracterización microestructural de comprimidos de copolímeros de almidón e hidroxipropil almidón de tapioca

Mª Rosa JIMÉNEZ-CASTELLANOS[(1)], Isabel SÁNCHEZ[(2)], Inés C. RODRIGUEZ-GALAN[(3)]

1. Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Prof. García Gonzalez nº 2, 41012 Sevilla.
2. Centro de Instrumentación Científica. Campus Universitario de Fuentenueva, 18003 Granada.
3. Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja, 18071 Granada.

Email de contacto: mrosa@us.es

1.- Introducción

La microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) presenta interesantes diferencias con SEM convencional. Permite hacer observaciones de la topografía y estudios composicionales de muestras conductoras, no conductoras e incluso hidratadas [1]. En el campo de la fármacotecnia, su utilización es amplia tanto en el campo de las ciencias de los coloides [2], como en el de los sólidos [3]. Nuestro objetivo se centró, pues, en confirmar la utilidad de ESEM como técnica de apoyo para justificar resultados de compresión previamente obtenidos en comprimidos de almidón e hidroxipropil-almidón de tapioca injertados, al tiempo que evidenciar aspectos nuevos de la micro-estructura de estos copolímeros.

2.- Materiales y métodos

2.-1.- Materiales

Almidón de tapioca-metacrilato de etilo (ATME), Hidroxipropilalmidón de tapioca-metacrilato de etilo (HATME),desecados tras su síntesis en estufa a vacío (EV) (Vacucell 22, Alemania) a 50 ºC hasta peso constante o por liofilización (L) (-80 ºC) (Cryodos-80, España). Como fármaco modelo se usó la teofilina anhidra (T) (Theophylline BP 80) y el ácido esteárico (Estearina) como lubrificante (ambos de Roig Farma, España).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Preparación de los comprimidos: Los diferentes copolímeros (ATME-EV; ATME-L; HATME-EV; HATME-L) se mezclaron con 24% de teofilina (15 min) en una mezcladora cúbica (Erweka, Alemania), y 5 min. más con 1% del lubrificante. Las mezclas se comprimieron en una máquina de comprimir excéntrica (Bonals, España), a dos resistencias a la rotura 70-80 y 140-150 N.

2.2.1.- Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental. Las imágenes se obtuvieron con un ESEM con filamento de emisión de campo (FEG, Schotty) y platina motorizada en 5 ejes (150x150 mm en X/Y) (QuemScan650F, Thermofisher-FEI). Las muestras se estudiaron en modo alto vacío ($<6*10^{-4}$Pa). Las imágenes se adquirieron con un ETD-detector de electrones secundarios, voltaje aceleración 3KV, distancia de trabajo 7,5-10,5 mm, de la zona central de la superficie y plano axial por fragmentación de los comprimidos. Estos fragmentos se pegaron con un adhesivo de doble cara de carbono (C) a un soporte de aluminio y todo el conjunto se recubrió con una fina capa de C depositada por un evaporador (MED-020, BALTEC).

3.- Resultados y Discusión

En estudios previos con SEM [4] no se evidenciaron diferencias en la superficie de los carbohidratos y copolímeros. Sin embargo, y

coincidiendo con Kim [5], ESEM muestra (Fig.1) que la superficie de las partículas de los copolímeros con HAT presentan mayor rugosidad que la de los derivados con AT, independientemente del procedimiento de secado utilizado. Así como que el interior de los copolímeros está constituido por pequeñas esferas de tamaño entre 170 y 205 nm (Fig.2).

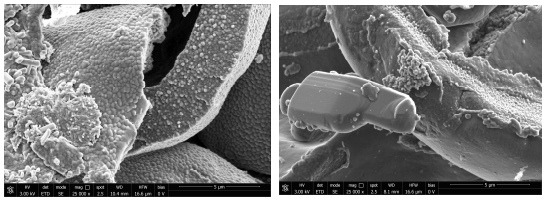


Fig. 1: Partícula de los copolímeros HATME-LT 140 con rugosidad en su superficie (izq.), y de ATME-LT 70 con superficie lisa (der.) (25000 x).

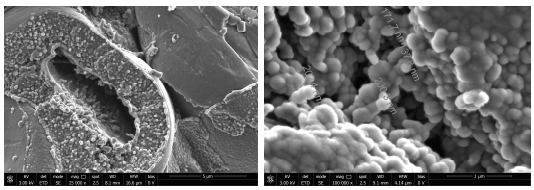


Fig.2.- Interior de una partícula del copolímero ATME-LT 140 (izq.) (25000x) y tamaño de las esferas (der.) (100000 x).

En relación con la superficie de los comprimidos, ESEM podría justificar la necesidad que hubo de aplicar mayor presión en todos los comprimidos desecados en estufa a vacío que por liofilización (Fig. 3) [6].

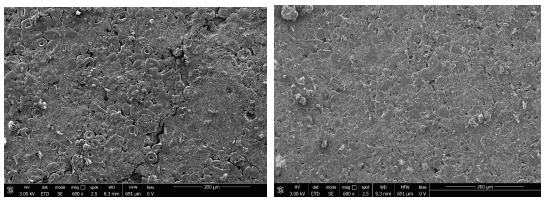


*Fig. 3: Superficie de comprimido*s de *HATME-EVT 140 (izq.)* y *HATME-LT 140 (der.) (600 x).*

Además, ESEM permitió visualizar el mayor carácter plástico de los derivados secados por liofilización frente a los secados en estufa a vacío (Fig. 4) [6].

Asimismo, en un corte axial centrado (Fig. 5), HATME-EVT 140 exhibe una superficie más abrupta y mayor individualización de las partículas que en HATME-LT 140.

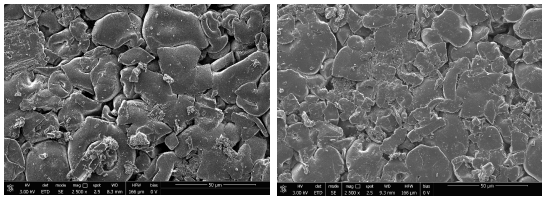


Fig.4: Intrusión mecánica de partículas de HATME-EVT sin llegar a perder su identidad (izq.), y mayor amoldamiento de las partículas con pérdida de su morfología para HATME-LT (der.) (25000x).

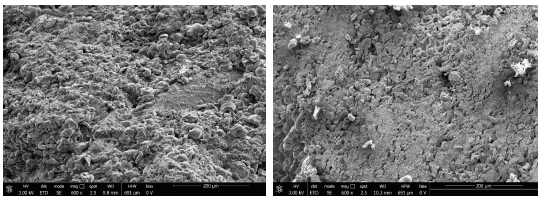


Fig.5: Superficie de un corte axial centrado de comprimidos de HATME-EVT 140 (izq.) y HATME-LT 140 (der.) (600x).

4.- Conclusiones

La microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) se ha mostrado como una herramienta útil para visualizar la deformación de los copolímeros en estudio, avalando el mayor carácter plástico de los copolímeros secados por liofilización. Además, podría justificar la mayor presión que hubo que aplicar en los copolímeros secados en estufa de vacío para obtener unos comprimidos de igual resistencia a la rotura a los desecados por liofilización.

5.- Referencias

[1] E. Conforto, N. Joguet et al. Materials Science and Engineering C, 47:357-366, 2015.

[2] A.M. Donald. Current Opinion in Colloid & Interface Science,3:143-147, 1998.

[3] A.D. Bonillo, I.C. Rodriguéz-Galán et al. AAPS Pharm.Sci.Tech., 18:3286-3295, 2017.

[4] M.Casas, C. Ferrero, V. de Paz, Mª R. Jz-Castellanos. Eur. Polym. J., 45:1765-1776, 2009.

[5] M. Kim.Carbohydrate Polymers 54:173-181, 2003.

[6] M.Casas, C. Ferrero, MªR. Jz-Castellanos. Carbohydrate Polymers, 80:71-77, 2010.

Difusión in vitro del Acetónido de Triamcinolona desde diferentes hidrogeles termosensibles de HA/Plu y PLGA-PEG-PLGA

Cecilia MONZÓN [(1)], Ana SANTOVEÑA [(1,2)], Matías LLABRÉS [(1,2)] y José Bruno FARIÑA [(1,2)].

1. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, 38200, Tenerife, España.
2. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias Universidad de La Laguna, 38200, Tenerife, España.

Email de contacto: ceciliafarmac@gmail.com

1.- Introducción

La necesidad de desarrollar sistemas de liberación controlada de medicamentos ha provocado el aumento del interés por los polímeros termosensibles, que gelifican a la temperatura corporal. Con este fin se han utilizado diferentes tipos de polímeros que permiten obtener hidrogeles con estas características, los copolímeros tribloque de PLGA-PEG-PLGA [1] y los obtenidos con Pluronic F-127 (Plu) y ácido hialurónico (HA) [2] son un ejemplo. Los hidrogeles de polietilenglicol (PEG) y poli [(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)] (PLGA) son muy atractivos por ser biodegradables y tener un buen perfil de seguridad [1].

Tienen un interés especial cuando queremos controlar la cesión del fármaco en zonas anatómicas dónde la inserción de un implante sólido es problemática, como es la administración intravítrea de formulaciones de triamcinolona (TCA) utilizadas en el tratamiento de la retinopatía diabética y el edema macular.

En este trabajo se ha estudiado la difusión del acetónido de triamcinolona (TCA) in vitro desde los hidrogeles preparados a un medio de difusión de Gelano-HA que simula las condiciones del vítreo utilizando un célula diseñada al respecto que permite la caracterización del proceso.

2.- Material y métodos

2.1.- Material

Acetónido de triamcinolona (TCA) (Acofarma, Barcelona, España); Ácido hialurónico (Bioibérica); Lactida, Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, Madrid, España), Glicolida (Boehringer Ingelheim, Barcelona, España), Polietilenglicol (Fluka, Madrid, España).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Síntesis

La síntesis del copolímero tribloque se realizó empleando un Mini-reactor (Trallero y Schlee, Barcelona, España) que permitió un control preciso del tiempo, temperatura, vacío y velocidad de agitación según el método propuesto por Zetner y cols. [1]. Luego se preparó el hidrogel A, mezclando una proporción del copolímero obtenido con agua a 4ºC.

En el caso del copolímero HA/Plu se sintetizó según Lee y cols. [2], y mezclando diferentes cantidades de HA-DN y Plu-SH en una solución de PBS a pH 7,4 y 4ºC se obtuvo el hidrogel B.

2.2.2.- Sistema de difusión

Se utilizó un sistema formado por un compartimento receptor que contiene el medio de difusión, hidrogel de gelano, y un compartimento donante dónde se introdujo el hidrogel (A o B) con TCA. Se prepararon dos sistemas por cada tiempo de muestreo y se conservaron en estufa a 37 ± 1 ºC. Cada sistema nos permitió determinar la cantidad de fármaco total que permanece en el compartimento donante, y la cantidad total de fármaco que ha difundido al compartimento receptor, por lo que se puede

realizar un balance de masas del fármaco en cualquier punto de muestreo.

3.- Resultados y discusión

Como puede observarse en la figura 1 el hidrogel de PLGA-PEG-PLGA (A) a los quince días ha liberado casi el 80 % de TCA. Mientras que el hidrogel de HA/Plu (B) en el mismo periodo de tiempo a cedido menos de un 40% de TCA, e incluso pasados 30 días de ensayo no llega a liberar más de un 52 % de principio activo al medio de gelano-HA.

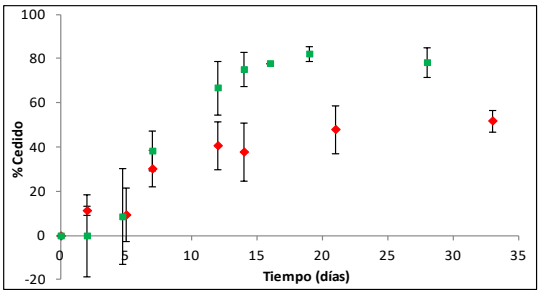


Fig.1: Resumen de la difusión de TCA a gelano desde el hidrogel A (■) y B (♦).

En el caso de los datos obtenidos en el ensayo realizado con el hidrogel B se ajustaron al modelo Korsmeyer-Peppas que explica la difusión de un ingrediente activo a un sistema hinchable [3-4]. Mientras que los datos obtenidos con el hidrogel A se intentaron ajustar a los modelos de cinética de 1er orden, Korsmeyer-Peppas y cinética de raíz cuadrada de Higuchi [5-8].

Los resultados del ajuste realizado para el hidrogel B se muestran en la tabla 1, que como se esperaba para valores de n cercanos a 0.5, k_1 es mayor que k_2, lo que nos indica que la cesión de TCA se debe mayormente a un mecanismo de difusión y no por relajación de la matriz del hidrogel.

Hidrogel A (■)	**Cinética de 1er orden**		**Korsmeyer-Peppas**		**Higuchi**	
	r^2 = 0,8178		ND		r^2 = 0,5556	
Hidrogel B (♦)	**Modelo Korsmeyer-Peppas**			**Modelo Peppas-Sahlin**		
	n	**k**	**r**	**k_1**	**k_2**	**r**
	0,50	0,18	0,953	0,196	-0,004	0,963

ND: No determinado por no tener cantidad suficiente de datos.

Tabla 1: Resumen de datos obtenidos con los diferentes modelos de ajuste en la liberación de TCA desde los hidrogeles A (■) y B (♦).

En el caso del hidrogel A (Tabla 1), en ningún caso se obtuvieron valores aceptables de R^2 (inferiores a 0.9) además no hay datos suficientes de liberación entre el 10 y el 60 % de TCA para ser ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas.

4.- Conclusiones

El dispositivo diseñado para la evaluación del ensayo in vitro, permitió establecer las variables que condicionan la velocidad y mecanismo de cesión de la TCA en ambos hidrogeles.

La liberación del TCA desde el hidrogel A es casi del 80 % en 15 días, pero no se ajusta a ninguno de los modelos cinéticos propuestos.

El hidrogel B muestra un perfil de liberación que lo hace un buen candidato para la administración sostenida ocular de fármacos.

5.- Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Proyecto Nacional de Investigación del Ministerio Español de Ciencia e Innovación SAF2010-17083.

6.- Referencias

[1] G.M. Zetner, R. Rathi, C. Shih, J.C. McRea, M-H. Seo, H. Oh, B.G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan, S. Weitman. Journal of Controlled Release, 72, 203-215, 2001.

[2] Y. Lee, H.J. Chung, S. Yeo, C-H. Ahn, H. Lee, P.B. Messersmith, T.G. Park. Soft Matter, 6, 977-983, 2010.

[3] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Bury, N. A. Peppas. International Journal of Pharmaceutics, 15, 25-35, 1983.

[4] N. A. Peppas. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 60, 110-111, 1985.

[5] L. Chen, Y. Li, W. Shen, K. Li, L. Yu, Q. Chen, J. Ding. Scientific Reports, 6, 31593, 2016

[6] T. Ci, L. Chen, L. Yu, J. Ding. Scientific Reports, 4, 5473, 2014.

[7] R. S. Cuming, E. M. Abarca, S. Duran, A. A. Wooldridge, A. J. Stewart, W. Ravis, R. J. Babu, Y. Lin, T. Hathcock. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 58, 2746-2754, 2017.

[8] L. Zhang, W. Shen, J. Luan, D. Yang, G. Wei, L. Yu, W. Lu, J. Ding. Acta Biomaterialia, 23, 271-281, 2015.

Dissolution rate improvement of naringenin using solvent change method

Ludmila A. G. PINHO [(1)], Lorena F. B. MALAQUIAS [(1)], Tais GRATIERI [(1)], Guilherme M. GELFUSO [(1)], Livia L. SA-BARRETO [(1)], Marcilio CUNHA-FILHO [(1)]

1. Laboratory of Food, Drug and Cosmetics (LTMAC), School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil.

Email: marciliofarm@hotmail.com

1.- Introduction

Naringenin (NAR) is a flavonoid present in citrus fruits with several biological activities such as anti-inflammatory, antithrombotic, antihypercholesterolemic and anticancer. However, its limited solubility in water and consequent low oral bioavailability has limited its clinical application [1].

Microcrystals produced by techniques in which the drug precipitation is caused by a change in the polarity of the solvent in presence of a stabilizing polymer has been described as an effective method to increase the dissolution rate of poorly water-soluble drugs [2]. Moreover, the possible drug encapsulation into cyclodextrins using this method is still underexplored.

Thus, the aim of this work was to improve NAR dissolution rate following the solvent change method using different polymers and cyclodextrin.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

NAR (purity ≥ 98%) was purchased from Sigma-Aldrich. Benecel™ (HPMC), Plasdone™ (PVPVA) and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) were donated by Ashland. Soluplus® (SOL) was donated by BASF.

2.2.- Sample preparation

Preliminary studies were performed to determine the ideal conditions for the preparation of microcrystals using the solvent change method [2]. Briefly, an aqueous solution of a polymeric stabilizing agent (PVPVA, SOL or HPMC) at 0.1% (w/v) was poured rapidly into a solution of NAR dissolved in acetone (100mg mL^{-1}) under stirring at room temperature. The micro-suspension was then filtered and dried in an oven at 37 °C for 24h. Similarly, an equimolar solution of NAR and HPBCD in acetone was submitted to the solvent change method using water without polymer.

2.3.- Physicochemical tests

Morphology and particle size of samples before and after solvent change precipitation were assessed by a scanning electronic microscope (SEM).

Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric (TG) analyses were performed under nitrogen-controlled atmosphere at a flow of 50 mL min^{-1}. Samples of approximately 3 mg were analyzed under a heating rate of 5^{o} C min^{-1} from 25 to 500^{o} C.

Dissolution profiles of samples were determined. The assay conditions were 900 mL of phosphate buffer pH 6.8; 37 °C; and paddle rotation at 100 rpm. NAR was quantified using a spectrophotometric method previously validated. Experiments were performed in quadruplicate and dissolution profiles were evaluated using their correspondent dissolution efficiency at 30 min (DE30) [2].

3.- Results and Discussion

Different polymers were tested to produce precipitated particles in the presence of stabilizing agent. The use of this component and the type of polymer were determinant for the NAR particle size obtained in each system. Particularly, reduced crystalline particles of less than 10 µm were produced using HMPC (Fig. 1). On the other hand, the system produced with cyclodextrin (NAR-HPBCD) gave rise to larger agglomerates particles without a defined form (Fig. 1). Thermal analysis showed the original

crystalline phase of NAR did not change with the precipitation process (Fig. 2). Nevertheless, the drug melting peak at 254° C disappeared in the sample containing cyclodextrin, indicating the possible encapsulation of NAR (Fig. 2). TG results, in turn, did not indicate any incompatibility or instability in the analyzed systems.

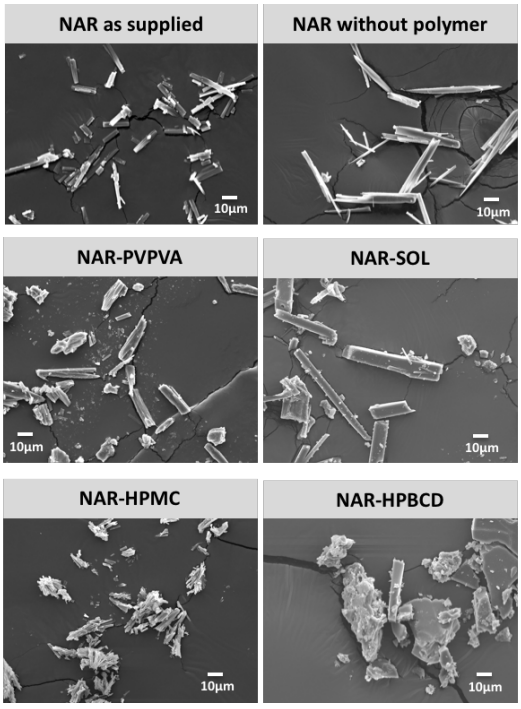


Fig. 1: SEM micrographs of NAR as supplied, and particles obtained by solvent change method.

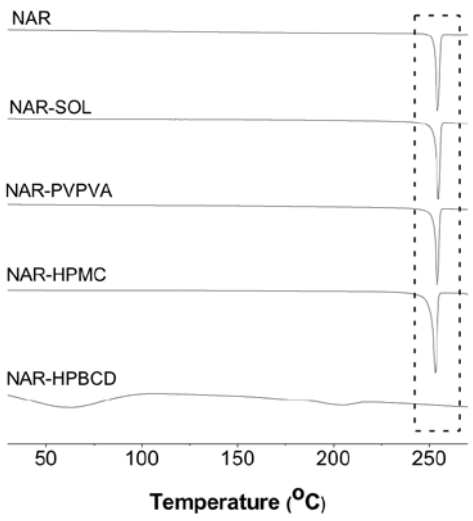


Fig. 2: DSC curves of NAR as supplied, and particles obtained by solvent change method.

Finally, all systems presented improved NAR dissolution rate, especially the microparticles obtained using HPMC and HPBCD, which presented DE30 almost four-fold higher than NAR as supplied (Fig. 3). In the first case, the improvement in the dissolution rate could be explained by the increase in the specific surface area of the NAR as observed by SEM, whereas the system produced with cyclodextrin possibly achieved a higher level of drug complexation.

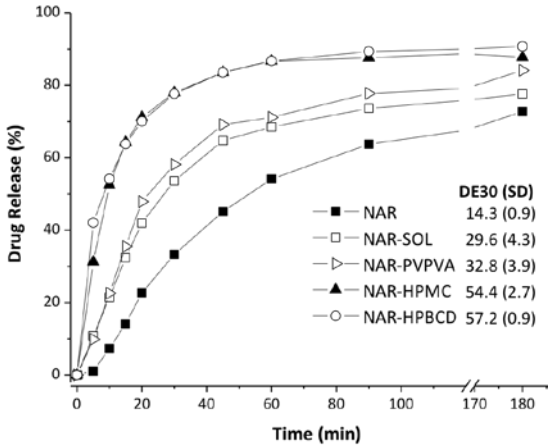


Fig. 3*:* Dissolution profile of NAR as supplied, and particles produced by solvent change method, together with its mean values of the DE30 and the standard deviation (SD).

4.- Conclusions

The solvent change method presented interesting prospects for improving the bioavailability of NAR and consequently could favor its medical use.

5.- Acknowledgments

This research was funded by FAPDF (grant n. 193.001741/2017). The authors would also like to thank BASF and Ashland for donation of the polymers.

6.- References

[1] N. Zhang, Z. Hu, Z. Zhang, G. Liu, Y. Wang, Y. Ren, X. Wu, F. Geng, Cellular and Molecular Neurobiology, 38, 549-557, 2018.

[2] F.P. Maximiano, L.M. de Paula, V.P. Figueiredo, I.M. de Andrade, A. Talvani, Sá- L.C. Barreto, M.T. Bahia, M.S. Cunha-Filho, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011, 78, 377-84.

Preparación de una nueva familia de dendrímeros policatiónicos de tipo "star" con nucleo de ciclotrehalana y su evaluación como vectores de genes no-virales

Ana I. CARBAJO-GORDILLO[(1)], José L. JIMÉNEZ BLANCO[(2)], Carmen ORTIZ MELLET[(2)], José M. GARCÍA FERNÁNDEZ[(1)], Concepción TROS DE ILARDUYA[(3)]

1. Instituto de Investigaciones Química (IIQ), CSIC – Universidad de Sevilla, Avda. Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla
2. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, c/ Profesor García González 1, 41012 Sevilla
3. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona

Email de contacto: ctros@unav.es

1.- Introducción

A pesar de los esfuerzos realizados para la formulación de ácidos nucleicos terapéuticos, los resultados alcanzados hasta la fecha, ya sea con vectores virales o no-virales, están lejos de satisfacer las expectativas. Los virus son agentes infecciosos que han evolucionado de manera natural y, consecuentemente, son vectores muy eficientes, algunos de los cuales han proporcionado resultados exitosos en ensayos clínicos. Sin embargo, la limitación en el tamaño del ácido nucleico que pueden encapsular, los problemas inherentes de inmunogenicidad y la dificultad técnica y coste extremadamente elevado de su producción en gran escala representan obstáculos importantes para su translación a la clínica. Los vectores no-virales, por su parte, permiten superar estas dificultades, pero su eficacia de transfección sigue estando por debajo de niveles farmacológicamente satisfactorios. Su optimización está lastrada por la falta de definición estructural y/o conformacional de los sistemas comúnmente utilizados, ya se trate de policationes o de lípidos catiónicos, lo que imposibilita la realización de estudios rigurosos de relación estructura/actividad. Persiste, por tanto, la necesidad urgente de desarrollar vectores no-virales con estructura perfectamente definida a nivel molecular y accesibles mediante estrategias compatibles que garanticen su carácter monodisperso y adaptadas a la generación de diversidad molecular [1].

Resultados previos han demostrado que la incorporación de múltiples cabezas catiónicas y cadenas lipófilas con orientación definida en ciclooligoscáridos de las familias de las ciclodextrinas (CDs) [2] y las ciclotrehalanas (CTs) [3], mediante técnicas de síntesis de precisión, permite obtener derivados anfifílicos monodispersos con buenas propiedades de transfección in vitro e in vivo (Figura 1).

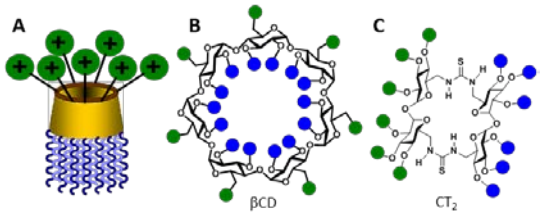


Figura 1. Estructura general de los vectores policatiónicos anfifílicos derivados de ciclooligosacáridos (A) con núcleos de ciclodextrina (B) y ciclotrehalana (C).

En esta comunicación presentamos datos sobre una nueva familia de derivados con estructura de dendrímeros tipo "star" construidos sobre núcleos de ciclotrehalanas de diferente tamaño: ciclodímeros y ciclotrímeros del disacárido trehalosa (CT_2 y CT_3, respectivamente).

2.- Materiales y métodos

2.1.- Síntesis

Los derivados de CT_2 y CT_3 **1-4** incluidos en este estudio (Figura 2) se han obtenido a partir del disacárido α,α'-trehalosa mediante funcionalización selectiva y macrociclación. La adición de cisteamina sobre grupos *O*-alilo (reacción tiol-eno) permite incorporar

las cadenas aminadas lineales en los compuestos de primera generación **1** y **3**. Los análogos ramificados de segunda generación **2** y **4** se obtienen a partir de **1** y **3** por condensación con segmentos de tris(2-aminoetil)amina mediante reacción de formación de grupos tiourea.

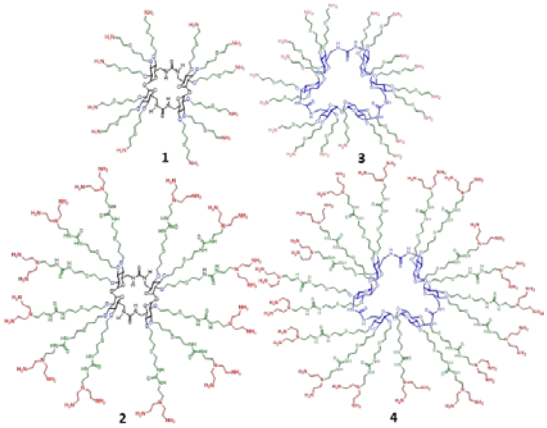


*Figura 2. Estructuras de los nuevos dendrímeros tipo "star" con núcleo de CT_2 (**1** y **2**) y CT_3 (**3** y **4**).*

2.2.- Formulación de nanocomplejos CT/pDNA

Se ha utilizado en todos los casos un plásmido reportero codificante de luciferasa. Los complejos (CTplejos) se formularon a diferentes relaciones de nitrógenos protonables en el vector/grupos fosfato en el pDNA (N/P) y se caracterizaron mediante medidas de radio hidrodinámico (DLS), carga superficial (potencial z) y capacidad de proteger y liberar intacta su carga (electroforesis en gel de agarosa en ausencia y en presencia de DNAasa).

2.3.- Ensayos de transfección

Se ha evaluado la eficacia de transfección en células COS-7 (epiteliales) y HepG2 (hepatocarcinoma) en presencia de suero (10%).

3.- Resultados y Discusión

Todos los dendrímeros preparados complejaron y protegieron el pDNA sin degradarlo. Los compuestos **1**, **2** y **4** originaron nanopartículas de tamaño comprendido entre 100-150 nm y potencial z positivo a valores de N/P 5 y 10. Sin embargo, en el caso del derivado **3** se observó agregación por DLS en estas condiciones; se obtuvieron CTplejos de tamaño adecuado cuando se formularon a N/P 20. En células HepG2, los derivados de CT3 **3** y **4** a N/P 20 y 10, respectivamente, fueron netamente superiores (5-20 veces) al PAMAM y a los derivados de CT_2 **1** y **2** en los ensayos de transfección. En COS-7, el derivado de CT_2 **2** resultó especialmente eficaz, proporcionando valores de expresión de luciferasa más de un orden de magnitud mayores que los obtenidos con PAMAM-G5 incluso a N/P5 (Figura 3).

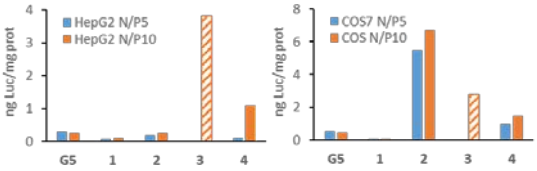


Figura 3. Resultados de transfección en células HepG2 y COS-7.

4.- Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología sintética para acceder a dendrímeros policatiónicos homogéneos con un núcleo constituido por módulos de trehalosa (ciclotrehalanas) y se ha demostrado su capacidad para complejar pDNA y promover la transfección en células.

5.- Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO, con cofinanciación FEDER (CTQ2015-64425-C2-1-R, CTQ2015-64425-C2-2-R y SAF2016-76083-R) y por la Junta de Andalucía (FQM2012-1467). A.I. Carbajo disfruta un contrato FPI (cofinanciado FSE).

6.- Referencias

[1] J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández. J. Drug Deliv. Sci. Technol., 42, 18-37, 2017.

[2] L. Gallego-Yerga, J. M. Benito, L. Blanco-Fernández, M. Martínez-Negro, I. Vélaz, E. Aicart, E. Junquera, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, J. M. García Fernández, Chem. Eur. J., 24, 3825-3835, 2018.

[3] J. L. Jiménez Blanco, F. Ortega-Caballero, L. Blanco-Fernández, T. Carmona, G. Marcelo, M. Martínez-Negro, E. Aicart, E. Junquera, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Chem. Commun., 52, 10117-10120, 2016.

Estudio comparativo de seis mezclas de un mismo principio activo co-procesado para evaluar la viabilidad para su compresión por vía directa utilizando la herramienta Diagrama SeDeM

A. Nardi-Ricart [a], I. Nofrerias-Roig [a], M. Suñé-Pou [a,b,c], P. Pérez-Lozano [a,b], E. García-Montoya [a,b] M. Miñarro-Carmona [a,b], J.R. Ticó-Grau [a,b], J.M. Suñé-Negre [a,b]

[a] Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physico-chemical Department, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Av. Joan XXIII, 27-31.08028, Barcelona. Spain.

[b] IDIBELL-UB Research Group; Pharmacotherapy, Pharmacogenomics and Pharmaceutical Technology, Avinguda Granvia, 199-203, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

[c] Department of Molecular Biology. Institute of Parasitology and Biomedicine "Lopez Negra" (IPBLN-CSIC). PTS. Granada 18016. Spain

Email de contacto: annanardi@ub.edu

1.- Introducción

El diagrama SeDeM es una metodología para la caracterización de sustancias para la determinación de su viabilidad para la compresión [1][2][3]. Esta herramienta galénica se aplica en los estudios de preformulación de comprimidos y consiste en determinar el perfil de las sustancias pulverulentas, sean principios activos o excipientes o mezclas de ambos [4].

Este perfil informa sobre la mayor o menor capacidad que tiene dicha sustancia pulverulenta para ser comprimida mediante la tecnología de compresión directa y facilita la elección de excipientes adecuados para la formulación de formas sólidas [5].

El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad que tienen diferentes mezclas de un mismo principio activo con diferentes concentraciones de excipientes para ser comprimidas mediante tecnología de compresión directa, utilizando la herramienta Diagrama SeDeM.

2.-Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Muestra 1: API BR980

Muestra 2: API BR980 micronizado

Muestra 3: API BR980 co-procesado con colágeno

Muestra 4: API BR980 co-procesado con fosfato tricálcico DC

Muestra 5: API BR980 co-procesado con celulosa microcristalina 101

Muestra 6: API BR980 co-procesado con fosfato tricálcico DC y celulosa microcristalina 101

2.2.- Métodos

Se utiliza la metodología del Diagrama SeDeM para las 6 muestras [1][2][3].

3.-Resultados y Discusión

La muestra 1 presenta un valor de 0.42 para el Índice Paramétrico, de 4.92 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 4.69 para el Índice de Buena Compresión. Estos valores bajos indican que la muestra presentará dificultades para su compresión por vía directa. De las 6 incidencias del Diagrama SeDeM, "Deslizamiento/Fluidez" y "Dosificación/Lubrificación" presentan valores medios deficitarios que deberán mejorarse con la adición de excipientes.

La muestra 2 presenta un valor de 0.42 para el Índice Paramétrico, de 4.95 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 4.72 para el Índice de Buena Compresión. Estos valores deficientes indican que la muestra presentará dificultades para su compresión por vía directa. Del mismo modo que la muestra 2, las incidencias "Deslizamiento/Fluidez" y "Dosificación/Lubrificación" presentan valores medios deficitarios que deberán mejorarse con la adición de excipientes.

La muestra 3 presenta un valor de 0.42 para el Índice Paramétrico, de 5.25 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 5.00 para el Índice de Buena Compresión. A pesar de que 2 de

los 3 índices presentan valores aceptables (≤5) y de que la evaluación global de las incidencias es positiva, debe tenerse en cuenta que esta muestra presenta una elevada higroscopicidad debida a la adición de colágeno la cual podría afectar al proceso de compresión y de estabilidad de los comprimidos.

La muestra 4 presenta un valor de 0.50 para el Índice Paramétrico, de 5.54 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 5.28 para el Índice de Buena Compresión. A pesar de que los 3 índices presentan valores correctos y de que la adición de fosfato tricálcico DC ha mejorado considerablemente la fluidez de la muestra, también se ha visto incrementada la higroscopicidad de la misma, parámetro que podría afectar la compresión y la estabilidad de los comprimidos.

La muestra 5 presenta un valor de 0.58 para el Índice Paramétrico, de 5.66 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 5.38 para el Índice de Buena Compresión. Los 3 índices presentan valores superiores a 5, por lo que la adición de Celulosa microscristalina 101 ha mejorado considerablemente la fluidez y la compresibilidad de la muestra sin verse afectada la hisgroscopicidad de la misma.

La muestra 6 presenta un valor de 0.50 para el Índice Paramétrico, de 5.40 para el Índice de Perfil Paramétrico y de 5.14 para el Índice de Buena Compresión. Los 3 índices presentan valores aceptables. La adición de ambos excipientes ha mejorado considerablemente la fluidez de la muestra, pero el Fosfato tricálcico DC ha incrementado la higroscopicidad de la misma.

4.-Conclusiones

1) Las muestras 1 y 2 no presentan características adecuadas para una buena compresión directa ya que ambas presentan unos valores de IP, IPP IGC inferiores a 5 y muchos de los parámetros estudiados presentan valores deficientes.

2) Las muestras 3, 4 y 6, a pesar de obtener valores aceptables en los índices de IP, IPP y IGC, lo cual presentan una elevada higroscopicidad, es motivo suficiente para ser descartadas para una compresión directa ya que se podría ver afectado tanto el proceso de fabricación como la estabilidad de los comprimidos obtenidos.

3) La muestra 5 es la más adecuada para una compresión directa ya que presenta valores de IP, IPP i IGC superiores a 5 manteniendo valores de higroscopicidad adecuados para el proceso de compresión directa.

5.-Agradecimientos

Trabajo realizado dentro de proyecto de investigación FBG309021 establecido entre Lab. Bioibérica S.A y la Fundación “Bosch i Gimpera” de la Universidad de Barcelona.

5.-Referencias

1. Suñé Negre JM, Roig Carreras M, Fuster García R, Hernández Pérez,C, Ruhí Roure R, García Montoya E, Miñarro Carmona M, Pérez Lozano P, Ticó Grau J. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relacióna su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. Cienc Tecnol Pharm. 2005;15:125–36.

2. Suñe-Negre J, García Montoya E, Perez-Lozano P, Edward Aguilar-Díaz J, Roig M, Fuster R, et al. SeDeM Diagram: A New Expert System for the Formulation of drugs in Solid form. In: InTech, editor. Expert System for Human, Materials and Automation. Rijeka (Croatia); 2011. p. 17–34.

3. Suñe Negre J, Roig M, Fuster R, García Montoya E, Perez-Lozano P, Edward Aguilar-Díaz J, et al. SeDeM Diagram: an expert system for preformulation, characterization and optimization of tablets obtained for direct compression. In: Limited WP, editor. Formulation tools for pharmaceutical development. Cambridge; 2013. p. 109–35.

4. Pérez Lozano P, Suñe Negre J, Miñarro M, Roig M, Fuster R, García Montoya E, et al. A new expert system (SeDeM Diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. Eur J Pharm Biopharm. 2006;64:351–9.

5. Suñé-Negre JM, Pérez-Lozano P, Miñarro, et al. Application of the SeDeM Diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. Eur J Pharm Biopharm. 2008;69(3):1029–39.

Actividad antioxidante de polvo medicinal para ostomía conteniendo propóleos verde

Juliana HOCSIS BRAGA[(1)], Juliana SOUZA CARNAÚBA[(1)], Jéssica Thalita FERNANDES ALVES DA SILVA[(1)], Ludmila Alvim GOMES PINHO, Izabel Cristina RODRIGUES DA SILVA[(1)], Eliana FORTES GRIS[(1)], Marcilio CUNHA-FILHO[(1)], Lívia Cristina Lira de SÁ-BARRETO[(1)]

1. Universidade de Brasília.

Email de contacto: liviabarretofarm@hotmail.com

1.- Introducción

Ostomía es un procedimiento quirúrgico en el que se realiza una apertura para un órgano hueco (tracto digestivo, urinario o respiratório), como alternativa para secretar los fluidos biológicos [1].

El tratamiento y manejo actual de los pacientes con ostomía ocurre con hidrocoloides. Ellos mantienen el área seca, impermeable y con tensión adecuada de O_2, permitiendo la hemostasia de la piel [2,3]. Los productos comerciales existentes para este fin son cremas, coberturas, aerosoles, pastas o sólidos pulverulentos, elaboradas, en general, sin sustancias farmacológicas [4,5].

La incorporación de insumos naturales activos, como el propóleos, a estos productos puede resultar en una alternativa viable para añadir a estos preparados efectos farmacológicos como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório y antiviral [6,7,8], y así, prevenir factores de riesgos que influyen en las complicaciones de la estomía y de la zona periestomial.

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue la producción y determinación de la actividad antioxidante de polvo medicinal conteniendo propóleos para el tratamiento de estomía.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Propóleos verde *in natura* (*Mel do Sol*); extracto comercial de propóleos verde, solución hidroalcóholica 70%, con mínimo de 11% de extracto seco; copolímero acrílico Eudragit® L100 (Evonik); polímero hidrocoloide, carboximetilcelulosa, agua deionizada, solventes y reactivos fueron obtenidos en los laboratorios de Tecnología de la Faculdade de Ceilândia y Laboratório de Tecnología de Medicamentos, Alimentos y Cosméticos (LTMAC), de la Facultad de Salud de la Universidade de Brasília - UnB.

2.2.- Métodos

2.2.1.- Producción del polvo medicinal

Micropartículas fueram elaboradas por *Spray Dryer* a partir del extracto comercial del propóleos verde (PRP) y Eudragit® L100 (EuL100), 1:3 p/p, respectivamente.

Las condiciones del secado utilizadas en el equipamiento *Spray dryer* (LabMaq) fueran: atomización 1,2 mm; temperatura de entrada 135 °C; flujo del aire de secado 4,5 m^3/min, y flujo de la muestra 0,35 L/h.

La producción del polvo medicinal, conteniendo propóleos fue finalizada con mezcla, en mortero, de las micropartículas (PRP:EuL100, 1:3 p/p) con polímero hidrofílico (carboximetilcelulosa).

2.2.2.- Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH)

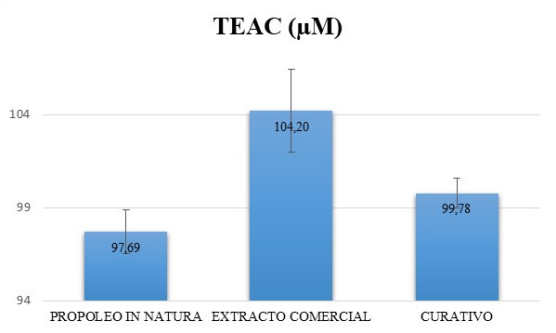
La capacidad antioxidante del propóleos verde *in natura*, del extracto comercial y del polvo medicinal producido fue realizada por el método de secuestro del radical libre DPPH y expresada en Concentración Antioxidante Total Equivalente al Trolox (TEAC) [9].

Fue utilizado 2,9 mL de la solución del radical DPPH en etanol y 0,1 mL de las diluciones del propóleos *in natura* disuelto en solución hidroalcohólica 50%, extracto comercial o polvo medicinal previamente disuelto en solución hidroalcohólica 70% (1:150 v/v). La absorbancia del radical libre fue determinada a 517nm, antes de la incorporación de la muestra y treinta minutos después de la incorporación de la muestra.

Estos datos permitieron la obtención del % de inhibición necesario a la determinación del TEAC[9]. La prueba estadística fue ANOVA y Tukey test en el *software* SPSS.

3.- Resultados y Discusiones

La Figura 1 presenta los resultados obtenidos en el análisis antioxidante. Los resultados ponen de manifiesto que el uso de la tecnología de *Spray dryer* produce reducción significativa (p<0,05) en la actividad antioxidante del insumo natural presente en el curativo. Por otra parte, el curativo aún puede actuar en el proceso oxidativo que ocurre durante la cicatrización de la herida [8], pues mantuvo considerable actividad antioxidante. Además, la forma sólida permite la estabilidad del producto y posible extensión de su plazo de validez, lo que es deseado por las industrias farmacéuticas.



Teste de Tukey

Propoleo in natura vs. Extrato comercial	P<0,01
Propoleo in natura vs. Curativo	No hay diferencia
Extrato comercial vs. Curativo	P<0,05

Fig 1: Comparación de la actividad antioxidante del curativo para ostomía y su insumo natural.

Es posible que la diferencia observada entre el extracto comercial y el propóleos *in natura* (P<0,01) se debe a la variación que suele ocurrir en los productos de orígene natural y/o el uso de proporción distinta de alcohol en la preparación de la muestra *in natura*.

4.- Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a las empresas Mel do Sol y Evonik por las donaciones de materiales para este estudio.

5.- Referencias

[1] V.C. MAURICIO *et al*. The view of nurses about educational practices targeted at people with a stoma. Esc. Anna Nery, Rio de Janeiro , v. 21, n. 4, e20170003, 2017 Epub Sep 21, 2017.

[2] B. A. HEYNEMAN, D. K. VANDERWEE. A systematic review of the use of hydrocolloids in the treatment of pressure ulcers. J Clin Nurs. v. 17, p. 1164–1173, 2008.

[3] L.S. PINHEIRO, E.L. BORGES, M.T.V. DONOSO. Uso de hidrocolóide e alginato de cálcio no tratamento de lesões cutâneas. Rev. bras. enferm., Brasília. v. 66, n. 5, p. 760-770, Oct. 2013.

[4] S. HEDREN *et al*. Clinical practice guidelines for ostomy surgery. Dis Colon Rectum. v. 58, p. 375–387, 2015.

[5] J. BURCH. Peristomal skin care and the use of accessories to promote skin health. British Journal of Nursing, v. 20, n. Sup3, p. S4-S10, 2011.

[6] A. PEREIRA *et al*. "First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test", Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 7, p. 2580–2584, Apr. 2008.

[7] M.A.S. COUTINHO, M.F. MUZITANO, S.S COSTA. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. Revista Virtual de Quimica, v. 1, n.3, p. 241-256, jun. 2009.

[8] M. H. BARBOSA *et al*. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta paul. enferm.*, São Paulo , v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.

[9] E. F. GRIS, F. MATTIVI, E. A. FERREIRA, U. VRHOVSEK, R. C. PEDROSA. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines, *Food Chemistry*, v. 126, n. 1, p. 213-220, 2011.

Ion-pair approach coupled with nanoparticle formation

Isabel LOZOYA-AGULLO[(1,2)], Marcos PLANELLES[(1)], Matilde MERINO[(2)], Marival BERMEJO[(1)], Isabel GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(1)], Marta GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[(1)]

1. Engineering: Pharmacokinetics and Pharmaceutical Technology Area. Miguel Hernandez University, San Juan de Alicante, Alicante, 03550, Spain.
2. Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Valencia University, Valencia, Valencia, 46100, Spain.

Email de contacto: isabel.gonzalez@goumh.umh.es

1.- Introduction

Atenolol is a drug widely used for the treatment of hypertension. However, the great drawback it presents is a low bioavailability after oral administration. To obtain formulations that allow to improve the bioavailability of this drug is a challenge for the pharmaceutical technology.

The objective of this work was to increase the rate and extent of intestinal absorption of atenolol as model of a low permeability drug, developing a double technology strategy.

2.- Materials and methods

Atenolol was the ionized drug chosen to develop an ion-pair and the counter ion employed was brilliant blue. The molar relationship drug:counter ion was 1:1. Both molecules were dissolved in an aqueous solution in order to enable the ion-pair formation.

PLGA NPs loaded with the atenolol-brilliant blue ion-pair were produced according to a modified nanoprecipitation method. In order to keep the 1:1 molar relationship drug: counter ion, 1.33 mg of atenolol and 3.96 mg of brilliant blue were dissolved in 50 mL of 1% (w/v) polyvinil alcohol (PVA) aqueous solution and 95 mg of PLGA were dissolved in 5 mL of acetone. Encapsulation of water-soluble drugs into PLGA NPs is done by double emulsion techniques, more complex techniques than nanoprecipitation method.

The organic phase (acetone + PLGA) was added dropwise, with the aid of a syringe and a needle, over the aqueous phase under magnetic stirring. The magnetic stirring was maintained during 3-4 h at 300 rpm to ensure the complete acetone evaporation. The resulting suspension was centrifugated to recover the NPs (40000 g 20 min). The pellet was left at room temperature during 24 h to dry it.

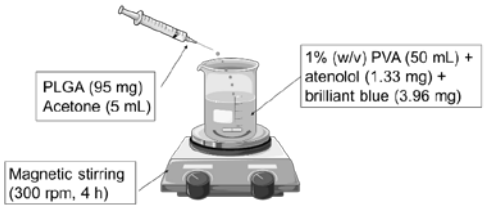


Fig 1: Scheme of NP formation

3.- Results and discussion

To increase atenolol permeability an ion pair with brilliant blue was designed and the sustained release achieved through encapsulation in polymeric nanoparticles (NPs). The in vitro release studies showed a pH-dependent release from NPs, (particle size 437.30 ± 8.92) with a suitable release

profile of drug (atenolol) and counter ion (brilliant blue) under intestinal conditions.

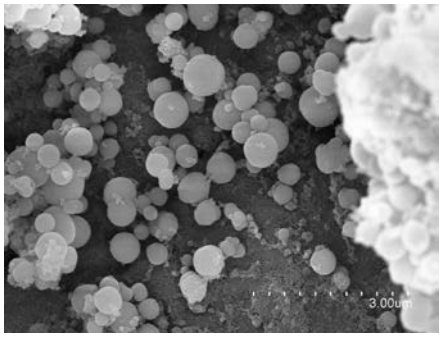


Fig 2. Scanning electron microscope image of ion-pair NPs.

Moreover, with the in vivo assays, a significant increase (2-fold) of atenolol bioavailability after administering the ion-pair NPs by oral route was observed.

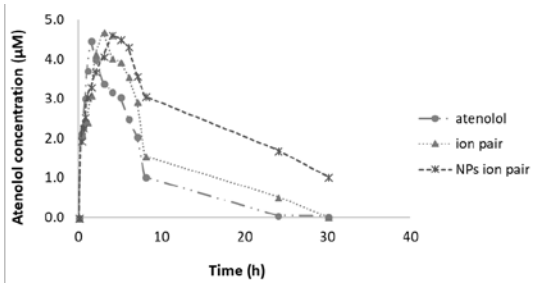


Fig. 3. Oral profiles from atenolol, ion-pair and ion-pair NPs.

4.- Conclusions

This study confirms that an ion-pair is a suitable strategy to increase the permeability of a low permeability charged drug but not enough to get complete drug absorption. Moreover, PLGA-NPs are an optimal choice to encapsulate an ion-pair and release both component of the ion-pair it in a controlled manner: simultaneously and progressive. Therefore, combining both strategies (ion-pair and PLGA-NPs) controlled release of the drug and its counterion have been reached. These achievements are helpful for low permeability charged drugs employed in treatments of chronic diseases. Hence, the knowledge obtained with this work can be applied to develop more efficient controlled release formulations using drugs with similar features to atenolol: low colonic permeability, hydrophilic and with ionized groups at physiological pH.

5.- Acknowledgements

SAF2016-78756(AEI/FEDER, EU)

6.- References

[1] H. Lennernas. Eur J Pharm Sci, 57, 333-41, 2014.

[2] C. Cunha-Reis, A. Machado, L. Barreiros, F. Araújo, R. Nunes, V. Seabra, D. Ferreira, M.A. Segundo, B. Sarmento, J. das Neves. J Control Release, 243, 43-53, 2016.

[3] I. Lozoya-Agullo, F. Araujo, I. Gonzalez-Alvarez, M. Merino-Sanjuan, M. Gonzalez-Alvarez, M. Bermejo, B. Sarmento. Eur J Pharm Sci, 115, 119-25, 2018.

[4] I. Lozoya-Agullo, I. Gonzalez-Alvarez, M. Gonzalez-Alvarez, M. Merino-Sanjuan, M. Bermejo. J Pharm Sci, 104, 3136-45, 2015.

Administración oral en pediatría: Impacto de la osmolaridad en la farmacocinética de absorción.

Alejandro RUIZ-PICAZO[1-2], Jose Manuel DELMORAL-SANCHEZ[1-2], Andres NAVARRO[3], Marta GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[1] Isabel GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[1], Marival BERMEJO[1]

1. Departamento de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández, Elche, España.
2. Institute of Molecular and Cellular Biology of Miguel Hernandez University. Avda de la Universidad s/n, 03202 Elche (Alicante) Spain
3. Pharmacy Service. General University Hospital of Elche, 03202 Elche (Alicante) (Spain)

Email de contacto: isabel.gonzalez@goumh.umh.es

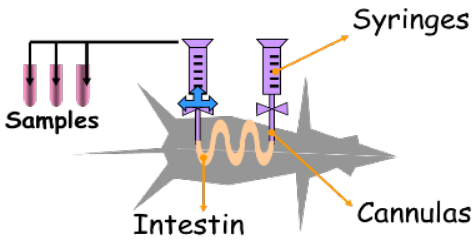
1.- Introducción

La población pediátrica necesita una administración oral líquida, lo que lleva a los servicios de farmacia de los hospitales a formular todo tipo de medicamentos en forma de jarabe cuando no hay una presentación comercial. La osmolaridad de estas presentaciones generalmente no se mide, ni su posible efecto sobre la biodisponibilidad. El objetivo de este estudio es verificar el efecto de la osmoliaridad en la permeabilidad de los medicamentos comúnmente formulados en jarabe para pediatría.

2.- Materiales y Métodos

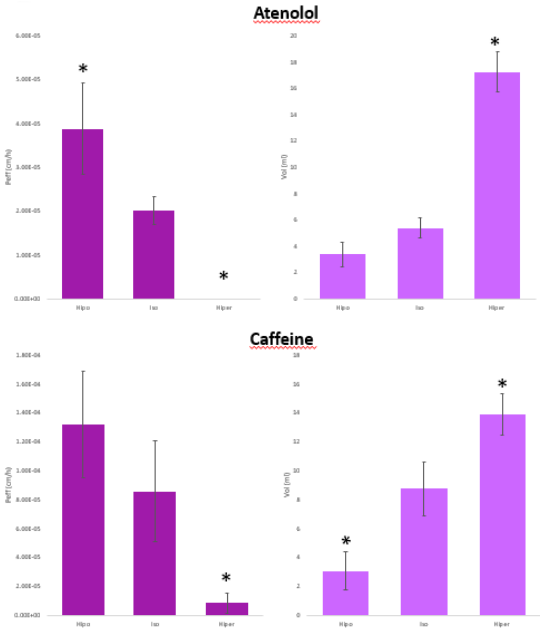
Se seleccionaron los siguientes farmacos por ser comunmente usados en los sevicios de neonatos: (Atenolol, Cafeina, Furosemida, Hidrocortisona y Paracetamol)

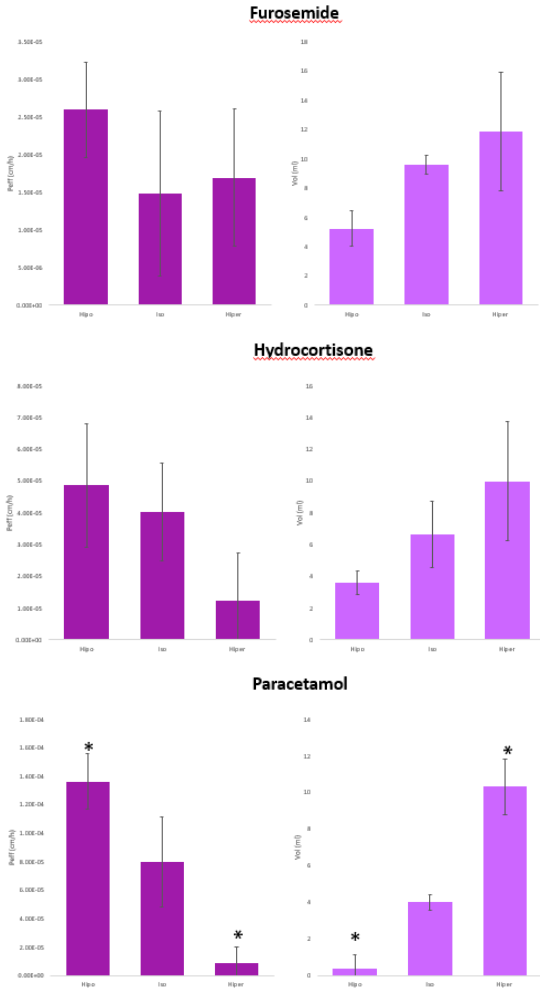
Las costantes de velocidad de absorción y los valores de permeabilidad de los fármacos estudiados se determinaron en el intestino delgado completo (n = 6-7) utilizando el método de perfusión "de ciclo cerrado" in situ basado en la Técnica Doluisio.



3.- Resultados y Discusión

La media de los valores de permeabilidad para diferentes ratas obtenidas con la técnica de perfusión basada en el método Doluisio y el volumen final obtenido en mL se muestran en la Figura 1. La absorción de fármacos se acompaña de una absorción acuosa que puede ayudar o dificultar la absorción del fármaco.





Como se esperaba, se muestra que la administración de diferentes osmolaridades varía la absorción acuosa, pero también se muestra que este cambio también afecta la permeabilidad de los fármacos estudiados.

4.- Conclusiones

La osmolaridad puede modificar la permeabilidad y, por lo tanto, la biodisponibilidad. Este efecto debe tenerse en cuenta al formular jarabes para uso pediátrico ya que se podría estar sobredosificando o por el contrario no se estaría llegando a la concentración deseada.

6.- Referencias

1. American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. Pediatrics. 1976 Feb;57(2):278–85.
2. Pearson F, Johnson MJ, Leaf AA. Milk osmolality: does it matter? Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2013 Mar;98(2):F166-169.
3. Fernández Polo A, Cabañas Poy MJ, Clemente Bautista S, Oliveras Arenas M, Castillo Salinas F, Hidalgo Albert E. [Osmolality of oral liquid dosage forms to be administered to newborns in a hospital]. Farm Hosp Organo Of Expresion Cient Soc Espanola Farm Hosp. 2007 Oct;31(5):311–4.
4. Steele JR, Meskell RJ, Foy J, Garner AE. Determining the osmolality of over-concentrated and supplemented infant formulas. J Hum Nutr Diet Off J Br Diet

Tratamiento de la enfermedad de Fabry mediante terapia génica no viral dirigida a células endoteliales

Paula ROLDÁN[(1)], Josune TORRECILLA[(1)], Mónica VICENTE-PASCUAL[(1)], Itziar GÓMEZ[(1)], Ana del POZO-RODRÍGUEZ[(1)], Alicia RODRÍGUEZ-GASCÓN[(1)], María Ángeles SOLINÍS[(1)]

1. Farmacocinética, Nanotecnología y Terapia Génica (PharmaNanoGene). Facultad de Farmacia. Centro de Investigación Lascaray Ikergunea. Universidad del País Vasco UPV/EHU. España

Email de contacto: marian.solinis@ehu.eus

1.- Introducción

La enfermedad de Fabry (EF) es un trastorno metabólico hereditario monogénico debido a la mutación del gen que codifica la enzima α- Gal A. Es una enfermedad rara en la que la deficiencia en la actividad enzimática da lugar a un almacenamiento lisosomal progresivo de glicoesfingolípidos, especialmente en los lisosomas de las células endoteliales.

El abordaje de la EF mediante terapia génica in vivo dirigida a las células afectadas requiere que los sistemas de transfección empleados presenten no sólo una adecuada capacidad de transfección en esas células sino también una biodistribución selectiva hacia la célula diana. De este modo, se lograría incrementar tanto la eficacia de la terapia como su seguridad. Los vectores basados en Nanopartículas Sólidas Lipídicas (SLNs) han demostrado una alta capacidad de transfección en diferentes tipos de células. Una de sus principales ventajas es su amplia versatilidad, ya que es posible modular la biodistribución y optimizar la eficacia de transfección mediante la adecuada selección de los componentes y ligandos específicos. La incorporación en las formulaciones de ligandos que se unen a la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, sobreexpresada en la superficie de las células endoteliales afectadas por la EF, podría proporcionar tras su administración intravenosa una biodistribución selectiva del vector hacia las células afectadas [1].

El objetivo de este trabajo es el diseño y evaluación en una línea celular establecida procedente de células endoteliales de un paciente con EF (IMFE1), de vectores basados en SLNs combinadas con un anticuerpo monoclonal de gran afinidad anti ICAM-1 (anti-ICAM1), como sistemas de administración del gen que codifica la enzima α-Gal A.

2.- Material y métodos

2.1.- Preparación y caracterización de los vectores

Para la elaboración de los vectores, se combinaron los diferentes componentes evaluándose el orden de adición de los mismos. Finalmente se seleccionó el siguiente método: el anti-ICAM1 se combinó con el plásmido pCMV-EGFP (codifica la GFP; proteína verde fluorescente) o el plásmido pR-M10-α-Gal A. Posteriormente se añadió una solución acuosa de protamina (P) y de dextrano (DX) o galactomanano (GM). Finalmente, la mezcla se adicionó a una suspensión de SLNs elaboradas según el método de emulsificación y evaporación del solvente [2].

Se caracterizó el tamaño, potencial Zeta e índice de polidispersión (PdI) de las formulaciones, así como la capacidad de los vectores de unir, proteger y liberar el ADN.

2.2.- Estudios “in vitro”

2.2.1.-Inmunocitoquímica

La expresión del receptor ICAM-1 en IMFE1 se confirmó mediante inmunocitoquímica, empleando el anticuerpo monoclonal antiICAM-1 como anticuerpo primario y AlexaFluor-488 como secundario.

2.2.2.-Evaluación de la eficacia de transfección de los vectores en células IMFE1

Se evaluó la internalización de los vectores, el porcentaje de células transfectadas y la viabilidad celular por citometría de flujo. La producción de GFP y la actividad de la enzima α-Gal A se midieron por fluorimetría [3].

3.- Resultados

Los datos de tamaño de partícula, PdI y potencial Zeta de las formulaciones se recogen en la Tabla 1. Tras evaluar la capacidad de protección y liberación del material genético de

las formulaciones mediante geles de electroforesis, se seleccionaron los vectores con las siguientes proporciones ADN-ICAM-P-DX-SLN (1:2:3:1:3) y ADN-ICAM-P-GM-SLN (1:2:3:0,1:3), DX-ICAM y GM-ICAM respectivamente, así como sus respectivos controles (vectores sin ICAM).

Tabla 1. Caracterización de los vectores. Media (DS). PdI: índice de polidispersión; Zeta: potencial Z; DS: desviación estándar.

ectores	PdI	Tamaño (nm)	Zeta (mV)
X-ICAM	0,34 (0,02)	206,6 (29,0)	35,5 (1,7)
M-ICAM	0,37 (0,02)	170,5 (29,3)	32,7 (1,7)
X	0,25 (0,02)	155,8 (27,4)	38,7 (2,3)
M	0,21 (0,01)	158,4 (11,8)	37,2 (0,3)

No se observaron diferencias en el grado de internalización celular entre los diferentes vectores; sin embargo, la incorporación del anti-ICAM1 en las formulaciones incrementó la producción de GFP, el porcentaje de células transfectadas, y la actividad α-gal A, todo ello sin alterar la viabilidad celular (fig 1).

4.- Discusión

La optimización de la composición y el método de preparación de las formulaciones basadas en SLNs junto con el anti-ICAM1, ha permitido desarrollar sistemas de administración que incrementan la actividad α-gal A en células IMFE1. Todos los vectores incluyeron la P, péptido catiónico que favorece la condensación y protección del material genético, y el DX o el GM, polisacáridos que presentan la capacidad de actuar con receptores presentes en la superficie celular. El tamaño de todas las formulaciones osciló entre 150 y 200 nm, adecuado para su administración parenteral. La incorporación del anti-ICAM1 en las formulaciones incrementó significativamente la actividad α-gal A, siendo los vectores más eficaces los preparados con DX y anti-ICAM1, con los que se logró incrementar más de 3 veces la actividad enzimática con respecto a las células sin tratar.

La mayor eficacia de las formulaciones con anti-ICAM1 no se debe a diferencias en el grado de captación celular de los vectores, por lo que son necesarios estudios adicionales sobre los mecanismos de internalización y disposición intracelular de estos nuevos vectores y su relación con la eficacia de transfección.

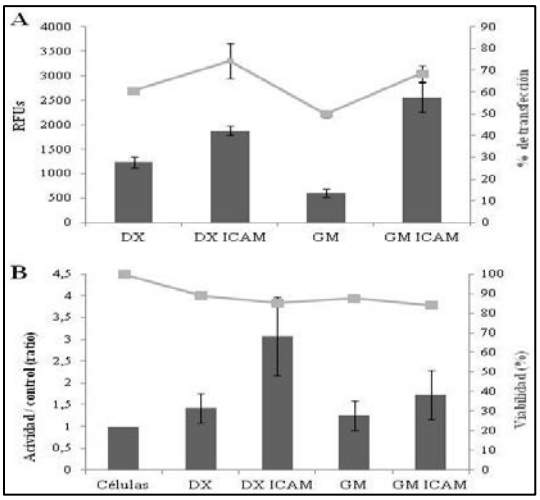


Fig 1. A) Producción de GFP (unidades relativas de fluorescencia, RFUs) y porcentaje de transfección, B) Actividad α-gal A y viabilidad celular en células IMFE1 no tratadas y tratadas con los diferentes vectores, 48h post-transfección.

5.- Conclusión

Hemos diseñado y evaluado sistemas multicomponente basados en SLNs para el tratamiento de la EF mediante terapia génica, capaces de incrementar la actividad de la enzima deficitaria sin comprometer la viabilidad celular. Los vectores más eficaces fueron los formulados con el anticuerpo capaz de interaccionar con el receptor ICAM-1, sobreexpresado en las células endoteliales de pacientes con EF, demostrando su potencial para el tratamiento de esta enfermedad rara.

6.- Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Merck Salud y por la UPV/EHU (PPG17/65, GIU17/32). J Torrecilla agradece a la UPV/EHU su beca de investigación. Las autoras agradecen la asistencia técnica de la ICTS NANBIOSIS (U10) del CIBER-BBN).

7.- Referencias

[1] R. L. Manthe et al. Bioeng Transl Med, 2, 109-119, 2017.

[2] P.S. Apaolaza et al. Biomaterials, 90, 40-49, 2016.

[3] AP. Ruiz de Garibay et al. J Biomed Nanotechnol, 511, 2015.

Early stages of felodipine crystallization from amorphous solid dispersion via multifractal geometry based on SEM-EDS

Renata ABREU-VILLELA[1,2], Isidoro CARABALLO [1], Martin KUENTZ [2]

1. Universidad de Sevilla, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, C/Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain.
2. University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland, Institute of Pharma Technology, Hofackerstrasse 30, 4132 Muttenz, Switzerland

Email de contacto: renabrvil@alumn.us.es

1.- Introduction

Amorphous solid dispersion (ASD) has become an established oral delivery technology to formulate poorly water-soluble drugs [1]. ASDs are metastable systems and bear the risk of physical instability during their shelf life. Early stages of crystallization from ASD are typically not detected by means of standard methods like powder X-ray diffraction (XRPD) [2]. The distribution of different drugs in ASDs has revealed to have a multifractal character [3]. The present work is based on the hypothesis that multifractals can be helpful to early detect instability in amorphous drug formulations.

2.- Materials and Methods

Binary mixtures of 50% w/w felodipine (FEL) (Kemprotec Ltd., Cumbria, UK) and HPMCAS-LF (Shin-Etsu Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) were prepared by solvent evaporation in a solvent mixture of 50:50 (v/v) dichloromethane:methanol. The ASDs were freeze/milled. Samples of the solid dispersions were compressed to tablets for subsequent surface and image analysis. Samples were stored at accelerated conditions of 40˚C for four weeks. Scanning electron microscopy equipped with an energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) was used to map the drug distribution of chloride (Cl) atoms for comparatively higher X-ray scattering intensity. A multifractal spectrum was then determined with a customized MATLAB program as proposed and described previously [4]. Comparative data were generated with a standard XRPD.

2.- Results and Discussion

SEM-EDS binary micrographs of surface topography presented in Fig. 1 show the qualitative changes in the degree of clustering. As Table 1 shows, differences in the multifractal dimensions D_0, D_1, and D_2 were indeed evidenced after one month compared to the initial analysis. Therefore, multifractals were capable of revealing microstructural changes caused by instability that were otherwise barely possible to see from the images of SEM-EDS and were undetected by XRPD. Changes in these clusters are primarily changes in mathematical objects as reflected by the fractal dimensions, D_0, D_1, and D_2. The dimension D_0 describes the space-filling capacity. Some of the drug-rich domains of drug-polymer aggregates may locally become more concentrated in an overall phase separation or drug re-crystallization, decreasing the value of D_0. The D_1 dimension reflects the diversity of elements in the system. Moreover, D_2 holds for a correlation dimension and the evidenced reduction was caused by the microstructural changes. Since the multifractal dimensions provide meaning to cluster distributions they can prove helpful for understanding changes in ASDs.

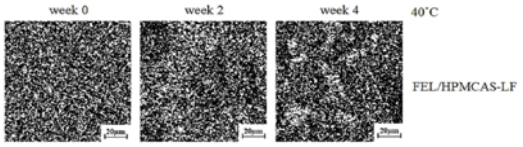


Fig. 1: Images of freshly prepared formulation and of those that show rearrangements of clusters over time (at 40˚C). The white pixels hold for the chloride (and hence FEL) distribution and it is possible to see some changes in the degree of clustering.

Table 1. Generalized fractal dimensions of felodipine (FEL) solid dispersions over time as based on chemical imaging and conversion to binary pictures.

	Age (week)	Generalized fractal dimensions		
		D_0	D_1	D_2
FEL/HPMCAS-LF (50:50)	0	1.92 ± 0.01	1.88 ± 0.01	1.81 ± 0.02
	2	1.92 ± 0.01	1.88 ± 0.01	1.81 ± 0.02
	4	1.91 ± 0.01	1.86 ± 0.01	1.79 ± 0.01

3.- Conclusion

Early changes in drug clusters were revealed by a multifractal analysis that indicated beginning separation phase and drug crystallization. Therefore, the presented multifractal analysis based on chemical imaging bears much promise as a new method to identify early signs of physical instability in ASDs, which is of great relevance for pharmaceutical development.

4.- Acknowledgements

We thank Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil (CAPES) and Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and FEDER Funds (European Union) for the support of the project MAT2016-77345-C3-3-P.

5.- References

[1] A. Newman, G. Knipp, G. Zografi, Assessing the Performance of Amorphous Solid Dispersions, IJOURNAL Pharm. Sci. 101 (2012) 1355–1377.

[2] N.K. Thakral, S. Mohapatra, G.A. Stephenson, R. Suryanarayanan, Compression-Induced Crystallization of Amorphous Indomethacin in Tablets: Characterization of Spatial Heterogeneity by Two- Dimensional X - ray Diffractometry, Mol. Pharm. 12 (2015) 253–263.

[3] R. Abreu-Villela, C. Adler, I. Caraballo, M. Kuentz, Electron microscopy/energy dispersive X-ray spectroscopy of drug distribution in solid dispersions and interpretation by multifractal geometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 150 (2018) 241–247.

[4] D.J. Gould, T.J. Vadakkan, R.A. Poché, Dj.M.E. Dickinson, Multifractal and Lacunarity Analysis of Microvascular Morphology and Remodeling, (2011) 136–151.

Formulation of acyclovir in Soluplus micelles for ocular administration

Angela VARELA-GARCIA [(1)], Angel CONCHEIRO [(1)], Carmen ALVAREZ-LORENZO [(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R+D Pharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Email de contacto: angela.varela.g.90@gmail.com

1.- Introduction

The treatment of eye infections caused by Herpes-virus type 1 (HSV-1) still remains a challenge. The treatment of choice for HSV-1 diseases remains to be acyclovir [1]. The main disadvantage of this drug is its low ocular bioavailability, due to rapid clearance from cornea surface. Encapsulation of drugs into nanocarriers may enhance ocular bioavailability through a variety of mechanisms, mainly involving improved solubilization, bioadhesion and penetration [2]. The aim of this work was to test whether encapsulation of acyclovir in Soluplus polymeric micelles may increase drug solubility, corneal permeability and sclera penetration.

2.- Materials and Methods

2.1.- Micelles preparation and characterization

Soluplus (polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol copolymer, 115000 g/mol, HLB 16) dispersions were prepared in water and PBS 7.4. Size and Z-potential were measured using a Zetasizer® 3000HS (Malvern Instruments, UK).

2.2.- Rheological behavior

Evolution of the storage (G") and loss (G") moduli of Soluplus dispersions (12 and 20% w/w), with and without loaded drug, in water and in PBS pH 7.4 was recorded in a Rheolyst AR-1000N rheometer (TA Instruments, United Kingdom) equipped with a Peltier plate and a 6 cm diameter cone (2º). The angular frequency was set to 5 rad/s, the oscillation stress at 0.1 Pa, and the temperature in the 15 to 40 ºC range.

2.3.- Acyclovir solubilization

Soluplus dispersions (3 mL) were placed in tubes with acyclovir in excess (50 mg). Drug solubility in water and PBS pH 7.4 was tested. The systems were stirred (72 h, 300 rpm and room temperature) and centrifuged (5000 rpm, 25 ºC, 30 min). Absorbance was measured, previous dilution in water-ethanol 50:50 v/v (252 nm, UV/VIS spectrophotometer Agilent 8453, Germany). The concentration was calculated using a calibration curve previously prepared.

2.4.- Micelle stability against dilution

The absorbance of acyclovir-loaded Soluplus (12 %w/w) micelle dispersions after 30- or 60-fold dilution was recorded (252 nm) each 30 seconds during 30 min (UV/Vis spectrophotometer Agilent 8453, Germany) at 35 ºC.

2.5.- HET-CAM

Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane (HET-CAM) was carried out [3] placing aliquots (200 µL) of acyclovir solution and loaded and non-loaded Soluplus formulations on the CAM of fertilized eggs (0.9% NaCl and 0.1 N NaOH solutions as negative and positive controls, respectively). Possible hemorrhage, vascular lysis or coagulation of CAM vessels were recorded for 5 min.

2.6.- Corneal and sclera permeability assay

Bovine corneas and scleras were isolated and mounted on Franz cells [2]. Receptor chambers were filled with carbonate buffer pH 7.2 and donor chambers with drug solutions (2 mL): acyclovir aqueous solution (0.3 mg/mL) in water and saturated acyclovir solution in Soluplus 20% micelles (1.34 mg/mL). Samples (1 mL) were removed from the receptor chamber at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. Acyclovir permeated was quantified by HPLC. The steady state flux (J) and the lag time (t_{lag}) were calculated. After 6h, corneas and scleras were analyzed.

3.- Results and discussion

3.1.- Micelles preparation and characterization

Soluplus micelles (12% w/w) had an average size of 117.4 nm (±1.4) and a polydispersity index of 0.23 (±0.01). Micelles loaded with acyclovir only increase to 137.0 nm (±4.0) in size. All formulations showed unimodal size distribution and Z-potential close to zero.

3.2.- Rheological behavior

The G' and G" of Soluplus dispersions (with and without drug) at 12 and 20% increased at temperatures above 30ºC and 27ºC, respectively. The increase was almost linear in the 30 to 37 ºC range, and the G'' values at 37 ºC were close to 7-40 Pa (the highest values were recorded in PBS) and 1500 Pa for 12 and 20% dispersions, respectively. Drug-loaded micelles systems showed superimposable profiles. These findings suggest that the micelle formulations could remain for prolonged time on the ocular surface.

3.3.- Acyclovir solubilization and micelle stability

Solubility of acyclovir in water was 1.02 mg/mL After the encapsulation in Soluplus micelles 20%, apparent solubility values increased two-fold. After rapid dilution, the absorbance of the formulations remained stable.

3.4.- HET-CAM

All formulations can be considered as non-irritant for the eyes because none hemorrhages, vascular lyses or coagulation of CAM vessels was observed.

3.6.- Corneal and sclera permeability assay

After 6 h of cornea exposition to drug aqueous solution or micelle dispersion the amounts of acyclovir accumulated in the receptor chamber were 2.16 $\mu g/cm^2$ (±0.45) and 11.43 $\mu g/cm^2$ (±1.04), respectively. Permeability coefficients were estimated to be in the $4.4 \cdot 10^{-6}$ to $6.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s range. The amounts of acyclovir accumulated in the cornea were 2.45 $\mu g/cm^2$ (±0.68) for acyclovir solution, and 13.97 $\mu g/cm^2$ (±2.88) for acyclovir-Soluplus formulation.

Sclera permeability tests also led to higher drug accumulation in the receptor chamber when the drug was applied as micelle dispersion (142.62 $\mu g/cm^2$, ±35.39) compared to drug solution (43.60 $\mu g/cm^2$, ±7.69). Permeability coefficients were estimated to be in the $10.5 \cdot 10^{-5}$ to $4.01 \cdot 10^{-5}$ cm/s range. The amounts of acyclovir accumulated in the sclera were 2.02 $\mu g/cm^2$ (±1.61) for acyclovir solution, and 13.69 $\mu g/cm^2$ (±4.10) for acyclovir-Soluplus formulation.

4.- Conclusions

Acyclovir-loaded Soluplus micelles showed a size and a Z-potential values which may facilitate the penetration through cornea and sclera. The peculiar dependence of the viscoelastic behavior on the temperature may allow instillation as eye drops while the increase in viscosity at eye temperature should prolong the permanence on the ocular surface and attenuate the dilution process. Although encapsulation of acyclovir in Soluplus micelles only caused a moderate increase in acyclovir apparent solubility, the micelles notably facilitated the penetration of the drug through cornea and sclera and also the accumulation in both tissues. The larger amount of acyclovir permeated through sclera compared with cornea opens the possibility of delivery the drug to the posterior eye segment.

5.- Acknowledgements

Work supported by Xunta de Galicia (ED431C 2016/008), MINECO (SAF2017-83118-R), AEI, and FEDER.

6.- References

[1] M. van Velzen, D. AMC van de Vijver, F. B. van Loenen, A. DME Osterhaus, L. Remeijier, G. MGM Verjans. The Journal of Infectious Diseases, 208, 1359-1365, 2013.

[2] F. Alvarez-Rivera, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 122, 126-136, 2018.

[3] S. L. Wilson, M. Ahearne, A. Hopkinson. Toxicology, 327, 32-45, 2015.

Estudio preliminar de implantes intravítreos para la liberación de anticuerpos anti-VEGF

Andrea LUACES RODRÍGUEZ [1,2], Xandra QUIROGA PALACIOS [1], Álvaro GIL GONZÁLEZ [3], Anxo FERNÁNDEZ FERREIRO [1,2], Francisco J OTERO ESPINAR [1].

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Praza Seminario Estudos Galegos, s/n. 15782 Santiago de Compostela
2. Grupo de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Hospital Clínico Universitario, Travesía da Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela
3. Instituto de Cerámica, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida do Mestre Mateo, 25. 15706 Santiago de Compostela

Email de contacto: andrealuaces21@gmail.com

1.- Introducción

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es considerada la principal causa de discapacidad visual entre los mayores de 60 años. En la actualidad, la estrategia para su tratamiento consiste en la inyección de anticuerpos anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) [1,2].

El objetivo de este trabajo es la evaluación de implantes intravítreos basados en dos polímeros biodegradables conteniendo un fármaco anti-VEGF preparados mediante una técnica de impresión 3D.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Preparación de los implantes intravítreos

Los implantes intravítreos fueron fabricados mediante impresión 3D. Se ha utilizado un 22% de alginato (LF240D FMC BioPolymer®) el cual posteriormente fue reticulado con una solución de $CaCl_2$ al 2%. En el caso de los implantes de quitosano, diferentes proporciones de quitosano (10, 12 y 15%) solubilizados en ácido acético al 3% fueron empleados, produciendo en algunos casos su reticulación con tripolifosfato (TPP) al 2% [3,4].

2.1.- Ensayo de hinchamiento

Para establecer el comportamiento de los implantes fabricados con quitosano y alginato se llevó a cabo un ensayo de hinchamiento. Se utilizaron dos medios de incubación diferentes, PBS y humor vítreo artificial (0.25% de hialuronato sódico y 0.05% de ágar-ágar). Los implantes fueron incubados a 37ºC y 100 rpm.

Se obtuvieron imágenes de los implantes a diferentes tiempos con el programa OLYMPUS cellSens Entry empleando un estereomicroscopio Olympus BX60. Estas imágenes fueron analizadas mediante el software Image Pro Plus 6.0. Los parámetros analizados fueron el diámetro de Martin y la superficie.

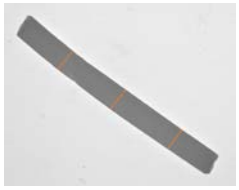


Fig. 1: Imagen del implante con el parámetro de diámetro marcado.

2.2.- Ensayo de liberación

El ensayo de liberación tan solo se ha llevado a cabo con los implantes realizados con quitosano por presentar mejores características. La liberación se ha llevado en células de Franz en donde el compartimento donador se ha rellenado con humor vítreo artificial, donde se ha insertado el implante, y el compartimento receptor de PBS.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Ensayo de hinchamiento

Los implantes basados en alginato aumentan considerablemente su volumen en las primeras horas, pero el aumento se estabiliza a partir de las 20 horas. A pH fisiológico el grupo ácido del alginato se encuentra ionizado, provocando la expansión de la red

polimérica debido a la repulsión de las cargas. Ello causa la absorción de gran cantidad de medio, haciendo que el implante hinche.

Por el contrario, los implantes de quitosano disminuyen ligeramente de tamaño en las primeras horas y luego se mantienen constantes. Esta disminución puede deberse a que a pH 7.4 se produce la disminución de la ionización del quitosano (se encuentra disuelto en ácido acético) y por lo tanto su afinidad por el medio con lo que el tamaño del implante se reduce.

Puesto que el volumen de los implantes se reduce significativamente durante el proceso de secado, el proceso de hinchamiento es más intenso cuando se parte de los implantes secos en comparación de los húmedos (recién preparados).

Cuando se compara la capacidad de hinchamiento de los implantes en PBS o en humor vítreo artificial, se observa que es mayor en el caso de emplearse PBS como medio. Una de las causas posibles es que la presencia de hialuronato sódico y de ágar-ágar en el medio favorezca la retención de agua debido a fenómenos osmóticos. En el caso del PBS, los iones poseen un tamaño que permite su difusión en el hidrogel. El aumento de la fuerza iónica en el interior del hidrogel puede favorecer el hinchamiento de los polímeros.

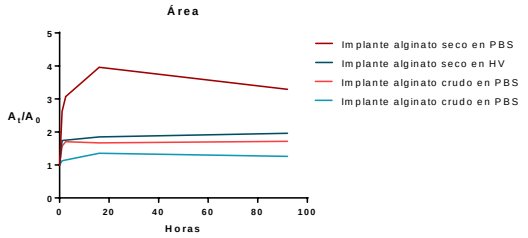


Fig. 2: Variación del área del implante de alginato en diferentes condiciones.

3.2.- Ensayo de liberación

Se observan diferencias entre los implantes elaborados con distinta proporción de quitosano en cuanto a la liberación del anticuerpo, disminuyendo la velocidad de liberación al aumentar la concentración de quitosano. Por otra parte, la reticulación del polisacárido mediante TPP también modifica la liberación del anticuerpo, lo que sugiere que la difusión del anticuerpo a través de la matriz polimérica juega un importante papel en la liberación y que el aumento de la densidad polimérica en los implantes da lugar a un mayor control de la liberación.

4.- Conclusión

Los resultados concluyen que el polímero quitosano presenta mejores características para la fabricación de implantes intravítreos mediante impresión 3D con respecto a los preparados con alginato.
Es necesario continuar investigando para establecer la composición más adecuada para los implantes.

5.- Agradecimientos

Andrea Luaces Rodríguez agradece la ayuda económica proporcionada por la Xunta de Galicia y la Unión Europea (European Social Fund - ESF).

Los autores agradecen a la Xunta de Galicia por la financiación GPC2017/015.

6.- Referencias

[1] LS Lim, P Mitchell, JM Seddon, FG Holz, TY Wong. Age-related macular degeneration. Lancet Lond Engl, 379(9827), 1728-38, 2012.

[2] WM Al-Zamil, SA Yassin. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. Clin Interv Aging, 12, 1313-30, 2017.

[3] HF Edelhauser, CL Rowe-Rendleman, MR Robinson, DG Dawson, GJ Chader, HE Grossniklaus, et al. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications. Invest Ophthalmol Vis Sci, 51(11), 5403-20, 2010.

[4] N Kuno, S Fujii. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. Drugs Aging, 27(2), 117-34, 2010.

Evaluación de la permeabilidad y la toxicidad de distintas formulaciones de riboflavina en córneas bovinas

Andrea CONDE-PENEDO[(1)], Victoria DÍAZ-TOMÉ[(1)], Anxo FERNÁNDEZ-FERREIRO[(1,2),] Francisco J. OTERO-ESPINAR[(1)], Miguel GONZÁLEZ-BARCIA[(1,2)].

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. (USC). Campus Vida. Santiago de Compostela. Zip Code: 15782.
2. Grupo de farmacología clínica. Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela. (IDIS). Travesía da Choupana S/N Santigo de Compostela. Zip Code:15706. España.

Email de contacto: andrea_cp93@hotmail.es

1.- Introducción

El cross-linking es una reacción fotooxidativa que genera enlaces covalentes que estabilizan la configuración tridimensional de las láminas de colágeno. El protocolo actual consiste en usar una solución de riboflavina-5-fosfato, como fotosensibilizador y aplicar luz UVA. La cantidad de riboflavina en el estroma corneal debe ser la adecuada para absorber un buen porcentaje de radiación, y evitar así el daño de estructuras como la retina o el cristalino [1,2]. El principal inconveniente de esta técnica es el bajo nivel de penetración de la riboflavina a través del epitelio corneal, lo que implica tener que llevar a cabo una previa desepitelización. Nuestro objetivo es mejorar la penetración de riboflavina a través del epitelio mediante el empleo de diferentes formulaciones.

2.- Materiales y métodos

2.1.-Permeabilidad corneal

El estudio se llevó a cabo utilizando células de difusión verticales de Franz, a una temperatura de 35ºC. El compartimento receptor se llenó con 6 ml de PBS (tampón fosfato salino) y se separó del compartimento dador conteniendo 1 ml de cada formulación (disolución de riboflavina en PBS (0.24 mg/ml), disolución de riboflavina en HPBCD (hidroxipropil-β-ciclodextrina) (20%) y arginina (0.5%) y nanoemulsión de riboflavina (0.05%)) con córneas bovinas extirpadas tras haberlas recogido en un matadero local. Se retiraron alícuotas de 1 ml durante las 6 horas de ensayo y se analizó la concentración de riboflavina con HPLC.

2.2.- Análisis con HPLC

El análisis con HPLC se realizó con un equipo Merck Hitachi y una columna waters symmetry C18 (3.9x150mm,5µm). El método consiste en una fase móvil 30:70 v/v metanol-tampón iónico (ácido metanosulfónico 0.05%/ ácido fosfórico 0.1%), con un flujo de 0.8 ml/min, un volumen de inyección de 50 µL y un detector UV a 267 nm.

2.3.- Extracción de riboflavina corneal

Para extraer la riboflavina retenida en las corneas se tuvieron en contacto con las formulaciones a testar durante 5 h. Después de este período de tiempo las córneas se pesaron y se trituraron manualmente para introducirlas en un volumen de 5 ml de solución extractiva (metanol : agua, 10:90). Tras una semana sumergidas en esta solución, las córneas se volvieron a triturar con un equipo IKA ULTRA TURRAX Tube Drive Control durante 5 minutos a 4000 r.p.m. La concentración de riboflavina extraída se midió con HPLC.

2.4.- Ensayo BCOP modificado

2.4.1.-Transmitancia y opacidad

La transparencia de las córneas extirpadas fue medida en valores de transmitancia con el espectrofotómetro Cary 60 UV-vis de Agilent technologies, y su opacidad mediante la determinación de la intensidad de luz que atraviesa la córnea (luxómetro Gossen Mavolux 5032c) al aplicar una fuente de luz (Olympus Europe Highlight 2000 Fiber Optic Light Source). Las córneas fueron

incubadas en células de Franz durante 60 minutos con 6 ml de PBS en el compartimento receptor y 1 ml de PBS en el dador a 35ºC antes de volver a medir su transmitancia y opacidad. A continuación, se incorporó 1 ml de las formulaciones a testar, control positivo (etanol puro) y control negativo (PBS) en el compartimento dador y se incubó durante 10 minutos, tras los que se retiró para añadir 1 ml de PBS. Tras 120 minutos de incubación, se volvió a medir la transmitancia y la opacidad[3].

2.4.2.-Permeabilidad a la fluoresceína

Se añadió al compartimento dador 1 ml de fluoresceína 4mg/ml y se incubó durante 90 minutos. Recogiendo muestras a los 30, 60, y 90 minutos. La medida de la concentración de fluoresceína en el compartimento receptor se midió mediante espectrofotometría UV a 490 nm.

3.- Resultados

La permeabilidad corneal de la riboflavina se ve incrementada en dos formulaciones estudiadas con respecto a la disolución de riboflavina en PBS. Se determinó un período de latencia 3 h, a partir del cual la riboflavina comienza a difundir. En el caso de la formulación conteniendo HPBCD o la nanoemulsión, se obtuvo con un coeficiente de permeabilidad de $0.1 \cdot 10^{-6}$ y $0.7 \cdot 10^{-6}$ cm/s respectivamente.

	% T initial (after 60 min PBS)	%T 10 min formulation	ODForm-ODPBS
PBS	88,277	62,931	-
Etanol	63,895	39,862	0,282
Solución de riboflavina	92,43	83,594	0,014
Complejo de riboflavina-ciclodextrina	93,958	86,995	0,053
nanoemulsión	94,514	73,704	0,048

Tabla 1: Transmitancia inicial y final de las córneas; OD_{490} para las distintas formulaciones

La cantidad de riboflavina extraída de las córneas después de 5 h en contacto con las formulaciones fue de 3.35µg/g, 3.62 µg/g y 1.94 µg/g de córnea respectivamente para la solución riboflavina 0.24 mg/ml, la solución de riboflavina 0.24 mg/ml con 20% HPBCD y 0.5% Arginina y para la nanoemulsión.

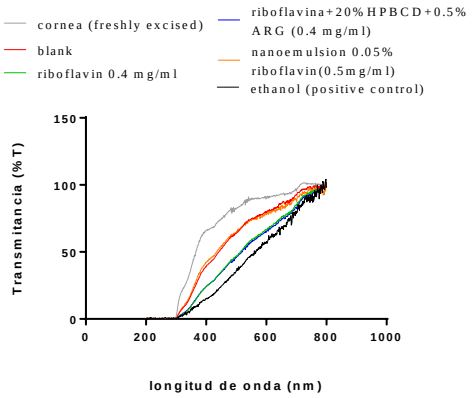


Fig. 1: Transmitancia corneal después del tratamiento con las distintas formulaciones.

4.- Conclusiones

El complejo riboflavina-ciclodextrina y la nanoemulsión proporcionan un aumento en la permeabilidad corneal de la riboflavina. En relación con la cantidad de riboflavina retenida en las corneas a las 5 horas, no se observa una diferencia importante entre la solución de riboflavina y el complejo con ciclodextrinas. En cambio, la nanoemulsión proporciona una cantidad menor.

Los resultados del ensayo BCOP indican que ninguna de las formulaciones testadas produce modificaciones significativas en la córnea.

5.- Referencias

[1] M. Ziaei, A. Barsam, N. Shamie, D. Vroman, T. Kim, ED. Donnenfeld et al. *Reshaping procedures for the surgical management of corneal ectasia*, J Cataract Refract Surgery, 41(4), 842–72, 2015.

[2] L.Mastropasqua, *Collagen cross-linking: when and how? A review of the state of the art of the technique and new perspectives*, Eye and Vision, 2, 2015.

[3] A. Fernández-Ferreiro, M. Santiago-Varela, M. Gil-Martínez, M. González-Barcia, A. Luaces-Rodríguez, V. Díaz-Tome, et al. *In Vitro Evaluation of the Ophthalmic Toxicity Profile of Chlorhexidine and Propamidine Isethionate Eye Drops*, J Ocular Pharmacology and Therapeutics, 33(3), 202–9, 2017.

Comparación de la toxicidad de formulaciones oftálmicas destinadas al tratamiento de la queratitis fúngica.

Victoria Díaz Tomé [(1)]; Andrea Conde Penedo [(1)]; Anxo Fernández-Ferreiro [(1,2,3)]; Francisco J Otero-Espinar [(1)]; Miguel González Barcia [(2,3)].

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela (USC). Santiago de Compostela. Spain. victoriadiaztome@gmail.com
2. Departamento de Farmacia. Hospital Clínico Universitario (SERGAS). Santiago de Compostela. Spain. anxorde@gmail.com
3. Grupo de Farmacia Clínica. Hopital Clínico Universitario. Instituto de investigación sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Santiago de Compostela. miguel.gonzalez.barcia@sergas.es

1.- Introducción

La queratitis fúngica (FK) es una enfermedad de origen infeccioso causada por diferentes tipos de especies fúngicas. Apenas existen formulaciones que sean tan efectivas como las destinadas a la queratitis bacteriana y a menudo son utilizadas fórmulas magistrales preparadas en la farmacia del hospital mediante la reformulación de medicamentos destinados a otras vías por lo que estas preparaciones no están adaptadas a la vía ocular. El objetivo del presente estudio fue la de comparar la toxicidad e irritación de diferentes formulaciones antifúngicas desarrolladas en trabajos anteriores [1,2] mediante dos tipos de ensayos: el BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) y el HET-CAM (Hen´s Egg Test Chorioallantoic Membrane).

2.- Materiales y métodos

2.1. BCOP

2.1.1.Transmitancia (T%) y opacidad (OP).

El ensayo se llevó a cabo en células verticales de Franz con córneas bovinas frescas en un baño a 35ºC. La córnea fue colocada entre los dos compartimentos de forma que la parte epitelial estuviera colocada hacia el compartimento donador. Durante el ensayo el compartimento receptor contuvo 6 ml PBS.

T% y OP se midieron inmediatamente después de la extirpación de las córneas. Después las corneas se incubaron durante 60 min. con 1 ml de PBS en el compartimento donador y se procedió de nuevo a medir T% y OP. Posteriormente se añadió al compartimento donador 1 ml de formulación y se incubó durante 10 min. Luego se eliminó la formulación y se añadió 1 ml de PBS, incubándolo durante 2 horas. Al pasar este tiempo se tomó la última medida de la T% y OP.

La OP será expresada como la relación de la intensidad de luz transmitida a través de la córnea con respecto a la obtenida en las incubadas en PBS durante 60 min.

La transmitancia corneal fue medida con un espectrofotómetro Cari 60 UV-VIS de Agilent Technologies mientras que la opacidad se midió con un luxómetro Gossen MAVOLUX 5032C y la fuente de luz fue emitida por Olympus Europe Hight Light 200 Fiver Optic Light Source.

2.1.2. Permeabilidad a la fluoresceína

La permeabilidad a la fluoresceína se obtuvo mediante la medida de la concentración de fluoresceína que atravesó la córnea después de todo el proceso anterior. Para ello se añadió 1 ml de fluoresceína 4mg/ml en el compartimento donador, y se recogió muestra a los 30, 60 y 90 min. La concentración de fluoresceína fue medida en el espectofotómetro Cari 60 UV-VIS de Agilent.

2.2.- HET-CAM

El potencial de irritación de cada formulación fue determinado usando la membrana corioalantoidea (CAM) de huevos Broiler fecundados. Los huevos se incuban a 37,5ºC y 65% de humedad durante 9 días en un incubador automático. Se añadieron 0,3 ml de formulación, y la CAM

fue observada durante 5 minutos usando una lupa Olympus SZ60 para detectar la aparición de lisis, hemorragia y/o coagulación. Se usó NaOH 0,1N como control positivo y cloruro sódico al 0,9% como control negativo.

3.- Resultados

3.1. HET-CAM

Ninguna de las formulaciones produjo daño en los vasos sanguíneos de la CAM después de 5 min. de contacto, por lo que su IS (Irritation Score) fue negativo pudiendo ser todas clasificadas como no irritantes.

3.2. BCOP

Los resultados obtenidos determinan la existencia de alteraciones importantes en la transparencia corneal y la permeabilidad a la fluoresceína del hidrogel de AH de econazol, así como la de la solución de econazol con αCD. Ambas formulaciones muestran valores similares a las del control positivo (Etanol). Las formulaciones de voriconazol y VFEND® no mostraron modificaciones importantes en ambos parámetros.

Formulation	% T initial (after 60 min PBS)		%T 10 min formulation		OD_{Form}-OD_{PBS}	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
PBS (negative control)	88.277	5.875	62.931	7.13	-	-
Ethanol (positive control)	63.895	9.756	39.862	11.647	0.282	0.018
Econazole 2% αCD 15%	77.326	4.84	38.137	12.625	0.316	0.261
Econazole 2% αCD 15% HA 0.4%	82.168	2.795	26.171	0.226	0.432	0.026
Econazole 2% αCD 15% GG/CK 0.82%	76.321	8.288	59.512	8.152	0.151	0.08
VFEND® (Voriconazole 1%)	71.214	6.55	68.548	4.648	-0.088	0.057
VFEND® (Voriconazole 1%) AH 0.4%	82.168	8.15	72.245	4.049	0.011	0.114
Voriconazole 1% HPB 20%	76.023	16.237	79.609	11.543	0.059	0.05
Voriconazole 1% HPB 20% AH 0.4%	73.536	2.927	71.055	11.505	0.058	0.037
Voriconazole 1% HPB 20% GG/CK 0.82%	86.057	2.609	85.221	2.54	0.044	0.094

Fig. 1: Datos obtenidos de Transmitancia y Densidad Óptica de cada formulación.

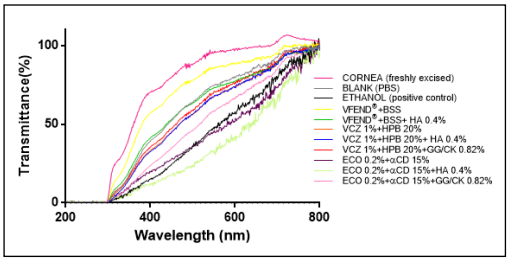


Fig. 2: Representación de la Transmitancia obtenida después del tratamiento con distintas formulaciones.

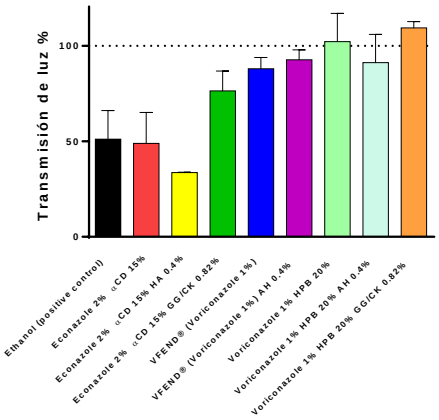


Fig. 3: Porcentaje de transmisión de luz con respecto a la obtenida en las córneas incubadas en PBS durante 60 min.

La incorporación del econazol en los hidrogeles de goma gellan y carragenato disminuye las alteraciones producida en la córnea.

4.- Conclusiones

Las formulaciones de Voriconazol y VFEND® presentan un perfil de irritación seguro, por lo teniendo en cuenta los patrones de toxicidad serán las formulaciones de elección para el tratamiento de la queratitis fúngica. La formulación de econazol en hidrogeles de goma gellan y carragenato, mejora su perfil de seguridad por lo que podrán ser útiles en el tratamiento de queratitis cuando el voriconazol no esté disponible, puesto que además presenta una efectividad antifúngica similar a la del voriconazol [1].

5.- Referencias

[1] Victoria Díaz-Tomé, Andrea Luaces-Rodríguez, Jesús Silva-Rodríguez, Sara Blanco-Dorado, Laura García-Quintanilla, José Llovo-Taboada, et al. Ophthalmic Econazole Hydrogels for the Treatment of Fungal Keratitis. J Pharm Sci.,107(5):1342-51, 2018.

[2] Victoria Díaz-Tomé , Rosie Darby, Andrea Luaces-Rodríguez, Anxo Fernández-Ferreiro, Miguel González-Barcia, Francisco J Otero-Espinar, Ophtalmic voriconazole hydrogels for the treatment of fungal keratitis. Póster PBP Granada (España), 2018.

Dual Macroporous-Mesoporous Starch Aerogels Scaffolds for Bone Regeneration

Víctor SANTOS-ROSALES [(1)], Carmen ALVAREZ-LORENZO[(1)], Carlos A. GARCÍA-GONZÁLEZ [(1)]

1. Pharmacology, Pharmacy Pharmaceutical Technology Dept., R+D Pharma group (GI-1645), Faculty of Pharmacy and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida S/N, E-15782 Santiago de Compostela, Spain.

Contact e-mail address: victor.santos.rosales@rai.usc.es

1.- Introduction

More than 2.2 million worldwide bone grafting procedures are being conducted every year, becoming the second most common transplantation tissue [1]. However, the limited availability and the risk of autoimmune response of biological grafts prompted the development of innovative 3D synthetic bone grafts (scaffolds). Such scaffolds should present an interconnected porous mixed (micro-macro) structure with an appropriate mechanical integrity as well as being biocompatible and biodegradable.

Aerogels are solid mesoporous materials characterized by extremely low densities and high open porosities [2]. Namely, starch aerogels emerge as an interesting bone scaffold alternative due to their particular biocompatibility and suitable mechanical behaviour. However, the presence of macropores is required for a suitable interaction between cells and environment with the scaffold. The absence of macropores restricts the use of aerogels as scaffolds.

In this work, the formation of macropores in the aerogel inner structure was evaluated through the addition of zein, a hydrophobic protein found in the corn, as a leaching porogen. The obtained aerogels were characterized in terms of morphology, texture and mechanical resistance.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

Native corn starch (Roquette Frères), corn zein (≤850 μm Sigma-Aldrich), absolute ethanol (VWR) and CO_2 (>99.9%, Praxair).

2.2.- Starch alcogels preparation

Starch aqueous solutions of 10% (w/w) were prepared with zein contents of 0 (Z0), 25 (Z1) and 50% (Z2) with respect to the starch content (w/w). The resulting mixture was subjected to a thermal treatment (121ºC, 1.1 bar, 20 min) to induce the starch gelatinisation and then poured into cylindrical moulds for gelation. Starch gels were stored at 4ºC for 48h for retrogradation. Afterwards, the gels were immersed in ethanol baths for gel solvent exchange and porogen leaching until complete zein removal.

2.3.- Supercritical CO_2 drying

Ethanol was extracted from the starch alcogels by supercritical CO_2-assisted drying under constant temperature (40ºC). and a CO_2 flow of 6 g/min for 4h.

2.3.- Aerogels characterization

Shrinkage values were calculated regarding size reduction from the gel-to-aerogel transition. Bulk density (ρ_{Bulk}) values were measured from the dimensions and weight of the aerogels. Skeletal density (ρ_{Skel}) was determined by helium pycnometry. The overall porosity (ε) values were determined according to Eq. (1).

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_{Bulk}}{\rho_{Skel}}\right) x100 \qquad (1)$$

Textural properties were evaluated by N_2 adsorption-desorption measurements. Specific surface areas (A_{BET}) were determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. Mean pore diameter ($d_{p,\ BJH}$) was evaluated according to the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. Aerogels

morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM).

Young moduli were calculated from stress-strain curves under orthogonal compression tests (30 kg load cell, 1mm/s speed rate).

3.- Results and discussion

Starch aerogels were white cylindrical and lightweight (0.135-0.189 g/cm^3) in all cases regardless of the initial zein content used. Aerogel shrinkage decreased with increasing zein contents. Overall porosities (ε) were analogous to cancellous human bone (75-95%) [3].

The obtained aerogels unveiled a mixed meso-macroporosity. The addition of zein preserved almost intact the inner mesoporous structure of the starch aerogel (Table 1). This outcome represents a key feature since mesoporosity is required for cell interaction and attachment to the scaffold surface.

Aerogel	Porosity (%)	A_{BET} (m^2/g)	$d_{p,\ BJH}$ (nm)
Z0	88.8 ± 0.2	183 ± 9	19.1 ± 1.0
Z1	91.0 ± 0.3	208 ± 10	16.5 ± 0.8
Z2	86.7 ± 0.5	143 ± 7	16.9 ± 0.9

Table 1: Textural properties of the obtained aerogels determined by N_2 adsorption-desorption measurements.

SEM imaging unveiled a new pore population of 1-2 μm diameter in Z1 and Z2 aerogels and integrated into the characteristic starch fibrillar network. (Fig. 1). However, zein residues in form of aggregates were detected in Z2, suggesting that complete porogen leaching was not achieved for the formulation with higher zein content.

The obtained Young moduli were in the 10-23 MPa range, which are comparable to values in particular skeletal regions of cancellous human bone, such as anterior and posterior femoral head [3].

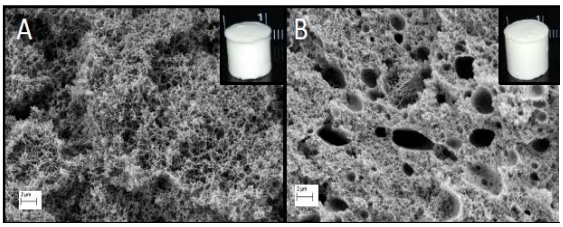


Fig.1: SEM image of classical starch aerogel strain network (Z0) (A) compared to a starch aerogel modified with zein (Z2) (B). Inset: physical appearance of the scaffolds

4.- Conclusions

Cylindrical starch aerogel scaffolds with dual porosity were obtained using aerogel technology coupled to porogen leaching of zein particles as a sacrificial macropore template. This approach allowed the formation of porous scaffolds containing mesopores and macropores without increasing the complexity and the overall processing times since the hydrogel-to-alcogel transition was simultaneous to the porogen leaching stage. Morphology and mechanical properties of the obtained aerogels were compatible with the intended application.

5.- Acknowledgements

Work supported by Xunta de Galicia [ED431F 2016/010 & ED431C 2016/008], MINECO [SAF2017-83118-R], AEI, FEDER and Interreg V-A POCTEP Programme [0245_IBEROS_1_E]. C.A. García-González acknowledges to MINECO for a Ramón y Cajal Fellowship [RYC2014-15239]. V. Santos-Rosales acknowledges to Xunta de Galicia (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria) for a predoctoral research fellowship [ED481A-2018/014].

6.- References

[1] C.A García-González, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Bioconjugate Chemistry, 26 (7), 1159-1171, 2015.

[2] H. Maleki, L. Durães, C.A García-González, P. Del Gaudio, A. Portugal, M. Mahmoudi, Advances in Colloid and Interface Science, 236, 1-27, 2016.

[3] K.A. Athanasiou, C.-F. Zhu, D.R. Lanctot, C.M. Agrawal, X. Wang, Tissue Engineering, 6, 361-381, 2000.

Novel protein-loaded hyaluronic acid-based nanocarriers for treating cancer

Andrea GONELLA[1,2], Dolores TORRES[2], Maria José ALONSO[1,2]

[1] *Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), University of Santiago de Compostela, 15782, Spain.*

[2] *Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de Compostela, 15782, Spain.*

Email de contacto: a.gonella1@gmail.com

1.- Introducción

In the last decades significant advances have been made in the development of protein-based innovative oncological treatments (1). Nanotherapies based on protein drugs offer new expectations to face the still far from ideal biodistribution profiles of these new drugs. The possibility of using these highly selective and specific proteins, and protecting them to enhance their circulation time, could appreciably increase the efficacy/toxicity balance of the therapy (2). Based on this, the objective of this work has been to develop a new nanocarrier made of hyaluronic acid with the capacity to associate and deliver protein drugs. Model proteins (i.e. BSA and a model IgG) and a therapeutic monoclonal antibody (mAb) have been associated to the nanoformulations and these novel nanocarriers have been characterized *in vitro* and tested for citotoxicity and gene expression assays.

2.- Materials and methods

The physicochemical properties of the nanocarriers (particle size, zeta potential and morphology) were evaluated by Photonic Correlation Spectroscopy (Zetasizer®, Malvern Instruments, United Kingdom), Transmission Electron microscopy (TEM) and Scanning Electron microscopy (SEM). The encapsulation efficiency (EE) and the release of the loaded proteins were evaluated with different techniques based on the type of protein encapsulated (i.e. colorimetric or fluorescence methods, or ELISA). The functional and structural stability of the proteins was determined by Circular Dichroism (CD) and ELISA. The stability of the particles in different simulated biological fluids, SBF (PBS, FBS supplemented PBS, FBS supplemented RPMI) was also evaluated. Storage stability studies of the nanocarriers suspensions were performed after freeze-drying. MDA-MB231 breast cancer cell line has been used for nanoparticles toxicity studies (MTT) and for gene expression assays.

3.- Results and discussion

First, BSA was associated to the nanosystem (size below 300 nm and ζ of -30 mV) with high efficiency (% EE >90%). Model IgG was also co-loaded into the system (% EE>90%) together with BSA. BSA was well able to keep its structure, meaning that the formulation conditions were not affecting the stability of the protein (CD experiments). The selected mAb could also be associated to the nanosystem. The resulting formulation exhibited a size of around 180 nm, a negative charge ζ (-28 mV) and a moderate association efficiency (50%). The functional stability of the mAb, once formulated, was assessed by ELISA. The particles showed a spherical shape and could be freeze-dried using trehalose as a protecting agent. The mAb-loaded nanoparticles were also tested for their in vitro citotoxicity on MDA-MB231 breast cancer cells. The results showed that both, blank and mAb-loaded nanoparticles, showed a dose-dependent toxicity profile. The concentration of 15 μg/mL was chosen for performing gene expression studies. Upon exposure of the

cells to the nanoparticles (blank or mAb-loaded), the expression of specific genes participating in the pathway in which the mAb is involved, decreased. This effect was higher for mAb-loaded nanoparticles, thus suggesting that the nanovehicles favored the triggering of the cellular response to the mAb.

3.- Conclusions

We have developed a nanocarrier with the capacity to associate different kinds of proteins, among them, monoclonal antibodies. The nanoformulation showed good stability profile in simulated biological fluids and a *in vitro* activity.

4.- Acknowledgments:

This work was supported by the European Union's Horizon 2020 - Research and Innovation Framework Programme under the Marie Sklodowska - Curie Grant agreement No. 642028 (NABBA).

5.- Referencias

[1]I. Santalices et al., *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42: 155-180, 2017

[2] V. Torchlin and A. Lukyanov, *Drug Discovery Today*, 8: 259-266, 2003

Mejora de la solubilidad de tacrolimus en soluciones de uso oftálmico mediante el empleo de ciclodextrinas y cosolventes

Xurxo GARCÍA-OTERO[(1)], Miguel GONZÁLEZ BARCIA[(2)], José BLANCO MÉNDEZ [(1)], Anxo FERNÁNDEZ-FERREIRO[(1)(2)], Francisco Javier OTERO-ESPINAR[(1)]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Santiago de Compostela (USC), Campus Vida. CP:15782
2. Hospital Clínico de Santiago, Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (FIDIS), Travesía da Choupana s/n Santiago de Compostela. CP:15706

Email de contacto: xurxo.garcia.otero@gmail.es

1.- Introducción

La queratoconjuntivitis atópica (QCA) o queratoconjuntivitis vernal (QCV) es una enfermedad alérgica grave cronicorrecurrente que puede ocasionar daños mediados por un proceso inflamatorio sobre la superficie ocular.

Los colirios tópicos de tacrolimus son una de las alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. En la actualidad no existen alternativas terapéuticas comerciales por lo que se preparan en hospitales como fórmulas magistrales. Lo más habitual es la reformulación de formas parenterales, aunque actualmente aún existen complicaciones en la adecuación de estas al uso oftálmico causadas por la insolubilidad del tacrolimus en agua. El objetivo de este trabajo es mejorar la solubilidad del fármaco mediante la combinación de complejos de inclusión con ciclodextrina y polímeros hidrofílicos. Tras seleccionar la composición más adecuada para la formulación oftálmica conteniendo un 0,01% de fármaco, se realizó un estudio preliminar de estabilidad.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Estudio de solubilidad

Con el fin de mejorar la solubilidad del tacrolimus en medio acuoso se investigó la interacción del fármaco con 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPB) mediante diagramas de solubilidad de fase y posteriormente se estudio el efecto de la incorporando diferentes polímeros hidrofílicos (PEG-300, PEG-400, PG y glicerina) en la solubilidad.

Las constantes de estabilidad de los complejos 1:1 y 1:2 se calcularon mediante ajuste no lineal del diagrama de fases a la siguiente ecuación:

$$S=S_0 +(k_{1:1}\cdot S_0+ k_{1:1}\cdot k_{1:2}\cdot S_0\cdot[CD]) \cdot [CD]$$

S es la solubilidad total, S_0 la solubilidad del fármaco libre, $k_{1:1}$ y $k_{1:2}$ las constantes de estabilidad de los complejos Fármaco:CD 1:1 y 1:2 y [CD] la concentración de HPB [1]. EL ajuste se realizó en GraphPad Prism® v.5.0b.

2.2.- Estudio de estabilidad

La formulación seleccionada se envasó en condiciones asépticas en viales de vidrio ámbar y se almacenó en diferentes condiciones: nevera (4ºC), temperatura ambiente (25ºC) y en estufa (40ºC). Las muestras fueron recogidas a diferentes tiempos y se realizó la medición del pH, osmolalidad y la concentración de fármaco.

2.2.1.- Cuantificación de tacrolimus

La cantidad de tacrolimus fue determinada usando un Sistema HPLC Agilent 1260 series (Agilent Technologies, EE. UU.) y una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6X50mm 5 μm) a 60 ºC. La fase móvil utilizada fue agua-acetonitrilo (35:65 v/v) con un flujo de 1,5 mL.min-1 y una longitud de onda de 210 nm. El volumen de muestra inyectado fue de 10 μL y el tiempo de retención de 3,3 minutos [2]. El porcentaje de fármaco inalterado frente al tiempo se ajustó a una cinética de primer orden usando GraphPad Prism® v.5.0b y se calculó la constante de degradación k y la t90.

2.2.2.-Osmolalidad y pH

Las medidas de pH y osmolalidad fueron realizadas en un pHmetro HI5221 HANNA® y un MicroOsmómetro Fiske Modelo 210® a diferentes tiempos.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Estudio de solubilidad

Los valores de solubilidad indican que existe una interacción entre el fármaco y la ciclodextrina ajustándose a un diagrama tipo Ap, en el que se sugiere la formación de complejos solubles que aumentan su estequiometria al aumentar la concentración de HPB, tal y como se muestra en la Fig. 1.

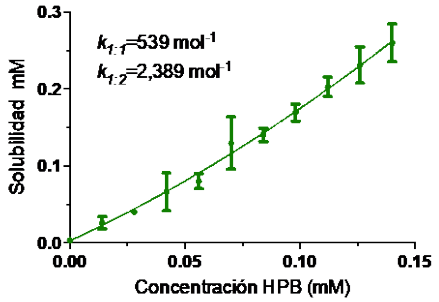


Fig. 1: Diagrama de solubilidad del tacrolimus a diferentes [HPB].

Se eligió una concentración de HPB 20% y se estudió el comportamiento en presencia de diferentes polímeros hidrofóbicos (Fig. 2). Se observa que el mejor resultado es la combinación de 20% de HPB y el 10% de PEG-300, por lo que se eligió esta composición para los estudios de estabilidad.

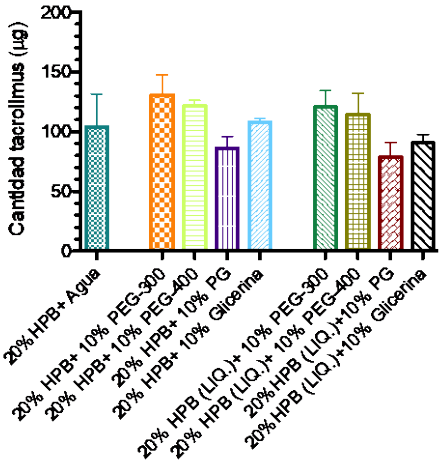


Fig. 2: Solubilidad de tacrolimus en presencia del 20% HPB y cosolventes.

3.2.- Estudio de estabilidad

Como se puede observar en la Fig. 3, la temperatura es un factor importante en la estabilidad del colirio. A 40ºC se produce una caída drástica de la concentración de tacrolimus en los primeros días del ensayo.

A los 7 días del estudio se produce un descenso de la concentración inicial de fármaco por debajo del 90% a temperatura ambiente. La única formulación almacenada que presenta una estabilidad adecuada es la conservaba en nevera, que permanece por encima del 90% durante 45 días.

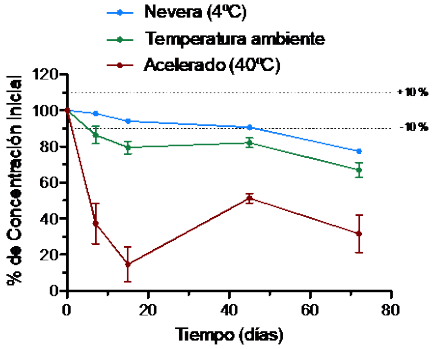


Fig. 3: Porcentaje de la concentración inicial para cada condición de almacenamiento.

Los valores de osmolalidad permanecen sin cambios a temperatura ambiente y nevera. No ocurre lo mismo a 40ºC donde se observa un incremento causado posiblemente por el aumento de las especies químicas formadas en el proceso de degradación. Los valores de pH permanecen en el rango apto para la administración ocular en las tres condiciones de almacenamiento.

3.- Conclusiones

La baja solubilidad del tacrolimus se ve incrementada por la formación de complejos solubles con la HPB. La combinación con PEG-300 o PEG-400 y ciclodextrinas también beneficia su solubilidad.

En un período de 45 días el colirio estudiado es estable únicamente cuando se conserva en nevera.

4.- Referencias

[1] Arima H, Yunomae K, Miyake K, Irie T, Hirayama F, Uekama K. *Comparative studies of the enhancing effects of cyclodextrins on the solubility and oral bioavailability of tacrolimus in rats*. J Pharm Sci.;90(6):690-701,2001.

[2] Luaces-Rodríguez A, Touriño-Peralba R, Alonso-Rodríguez I, García-Otero X, González-Barcia M, et al. *Preclinical characterization and clinical evaluation of tacrolimus eye drops.* Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.; 120:152-61,2018.

Análisis retrospectivo de las prescripciones que pueden infringir los criterios STOPP.

Silvia GONZÁLEZ-MUNGUÍA, Obdulia MUNGUÍA, Esther SÁNCHEZ, Matías LLABRÉS

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Universidad de La Laguna, 38203 La Laguna Tenerife.

Email de contacto: silviagonzalezmunguia@gmail.com

1.- Introducción

Es conocido el constante incremento de la esperanza de vida en los países desarrollados, lo que implica una población con mayor morbilidad y mayor prevalencia de patologías crónicas no transmisibles (cardiovascular, tumoral, respiratorio, diabetes, etc.) y su consiguiente polimedicación.

Basándonos en el hecho de que la polimedicación en atención primaria es muy frecuente, especialmente en el grupo de pacientes mayores de 65 años, se describe a continuación, un procedimiento de análisis para detectar prescripciones inadecuadas en pacientes siguiendo los criterios STOPP.

2.- Material y métodos.

El estudio se llevó a cabo mediante el análisis de las dispensaciones generadas a través del sistema de receta electrónica implantado por el Servicio Canario de la Salud que opera sobre tablas MS Excel. Se utilizaron los datos disociados de los pacientes que acudieron a oficinas de farmacia correspondientes a diferentes zonas farmacéuticas de Canarias durante el periodo 2012-2015.

Como herramientas para la selección de una prescripción inadecuada se utilizaron los criterios STOPP/START (Screening Tool of Older Person´s Prescriptions) (1).

Para el desarrollo de los algoritmos de construcción de tablas y cribado de datos se utilizó el lenguaje de programación estadística RStudio® (2).

2.1.- Codificación de dispensaciones.

Para identificar el principio activo de las dispensaciones se generó una tabla que incluye los códigos y las denominaciones DCSA (3), obtenidos del fichero DICCIONARIO_DCSA.xml, y los códigos nacionales de los medicamentos con una misma denominación y código DCSA, extraídos del fichero Prescripcion.xml. La tabla obtenida denominada A15_CN2DCSA.csv combina el código nacional con su correspondiente código y denominación DCSA. Cuando esta tabla se importa al RStudio® se denomina cn2dcsa. Al enfrentar cn2dcsa con la tabla datos, la que todas las dispensaciones, se genera una nueva tabla A15_ Dispensaciones.txt**,** que recoge los principios activos con la denominación y código DCSA correspondientes a cada uno de los códigos nacionales dispensados

2.2- Base de datos fármacos STOPP.

Se importa el fichero DICCIONARIO_ DCSA.xml a una tabla en formato Access® *A10 Catalogo DCSA*, donde se añadieron dos campos que permitían introducir el código ATC con cuatro niveles y el posible criterio STOPP que podía infringir cada principio activo.

2.3- Algoritmo de búsqueda.

Al enfrentar en RStudio® la tabla *A10 Catalogo DCSA* con los datos de las dispensaciones A15_Dispensaciones.txt, se obtiene una única tabla A25_Dispensaciones_v1.txt que recoge cada criterio STOPP y el ATC de cada principio activo de las dispensaciones, permitiendo detectar todos aquellos pacientes con dispensaciones que puedan infringir el/los criterio/s STOPP.

3.- Resultados y Discusión.

Una vez obtenida la tabla de análisis, A25_Dispensaciones_v1.txt, se comienza a realizar el análisis demográfico de los pacientes y un estudio para cada criterio.

Como ejemplo, se presentan los resultados obtenidos para el criterio C11.

Se produce la infracción del criterio C11 si se prescribe un AINE con un antiagregante sin tratamiento profiláctico con inhibidores de la bomba de protones (IBP) ya que se aumenta el riesgo de úlcera péptica. Para detectar la infracción se utilizan los grupos ATC, en la misma dispensación debe haber principios activos que pertenezcan al grupo ATC B01A donde se encuentran los antiagregantes y al grupo ATC M01A que representa a los AINE y además ausencia de fármacos del grupo ATC A02B que corresponde a los IBP. En la tabla 1 se muestran algunos planes de tratamientos que tienen un antiagregante por ello, p1 ≥ 1, y un AINE por eso p2 ≥ 1, sin IBP p3 = 0, por todas estas condiciones se infringe el criterio C11 (C11=1).

Id_Trat	p1	p2	p3	C11	NUSS	durTrat	Sexo	Edad	Medico
10011554015883	2	3	0	1	3847F60360444	28	F	1	2446A6F
10021449170453	1	1	0	1	5414048500824	24	M	0	244442A
10041555336655	3	1	0	1	3B127CC550655	79	F	0	2447E2C
10081238734495	1	1	0	1	3DEEF3D450867	28	F	1	216F125
10061237512144	1	1	0	1	4EF05B9581012	56	M	0	2442798

Tabla 1.- Muestra de varios planes de tratamiento donde se infringe el criterio C11. Id_trat: plan de =tratamiento; p1, p2 y p3: grupos ATC; NUSS: paciente; durTrat: duración de tratamiento (días); Edad: 0 si < 65 años y 1 si ≥ 65 años.

A continuación, utilizando un modelo logístico, se calcula el Odd ratio (OR). La variable dependiente C11 puede tomar los valores 1, si se detecta la infracción del criterio C11, o 0 cuando no la hay. El grupo de control, cuando C11 = 0, se forma seleccionando los individuos a los que se les ha prescrito fármacos de los grupos ATC que pueden dar lugar a la infracción del criterio C11. Las variables estudiadas son el sexo, edad y duración del tratamiento para cada Id_tratamiento.

De las tres variables estudiadas, sólo se rechaza la hipótesis nula para la variable edad. El valor estimado de OR es 2.12 (intervalo de confianza 95% 1.57 - 2.90). En otras palabras, los pacientes con 65 o más años tienen un riesgo relativo aproximadamente igual a 2 de que se les prescriba un tratamiento que infrinja el criterio C11.

4.- Conclusiones

El algoritmo desarrollado permite evaluar un gran número de pacientes en un corto periodo de tiempo detectando aquellos que presentan prescripciones inadecuadas y necesitan una revisión de su tratamiento.

Los pacientes con edad igual o superior a 65 años tienen un riesgo dos veces mayor de que se le prescriba un tratamiento que infrinja el criterio C11.

5.- Referencias

1.O'Mahony D, O'Sullivan D, Byrne S, O'Connor MN, Ryan C, Gallagher P. STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 2. Age Ageing. 2015;44(2):213-8.

2.R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.r-project.org/

3.International Health, Terminology Standars Development Organization, www.ihtsdo.org.

Preparación de micropartículas sólidas lipídicas mediante tecnología supercrítica para aplicación en heridas crónicas

Clara LÓPEZ-IGLESIAS[1], Mariana LANDÍN[1], Carmen ÁLVAREZ-LORENZO[1], Carlos A. GARCÍA-GONZÁLEZ[1]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Grupo I+D Farma (GI-1645), Facultad de Farmacia e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña

Email de contacto: clara.lopez.iglesias@rai.usc.es

1.- Introducción

Las heridas crónicas, tales como úlceras por presión o diabéticas, condicionan la calidad de vida de los pacientes y suponen un enorme coste sanitario. Este tipo de heridas pueden ser tratadas con sustancias que favorezcan el proceso curativo o traten las complicaciones que lo dificultan (por ejemplo, las infecciones). Actualmente la mayoría de los tratamientos se administran por vía sistémica, pero la profilaxis y los tratamientos locales ofrecen la posibilidad de reducir los efectos secundarios [1]. La piel tiene un elevado contenido en lípidos, y algunas sustancias lipídicas biocompatibles se comportan como excelentes vehículos para fármacos. La tecnología supercrítica mediante la técnica PGSS (Particles from Gas-Saturated Solutions) permite obtener partículas sólidas lipídicas en ausencia de disolventes orgánicos y bajo condiciones de operación suaves. Además, esta técnica hace posible la incorporación eficiente de agentes bioactivos con problemas de solubilidad [2].

En este trabajo, se utilizó la técnica PGSS para la preparación de micropartículas de glicerilmonoestearato (GMS), un lípido de uso en la industria cosmética y farmacéutica como emulsificante, lubricante o anti-agregante, susceptibles de empleo como vehículos para fármacos en formulaciones de administración tópica para el tratamiento de heridas crónicas. Se evaluaron los efectos de diferentes parámetros de procesado (presión, temperatura, diámetro de orificio y agitación) sobre las propiedades morfológicas de las micropartículas generadas. Para ello, se empleó una herramienta de inteligencia artificial, que combina redes neuronales artificiales y lógica difusa.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Glicerilmonoestearato 40-55 tipo II (GMS, Kolliwax® GMS II, BASF) y CO_2 (99% de pureza, Praxair).

2.2.- Determinación del punto de fusión del GMS en atmósfera de CO_2 supercrítico

La temperatura de fusión del GMS a distintas presiones (65, 110 y 140 bar) se determinó visualmente en un autoclave con mirillas.

2.3.- Técnica PGSS

El GMS de partida se introdujo en un autoclave a presión (saturador). Se calentó hasta alcanzar la temperatura deseada y se incorporó CO_2 hasta alcanzar la presión de trabajo (Paso 1 en Fig. 1). Tras 1 h de agitación, se abrió la válvula (Paso 2) que permite una repentina despresurización de la mezcla a través de un orificio de diámetro *d* y su recolección en forma de partículas en el precipitador. Se elaboraron micropartículas en distintas condiciones de presión (150-200 bar), temperatura (63-70 °C), diámetros de orificio (0.7 y 1 mm) y agitación (600-900 rpm).

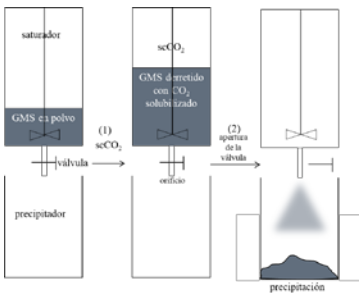


Fig. 1: Representación esquemática de la técnica PGSS para producción de partículas

2.4.- Caracterización de las partículas

2.4.1.- Propiedades físico-químicas

La estructura morfológica de la superficie de las partículas se visualizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y el grado de cristalinidad se determinó mediante difracción de rayos X.

2.4.2.- Análisis granulométrico

Se determinó la distribución de tamaños de partícula por tamización. Los lotes se caracterizaron mediante los parámetros media (mm) y desviación estándar geométricas tras su ajuste a una distribución logarítmico-normal.

2.5.- Análisis de resultados

Se utilizó FormRules® 4.03 (Intelligensys Ltd.) para modelizar los resultados de tamaño de partícula obtenidos.

3.- Resultados y discusión

El CO_2 actuó como un agente plastificante, disminuyendo la temperatura de fusión del GMS (Tabla 1), que es de hasta 64 °C a presión ambiente.

Presión (bar)	Temperatura (°C)
65	58.5
110	57.1
140	56.6

Tabla 1: Puntos de fusión del GMS en presencia de CO_2 comprimido obtenidos mediante método visual

Las partículas de GMS a partir de la técnica PGSS mostraron apariencia de polvo fino, seco, y con buenas propiedades de flujo. El tamaño de partícula medio se situó en el intervalo 300-500 µm. Las partículas con mejor aspecto y mayor porosidad se obtuvieron a 65 °C y 170 bar (Fig. 2). El gas disuelto en el GMS fundido provocó la solidificación de las partículas durante la despresurización, creando una estructura de superficie abierta y porosa.

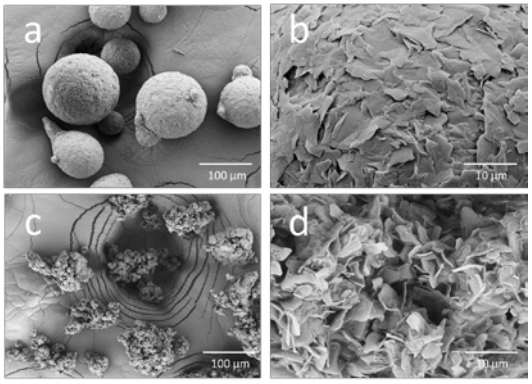


Fig. 2: Partículas de GMS antes (a, b) y después (c, d) del procesado a 65 °C y 170 bar

Presiones y agitaciones altas junto con temperaturas intermedias (65-68 °C) dieron lugar a distribuciones de tamaño de partícula más homogéneas. Los tamaños de partícula más pequeños se obtuvieron empleando presiones y diámetros de orificio bajos.

4.- Conclusión

El empleo de CO_2 supercrítico redujo la temperatura de fusión del GMS. La técnica PGSS permitió obtener partículas micrométricas de tamaño modulable mediante la variación de las condiciones de operación. En trabajos futuros, se evaluará la carga de las partículas con un agente bioactivo de relevancia para el tratamiento de heridas cutáneas.

5.- Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por la Xunta de Galicia [ED431C 2016/008 & ED431F 2016/010], MINECO [SAF2017-83118-R], Agencia Estatal de Investigación (AEI) y FEDER. C.A. García González agradece al MINECO por una ayuda Ramón y Cajal [RYC2014-15239].

6.- Referencias

[1] C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, E. Bucio, A. Concheiro, Expert Opinion on Drug Delivery, 13, 1109-19, 2016

[2] C.A. García-González, A.R. Sampaio da Sousa, R. Argemí, A.L Periago, J. Saurina, C.M.M. Duarte, C. Domingo, International Journal of Pharmaceuticals, 382, 296-304, 2009

Desarrollo y evaluación de microesferas de PLGA conteniendo idebenona como sistemas de liberación modificada

Rubén VARELA-FERNÁNDEZ [(1)]; Francisco J. OTERO-ESPINAR [(1)];
Anxo FERNÁNDEZ-FERREIRO [(1,2,3)] y Miguel GONZÁLEZ-BARCIA [(2)].

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela (USC). Campus vida. Santiago de Compostela. Código Zip: 15782. España. francisco.otero@usc.es.
2. Grupo de Farmacología Clínica. Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Travesía da Choupana s/n Santiago de Compostela. Código Zip: 15706. España. miguel.gonzalez.barcia@sergas.es.
3. Grupo de Imagen Molecular. Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Travesía da Choupana s/n Santiago de Compostela. Código Zip: 15706. España. anxordes@gmail.com.

Email de contacto: rubenvf1@gmail.com

1.- Introducción

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria de origen mitocondrial caracterizada por una degeneración de las células ganglionares de la retina (RGCs), acompañada de una pérdida progresiva de la funcionalidad del nervio óptico [1].

La etiología de la enfermedad es desconocida, aunque los casos descritos presentan un patrón de herencia materna basado en la presencia de mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial. Estas mutaciones producen cambios en el proceso de codificación del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial, dando origen a una disfunción de las RCGs y, en consecuencia, la muerte celular por apoptosis.

Actualmente, las opciones de tratamiento de la LHON son limitadas. Análogos de nueva generación de la CoQ10 se han desarrollado con la finalidad de incrementar la biodisponibilidad del farmacóforo y maximizar su potencial terapéutico, siendo el análogo usado en el presente estudio la idebenona [2].

La idebenona es una benzoquinona de cadena corta dotada de una potente acción antioxidante e inhibidora de la peroxidación lipídica, siendo capaz de proteger las membranas celulares y las mitocondrias del daño oxidativo.

Las microesferas son sistemas matriciales con un tamaño comprendido entre 1-1000µm que permiten la encapsulación y el transporte de sustancias activas de distinta naturaleza, postulándose como sistemas versátiles para en la obtención de perfiles de liberación controlada durante largos periodos de tiempo.

El objetivo de este trabajo es investigar posibles alternativas de administración intravítrea para una liberación controlada de idebenona en el humor vítreo.

2.- Materiales

Idebenona y Sodio hialuronidato (Acofarma®, España), Resomer RG 502 25G (PLGA) (Evonik®, Alemania), Alcohol de polivinilo (PVA) (Sigma Aldrich, Alemania), Diclorometano (DCM) (Analar Normapur®), Tampón Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline; PBS), Agua Milli-Q® Millipore (Merck®), Membranas de diálisis sintéticas Viscking (Medicell Membranes Ltd.). Los demás productos usados son de grado analítico y todos los solventes cumplen con los límites establecidos por el USP XXII y la EMEA.

3.- Métodos

3.1.- Preparación de las microesferas

La preparación de las microesferas se ha llevado a cabo mediante el método de emulsión/evaporación. Para ello, se llevó a cabo la disolución del fármaco a encapsular

en la solución polimérica (PLGA en DCM), prosiguiendo con la emulsificación de la mezcla forma con la fase inmiscible que contiene el tensoactivo (solución acuosa de PVA), para la obtención de las micropartículas sólidas tras la eliminación del disolvente volátil en el que inicialmente se dispersó el polímero (DCM).

3.2- Propiedades tecnológicas de las microesferas

3.2.1- Morfología

El estudio de la morfología se lleva a cabo mediante la aplicación de técnicas de microscopía, principalmente microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

3.2.2- Tamaño de partícula

El análisis del tamaño de partículas se lleva a cabo mediante el uso de técnicas de difracción láser.

3.2.3.- Carga y eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación (EE) se calcula matemáticamente mediante la aplicación de la siguiente fórmula matemática:

$$EE\ (\%) = \frac{Frac.\ experim.de\ PA\ encap.\ (g)}{Frac.\ teórica\ de\ PA\ encap.\ (g)} \cdot 100$$

La carga (Q) de principio activo se determina mediante el uso de la siguiente expresión matemática:

$$Q = \frac{Cantidad\ de\ principio\ activo\ (g)}{Cantidad\ de\ microesferas\ (g)}$$

3.2.4.- Liberación in vitro de fármacos: idebenona

Los estudios de liberación se realizan mediante el uso de células de difusión vertical (células de Franz) usando como medio receptor PBS (pH = 7.4), además de incluir humor vítreo sintético (1 ml) en la porción donadora con la finalidad de simular el medio *in vivo* para el que se han diseñado (cámara vítrea del ojo).

Sobre el humor vítreo, se disponen las microesferas (100 µl). Hecho esto, las células se colocan en un agitador orbital (37° y 100 rpm), extrayendo las muestras a tiempos predeterminados durante 1 mes. Después de cada muestra, la porción receptora se rellena con PBS fresco.

4.- Resultados y discusión

4.1- Propiedades tecnológicas de las microesferas

Las partículas muestran un aspecto esférico y un elevado número de pequeños poros en su superficie.

El uso de un tamiz con una abertura de malla de 25 µm y el de una malla de 10µm ha permitido seleccionar el intervalo de tamaños deseado para la aplicación de las microesferas en inyección intravítrea.

Los ensayos de carga y eficacia de encapsulación realizados indican una alta variabilidad en la eficacia de carga, por lo que es necesario realizar una optimización del proceso de fabricación que mejore la eficiencia del proceso.

Los resultados obtenidos hasta el momento en los ensayos de liberación *in vitro* sugieren un control efectivo de las microesferas sobre la liberación de la idebenona.

5.- Conclusiones

La técnica de microencapsulación descrita en este trabajo resulta útil para la encapsulación de fármacos y su posterior liberación controlada durante varios meses, manteniéndose su actividad biológica.

6.- Referencias

[1] Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, et al. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain. septiembre de 2011;134(9):2677-86.

[2] Newman NJ, Biousse V. Hereditary optic neuropathies. Eye. noviembre de 2004;18(11):1144-60.

Preparation of Resveratrol-loaded Poly-ε-caprolactone microcapsules by ultrasonic atomization intended for intra-articular therapy of Rheumatoid Arthritis.

I. Lamela-Gómez [(1,2)], J. Blanco-Méndez J [(1,2)], F.J.Otero-Espinar [(2)], A. Luzardo-Álvarez [(1,2)#]

Departament of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical technology, University of Santiago de Compostela [1] Faculty of Sciences (Lugo); [2]Faculty of Pharmacy (Santiago de Compostela).
Contact Email: ivan.lamela@usc.es

1. Introduction

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene; RSV) is a natural polyphenol found as secondary metabolite in vascular plants such as grapes, berries and peanuts. *Trans*-RSV has been reported to exhibit several pharmacological activities, including anti-inflammatory and antioxidant properties. Oxidative stress has been demonstrated to play a critical role in a wide number of pathologies, including rheumatoid arthritis (RA), where it is even considered a pathogenic marker of the disease [1]. Antioxidant activity of RSV supports it as a promising molecule against free radical damage and oxidative stress, resulting in an anti-inflammatory effect as found *in vitro* and *in vivo* [2]. However, RSV biomedical applications are limited due to its low aqueous solubility, short half-life and poor stability, especially under UV light [3]. Its microencapsulation seems to be an excellent alternative to overcome those limitations. Ultrasonic atomization allows us to generate microcapsules under mild conditions, being an excellent approach for encapsulation of labile drugs like RSV [4].

2. Material and methods

2.1.- Preparation of microcapsules

Poly-ε-caprolactone microcapsules were obtained by using a coaxial dual-feed ultrasonic nozzle (Sono-Tek Corp.) with a fix operation frequency of 60 KHz and variable power (P). Briefly, a PVA solution (3.5%) was infused through both channel (3 ml/min) obtaining a fine spray which was collected over a PCL stirring solution. Later, solvent was removed, and microcapsules were washed and finally dried under vacuum. A central composite rotational experimental design was performed to assess the influence of power and [PCL] on size particle and encapsulation efficiency (EE).

2.2.- Characterization of microcapsules

Particle size was measured by light scattering (Mastersizer micro). The inner and surface morphology of microcapsules was observed using SEM (Jeol JSM-6360LV).

To test the *trans*-RSV photostability and the potential protective effect of encapsulation, RSV stock solutions, pure RSV in powder form and encapsulated RSV were placed in quartz cuvettes and irradiated at λ=254 nm. *Trans*- and *Cis*-RSV concentrations were determined at different times.

In vitro release profile of RSV was assessed by incubating 5 mg of microcapsules in aqueous buffer at three different pH values (pH 5 6.4 and 7.4), at 37ºC and continuous stirring for 485 h. Concurrently, stability studies of trans-RSV in the same conditions were carried out.

Cell compatibility of microcapsules was tested in RAW 264.7 mice macrophages by WST-1 assay. Furthermore, to evaluate the protective effect of RSV against oxidative stress, ROS production in presence of empty microparticles, free RSV and loaded-RSV was measured in macrophages cell culture by DCF-DA assay.

3. Results and discussion

All formulations were successfully prepared according to the experimental design, rendering in process yield between 80.2 and 92.1 %. Encapsulation efficiency varied from 39.7 to 96.0 % depending on formulation parameters. Spherical and smooth surfaced microcapsules were obtained, as verify by SEM. As well, cross-sectioned microcapsules observation showed a PCL well surrounding

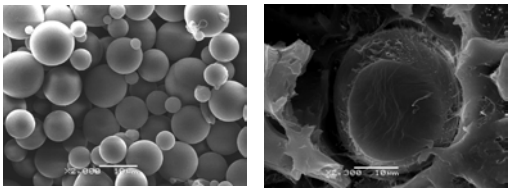


Fig. 1: SEM images of RSV-loaded microcapsules

an empty core (Fig. 1). Multiple regression analysis showed a positive, statistically significant relationship between polymer concentrations and particle size, whereas by increasing power supplied a size distribution broadening was observed. Additionally, an optimum formulation with a mean diameter of 13.82±0.3 μm and EE=96 % was selected by surface response methodology.

The exposure of RSV to UV light resulted in a rapid isomerization of RSV from *trans*- to *cis*- form following a first order kinetic model. Concisely, in ethanol, *trans*-RSV isomerized to the extent of 50% after 4 h of irradiation. Further, stability assays in solid form were performed, showing that PCL microcapsules enhance *trans*-RSV stability. In short, after irradiation at 254 nm for 3.2 h, 60.5 % of free *trans*-RSV were isomerized, whereas loaded-RSV degraded only 37.0 %.

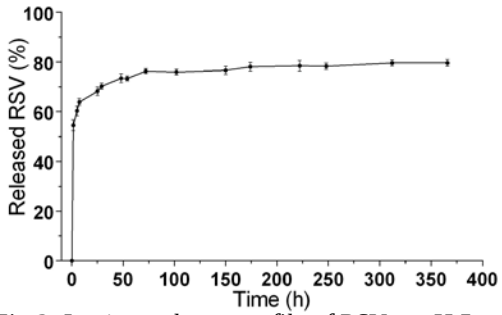


Fig.2: In vitro *release profile of RSV at pH 5*

The *in vitro* release of RSV was carried out at three different pH values (5, 6.4 and 7.4). Nonetheless, simultaneously stability studies demonstrated a fast degradation of RSV over pH 5, even under dark conditions. Indeed, at pH 7.4 RSV degrades continuously while it was been releasing from microcapsules. Due to lack of stability in those conditions, we present here the results of release at pH 5. After an initial burst of over 55% in first 90 minutes, RSV was delivered at a constant rate until first signs of degradations were detected at 485 h (Fig. 2). In addition, release data were fitted to a kinetic mathematical model, with a best fitting to Peppas´ equation (R^2=0,9992; $Q = 0.52254*t^{0.09576}$), which supports the predominance of a diffusion release mechanism.

As it is shown in figure 3, incubation of

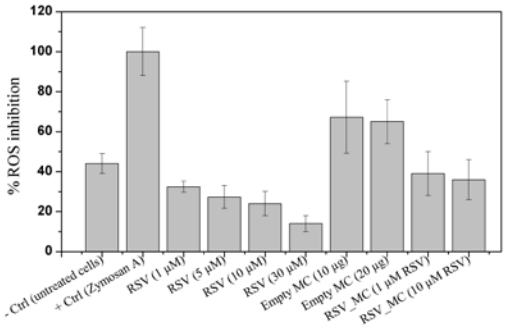


Fig. 3: Effect of free RSV and RSV-loaded microcapsules on the ROS production in Zymosan A-stimulated mice macrophages

RSV, loaded-RSV or empty microcapsules did not lead to an increase in ROS production. Nonetheless, cell stimulated with Zymosan A produced high levels of ROS, which decreased in presence of free RSV. Also, ROS levels decreased after co-incubation with empty microcapsules, but this effect was higher in case of RSV-loaded microcapsules. Those results confirmed that RSV maintained its ROS inhibition properties when encapsulated.

4. Conclusions

RSV-loaded microcapsules made of PCL were successfully prepared by ultrasonic atomization with size and morphology suitable for local administration. A controlled release profile of RSV was achieved and moreover, encapsulation of RSV enhanced its photostability and preserved RSV antioxidant properties. Further studies should be performed in the future to explore the clinical significance of microencapsulated RSV and its potential in RA treatment.

5. Acknowledgments

Iván Lamela-Gómez is grateful to “Axudas á etapa predoutoral da Xunta de Galicia, 2017”

6. References

[1] S. Datta et al., Clin. Rheumatol., 33(11): p. 1557-64, 2014.

[2] N. Elmali et al., Inflammation, 30(1-2): p. 1-6, 2007.

[3] Š. Zupančič et al., Eur. J. Pharm. Biopharm., 93: p. 196-204, 2015.

[4] A. Dalmoro et al., Eur. J. Pharm. Biopharm., 80(3): p. 471-477, 2012.

Potencial terapéutico de la Melatonina en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

I. Seoane-Viaño[1]; N. Gómez-Lado[2]; A. Luzardo-Álvarez[1]; F.J. Otero-Espinar[1]; C. Bendicho-Lavilla[1]; Á. Ruibal[4]; A. Fernández-Ferreiro[1,2,3]; P. Aguiar[2,4]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela (USC). España.
2. Grupo de Imagen Molecular. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). España.
3. Departamento de Farmacia. Gerencia de Gestión Integrada de Santiago de Compostela (SERGAS). España.
4. Departamento de Medicina Nuclear. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). España.

Email de contacto: francisco.otero@usc.es

1.- Introducción

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un conjunto de patologías crónicas del tracto gastrointestinal, tales como la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa. Los tratamientos actuales son en su mayoría poco específicos y presentan efectos adversos. En consecuencia, es necesario el desarrollo de fármacos menos agresivos para el tratamiento de la enfermedad.

La Melatonina es un producto de secreción de la glándula pineal, que presenta funciones neurohormonales como la regulación del ritmo circadiano. Además, esta hormona también es sintetizada en el tracto gastrointestinal, lo que se sugiere que juega algún papel importante en su fisiología dadas sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (1).

La Tomografía por Emisión de Positrones junto con la Tomografía Computarizada (PET/CT) representa una técnica de imagen no invasiva que permite realizar un seguimiento de la patología, reduciendo así el número de animales necesarios para evaluar la progresión de la enfermedad y la eficiencia de un determinado fármaco.

La [^{18}F]FDG es un trazador análogo de la glucosa que se emplea para la identificación de regiones en las que existe un metabolismo glucídico elevado debido a un proceso inflamatorio o infeccioso.

2.- Materiales y métodos

Este estudio se ha realizado en ratas Sprague-Dawley macho con un peso medio entre 250-300 g. Los animales fueron alojados en jaulas individuales en condiciones controladas de temperatura (22±1ºC) y humedad (60±5ºC), con ciclos de día y noche (12h/12h) regulados por luz artificial y con libre acceso a comida y agua.

2.1.- Diseño experimental

En este estudio se han utilizado 20 ratas Sprague-Dawley a las que se les ha inducido una colitis experimental. Dichos animales se dividieron en dos grupos: un grupo control que no recibió ningún tratamiento y otro que fue tratado con melatonina a partir del día 3 post-inducción.

2.1.1.- Inducción de la colitis

Previamente a la inducción, los animales se dejaron en ayunas durante 24 h. Bajo anestesia con isoflurano, se administró un enema de TNBS/etanol (50% v/v) con una concentración de 50 mg/kg mediante un catéter de 8 cm de longitud basándose en el método descrito por Morris (2).

2.1.2.- Tratamiento con Melatonina

Uno de los grupos experimentales fue tratado con una dosis diaria de 10 mg/kg de Melatonina por vía rectal a partir del día 3.

2.1.3.- Protocolo de estudios PET/CT

Las imágenes PET/CT se obtuvieron mediante un Sistema de Imagen Preclínica Albira PET/CT (BrukerBiospin,

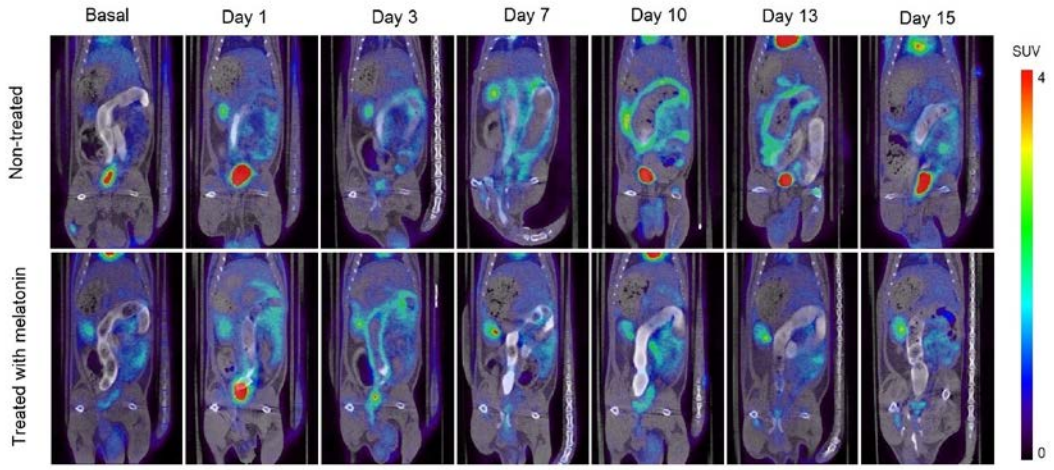


Figura 1. Imágenes FDG PET/CT representativas de los grupos experimentales. En la parte superior, evolución de la inflamación intestinal en un animal sin tratamiento. En la imagen inferior, evolución de la enfermedad en un animal tratado con Melatonina a partir del día 3. Nótese la desaparición de la inflamación a partir del día 7 en el animal tratado.

Woodbridge, Connecticut, UnitedStates). Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano para la inyección intravenosa de 25±7 MBq del radiotrazador [^{18}F]FDG y posteriormente permanecieron despiertas durante los 45 minutos de captación. Para el CT, se administró una agente de contraste intrarectal 10 minutos antes de los estudios. Las adquisiciones PET/CT se llevaron a cabo a día cero para obtener imágenes basales y 1, 3, 7, 10, 13 y 15 días post-inducción. Todos los animales fueron sacrificados el día 15. La captación máxima de [^{18}F]FDG (SUVmax) se obtuvo a partir de las imágenes PET para cuantificar la inflamación en el colon ascendente, transversal y descendente.

3.- Resultados y discusión

La colitis producida por un enema de TNBS/etanol causa una inflamación transmural severa asociada a ulceraciones y estrechamiento de la pared del colon. Después de la inducción, los animales presentaron síntomas de colitis aguda como diarrea sanguinolenta y pérdida de peso.

3.1.- Cuantificación de la actividad

Las imágenes PET/CT muestran un incremento en la captación colónica de FDG tras la inducción, correspondiendo la mayor captación al día 3. Los animales tratados con Melatonina intrarectal muestran una disminución de la inflamación a partir del día 7 post-inducción, mientras que los animales del grupo que no recibe tratamiento la inflamación no remite hasta el día 15.

4.- Conclusiones

En este estudio se ha demostrado la eficacia de la Melatonina para el tratamiento de la EII en un modelo animal de colitis. El efecto del tratamiento con Melatonina se observó a partir del día 7 post-inducción. En este estudio se ha demostrado el posible potencial terapéutico de la Melatonina y la utilidad de la técnica de imagen FDG PET/CT para realizar el seguimiento de la progresión de la enfermedad. Trabajos futuros irán encaminados al desarrollo y evaluación de formulaciones de Melatonina más eficaces y determinación de pautas de tratamiento.

5.- Referencias

1. Jena G, Trivedi PP. A review of the use of melatonin in ulcerative colitis: experimental evidence and new approaches. Inflamm Bowel Dis. 2014; 20(3):553-63.

2. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon. Gastroenterology. 1989; 9 (2):795-803.

Estudios sobre el mecanismo de interacción y tipo de adsorción entre sistemas sintetizados por sistemas vesiculares lipídicos y minerales de arcilla de diferente origen

Sergio PIÑAR CORRAL[(1)], María Luisa GONZÁLEZ RODRÍGUEZ [(1)], Santiago MEDINA CARRASCO [(3)], María del Mar ORTA CUEVAS [(2)],Antonio María RABASCO ÁLVAREZ [(1)].

1. Departamento Farmacia y Tecnología Farmaceútica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 2.
2. Departamento Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González, 2.
3. Laboratorio Rayos X (CITIUS), Universidad de Sevilla, E-41012. Sevilla, España.

Email de contacto: sergiopincor@gmail.com

1.- Introducción

Los sistemas de administración de fármacos se están convirtiendo en una opción muy utilizada como vehículos de principios activos, otorgando características que mejoran la biodisponibilidad, actividad terapéutica e incluso reducir efectos secundarios indeseables [1]. Además, se emplean arcillas de tipo silicato laminares que presentan capacidades de adsorción e hinchamiento debido a sus estructuras, siendo capaces de interactuar con fármacos [2, 3].

En la actualidad, está despertando un gran interés el estudio en profundidad del uso de compuestos formados por sistemas vesiculares lipídicos, como liposomas, adsorbidos en arcillas, llegando a formar sistemas que son capaces de mejorar el control en la liberación y administración del fármaco por vía oral, optimizando tratamientos existentes [4]. Además, estos sistemas binarios se diseñan para mejorar propiedades de disolución de fármacos poco solubles [5] y estabilizarlos [6]. Aparte, al tratarse de materiales que respetan el medio ambiente, se considera una interesante línea de actuación [7].

El objetivo del presente trabajo es dilucidar el mecanismo de interacción de liposomas con diferentes arcillas, y evaluar la influencia de la carga superficial de las vesículas sobre el proceso de adsorción.

2.- Material

Arcillas de distinta naturaleza (naturales y sintéticas, e inorgánicos y orgánicas); Cloroformo (Panreac); Coltesterol 95% GC, Cho; Dihexadecilhidrógenino fosfato, CDP, α-Fosfatidilcolina de huevo, PC; Octadecilamina (Sigma-Aldrich); Metanol (Labbox-Labkem).

3.- Metodología

-Síntesis de formulaciones de liposomas, con diferente carga superficial, por la técnica de evaporación en capa fina.
-Selección de silicatos laminares naturales tipo Montmorillonita, y preparación de arcillas sintéticas, Na-mica-4.
-Síntesis de formulaciones basadas en liposomas adsorbidos a las diferentes arcillas.
-Caracterización fisicoquímica: tamaño (nm), índice de polidispersión, potencial Z (mV) en función del pH del medio artificial utilizado; intestinal o gástrico.
-Ensayos de adsorción: (A) Evaluación de la estabilidad y comportamiento de sedimentación de las formulaciones mediante estudios de Transmitancia. (B) Adsorción en el espacio interlaminar de la arcilla mediante difracción de Rayos X. (C) Adsorción en la superficie de la arcilla mediante determinación del potencial Z. (D) Adhesión de liposomas en superficie de la arcilla mediante Microscopía Electrónica.

4.- Resultados y discusión

Al realizar el ensayo de transmitancia, se comprobó un comportamiento de sedimentación específico de cada sistema debido a la interacción de la arcilla con los

liposomas de diferente carga utilizados. La Figura 1 muestra un aumento significativo en la transmitancia de los liposomas catiónicos adsorbidos a Na-mica-4, a diferencia de las formulaciones aniónica y neutra. Ello es indicativo de una mayor interacción liposoma-arcilla, lo que incrementa la sedimentación global del sistema.

Por tanto, tras seleccionar los liposomas catiónicos como formulación óptima para interactuar con las arcillas, se llevó a cabo una serie de estudios complementarios para ayudar a conocer el comportamiento de adsorción, utilizando la arcilla sintética y dos montmorillonitas naturales de diferente procedencia. La Tabla 2 muestra los resultados de potencial Z de las arcillas en contacto con estos liposomas, no apreciándose diferencias en sus cargas superficiales. Por tanto, se propone una adsorción mayoritariamente en la interlámina producida por un intercambio catiónico, sin llegar a descartar una posible adsorción superficial en menor medida, como se aprecia en las imágenes por Microscopía en una primera aproximación. Estudios adicionales de Rayos-X mostraron diferencias en la retención de los liposomas catiónicos, aniónicos y neutros .

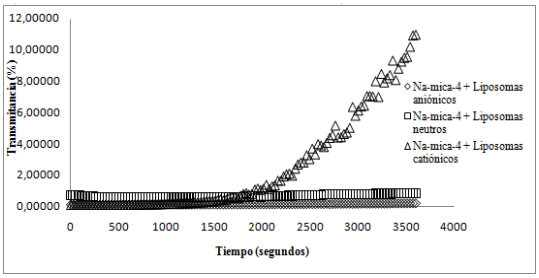


Fig.1A.Transmitancia (%) vs Tiempo (segundos).

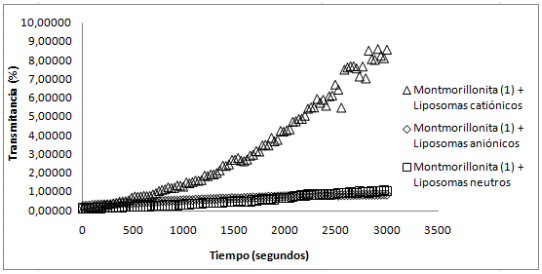


Fig.1B. Transmitancia (%) vs Tiempo (segundos).

Nombre	Tiempo (segundos)	Potencial Z (mV)
Na-mica-4	0	-17,5
	1000	-17,83
	2000	-17,2
	3000	-16,43
Montmorillonita (1)	0	-23,3
	1000	-23,07
	2000	-22,33
	3000	-21,77
Montmorillonita (2)	0	-23,15
	1000	-22,6
	2000	-21,5
	3000	-22,37

Tabla 1. Valores del potencial Z de los sistemas formados por arcillas y liposomas catiónicos a lo largo del tiempo.

4.- Conclusiones

Existe una interacción favorable entre los liposomas catiónicos y las diferentes arcillas, proponiéndose un mecanismo principal de adsorción de tipo interlaminar.

5.- Agradecimientos

VI Plan Propio de la Universidad de Sevilla.
Laboratorio de Rayos X del Centro de Investigación, Transferencia e Innovación de la Universidad de Sevilla.
Proyecto 640000 de la Fundación de Investigación de la Universidad de Sevilla.

5.- Referencias

[1] Davoodi P, Yeng L, Xu Q, Sunil V, Sun Y, Soh S, Hwang C-H, Adv Drug Deliv Rev, 2018, https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.002

[2] Borrego-Sánchez A, Carazo E, Aguzzi C, Viseras C, Sainz-díaz CI, Appl Clay Sci, 160, 173-9, 2018.

[3] Yang J, Lee J, Ryu H, Elzatahry AA, Alothman ZA, Choy J, Appl Clay Sci, 130, 20-32, 2016.

[4] Zhang Y, Wu X, Mi Y, Li H, Hou W, J Phys Chem Solids, 108(May), 125-32, 2017

[5] Mura P, Maestrelli F, Aguzzi C, Viseras C, International Journal of Pharmaceutics, 509, 8–15, 2016.

[6] Viseras C, Cerezo P, Sanchez R, Salcedo I, Aguzzi C, Appl Clay Sci 48(3), 291-5, 2010.

[7] Jafarbeglou M, Abdouss M,Mousavi A, Jafarbeglou A, RSC Adv, 6, 5002-16, 2016.

Synthesis and characterization of pSi nanoparticles functionalized with hyaluronic acid for IBD treatment

Adrián H TERUEL [1, 3], Jon ZUIDEMA [2], Joanna WANG [2], Byungji KIM [2], Virginia MERINO SANJUÁN [1, 5], Ramón MARTÍNEZ-MAÑEZ [1, 3, 6, 7], Félix SANCENÓN [1, 3, 6, 7], Michael J SAILOR [2], Isabel GONZÁLEZ-ÁLVAREZ [4] and Marta GONZÁLEZ-ÁLVAREZ[4]

1. Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València, Spain
2. Department of Chemistry and Biochemistry, University of California San Diego, USA, CA 92093
3. CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain
4. Departamento de Ingeniería, Sección de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad Miguel Hernandez, Alicante 03550, Spain
5. Departamento de Farmacia y Tecnologia Farmacéutica, Universitat de València, Valencia 46100, Spain
6. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Unidad Mixta de Investigación en Nanomedicina y Sensores, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain
7. Unidad Mixta UPV-CIPF de Investigación en Mecanismos de Enfermedades y Nanomedicina, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

Email de contacto: marta.gonzalez@umh.es

1.- Introducción

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are a group of autoimmune, chronic inflammatory conditions of the colon and small intestine. Colitis and Crohn's are the most well-known of these group of diseases.[1] However, the targeting of inflamed regions by oral administration of drugs or biological agents is a challenge to achieve in the treatment of IBD. Achieving drug delivery specifically in the areas where wounds are present will decrease the required amount of drug for IBD treatments, thus more efficient solutions with hardly any adverse effect will be possible.

The growing number of studies with Porous silicon (PSi) nanoparticles as therapeutic and diagnostic agents are due to properties such as efficient photoluminescence, biocompatibility, biodegradability, and high capacity for therapeutics and other payloads. [2]

Porous Si films with controlled porosity and pore size can be prepared by electrochemical etch of crystalline silicon wafers. The process of synthesis of PSi nanoparticles involves the realization of several steps. Salonen and co-workers [3] reported how to increase the yield of PSi nanoparticles with controlled size, narrow size distribution, and higher yield.

Here, we describe the process to synthesize and characterize a novel drug delivery system that could be used to target and improve the outcomes on IBD treatment. This system is based on Luminescent Porous Silicon Nanoparticles (LPSiNPs) loaded with two different chemical identities of interest for future experiments (lysozyme or hydrocortisone) and functionalized with hyaluronic acid to target CD-44 receptors which are overexpressed in inflamed colonic tissue present in IBD subjects.[4]

2.- Materials and methods

Materials: Silicon wafers (≈1 mΩ cm resistivity, <100> orientation) from Virginia Semiconductor, Inc. Sodium tetraborate decahydrate, lysozyme and APDMES from Sigma-Aldrich Chemicals. Hydrofluoric acid (48% aqueous, ACS grade) from Fisher Scientific. Sulfo-NHS, EDC and hydrocortisone (HC) from Thermo Scientific. Hyaluronic acid (HA) MW<5kDa from Lifecore Biomedical. All chemicals were used without further purification.

Preparation of Luminescent Porous Silicon Nanoparticles (LPSiNPs, S0): First,

porous silicon films were prepared by means of electrochemical etch chemistry of highly boron-doped p^{++}-type silicon wafers.

Lysozyme Loading (S1). LPSiNPs (1 mg) were suspended in 1 mL of aqueous lysozyme solution (10 mg/mL, PBS (x1)).

Drug Loading (S2). LPSiNPs (1 mg) were suspended in 1 mL of ethanoic hydrocortisone solution (10 mg/mL).

Chemical Modification (functionalization) of S1 and S2 (S1f and S2f). Conjugation of hyaluronic acid (HA) to the loaded LPSiNPs (S1 or S2) was achieved by amidation between the previously activated carboxyl group of HA and the primary amine found in APDMES.

Characterization: Transmission electron microscope (TEM) images were obtained on a JEOL-1200 EX II. Dynamic light scattering (DLS, Zetasizer ZS90, Malvern Instruments) was used to determine the hydrodynamic size of the nanoparticles. The PL spectra (λex: 365 nm) were obtained using Ocean Optics QE-65 spectrometer with 460 nm long-pass emission filter.

3.- Results and discussion

The nanoparticles were prepared from highly doped p^{++}-type single-crystal silicon wafers using a three-step process. First, porous layers were etched into silicon by electrochemical etching in an aqueous electrolyte containing HF and ethanol. Then, the porous silicon layers were removed from the silicon substrate with a current pulse, commonly named "lift-off". Finally, the detached porous Si layer was placed in deionized water and fractured by ultrasonication (Figure 1).

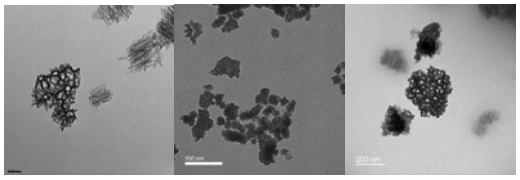


Fig. 1: S0, S1f and S2f TEM images

The hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering (270 ± 30 nm) was consistent with TEM measurements.

The resulting luminescent porous Si nanoparticles (LPSiNPs) displayed strong orange to near-infrared photoluminescence (Figure 3), which has been attributed to quantum confinement effects in the silicon cores and to localized Si-SiO_2 interfacial defects.

Fig. 3: Pictures of PSiNPs (left) and LPSiNPs (right) in aqueous suspension (1mg/mL).

4.- Conclusions

- A new hybrid material was obtained by grafting hyaluronic acid to the external surface of luminescent pSi nanoparticles loaded with lysozyme or hydrocortisone.

- The new material shows an enhanced photoluminescence due to the oxidation process subjected in borax solution in post-synthesis steps.

5.- Acknowledgement

The authors thank the Spanish Government (projects MAT2015-64139-C4-1-R) and the Generalitat Valenciana (project PROMETEOII/2014/047) for support. AHT thanks to the Spanish MEC for his FPU grant.

6.- References

[1] Liu, T-C., Stappenbeck, T.S., Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Annu. Rev. Pathol., 11, 127-148, 2016.

[2] Z. Qin, J. Joo, L. Gu, and M. J. Sailor, Particle & Particle Systems Characterization, 31, 252–256, 2014.

[3] L. M. Bimbo, M. Sarparanta, H. l. A. Santos, A. J. Airaksinen, E. M. kilä, T. Laaksonen, L. Peltonen, V.-P. Lehto, J. Hirvonen, J. Salonen, ACS Nano, 24, 5688-5694, 2010.

[4] B. Xiao, Z. Xu, E. Viennois, Y. Zhang, Z. Zhang, M. Zhang, M. K. Han, Y. Kang, and D. Merlin. Molecular Therapy, 25, 1628-1640, 2017.

Hidrogeles iónicos basados en 6-fosfogluconato trisódico para aplicación tópica

María Teresa MARTINEZ-MARTINEZ [(1)], Guillermo RODRIGUEZ BERNA [(2)], Virginia MERINO [(1)], Avelino CORMA [(2)], Marival BERMEJO [(3)] Isabel GONZALEZ-ALVAREZ [(3)], Marta GONZALEZ-ALVAREZ [(3)],

1.Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Universidad Politécnica de Valencia,Universitat de València. Dep. Farmacia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia. Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia. Vicente Andrés Estelles s/n. Burjassot. Valencia. España

2. Instituto Mixto de Tecnología Química. Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (UPV-CSIC). Avd. de los Naranjos s/n, 46006. Valencia. España

3. Dpto. de Ingeniería. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández. Carretera Alicante-Valencia km. 87, 03550. San Juan. Alicante. España

Email de contacto: marta.gonzalez@umh.es

1.- Introducción

En el campo de la biomedicina, los sistemas hidrogel formados a partir de polímeros tienen un gran potencial. Se han desarrollado sistemas diseñados para liberación de fármacos, cosmética, tratamiento de heridas, ingeniería de tejidos, etc…Su consistencia semisólida los hacen especialmente adecuados para el desarrollo de formulaciones para la piel. En este campo se pueden formular hidrogeles con distintas aplicaciones: actuar como sistemas para liberación de fármacos con efecto local, como matrices para contener y controlar la liberación de los principios activos en parches y para formar películas poliméricas compatibles, adhesivas y flexibles sobre la piel con una gran variedad de potenciales aplicaciones.

Para poder obtener nuevas formulaciones con distintas características fisicoquímicas y organolépticas es necesario la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad entrecruzante. Hidrogeles con propiedades diferentes pueden suponer un avance en distintas aplicaciones farmacéuticas.

En ese sentido, el ácido 6-fosfoglucónico (6-PG) es una molécula biológica pequeña capaz de entrecruzar polímeros con carga positiva para su aplicación sobre la piel gracias a su inocuidad y biocompatibilidad.

Por todo ello, se ha estudiado la formación de hidrogeles de quitosán por entrecruzamiento con el 6-PG-Na+, utilizando el piroxicam como fármaco modelo para evaluar cómo afecta el sistema elaborado a las características de liberación. Se han evaluado todos los aspectos de la formulación que determinarían su aplicabilidad a nivel biomédico y/o cosmético.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Síntesis del hidrogel

La preparación del hidrogel se lleva a cabo con una solución del polímero en medio ácido al que se le añade una solución de 6-PG-Na+ en agua. Esta mezcla se agita en el vórtex de 1 a 3 minutos formándose el hidrogel y posteriormente se liofiliza. Como fármaco modelo se ha encapsulado piroxicam

2.2.- Caracterización del hidrogel

Las formulaciones se caracterizaron por análisis elemental, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), análisis termogravimétrico, difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), propiedades reológicas, hinchamiento, toxicidad, extensibilidad e irritación

2.3.- Liberación de fármaco

Se realizaron estudios de liberación de piroxicam en un medio con pH= 5.5 (hasta 48 h) en un agitador oscilante a 100 rpm y 37ºC. También se han realizado ensayos

complementarios a otros pHs que se observan en el organismo (pH=1,2; 4,5; 6,8..)

2.4.- Cuantificación de la cantidad de fármaco en las muestras

El piroxicam se ha caracterizado por HPLC utilizando una columna de acero inoxidable WatersTM modelo Nova Pak® C18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm (flujo 1 ml/min T= 30ºC). La fase móvil fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1% y acetonitrilo 50:50. La detección se realizó con una longitud de onda de 356 nm.

2.5.- Permeabilidad

Para determinar la cinética de difusión y la carga cutánea de fármaco tras la exposición a hidrogeles con piroxicam, se realizó el estudio de permeabilidad in vitro en células de Franz siguiendo un protocolo estándar.

3.- Resultados y discusión

3.1 Síntesis y caracterización del hidrogel

Los grupos amino del chitosan reaccionan con los grupos -H2PO4 y -COOH del 6pg formando un hidrogel iónico.

3.2 Caracterización

Los ensayos realizados determinan la formación y características del hidrogel. Los ensayos indican que el hidrogel no es tóxico ni irritante y presenta una extensibilidad y adhesividad adecuada para administrar sobre la piel.

3.3.- Liberación de fármaco

La cinética y el mecanismo de liberación del fármaco se ha determinado matemáticamente aplicando la ecuación de Korsmeyer-Peppas a los perfiles obtenidos para determinar la cinética de liberación. Se han determinado los valores del exponente difusional (n) y la constante cinética (K) así como la SSR obtenida tras el ajuste de los datos a dicho modelo matemático. Los valores obtenidos indican una liberación combinada con un mecanismo de difusión que sigue la ley de Fick y relajación/erosión de la matriz polimérica. Diferentes ensayos demuestran que cuanto mayor es el pH del medio y el porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel, los valores de la constante de orden uno son menores, y, por tanto, la liberación es más lenta y prolongada.

3.4 Permeabilidad

Los resultados indican que el hidrogel permite la administración de fármacos a nivel tópico, sin que se absorban de forma considerable. La permeabilidad del fármaco en la piel se puede regular modificando el medio de rehidratación del hidrogel.

4.- Conclusiones

Se ha obtenido un nuevo hidrogel biocompatible con cualidades idóneas para la administración de activos sobre la piel durante períodos prolongados de tiempo. Este sistema polimérico podría servir como vehículo para el tratamiento tópico de afecciones cutáneas (como alteraciones de la pigmentación, infecciones bacterianas o víricas, micosis, úlceras, lesiones) o como formulación cosmética, pudiendo limitar la absorción transdérmica para minimizar los efectos secundarios a nivel sistémico.

4.- Agradecimientos

Beca FPU del MECD, becaria Mª Teresa Martínez Martínez. Los autores agradecen al MINECO la financiación de este trabajo (SAF2016-78756)

5.- Referencias

[1] N. BHATTARAI, J. GUNN, M. ZHANG, *"Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery"*. Advanced Drug Delivery Reviews,62, 1, 83-99, 2010.

[2] MAJI P., ARIJIT G., SOUGATA J., NIRMAL M. Preparation and Characterization of Maleic Anhydride Cross-Linked Chitosan-Polyvinyl Alcohol Hydrogel Matrix. Transdermal Patch. JPST 2013; 2 (2): 62-67.

[3] MARTINEZ-MARTÍNEZ M.T. Tesis DOCTORAL. Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos, 2016.

Silk fibroin characterization and sponge preparation

Mathie NAJBERG [1,2], Salvador AZNAR-CERVANTES [3], José-Luis CENIS [3] , Emmanuel GARCION [2], Carmen ALVAREZ-LORENZO [1]

1. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R + D Pharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
2. CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France
3. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), 54442, La Alberca, Murcia, Spain

Email de contacto: mathie.najberg@univ-angers.fr

1.- Introduction

Silk fibroin (SF) from the silk worm *Bombix mori* is a naturally derived polymer which is known for its biocompatibility, relatively slow degradability, low inflammatory responses and processing abilities [1, 2]. Based on its unique mechanical properties combining strength and elasticity, it is possible to produce hydrogels, sponges, films and nanofibers for example via organic solvent free processes [3]. IMIDA (Murcia, Spain) is producing SF in aqueous solution in GMP conditions in order to develop biomaterials. We investigated the quality of the SF throughout different batches and the production of sponges via a simple freeze-drying process.

2.- Materials and Methods

SF solution (8% w/v in water) have been prepared in GMP conditions by IMIDA. The quality of the process has been assessed on 3 different batches by SDS-poly(acrylamide) gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 4-20% gradient mini-protean TGX precast gel (Bio Rad), HiMark Pre-stained protein standards (Thermo Fisher) served as molecular weight marker.

Then, SF sponges have been prepared by freeze-drying followed by annealing with vapor of ethanol (Fig. 1). An annealing step was required to increase the crystallinity of the protein in order to obtain sponges that retain their shape in aqueous solutions. The conformation of the SF protein was evaluated before and after annealing by FTIR analysis. Their swelling ability in NaCl 0.9% aq. solution, degradation in PBS, morphology by SEM (porosity, pore size and connectivity) and texture have been evaluated.

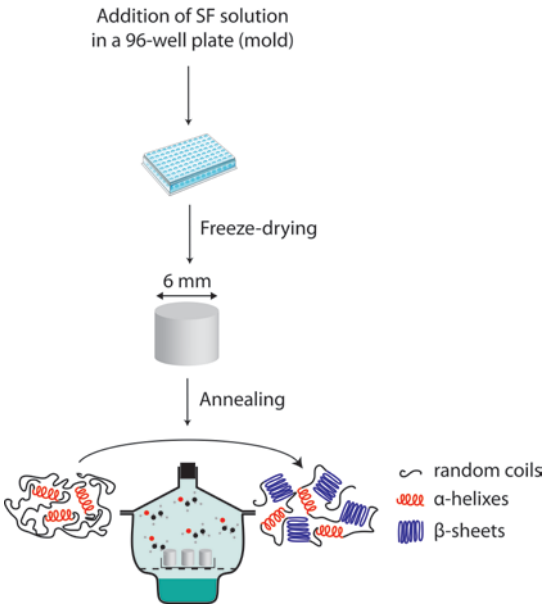


Fig. 1: Preparation of SF sponges by freeze-drying followed by annealing with vapor of ethanol.

3.- Results and Discussion

We can clearly observe the L-chain at 25 kDa. The H-chain was observed between 238 kDa and 460 kDa (Fig.2). The process used by Imida to produce the SF solution was therefore able to retain the integrity of the protein.

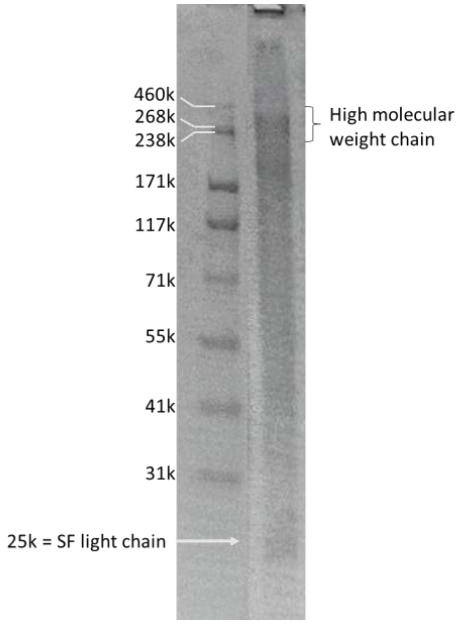


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of SF produced by IMIDA.

We showed that the annealing process used allowed us to obtain SF sponges with 28% of β-sheets (Fig. 3). Moreover, this process did not modify the morphology of the sponge. SF sponges showed good porosity near 90%, pore diameter around 60 µm and can uptake ca. 15 times their weight in water. Moreover, swollen sponges were soft and elastic with a Young modulus of 22 kPa. No degradation was observed after 3 weeks in PBS at 37°C.

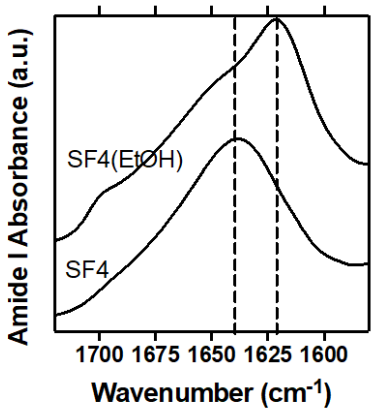


Fig. 3. FTIR absorbance spectra in the amide I region vs wavenumber for sponges containing SF before and after ethanol annealing. Peak at 1621 cm^{-1} is typical of the β-sheet conformation of SF, peak at 1640 cm^{-1} corresponds to SF random coil.

4.- Conclusion

IMIDA is producing aqueous solutions of SF with similar protein length through different batches. We were able to use it to produce porous sponges with large interconnected pores that swell in aqueous solution. Moreover, the sponges were soft and did not degrade in PBS even after 3 weeks. The process used to produce them was simple, easily up scalable and solvent free. Moreover, it is possible to use a different annealing process to modify the physico-chemical properties by changing the β-sheet content. SF sponges would therefore be interesting for biomedical applications.

5.- Acknowledgments

This work was financially supported by "Région Pays de la Loire", the University of Angers, MINECO (SAF2017-83118-R) and AEI (Spain), the Erasmus Mundus Joint Doctorate (NanoFar), and FEDER. The authors thank IMIDA (Murcia, Spain) for the kind provision of silk fibroin.

6.- References

[1] C. Vepari, D.L. Kaplan. Prog. Polym. Sci. 100, 130-4, 2012.

[2] S. Mobini, M. Taghizadeh-Jahed, M. Khanmohammadi, A. Moshiri, M.-M Naderi, H. Heidari-Vala, et al., J. Biomater. Appl. 30, 793–809, 2016.

[3] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan. Nat. Protoc. 6, 1612–31, 2011.

Prediction of testosterone effects in humans from a preclinical translational semi-mechanistic PK/PD model of sustained-release formulations of triptorelin

Victor MANGAS-SANJUAN [1,2,3], Elba ROMERO [4], Iñaki F. TROCONIZ [1,2,3]

1. Pharmacometrics & Systems Pharmacology Research Unit, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain
2. IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain.
3. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Parasitology, University of Valencia, Valencia, Spain; Interuniversity Research Institute for Molecular Recognition and Technological Development, Polytechnic University of Valencia-University of Valencia, Valencia, Spain.
4. Pharmacobiology Department. University of Guadalajara, Guadalajara, Mexico.

Email de contacto: victor.mangas@uv.es

1.- Introduction

Prostate cancer is one of the most relevant causes of mortality and morbidity in men [1]. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor agonists, as triptorelin (TRP), are the gold standard of care for prostate cancer patients sensitive to hormonal therapy, according to the European treatment guidelines [2], administered every 1, 3, or 6 months intramuscularly (IM) or subcutaneously (SC).

Development of next generation of SR for TRP faces a number of challenges as the need to prolong the dosing interval over the three- or six-months period, and the complex relationship between the time courses of drug exposure and TST response, including an initial flare-up in TST levels which might have an impact on tumour progression [3], resulting a context in which the model-informed drug discovery and development (MID3) approach has relevance. However, predictive PK/PD models for TST effects of TRP in the pre-clinical arena have not been stablished yet and the translational gap across animal species and humans still persists.

Therefore, the objectives of this work are (i) to develop a semi-mechanistic PK/PD model describing TST response of TRP profiles following intravenous and extravasal (IM/SC) administration in Beagle dogs; and, (ii) to establish a translational model able to predict TRP exposure and efficacy endpoints in adults, enhancing the development of new SR formulations of TRP for the treatment of prostate cancer

2.- Material and methods

2.1.- Study design

Data from 17 randomized preclinical trials, including 107 male Beagle dogs were available.

2.2.- Data analysis

All data analyses were performed based on the population approach with the software NONMEM version 7.3.

2.3.- Pharmacokinetic model

Different absorption parameters were considered among the formulations studied. Disposition characteristics were characterized in terms of compartments and parameterized in apparent volumes of distribution and clearances.

2.4.- Pharmacodynamic model

The semi-mechanistic response model for TRP in adults previously published by Romero et al. [4] was adapted to the time-course of TST in Beagle dogs.

2.5.- Translational approach

Using the final PK parameter estimates from Beagle dogs, an allometric scaling exercise

was conducted to predict the pharmacokinetic profiles of TRP in humans.

3.- Results

3.1.- Pharmacokinetic model

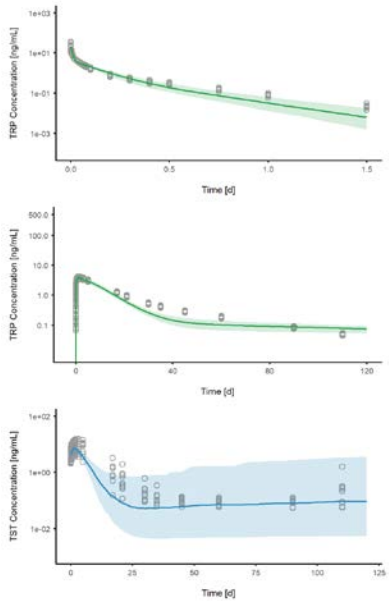
Disposition of TRP was best described by a three-compartment model with first-order elimination. Drug input into the systemic circulation was characterized with two absorption compartments. The estimate of the absolute bioavailability for each of the SR formulations was not significantly different form 1 ($p>0.05$).

3.2.- Pharmacodynamic model

Population estimates were calculated precisely according to the results from the bootstrap analysis and the results from the pc-VPC confirm the selected model is able to characterize the median behavior and dispersion of the data. The γ parameter to account for non-linear relationship on the down-regulation phenomena showed significance ($p<0.001$).

3.3.- Translational approach

Figure 1 represents the allometric prediction of human PK/PD profiles based on the parameters obtained in Beagle dogs.



4.- Discussion

The sustained and slow absorption process was successfully characterized with two depot-compartments after SC or IM administration from which the drug was released following first order kinetics. The published model [4] was able to describe the time-course of TST in Beagle dogs with the following mechanism: (i) a competitive interaction between TRP and the endogenous agonist at the level of TST receptor, (ii) prolonged interaction to the receptor elicited a down-regulation process which has been widely reported, and (iii) zero-order rate synthesis process, independent from LH and FSH, both hormones responsible of the TST dynamics. The TST response in humans was well and better predicted based on the estimated system-related PD parameters gathered from Beagle dogs.

5.- Conclusions

In conclusion, a semi-mechanistic population PK/PD model for the testosterone effects elicited by triptorelin administered in sustained released formulations to Beagle dogs has been successfully developed. The results from a model-based translational approach indicate that it is indeed possible to predict human response with a remarkable degree of accuracy, serving as a robust tool in the development process of GnRH agonists

6.- References

[1] Merseburger AS and Hupe MC (2016) An Update on Triptorelin: Current Thinking on Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. Adv Ther 33:1072-1093.

[2] Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F, and European Association of U (2008) EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 53:68-80.

[3] Pagliarulo V, Bracarda S, Eisenberger MA, Mottet N, Schroder FH, Sternberg CN, and Studer UE (2012) Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer. Eur Urol 61:11-25.

[4] Romero E, Velez de Mendizabal N, Cendros JM, Peraire C, Bascompta E, Obach R, and Troconiz IF (2012) Pharmacokinetic/pharmacodynamic model of the testosterone effects of triptorelin administered in sustained release formulations in patients with prostate cancer. J Pharmacol Exp Ther 342:788-798.

Evaluación de la efectividad del tratamiento con daptomicina en pacientes con infección osteoarticular

Teresa GARCÍA MARTÍNEZ [1,2], Victor MANGAS SANJUAN [2,3], Mª Dolores BELLÉS MEDALL[1], Matilde MERINO SANJUAN [2,3], Raul FERRANDO PIQUERES [1,2]

1. Servicio de Farmacia, Hospital General Universitario de Castellón. Castellón de La Plana.
2. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot (Valencia).
3. Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València. Avd. Vicente A. Estellés s/n, 46100, Burjassot,Valencia, Spain.

Email de contacto: victor.mangas@uv.es

1.- Introducción

La daptomicina está autorizada por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de las infecciones complicadas de piel y partes blandas (IPPBc), de la endocarditis infecciosa del lado derecho (EID) debida a *Staphylococcus aureus*, y de la bacteriemia causada por *Staphylococcus aureus* cuando está asociada con EID o IPPBc. La dosis autorizada que se recoge en ficha técnica es de 4 mg/kg en dosis única diaria en IPPBc sin bacteriemia y de 6 mg/kg en dosis única diaria en EID e IPPBc asociadas a bacteriemia. Actualmente se está extendiendo la utilización de dosis mayores, en un rango comprendido entre 8 y 12 mg/kg/día. Los resultados que aportan los ensayos post-comercialización ponen de relieve que la tasa de respuesta clínica superior se obtiene cuando se utiliza una dosis de 10mg/kg, hecho que se justifica por el efecto concentración dependiente de la daptomicina [1-2].

El objetivo de este trabajo es analizar el perfil de utilización de daptomicina en pacientes con infección osteoarticular con el fin de evaluar la relación entre los parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos y la pauta de dosificación utilizada.

2.- Material y métodos

Estudio observacional retrospectivo en el que se incluyeron todos los pacientes del Servicio de Traumatología con monitorización farmacocinética de daptomicina desde junio de 2017 hasta junio de 2018. Las variables fisiopatológicas, bioquímicas y microbiológicas fueron recogidas a partir de la historia clínica. Los tiempos de recogida de muestras (a partir del 4º ciclo de tratamiento) fueron pre-dosis (Cmin) y 30 minutos (Cmax) post-infusión. Las concentraciones plasmáticas del antibiótico fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [3]. Los parámetros farmacocinéticos de daptomicina se estimaron con ayuda del programa PKs®. El parámetro seleccionado para evaluar la efectividad del tratamiento fue el cociente entre el área bajo la curva (AUC) y CMI, cuyo valor objetivo fue mayor a 666. En aquellos pacientes que no se disponía de la CMI para el microorganismo aislado, se utilizó el valor correspondiente a la distribución mayoritaria en el estudio (0,25 mcg/mL en el 57,4% de la población). Con el fin de evaluar el impacto del aclaramiento de creatinina (CLCR) individual (calculado por la ecuación de Cockcroft – Gault) sobre los valores de AUC/CMI, se analizó la relación entre ambos parámetros

3.- Resultados

Se incluyeron 13 pacientes, de ellos 8 hombres, con una mediana de edad de 69 años (rango 47-87). La dosis utilizada estuvo comprendida entre 5,83 y10,71 mg/kg, según la siguiente distribución: <8 mg/kg en 4 pacientes y ≥8 mg/kg en 9 pacientes.

Los microorganismos aislados más frecuentes fueron *Staphylococcus aureus* (n=4) y *Staphylococcus epidermidis* (n=2),

en 7 pacientes no hubo ningún aislado. La CMI de daptomicina de los microorganismos aislados fue 0,25 mcg/mL (n=4) y 0,5 mcg/mL (n=2). Los valores de Cmin variaron desde 0 a 46,16 mcg/mL y los valores de Cmax desde 27-114,97 mcg/mL. En todos los pacientes se superó el valor objetivo del cociente AUC/CMI (666), siendo el valor medio alcanzado 4.196 (1.702-7.821).

Figura 1.

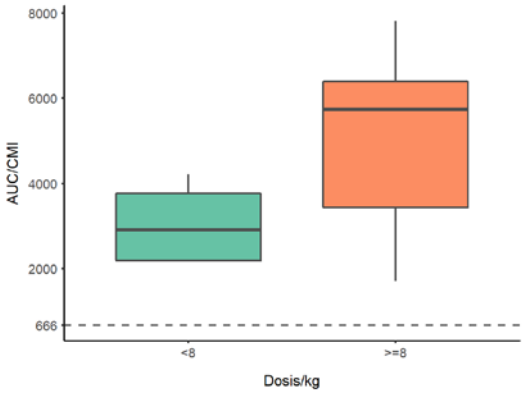
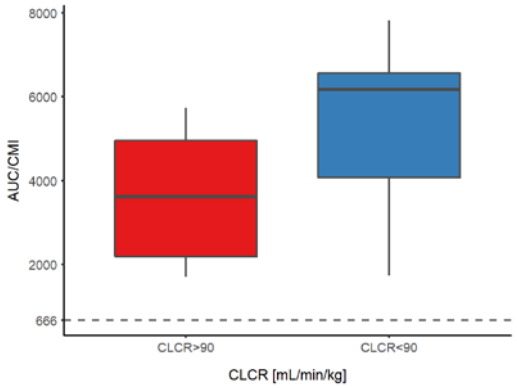


Figura 2.



La caracterización farmacocinética realizada con ayuda del programa PKs® permitió obtener un valor medio de CL en los pacientes reclutados de 0.57 L/h/70 kg (CV=32%). La distribución de valores AUC/CMI en función de los niveles de dosis/kg establecidos (<8 mg/kg y ≥8 mg/kg) está representado en la figura 1, en la que se aprecia que en todos los casos los valores individuales de AUC/CMI fueron superiores al valor objetivo de eficacia previamente establecido (AUC/CMI=666). En la figura 2 se representa la relación entre el aclaramiento de creatinina y el cociente AUC/CMI en la que se observa que una reducción en el aclaramiento de creatinina, incrementando en más de un 50% la exposición al antibiótico.

4.- Discusión

La utilización de daptomicina en el entorno hospitalario muestra que la relación entre la exposición y las características individuales de los pacientes es variable, permitiendo distinguir tendencias que pueden ser relevantes para su análisis farmacocinético. Se observa una elevada variabilidad en los valores de concentraciones plasmáticas de daptomicina, de forma más acusada en valores de dosis superiores a 8 mg/kg. Se podría recomendar una reducción de dosis en pacientes con CLCR<90 mL/min/kg sin alterar la efectividad del tratamiento y mejorar así la eficiencia. Por otro lado, niveles de dosis superiores a 8 mg/kg podrían no resultar justificados, al alcanzar valores de AUC/CMI muy superiores al nivel de eficacia establecido.

5.- Conclusiones

La selección de la dosis de daptomicina más adecuada para conseguir el objetivo terapéutico que señalan las guias clínicas actuales (AUC/CMI=666) debe realizarse a partir de los parámetros farmacocinéticos del antibiótico determinados con ayuda de las concentraciones plasmáticas que se alcanzan en estado de equilibrio estacionario.

6.- Referencias

[1].M. Falcone, A. Russo, MI Cassetta, A Lappa, L. Tritapepe, G. d'Ettorre, S. Fallani, A. Novelli, M. Venditti. J Infect Chemother (4):732- 9 (2013).

[2].Soraluce A, Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Barrasa H, Maynar J, Carcelero E, Soy D, Isla A. Int J Antimicrob Agents. 2018 Aug;52(2):158-165.

[3].C.M. Tobin, J.M. Darville, A.M. Lovering and A.P MacGowan. J Antimicrob Chemother, 46:523-6 (2000).

Control del proceso de mezclado de un sólido pulverulento compuesto por 3 principios activos empleados para el tratamiento de la Tuberculosis.

Javier SUÁREZ-GONZÁLEZ[1,2,3], Ana SANTOVEÑA[2,3], José B. FARIÑA[2,3]

1. Programa Doctorado en Ciencias de la Salud. Universidad de La Laguna, La Laguna. España.
2. Departamento Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, La Laguna. España
3. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, La Laguna. España

Email de contacto: jsrzglz@gmail.com

1.- Introducción

En la industria farmacéutica la calidad por diseño es una herramienta esencial para la optimización de la producción de formas farmacéuticas y el cumplimiento de las especificaciones de calidad requeridas por los organismos internacionales [1]. La identificación, y el control, de los puntos de control críticos del proceso de elaboración asegura unos adecuados atributos críticos de calidad (CQA) del producto final. El índice de capacidad de proceso (CpK) es útil para controlar estos CQA. Parece existir consenso en que, para un determinado proceso, un valor de CpK superior a 1,33 es adecuado para cumplir especificaciones [2].

Este trabajo tiene como objetivo el control del parámetro tiempo en el proceso de mezclado de un sólido pulverulento que contiene 3 principios activos (API) y 7 excipientes. Para poder así, asegurar la homogeneidad en contenido de la mezcla, que será utilizada para elaborar comprimidos para el tratamiento de la tuberculosis.

2.- Material y Método

El solido pulverulento contiene 3 APIs: Isoniazida (Acofarma®), Pirazinamida (Sygma-Aldrich®) y Rifampicina (Fagron®), ver tabla 1. Además, contiene los siguientes excipientes: Ac-Di-Sol® (Crosscarmellose Sodium, FMC Corp.), Avicel® PH102, (Microcrystalline Cellulose, FMC Corp.), Explosol® (Sodium Starch Glycolate, Blanver), Cab-O-Sil® (fumed silica, Cabot CorporaFon), Luzenac® (talc, Imerys Talc) y CompactCel® (Biogrund GmbH).

APIs	% en la mezcla (m/m)	Tamaño de partícula (d (0.9))
Isoniazida	7,1	454 µm
Pirazinamida	22	925 µm
Rifampicina	11	400 µm

Tab. 1: Porcentaje en la mezcla y tamaño de partículas de los API.

Los productos se pesaron e introdujeron en una mezcladora en "V" (FTLMV-0,5, FILTRA® VIBRACIÓN, España) con una capacidad de 0,5 litros y una potencia de mezclado de 0,12 kW. Los parámetros del proceso de mezclado que se mantuvieron fijos fueron: la carga del mezclador, el orden de adición y los tamaños de partícula del sólido. Los tiempos de mezclado fueron 0, 10, 15 y 20 min.

A estos intervalos de tiempo se vació la cubeta de mezclado y se depositó el contenido en un recipiente rectangular. Este se dividió en 5 áreas y se tomó una alícuota de 100 mg de cada una de ellas

Las muestras tomadas fueron analizadas por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC) haciendo uso de un método previamente validado según normas ICH [3-5].

El CpK, ecuación 1, se utilizó para conocer cuando el proceso de mezclado se encuentra bajo control, CpK ≥ 1,33 [2].

(1) $$CpK = min\left(\frac{USL - \mu}{3\sigma}, \frac{\mu - LSL}{3\sigma}\right)$$

Donde μ es la media del contenido de los API entre las diferentes zonas y σ es su desviación estándar. USL y LSL son los límites inferior y superior establecidos como ±15% de la masa media.

Una vez obtenido el tiempo óptimo de mezclado se determina la uniformidad en contenido y el CpK en otros 5 lotes para comprobar dicho tiempo.

3.- Resultados y Discusión

Como se puede observar en la tabla 2, a los 20 minutos de mezclado se obtienen valores de CpK superiores a 1,33 para todos los API.

CpK				
Tiempo (min)	**5**	**10**	**15**	**20**
Isoniazida	0,86	0,93	0,94	1,43
Pirazinamida	4,53	7,22	4,86	3,43
Rifampicina	1,06	0,78	0,68	2,05

Tab. 2: CpK para cada tiempo de muestreo

Como puede observarse la homogeneidad de la pirazinamida en la mezcla se encuentra bajo control desde los 5 minutos. Esto puede estar relacionado con su proporción en la mezcla y su tamaño de partícula (tabla 1).

En la figura 2 se muestra la distribución de los valores de CpK para los 5 nuevos lotes tras haber sido mezclados durante 20 minutos. Para todos los casos se obtienen valores de CpK siempre superiores a 1,33.

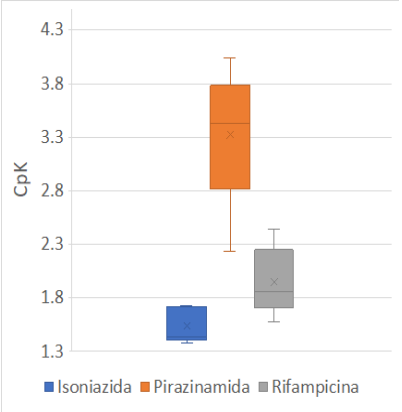


Fig. 2: Distribución Valores CpK (n=5)

4.- Conclusiones

El CpK es una herramienta sencilla y útil para comprobar cuando el proceso de mezclado está bajo control.

Para esta mezcla, se alcanza un CpK ≥ 1,33 a los 20 minutos de mezclado para todos los API. Así, se consigue una distribución homogénea de los mismos a lo largo de las diferentes zonas de muestreo.

El control de este parámetro de proceso es crucial para poder asegurar la homogeneidad en contenido de los comprimidos a elaborar.

5.- Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto ProID2017010094 financiado por el Gobierno de Canarias. Además, se reconoce a la entidad CajaSiete y la Universidad de La Laguna por su contribución con un contrato predoctoral. Los autores agradecen a Biogrund GmbH, IMCD Iberia, Acofarma and DFE Pharma la donación de excipientes.

6.- Referencias

[1] K. Pramod, M. Abu Tahir, N.A. Charoo, S.H. Ansari, J. Ali, Pharmaceutical product development: A quality by design approach, Int. J. Pharm 6(3):129-138 (2016).

[2] United States Pharmacopoeia (USP), USP–NF General Chapter <1080>, in: USP 33, The USP Convention, Rockville, 2007.

[3] ICH Q2(R1). The International Conference on Harmonisation; 2015. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

[4] N. Dao T.-T, D. Guillarme, S. Rudaz, J. Veuthey. Validation of an ultra-fast UPLC-UV method for the separation of antituberculosis tablets. J. Sep. Sci. 31: 1050 – 1056 (2008).

[5] L. Moreno-Exebio, M. Grande-Ortiz. Validación de un método de cromatografía líquida para la determinación de rifampicina en plasma humano. Rev Peru Med Exp Salud Pública 31(1):56-61 (2014).

Gene supression therapy based on RNAi for the inhibition of cell migration and capillary tube formation in corneal cells

Josune TORRECILLA[(1)], Mónica Vicente-Pascual[(1)], Ana del POZO-RODRÍGUEZ[(1)], María Ángeles SOLINÍS[(1)], Alicia RODRÍGUEZ-GASCÓN[(1)]

1. Pharmacokinetics, Nanotechnology and Gene Therapy Group (PharmaNanoGene). Faculty of Pharmacy. Centro de investigación Lascaray ikergunea. University of the Basque Country. UPV/EHU. Vitoria-Gasteiz (Spain)

Contact e-mail: alicia.rodriguez@ehu.eus

1.- Introduction

Herpes simplex virus type I (HSV-1)-induced keratitis (HSK) is a common immunopathological corneal disease characterized by recurrent destructive inflammation and progressive scarring in the corneal stroma. The production of a large amount of tumour necrosis factor-α (TNF-α) has been reported in HSV-infected murine corneas. TNF-α, that disrupts the barrier function of human corneal epithelial (HCE) cells and contributes to ocular inflammation, has been shown to stimulate matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity, implicated in HSK. MMP-9 is one of the primary extracellular matrix remodeling enzymes that participate in the pathologic conditions of the cornea such as infection, dry eye and neovascularization [1].

The aim of this work was to evaluate the effect of a non-viral vector based on lipid nanoparticles containing interfering RNA (RNAi) against MMP-9 on HCE cells previously stimulated with TNF-α, as a therapy to control HSK.

2.- Materials and methods

2.1.- Preparation and characterization of the vector

The vector (DX21) was prepared with solid lipid nanoparticles (SLN) [2], protamine (P), dextran (D), and a plasmid containing a short-hairpin RNA (shRNA) targeted to MMP-9. It presented a particle size of 190 nm and surface charge of +45 mV.

2.2.- Silencing of MMP-9 in HCE cells

HCE-2 cells were stimulated with TNF-α (10 ng/ml) overnight before transfection [3]. Intracellular MMP-9 was detected by immunocytochemistry (cells were immunostained with goat monoclonal anti-MMP-9 antibody and Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-goat IgG as primary and secondary antibodies, respectively). MMP-9 levels in the culture medium was measured by ELISA 72 h post-transfection. Cell viability was measured by flow cytometry.

2.3. Cell migration

TNF-α stimulated HCE-2 cells were grown to confluence in 24-well plates, and a linear wound was made with a 1000 µL tip [4]. Subsequently, cells were treated with the vector DX21. Cell morphology and proliferation were analyzed 48 h later by optical microscopy. The wound width was measured and the cell migration rates were calculated.

2.4.- Capillary tube formation assay

For this study, a human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) was used. Cells were seeded onto Geltrex in a 96-well plate with the culture medium from the HCE-2 cells non-stimulated, stimulated with TNF-α , and stimulated with TNF-α and transfected with the vector DX21. After 15 h, cells were observed by microscopy to detect the formation of tube-like structures.

3.- Results

Figure 1 features the intracellular MMP-9 (stained in red) in the HCE-2 cells.

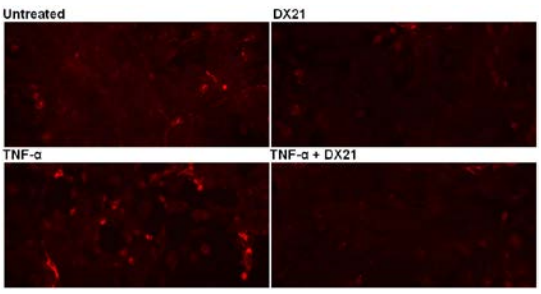


Figure 1. Immunofluorescence staining of MMP-9 (red) in the HEC-2 cells.

At it is shown, the stimulation of the cells with TNF-α increases the levels of MMP-9; however, the addition to the cells of the vector containing the shRNA against MMP-9

notably decreases the level of the matrix metalloproteinase.

Figure 2 shows the levels of MMP-9 secreted to the culture medium of HCE-2 cells non-stimulated, stimulated with TNF-α, and stimulated with TNF-α and treated with DX21. Seventy-two hours after transfection, a reduction in the levels of MMP-9 secreted to the culture medium was already detected.

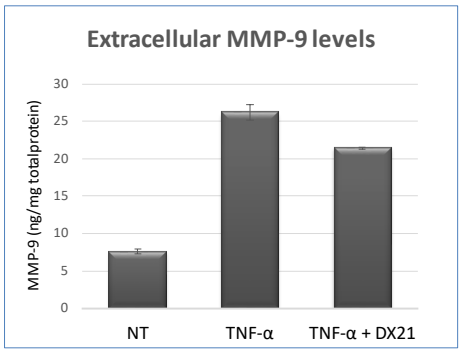


Figure 2. Levels of MMP-9 secreted to the culture medium of HCE-2 cells. NT: non-stimulated cells.

Cell viability was always higher than 90%.

Figure 3 shows that DX21 reduced the migration of TNF-α stimulated HCE-2 cells.

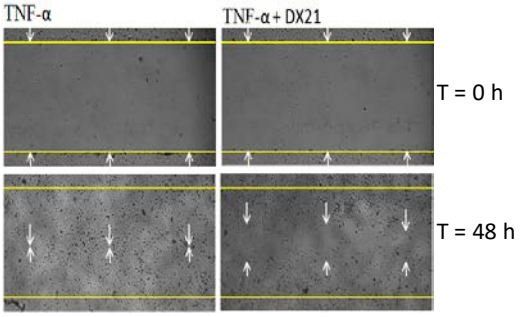


Figure 3. Effect of DX21 on HCE-2 cell migration. Phase contrast images (4x). Arrows indicate the edge of the wounds.

In the figure 4, it can be observed the inhibition of tube formation of HUVEC cells supplemented with the culture medium from the HCE-2 cells, whose MMP-9 levels were conditioned by the treatment with DX21, TNF-α or with both.

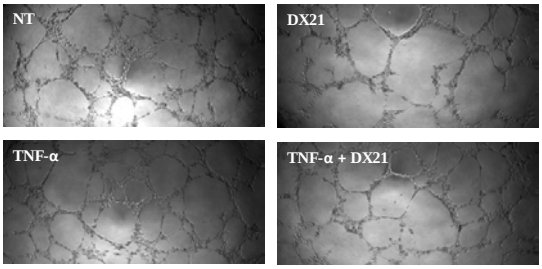


Figure 4. Inhibition of tube formation in HUVEC cells treated with the conditioned culture medium of HCE-2 cells treated with DX21, TNF-α or with both. NT: non-treated.

4.- Discussion

Chronic corneal inflammation associated to infection with HSV involves infiltration of cells, edema, neovascularization and scarring, resulting in vision impairment and blindness. In this work we show the potential of lipid nanoparticles to downregulate the MMP-9 activity in a HCE-2 cell inflamation model by supression gene therapy based on RNAi technology. We have shown that TNF-α, a proinflammatory mediator, increased the levels of this matrix metalloproteinase, and therefore, it was a good model to evaluate the effect of our vector. Our results show that DX21 was able to transfect and to silence the MMP-9 protein, and this reduction lead to a decrease of functionality (cell migration and tube formation).

5.- Conclusions

This study demonstrates the ability of DX21 to downregulate the MMP-9 activity (cell migration and angiogenesis) in HCE-2 cells. This vector could be used as a therapeutic strategy based on gene supression to treat the inflammation due to HSK.

6.- Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-53092-R) and by the UPV/EHU (PPG17/65, GIU17/32). J Torrecilla thanks UPV/EHU for her research grant.

7.- References

[1] S. Lee et al. J. Clin. Invest, 110, 1105, 2002.
[2] J. Torrecilla et al. Colloids Surf B Biointerfaces. 146, 808, 2016.
[3] S. Swamynathan et al. Exp. Eye Res, 164, 118-128, 2017.
[4] H. Jinhai et al. Colloids Surf B Biointerfaces, 159, 241-250, 2017.

Chitosan matrices to improve the antibiotic loaded into bone cement treatment

Javier MARTÍNEZ-MORENO [(1)], Amparo NACHER [(1,2)], Virginia MERINO [(1,2)], Matilde MERINO-SANJUÁN [(1,2)].

1. Departament de Farmacia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de Valencia Avda Vicente Andrés Estelles s/n, 46100 Burjassot (Valencia).
2. Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València.

Email de contacto: matilde.merino@uv.es

1.- Background information

Development of a pharmaceutical dosage form that would provide an initial high rate of delivery of the antibiotic after surgery would be helpful for the prophylaxis and treatment of superficial infections related with arthroplasties [1].

2.- Purpose

Evaluate the ciprofloxacin and gentamicin elution from systems based on chitosan and chitosan added with gelatin. Ultimately, film or semisolid hydrogel formulations with chitosan and tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium chloride (THPC) were evaluated as delivery systems and their cytocompatibility and bioactivity were analyzed.

3.- Method

For this proposal, in vitro study of various formulations (films and semisolid hydrogels) containing chitosan alone (2%) or in combination with gelatin (6%) or THPC in different proportions (12% for films and 12%, 24% or 36% for hydrogel) were prepared. Moreover, different antibiotic doses were assayed (0.5mg/cm^2, 1mg/cm^2 and 2mg/cm^2). Apart from antibiotics release, the bioactivity exercise and the cytocompatibility was analyzed for the formulations that provided the best elution kinetics [2,3].

4.- Results

All samples containing chitosan or chitosan-gelatin released ciprofloxacin or gentamicin at very high rates. Samples containing ciprofloxacin into THPC-chitosan showed a biphasic release during the 6 days delivery assay. The amount of ciprofloxacin released at 6 days from THPC-chitosan films containing 12% of THPC was 1.78 mg, 2.59 mg and 3.18 mg for antibiotic loaded at 0.5 mg/cm^2, 1 mg/cm^2, and 2 mg/cm^2, respectively. On the other hand, from the hydrogel containing 2mg/cm^2 of ciprofloxacin, the percentage of ciprofloxacin released was 63.26%, 46.47% and 29.50% for 12%-THPC, 24%-THPC and 36%-THPC, respectively.

Figure 1 shows the results of bioactivity exercise; the antibiotic concentration decreased until 72 hours, at which point the redon was removed. Nevertheless, after this time point, concentrations would be above MIC of *E. Coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* in 100% of patients ensuring adequate effectiveness.

Finally, the viability of mouse fibroblasts compared with the control indicates that the

concentration of 12% THPC when used at a 1/10 dilution in the medium did not cause cytotoxicity in NIH3T3 mouse fibroblasts after 48 hours of assay.

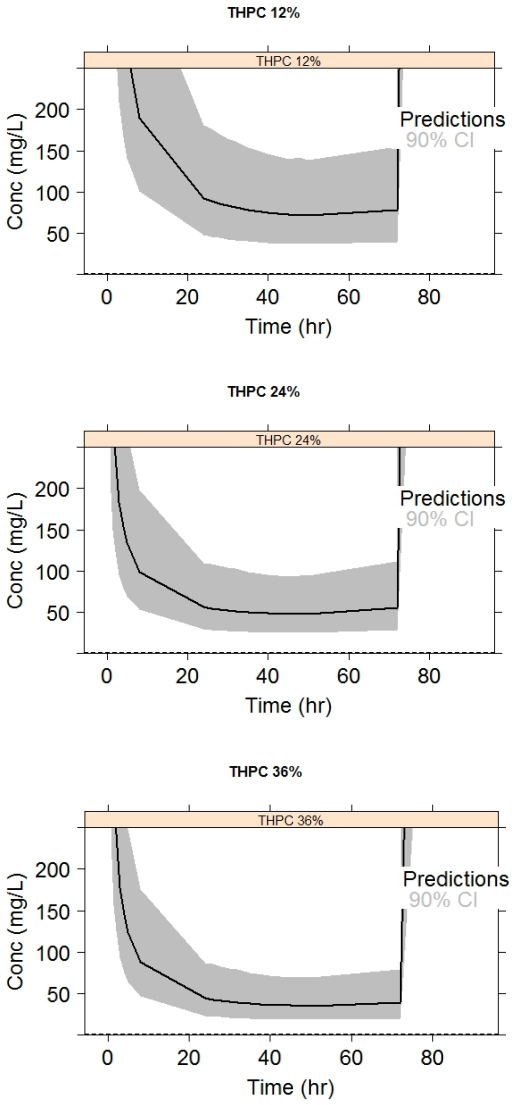


Fig. 1: Concentration of ciprofloxacin simulated in joint space. THPC: tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium chloride

5.- Conclusion

THPC is suitable as crosslinker for chitosan when ciprofloxacin is incorporated showing a sustained release during 6 days. The release system of 12%-THPC-chitosan with 2mg/cm^2 of ciprofloxacin showed that 100% of patient would be covered during 72 hours post-surgery. The concentration of 12%-THPC did not show cytotoxicity in NIH3T3 mouse fibroblasts after 48 hours of assay.

6.- Referencias

[1] Wang J, Zhu C, Cheng T, Peng X, Zhang W, Qin H, et al. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. PLoS One. 2013;8(12):e82745.

[2] Kutlusoy T, Oktay B, Apohan NK, Suleymanoglu M, Kuruca SE. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering. International journal of biological macromolecules. 2017;103:366-78.

[3] Martinez-Moreno J, Merino V, Nacher A, Rodrigo JL, Bonet Yuste BB, Merino-Sanjuan M. Bioactivity of Ceftazidime and Fluconazole Included in Polymethyl Methacrylate Bone Cement for Use in Arthroplasty. J Arthroplasty. 2017.

First steps in the development of a new radioprotective cream

Ana Melero [(1)], Juan José Carreras[(1)], Antonio Guillot[(1)], Teresa Garrigues[(1)], Alegría Montoro[(2,4)], Natividad Sebastiá[(2,4)], Pérez Del Caz MD[(5)], Juan Ignacio Villaescusa[(2,4)], Jose Miguel Soriano[(6)].

1. Departament of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. Avenue Vicent Andrés Estellés S/N, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.
2. Radiation Protection Service, University and Polytechnic Hospital La Fe. Avenue Fernando Abril Martorell, 106, 46026, Valencia, Spain.
3. La Fe Health Research Institute. Avenue Fernando Abril Martorell, 106, 46026, Valencia, Spain.
4. Medical Imaging Department and Biomedical Imaging Research Group (GIBI230), La Fe Polytechnics and University Hospital and Health Research Institute. Avenue Fernando Abril Martorell, 106, 46026, Valencia, Spain.
5. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, La Fe Hospital. Avenue Fernando Abril Martorell, 106, 46026, Valencia, Spain.
6. Department of Nutrition and Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. Avenue Vicent Andrés Estellés S/N, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

Contact email: ana.melero@uv.es

1.- Introducction

1.1.- Risks associated with the use of ionizing radiations

Although the results of ionizing radiations are positive for the treatment and diagnosis of some diseases, they are nt exent of risks for the health of patients [1]. For example, skin lesions (radiodermatitis or desquamative procedures) are a very common side effect of radiotherapy, which can cause the interruption of the treatments. In particular, skin lesions are caused by the directs and indirect (stress oxidative) effects that ionizing radiations has over the DNA.

1.2.- Current treatments to avoid radioinduced injueries

Several studies have been conducted with the objective of avoid the radioinduced damage. These studies conclude that the topical approach is a interesting way to prevent and heal skin lesions.

1.3.- Potential novel drugs to avoid radioinduced injueries

1.3.1.- Superoxide-dismutase

Superoxide-dismutase catalyzes the conversión of the superoxide radical, one of the most damaging reactive species of oxygen for skin cells [1].

1.3.2.- Resveratrol

Resveratrol is a polyphenol which has shown antioxidant properties and can induce the internal production of Superoxide-dismutase [2].

1.3.3.- Curcumin

Curcumin could be used to neutralize the radiation that hurt the skin cells [3].

1.3.- Objetives

The main aim of this first step of investigation was develop a radioprotective potential preventing or curative properties against the radioinduced damage. For this, drug reléase, absorption profile and accumulation in the diffrent skin layers of the formulated drugs have been evaluated.

2.- Materials and methods

2.1.- Materials

SOD was delivered purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), curcumin from Acros Organics (Geel, Belgium) and Resveratrol from Fluorochem (Hadfield, United Kingdom). Human abdominal skin of women aged between 20 to 55 years, was donated by the Hospital La Fe (Valencia, Spain), after previous signed consent of patients. Pig ears were obtained from a local slaughter house (Teruel, Spain)

2.2.- Methods

2.2.1.- Preparation of radioprotective product

First, the actives products ingredients were pulverized and mixed. Later the emulsion base W/O is added. All components are mixed until until getting the homogenization of the product.

2.2.2.- Release and permeability studies

Franz cells were used to study the reléase of the cream compounds and the absorption of curcumin and resveratrol. All test were performed under skin conditions. The receptor compartment was filled with phospate buffer p.H 7.4.

2.2.3.- Tape-stripping and differential-stripping

Tape-stripping [4] and differential stripping [5] was used to determine the amount of resveratrol and curcumin in the different skin layers and hair follicles.

3.- Results and discusión

3.1.- Permeabilty studies

The reléase of curcumin is approximately 30% and resveratrol 60% at 24 hours.

3.2.- Release studies

The first-order kinetic is the kinetic that provide the best fit of the resveratrol and curcumin reléase data.

3.3.- Tape-stripping and differential-stripping

Figures 1-2 present the nanograms of curcumin and resveratrol extracted from the skin layers and hair follicles. The resveratrol is distributed within the deeper skin layers. The curcumin is preferably distributed within the most superficial layers of skin.

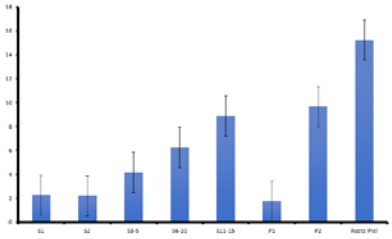


Figure 1: Nanograms of resveratrol in each skin layers

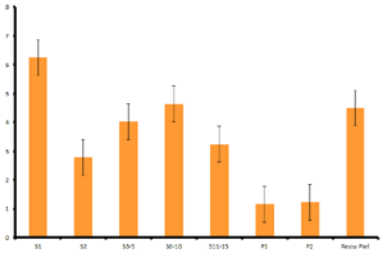


Figure 2: Nanograms of curcumin in each skin layers

4.- Conclusions

The cream has potential efficacy. Superoxide dismutase stays in the most superficial layer of skin due to its enormous size (32.5 kDa). Resveratrol diffuses well and is quickly released from the cream so it reaches to the deep layers of skin. Curcumin is released more slowly from the cream and permeating only in the most external layers of the skin.

5.- References

[1] Treiber N, et al. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. Dermatoendocrinol. 2012; 1;4(3):232–5.

[2] Sebastià N, et al. Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: an in vitro evaluation. Food ChemToxicol. 2013; 51:391–5.

[3] Sebastià N., et al. Assessment in vitro of radioprotective efficacy of curcumin and resveratrol. Radiation Measurements, 2011; 46 (9). 962-966.

[4] Peppelman M, Van der Eijnde WAJ, Jaspers EJ, Gerritsen M, Van Erp P. Combining tape stripping and non-invasive reflectance confocal microscopy: an in vivo model to study skin damage. Skin Res Technol. 2015; 21: 474-484.

[5] Raber AS, Mittal A, Schäfer J, Bakowsky U, Reichrath J, Vogt T, et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. J Control Release. 2014; 179: 25-32.

Use of cubosomes to improve topical administration of naproxen

Teresa Garrigues [(1)], Ana Melero [(1)], Antonio Guillot[(1)], Juan José Carreras [(1)]

1. Departament of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. Avenue Vicent Andrés Estellés S/N, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

Contact email: teresa.garrigues@uv.es

1.- Introduction

1.1.- Targeting

The principal objective of targeting is reduce the toxicity of drugs as much as posible and increase the effectiveness of treatments. Therefore, one of strategies most used to achieve a selective release of drugs in a specific target is the use of vehicles, such as nanoparticles. [1].

1.2.- Cubosomas

Cubosomes are a structured nanoparticles with a size ranging between 10 and 500 nanometers. These vehicles hava a interesting advantages over other nanoparticles [2].

2.- Materiales and methodos

2.1.- Materials

Table 1 presents all materials used for the preparation of cubosomes

	Provider	Description
Glycerin 1-monooleate 95% (GMO)	*Carbosynth Limited*	MW: 356.54g/mol
HI-CAP 100 Starch	*INGREDION UK limited*	E1450
Poloxamer P407 (PPO 407)	*SIGMA-ALDRICH*	ph: 5.0-7.5
MiliQ Water	–	Resistivity>18MΩ·cm. Total organic content (TOC)<10ppb
Phospholipon 90G®	*Lipoid*	Phosphatidylcholine purified from soy lecithin. T_m<45ºC. MW:758.07g/mol
Cholesterol	*Acofarma*	White crystalline powder.PM: 386.67g/mol
Chloroform	*LiChrosolv-Merk*	MW: 119.38g/mol
Methanol	*BHD Prolabo*	HPLC Grade. MW:32.04g/ mol
Acetonitrilo	*BHD Prolabo*	HPLC Grade. MW:41.05g/ mol
(-)-Naproxen sodium salt	*SIGMA-ALDRICH*	MW: 230.26g/mol
Caffeine	*Fluka Analytical*	MW: 180.16g/mol
NaH_2PO_4	*Scharlau*	MW:120g/mol
HNa_2PO_4	*Scharlau*	MW: 141.96g/mol
KH_2PO_4	*Scharlau*	MW: 136.09g/mol

Table. 1: Materials used for the preparation of cubosomes.

2.2.- Métodos

2.2.1.- Cubosomes production

Cubosomes were prepared following three different methods previously published:

- Pseudodispersion system (PS) [3]
- High Performance Dispersión (HPD) [4]
- Dry Powder Precursor (DPP)[5]

2.2.2.- Analitical method

The samples were analyzed by HPLC using a previously published method [7].

2.2.3.- Caracterización de las nanopartículas

Characterization of cubosomes was performed by determining the size, Z potential, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE) and drug release.

2.3.- Objetives

The main aim of this work is optimize the production of naproxen cubosomes (a non-steroidal antiinflamatory drug with analgesic properties) and evaluate their capacity to improve the absorption of naproxen through the skin.

3.- Results and discussion

3.1.- Size, PDI and Z potential.

The method that provides a better Z potential and size is the PS method. Although the FPP method has a lower value of PDI tan the PS method, both PDI values are optimal (Tables 2-3).

Fomulation	MD (nm)	Mean±SD	PDI	Mean±SD
PS	195.9		0.223	
	200.5	197.8±2.4	0.214	0.23±0.01
	197		0.237	
HPD	250		0.39	
	255.4	250.9±4.1	0.518	0.46±0.07
	247.4		0.472	
DPP	389.1		0.109	
	373.7	375.4±12.9	0.23	0.18±0.06
	363.3		0.208	

Table 2: Size and PDI of formulated cubosomes. SD: Standard desviation; MD: Diameter of the particle.

Fomulation	ZP (mV)	Mean±SD
PS	-18.1	
	-18.3	-18.33±0.25
	-18.6	
HPD	-4.95	
	-4.84	-4.85±0.09
	-477	
DPP	-11.4	
	-13.1	-12.17±0.86
	-12	

Table 3: Z potential values of cubosomes obtainde by the three production methods.

3.2.- Entrapment efficiency (EE)

The EE, calculated as described in equation 1, was 26.93(±0.79)%.

$$Equation\ 1.\ EE = \frac{Actual\ yield}{Theoretical\ yield} \cdot 100$$

3.3.- Release studies

Release studies show the controlled release of naproxen formulated in cubosomes. Figure 1 presents the release data of naproxen from cubosomes in solution. Cubosomes are able to control the release following a first-order kinetic.

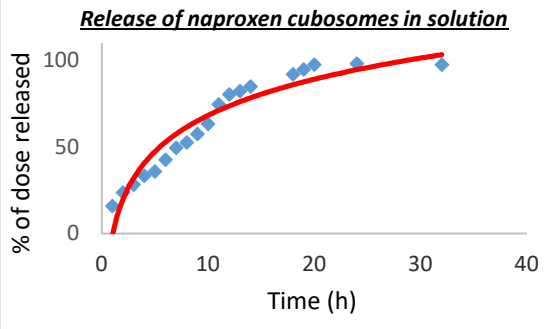


Fig 1: Release of naproxen from cubosomes in solution.

In addition, use of a hydrogel prepared with hydroxypropylmethylcellulose improves the control of the release. In particular, increase the period of release four hours and achieves a more gradual release.

4.- Conclusions

Cubosomes are a promising nanoparticle for drug delivery and targeting with a simple production method, but their production should be optimized to improve the entrapment efficiency.

5.- References

[1] Roberts M, Mohammed Y, Pastore M, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A, et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. Journal of Controlled Release 2017 Feb 10;247: 86-105.

[3] Bhosale RR, Ali Osmani R, Harkare BR, Ghodake PP. Cubosomes: The Inimitable Nanoparticulate Drug Carriers. Scholars Academic Journal of Pharmacy 2013;2(6): 481-486.

[4] Tilekar K, Khade P, Kakade S, Kotwal S, Patil R. Cubosomes-A drug delivery system. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences 2014;4(4): 812-824.

[5] Peng X, Zhou Y, Han K, Qin L, Dian L, Li G, et al. Characterization of cubosomes as targeted and sustained transdermal delivery system for capsaicin. Drug design, development and therapy 2015;9: 4209-4218.

[6] Spicer PT. Progress in liquid crystalline dispersions: cubosomes. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2005;10(5): 274-279

[7] Kokate A, Li X, Jasti B. Effect of Drug Lipophilicity and Ionization on Permeability Across the Buccal Mucosa: A Technical Note. AAPS PharmSciTech 2008 Jun;9(2): 501-504.

Proyecto piloto para implantar la determinación de ácido valproico libre

Angel Luis SALCEDO MINGOARRANZ [(1)], Emilia BARCIA HERNÁNDEZ [(2)], Silvia PEÑA CABIA [(1)], Benito GARCÍA DÍAZ [(1)]

1. Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Severo Ochoa, Avenida Orellana s/n.
2. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n.

Email de contacto: als.29@hotmail.com

1.- Introducción

Proyecto piloto justificativo para la implantación de la técnica analítica de determinación de ácido valproico (AV) libre en un hospital universitario de 400 camas. Con este proyecto se persigue aumentar la rapidez en la obtención de la concentración libre de AV para la optimización del tratamiento farmacológico en pacientes concretos: aquellos con albúmina inferior a 3 g/dL, puntuación de Child-Pugh ≥ 2, aclaramiento de creatinina inferior a 30 mL/min o mayores de 80 años.

2.- Materiales y métodos

Se diseñó un estudio descriptivo prospectivo de 4 meses de duración (enero-abril de 2018), cuya población fueron los pacientes ingresados en un Hospital General Universitario de 400 camas. Se incluyeron pacientes en tratamiento con AV y albúmina inferior a 3 g/dL, por ser el factor responsable de la relación no lineal entre la concentración de AV total y libre. Para estos pacientes se solicitó la determinación de AV libre a un laboratorio externo al hospital. Los datos recopilados fueron: concentración plasmática de AV total y libre, albúmina, edad, creatinina sérica y servicio clínico responsable.

2.1.- Circuito y etapas

Actualmente, para la determinación de la concentración de AV libre, la muestra se envía a un laboratorio externo. El tiempo de demora entre la petición y la recepción del resultado tiene una media de 6 días hábiles. Por ello, se contactó con el Servicio de Análisis Clínicos del hospital para plantear la necesidad, conocer la factibilidad de implantación de la técnica y proponer el desarrollo del estudio piloto.

2.2.- Implantación

Durante 4 meses se realizó la solicitud para la determinación de AV libre en los pacientes incluidos en el estudio. El intervalo terapéutico del AV total es de 50-100 mg/L y del AV libre, con la técnica empleada, es de 5-20 mg/L.

3.- Resultados y discusión

Se incluyeron 13 pacientes: 7 (53,8 %) mujeres y 6 (46,2 %) hombres, con una media de edad de 62,3 años (31-83 años), una media de albúmina de 2,5 g/dL y una creatinina sérica media de 0,7 mg/dL. Seis pacientes pertenecían al Servicio de Medicina Interna, 4 al Servicio de Geriatría, 2 a Urgencias generales y 1 a Medicina intensiva. Debido a problemas en la extracción de la muestra, de las 13 peticiones de AV libre sólo se recibieron 7 resultados (53,8%). Seis de los siete pacientes (85,7%) presentaron un nivel infraterapéutico de AV total, pero niveles normoterapéuticos de AV libre; por el contrario, el único paciente con un nivel dentro del intervalo terapéutico de AV total presentó un nivel supraterapéutico de AV libre. La principal limitación del proyecto lo constituye la coordinación con enfermería para la extracción y envío de la muestra de sangre al laboratorio.

4.- Conclusiones

Para la implantación de la determinación de AV libre se precisa de filtros específicos. La instauración de esta prestación supone una reducción en el tiempo de obtención de resultados analíticos, lo que redunda en una mejor atención al paciente ingresado. El objetivo final es la determinación de AV libre, dentro del propio hospital, en los siguientes grupos de pacientes: aquellos con albúmina inferior a 3 g/dL, puntuación de Child-Pugh ≥2, aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min o mayores de 80 años, para garantizar una adecuada interpretación y utilización de los datos de concentraciones de AV tanto total como libre.

5.- Referencias

[1] E. Wallenburg, B. Klok, K. de Jong, M. de Maat, N. van Erp, S. Stalpers-Konijnenburg, G. Essink, M. van Luin. Monitoring Protein-Unbound valproic acid serum concentrations in clinical practice. Therapeutic Drug Monitoring, 39, 3, 269-272, 2017.

[2] G. Zaccara, A. Messori, F. Moroni. Clinical Pharmacokinetics of valproic acid. Clinical Pharmacokinetics, 15, 367-389, 1988.

[3] M. de Maat, H. J. van Leeuwen. P. M. Edelbroek. High unbound fraction of valproic acid in a hypoalbuminemic critically ill patient on renal replacement therapy. Annals of Pharmacotherapy, 45, e18, 2011.

[4] H. G. Gibbs, D. E. Zimmerman, K. M. Shermock. Comparison of free fraction serum valproic acid concentrations between inpatients and outpatients. American Journal of Health-System Pharmacy, 72, 121-126, 2015.

Cuantificación de morin hidrato formulado en nanopartículas poliméricas.

M. ALONSO GONZÁLEZ, E. BARCIA, M. CÓRDOBA, D. CÓRDOBA, A. FERNÁNDEZ CARBALLIDO.

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

Email de contacto: marioalonsogonzalez@ucm.es

1.- Introducción

El morin es un flavonoide que, por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria puede ser utilizado para el tratamiento de distintas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer [1][2]. No obstante, debido a sus características fisicoquímicas no atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica.

Para facilitar el paso del principio activo a sistema nervioso central, en este trabajo se desarrollan nanopartículas poliméricas cargados con el flavonoide por medio de dos métodos distintos: nanoprecipitación (F1) y evaporación del solvente (F2).

Con el fin de cuantificar la cantidad de morin encapsulada en las formulaciones F1 y F2 se ha puesto a punto y validado un método de detección y cuantificación por HPLC. Para la validación de dicho método se tuvieron en cuenta los criterios de linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad. Además, se realizó un ensayo de estabilidad del principio activo.

2.- Material y métodos:

2.1.- Reactivos:

El morin hidrato fue adquirido de Sigma Aldrich (España). Los demás reactivos empleados en los ensayos fueron proporcionados por Fisher Scientific (España). Toda el agua empleada fue purificada con un equipo de filtración Milli-Q (Millipore, EEUU).

2.2.- Equipos:

El equipo detector empleado fue un HPCL Jasco (Japón) equipado con una bomba PU-2080, un desgasificador LG-2080-54, un autosampler AS-2050-plus y un detector UV/Vis UV-2070 plus.

La columna empleada fue una Gemini® 5µm NX-C18 110 Å (tamaño de la columna: 250 x 4,6 mm) (Phenomenex®, EEUU).

2.3.- Método de cuantificación:

El método utiliza una fase móvil de acetonitrilo-agua, en proporciones 27:73. El pH se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico, el flujo fue de 1,4 ml min^{-1} y la columna se mantuvo a una temperatura de 40 ºC, con una λ de detección de 256 nm. Con el fin de aumentar la sensibilidad y precisión del método, las muestras de flavonoide fueron previamente tratadas con HCl 0,1 N durante 20 minutos antes de su cuantificación.

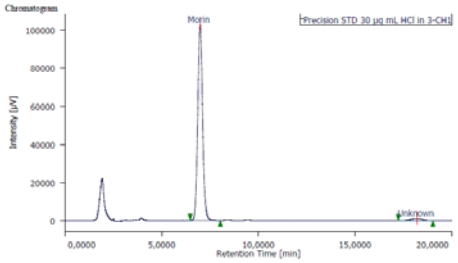


Fig. 1:Cromatograma de morin (30µg ml^{-1}).

2.4.- Validación:

Para la validación del método se tuvieron en cuenta las directrices marcadas por la Internacional Conference on Harmonization (ICH). Los resultados fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) para asegurar la validez del método. Con este fin se estudió la linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad del mismo.

2.5.- Preparación de las nanopartículas de morin:

El polímero empleado en la formación de las nanopartículas fue el resómero PLGA RG 502 (Evonik, Alemania).

En ambas formulaciones se empleó 1mg de morin hidrato en su elaboración.

2.5.1.- Nanoprecipitación:

La formulación F1 fue elaborada con 50 mg de polímero y el principio activo, disueltos en acetona (4 ml), adicionado gota a gota sobre PVA al 1% y bajo agitación controlada.

2.5.2.- Evaporación del solvente:

La formulación F2 se preparó con 50 mg de polímero y el principio activo, mediante la formación de una emulsión O/A y posterior evaporación y extracción del solvente orgánico (CH_2Cl_2).

2.6.-Ensayo de encapsulación:

Para este ensayo se tomaron 10 mg de muestras de cada una de las formulaciones de nanopartículas de morin (F1 y F2), que se disolvieron en 1 ml de CH_2Cl_2, respectivamente. Tras asegurar la disolución del polímero que conforma las nanopartículas se procedió a su precipitación mediante la adición de 4 ml de metanol. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante, que se trata con HCl durante 20 minutos. A continuación, se analizan las muestras por el método de HPLC antes descrito.

3.- Resultados y discusión:

3.1.- Linealidad:

Para demostrar la linealidad del método en el rango de concentraciones entre 1 y 30 µg ml^{-1} se realizaron 3 rectas de calibración en 3 días diferentes. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA. El test mostró que existía linealidad para $p < 0,05$. Se han calculado los coeficientes de correlación, que fueron >0,99.

3.2.-Precisión:

Se determinó la precisión del método en el mismo día y en días diferentes. Para ello, se cuantificaron 3 concentraciones 5 veces cada una durante 3 días. Se calculó el coeficiente de variación (CV) entre los mismos, resultando en todos los casos ser <5%.

3.3.-Exactitud:

La exactitud del método se determinó por medio del cálculo del porcentaje de recuperación de 3 concentraciones ensayadas 3 veces cada una y calculando el CV entre ellas. En todos los casos fue < 3,6%, lo que confirma la exactitud del método.

3.4.-Eficacia de encapsulación:

La formulación F1 presentó una eficacia de encapsulación media de 35,57±12,69 % y la F2 de 72,21±11,97 %.

A partir de e estos resultados se determina que el método de evaporación del solvente es más adecuado que el de nanoprecipitación para la preparación de nanopartículas cargadas con el flavonoide morin.

4.- Agradecimientos:

Grupo de investigación “Administración Parenteral de Medicamentos” de la UCM (Grupo 910939).

5.- Referencias

[1] Mohammad S Ola et al. Flavonoid, morin inhibits oxidative stress, inflammation and enhances neurotrophic support in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Neurol Sci 35: 1003-1008, 2014.

[2] Ying Du et all. Morin reverses neuropathological and cognitive impairments in APPswe/PS1dE9 mice by targeting multiple pathogenic mechanism. Neuropharmacology. 108: 1-13, 2016.

Human hair follicle-derived MSCs slow down proliferation of PBMCs and induce M1-to-M2 phenotypical change in macrophages *in vitro*

Beatriz HERNAEZ-ESTRADA[(1)], Marian MARTINEZ DE PANCORBO[(2)], Jose Luis PEDRAZ[(1,3)], Manoli IGARTUA[(1,3)], Edorta SANTOS-VIZCAINO[(1,3)], Rosa Maria HERNANDEZ[(1,3)]

1. NanoBioCel Group, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Spain

2.BIOMICS Res. Group, University of the Basque Country (UPV/EHU),VitoriaGasteiz, Spain

3.Biomedical Research Networking (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Spain

Email de contacto: edorta.santos@ehu.eus

1.- Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-hematopoietic cells with multipotent features and self-renewal capacity. There can also be found in a variety of different adult and neonatal tissues. The isolation method used for each type of MSCs differ from each other. Generally, these techniques are quite invasive and painful for the patient and infections after the procedure are not uncommon [1]. Despite of their origin, one main property of MSCs is immunomodulation. This is related to the ability of these cells to suppress proliferation of different immune cells and to modulate differentiation of pro-inflammatory macrophages (M1) toward anti-inflammatory macrophages (M2) [2].

As most experiments regarding immunomodulation in humans are performed using bone marrow and adipose tissue-derived MSCs, in this study we intended to assess the immunomodulatory capacity of a lesser-known hair follicle-derived MSCs (HF-MSC). The main advantage of HF-MSCs is the noninvasive procedure for their isolation.

Thus, in this work, our aim was to study the immunomodulatory properties of HF-MSC focusing on their capability to slow down the proliferation rate of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and on their ability to induce M1-to-M2 macrophage switch. In addition, we sought to determine whether or not the HF-MSC pretreatment with IFN_{γ} is necessary to promote the immunomodulatory effect of these cells.

2.- Materials and Method

CFSE-based Proliferation assay: Immune inhibitory function was assessed by HF-MSC capacity to suppress 2.5µg/ml Concanavalina A stimulated PBMCs activation and proliferation by a 5,6-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE)-based proliferation assay (Thermo Fisher). PBMCs were stimulated in the absence or presence of HF-MSCs without or with an IFN_{γ} pretreatment (100ng/ml) at PBMC: MSC different ratios. CFSE intensity was determined using a MACSQuant 10 (Miltenyi Biotech) and FlowJo 10.5.0 Software (TreeStar Inc., USA) to monitor proliferation.

Macrophage HF-MSCs coculture experiment: Isolation of monocytes from PBMCs were performed by using $CD14^{+}$isolation kit (Miltenyi Biotec). Monocytes were differentiated into macrophages with 100ng/ml human M-CSF (Miltenyi Biotec). Macrophages were polarized in M1 macrophages by 120ng/ml of IFN_{g} and 10ng/ml of LPS (Sigma-Aldrich). Macrophages were polarized in M2 macrophages by 2µl/ml IL-4 (Prepotech). After M1 differentiation, HF-MSCs were cocultured with M1 at PBMC/MSC ratio of 1:1. Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR assays were performed. Human TaqMan primers (Applied Biosistem) for M1 identification were IDO and CXCL11 and for M2 CCL13 and MRC1 [3] S18 primer was used as housekeeping gene (IDT).

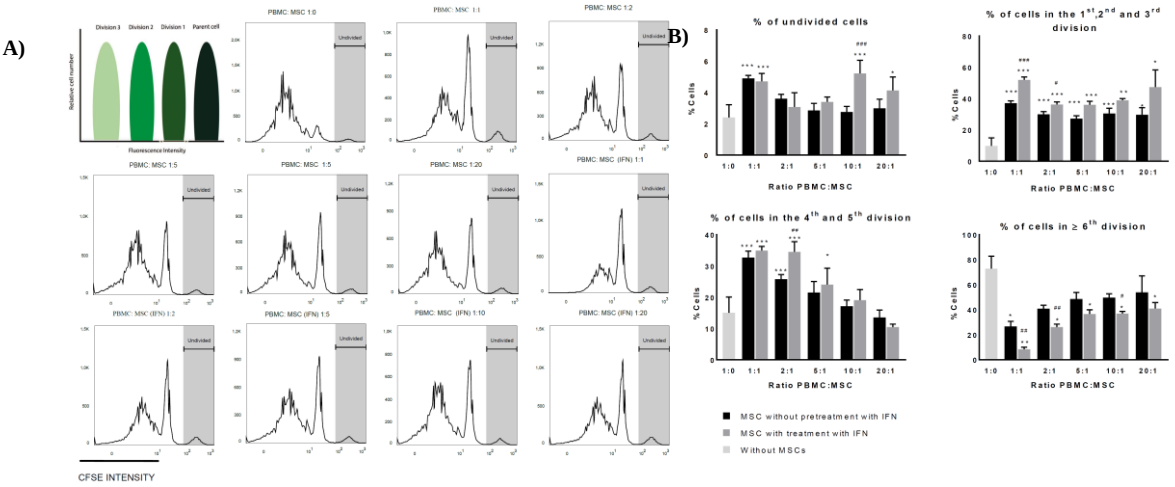


Fig 1: Generational tracing of human PBMCs with or without coculture with HF-MSC using CFSE reagent. A) Principle of cell division tracking by flow cytometry using CFSE. Histogram plots of CFSE fluorescence of PBMCs after 5 days cultured. B) Each graphic shows the percentage of cells that are in a certain division. Statistical significance: *p<.05 **p<.01 and ***p<.001 when comparing with control. #p<.05 ##p<.01 and ###p<.001 when comparing with the same ratio but without IFN pretreatment.

3.- Results and Discussion

The PBMCs stimulation by ConA was inhibited by HF-MSCs in a dose-dependent manner. Analysis of the percentage of proliferated cells for each division showed an increased number of undivided cells and cells until fifth division when cells were cocultured with HF-MSCs. Similarly, a decreased number of cells was observed in more than 6th division when cells were cocultured with HF- MSCs. Pretreatment with IFN$_\gamma$ reinforced the immunosuppression capacity of the HF-MSCs (Fig.1). The presence of HF-MSCs induced a M2 –like macrophage differentiation from M1 macrophage. The presence of HF-MSCs on the one hand, increased the expression of CCL13 and MRC1, genes generally attributed to M2. On the other hand, the presence of HF-MSCs dramatically decreased the expression of CXCL11 and IDO, genes generally attributed to M1 (Fig 2).

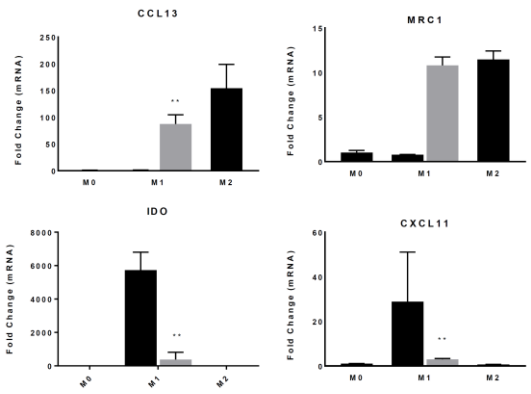


Fig.2: **Comparison between q-PCR data** obtained with M1, M0 and M2 macrophages

4.- Conclusions

Here, we demonstrated that HF might be an interesting source of MSCs due to their immunomodulatory efficiency and noninvasive isolation procedure. Thus, these cells may represent a potent cell therapy tool for the treatment of different pathologies, such as auto-immunity and degenerative diseases.

5.- Acknowledgments

This project was partially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2017-82290-R) and European Funding. Beatriz Hernaez-Estrada thanks the Basque Government for the PhD grant. Hair follicles were kindly supplied by Dr. A. Gorrochategui, Clinica Ercilla, Bilbao.

6.- References

[1] R Hass et al, Cell Communication and Signalling, 9:12, 2011

[2] M Magatti, et al, J Tissue Eng Regen Med 11:2895-2911, 2017

[3] FO Martinez et al, J Immunol 177: 7303-7311,2006

Elaboración y caracterización de un inserto ocular de progesterona para el tratamiento de la retinosis pigmentaria

Adrián ALAMBIAGA CARAVACA, Iris DOMENECH MONSELL, María SEBASTIÁN MORELLÓ, M. Aracely CALATAYUD PASCUAL, Cristina BALAGUER FERNÁNDEZ, María MIRANDA SANZ, Vicent RODILLA, Alicia LÓPEZ CASTELLANO

Instituto de Ciencias Biomédicas. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, C/Ramón y Cajal s/n Alfara del Patriarca, Valencia.

E-mail de contacto: adrian.alambiagacaravaca@uchceu.es

1.- Introducción

La retinitis pigmentosa (RP) es un conjunto de enfermedades oculares degenerativas que afectan a la retina y que cursan con la muerte celular de los fotorreceptores. Al principio se ven afectados los bastones, responsables de la visión periférica, generando visión tipo túnel. Posteriormente, la RP afecta a los conos, agravando la pérdida de visión [1]. La prevalencia es de 1 entre 4.000 personas en el mundo, y en la mayoría de los casos hay antecedentes familiares de la enfermedad [2]. La RP aparece principalmente en jóvenes y se va desarrollando hasta los 40-50 años de edad, cuando la disfunción visual alcanza su máxima gravedad [3].

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la RP. Ciertos autores describen que la progesterona (PG) podría usarse para ralentizar el avance de la enfermedad [1,4].

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un inserto ocular de PG que permita su administración por vía ocular para estudiar posteriormente su eficacia en el tratamiento de la RP.

2.- Materiales y métodos

Se formuló un inserto ocular de PG con los polímeros metil celulosa y polivinil alcohol en la composición que se detalla en la Tabla 1.

Tras mezclar los componentes, se dejaron durante 24 h bajo agitación constante y posteriormente la formulación se laminó a un espesor de 800 µm sobre una lámina traslucida, dejándose secar durante 48 h a temperatura ambiente. Una vez seco se separó el inserto de la lámina translucida y se recortó en cuadrados de 1cm^2.

Tabla 1. Componentes empleados en la elaboración de insertos de PG.

Componentes	Cantidades
Metilcelulosa	100 mg
Polivinil alcohol	150 mg
Propilenglicol	0,125 ml
Progesterona (metil-β-ciclodextrina)	5 mg
Agua	5 ml

Una vez preparados los insertos se caracterizó su morfología, peso, espesor, pH, contenido de PG en la matriz ocular e higroscopicidad.

Finalmente se realizaron ensayos *ex vivo* de permeación de PG a partir del inserto ocular formulado. Los estudios de difusión se realizaron con células de Franz empleando dos tipos de membrana: córnea y esclera de conejo. Los tiempos de muestreo se establecieron cada 15 minutos la primera hora y cada 30 minutos las siguientes dos horas. La cuantificación de las muestras se realizó mediante HPLC-UV, en la separación cromatográfica se utilizó una columna SunFier (150 x 4,6mm) empaquetada con partículas de sílice C18 de 5 µm de tamaño de partícula, absorción a 240 nm y volumen de inyección de 50 µL.

Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para detectar la posible existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los estudios de difusión ocular de ambas membranas de estudio. El nivel de confianza fue del 95%. El análisis estadístico se completó mediante el test de Mann-Whitney aplicando la corrección de Bonferroni.

3.- Resultados y Discusión

Los insertos formulados fueron translucidos, homogéneos y de características organolépticas adecuadas. El peso medio de los insertos fue de 7,02 ± 0,10 mg, mientras que el espesor medio fue de 0,20 ± 0,01 mm, su pH fue 7,1 ± 0,1, valor óptimo para la administración ocular.

Figura 1. Fotografía de uno de los insertos formulados con PG.

El contenido medio de fármaco fue de 161 ± 22 µg/cm^2 y su higroscopicidad, importante para la adhesión ocular del inserto, fue de 3,92 ± 0,16 % (n=6).

En la figura 2 se muestran las cantidades acumuladas (Q) de PG en el compartimento receptor en función del tiempo en los experimentos realizados en córnea y esclera de conejo. A partir de la pendiente de la cinética de difusión de la PG se determinó su coeficiente de permeabilidad, Kp, en córnea y esclera, siendo 10,73 ± 3,49·10^{-3} cm/h y 49,99 ± 22,90 ·10^{-3} cm/h respectivamente (n=7).

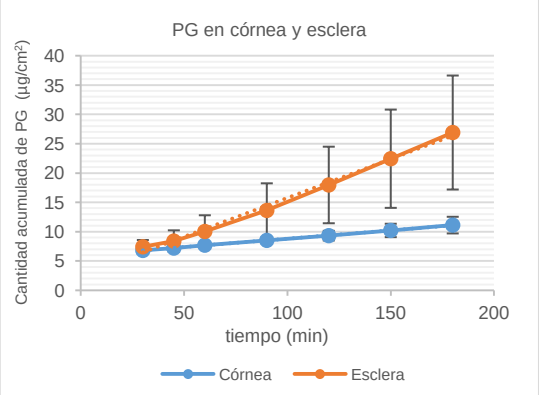


Figura 2. Cantidades acumuladas (µg/cm^2) de PG en el compartimento receptor en función del tiempo (minutos) en los ensayos realizados con córnea y esclera de conejo (n=7).

La permeación transesclera de la PG a partir de los insertos formulados fue significativamente superior a la de la córnea ($p<0,05$).

4.- Conclusión

- El inserto ocular con PG presenta características adecuadas en morfología, peso, pH, espesor y captación de agua para su administración.
- Los estudios de difusión de PG *ex vivo* mostraron que el fármaco difunde más a través de la esclera que de la córnea de conejo.

5.- Agradecimientos

Proyecto precompetitivo Santander PPC26/2015, FPI-CEU 2017/2018 y Fundación Jesús Gangoiti Barrera.

6.- Referencias

[1] Sánchez-Vallejo V, Benlloch-Navarro S, López-Pedrajas R, Romero FJ, Miranda M. Neuroprotective actions of progesterone an *in vivo* model of retinitis pigmentosa. Pharmacol Res. 2015; 99:276-88.

[2] Jauregui R, Park KS, Duong JK, Mahajan VB, Tsang SH. Quantitative progression of retinitis pigmentosa by optical coherence tomography angiography. Sci Rep. 2018 Sep 3;8(1):13130.

[3] Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, Romano MR, Parmeggiani F. Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. Current genomics 2011;12:276-284.

[4] Yang YJ, Peng J, Ying D, Peng QH. A Brief Review on the Pathological Role of Decreased Blood Flow Affected in Retinitis Pigmentosa. J Ophthalmol. Hindawi; 2018;2018:3249064.

Novel soy protein and chitin scaffold combined with mesenchymal stem cells for chronic wounds healing

Kevin LAS HERAS [(1)], Saioa SANTOS-VIZCAINO [(1)], Alaitz ETXABIDE [(3)], Jone URANGA [(3)], Edorta SANTOS-VIZCAINO [(1,2)], Pedro GUERRERO [(3)], Manoli IGARTUA [(1,2)], Koro DE LA CABA [(3)], Rosa Maria HERNANDEZ [(1,2)]

1. NanoBioCel Group, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Spain.
2. Biomedical Research Networking (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Spain
3. BIOMAT Res. Group, University of the Basque Country (UPV/EHU), Donostia-San Sebastian, Spain

Contact email: rosa.hernandez@ehu.es

1.- Introduction

Chronic wounds result from a healing process which does not progress normally, despite wound care standard practices [1].

Since nineties, several works have described combined therapies with different cell types, such as fibroblast or keratinocytes, and biological matrices composed of hyaluronic acid, collagen or fibrin. [2].

In recent years, use of biomaterials and mesenchymal stem cells (MSCs) has emerged as a promising alternative for chronic wounds care. The composition of biomaterials and the immunomodulatory effect presented by MSCs are key features of these new therapies [2] [3].

The aim of this project was to design a MSC-laden polymeric scaffold (dressing) composed by soy protein and chitin, in order to promote a paracrine immunomodulatory and regenerative effect in chronic ulcers.

2.- Materials and methods

Scaffolds used in this study were developed by combination of commercial soy protein isolated (SPI), with β-chitin (20 wt %) extracted from squid pens, employing a simple treatment with NaOH [4].

Swelling curves were obtained by weighing the scaffolds at different time points after immersion in PBS. Dry scaffolds were used as controls.

The hydrolytic and enzymatic degradability of the scaffolds was calculated from the weight loss of the samples incubated at 37ºC in PBS or collagenase solution (0,5 mg/ml) respectively, taking into account the initial to final weight difference of the dry samples.

The cytotoxicity of the scaffolds was studied either by direct contact or by incubating the cells with the leachate of the scaffolds (indirect cytotoxicity), following the ISO 10993-5:2009 standard.

Minimum cell adhesion time with optimum viability was studied by seeding a cell suspension of known density in the scaffold and counting the number of living cells attached at different time intervals. To assess the cell load capacity of the scaffolds, increasing densities of cell suspensions were seeded and counted after the time required for optimum cell attachment.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate the capacity of the adipose tissue-derived MSCs included within the 3D scaffolds to release Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) in an inflammatory environment recreated with the presence of IFNγ. Cells seeded in wells (2D) were used as a control group.

3.- Results and discussion

Fig. 1 shows the macroscopic appearance and SEM images of the microarchitecture of the scaffold.

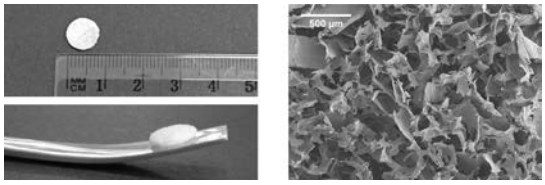


Fig. 1: Dry scaffolds with 8 mm of diameter (left). Microarchitecture of the scaffold (right).

The obtained results revealed a great capacity of the scaffold to absorb water, as demonstrated by a 13.5-fold increase of its weight in few seconds, likely due to his composition and highly porous microstructure.

In the hydrolytic degradation study, 20% of the weight was lost during the 21 days of the assay. However, in the enzymatic degradation assay, complete degradation was achieved in 2 hours due to the activity of the collagenase that breaks the peptide bonds of soy protein.

In the direct cytotoxicity assay, cell viability in all groups (dialysed, hydrated and dried scaffolds) was higher than 70%, suggesting a negligible cytotoxic effect. In the indirect cytotoxicity assay, the dialyzed group was the only which viability dropped below 70% (*Fig. 2*).

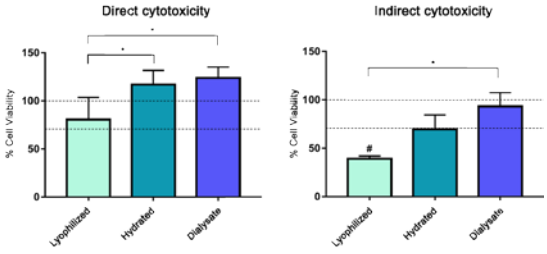


*Fig. 2: Direct (left) and indirect (right) cytotoxicity. *p < 0.05*

The minimum time required for cell adhesion while maintaining an optimum viability was 8 hours. In the cell load study, we observed a linear correlation between the initial cell density pipetted into the scaffolds and the successfully attached living cells, without reaching the saturation point (*Fig. 3*).

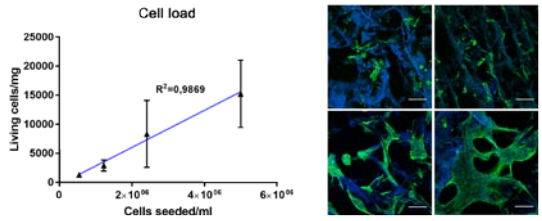


Fig. 3: Cell load assay. Different cell densities pipetted in the scaffolds.

Finally, we tested the capacity of MSCs included within the scaffolds to release immunomodulatory factors. The results showed significant differences in IDO release between cells seeded in 2D and 3D (both without IFNγ), obtaining higher signal with the latter. The group seeded in 2D activated with IFNγ showed higher release of IDO comparing with non-activated group (*Fig. 4*). Nevertheless, for cells within 3D scaffolds, non-significant differences were observed between IFNγ-activated and non-activated groups. This may be due to the difficulty of the IFNγ to access the cells included within the scaffold.

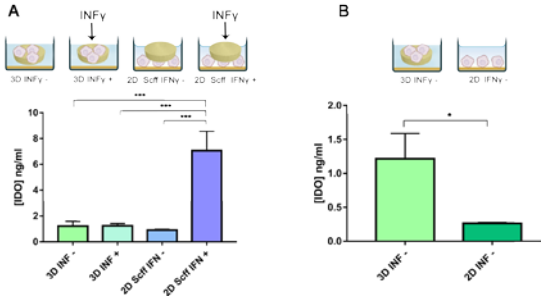


*Fig. 4: ELISA assays. ***p < 0.001, *p < 0.05.*

4.- Conclusions

The present study shows that soy protein and chitin can be combined to produce a scaffold with high water absorption and swelling capacity, good stability in aqueous medium, negligible cytotoxicity and suitable properties to load high number of viable MSCs. Such qualities may be of great interest to allow moisture-retention within the wound bed, mitigate inflammation and promote wound healing in chronic ulcers.

5.- Acknowledgments

This project was partially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2017-82290-R) and the FEDER funds.

6.- References

[1] Dickinson LE, et al. Front Physiol 2016;5(7):341.

[2] Jasmine Ho, et al. Adv Wound Care (New Rochelle). 2017;6(6):191-209.

[3] Duscher D, et al. Gerontology 2016;62(2):216-225.

[4] Tania Garrido, et al. Green Chem 2017;19(24):5923-5931.

Estudio preliminar de diseño de prótesis temporales impresas en 3D para la liberación controlada de fármacos.

Carlos BUENO-LÓPEZ[1], Carlos TAMARIT[1], Joan FERRÀS[1,2], Cristina BALAGUER-FERNÁNDEZ[1], Alicia LÓPEZ-CASTELLANO[1], Jose Vicente AMAYA[1,2], Vicent RODILLA[1].

[1]Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, C/Ramón y Cajal s/n Alfara del Patriarca, Valencia; [2]Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

E-mail de contacto: vrodilla@uchceu.es

1.- Introducción

La impresión 3D ha sido uno técnica que ha evolucionado dramáticamente en los últimos veinte años, para dejar de ser una promesa y convertirse en una herramienta para los profesionales de la salud [1,2] que ya se utiliza en diversos campos de la medicina, como la traumatología y la cirugía ortopédica.

La infección de prótesis articular es un problema creciente de salud pública ya que la presencia de un cuerpo extraño (la prótesis) determina la formación de biofilms bacterianos que son resistentes a los mecanismos de defensa y a los antibióticos. Las infecciones crónicas tardías en las que se requiere un recambio protésico junto a tratamiento antibiótico de larga duración son particularmente problemáticas. Ciertas estimaciones sugieren que las tasas medias de infección global durante los primeros 2 años de postoperatorio oscilan entre un 2 y un 6%, y aunque en España no existen datos detallados, el número de artroplastias excede las 30.000/año. En las cirugías en dos tiempos, la colocación de una prótesis temporal (espaciador) personalizada y la administración sostenida e *in situ* de un antibiótico eficaz frente a los microorganismos patógenos puede resolver estas infecciones de forma satisfactoria.

La impresión 3D de un espaciador con un material adecuado para permitir la liberación local de antibióticos mejoraría el tratamiento localizado de la infección y además permitiría el ajuste del mismo de forma más anatómica, por lo que podría ser una alternativa útil al problema que suponen las infecciones en artoplastias.

El proyecto del que forma parte el presente trabajo, pretende desarrollar espaciadores personalizados, impresos en 3D, de materiales adecuados, así como evaluar la efectividad de antibióticos incorporados al espaciador, destinados al tratamiento de infecciones en artroplastias.

En los estudios preliminares que aquí se presentan se evalúan diferentes diseños de la prótesis temporal (espaciador) que permitan liberar el fármaco incorporado, utilizando como sustancia testigo azul de metileno para comprobar que el diseño del espaciador es adecuado y se libera la sustancia contenida de manera controlada.

2.- Materiales y métodos

Con el objeto de seleccionar el diseño más adecuado para una prótesis que permita liberar el fármaco y con la resistencia que obviamente necesita una prótesis, se trabajó con un cuerpo geométrico: el cilindro. Se utilizaron huesos de fémur humanos, tanto masculinos como femeninos, en los que se midió el diámetro del fémur desde distintos ángulos a la altura de la metáfisis distal. Con la media de los valores obtenidos se diseñó un cilindro con una capacidad interna de 10 ml, manteniendo una altura constante respecto a la anchura.

Se utilizó el programa informático “Rhinoceros 3D” para el modelado y una impresora 3D “Flashforge Creator Pro” que utiliza la metodología de deposición fundida (FDM) para la impresión.

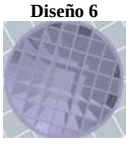
Se utilizó como material para la impresión del cilindro el ácido poliláctico (PLA) por sus características de biocompatibilidad y resistencia [2].

Con el fin de analizar si los diseños de la prótesis propuestos (cilindros) podían ser utilizados para la liberación adecuada de un fármaco se utilizó azul de metileno como sustancia testigo. Antes de terminar la impresión 3D del cilindro, este se rellenó con una solución de azul de metileno (1 mg/mL) y se continuó la impresión hasta el cierre completo del mismo. El cilindro se mantuvo sumergido en una solución de agua destilada con agitación y se tomaron muestras durante 48 h para cuantificar la cantidad de azul de metileno liberada desde el cilindro mediante espectrofotometría.

3.- Resultados y Discusión

La técnica FDM se caracteriza por ser simple y extremadamente versátil y por ello, ya ha sido utilizada en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, especialmente medicamentos personalizados y dispositivos médicos. [1]. Los resultados de los diseños realizados se muestran en la tabla 1, junto con las características más relevantes de cada uno de ellos.

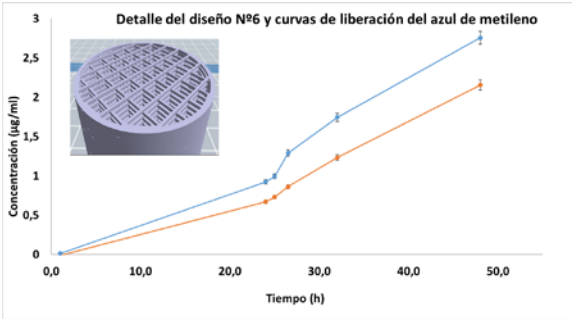
Tabla 1. Diseños realizados para los cilindros. En cada diseño se muestran las diferencias en el diseño e impresión.

Diseño 1	**9 capas exteriores** **Infill 100%** **Patrón sólido** **Cavidad**	**Diseño 4**	**1 capa exterior** **Infill 20%** **Patrón Hexagonal**
Diseño 2	**2 capas exteriores** **Infill 20%** **Patrón Hexagonal** **Cavidad**	**Diseño 5**	**2 capas exteriores** **Infill 10%** **Patrón Hexagonal**
Diseño 3	**1 capa exterior** **Infill 20%** **Patrón Hexagonal** **Cavidad**	**Diseño 6** 	**2 capas exteriores** **Infill 20%** **Patrón Líneas solapadas**

El azul de metileno no se liberó en los diseños 1 y 2. Con el diseño 3 se produjo liberación, pero no de forma controlada, mientras que en el diseño 4 el azul de metileno se liberó masivamente. El diseño 4 presentó un problema en su estructura ya que al no existir comunicación interna entre las celdas se dificultaba la liberación desde las zonas más internas del cilindro; este mismo problema también estaba presente en el diseño 5.

En el diseño 6 (el detalle de líneas solapadas internas se muestra en la figura 2) se consiguió liberar el azul de metileno de una manera sostenida en el tiempo (figura 2).

Fig. 2. Detalle del diseño 6 y curvas de liberación de azul de metileno en función del tiempo.



4.- Conclusiones

Se han realizado y ensayado diferentes diseños para conseguir un cilindro, que corresponde al diseño 6, con el que se produce una liberación sostenida de azul de metileno incluido en modelo impreso. En estudios posteriores procederemos a evaluar la liberación de determinados antibióticos desde el interior de los cilindros impresos en 3D.

5.- Agradecimientos

Financiación de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

6.- Referencias

1. Goyanes A, Det-Amornrat U, Wang J, Basit AW, Gaisford S. 3D scanning and 3D printing as innovative technologies for fabricating personalized topical drug delivery systems. J Control Release. 2016; 28; 234:41-8.
2. Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. Biotechnol Adv. 2017 (2):217-39.

Micropartículas de PLGA para la vectorización de sulfasalazina a macrófagos

Mónica-Carolina VILLA HERMOSILLA[(1)], Sofía NEGRO ALVAREZ [(1)], Consuelo MONTEJO RUBIO[(2)], Carolina HURTADO MARCOS [(2)], Ana FERNANDEZ CARBALLIDO[(1)].

1. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, España..
2. Departmento de Ciencias Farmacéuticas y de Salud. Universidad San Pablo-CEU Universities, Av. de Montepríncipe, s/n, 28668 Madrid, España.

Email de contacto: mcvhermosilla@ucm.es

1.- Introducción

La inflamación es una respuesta ante una lesión tisular que activa al sistema inmunitario. En este proceso, el macrófago tiene un papel principal por sus características fagocíticas, como presentador de antígenos y como regulador de la inflamación [1].

La sulfasalazina (SSZ) es un antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido amino-salicílico. Su uso más habitual es en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, pero también puede utilizarse en la artritis reumatoide [2] y en el tratamiento temprano de la artritis idiopática juvenil [3].

El objetivo de este trabajo es desarrollar micropartículas (MPs) de sulfasalazina, con un tamaño adecuado, para ser captadas por macrófagos y evaluar la actividad antiinflamatoria, en cultivos celulares, mediante la cuantificación de los mediadores de la inflamación Interluquina-1 (IL-1), Interleuquina-6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α).

2.- Material y métodos

2.1.- Elaboración y caracterización de micropartículas

Las formulaciones se han preparado utilizando el polímero PLGA Resomer® 502 mediante el método de evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. Se han preparado MPs blancas (F-A), MPs con SSZ (F-AS) y MPs con fluoresceína-5-isotiocianato (F-AF). En la elaboración de las MPs con SSZ, ésta se incorpora al 5% respecto el polímero y en aquellas que se elaboran con fluoresceína -5-isotiocianato (FITC), se mantuvo una relación de 1:10 respecto al polímero.

2.3.- Estudios en macrófagos

Para los ensayos en macrófagos se emplea la línea celular de ratón RAW264,7. Primero se llevan a cabo los estudios de captación, en los que las MPs cargadas con FITC se incubaron a diferentes tiempos: 2, 3 y 5 horas. Las formulaciones se observan en un microscopio de fluorescencia. Para evaluar la actividad antiinflamatoria, las células se incubaron, durante 24 horas, con las formulaciones de MPs y con SSZ libre. A dicho tiempo se retiró el medio de cultivo, para cuantificar por ELISA la concentración de los mediadores de la inflamación: TNF-α, IL-6 e IL-1.

3.- Resultados y discusión

Todas las formulaciones presentaron poblaciones monodispersas con una superficie lisa y homogénea. Los tamaños de partícula de las formulaciones fueron entre 3,99 ± 0,41 μm y 4,09 ± 0,64 μm. Estos tamaños son adecuados para lograr una captación por macrófagos (4). Los valores medios de las eficacias de encapsulación (EE) (%) de SSZ fueron del 80%, mientras que con la de FITC fueron inferiores al 1%.

Los ensayos de cesión de la formulación F-AS nos muestran un *burst* inicial a las 6 horas de más del 40% de la carga, seguida de una liberación sostenida durante 3 días.

Los ensayos de fagocitosis mostraron una rápida captación de MPs por parte del

macrófago. A las 2 horas de la incubación se pueden observar las MPs en el interior del macrófago (Fig. 1).

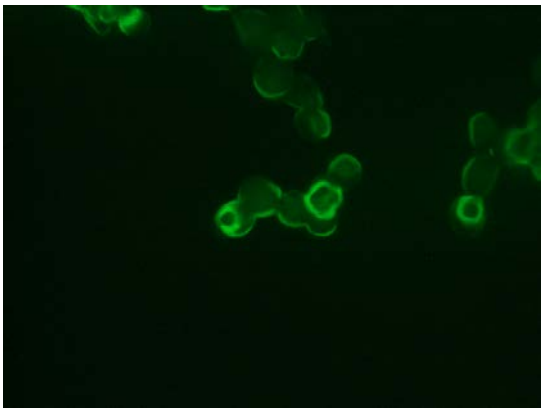


Fig. 1: *Microfotografía obtenida a las 2 horas de incubación de la formulación F-AF con macrófagos.*

Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos de las concentraciones de TNF-α, IL-6 e IL-1 a las 24 horas, tras la incubación con las diferentes formulaciones ensayadas.

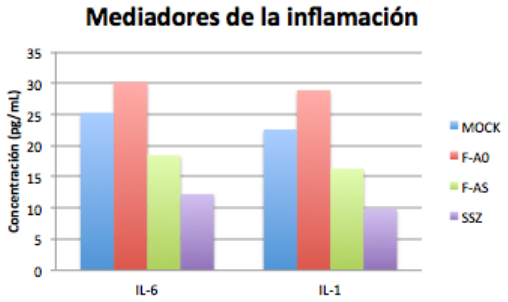


Fig. 2*: Concentraciones medias de IL-1 e IL-6 a las 24 horas, de las formulaciones MPs inertes (F-A0) MPs con SSZ (F-AS), SSZ libre y el control (Mock).*

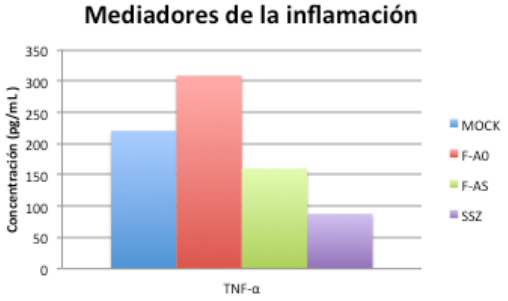


Fig. 3: *Concentraciones medias de TNF-α a las 24 horas, de las formulaciones MPs inertes (F-A0) MPs con SSZ (F-AS), SSZ libre y el control (Mock).*

La presencia de MPs inertes (F-A0) da lugar a un incremento en la concentración de los tres mediadores a las 24 horas de comenzar el ensayo. Esto se debe a que los macrófagos identifican las MPs como cuerpo extraño y reaccionan ante su presencia.

Cuando se analizan los resultados obtenidos con las MPs de SSZ (F-AS), se observa una reducción significativa de TNF-α, IL-6 e IL-1, tras la captación por macrófagos. Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con la SSZ en disolución.

Es necesario indicar que, aunque en cultivos celulares se obtienen mejores resultados con la SSZ en disolución, estos resultados no son extrapolables a su comportamiento *in vivo*, ya que la SSZ presenta una semivida plasmática de 5,5 horas y es rápidamente eliminada del organismo.

4.- Conclusiones

Las micropartículas de sulfasalazina elaboradas con PLGA, con un tamaño de partícula inferior a 6 µm, son rápidamente fagocitadas por macrófagos. La SSZ liberada en el interior de los macrófagos, a partir de las micropartículas, reduce los niveles de los mediadores de la inflamación: TNF-α, IL-6 e IL-1.

5.- Agradecimientos

Grupo de investigación “Administración Parenteral de Medicamentos” de la UCM (Grupo 910939).

6.- Referencias

[1] Pan F. *Et al*. Lupus. 2018.

[2] Weinblatt, M. E. *et al*. J Rheuma. 26. 2123-2130. 1999.

[3] Van Rossum, M. A. *Et al*. Annu. Rheum Dis. 66, 1518-1524. 2007.

[4] Hirota, K *et al*. J Control Release. 119. 69-76. 2017.

Absorción percutánea del formaldehido

Lucía LÓPEZ SÁNCHEZ[(1)],Pablo MIRALLES IBARRA[(3)], Matilde MERINO SANJUÁN[(1,2)], Virginia MERINO[(1,2)]

1. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Universidad de Valencia, Avda.Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjasot ,Valencia, Spain.

2. Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Universitat Politècnica de València, Universitat de València.

3.Dpto Química Analítica Universidad de Valencia, C. Dr Moliner 50 46100 Burjasot ,Valencia, Spain.

Email de contacto:virginia.merino@uv.es

1.- Introducción

El uso cotidiano de productos cosméticos conlleva una exposición continua a sus ingredientes, y por lo tanto es necesario que superen una rigurosa evaluación antes de su utilización. Esta evaluación incluye controles de seguridad y de calidad. Son las autoridades correspondientes las que regulan el uso de estos conservantes para así garantizar la seguridad en su empleo[1].

El formaldehido es un conservante utilizado en cosmética pero se considera como un producto especialmente peligroso, ya que además de su acción irritante y sensibilizante es un producto reconocido como cancerígeno, por lo que la exposición a él debe reducirse al máximo[2].

Por otra parte está ampliamente documentado que la composición de las formulaciones puede condicionar el paso transdérmico de los componentes que la integran. [3]

El objetivo de este trabajo es estudiar la absorción percutánea *in vitro* del formaldehido desde diferentes formulaciones.

2.- Materiales y Métodos

La permeabilidad del formaldehido se evaluó a partir de una solución acuosa, una emulsión O/A y un hidrogel. La composición de las formulaciones ensayadas se indica en la Figura 1.

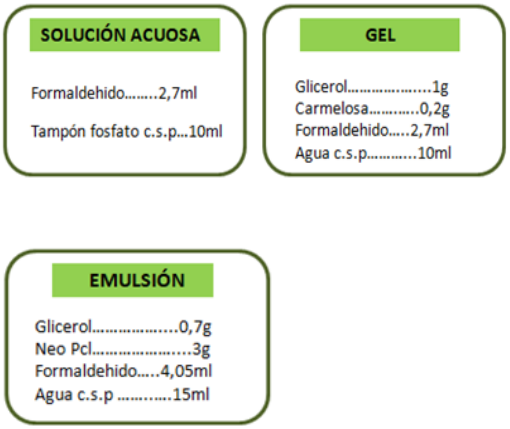


Fig.1: Formulaciones ensayadas.

Para la realización del estudio de permeabilidad se empleó piel completa de oreja de cerdo. Los ensayos se llevaron a cabo en celdas de Franz, con una capacidad del compartimento receptor de 6mL.

En el compartimento dador se dosificó 1mL de las diferentes formulaciones ensayadas. La solución del compartimento receptor fue una solución acuosa elaborada con tampón fosfato pH 7,4, que se mantuvo en constante agitación y a temperatura fisiológica (37ºC). Se tomaron muestras a distintos tiempos de esta última con objeto de caracterizar la cinética del proceso de difusión (n=6).

La cuantificación del formaldehido en las muestras se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV. Se utilizó una columna cromatográfica Lichrocart RP-18, una fase móvil de fosfato de sodio 0,006M ajustada a pH 2,1 y una longitud de onda 407 nm.

Las cantidades acumuladas de formaldehido en el compartimento receptor a cada tiempo de toma de muestra se emplearon para caracterizar las cinéticas de absorción (Ecuación 1).

$$J = Kp \cdot C \qquad \textit{Ecuación 1}$$

Siendo J el flujo transdérmico, Kp la constante de permeabilidad y C la concentración en el compartimento dador (se asume constante).

3.- Resultados y discusión

Las cantidades de formaldehido acumuladas en compartimento receptor obtenidos para cada tiempo de toma de muestra y su desviación estándar se presentan en la tabla 1 y los flujos transdérmicos y el periodo de latencia caracterizados en la tabla 2.

DIFUSIÓN PASIVA. FORMALDEHIDO (90000ppm) n=6					
Cantidades acumuladas de formaldehido en el compartimento receptor.					
EMULSIÓN		SOLUCIÓN		HIDROGEL	
Tiempo (h)	Qa±SD (µg/cm²)	Tiempo (h)	Qa±SD (µg/cm²)	Tiempo (h)	Qa±SD (µg/cm²)
16	491,19±240,44	16	337,79±139,13	17	572,67±135,50
18	610,52±275,11	18	411,78±170,50	19	657,10±152,46
20	702,15±294,25	20	483,43±204,93	21	758,07±161,87
22	801,19±316,63	22	570,20±236,63	23	855,13±176,32
24	883,11±339,38	24	644,82±267,04	25	974,20±206,09

Tabla.1: Cantidades medias de formaldehido acumuladas en el compartimento receptor por unidad de superficie, acompañadas de la desviación estándar (SD) para cada tiempo y para cada tipo de formulación.

FORMULACIÓN	J(µg/cm²h) ± SD	t_o (Tiempo de latencia, h)
EMULSIÓN	47,87 ± 13,62	5,89 ± 3,46
SOLUCIÓN	39,55 ± 17,04	7,70 ± 0,85
HIDROGEL	50,05 ± 9,99	5,78 ± 1,71

Tabla.2: Flujos transdérmicos y tiempos de latencia para cada tipo de formulación, acompañados de su desviación estándar (SD).

El análisis estadístico ANOVA no muestra diferencias significativas en los parámetros analizados, flujo transdérmico del formaldehido y periodo de latencia de la difusión, que puedan ser atribuidas a la formulación seleccionada.

4.- Conclusiones

Los ensayos *in vitro* manifiestan que en los ejemplos de formulación seleccionados el vehículo cosmético no influye en la capacidad del formaldehido de atravesar la piel. No obstante, se debe confirmar *in vivo* que la magnitud de la absorción transdérmica de formaldehido desde soluciones acuosas, emulsiones o hidrogeles no está asociada a problemas de toxicidad a las concentraciones autorizadas (la concentración máxima permitida en las formulaciones es del 0,1% para productos bucales y 0,2% para el resto de formulaciones cosméticas. No se podrá utilizar en aerosoles).

5.- Agradecimientos

Este proyecto de investigación está financiado por MINECO (CTQ2015-70301-R)

6.- Referencias

[1] Reglamento Europeo. Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre productos cosméticos (versión refundida). [Monografia en Internet]. Bruselas: Parlamento Europeo; 2017 [acceso 14 de febrero de 2009].

[2] ATSDR.Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resumenes de salud pública- Formaldehido. Mayo 2016.

[3] Kardzovska, D Brooks, JD, Riviere, JE. Modeling the effect of experimental variables on the in vitro permeation of six model compounds across porcine skin. Int J Pharm, 2013, 443, (1-2): 58-67.

Microcápsulas de rifampicina para el tratamiento de la infección protésica

Irene Isabel LÓPEZ-TORRES[(1)], Gina ORTEGA-TORRES[(2)], Ana Isabel FRAGUAS-SÁNCHEZ[(2)], Pablo SANZ RUIZ[(1)], Javier VAQUERO MARTÍN[(1)], Ana Isabel TORRES-SUÁREZ[(2)]

1. Departmento de Cirugía Ortopédica, Hospital General Gregorio Marañón. 28007 Madrid.
2. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

Email de contacto: galaaaa@ucm.es

1.- Introducción

La infección protésica (IP) es una complicación grave con incidencia creciente debido al aumento de la esperanza de vida de la población y a un aumento de la demanda funcional del paciente joven (figura 1). Todas las opciones quirúrgicas asociadas a la erradicación de la IP de origen estafilocócico (las mayoritarias) incluyen el uso de rifampicina, iv u oral, asociada a otros antibióticos, debido a su eficacia tanto en la eliminación de biofilm como en la prevención de su formación (1). Sin embargo, existen dos efectos adversos cuya gravedad obliga a la suspensión inmediata del tratamiento: la hepatitis y el síndrome seudogripal. Además, la rifampicina es una conocida inductora encimática .

Fig. 1: Infección de prótesis total de rodilla.

Los cementos óseos (los más utilizados son los de polimetacrilato-PMMA) se emplean para la construcción de espaciadores en el tratamiento de IP evitando la contractura de tejidos blandos periarticulares y manteniendo la longitud del miembro, pero, además, al incorporar en ellos antibióticos permiten la liberación intra-articular de los mismos evitandose los efectos adversos debidos a su administración sistémica. Aunque existen comercializados cementos oseos con diferentes antibióticos, principalmente aminoglucósidos, no ha sido posible el desarrollo de cementos con rifampicina ya que el antibiótico prolonga los tiempos de fraguado del cemento haciéndole inservible.

En este trabajo se incorporan microcápsulas de alginato conteniendo rifampicina a un cemento oseo de PAMMA y se determina la cesión del antibiótico en un modelo animal de IP.

2.- Materiales y Método

2.1.- Preparación del cemento oseo con microcápsulas de rifampicina.

Las microcápsulas de alginato con rifampicina se elaboran por el equipo de la Dra. Aran (INESCOP, Madrid) mediante la técnica de gelificación iónica y se esterilizan por radiación gamma a 25KGry (Aragogamma S.A, Barcelona). Se determina su aspecto por SEM y su carga en antibiótico para lo que se puso a punto un procedimiento analítico por HPLC. A partir de ese dato se prepara la mezcla de microcápsulas-PAMMA de manera que la rifampicina se encuentra a una concentración del 0,3%; concentración a la que la rifampicina incorporada al cemento mostró actividad inhibitoria frente a Staphylococcus aureus en estudios in vitro (2,3).

2.2.- Determinación de la cesión de rifampicina en un modelo animal.

Se utilizan 8 conejos NZW adultos inmunocompetentes de al menos 3 kg a los que se implanta, en sustitución de la meseta tibial, un espaciador de cemento Palacos® R+G (Heraeus. Hanau, Alemania) con microcápsulas de rifampicina. En el mismo acto quirúrgico se les coloca un drenaje que permite extraer muestras de líquido

intraarticular (a las 6, 24, 48 y 72h) en las que se determina la concentración de rifampicina por HPLC.

De forma complementaria, se determina in vitro la estabilidad de rifampicina en liquid sinovial simulado (tabla 1)

Cloruro sódico	8 g/L
Cloruro potásico	0,2 g/L
Fosfato sódico dibásico	1,44 g/L
Fosfato monopotásico monobásico	0,24 g/L
Ácido hialurónico	3 g/L
pH	7,4

Tabla 1.- Composición del líquido sinovial simulado.

3.- Resultados y discusión

La figura 2 recoge el aspecto de las microcápsulas de rifampicina una vez esterilizadas. Presentan un aspecto irregular y superficie rugosa debido al depósito de alginato cálcico. El contenido medio de rifampicina en las microcápsulas fue de 2,48 mg% (sd= 1,05). En la figura 3 se observa el aspecto de estas microcápsulas incorporadas al cemento, una vez fraguado.

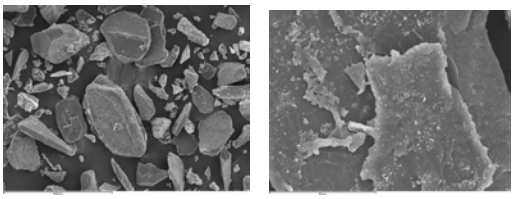


Fig. 2: Aspecto de las microcápsulas de rifampicina (A:x100) y de su superficie (B:x1000).

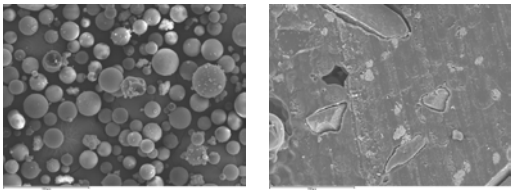


Fig. 3: Aspecto del PAMMA sin fraguar y del cemento fraguado conteniendo las microcápsulas.

A pesar de la elevada inestabilidad de la rifampicina en líquido sinovial simulado (figura 5), en las muestras biológicas (figura 6) se detectaron niveles intraartículares del antibiótico superiores a su concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* (0,06mg/mL)

Fig. 4: Espaciador de cemento con microcapsulas de rifampicina (A) y drenaje intraarticular (B) en los conejos.

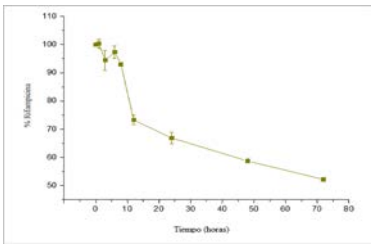


Fig. 5: Estabilidad de rifampicina en liquido sinovial simulado

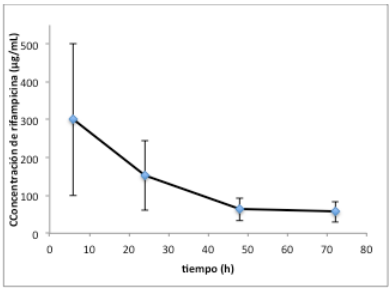


Fig. 6: Concentraciones de rifampicina en liquido sinovial.

4.- Conclusiones

Las microcápsulas de rifampicina incorporadas al cemento oseo resultan una herramienta eficaz para la administración del antibiótico para el tratamiento de la IP.

4.- Agradecimientos

Trabajo financiado por los proyectos Santander-UCM 2016 y por la Fundación Mutua Médica.

5.- Referencias

[1] *Cabrita, Croci, Camargo, Lima. Clinics,62(2):99-108, 2007.*

[2] *Sanz-Ruiz, Carbo-Laso, Del Real-Romero, Aran-Ais, Ballesteros-Iglesias, Paz-Jimenez, et al. J Orthop Res. 36(1):459-466, 2017.*

[3] Carbo-Laso, Sanz-Ruiz, Del Real-Romero, Ballesteros-Iglesias, Paz-Jimenez, Aran-Ais et al. Rev Esp Cir Ortop Traumatol. 62 (1):86-92, 2017.

Evaluación de aspectos básicos en el diseño de nanocompuestos magnetopoliméricos con potenciales aplicaciones biomédicas

Fátima FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ[(1)], Lucía MARTÍN-CASADO[(1)], Gracia GARCÍA-GARCÍA[(1)], Silvia FUERTE-RODRÍGUEZ[(1)], Raúl ORTIZ[(2,3)], Consolación MELGUIZO[(2-4)], Jóse L. ARIAS [(1,3,4)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España.
3. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.
4. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: fatimaferal@correo.ugr.es

1.- Introducción

El éxito de la quimioterapia contra el cáncer está notablemente condicionado por la capacidad del agente antitumoral de interaccionar con su diana terapéutica. Un problema adicional ampliamente descrito en estudios clínicos es el importante desarrollo de resistencias por las células cancerosas [1]. Una aproximación a estos problemas ha sido el desarrollo de coloides magnéticos con adecuadas características para el transporte de fármacos, la mejora de las técnicas de diagnóstico por imagen, la hipertermia magnética antitumoral, e incluso la teranosis [2].

En este contexto, este trabajo de investigación tiene como principal objetivo profundizar en el desarrollo de una metodología reproducible para el diseño de nanopartículas (NPs) con capacidad para responder a campos magnéticos aplicados y que puede aunar las capacidades antitumorales anteriormente citadas. En el contexto del diseño de un nanocompuesto basado en una nanomatriz biodegradable de poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) mejorada estructuralmente con la inserción de núcleos de maghemita (γ-Fe_2O_3, obtenidas mediante oxidación de NPs de magnetita preparadas mediante coprecipitación química, y de tamaño: 9 ± 3 nm) [3], se pretende analizar la conveniencia de realizar un perfecto control de las proporciones en masa γ-Fe_2O_3:PLGA a emplear de ambos componentes.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Los reactivos químicos utilizados son de calidad analítica (Panreac Química S.L.U., España; y, Merck KGaA, Alemania).

2.2.- Formulación y caracterización de NPs de PLGA magnéticas

La preparación de las NPs de PLGA (260 ± 10 nm) y de los nanocompuestos γ-Fe_2O_3/PLGA se realizó mediante el método de emulsificación con evaporación del disolvente [4], incluyendo en el último caso diferentes proporciones masa:masa de NPs de óxido de hierro y polímero (2:4 a 4:3, n = 3). La selección de la proporción óptima de estas masas para la formulación de las NPs γ-Fe_2O_3/PLGA se basó en determinaciones de rendimiento de la síntesis, tamaño, y propiedades eléctricas superficiales (potencial zeta, ζ). Estas dos últimas características se estudiaron empleando un dispositivo Malvern Autosizer® 4700 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

3.- Resultados y Discusión

La Tabla 1 recoge el efecto de la proporción m:m de γ-Fe_2O_3:PLGA en el tamaño y rendimiento de las NPs magnetopoliméricas.

Parece claro cómo un incremento en la cantidad de núcleos de óxido de hierro utilizados acrecienta el tamaño medio de partícula, probablemente consecuencia de la tendencia a la agregación de éstos en el medio de dispersión, previa a su inclusión dentro de la matriz polimérica.

Proporción γ-Fe_2O_3:PLGA (m:m)	Tamaño (nm)	PdI	Rendimiento (%)
2:4	281.5 ± 13.1	0.71 ± 0.07	14.1
3:4	436.1 ± 1.2	0.38 ± 0.01	10.9
4:4	461.2 ± 14.4	0.49 ± 0.01	63.8
4:3	646.8 ± 13.6	0.59 ± 0.03	10.3

Tabla 1: Influencia de la proporción γ-Fe_2O_3:PLGA (m:m) en el tamaño (nm) y distribución de tamaños (PdI), ζ (mV) y rendimiento (%).

Cabe esperar también que un incremento en el tamaño de partícula de estos nanocompuestos lleve asociado un mayor contenido en núcleos magnéticos y así una mayor capacidad de respuesta magnética. Teniendo en cuenta que la selección de las NPs γ-Fe_2O_3/PLGA obtenidas se llevó a cabo mediante separación magnética, podría encontrarse aquí la justificación de un mayor rendimiento en la proporción 4:4 (tabla 1), a falta de un estudio más detallado.

En cuanto a las propiedades eléctricas superficiales, la Fig. 1 confirma cómo debe vigilarse la relación m:m de γ-Fe_2O_3:PLGA, si se pretende un pleno recubrimiento de los núcleos de γ-Fe_2O_3.

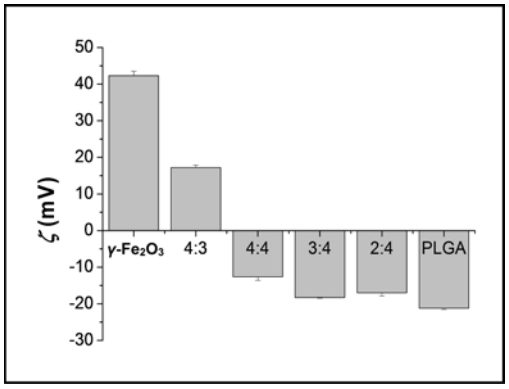


Fig. 1: Influencia de la proporción γ-Fe_2O_3:PLGA (m:m) en las propiedades electrocinéticas (ζ, mV) de los nanocompuestos.

La carga eléctrica superficial de las NPs de γ-Fe_2O_3 queda oculta por el recubrimiento polimérico en las proporciones 2:4, 3:4 y 4:4, siendo casi indistinguibles los comportamientos de los nanocompuestos y las NPs de PLGA. La sensibilidad de la electroforesis a pequeños cambios superficiales en una partícula coloidal demuestra su eficacia en la identificación de un recubrimiento óptimo superficial. La reducción de los valores de ζ positivo en los núcleos cuando se acomete la formulación de nanocompuestos bajo la proporción 4:3 parece postular un recubrimiento superficial insuficiente.

4.- Conclusiones

Se ha confirmado la relevancia de un buen ajuste de las proporciones masa:masa núcleo:matriz en el diseño de nanocompuestos magnetopoliméricos. La electroforesis constituye una herramienta fundamental en este proceso.

5.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).

6.- Referencias

[1] M. Mazen, El-Hammadi, AV. Delgado, C. Melguizo, JC. Prados, JL. Arias, Int. J. Pharm., 516, 61-70, 2017.

[2] LH. Reddy, JL. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Chem. Rev., 112, 5818-5878, 2012.

[3] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, J. Magn. Magn. Mater., 149, 6-9, 1995.

[4] E. Pretel, JL. Arias, L. Cabeza, C. Melguizo, J. Prados, M. Mallandrich, J. Suñer, B. Clares, Int J Pharm., 530, 155-164, 2017.

Vehiculation of natural substances in liposomes: antimicrobial activity of citral

Iris USACH, Elisabetta MARGARUCCI, José Esteban PERIS

Departament of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.

Contact email: jose.e.peris@uv.es

1.- Introduction

Some natural compounds can be used as alternatives to synthetic drugs to prevent and treat skin diseases. Citral is a natural mixture of two isomeric acyclic monoterpene aldehydes: geranial and neral. It can be isolated from the leaves and fruits of a large variety of citrus plants. Citral shows significant anti-fungal and anti-bacterial activity as well as antiinflammatory activity [1].

This study was conducted with the aim of evaluating the antimicrobial activity of citral itself and citral formulated in liposomes. To do so, a gram-positive bacterium (*Staphylococcus aureus*) and a yeast (*Candida albicans*) were used.

2.- Materials and Methods

2.1.- Liposome preparation and characterization

Liposomes were prepared mixing 360 mg of Lipoid S75 and 60 mg of citral. Mixtures were hydrated with water and sonicated with a high intensity ultrasonic disintegrator for 15 cycles (5 seconds "on" and 2 seconds "off", 13 microns of probe amplitude). The concentration of citral in the corresponding final mixture was 20 mg/ml. Vesicle formation and morphology were checked by transmission electron microscopy (TEM).

2.2.- Agar diffusion methods

Bacterial and fungal inocula were uniformly spread on the surface of a sterile Petri dish containing Mueller-Hinton agar using a sterile cotton swab. In the case of bacteria, tests were performed by applying a bacterial inoculum of approximately 1.4×10^8 CFU/ml [2] and, in the case of *C. albicans*, this number was reduced to 6×10^6 CFU/ml [3]. Paper discs were impregnated with 20 µl of the natural product, as an extract (300 mg/ml in DMSO) or formulated in liposomes (20 mg/ml), and placed onto the surface of the agar. Plates were incubated for 24 h at 36 °C ± 1 °C, under aerobic conditions and the diameter of the zone of growth inhibition (halo) was measured in mm.

2.3.- Micro-dilution methods

2.3.1.- Turbidimetric assays

These assays were performed using microtitration plates and inserting different concentrations of the natural product considered. The 96-well plate was incubated at 35 ºC during one day. After incubation, minimum inhibitory concentration values (MICs) were determined, indicated by absence of turbidity which was measured with a spectrophotometer (λ= 530 nm). In order to obtain the minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC), which are the most common estimations of bactericidal or fungicidal activity, an aliquot of each well was spread on the surface of a Petri dish containing Mueller-Hinton agar in the case of bacteria and SDCA for *C. albicans*.

2.3.2.- Colorimetric assays

This method, instead of the standard turbidity test, was used as the liposomes showed self-turbidity, which prevented the detection of microbial inhibition growth based on the absence of turbidity. Eppendorf tubes with different concentrations of liposomes using Mueller-Hinton broth or RPMI as a medium were employed. Tubes were incubated at 35 °C for 24 h. After incubation, tubes were shaken and 10 µl of MTT (5 mg/ml in H_2O) was added to each one. To stop the reaction, acidic isopropanol was added. Finally, samples were centrifuged and the absorbance of the supernatants was measured (λ= 570 nm).

3.- Results and Discussion

3.1.- Agar diffusion methods

The obtained results showed that citral exhibited antimicrobial and antifungal activity against both tested microorganisms. However, no inhibition halos were observed when liposomes were assayed.

3.2.- Micro-dilution methods

Table 1 summarizes the results obtained analyzing the turbidity of the samples. As in the previous assays, citral showed a similar antimicrobial activity against both microorganisms.

Table 1. Antimicrobial activity of citral.

	MIC_{50} (mg/ml)	MIC_{90} (mg/ml)	MFC/MBC (mg/ml)
S. aureus	1.5	3	3
C. albicans	1.5	3	3

MIC_{90}: minimum inhibitory concentration 90%.
MIC_{50}: minimum inhibitory concentration 50%.
MFC: minimum fungicidal concentration.
MBC: minimum bactericidal concentration.

In order to quantify the antimicrobial activity of liposomes containing citral the colorimetric method was employed. In this case, liposomes were more active against *C. albicans* than against *S. aureus* (Table 2).

Table 2. Antimicrobial activity of citral liposomes. Results are expressed in microliters of liposome suspension per milliliter of final volume and in milligrams of citral per milliliter of final volume.

	MIC_{50}	MIC_{90}	MFC/MBC
S. aureus	125-250 µl/ml	250 µl/ml	250 µl/ml
	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
C. albicans	30 µl/ml	60 µl/ml	125 µl/ml
	0.6 mg/ml	1.2 mg/ml	2.5 mg/ml

Citral liposomes were a little less potent than the reference product against *S. aureus*, but more potent than citral itself in the case of *C. albicans.*

The absence of the inhibition halo in the agar diffusion assays with liposomes could be related to the relatively high concentration required to inhibit the growth of these microorganisms.

3.3.- Electron microscopy of liposomes

The morphology of citral liposomes was checked by TEM and the obtained micrographs confirmed the formation of spherical vesicles (Fig. 1).

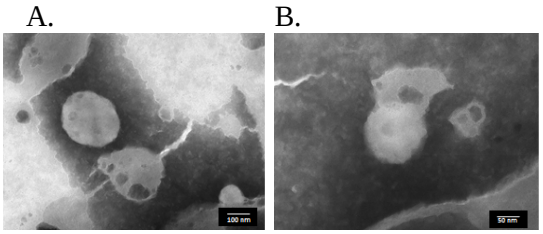


Fig. 1. TEM micrographs of citral liposomes (A, 30.000X; B, 50.000X).

4.- Conclusions

The natural substance citral could be useful for the treatment of skin infections caused by sensitive microorganisms. Its formulation in liposomes could facilitate the interaction with epidermal cells, bacteria and yeasts.
Citral liposomes were more active against *C. albicans* than against *S. aureus*.

5. References

[1] HB. Martins et al, Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil Citral in Experimental Infection with Staphylococcus aureus in a Model Air Pouch, Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2505610, 2017.

[2] Clinical and Laboratory Standard Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that aerobically, Tenth Edition. Wayne, Pennsylvania, 2015.

[3] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Version 7.3.1. 2017, https://www.aspergillus.org.uk/sites/default/files/pictures/Lab_protocols/EUCAST_E_ Def_7_3_Yeast_testing_definitive.pdf

Population pharmacokinetic model of topiramate in neonate patients

Reme MARQUES[(1)], Victor MANGAS-SANJUAN[(2,3)], Ana GARCIA[(4)], Iris USACH[(2)], Máximo VENTO[(4)], José Esteban PERIS[(2)]

1. Departament of Pharmacy Services, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain.
2. Departament of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.
3. Interuniversity Research Institute for Molecular Recognition and Technological Development, Polytechnic University of Valencia-University of Valencia, Valencia, Spain.
4. Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain.

Contact email: jose.e.peris@uv.es

1.- Introduction

Topiramate is an antiepileptic drug widely used in the treatment of numerous psychiatric conditions such as schizophrenia, bipolar affective disorders, unipolar depression, posttraumatic stress disorder and disordered eating behavior [1]. It has a favorable pharmacokinetic profile with rapid absorption, good oral bioavailability (about 80%), linear pharmacokinetics, relatively long half-life (19-23 hours) and limited pharmacokinetic drug interactions [2].

The administration of topiramate in newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy undergoing therapeutic hypothermia has been proposed in order to reduce seizure activity during hospital stays [3]. The objective of this study was to develop a population pharmacokinetic model for topiramate in this particular group of neonates.

2.- Material and methods

2.1.- Study design

A clinical study including 52 neonates was available from Hospital Universitario-Politecnico La Fe (Valencia). All patients received an initial dose of 5 mg/kg at cycle 1 (C1) and 3 mg/kg up to cycle 6 (C2-C6). Experimental observations were collected in C1 at 2, 4, 8, 12, and 24 hours, and in C2-6 at 24 hour post-administration.

2.2.- Data analysis

All data analyses were performed based on the population approach with the NONMEM version 7.3 software.

2.3.- Pharmacokinetic model

Different pharmacokinetic (PK) models were evaluated to account for the time-course of topiramate in neonates. Models were parameterized in terms of absorption rate constant (ka), apparent volumes of distribution and clearances.

2.4.- Covariate analysis

The association between patient covariates and PK parameters were assessed graphically and numerically. Individual Bayes post hoc PK parameter estimates were generated from the basic model. These individual estimates as well as their difference from the corresponding population value were plotted versus the covariates to identify potential relationships. Numerical evaluation of the parameter-covariate relationship was performed using stepwise covariate model-building (SCM).

2.5.- Model evaluation

The objective function value (OFV) between hierarchical models, which is proportional to minus twice the log likelihood of the data, was used to compare different models. Final parameter estimates, relative standard errors (RSE) and shrinkage values were also

assessed. Standard goodness-of-fit plots and internal evaluation techniques (visual predictive check (VPC) and bootstrap analysis) were used to select the final model.

3.- Results

3.1.- Pharmacokinetic model

A one-compartment model with linear absorption and disposition kinetics was able to successfully described topiramate time-course profiles in neonates. Inter-individual variability was considered with an exponential model in ka, apparent clearance (CL) and apparent volume of distribution (V). Eta- and Eps-Shrinkage values were <20%. Non-linear absorption or elimination processes were not statistically significant (p>0.05). Model evaluation with the VPC (Fig.1) shows the adequacy of the model to describe not only the mean tendency, but also the variability observed.

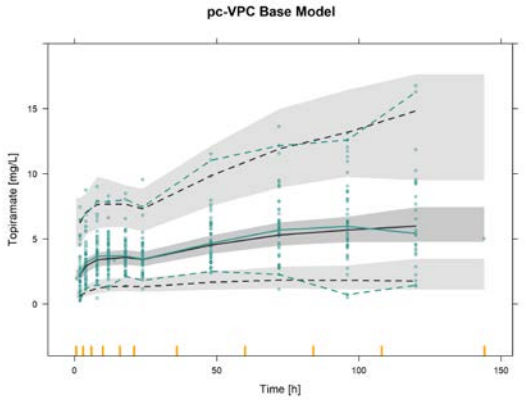


Fig. 1. Visuyal predictive check.

The estimated values and relative standard errors (RSE, %) of the PK parameters were: ka = 0.328 h^{-1} (14.7 %), CL = 0.0448 L/h (11.2 %), V = 3.63 L (6.2 %). The interindividual variabilities (IIV) were: IIV-ka = 86.9 %, IIV-CL = 56.8 %, IIV-V = 35.4 %.

3.2.- Covariate analysis

A descriptive analysis of continous covariates included in the study is summarized in Table 1, including weight (WT), post-gestational age (PGAW) and height (HGT). SCM analysis did not result in any significant relationship between PK parameters and covariates selected.

Table 1. Covariates.

	Mean	SD	Median	Min	Max
WT [g]	3309.15	552.67	3380	2050	4595
PGAW [week]	38.93	1.6	39	36	41
HGT [cm]	50.96	2.99	51	43	57

4.- Discussion

The oral administration of topiramate in neonates was described using a one-compartment model, assuming a first-order kinetics for oral absorption and disposition. The inclusion of parameters to account for delays in drug absorption were not statistically significant. The analyzed covariates did not show any significant effect on the PK parameters.

5.- Conclusions

In conclusion, a one-compartment population PK model was able to successfully predict the time-course of topiramate in neonates. The covariates selected could not help to partially explain the inter-individual differences in the PK profiles.

6.- References

[1] D. Arnone, Review of the use of Topiramate for treatment of psychiatric disorders, Ann Gen Psychiatry, 4, 5, 2005.

[2] J.H. Schneiderman, Topiramate: pharmacokinetics and pharmacodynamics, Can J Neurol Sci, 25, S3-5, 1998.

[3] B.J. Dixon et al, Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy, Int J Mol Sci, 16, 22368–22401, 2015.

Efecto del fraccionamiento y la trituración sobre la velocidad de disolución de comprimidos osmóticos de metilfenidato

Isamar GOMEZ, M. del Rosario ABERTURAS, Jesús MOLPECERES

Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Ctra. A2 km 33,600. Campus Universitario. 28871-Alcala de Henares.®

Email de contacto: jesus.molpeceres@uah.es

1.- Introducción

Estudios previos *in vitro* [1,2] han mostrado los efectos que la manipulación de comprimidos osmóticos de nifedipino (Adalat *Oros*® *push-pull*) o comprimidos matriciales con cubierta entérica de mesalazina (Mezavant® MMX) puede tener sobre sus perfiles de seguridad y eficacia. En este estudio se han evaluado, de forma análoga, las alteraciones que el fraccionamiento o la trituración de comprimidos osmóticos con triple dosis de metilfenidato (MPH) provocan sobre la velocidad de disolución del principio activo.

2.- Materiales y métodos

El estudio de disolución se ha realizado empleando comprimidos Concerta® de 18 mg, según el ensayo 4 de la USP, con un aparato de paletas semiautomático (Pharmatest Type PTW S III). Como medio de disolución se emplea medio ácido (500 ml HCl 0,001M) a 50 rpm y 37,0 ± 0,5 °C. La cuantificación del metilfenidato disuelto a lo largo de 10h se realiza por HPLC siguiendo USP test 4 pero con ciertas modificaciones respecto a las dimensiones de la columna, el flujo y las proporciones de acetonitrilo y agua de la fase móvil. El estudio se lleva a cabo con una columna C18 de 0,46 x 25 cm (5 µm), a 40ºC, un flujo de 1,0 mL/min y detección UV a 220 nm. La fase móvil es una mezcla ácido fórmico (1,0 mL/L) y ácido trifluoroacético (0,2 mL/L) en MeCN:agua milliQ 25:75. Los porcentajes disueltos se estiman frente a una solución patrón de 20 µg/ml [3] y se calculan los TMD y las velocidades de disolución. El análisis estadístico de los resultados se lleva a cabo mediante ANOVA con el programa Statgraphics v 5.1.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Comprimidos enteros

La figura 1 muestra que el comprimido osmótico libera una primera dosis de aproximadamente un 20%, contenida en la cubierta externa, durante los primeros 60 minutos. Se aprecia a continuación un incremento gradual en la cantidad de MPH liberado durante el tiempo restante a una velocidad constante que oscila entre 0,1 y 0,2%/min tras activarse los compartimentos osmóticos. El TMD (0-600 min) obtenido para este perfil de disolución fue de 388,49±1,43 min.

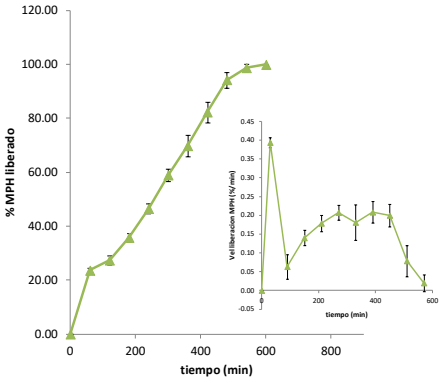


Fig.1: MPH liberado de forma acumulativa y distributiva en comprimidos enteros. (media±d.e.;n=6)

3.2.- Comprimidos fraccionados

La figura 2 muestra el efecto que provoca fraccionar los comprimidos de forma transversal por su mitad. Se observa que el comprimido osmótico libera el MPH de forma más rápida, si bien sigue mostrando una capacidad de modular la liberación. La liberación inicial prácticamente duplica la

velocidad del comprimido intacto con una disminución progresiva de ésta entre la segunda y la quinta hora desde 0,2 hasta 0,1%/min, manteniendo ésta última hasta el final del estudio. El TMD (0-600 min) obtenido para este perfil de disolución fue de 353,35±2,35 min.

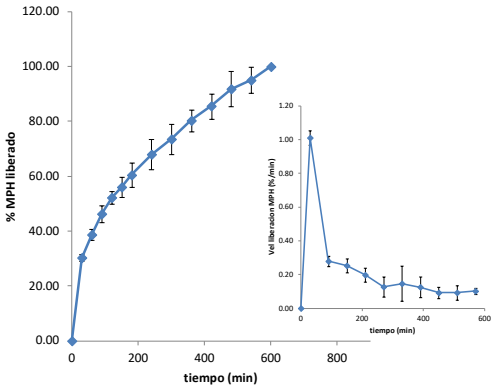


Fig.2: MPH liberado de forma acumulativa y distributiva en comprimidos fraccionados. (media±d.e.;n=6)

3.3.- Comprimidos triturados

La figura 3 muestra que la trituración del comprimido acelera el proceso de disolución acercándose a la situación de una liberación inmediata. Se libera prácticamente el 80% de la dosis total en la primera hora. El perfil muestra pérdidas significativas de MPH durante la manipulación. La velocidad de disolución máxima, alcanzada en las etapas iniciales del proceso, aumenta en un facto de 30 con respecto a la alcanzada con el comprimido sin manipular (12%/min). El TMD (0-180 min) obtenido para este perfil de disolución fue de 92,80±0,79 min.

4.- Conclusiones

La manipulación de comprimidos osmóticos de MPH provoca alteraciones del perfil de disolución del fármaco. Estas no son muy significativas a pesar de partir el comprimido en dos mitades exponiendo una de los compartimentos de fármaco directamente al medio externo. Sin embargo, la trituración elimina cualquier posibilidad de que se produzca una liberación mínimamente modificada.

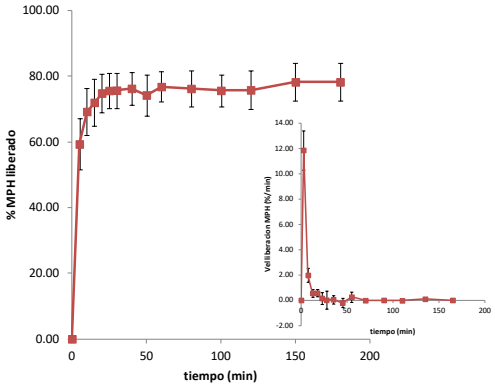


Fig.3: MPH liberado de forma acumulativa y distributiva en comprimidos triturados. (media±d.e.;n=6)

5.- Referencias

[1] L.C. García, Y. Rodrigo, M.R. Aberturas, J. Molpeceres, *Efecto del fraccionamiento y la trituración sobre la velocidad de disolución de comprimidos osmóticos de nifedipino*, En: Libro de comunicaciones XIII Congreso SEFIG (Comité organizador, Ed.), FGUA, Alcalá de Henares (España), 2017, 117-118.

[2] Y. Rodrigo, L.C. García, J. Molpeceres, M.R. Aberturas, *Efecto del fraccionamiento y la trituración de comprimidos matriciales de mesalazina sobre la velocidad de disolución*, En: Libro de comunicaciones XIII Congreso SEFIG (Comité organizador, Ed.), FGUA, Alcalá de Henares (España), 2017, 119-120.

[3] USP NF 41-36. http://app.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=41&nf=36&s=1&officialOn=August%201,%202018.

EMULSIONES AGUA EN AGUA (W/W) CON ALGINATO Y CASEÍNA COMO NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.

Esteban FIGUEROA-BECERRA [(1)], Jordi ESQUENA-MORET [(2,3)], Elvira ESCRIBANO-FERRER [(1)], María José GARCÍA-CELMA [(1,2,3)]

1. Departamento de Farrmacia y Tecnología Farmaceútica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación. Instituto de Nanociencia y Nanotecnología (IN^2UB). Universidad de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, España.
2. Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC). Consejo superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, España.
3. Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, España.

Email de contacto: mjgarcia@ub.edu

1.- Introducción

Las emulsiones agua-en-agua (W/W) consisten gotas de una solución acuosa dispersadas en el seno de otra solución acuosa, estando las dos fases acuosas en equilibrio termodinámico, debido a la incompatibilidad entre sus solutos[1]. Estos sistemas, muy poco explorados hasta la fecha, constituyen un reto científico y tecnológico importante, dado que consiguen la compartimentalización multifásica propia de las emulsiones convencionales y, gracias a su alto contenido en agua y la ausencia de tensioactivo y componente oleoso, presentan una mayor biocompatibilidad, además de la posibilidad de incorporar eficazmente, biomoléculas, polímeros hidrófilos y microorganismos[2].

Cabe destacar que las emulsiones W/W pueden ser precursores para la preparación de microgeles y nanogeles. Además, es posible formar nanoestructuras poliméricas (nanoagregados, nanocápsulas y nanoesferas) mediante la generación de complejos poliméricos a partir de dichas emulsiones[3], para posibles aplicaciones farmacéuticas.

El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar emulsiones W/W constituidas por proteína-polisacárido, en el sistema caseína-alginato. Se ha incorporado un 2% de clindamicina como fármaco hidrosoluble modelo y se ha estudiado su difusión a un medio receptor.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Alginato de Sodio (Sigma), Caseína de leche de bovino (Sigma), Clindamicina Hidrocloruro (Fagron), y agua MilliQ.

2.2.- Métodos

2.2.1.- Preparación de formulaciones

- Las emulsiones fueron preparadas a partir de mezclas en diferentes proporciones de una solución acuosa de alginato (que contenía la clindamicina) y otra de caseína en solución reguladora de fosfatos (PBS pH 7.4). Se mezclaron las soluciones mediante un homogeneizador Ultraturrax T8 (IKA) a 30,000 rpm, para formar las gotas de emulsión
- Todas las muestras se conservaron en un baño termorregulado a 25°C.

2.2.2.- Caracterización

El recuento de gotas y la determinación del tamaño de las mismas se efectuó por microscopía óptica, utilizando el software ImageJ de análisis de imágenes.

2.2.3.- Ensayo de liberación

- Se realizó en el equipo Vision® G2 Elite 8™ Dissolution Test, usando bolsas de diálisis (membrana hidrofílica Cellu SepT3® MWCO 12000-14000 Da), y 150 mL de PBS 1X como solución receptora, a 37°C y con una agitación de 250 rpm durante 24 horas. Se ensayaron 3 replicados por cada formulación.

- La cuantificación de clindamicina en las muestras se realizó mediante HPLC (Shimadzu equipment, Nexera X2) y espectrofotometría UV.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Preparación de las emulsiones W/W

Las emulsiones preparadas fueron: A1C5 (1:12, alginato-caseína), A2C4 (1:6), A3C3 (1:4); A4C2 (1:3) y A5C1 (1:2). Todas contenían una concentración de clindamicina del 2%. Las muestras A1C5 y A2C4 presentaron separación de fases, por lo que no se consideraron en los posteriores ensayos. (Fig. 1). Se usaron como controles, solución de clindamicina al 2% que estaba en; PBS 1X; solución de alginato; y solución de caseína.

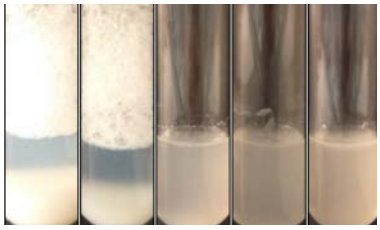


Fig. 1: Emulsiones después de 24h de su preparación. De izquierda a derecha, A1C5, A2C4, A3C3, A4C2 y A5C1, respectivamente.

3.2.- Caracterización de las emulsiones

Las emulsiones presentaron una distribución de tamaño de gota similar, con valores medios entre 5-10 µm, excepto la muestra A5C1, que presentaba un diámetro medio inferior a 5 µm (Fig.2).

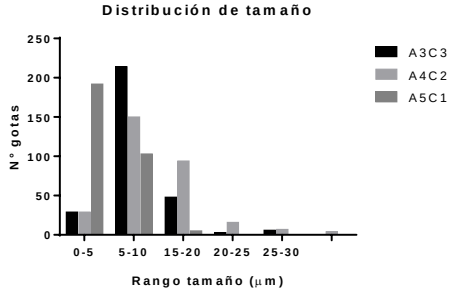


Fig. 2: Distribución de tamaño de gota de las emulsiones agua en agua con un 2% de clindamicina.

En la Fig.3 se muestran las micrografías de las emulsiones. Cabe destacar que en la emulsión A5C1 se observan gotas más pequeñas (Fig. 3c), lo que indica que al aumentar la concentración de alginato se produce una disminución del tamaño hasta llegar al rango submicrométrico.

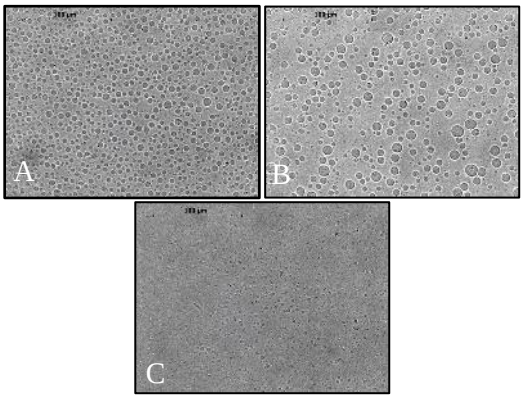


Fig. 3: Imágenes de las emulsiones (40x). A: A3C3; B: A4C2 y C: A5C1.

3.2.- Liberación de clindamicina

Las emulsiones presentaron una liberación de clindamicina prolongada en el tiempo en relación con la solución control de clindamicina y la solución de caseína; sin embargo, la solución de alginato presentó un comportamiento similar al de las emulsiones.

4.- Conclusiones

-Se han desarrollado emulsiones W/W de alginato-caseína con un 2% de clindamicina, que no han presentado separación de fases durante más de 48 h.

-El aumento en la concentración de alginato con respecto a la caseína supone una disminución del tamaño de gota y un aumento en la estabilidad, pudiéndose obtener gotas de tamaño submicrométrico.

-Las emulsiones W/W desarrolladas, que no contienen tensioactivo ni componente oleoso, retardan la liberación de la clindamicina. Sus propiedades permiten considerarlas como potenciales vehículos para la liberación de fármacos de carácter hidrófilo.

Bibliografía

[1] Capron y cols. (2001). *Rheol. Acta*. 40(5), 441-456.

[2] Esquena, J. (2016). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 25, 109-119.

[3] Paques y cols. (2014). *Adv. Colloid Interface Sci.* 209, 163-171.

Development of a nanoreinforced hyaluronic acid hydrogel for neuregulin delivery in cardiac repair

Elisa GARBAYO [(1)], Daniel PLANO [(1)], Valeria DIOZZI [(1)], Carmen SANMARTIN [(1)], María J. BLANCO-PRIETO [(1)]

1. Department of Pharmaceutical Technology and Chemistry, School of Pharmacy and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain

egarbayo@unav.es

1.- Introduction

Neuregulin-1 (NRG) is a cytokine involved in cardiac development and regeneration that holds tremendous potential as cardiac regenerative therapeutic [1]. This biopharmaceutical requires new formulation strategies for the sustained bioavailability of the drug in the infarcted myocardium due to its short *in vivo* half-life. In this regard, injectable hydrogels (HGs) are considered one of the most promising cardiac vehicles [2]. Encapsulation of bioactive molecules in HGs allows local sustained release over time, ensuring a prolonged therapeutic effect. Given the biocompatibility, viscoelastic and self-healing properties of hyaluronic acid (HA), there is great interest in the development of injectable HA-based HGs for controlled protein delivery to the heart. Since HA HGs do not have the mechanical properties required for tissue engineering applications, additional mechanical reinforcement may be needed. The objective of this work is to develop a nanoreinforced guest-host HA HG for NRG delivery to the infarcted myocardium.

2.- Methods

2.1.- Guest-Host HA HG preparation and characterization

An HA HG-based on the non-covalent hydrophobic interactions of adamantane (guest) and β-cyclodextrin (host) were prepared as published in [3] with modifications. First, functionalization of HA either with adamantane via controlled esterification or with ß-cyclodextrins through amidation was performed. Both HA products were isolated using dialysis and lyophilisation. The degree of modification for both HA was assessed by ^{1}H-NMR. Then, to prepare the self-assembly gel at 3.5 % w/v, the two components were individually dissolved in 125 µl phosphate buffered saline and mixed at room temperature. The gelation time of the system was determined by test tube inverting method. No flow upon inverting the vial was regarded as the gel state. Injectability of the biomaterial was assessed by its ability to pass through 23, 25, 27 and 29 gauge (G) needles.

2.2.- NRG-loaded NPs preparation and characterization

NRG-loaded polymeric NPs were prepared by multiple emulsion solvent evaporation method using Total Recirculation One Machine System (TROMS) using a previously published method adapted for NPs preparation [4]. The mean particle diameter and polydispersity index (PDI) were measured by dynamic light scattering (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, UK). NRG encapsulation efficiency was quantified by western blot. For fluorescent NPs, rhodamine B was added to the emulsion internal water phase and NPs were prepared as described.

2.3.- Preparation and characterization of the NRG-NP HA-HG composite

In order to obtain the nanocomposite HA HG, freeze-dried NRG-NPs were non-covalently immobilized in the gel matrix. Two different approaches were followed: 1) to incorporate the NPs (3 mg) in the HA-adamantane solution just before gel formation, 2) to incorporate the NPs (3 mg) in the HA-cyclodextrin solution just before HG formation. Fluorescent polymeric NPs were used in these experiments to assess particle distribution within the biomaterial. Gelation time, injectability through 23, 25, 27 and 29 gauge (G) needles and distribution of the NP within the HG were characterized.

3.- Results and Discussion

3.1.- HA HG synthesis

HA-adamantane and HA-cyclodextrin were synthesized with good yields. The ^{1}H-NMR analysis showed that the degree of modification for HA-adamantane was 12.1% and for HA-cyclodextrin 31.1%, good enough to obtain the desired HG. To prepare the gel, 3.2 mg HA-adamantane and 5.9 mg HA-cyclodextrin were individually dissolved and mixed. HGs showed a short gelation time, less than 30 seconds. Macroscopic examination of the HA gels formed showed transparent HGs. All the needles tested allowed the passage of the HG demonstrating that the system might be administrated using current cardiac catheter technology.

3.2.- NRG-NP preparation and characterization

Polymeric NRG-NPs were successfully prepared by TROMS, a technique suitable for protein encapsulation that avoids high temperatures and shear stress that can degrade biologic drugs. Particles had a mean particle size of 274 ± 43 nm, a PDI of 0.13 ± 0.03 and a drug loading of 7.3 μg NRG/mg polymer, suitable for further *in vivo* studies.

3.3.- Preparation of the nanocomposite HA-HG

When NRG-NPs were incorporated in the HA-adamantane solution, it was not possible to uniformly distribute the particles within the gel network. On the other hand, the nanoreinforcement of the HA-cyclodextrin solution allowed the obtention of a homogeneous nanocomposite HG. In any case, the inclusion of NPs within the HG did not affect the gelation time of the system (30 seconds). Finally, all the needles tested allowed the passage of the HG when NPs were incorporated, as no resistance to the flow or needle blockage was observed.

4.- Conclusions

A nanoreinforced guest-host HA-HG for NRG delivery has been successfully prepared and characterized. The developed biomaterial has a gelation time and injectability compatible with minimally invasive cardiac catheter-based administration. This self-healing HG nanocomposite has great potential for heart tissue engineering applications.

5.- Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2017-83734-R).

6.- References

[1] K. E. Yutzey, Nature, 520, 445-446, 2015.

[2] L. Saludas, S. Pascual-Gil, F. Prósper, E. Garbayo, M.J. Blanco-Prieto, Int. J. Pharm., 523, 454-475, 2017.

[3] C. Loebel, C.B. Rodell, M.H. Chen, J.A. Burdick, Nat Protoc 12, 1521-1541, 2017.

[4] E. Garbayo, J.J. Gavira, M.J. de Yebenes, B. Pelacho, G. Abizanda, H. Lana, M.J. Blanco-Prieto, F. Prósper, Sci Rep, 6:25932, 2016.

Optimización sistemática del proceso de recubrimiento entérico de pellets de isoniazida por lecho fluido

Laura Carolina LUCIANI-GIACOBBE [1,2], Agustina BALDRICH [1], Rubén MANZO [1], María Eugenia OLIVERA [1]

1. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, Córdoba-Argentina.
2. Unidad de Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET, Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, Córdoba-Argentina.

Email de contacto: meoliver@fcq.unc.edu.ar

1.- Introducción

Rifampicina (RIF) e Isoniazida (ISO) son fármacos administrados en formulaciones sólidas en combinación a dosis fijas (CDF) para favorecer la adherencia de los pacientes al tratamiento de la tuberculosis. En las CDF, RIF presenta problemas de biodisponibilidad baja y variable, debido a su hidrofobicidad, solubilidad dependiente del pH y su descomposición en medio ácido, acelerada por ISO.

Previamente, se obtuvo una dispersión sólida cristalina de carboximetilcelulosa ácida y RIF (CMC-RIF) que luego de ser compactada en forma de matrices mejoró significativamente la hidrofilicidad y la velocidad de disolución de RIF [1].

La obtención de sistemas multiunitarios que permitan la liberación intestinal de ISO, desfasada respecto a la de RIF, sería una estrategia superadora respecto a la farmacoterapia actual de la tuberculosis.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar pellets de ISO y explorar las condiciones que permitan su recubrimiento entérico utilizando herramientas de Calidad por Diseño (QbD), tal que puedan ser posteriormente utilizados en una formulación en CDF con RIF.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Obtención de pellets de ISO:

ISO (828 g) y celulosa microcristalina (150,5 g) fueron adicionadas con solución acuosa al 10 % de polivinil pirrolidona (PVP K90, 38,18 g) en un mezclador planetario (ERWEKA AR 402). La masa húmeda se sometió a un proceso de extrusión y esferonización. Posteriormente, los pellets fueron secados y tamizados, seleccionando para trabajar la fracción 1000-1680 µm.

2.2.- Caracterización de pellets de ISO

Se determinó la distribución y tamaño de las partículas mediante un analizador de distribución laser (HORIBA LA 960). Las propiedades mecánicas se determinaron mediante el ensayo de friabilidad (Int Pharm, 7th Ed) [2]. Además, se evaluó la disolución de ISO desde los pellets en medio intestinal simulado.

2.3.- Recubrimiento entérico

Los pellets de ISO fueron sometidos a un proceso de recubrimiento en lecho fluido mediante atomización en modo *top* (Caleva Mini coater). El agente de cobertura entérica fue una dispersión acuosa al 20 % p/p de LAY AQ ME® (Aspirus, Argentina), elaborada en base al copolímero del ácido metacrílico tipo C.

Se realizaron 8 corridas experimentales, de acuerdo a un diseño factorial regular de 2 niveles divididos en parcelas (*Split-plot*). Los factores de ensayo fueron la concentración de talco en la dispersión de cobertura, el flujo de atomización y la velocidad de agitación de los núcleos. Se determinaron como respuestas el tiempo de formación de agregados en proceso (>50% del material), la ganancia de peso (%), la formación de aglomerados (unión de 2 o más pellets; %) y la cantidad de ISO liberada luego de 2 h de disolución en fluido gástrico simulado. Para el análisis de los datos se utilizó el software Design-Expert® Versión 11.0 (Stat-Ease, EE. UU.).

3. Resultados y Discusión

3.1.- Obtención de los pellets de ISO

Se obtuvieron pellets homogéneos, cuyo diámetro promedio fue de (1483 ± 68) µm y un SPAN de 0,3. La friabilidad fue del 0,01%; lo que asegura su resistencia al estrés mecánico propio del proceso de recubrimiento. Además, se observó una muy rápida liberación de ISO en medio intestinal (98,7% a los 15 min), lo cual es importante para lograr una adecuada liberación *in vivo*[3].

3.2.- Recubrimiento entérico

Se analizaron los resultados obtenidos y se calcularon las superficies de respuesta para describir las influencias e interacciones de cada factor. Todos los modelos fueron significativos (p <0,05). El análisis determinó que el parámetro crítico del proceso de recubrimiento fue la concentración de talco en la dispersión de cobertura. La mayor concentración de talco aumentó tanto el tiempo de formación de agregados en proceso como la ganancia de peso y redujo la disolución en medio ácido. Sin embargo, se observó una mayor formación de aglomerados en el producto final. Este resultado es inverso a lo esperado, ya que el talco es ampliamente reconocido como antiadherente [4] y puede estar relacionado a la presencia de otros componentes no declarados en la fórmula.

Otro factor de relevancia para la disolución de ISO en medio ácido fue la velocidad de agitación de los núcleos en el lecho fluido. Se demostró una interacción entre este factor y la concentración de talco de la dispersión de cobertura (figura 1), observándose un efecto antagónico para cada nivel de concentración de talco.

Para lograr la optimización del proceso (máximo tiempo de formación de agregados en proceso, mínima formación de aglomerados y mínima disolución en medio ácido) el software generó 29 soluciones posibles, con una deseabilidad entre 0,582 y 0,666. La Figura 2 muestra la solución de mayor ajuste, que comprende concentración de talco del 5%, velocidad de agitación 25 Hz, flujo de suspensión 2,23 rpm. En una etapa posterior se propone evaluar otros agentes de cobertura.

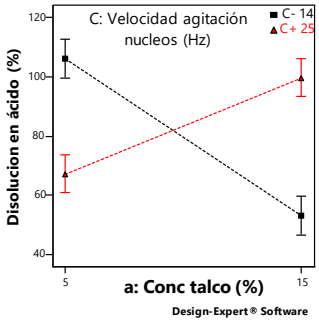


Fig 1. Gráfico de interacción de factores para la disolución de pellets de ISO en medio ácido.

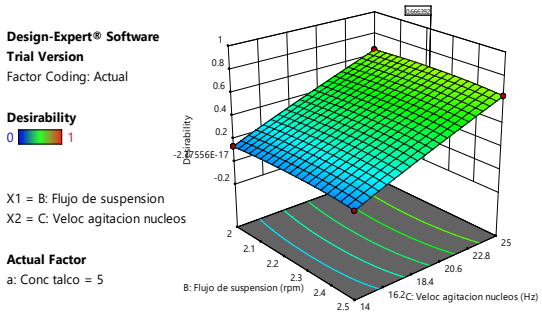


Fig. 2 Gráfico de superficie de respuesta para la función deseabilidad (solución 1)

4.- Conclusiones

Se obtuvieron pellets de ISO de calidad aceptable. El diseño experimental propuesto para el recubrimiento permitió estimar los parámetros críticos de proceso y definir los coeficientes de interacción para describir el espacio de diseño y optimizar el proceso.

5.- Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al subsidio otorgado por la Agencia de Ciencia y Tecnología (PICT 2015-3331), República Argentina. Luciani-Giacobbe agradece al CONICET su beca de posdoctorado.

6.- Referencias

[1] L.C. Luciani-Giacobbe, M.V. Ramírez-Rigo Y. Garro-Linck, G.A. Monti, R.H. Manzo, M.E. Olivera. Eur J of Pharm Sci, 96, 398–410, 2017.

[2] The International Pharmacopoeia 7 ed 2017, http://apps.who.int/phint/2017/index.html

[3] C. Becker, J.B. Dressman, G.L. Amidon, H.E. Junginger, S. Kopp, K.K. Midha, V.P. Shah, S. Stavchansky, D.M. Barends. J. Pharm. Sci, 96 (3), 522-531, 2007.

[4] R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association. Chicago (EE UU) 2009, 917 pag.

Análisis descriptivo del proceso de gestión de señales de seguridad en una consultoría de Farmacovigilancia: a propósito de una validación de señales

Elizabeth MORA FORERO [(1)], Pilar MODAMIO [(1)], Yolanda CASTILLO [(2)], Cecilia F. LASTRA [(1)], Eduardo L. MARIÑO [(1)]

1. Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona, España.
2. Departamento de Farmacovigilancia, ELM Farmacéutica, Av. Josep Tarradellas 8, ático 1ª , 08029 Barcelona, España.

Email de contacto: emarino@ub.edu

1.- Introducción

Una señal de seguridad es información de un evento adverso nuevo o conocido que puede ser causado por un medicamento, proceder de distintas fuentes de información y que requiere investigación [1].

Los procesos de gestión de señales son un conjunto de actividades realizadas para determinar si existen nuevos riesgos asociados con una sustancia activa o medicamento o si los riesgos conocidos han cambiado [2]. Dentro de los procesos de gestión se encuentra el proceso de validación de señal en el cual se hace una evaluación de los datos que respaldan la señal detectada para verificar que la documentación disponible contiene evidencia suficiente que justifica el posterior análisis más detallado.

El objetivo fue describir los factores a considerar en el proceso de validación de señales de farmacovigilancia para la mejora y actualización de los procesos de gestión de señales dentro de una consultoría de Farmacovigilancia.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Diseño y periodo de estudio

Análisis descriptivo retrospectivo de un reporte de evaluación de señales de diferentes laboratorios titulares de la autorización de comercialización (TAC), en un periodo de 5 años.

2.2.- Fuentes de información

El documento *Periodic Safety Update Single Assessment* (PSUSA) del medicamento evaluado, las páginas oficiales de la *European Medicines Agency* (EMA) y de centros de farmacovigilancia reconocidos y la plataforma *Eudravigilance Data Analysis System (*EVDAS) de la EMA, como seguimiento a señales potenciales en un último informe de 6 meses.

2.3.- Variables de evaluación

Individual Case Safety Reports (ICSR), series de casos, informes de literatura científica y EudraVigilance como fuentes de información de señales de Farmacovigilancia.

3. Resultados y discusión

3.1.- Evaluación de la señal

La evaluación de causalidad de un ICSR y/o de serie de casos es el primer paso para determinar si una señal es válida. Hay diversos métodos, sin embargo, ninguno por si solo pueden distinguir un caso válido de uno inválido [3]. Por otro lado, considerando que no toda *Adverse Drug Reaction* (ADR) se notifica, es necesario realizar búsquedas de información en la literatura científica. Otros aspectos a considerar son la documentación disponible del medicamento (estudios clínicos, historia regulatoria, patrones de uso, entre otros) y la farmacología del fármaco y de la ADR.

El sistema de análisis de datos EVDAS apoya las actividades de seguimiento y detección de señales, aunque no permite determinar si tienen relación causal y tampoco la validación de las mismas. La herramienta *electronic Reaction Monitoring Report* (eRMR) permite realizar detección de

señales mediante el parámetro *Signal of Disproportionate Reporting* (SDR) [4].

En la validación de las señales se deberá considerar, además, la fuerza de la evidencia, la relevancia clínica y contexto y el conocimiento previo [3], aspectos claves para determinar si hay algún nuevo riesgo asociado a un medicamento.

3.2.- Estudio del caso

3.2.1.- Análisis PSUSA

De las señales evaluadas para permetrina tópica, tres ADRs presentaron en conjunto evidencia que avala un cambio en la información del producto. La primera es la parestesia, con reportes de casos y de revisión de la literatura científica; otra la hipersensibilidad a crisantemos que se evaluó mediante revisión de la literatura científica, reportes de casos y con el uso del conocimiento previo de la asociación, ambas demostrando su asociación causal mediante criterio de plausibilidad biológica. La última es intoxicación sistémica en población pediátrica con un informe de caso que contiene los síntomas clínicos propios a una intoxicación oral con permetrina.

3.2.2.- Análisis ADRs por EVDAS

Se evaluó la desproporcionalidad en la serie de casos, con los siguientes resultados:

Reacción adversa	SDR	Aumento de casos, nuevo, o fatal
Parestesia	No	Aumento
Reacciones de hipersensibilidad	No	Aumento
Cancerogenicidad y mutagenicidad	No	Nuevo
Otros	No	NA

Fig. 1: Resultados EVDAS permetrina

Ningún ADR tuvo un valor positivo de SDR, indicando que no hay un mayor número de casos de los esperados. Parestesia y reacciones de hipersensibilidad recibieron nuevos casos durante el periodo de referencia. De los datos resalta la aparición por primera vez de las ADR de cancerogenicidad y mutagenicidad. Esta información podría ser útil para realizar análisis de causalidad, y soportar un proceso de validación de señales.

4.- Conclusiones

Dentro del proceso de validación de señal existen diferentes fuentes de información que deben monitorizarse. Se requiere la aplicación de un criterio clínico-científico. Evaluar la evidencia existente, la relevancia clínica y la información existente es clave. En todo caso cuando una señal es confirmada, el siguiente paso será establecer las medidas de minimización de riesgo del producto.

5.- Referencias

[1] Uppsala Monitoring Center (UMC). Signal detection and causality assessment. 2017.

[2] European Medicines Agency (EMA). Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP): Module IX – Signal management (Rev. 1). 2017.

[3] WHO-UMC. The use of the WHO-UMC system for standardized case causality assessment. 2018.

[4] European Medicines Agency (EMA). *EudraVigilance User Manual*. 2018.

Diseño de nanopartículas multicapa PLGA-chitosan y estudio de la estabilidad del 5-fluorouracilo por HPLC

Beatriz PARERA [(1)], Juan F. MORENO [(1)], Julián LOPEZ-VIOTA [(2),] Jose Luis VILCHEZ [(3)], Margarita LÓPEZ – VIOTA [(1)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja S/N 18071. Granada. España.
2. Vircell microbiologist. Granada. Spain.
3. Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja S/N 18071. Granada. España.

Email de contacto: bparera@correo.ugr.es

1.- Introducción

El desarrollo de la química farmacéutica junto con la farmacognosia han dado lugar a una serie de compuestos muy utilizados en la quimioterapia moderna. La mayoría de estos agentes terapéuticos son administrados mediante formas de dosificación convencionales, pero en ocasiones éstas son inapropiadas para lograr un efecto farmacológico óptimo, pudiendo producir considerables fluctuaciones en los niveles plasmáticos u originar efectos secundarios tóxicos. [1]

Por ello, en las últimas décadas se han desarrollado potentes transportadores como los sistemas nanométricos, en concreto las nanopartículas poliméricas, objeto de estudio en este trabajo.

Aquí mostramos un estudio de la estabilidad mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de un antineoplásico encapsulado en nanopartículas multicapa poliméricas.

2.- Materiales y métodos

Para la obtención de las nanopartículas de PLGA (poli (D, L – lactida – co – glocolida)) utilizamos el procedimiento fundamentado en el método de doble emulsión con evaporación de disolvente [2] y a continuación, procedimos a la formación de la segunda capa polimérica constituida por chitosan. Este procedimiento se realizó con diferentes concentraciones de chitosan, a saber 1, 5 y 10%.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Morfología del sistema

Para comprobar la geometría de las nanopartículas formuladas se utilizó microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). Podemos comprobar la morfología en la Figura 1.

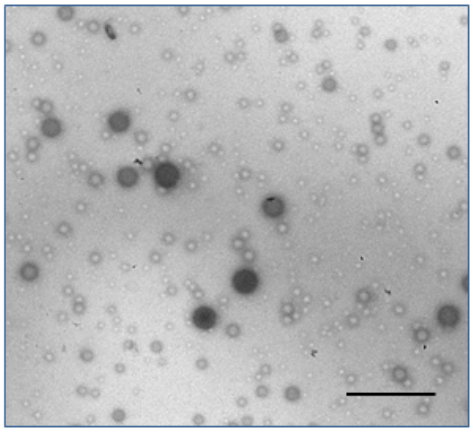
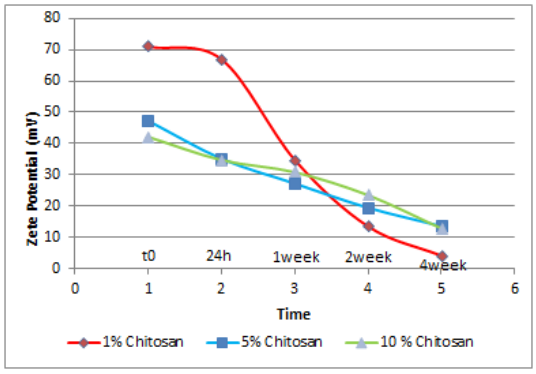


Fig. 1: Imagen HRTEM de nanopartículas de PLGA – Chitosan al 1% (Longitud de barra: 1000nm)

3.2.- Estabilidad de suspensión del sistema

El estudio de la estabilidad de suspensión de las nanopartículas se llevó a cabo mediante valores de potencial zeta. La Gráfica 1 podemos ver estos valores de potencial zeta en función del tiempo de las nanopartículas sintetizadas con diferentes concentraciones de chitosan. Mediante este estudio podemos afirmar el recubrimiento de chitosan sobre las nanopartículas de PLGA ya que encontramos en todos los puntos valores positivos. Se puede comprobar, de igual modo, que el sistema se va degradando con

el tiempo, ya que tiende a la negatividad a lo largo del tiempo.



Gráf. 1: Valores de PZ en función del tiempo de las nanopartículas de PLGA – Chitosan.

3.3.- Estabilidad y capacidad de encapsulación del fármaco en el sistema

Estudiamos la estabilidad de encapsulación del 5 – fluorouracilo mediante cromatografía líquida de alta resolución (RP – HPLC), que determinó la presencia cuali y cuantitativa de fármaco en solución y en el interior de las nanopartículas sintetizadas. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos siendo el primer pico correspondiente a nuestra muestra (A=9615mAU, tiempo de retención=2,5min) y el segundo pico al patrón interno (A=7222mAU, tiempo de retención=4,9min).

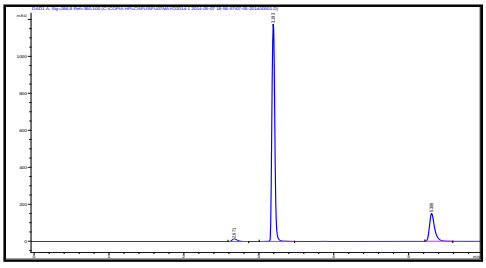


Fig. 2: Cromatograma obtenido mediante RP – HPLC del 5 – fluorouracilo y el patrón interno (cafeína, C=5ppm)

Una vez comprobada la correcta encapsulación del fármaco procedemos a determinar el porcentaje del mismo. Para ello realizamos una recta de calibrado y comparamos la concentración inicial utilizada en la síntesis (1300,8ppm) y la obtenida tras el análisis introduciendo los valores obtenido de relación área en la ecuación resultante de la recta de calibrado (muestra 1 (1% chitosan): 674,5ppm (51,85% de fármaco encapsulado); muestra 2 (5% chitosan): 719,5ppm (55,61% de fármaco encapsulado); muestra 3 (10% chitosan): 788,5ppm (60,61% de fármaco encapsulado).

Por último, para estudiar la estabilidad del fármaco sometimos nuestro sistema a la cámara de envejecimiento acelerado durante un tiempo máximo de 72 horas y analizando las muestras a lo largo de ese tiempo mediante HPLC. La Tabla 1 recoge los valores obtenidos.

TIME	5 Fluorouracil	Caffeine	Area Ratio	Concentration
15 min	3288.74	726.4	4.52	19.45
30 min	3244	721.7	4.49	19.29
45 min	3258.6	701.7	4.64	20.13
1 h	3253.5	725.6	4.48	19.23
24 h	3325.5	699.9	4.75	20.75
34 h	3312.9	728.1	4.55	19.92
48 h	3280.1	730.8	4.48	19.23
64 h	3282.7	704.1	4.66	20.24
72 h	3272.1	737.6	4.43	18.96

Tabla 1: Valores de HPLC obtenidos en función del tiempo.

Calculando el valor promedio de concentración (19,68±0,59) podemos concluir que el fármaco permanece estable en el nanosistema, ya que a lo largo de ese periodo de tiempo no varía la concentración.

4.- Conclusiones

El método químico seleccionado para la obtención de nanopartículas en multicapa es un procedimiento eficaz y reproducible.
Mediante el análisis electrocinético se ha podido comprobar que la paca polimérica de chitosan se va degradando con el tiempo independientemente de la concentración empleada.
Basándonos en HPLC se comprobó que el fármaco se mantiene estable en la formulación tras exponerlo a condiciones extremas como las ofrecidas por la cámara de envejecimiento acelerado.

5.- Referencias

[1] P. Couveur, C. Vauthier, *Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease.* Pharm. Res. 23, 1417 – 1450, 2006.

[2] Holgado and cols., *Synthesis of lidocaine – loaded PLGA microparticles by flow focusing effects on drug loading and release properties.* Int. J. Pharm. 359, 27 – 35, 2008.

Influencia del método de recubrimiento en la cinética de liberación de sistemas matriciales

Cristina MADERUELO MARTÍN [(1)] Silvia FRAILE ARCE [(1)] Roberto ARÉVALO PÉREZ [(1),], José M. LANAO [(1,2)]

1. Dpto de Ciencias Farmacéuticas-Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Salamanca
2. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Email de contacto: cmaderuelo@usal.es

1.- Introducción

En el diseño de formas farmacéuticas de liberación controlada, una de las estrategias tecnológicas más extendidas es el recubrimiento [1]. Para ello existen diversas tecnologías, como son el recubrimiento pelicular por esprayado en un bombo de recubrimiento o el recubrimiento por compresión, entre otras [2, 3]. El recubrimiento por compresión es un proceso libre de solvente, seguro y barato que no requiere un equipo especial a diferencia del recubrimiento pelicular [4].

El objetivo del estudio ha sido realizar una comparativa de los perfiles de disolución *in vitro* de matrices hidrófilas de Metronidazol 500 mg recubiertas mediante cada una de las dos técnicas anteriormente expuestas con un polímero tiempo dependiente y con uno pH dependiente.

2.- Material y Métodos

2.1.-Materiales

Metronidazol (Fagron®España), HPMC (Colorcon®), Chitosan (GlenthamScience®), Eudragit® FS30D, S100, RLPO y RL30D (Evonik®)

2.2.-Elaboracion de las matrices recubiertas

Se obtuvieron matrices hidrófilas de 11 mm de diámetro a base de HPMC K15M y chitosan en una máquina de comprimir Bonals® BMT y se recubrieron con un polímero pH dependiente y con un polímero tiempo dependiente incrementando el peso del comprimido en un 10 % y un 20 % (Tabla 1).

El recubrimiento en bombo de recubrir se realizó en una paila pulverizando la dispersión de recubrimiento sobre el lecho de comprimidos con una pistola de 1,5 mm de diámetro a una presión de atomización de 1 bar.

	Recubrimiento	
Polímero	**Mediante compresión**	**Esprayado**
pH dependiente	S100	FS30D
Tiempo dependiente	RLPO	RL30D

Tabla. 1: Polímeros empleados en el recubrimiento de las matrices (Eudragit®).

El recubrimiento por compresión se llevó a cabo en una máquina excéntrica Korsch® empleando punzones de 15 mm de diámetro.

2.5.-Test de disolución in vitro

Se llevaron a cabo los test de disolución durante 24 horas en un medio tampón fosfato a pH 7,2 con paletas y a 50 rpm. Se tomaron muestras de 1 ml a los tiempos 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 h. Las concentraciones de fármaco se determinaron mediante una técnica analítica de espectrofotometría UV-visible previamente validada en cubeta de 1 mm de paso a una longitud de onda de 320 nm.

3.- Resultados y discusión

La Figura 1 muestra el perfil de disolución del fármaco desde la matriz sin compactar (11 mm) y desde la matriz compactada (15 mm) sin cubierta, lo que supone un cambio de geometría del sistema.

La Figura 2 muestra los perfiles de disolución del fármaco desde las formulaciones obtenidas recubriendo por las dos técnicas estudiadas y con una cubierta tiempo dependiente.

La Figura 3 muestra los perfiles de disolución del fármaco desde las formulaciones obtenidas recubriendo por las dos técnicas estudiadas y con una cubierta pH dependiente.

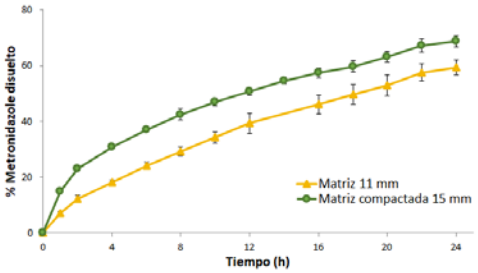


Fig. 1: Perfiles de disolución de la matriz de 11 mm y la matriz de 11 mm compactada en 15 mm sin material de recubrimiento.

En la Fig. 1 se muestran las diferencias entre la liberación del fármaco desde la matriz de 11 mm y desde la matriz sometida a la compresión con punzón de 15 mm en las mismas condiciones que se llevó a cabo el recubrimiento, pero sin producto para la cubierta. Se observa como en la matriz doblemente compactada hay un marcado efecto *Burst* que podría deberse a un cambio en el reparto del fármaco en la nueva geometría que lo sitúa en la superficie del comprimido en mayor medida que en la matriz de 11 mm.

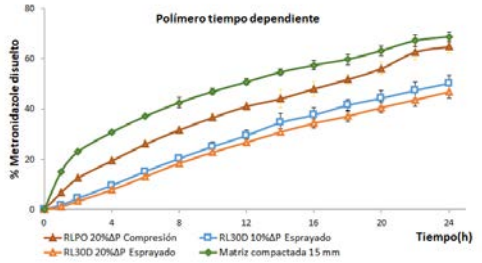


Fig. 2: .Perfiles de disolución de las matrices recubiertas con polímero tiempo dependiente

En las Fig. 2 y 3 se observa como el método de recubrimiento por esprayado permite obtener una liberación más lenta que el método de recubrimiento por compresión para el mismo incremento de peso (20 % y 10 % respectivamente). Cuando el polímero de la cubierta es tiempo dependiente (Fig. 2), el perfil de disolución para un incremento de peso del 20 % mediante la técnica del recubrimiento por compresión es más lento que la matriz sin recubrir, pero más rápido que las matrices recubiertas por esprayado tanto al 20 como al 10 % de incremento de peso. Lo mismo ocurre cuando el polímero de la cubierta es pH dependiente (Fig. 3).

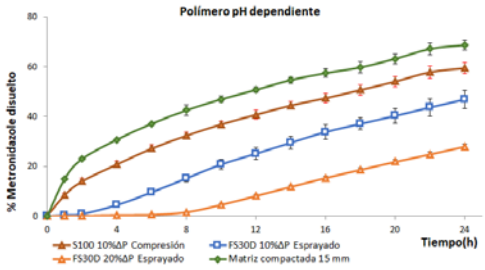


Fig. 3: Perfiles de disolución de las matrices recubiertas con polímero pH dependiente.

El incremento de peso de la cubierta con el polímero pH dependiente resultó determinante en el perfil de liberación del fármaco, observándose un periodo de latencia de 6 h con un 20 % de cubierta y de 3 h con un 10 % de cubierta. Con la técnica de recubrimiento por compresión no se observa tiempo de latencia, sino una liberación rápida a los tiempos iniciales de la disolución.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el recubrimiento por compresión con un polímero pH dependiente no es adecuado, ya que debido a la aparición del efecto *Burst*, el efecto del polímero de recubrimiento se ve anulado, obteniéndose perfiles de liberación considerablemente más rápidos.

5.- Referencias

[1] W. Hong, K. Park, eds. Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice. John Wiley & Sons, 2011

[2] Wei, Xiuli, et al. "An in situ crosslinked compression coat comprised of pectin and calcium chloride for colon-specific delivery of indomethacin." Drug delivery Volume 22 Issue 3, Pages 298-305, 2015.

[3] A. Maroni, et all. Film coatings for oral colon delivery, Int J Pharm, Volume 457, Issue 2, Pages 372-394, 2013.

[4] F.M. Hashem,et all. Guar gum and hydroxypropyl methlcellulose compressed coated tablets for colonic drug delivery: in vitro and in vivo evaluation in healthy human volunteers. Drug. Disc. Ther. Volume 5, Pages 90–95, 2011.

Efecto del recubrimiento pelicular en la liberación de un fármaco poco soluble

Roberto ARÉVALO PÉREZ [(1),] Cristina MADERUELO MARTÍN [(1)], José M. LANAO [(1,2)]

[1]Dpto de Ciencias Farmacéuticas-Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Salamanca

[2] Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

Email de contacto: robertoarevalo@usal.es

1.- Introducción

Muchas formulaciones farmacéuticas de liberación controlada emplean polímeros tiempo-dependientes o pH-dependientes para conseguir la liberación selectiva del fármaco [1]. Algunos de los polímeros tradicionalmente empleados para retrasar la liberación del fármaco son los derivados del polimetacrilato, comúnmente denominados Eudragit®. Estos polímeros tienen la capacidad de formar una capa sobre la superficie de los comprimidos, actuando como barrera física entre el núcleo y el medio [2].

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto del tipo de polímero (pH dependiente y tiempo dependiente) sobre la liberación de un fármaco de baja solubilidad desde sistemas matriciales de HPMC/Chitosan, utilizando como fármaco modelo el Metronidazol

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Metronidazol (Fagron®España), HPMC (Colorcon®), Chitosan (GlenthamScience®), Eudragit FS30D y Eudragit RL30D (Evonik®).

2.2.- Formulación de las matrices recubiertas

Se prepararon matrices hidrófilas a base de HPMC/Chitosan mediante compresión directa en una máquina de comprimir excéntrica Bonals® con un punzón de 11 mm.

Las matrices se recubrieron en un bombo Erweka® pulverizando la dispersión de recubrimiento sobre el lecho de comprimidos, con una pistola de 1,5 mm de boquilla y una presión de atomización de 1 bar. Se recubrieron las matrices hasta alcanzar un 10 % o un 20 % de peso.

Lote/s	Núcleo		Cubierta	
	Tipo/% HPMC	% Ch	% ΔP	Pol. Rec.
1	K15 – 8%	24%	10%	RL30D
6,7,12	K15 – 8%	24%	20%	RL30D
2	K35 – 24%	8%	20%	RL30D
8, 9	K35 – 24%	8%	10%	RL30D
3	K15 – 24%	8%	20%	FS30D
4,5,11	K15 – 24%	8%	10%	FS30D
10	K15 – 16%	16%	15%	FS30D

Tabla. 1 composición de los lotes estudiados. Ch=Chitosan; ΔP=Incremento de Peso

2.3.- Caracterización de las matrices recubiertas

Se caracterizaron los núcleos y las matrices recubiertas mediante diferentes ensayos, como uniformidad de masa, resistencia a la rotura, friabilidad, humedad residual, riqueza, y test de disolución.

Los ensayos de disolución se llevaron a cabo en un baño de disolución durante 24 horas en tampón fosfato a pH 7.2, agitación mediante paletas a 50 rpm, con recogida de muestra de 1 ml a la hora y posteriormente cada dos horas desde el inicio del test. Las concentraciones de fármaco se determinaron empleando una técnica analítica de espectrofotometría UV-visible con una cubeta de 1 mm de paso y a una longitud de onda de 320 nm.

2.4.- Análisis estadístico de los resultados

Se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos con la ayuda del software informático Minitab18®. Se realizó un test de ANOVA y una regresión lineal múltiple para determinar el efecto en el perfil de disolución del tipo de cubierta, el porcentaje de incremento de peso de la misma y el grado de viscosidad del polímero hidrofílico empleado.

3.- Resultados y discusión

Las figuras 1 y 2 muestran los perfiles de disolución para las formulaciones recubiertas con FS30D y RL30D respectivamente.

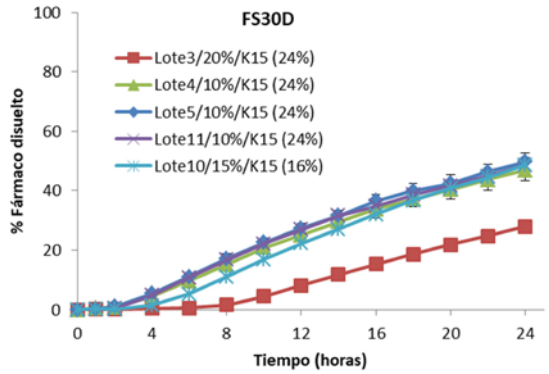


Fig. 1. Perfiles de disolución con recubrimiento pH dependiente

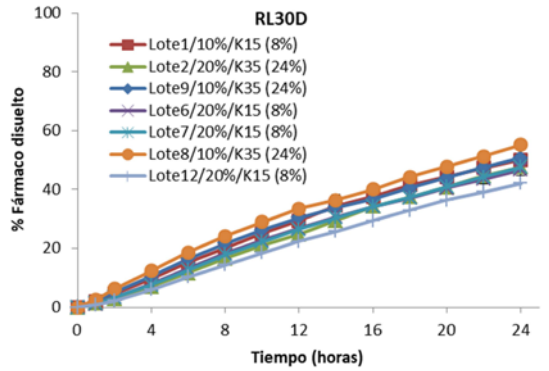


Fig. 2. Perfiles de disolución con recubrimiento tiempo dependiente.

Como se aprecia, existe un tiempo de latencia en la disolución de los comprimidos recubiertos con el polímero pH-dependiente FS30D respecto a los comprimidos recubiertos con RL30D (tiempo-dependiente). Este efecto se acentúa si se duplica el incremento de peso de la cubierta, debido al tiempo requerido para que se disuelva la misma. Una vez superado el tiempo de latencia los perfiles de disolución exhiben una velocidad de liberación similar en todas las formulaciones estudiadas. Este hecho pone de manifiesto que el grado de viscosidad del polímero hidrofílico empleado para el núcleo no resulta determinante en el perfil de disolución, como se pudo comprobar en el análisis estadístico de los resultados.

La tabla 2 muestra los resultados del tratamiento estadístico de los datos para la cantidad disuelta de fármaco a los tiempos 2, 6, 12 y 24 horas.

Los resultados del análisis estadístico muestran que en las primeras 6 h la liberación del fármaco depende tanto del incremento de peso como del tipo de polímero, y no del grado de viscosidad del polímero hidrofílico constituyente de la matriz. Sin embargo a partir de las 12 h la velocidad de disolución depende exclusivamente del incremento de peso de la cubierta. La ecuación siguiente refleja los factores involucrados en la disolución del fármaco a las 12 h:

$$Q12\% = 38{,}48 + 4{,}17\ Pol.rec. - 0{,}953\ \Delta P\%$$

Cantidad disuelta (Q) a tiempo	Factor estudiado	p
2 h	Tipo cubierta	0,000*
	% ΔP	0,005*
	Grado viscosidad HPMC	0,811
6 h	Tipo cubierta	0,002*
	% ΔP	0,007*
	Grado viscosidad HPMC	0,693
12 h	Tipo cubierta	0,064
	% ΔP	0,019*
	Grado viscosidad HPMC	0,574
24h	Tipo cubierta	0,297
	% ΔP	0,040*
	Grado viscosidad HPMC	0,163

*Tabla 2. Resultados del análisis estadístico de los perfiles de liberación del fármaco. ΔP=Incremento de Peso de la cubierta. * = p<0,05.*

4.- Conclusiones

Este estudio demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa en la liberación del fármaco desde una matriz hidrofílica dependiendo del tipo y cantidad de cubierta empleada. Los polímeros estudiados, FS30D y RL30D, son de utilidad para controlar la velocidad de liberación del fármaco.

5.- Referencias

[1] A. maroni, M. Dorly Del Curto, L. Zema, A. Foppoli, A. Gazzaniga, International Journal of Pharmaceutics, 475, 372-394, 2013.

[2] C. N. patra, R. Priya, S. Swain, G. K. Jena, K. C. Panigrahi, D. Ghose, Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 3, 33-45, 2017

Funcionalización polimérica con poli(ε-caprolactona) de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas

Gracia GARCÍA-GARCÍA [(1)], Silvia FUERTE-RODRIGUEZ [(1)], Fátima FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ [(1)] y José L. ARIAS [(1-3)].

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.
3. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: graciagg3@gmail.com

1.- Introducción

El uso de nanopartículas (NPs) de óxido de hierro, como por ejemplo la magnetita (Fe_3O_4), está siendo ampliamente investigado debido a su capacidad superparamagnetica con interesantes aplicaciones en Biomedicina. Sin embargo, es necesaria la mejora de sus propiedades fisicoquímicas para mejorar su biocompatibilidad, seguridad, semivida plasmática y aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico [1]. Con este objetivo, se propone el diseño de un coloide magnético funcionalizado con un recubrimiento de poli(ε-caprolactona) (PCL), un polímero con utilidad en la liberación sostenida de fármacos [2].

En el presente trabajo se caracterizan las NPs de Fe_3O_4/PCL por un método electroforético en función del pH y se determina su tamaño medio. Además, se estudia su capacidad magnética y se compara con la de NPs de Fe3O4/PCL.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Los reactivos químicos utilizados son de calidad analítica (Panreac Química S.L.U., España; y, Merck KGaA, Alemania).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Preparación de NPs Fe_3O_4/PCL

La metodología de formulación propuesta para la obtención de las NPs constituidas por núcleos de Fe_3O_4 embebidos en una matriz de PCL está basada en el método de disposición interfacial de polímero [2] en una proporción de Fe_3O_4:PCL 2:4 p/p, siendo precisa la adición de las NPs de óxido de hierro a la fase acuosa. Para ello, una solución orgánica de PCL se echó, gota a gota y bajo agitación mecánica (1200 rpm), sobre la dispersión acuosa al 2%, p/v de Pluronic® F-68. Las NPs de óxido de hierro se prepararon previamente por el método de co-precipitación química (n = 3) [3].

2.2.2.- Tamaño medio de partícula y propiedades eléctricas supeficiales

El potencial zeta (ζ) y el tamaño medio de las NPs se analizó usando un Malvern Autosizer® 4700 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) a una temperatura de 25.0 ± 0.5 ºC.

2.2.3.- Propiedades magnéticas

La determinación del ciclo de histéresis tuvo lugar usando un magnetómetro Quantum Design MPMS XL Squid, Quantum Design Inc, EE.UU.).

Para las pruebas *in vitro* macroscópicas del magnetismo de las dispersiones de NPs se hizo uso de un imán de 400 mT.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Tamaño medio de partícula

El tamaño obtenido de los nanocompuestos de Fe_3O_4/PCL es de 130 ± 4 nm. Este resultado posibilita, *a priori*, la administración de la dispersión de NPs de Fe_3O_4/PCL por vía parenteral, entre otras.

3.2.- Propiedades eléctricas superficiales

El ζ de las NPs de magnetita frente a un rango de pH de 3 a 9 mostró valores positivos hasta un pH de aproximadamente 7, su punto isoeléctrico. Sin embargo, las NPs de PCL presentaban valores negativos a pHs básicos y ligeramente ácidos presentándose su punto isoeléctrico alrededor de un pH 5. En pHs menores al de su punto isoeléctrico, el ζ de la PCL será positivo. Como cabía de esperar, las partículas magnéticas recubiertas muestran un comportamiento similar a las NPs de PCL debido la similitud de superficie (Fig. 1.)

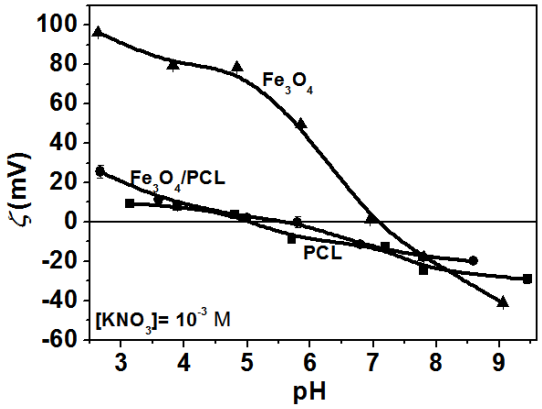


Fig. 1:Potencial zeta (ζ) de NPs de Fe_3O_4, de PCL y de Fe_3O_4/PCL en función del pH a una concentración fija de KNO_3 10^{-3}M.

3.2.- Propiedades magnéticas

Los materiales superparamagnéticos están caracterizados por presentar una histéresis de 0 para magnetización adquirida al someter a dicho material a un gradiente de campo magnético externo [1]. Debido a que en los dos tipos de NPs estudiadas su ciclo de histéresis pasa por el origen (Fig. 2), esto quiere decir que ambos son superparamagnéticos y que, por lo tanto, van a presentar numerosas aplicaciones biomédicas.

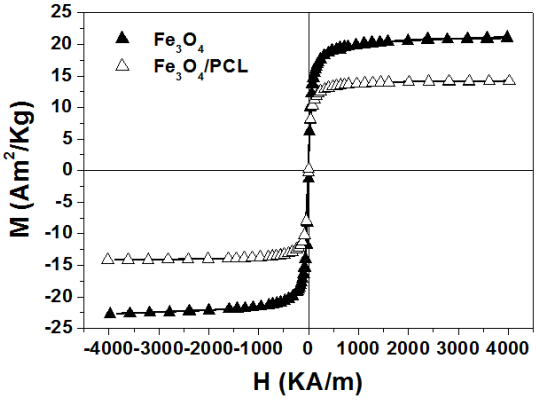


Fig. 2:Curva de histéresis de magnetita (▲) y de magnetita recubierta con PCL (Δ).

Sin embargo, la susceptibilidad magnética de la magnetita era mayor a la de las NPs combinadas lo cual se debe a que, en cantidades iguales de muestra, la proporción de magnetita será mayor en la muestra de NPs de Fe_3O_4 que en la de las NPs de Fe_3O_4/PCL. Es interesante destacar que en el comportamiento macroscópico de los dos tipos de dispersiones coloidales serán únicamente las partículas recubiertas las que presenten un magnetismo observable (Fig. 3.). Este hecho probablemente se deba a la presencia de varios núcleos magnéticos embebidos en la matriz polimérica de PCL lo cual repercute positivamente sobre la capacidad magnética de las NPs de Fe_3O_4/PCL resultantes.

Fig. 3: 0Evaluación macroscópica de la respuesta magnética de dispersiones de NPs Fe_3O_4/PCL (izquierda) y de NPs de Fe_3O_4 (derecha) frente a un campo magnético de 400 mT .

4.- Conclusiones

Se ha logrado establecer un procedimiento reproducible y eficaz para la funcionalización polimérica de NPs de Fe_3O_4. Los nanocompuestos tienen un tamaño ideal para las mayorías de las vías de administración utilizadas en farmacoterapia. El adecuado carácter superparamagnético del nanocompuesto abre las puertas a la investigación de su capacidad como agente de diagnóstico en resonancia magnética de imagen, en el transporte de agentes terapéuticos (fármacos y material genético) y como herramienta para la hipertermia magnética antitumoral.

5.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).

6.- Referencias

[1] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas y P. Couvreur, Chemical Reviews, 112, 11, 5818-78, 2012.

[2] L. Cabezas, R. Ortiz, J. Prados, A.V. Delgado, M. J. Martín, B. Clares, G. Perazzoli, J.M. Entrena, C. Melguizo y J.L. Arias, European Journal of Pharmaceutical Science, 102, 24-34, 2017.

[3] R. Massart, IEEE Transactions on Magnetics, 17, 1247-1248, 1981.

Influencia de las condiciones de formulación en el diseño de nanopartículas poli(ε-caprolactona) con capacidad de respuesta magnética

Gracia GARCÍA-GARCÍA [(1)], Nerea Gálvez Álvarez[(1)], Fátima FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ [(1)], Silvia FUERTE RODRIGUEZ[(1)] y José L. ARIAS [(1-3)].

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.
3. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: graciagg3@gmail.com

1.- Introducción

Los óxidos de hierro, como la magnetita (Fe_3O_4) se utilizan para el diseño de nanopartículas (NPs) con capacidad de respuesta ante la presencia de un campo magnético. De esta forma, se podría determinar el destino final de las NPs. Un diseño avanzado de NPs de magnetita basado en la modificación de su superficie con polímeros, como por ejemplo la poli(ε-caprolactona) (PCL), permitiría cargar en esta matriz polimérica agentes terapéuticos. Además, determinaría el tamaño final del coloide y la carga eléctrica superficial [1]. Por lo tanto, el diseño de NPs magnetopoliméricas es de gran interés para la liberación controlada de agentes terapéuticos.

En este trabajo se va a estudiar cómo afecta el uso de diferentes proporciones Fe_3O_4:PCL (p:p) a las características de tamaño de partícula, potencial zeta (ζ) y al rendimiento del proceso de obtención. Adicionalmente, se analizaran las propiedades magnéticas para su aplicación en biomedicina.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Los reactivos químicos utilizados son de calidad analítica (Panreac Química S.L.U., España; y, Merck KGaA, Alemania).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Formulación de nanopartículas de Fe_3O_4:PCL

La formulación propuesta para la obtención de las NPs de núcleos de magnetita embebidos en una matriz de PCL está basada en el método de disposición interfacial de polímero [2]. El polímero PCL disuelto en un disolvente orgánico se echó, gota a gota y bajo agitación mecánica (1200 rpm), sobre una dispersión acuosa al 2% de Pluronic® F-68 con las NPs de Fe_3O_4. Por otro lado, el método de co-precipitación química en solución se siguió para la producción de los núcleos de Fe_3O_4 [3]. Las proporciones utilizadas para la obtención de las nanoplataformas van de 4:1 a 1:4 (Fe_3O_4:PCL, p:p) (n = 3).

2.1.2.- Propiedades eléctricas supeficiales y tamaño medio de partícula

El potencial zeta, el tamaño medio de partícula y la polidispersión de las NPs de Fe_3O_4:PCL se midieron usando un Malvern Autosizer® 4700 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) a pH 6 y a una temperatura de 25.0 ± 0.5 ºC.

2.1.3.- Propiedades magnéticas

Se determinaron los parámetros de susceptibilidad inicial y magnetización de saturación de las NPs de Fe_3O_4:PCL de su ciclo de histéresis. Las medidas para el ciclo de histéresis de las NPs se obtuvieron usando un magnetómetro Quantum Design MPMS XL

Squid, Quantum Design Inc, EE.UU.) a 25.0 ± 0.5 ºC.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Optimización de la formulación Fe_3O_4:PCL

3.1.1.- Efecto de la relación p:p en el rendimiento del proceso de obtención y tamaño medio de partícula

Con el objetivo principal de elegir la proporción óptima se seleccionaron las NPs Fe_3O_4:PCL con un tamaño e índice de polidispersión (*PdI, polidispersity index)* más adecuado para la mayoría de las vías de administración. Además, se valoró la máxima optimización del proceso, por lo que otro factor a tener en cuenta fue su rendimiento. En la tabla 1 se comprueba que las NPs de Fe_3O_4:PCL de la proporción 2:4 son las que mejor se adaptan a los criterios mencionados: un pequeño tamaño de ≈ 130 nm idóneo para la administración parenteral apoyado por un buen *PdI* y un rendimiento de aproximadamente un 90 % pudiéndose así aprovechar gran cantidad de los materiales utilizados en la formulación.

Tabla 1. *Tamaño (nm), PdI y rendimiento (R, %) de la formulación de NPs de Fe_3O_4:PCL para cada una de las proporciones (p:p) estudiadas.*

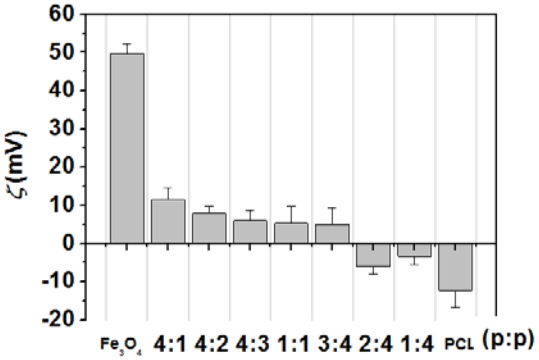
.

Proporción Fe_3O_4:PCL (p:p)	R (%)	Tamaño (nm)	*PdI*
4:1	15.8	135.8 ± 1.6	0.21 ± 0.02
4:2	17.7	142.0 ± 3.2	0.23 ± 0.01
4:3	29.1	137.9 ± 2.7	0.23 ± 0.02
4:4	80.1	196.1 ± 15.9	0.32 ± 0.04
3:4	69.1	277.6 ± 7.5	0.41 ± 0.01
2:4	91.5	127.9 ± 4.2	0.34 ± 0.03
1:4	62.3	455.5 ± 107.5	0.93 ± 0.06

3.1.2.- Carga eléctrica superficial

El estudio electroforético sirvió para avalar el pleno recubrimiento de los núcleos de Fe_3O_4 constituyendo otro factor de selección más de la proporción de NPs de Fe_3O_4:PCL 2:4 . Al obtenerse valores de ζ negativo similares a los de la PCL queda demostrado que los núcleos de magnetita quedan completamente embebidos en la matriz polimérica (fig.1.).

Fig. 1: Valores de potencial zeta de las NPs de Fe_3O_4:PCL, de las NPs de magnetita y de las NPs de PCL.



Este requisito es necesario puesto que si el recubrimiento de los núcleos no fuera suficiente, por ejemplo, la carga de agente terapéutico en este tampoco podría alcanzar la dosis terapéutica.

3.1.- Propiedades magnéticas

Para evaluar la capacidad magnética de las NPs de la proporción Fe_3O_4:PCL 2:4, se obtuvieron los valores de susceptibilidad inicial y de magnetización de saturación tras la realización del ciclo de histéresis. Respecto a la susceptibilidad inicial el valor obtenido fue de (0.189 ± 0.032) x 10^{-3} y, el de la magnetización de saturación fue de 13.74 ± 0.97 Am^2/kg. Estos resultados permiten confirmar que las NPs obtenidas poseen las propiedades magnéticas necesarias para su potencial aplicación biomédica.

4.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).

5.- Referencias

[1] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Chem. Rev., 112, 11, 5818-78, 2012.

[2] Arias J.L., López-Viota M., Sáez-Fernández E., Ruiz M.A., Colloids Surf B Biointerfaces, 75:204-208, 2010.

[3] R. Massart, IEEE Transactions on Magnetics, 17, 1247-1248, 1981.

Lyophilization of sildenafil citrate liposomes

Mª José de JESÚS VALLE [1,2], Silvia GONZÁLEZ CALLEJA [1], Isabel FERNÁNDEZ GARROSA [1] , Cristina MADERUELO MARTIN [1] , Paula COUTINHO [3,4], André R.T. ARAUJO [3,4], Maximiano PRATA RIBEIRO [3,4], Andreia MOREIRA ALVES [1,3], Amparo SÁNCHEZ NAVARRO [1,2]

1. Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, C/Licenciado Méndez Nieto sn, 37007 Salamanca, Spain
2. Institute of Biopharmaceutical Sciences of University of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain
3. CPIRN-IPG- Center of Potential and Innovation of Natural Resources, Polytechnic Institute of Guarda, Guarda, Portugal
4. CICS-UBI- Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilha, Portugal

Email de contacto:mariajosedj@usal.es

1.- Introducción

Sildenafil is a 5-phosphodiesterase (PDE-5) inhibitor drug, currently approved for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH), used by oral administration and intravenous injection [1]. Pulmonary drug delivery is an efficient method for passive drug targeting, with relevant advantages compared to systemic routes. Among drug carriers, liposomes have shown their safety for pulmonary drug delivery in animals and humans [2]. Nevertheless, few formulations intended for drug inhalation are based on liposomes. Their instability is one of their shortcomings and lyophilization is frequently carried out for liposome stabilization. Lactose monohydrate is a reducing sugar approved as excipient for dry powder aerosol formulations and mannitol has been tested as an alternative, since it does not participate in the solid-state decomposition Maillard reaction [3]. The aim of the present work was to study the lyoprotective effects of mannitol and lactose, compared to sucrose, when used for stabilization of lyophilized liposomes loaded with sildenafil citrate (SC).

2.- Material and methods

2.1.- Liposomes

Liposomes were prepared according to a previously described method based on direct sonication of components and pH transmembrane gradient for remote drug loading [4]. Multiple filtration though 0.45 µm filter was performed for size homogenization. The resulting lipid vesicles were characterized in terms of entrapment efficiency (EE%), aerodynamic diameter, (Dh), polydispersity index (PDI), and zeta potential. Centrifugation (14.000 rpm; 6ºC; 45 min) allowed the separation of the liposomes from the supernatant. The drug amount in the supernatant was quantified by HPLC and the EE% values were estimated from the Qlip/Qt ratio, where Qt is the total drug amount and Qlip is the drug amount in liposomes. Dh, PDI and zeta potential were determined by Dynamic light Scattering (DLS)

2.2.-Lyophilization

4% w/w of the lyoprotectant assayed (mannitol, lactose, sucrose, a mixture of mannitol and sucrose and a mixture of lactose and sucrose) was added to the liposome suspension and the mixtures were frozen at -78 ± 5 ºC, then dried for 24 h, 36 h or 48 h.

The remaining moisture (RM%) in the freeze-dried products was determined by the Karl Fisher method. The sample (0.1 g) was transferred to the titration cell and the volumetric water content was measured. Cakes were rehydrated to the original volume and the resulting liposome suspensions were characterized by DLS (Dh, PDI, zeta potential).

3.- Results and Discussion

SC loaded liposomes were obtained by direct sonication of components without using organic solvents. By the application of a transmembrane pH gradient the EE% reached optimal values (>85%), being the

drug loading (DL) high enough to be suitable for therapeutic doses of SC. Table 1 shows the characteristics of liposomes obtained, before lyophilization.

	EE %	DL	Dh nm	PDI	Zeta mV
Mean (sd)	86.49 (4.36)	52.09 (2.62)	233.29 (13.1)	0.23 (0.01)	-9.41 (0.07)

Table 1.- Characteristics of liposomes before lyophilization (DL in mg SC/g lipids)

Monodispersed samples were obtained with Dh and PDI mean values of 233.29±13.10 nm and 0.23±0.01, respectively. The liposomes showed negative surface charge with a mean value of zeta potential of -9.41 mV.

The appearance of the lyophilized cakes was homogeneous, irrespectively of the drying time and the lyoprotectant used. The microscopic observation revealed a sponge-like structure (Figure 1), typical for freeze-dried products.

Fig. 1.- *Microscopic aspect of cakes obtained with sucrose as the lyoprotective agent*

After cake rehydration, the liposome suspensions showed the same appearance as originals, despite Dh, PDI and zeta potential were modified. Table 2 includes the characteristics of liposomes after lyophilization and rehydration, together with the corresponding values of remaining moisture. The results obtained reveal that the liposomes did not retained their original properties in any case, and that these were closer to the originals for the longest drying times. In particular, Dh=393.40 nm, PDI=0.20 and Dh=328.20 nm, PDI= 0.39 were obtained after 48 h of drying with sucrose and lactose, respectively compared to Dh=233.29 ± 13.10, PDI=0.23 ± 0.01 observed in original samples. Mannitol, alone or in combination with sucrose, was the additive less effective regarding the maintenance of size and polydispersity of SC liposomes, despite the RM% of cakes containing mannitol being even lower than the values found with sucrose or lactose.

		RM %	**Dh nm**	**PDI**	**Zeta mV**
24h	M	3.15	1143.00	0.52	-5.62
	L	4.12	1098.00	0.78	-6.38
	S	3.88	725.30	0.62	-5.03
	M+S	3.34	1291.00	0.75	-5.57
	L+S	4.12	1366.00	0.60	-7.63
36h	M	3.38	849.70	0.52	-7.62
	L	3.81	643.50	0.70	-6.26
	S	3.50	385.80	0.39	-9.61
	M+S	2.74	814.30	0.59	-7.86
	L+S	3.33	976.90	1.00	-5.67
48h	M	2.72	501.40	0.41	-13.80
	L	3.68	328.20	0.39	-15.50
	S	3.40	393.40	0.20	-16.70
	M+S	3.03	754.70	0.48	-7.79
	L+S	3.85	419.50	0.32	-9.36

Table 2.- Characteristics of liposomes after lyophilization (M= mannitol; L= lactose S= sucrose)

4.- Conclusions

Liposomes showing characteristics suitable for pulmonary delivery of SC were obtained by direct sonication of components, without using organic solvents.

For lyophilization the results obtained with lactose were similar to those found with sucrose after 48 h of primary drying.

The Dh of lyophilized liposomes slightly increased compared to originals when sucrose or lactose were used as lyoprotective agents and the RM was 3.40% or 3.68%, respectively.

5.- References

[1] L. Simonca, R. Tulloh. Children, 4(7), 60, 2017.

[2] M. Rudokas, M. Najlah, M.A. Alhnan, A. Elhissi. Medical Principles and Practice, 25 (Suppl. 2), 60–72, 2016.

[3] P. Harjunen, T. Lankinen, H. Salonen, V.P. Lehto, K. Jarvinen. International Journal of Pharmaceutics, 263, 151–163, 2003.

[4] M.J. de Jesús Valle, P. Gil González, M. Prata Ribeiro, A. R. .T. S. Araujo, A. Sánchez Navarro. Applied Sciences, 8, 1291, 2018.

Aportación al comportamiento de curcumina en la bicapa de liposomas mediante un estudio calorimétrico: influencia sobre parámetros de estabilidad

Ana María FERNÁNDEZ-ROMERO [(1)], Carlota GARCÍA-MOLINA[(1)], María Luisa GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ[(1)], Antonio María RABASCO [(1)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2.

Email de contacto: anaferrom2@alum.us.es

1.- Introducción

Curcumina (Cur) es el principio activo presente en la cúrcuma, especia proveniente de Asia. Recientemente, se han descubierto numerosas propiedades de este compuesto, como su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerosa, entre otras [1, 2]. Muchas de estas propiedades derivan de su estructura química, que también es responsable de su escasa solubilidad y biodisponibilidad.

Existen numerosas estrategias para solventar estos problemas, entre la que destacan los liposomas, vesículas compuestas por lípidos anfifílicos organizados en estructura de bicapa que encierran un espacio acuoso, lo que permite la encapsulación de compuestos lipófilos, hidrófilos y anfóteros [3]. Por lo general se componen de un fosfolípido, colesterol y un lípido que aporta carga superficial, ya sea positiva o negativa [4]. No obstante, la curcumina interacciona con estas bicapas [5], lo que podría afectar a su estabilidad.

A la luz de estas evidencias, el objetivo del presente trabajo es analizar la posible existencia de interacciones entre diferentes lípidos cargados positivamente y la curcumina y la influencia de éstos en la estabilidad de los liposomas. De entre los diferentes lípidos cargados positivamente, se seleccionaron la estearilamina (EA) y el bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB).

2.- Métodos

2.1.- Estudio de la interacción curcumina-agente de carga

Para determinar la existencia de alguna interacción entre alguno de estos agentes y la curcumina, se llevaron a cabo estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía en platina caliente (HSM) con una velocidad de calentamiento de 33K/min.

Las muestras a analizar fueron Cur pura, Cur-EA (1:4 p/p) y Cur-DDAB (1:6.86 p/p) tratados según el método de fabricación de liposomas.

2.2.- Preparación de liposomas con curcumina

Los liposomas se prepararon mediante la técnica de evaporación en capa fina descrita previamente [4]. Para ello, 64.84 µmol de fosfatidilcolina, 12.41 µmol de colesterol, 14.84 µmol de agente de carga y 1 mg de curcumina de disolvieron en 3.8 mL de metanol y 4.2 de cloroformo. Una vez evaporados los disolventes, se formó un film lipídico que se hidrató con 3 mL de PBS a pH 6.5.

2.3.- Estudio de estabilidad

Para la realización de este estudio se prepararon liposomas con DDAB, con EA y sin ningún tipo de agente de carga como control. Se analizaron el tamaño de las vesículas, su homogeneidad, la carga superficial, el porcentaje de encapsulación (PDE) y la capacidad antioxidante de la curcumina mediante la técnica del ABTS.

Los liposomas se mantuvieron aislados de la luz y a 4ºC durante 4 semanas. Se tomaron 5 muestras, una 24 h después de la fabricación

de los liposomas y los 4 restantes, semanalmente.

3.- Resultados y Discusión

3.1.- Análisis calorimétrico

Tras el análisis de las diferentes muestras, se observó que la curcumina precipita en forma amorfa debido a la rápida evaporación de los disolventes en el rotavapor, que no permite un reordenamiento adecuado de los cristales. Por otro lado, la mezcla de ésta con ambos agentes de carga revela nuevos picos en los termogramas, que no corresponden con los termogramas de los compuestos comerciales. Mediante un análisis detallado por HSM, se puso de manifiesto que los picos corresponden a un fenómeno de fusión de los agentes de carga seguido de una disolución de la curcumina en ellos.

3.2.- Estudio de estabilidad de los liposomas

Una vez obtenidos los resultados de los parámetros mencionados en el apartado 2.3, se observó una disminución de la carga superficial con el tiempo, acompañada de un aumento de los tamaños. Además, se aprecia una fluctuación en la homogeneidad de los liposomas, especialmente acusada en el caso de aquellos con EA, lo cual podría deberse a procesos de agregación y fusión.

Respecto a la encapsulación (Fig. 1), se observa un descenso de la encapsulación a las 3 semanas seguido de un repunte al mes.

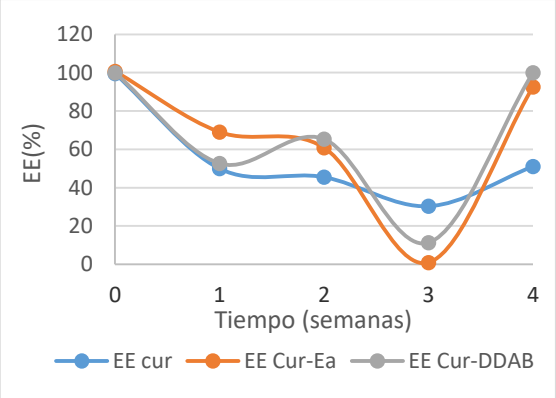


Fig. 1: Encapsulación de liposomas. Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

Este descenso podría deberse a los procesos de fusión mencionados anteriormente que favorecerían la salida del fármaco, mientras que el repunte se puede deber a una aproximación de las moléculas de curcumina debido a la presencia de cargas opuestas que neutralizarían la carga superficial y, al mismo tiempo, facilitarían la internalización de la misma.

Respecto a la capacidad antioxidante, se observó que los liposomas formulados con DDAB mantienen la capacidad antioxidante de la curcumina durante más tiempo que aquellos formulados con EA o neutros.

4.- Conclusiones

De estos estudios se puede concluir que, en principio, no existe una interacción molecular entre los agentes de carga y la curcumina. Además, se deduce que los procesos de fusión y agregación afectan negativamente a la cantidad de fármaco encapsulado en el liposoma. Sin embargo, la naturaleza tensioactiva del DDAB permite la reubicación de la curcumina en la bicapa. Además, éste conserva las propiedades antioxidantes de la curcumina durante todo el tiempo de estudio.

5.- Referencias

[1] S. Ghosh, S. Banerjee, PC. Sil, Food and Chemical Toxicology, 83, 111-124, 2015.

[2] Y. Sunagawa, Y. Katanasaka, L. Hasegawa, T. Morimoto, Biochemical Pharmacology, 3(4), 131-135, 2015.

[3] J. Oliveira, M. Claro, D. Souza, R. Petrilli, J. Palma, A. Barcellos, et al, Colloids and Sufaces B: Biointerfaces, 123, 345-363, 2014.

[4] F. Maestrelli, ML. González-Rodríguez, AM. Rabasco, P. Mura, International Jounal of Pharmaceutics, 298 (1), 55-67, 2005.

[5] A. Karewicz, F. Bielska, B. Gzyl-Malcher, M. Kepczynski, R. Lach, M. Nowakowska, Colloids and Sufaces B: Biointerfaces, 88, 231-239, 2011.

Optimization of doxorubicin encapsulation conditions within liposomes: effect of gold nanoparticles

Nabila NAITLHO[1], María Luisa GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ[1], Antonio María RABASCO[1], Manuela RUEDA[2], Francisco PRIETO[2]

[1] Department of Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 2. 41012. Seville

[2] Department of Physical-Chemistry. Faculty of Chemistry, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 0. 41001. Sevilla

Email: malugoro@us.es

1.- Introduction

Over the last years, advances in nanotechnology have increased the interest in developing gold nanoparticles (AuNPs) for a wide range of applications [1] due to their stability and biocompatibility. AuNPs have been shown to provide therapeutic enhancement in cancer treatment where their efficacy relies on the successful delivery of the particles like doxorubicin encapsulated into liposomes to the tumor site and internalization into tumor cells.

All these features prompted us to investigate the possibility of developing these nanoparticles as controlled release drug formulations finding out the effect of the incubation time and the anchoring of the gold nanoparticles [2].

2.- Materials and methods

Pre-weighed lipids, DPPC, cholesterol, and DDAB (in 75,25:3,63:21,12 mol % ratio) were dissolved in chloroform; then, the mixture was subsequently dried, forming a thin film after rotary evaporation. The dried lipid film was then hydrated with 3 mL of 250 mM $(NH_4)_2SO_4$ in a 42°C water bath and dispersed into multilamellar vesicles with 5 min in the water bath alternated with 1 min of vortexing 5 times. The liposomes were then passed through a polycarbonate membrane (800 than 200 nm pore size) 3 times with an extruder (Avanti, Alabaster, AL). The above unilamellar liposomes prepared in 250 mM $(NH_4)_2SO_4$ were separated from the loading solution by dialysis. AuNPs-liposome complexes were prepared by adding the AuNPs suspension of diameter 10 nm to the liposome dispersion in Hepes 7.4 at ratio of 8/3 (v/v) and stirred with a vortex. DOX was loaded into the preformed liposomes and AuNPs-liposomes via a transmembrane pH gradient method during 30 minutes, 1 hour and 2 hours at 42°C. The unloaded DOX was removed by Sephadex G50 column preequilibrated with HEPES pH 7.4. The amount of encapsulated DOX into the liposomes was determined by UV-visible spectrophotometer (Agilent 8453 System) after lysing liposomes with Triton X-100 (0.5% v/v). The release of doxorubicin from liposomes and AuNPs-liposome system was carried out by means of dialysis method. Finally, a kinetic study of release profiles was carried out.

3.- Results and discussion

The loading efficiency of drug from both liposomes and AuNPs-liposomes was up to 80% after 1 hour of incubation (Fig.1), which indicated that the gold nanoparticles coating onto the liposomes surface did not affect the drug loading [3]. On the other hand, for an incubation time of 2 hours we have observed that the effectiveness of encapsulation is slightly lower, indicating that 60 minutes are ideal to achieve maximum encapsulation of doxorubicin into liposomes.

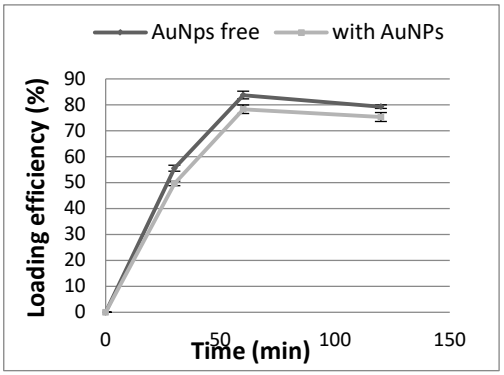


Fig. 1: Loading efficiency of doxorubicin (DOX) into liposomes and AuNPs-liposomes were determined by UV-visible spectrophotometry.

The *in vitro* DOX release profiles from AuNPs/DOX-Liposomes and DOX-Liposomes are shown in Fig. 2. When the release assay is carried out at 42 °C, significant amounts of encapsulated DOX were released from the Liposomes and AuNPs/Liposomes (40%) in only 2 hours. the release of doxorubicin is especially favored from AuNPs/Liposomes (65%) within 8 hours; In contrast, approximately 57 % of the encapsulated DOX was released from test Liposomes.

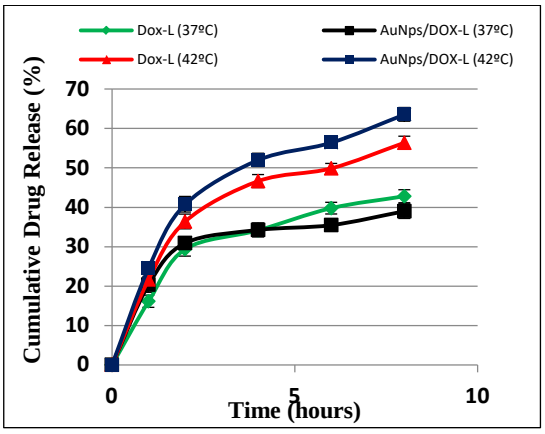


Fig.2: Release profiles of DOX from Liposomes and AuNPs/Liposomes that were incubated at 37 ºC or 42 ºC (n= 2)

Four kinetic models namely zero order, first order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas were fitted to in vitro DOX release data. R^2 value close to 1 indicated Peppas model as the best fit model (table 1); ŋ was found to be lesser than 0.45 which indicated that mechanism of DOX release from liposomes follows a Fickian diffusion [4].

Sample (T°C)	Korsmeyer-Peppas	
	ŋ	r^2
Dox_lipo (37º)	0,4416	0,9195
Dox_lipo/AuNPs (37º)	0,2825	0,8859
Dox_lipo (42º)	0,436	0,9444
Dox_lipo/AuNPs (42º)	0,4346	0,9512

Table 1: Release kinetics models curve fitting for Dox/Lips and DOX/AuNPs-lips.

4.- Conclusion

Our findings may provide an important foundation of liposomal drug delivery systems coated with gold nanoparticles, in terms of the optimal conditions for encapsulating doxorubicin within liposomes or AuNPs-liposomes.

5.- Acknowledgments

This work is part of the project CTQ2014-57515-C2-1-R"Nanostructured interfaces derived DNA for molecular recognition and biomedical applications" project, funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, 2014.

6.- References

[1] X Lu , H Tuan , BA Korgel , Y Xia Y. Facile synthesis of gold nanoparticles with narrow size distribution by using AuCl or AuBr as the precursor. Chem Eur J. 14:15(84_91) 2008.

[2] D Missirlis , R Kawamura, N Tirelli, & JA Hubbell. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*, *29*(2), 120-129. 2006.

[3] HJ Kwon, Y Byeon, H N Jeon, S H Cho, HD Han, & BC Shin. (2015). Gold cluster-labeled thermosensitive liposmes enhance triggered drug release in the tumor microenvironment by a photothermal effect. *Journal of Controlled Release*, *216*, 132-139 (2015).

[4] F Haghiralsadat, G Amoabediny, M Helder, S Naderinezhad, M Sheikhha, T Forouzanfar, & B Zandieh-doulabi. A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *46*(1), 169-177 (2018).

Utilización de eritrocitos procedentes de banco de sangre para la obtención de portadores celulares homólogos como DDS

Carmen GUTIÉRREZ MILLÁN [1,2], Marina PALACIOS GARROTE [1], Clara Isabel COLINO GANDARILLAS[1,2], José M. LANAO [1,2]

1. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Salamanca
2. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Email de contacto: carmengutierrez@usal.es

1.- Introducción

La utilización de los denominados portadores biológicos se ha venido investigando como alternativa a los sistemas sintéticos tradicionales, para el desarrollo de nuevas formas de administración de fármacos desde hace más de treinta años. Así, se han empleado *Drug Delivery Systems (DDS)* basados en células con aplicaciones en patologías muy diversas [1].

Los eritrocitos destacan en este campo como los portadores biológicos más abundantes, biocompatibles, asequibles y de fácil manejo. Los sistemas basados en eritrocitos han demostrado ser potenciales vectores de gran variedad de moléculas con utilidad terapéutica, desde moléculas pequeñas a péptidos de elevado peso molecular como enzimas, e incluso material genético.

Su aplicación al campo de los antiinfecciosos ha demostrado una mayor vectorización a órganos y tejidos del sistema monocito-macrófago [2].

La mayoría de los procedimientos de encapsulación de fármacos se basan en la utilización de sangre fresca recién extraída, tanto de humanos como de otras especies animales, lo cual complica la metodología, implica una inmediata obtención y aplicación de los eritrocitos cargados y limita su uso únicamente a un individuo.

El objetivo de este trabajo es optimizar un proceso de encapsulación en eritrocitos humanos procedentes de banco de sangre, lo que ampliaría considerablemente la aplicabilidad de nuestro DDS.

2.- Material y métodos

Se propone la utilización de amicacina como fármaco modelo dada la amplia experiencia de nuestro grupo con dicho fármaco y las ventajas que ya ha demostrado su aplicación tanto en humanos como en animales de experimentación.

2.1.- Encapsulación de amicacina

El método de encapsulación se basa fundamentalmente en una diálisis hipotónica seguida de resellado, tal y como se recoge en la Figura 1.

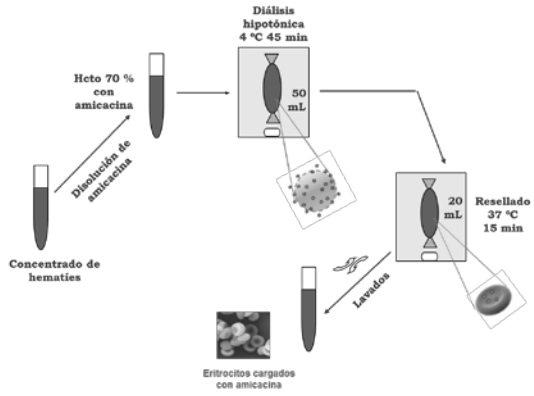


Figura 1. Técnica de encapsulación basada en la diálisis hipotónica.

2.1 Determinación de la cantidad encapsulada

Los eritrocitos cargados fueron precipitados con una solución de ácido tricloroacético al 20 % en proporción 1:1 (v/v).

2.2.- Liberación *in vitro*

La liberación del antibiótico desde los eritrocitos cargados se llevó a cabo mediante diálisis frente a un medio isotónico en proporción 1/10 (v/v) y la amicacina liberada se expresó como porcentaje del total de amicacina encapsulada.

2.3.- Cuantificación del fármaco

La cuantificación de amicacina se llevó a cabo mediante una técnica de UPLC con derivatización precolumna con o-phtaldialdehído y detección por fluorescencia ($\lambda_{excitación}$=343 nm y $\lambda_{emisión}$=460 nm) con una fase móvil constituida por metanol (67 %) y disolución acuosa (2,2 g de EDTA tripotásico por litro de fase móvil) a 37 ºC.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Encapsulación de amicacina

La concentración de amicacina encapsulada en eritrocitos portadores con el método propuesto fue de 1,99 ± 0,81 mg/mL, observándose una mayor encapsulación que la obtenida con el mismo procedimiento por nuestro grupo con eritrocitos frescos de rata recién extraídos (0,82 ± 0,09 mg/mL).

3.1.- Liberación *in vitro*

Como se puede observar en la Figura 2, los eritrocitos dan lugar a una liberación sostenida de amicacina, manteniéndose en su interior un alto porcentaje del fármaco encapsulado incluso a las 24 horas de la experiencia.

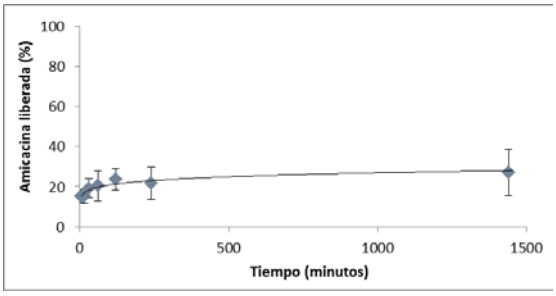


Figura 2. Liberación in vitro de amicacina desde eritrocitos portadores homólogos

4.- Conclusiones

La aplicación de un método de diálisis hipotónica y resellado a eritrocitos humanos procedentes de banco de sangre permite obtener eritrocitos cargados con importantes concentraciones de antibiótico.

Los estudios *in vitro* revelan una lenta liberación de amicacina desde estas células, permaneciendo un alto porcentaje de la amicacina encapsulada en el interior de los mismos durante un periodo de 24 h. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la potencial utilidad de eritrocitos procedentes de banco de sangre como alternativa a los eritrocitos autólogos para la preparación de DDS.

5.- Referencias

[1] C.H. Villa1, A.C. Anselmo, S. Mitragotri V. Muzykantov, Advanced Drug Delivery Reviews 106, 88–103, 2016.

[2] E. Briones, C.I. Colino, C.G. Millán, José M. Lanao, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 38, 320–324, 2009.

Estimación de la solubilidad del etoricoxib utilizando el modelo de Jouyban-Acree

Begoña ESCALERA IZQUIERDO, Norma TORRES PABÓN, Mª Ángeles PEÑA FERNÁNDEZ

Departamento de Ciencias Biomédicas, U.D. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid
Email de contacto: begona.escalera@uah.es

1.- Introducción

El etoricoxib (5-cloro-6'-metil-3- [4-(metilsulfonil) fenil] -2,3'-bipiridina) (ETX) es un analgésico antiinflamatorio inhibidor selectivo de COX-2 comúnmente utilizado en el tratamiento de trastornos reumáticos crónicos, generalmente administrados a una dosis de 60 a 120 mg al día [1]. Se presenta en formas de dosificación orales e inyectables. De acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutico pertenece a la clase II porque no cumple con los criterios establecidos por la FDA para ser clasificado como un fármaco de clase I. Se trata de un polvo cristalino blanco con baja solubilidad en agua, lo cual, restringe visiblemente su uso terapéutico.

Desde el punto de vista farmacéutico la información fisicoquímica sobre solubilidad y velocidad de disolución en disolventes acuosos para muchos fármacos no está determinada y es muy relevante en etapas tempranas del diseño y desarrollo de nuevos fármacos en la industria farmacéutica [2]. Se estima que casi el 40% de los fármacos candidatos no progresan más allá de las etapas iniciales de experimentación y nunca llegan al mercado debido a su escasa solubilidad en agua [3].

Se emplean diversas técnicas de hidrosolubilización para aumentar la solubilidad acuosa de principios activos, siendo, una de las más convenientes, la utilización de codisolventes.

En los últimos años son muchos los modelos matemáticos que nos permiten estimar, correlacionar y predecir la solubilidad de los fármacos. Existen recientes estudios sobre la determinación de la solubilidad del ETX en codisolventes como 1,4-butanodiol, 1,4-dioxano, etanol, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilacetamida, glicerina, metanol, polietilenglicol, propilenglicol o N,N-dimetilformamida [1, 4-5].

En este trabajo se determinó la solubilidad del ETX a 25ºC en una mezcla etanol-agua (intervalo de polaridad: 26 – 47 $MPa^{1/2}$). Los datos de solubilidad se predijeron empleando el modelo de Jouyban-Acree [4], este modelo tiene una aplicación potencial en los estudios de preformulación y formulación durante los cuales los cálculos de solubilidad y densidad son propiedades fisicoquímicas significativas para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos en la industria farmacéutica. Estos cálculos podrían usarse además para predecir la solubilidad en otros disolventes y también para detectar posibles valores atípicos en resultados de solubilidad experimentales.

2.- Material y métodos

Etoricoxib (Laboratorios Rovi).
Agua bidestilada y etanol (grado espectrofotométrico. Panreac, Monplet & Esteban).

Las suspensiones se preparan a 25ºC y se sitúan en baños provistos de agitación constante hasta alcanzar la saturación (4 días). Tras alcanzar el equilibrio de solubilidad, la fase sólida se separa por filtración a través de membranas Durapore (0,22 µm). La concentración de la fase disuelta filtrada se determina por espectrofotometría ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción previamente seleccionada (λ=235 nm). Las densidades de las disoluciones saturadas se midieron usando un picnómetro de 10 ml (previamente calibrado con agua desionizada doblemente destilada) a 25ºC con una incertidumbre de ± 0,0001 g. Una vez que se conocen las densidades, las solubilidades pueden expresarse en fracción molar. Además, se

determinó el contenido de agua del fármaco, utilizando el test rápido de Karl Fischer (KF).

3.- Resultados y discusión

Como se observa en la Fig. 1 el ETX empleado tiene muy baja humedad, es prácticamente anhidro.

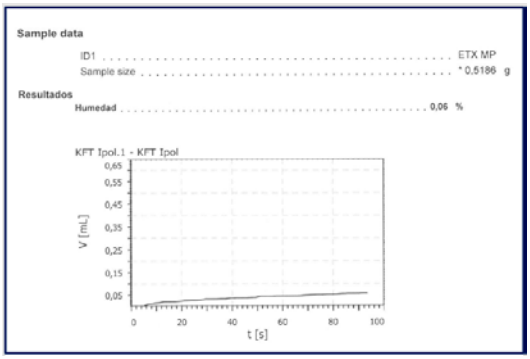


Fig. 1: Valoración por KF de ETX

En la Fig. 2 se observa un aumento continuo de la solubilidad del ETX desde el agua (1) hasta el etanol (2). En general, la adición de una pequeña cantidad de un disolvente menos polar (2) a un disolvente más polar (1), aumenta la solubilidad de un fármaco hidrófobo como el ETX y disminuye la solubilidad de fármacos hidrofílicos y / o ionizados.

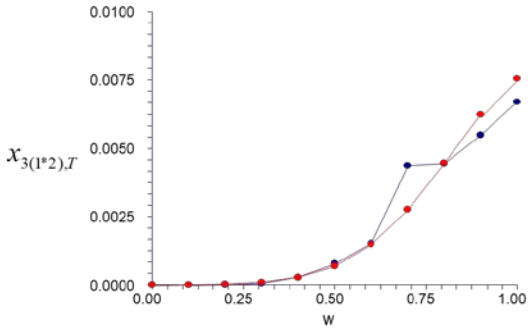


Fig. 2: Solubilidad de ETX en etanol-agua a 25ºC.l ● Estimada ● Experimental

El estudio de estimación de la solubilidad se realizó adecuadamente utilizando el modelo de Jouyban-Acree [4]:

$$\ln x_{3(1+2),T} = w_1 \ln x_{3(1),T} + w_2 \ln x_{3(2),T} + \left(\frac{w_1 w_2}{T}\right)\sum_{i=0}^{2} J_i (w_1 - w_2)^i$$

en la que, $x_{3(1*2),T}$, $x_{3(1),T}$ y $x_{3(2),T}$ es la solubilidad experimental del soluto y la solubilidad en cada monodisolvente, (1) agua y (2) etanol, a una temperatura T en Kelvin; w_1 y w_2, la fracción de masa de los disolventes en ausencia del soluto; los términos Ji son las constantes del modelo calculadas usando un análisis de mínimos cuadrados [5]. El modelo Jouyban-Acree permitió correlacionar diferentes propiedades fisicoquímicas en el sistema de disolvente estudiado (etanol-agua) (Fig.2) [6].

En la Tabla 1 se presentan los resultados experimentales y predichos de la solubilidad con la ecuación anterior. El error se calcula con la expresión:

$$\text{Error} = \sum \frac{\left|x^{cal}_{3(1+2)} - x_{3(1+2)}\right|}{x_{3(1+2)}}$$

los valores fueron inferiores al 3,5%.

Tabla 1. Solubilidad experimental y calculada con el modelo de Jouyban-Acrre

w	$x_{3(1*2),T}$ Experim.	$x_{3(1*2),T}$ Estim.	Error
0	2,379	1,734	-2,44
0,1	7,3553	7,649	0,33
0,2	2,173	2,922	2,76
0,3	6,814	9,670	3,65
0,4	0,0002	0,0002	0,02
0,5	0,0007	0,0006	-1,78
0,6	0,0015	0,0014	-0,56
0,7	0,0043	0,0027	-8,45
0,8	0,0044	0,0044	0,06
0,9	0,0054	0,0062	2,47
1	0,0066	0,0075	2,39

4.- Referencias

[1] Rathi PB., Kale M., Soleymani J., Jouyban A. J. Chem. Eng. Data, 63 (2), 321–330, 2018.

[2] Jouyban, A. Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010.

[3] Williams H D., Trevaskis N L., Charman S A., Shanker R M. Charman WN. Pouton C W. Porter, CJ. Discov Dev Pharmacol. Rev. 65, 315–499, 2013.

[4] Jouyban-Gharamaleki A., Acree Jr WE. Int. J. Pharm., 167, 177–182, 1998.

[5] Jouyban A., Khoubnasabjafari M., Chan HK., Acree Jr. WE. Pharmazie 61, 789–792, 2006.

[6] Jouyban A.; Azarmir O.; Mirzaei S.; Hassanzadeh D.; Ghafourian T.; Acree W. E.; Nokhodchi A. Chem. Pharm. Bull., 56, 602– 606, 2008.

Identificación de formas polimórficas del metamizol magnésico

Mª Ángeles PEÑA[1], Francisco REALES[1], Antonio PEÑA-FERNÁNDEZ[2], Begoña ESCALERA[1]

1. Departamento de Ciencias Biomédicas, U.D. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid
2. Faculty of Health and Life Sciences, De Montfort University, The Gateway, Leicester LE1 9BH, UK.

Email de contacto: angeles.pena@uah.es

1.- Introducción

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio térmico, por calorimetría de barrido diferencial (DSC), para describir diferentes procesos térmicos del metamizol magnésico (MM), una pirazolona con efectos analgésicos, antipiréticos y espasmolíticos, tales como fusión, cristalización, conversión polimórfica, desolvatación o deshidratación. Para lograrlo se han empleado dos técnicas, la cristalización y el tratamiento térmico.

2.- Material y métodos

Metamizol magnésico (Laboratorios Fagrón). Agua bidestilada, ciclohexano, cloroformo, dioxano, dimetilformamida, pentanol, acetato de etilo (grado espectrofotométrico. Panreac, Monplet & Esteban).

Se determinó la entalpía (ΔH^F) y temperatura de fusión (T^F) por calorimetría diferencial de barrido (DSC, Mettler DSC3) a diferentes velocidades de calentamiento. El peso de las muestras utilizado fue ≅ 4 mg en todos los casos. Las suspensiones se prepararon a 25ºC y se colocaron en baños provistos de agitación constante hasta saturación. Las fases sólidas se separaron por filtración (0,45 µm) y se dejaron recristalizar por enfriamiento espontáneo y evaporación a temperatura ambiente. Los cristales obtenidos se almacenaron en ausencia de luz y en un desecador con sílice.

3.- Resultados y discusión

Los termogramas de las sales se caracterizan en general por la presencia de varios picos. En la Fig. 1 se muestra el termograma del polvo original obtenido a una velocidad de calentamiento 10ºC/min, se observa un primer pico asociado, previsiblemente, a una transformación polimórfica sólido-sólido, seguido de un segundo evento endotérmico que corresponde a la temperatura de fusión (136,4 ºC; calor de fusión 1722 J/g), y finalmente aparecieron diferentes picos asociados a la descomposición, provocados por la oxidación de algún residuo orgánico, que comienzan alrededor de los 185ºC.

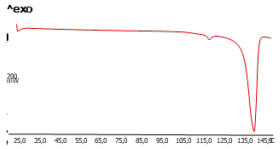


Fig. 1: Termograma polvo original

Un mismo compuesto puede cristalizar en diferentes especies cristalinas. Los polimorfos exhiben diferentes propiedades ópticas, puntos de fusión, solubilidad, reactividad química, velocidad de disolución y biodisponibilidad. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos polimorfos es transcendental en el campo farmacéutico, tanto en el desarrollo de productos genéricos como de fármacos y excipientes conocidos. Una de las formas empleadas para identificar formas polimórficas o pseudopolimórficas es la cristalización en un disolvente determinado. Este estudio se realizó con las fases sólidas en equilibrio con cada uno de los disolventes seleccionados, con objeto de comprobar si estos inducen algún cambio de fase. La cristalización y la precipitación dan como resultado la formación de un sólido cristalino a partir de una suspensión y posterior procesamiento para lograr la sobresaturación seguida de la nucleación y el crecimiento. Los parámetros de procesamiento comunes incluyen, el ajuste de la temperatura, tiempo, pH, concentración

del fármaco y naturaleza y composición del disolvente [1].

Cabe señalar que la desecación de todas las fases sólidas se llevó a cabo a temperatura ambiente para no afectar la estructura del cristal o al disolvente retenido en los intersticios de la red. Posteriormente, los cristales obtenidos se colocaron en un desecador para visualizar mejor las endotermas, y también permite evidenciar que, en presencia de humedad, algunos eventos podrían estar enmascarados. La temperatura de fusión (T^F, ^oC) y la entalpía de fusión molar (ΔH^F, J/mol) para las fases solidas de cada uno de los disolventes estudiados a una velocidad de calentamiento de 10ºC/min se muestran en la Tabla I. Se destaca que los resultados de las muestras en desecador no produjeron ningún cambio.

Tabla 1. Temperatura de fusión y la entalpía de fusión para cada disolvente a 10 ºC / min

Diolventes	T^F (ºC)	ΔH^F (J/g)	Velocidad calentamiento (ºC/min)	Transformación sólido-sólido Onset (ºC)	Peso (mg)
Agua	-	-	10	-	4.59
Pentanol	140.45	-1722.02	10	136.88	4.66
Acetato de etilo	141.35	-1907.17	10	137.38	4.24
Ciclohexano	142.19	-1521.69	10	137.76	4.72
Cloroformo	141.69	-1589.74	10	136.05	4.27
Dixano	141.44	-1618.90	10	137.85	4.80
Dimetilformamida	-	-	10	-	-

Se observó la formación de un hidrato (pseudopolimorfismo) en la fase sólida acuosa mientras que las fases sólidas en contacto con los disolventes no acuosos no mostraron el pico endotérmico relacionado con la evaporación del disolvente. La presencia de las moléculas de agua influye en las interacciones intermoleculares (que afectan la energía interna y la entalpía) y el desorden cristalino (entropía) y, por lo tanto, influye en la energía libre, actividad termodinámica, solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad y biodisponibilidad.

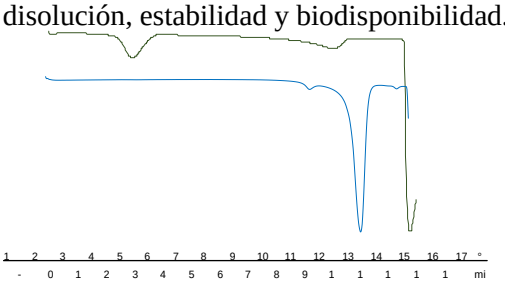


Fig. 2: Termograma MM con las fases sólidas agua (verde) y dioxano (azul)

En la Fig. 2 se muestran los termogramas de las fases sólidas en equilibrio con las disoluciones saturadas en agua y en dioxano. En el termograma del agua aparece un primer pico que se asocia con la presencia de agua de cristalización a 50°C. Se comprobó que no es otro evento porque se eliminó por calentamiento en un horno a temperaturas alrededor de 60°C. El segundo evento endotérmico se relaciona con la fusión de la forma anhidra asociada con una transformación polimórfica a una forma más estable a 130ºC. Continúa con la fusión a 158°C y posterior descomposición en sucesivas endotermas. Este comportamiento ya ha sido descrito previamente para numerosos fármacos, como cafeína [2], teofilina o diclofenaco sódico.

Para el resto de las fases sólidas los termogramas son iguales al del polvo original, pero con variaciones en los valores de temperaturas de fusión, en los disolventes acetato de etilo, cloroformo y dioxano. Estos hallazgos permiten identificar una nueva forma cristalina llamada Forma I. No se tiene constancia de ningún estudio previo que identifique polimorfos en este fármaco. Por lo tanto, los resultados encontrados con los disolventes mencionados anteriormente son muy significativos.

Por otro lado, el MM polvo original se colocó en un horno a 100 ºC durante 3 horas, ya que es conocido que el tratamiento térmico puede producir polimorfismo en compuestos de hidrocarburos de cadena larga [3]. Los resultados muestran un aumento drástico en el área del primer pico, de 18,64 Jg^{-1} a 59,28Jg^{-1} y un descenso en la temperatura de fusión (130ºC).

Estos resultados deberán contrastarse con el empleo de nuevas técnicas y considerar nuevas identificaciones de formas polimórficas del metamizol magnésico.

4.- Referencias

[1] Higashi K, Ueda K, Maoribe K. Adv. Drug Deliv. Rev., 117(1), 71-85, 2017.

[2] Bustamante P, Navarro J, Romero S, Escalera B. J Pharm Sci., 91(3), 874-883, 2002.

[3] Park K, Evans J, Myerson A. Crystal Growth Design., 3(6), 991–995, 2003.

Gominolas medicamentosas. Alternativa galénica en la formulación de Medicamentos Individualizados

Aránzazu ZARZUELO CASTAÑEDA [(1)], Mª Eugenia VILLALBA ÁLVAREZ[(1)], Adela SÁNCHEZ ÁVILA[(2)]

1. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Salamanca
2. Farmacia Ávila Bardají. Calle Gran Vía 24, 37001 Salamanca

Email de contacto: drury@usal.es

1.- Introducción

Un problema frecuente que se encuentran hoy en día los pediatras es la necesidad de adecuar la dosis de los medicamentos existentes en el mercado a sus pacientes, así como seleccionar formas farmacéuticas que faciliten el cumplimiento fármaco-terapéutico prescrito [1]. El pediatra debe tener en cuenta tanto la vulnerabilidad y las características farmacocinéticas del paciente, como el distinto volumen de distribución o un metabolismo hepático más reducido [2]. Estos pacientes no pueden ser tratados como adultos en miniatura, ya que la infancia es una etapa de cambio constante en el crecimiento y desarrollo, lo que condiciona que las pautas terapéuticas se tengan que ir adaptando a grados muy distintos de maduración.

El objetivo de este estudio ha sido el diseño y elaboración de gominolas para facilitar el tratamiento terapéutico a pacientes que por un lado no encuentran la medicación en el mercado y, si lo encuentran, lo rechazan bien por su sabor, bien por el proceso de adaptación, etc.

2.- Material y Métodos

2.1.- Diseño de la formulación

Debido a la poca información sobre la elaboración de gominolas se realizaron pruebas con el fin de fijar el gelificante (gelatina, agar-agar, pectina) y las cantidades óptimas del mismo, agua, edulcorante y saborizante [3]. Tras definir el modus operandi de la base de las gominolas, se elaboraron gominolas de tetracaina (2,5 mg) e ibuprofeno (100 mg).

2.2.- Preparación de gominolas

- Calentar el agua (100 ml) en placa calefactora, a una temperatura de 90ºC.
- Añadir el edulcorante (125 g sacarosa) y la gelatina (17,5 g) hasta obtener una solución completamente homogénea y sin burbujas; el punto crítico de la elaboración de la fórmula es la duración del proceso de calentamiento y agitación (45 minutos).
- Añadir la tetracaina o el ibuprofeno, éste último tamizado a través de malla de 0,025 µm y añadir el saborizante y colorante.
- Rellenar los moldes por peso.

2.3.- Conservación de las gominolas

Sobre los primeros lotes de gominolas de tetracaina se hicieron pruebas para conocer su comportamiento con el tiempo y las condiciones óptimas de conservación. La conservación de las gominolas en frío (5-8ºC) o en envase de vidrio o PVC cerrado, garantiza la textura de las mismas durante al menos dos meses.

2.4.- Ensayos y controles

Una vez elaboradas las fórmulas se realizaron los controles exigidos por Farmacopea para formas orales sólidas:

- Análisis organoléptico: forma, color, olor y sabor.
- Ensayo de uniformidad de contenido [4].
- Evaluación de la riqueza de (UV) [5].
- Perfil de disolución gominolas Ibuprofeno [5]: 900 ml tampón fosfato, pH 7,2, paletas, 50 rpm, tiempos muestreo: 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos.

El perfil de disolución de las gominolas de Ibuprofeno se comparó con el perfil de dos formulaciones comerciales, comprimidos y solución de Ibuprofeno. Tal y como recoge la figura 1, el comportamiento es similar en las

tres formulaciones, obteniéndose un % disuelto a los 15 minutos > 85%, lo que hace pensar a priori, que el comportamiento *in vivo* va a ser similar, aunque la forma farmacéutica sea diferente.

Parámetro	*Especificaciones*	*Media*	*SD*	*CV*
Apariencia	Color rosado, sin motas ni estrías	NA		
Riqueza tetracaina(%)	90-110%	98,95	1,65	1,66
Uniformidad de dosis	AV<15	99,93	1,66	1,66
		AV = 2,6		
Peso medio	Peso medio ± 7,5%	1,35	0,04	2,84

Tabla 1. Controles fisicoquímicos gominolas tetracaína 2.5mg/gominola

Parámetro	*Especificaciones*	*Media*	*SD*	*CV*
Apariencia	Color ambar, sin motas ni estrías	NA		
Riqueza ibuprofeno(%)	90-110%	101,12	0,66	0,65
Uniformidad de dosis	AV<15	101,20	2,38	2,35
		AV = 5,7		
Peso medio	Peso medio ± 7,5%	4,17	0,10	2,39
% disuelto 60 min	>80%	101,69	1,41	1,39

Tabla 2. Controles fisicoquímicos gominolas Ibuprofeno 100mg/gominola

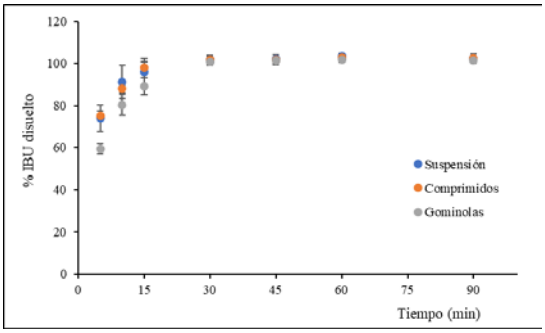


Figura 1. Comparativa perfiles disolución formulaciones Ibuprofeno 100 mg

3.- Resultados y conclusiones

La posibilidad de formular medicamentos en gominolas de gelatina, permite tanto la liberación del API en el tracto gastrointestinal, como la liberación lenta y uniforme en la cavidad oral. Su agradable sabor, capaz de enmascarar el sabor desagradable de varios principios activos y la facilidad de preparación en la oficina de farmacia de manera extemporánea, es otra de las ventajas que ofrece esta nueva forma farmacéutica.

Las dos formulaciones elaboradas han demostrado cumplir con las especificaciones descritas por farmacopea y, en el caso de gominolas de Ibuprofeno, presentar un perfil de disolución similar al de otras formas farmacéuticas comercializadas presentes en el mercado, y por tanto, contribuyen a una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de patologías en pacientes pediátricos. Esta forma farmacéutica puede ampliarse a otros campos como los pacientes geriátricos con problemas de deglución y características farmacocinéticas diferentes a los adultos y que, por tanto, requieren en muchas ocasiones, una individualización de sus tratamientos.

Esta línea de investigación abre un abanico de posibilidades de formulación de diferentes principios activos, pudiendo seleccionar la dosis idónea en función de las características del paciente, contribuyendo así a evitar los vacíos terapéuticos a los que estos grupos de población más vulnerables se ven sometidos. Se abre una nueva línea de trabajo en la que queda mucho por hacer, como buscar nuevas texturas, sabores… y realizar estudios con otros principios activos, al igual que realizar estudios de estabilidad completos, incluyendo ensayos microbiológicos.

5.- Referencias

[1] Martínez-Booné Montero E., Coronado Núñez M.J., Martínez-Boné Cabello de los Cobos F., Rite Zembrano I., Mier Palacios M., Díaz Suárez M. Formulación Magistral en Pediatría. Vox Paediátrica. XIX (1): 30-42.N. 2012.

[2] Loyd V. Allen, Jr., Ph.D. Troches and Lozenges. Secundurum Artem. Current and Practical Compounding; Information for the pharmacist. Paddock Laboratories, Inc. 4 (2).

[3] http://www.compoundingtoday.com.

[4] Real Farmacopea Española. 5ª Edición.2015.

[5] Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 41. 2018.

Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones de liberación rápida de voriconazol

Teresa GALLEGO ARRANZ[(1)], Santiago TORRADO DURÁN[(1)], Susana TORRADO DURÁN[(1)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid.

Email de contacto:teregall@ucm.es

1.- Introducción

El voriconazol (VCZ) es un fármaco antifúngico con baja solubilidad en agua [1] y alta permeabilidad, siendo rápidamente absorbido por el organismo [2].

Las dispersiones sólidas con excipientes hidrofílicos [3]. y surfactantes [4] permiten mejorar los perfiles de disolución.

El objeto de este trabajo es desarrollar dispersiones sólidas de VCZ con perarlitol y polisorbato 80 para obtener una estructura de VCZ al estado amorfo incluida en un excipiente hidrófilo.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Voriconazol (VCZ, Laboratorios Normon), pearlitol 200SD (P200SD, Roquette) y tween 80 (T80). El resto de los reactivos utilizados son de grado farmacéutico o superior.

2.2.- Elaboración de las nuevas formulaciones

Se disuelve el VCZ en etanol con el T80. Esta solución se añade sobre el P200SD, se seca a 40ºC durante 24 horas y se tamiza por 297 µm. Las formulaciones ensayadas son:

Formulación	VCZ	P200SD	T80
VOR1	1	0	0
VOR2	1	3	0
VOR3	1	6	0
VOR4	1	3	0,050
VOR5	1	6	0,025

Tabla 1: Formulaciones.

2.3.-Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se recubren con grafito y oro. El estudio morfológico se realiza en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400®, 20kV.

2.4.- Ensayos de difracción de rayos X

Se utiliza un difractómetro Philips X'Pert-MPD. Las muestras se someten a una radiación CuKα (λ=1.542) con ángulos entre 5º y 50º (2θ).

2.5.-Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utiliza un calorímetro diferencial de barrido Mettler® Toledo modelo DSC 3 Star system con una corriente de nitrógeno. El análisis se realiza en un rango de temperaturas entre 25 y 225ºC, con una velocidad de 10ºC/min.

2.6.- Ensayos de disolución

Se utiliza el aparato II (paletas, 50 rpm) (Erweka® DT80) con 500 mL de medio de disolución y 10 mg de VCZ. Dado que el VCZ presenta una solubilidad pH-dependiente [1], los ensayos se realizan por cuadruplicado en medios con distinto pH. El análisis se realiza por espectrofotométrica de segunda derivada a 270,5 nm [5].

2.6.1.- Espectroscopía de segunda derivada

Se realizan barridos entre 280 y 250 nm y se mide la pendiente del espectro con el algoritmo de Savitzky-Golay de segunda derivada. Las lecturas se realizan a λ= 270,5 nm en un rango de concentraciones entre 0,5 y 25,0 µg/mL (r2 = 0,999).

3.- Resultados y Discusión

3.1.-Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El VOR1 presenta una morfología con estructuras cristalinas en forma de escamas (20-60 µm), con pequeños cristales rectangulares en su superficie (2-6 µm).

En las formulaciones VOR2, VOR3 y VOR4 se muestra la presencia del excipiente P200SD como estructuras granulares de mayor tamaño, observando en su superficie pequeños cristales aciculares de P200SD y pequeños cristales rectangulares de VCZ.

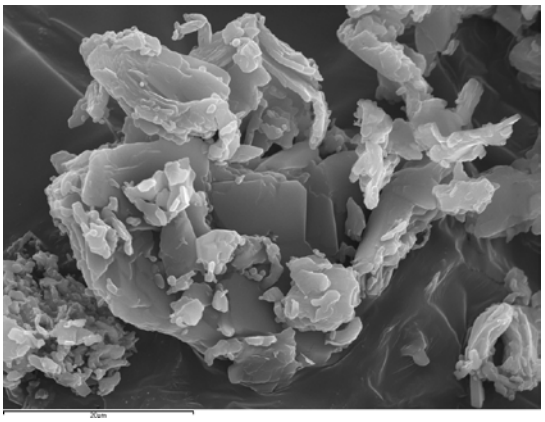


Fig.1: Imagen de SEM de VOR1 (x2000).

3.2.- Ensayos de difracción de rayos X

El VCZ presenta picos característicos en los ángulos de difracción 6,94º, 13,82º, 28,14º y 35,18º 2θ, con intensidades propias de una sustancia cristalina. En las formulaciones VOR2 y VOR3 desciende la cristalinidad del VCZ. El mayor descenso en la intensidad de las formulaciones VOR4 y VOR5 se relaciona con una menor cristalinidad del VCZ atribuido a la presencia del surfactante.

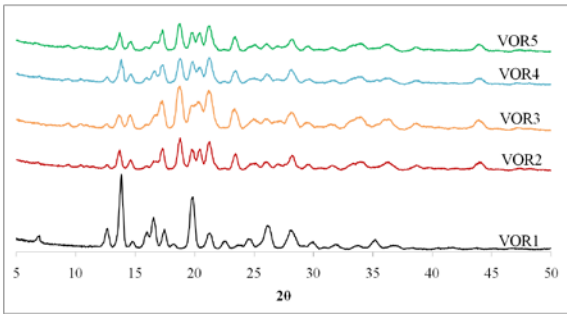


Fig.2: Resultados de rayos X.

3.3.-Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El VCZ presenta un pico endotérmico a los 130ºC, con ΔH de 84 J/g. Proporciones elevadas de P200SD (VOR3) son necesarias para encontrar descensos en su cristalinidad. Las formulaciones con T80 (VOR4 y VOR5) incrementan la fracción amorfa del VCZ al descender ΔH cerca de un 20%.

3.4.- Ensayos de disolución

El VCZ se disuelven más despacio a medida que aumenta el pH del medio. Exceptuando la formulación VOR2, todas las formulaciones consiguen una mejora en la velocidad de disolución, ya que el VCZ se presenta en una forma amorfa. Las formulaciones con tensoactivo se disuelven más rápido que las que no lo tienen.

	1,2		4,5	
Formulación	50%	90%	50%	90%
VOR1	10	30	30	90
VOR2	5	20	20	90
VOR3	<5	5	10	20
VOR4	<5	5	<5	10
VOR5	<5	5	<5	5

Tabla 2: tiempo (min) en el que se cede el 50% y el 90% de VCZ en cada medio.

4.- Conclusiones

Las formulaciones que presentan un porcentaje de forma amorfa de VCZ aumentan sus perfiles de disolución.

Una mayor proporción de adsorbente en la formulación provoca que el VCZ se presente en estado amorfo.

La presencia del surfactante T80 incrementa la velocidad de disolución.

La formulación que presenta una mayor velocidad de disolución es VOR5, con proporciones VCZ:P200SD:T80 1:6:0,025.

5.- Referencias

[1] T. Miletic, K. Kyriakos, A. Graovac, S. Ibric. Carbohydrate Polymers, 98, 122-131, 2013.

[2] D. Levêque, Y. Nivoix, F. Jehl, R. Herbrecht. Antimicrobial Agents, 27, 274-284, 2006.

[3] S. V. Jermain, C. Brough, R.O Williams III. International Journal of Pharmaceutics, 535, 379-392, 2018.

[4] S. P. Chaudhari, R. P. Dugar. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 41, 68-77, 2017.

[5] N. S. Abdullah, M. A. Hassan, R. O. Hassan. Arabian Journal of Chemistry, 10, S3426-S3433, 2017.

Mejoras farmacotécnicas en formulaciones de Ezetimiba. Estudios de eficacia.

Carlos TORRADO SALMERÓN [(1)], Victor GARCÍA HERRERO [(1)], Cristina Maria SENA [(2)], Santiago TORRADO DURÁN [(1)].

1. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
2. Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Coimbra.

Email de contacto: ctorrado@ucm.es

1.- Introducción

La Ezetimiba es un fármaco capaz de inhibir selectivamente la absorción intestinal del colesterol. Este fármaco se utiliza en pacientes con hipercolesterolemia primaria. Este fármaco es de clase 2 dentro del BCS (Biopharmaceutics Classification System) por lo que su factor limitante se atribuye a una solubilidad muy baja. Este problema da lugar al desarrollo de nuevas formulaciones de Ezetimiba sola o en combinación con estatinas (fármacos implicado en la reducción del colesterol a nivel hepático).

El objetivo de este trabajo es: (i) desarrollar nuevas formulaciones micelares de Ezetimiba de rápida velocidad de disolución. (ii) Mejorar la eficacia mediante el empleo de formulaciones de rápida disolución de ezetimiba.

2.- Material y Métodos.

Ezetimiba (Eze), suministrados por Laboratorios Normon S.A. Madrid (España). Kolliphor® RH40 (K), surfactante no iónico. BASF S.L. Barcelona, (España). Dodecilsulfato sódico (SDS), surfactante iónico. Fagron Ibérica S.A.U. Barcelona, (España). Croscarmelosa sódica (Cros): Celulosa microcristalina (CM) suministrados por FMC Liége (Bélgica).

2.1.- Desarrollo de formulaciones de rápida disolución.

Para la elaboración de dispersiones solidas (i) se disuelve la Ezetimiba y Cremophor RH40 en etanol, (ii) adición de la solución sobre croscarmelosa sódica (semisólido), (iii) secado a 40°C 24 h, (iv) adición de CM como polvo de carga y tamización por 0,850 mm. Las formulaciones estudiadas son:

Eze	Cros	K	SDS
1	1	0	0
1	2,5	0	0
1	2,5	0	0,5
1	2,5	0,75	0
1	2,5	1	0

*Tabla 1: Composición de las formulaciones de Ezetimiba. * Todas las formulaciones incluyen 100 mg de CM por cada 10 mg de Eze.*

2.2.- Ensayos de velocidad de disolución.

Se realizan en un equipo Erweka DT 80 Heusenstamm (Germany) con 500ml de medio de disolución a un pH 4,5 con 0,45% de SDS, a 37 ± 0,5°C, método paletas (tipo II) a 50 r.p.m (USP). La lectura se realiza por espectrofotometría a 233 nm (r=0,999).

2.3.- Estudios de eficacia.

Se realiza en ratas Wistar machos (220–270 g) estabulados cumpliendo con el comité de ética de la CAM. La hiperlipemia se induce a los animales mediante dieta alta en grasas durante ocho semanas, incluyendo en una dieta normal, grasa de cerdo (20% p/p), colesterol (2% p/p) y ác. cólico (0,25% p/p) [(1)]. A las ocho semanas se realiza el tratamiento con ezetimiba (3 mg/kg) durante dos semanas, en 5 grupos de 6 animales cada uno (control dieta normal, control dieta grasa, Eze materia prima, Eze:Cros:SDS (1:2,5:0,5) y Eze:Cros:K (1:2,5:0,75).

Para los estudios de eficacia, las muestras de suero se someten a un análisis bioquímico de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), HDL, LDL a tiempos 0 y 2 semanas mediante un kit análisis comercial.

3.- Resultados y Discusión.

3.1.- Ensayos de velocidad de disolución.

La figura 1 muestra las velocidades de disolución de la Ezetimiba materia prima (Eze MP), de la dispersión sólida de Ezetimiba Eze:Cros (1:2,5) y de las preparaciones con surfactantes: Eze:Cros:SDS (1:2,5:0,5), Eze :Cros:K (1:2,5:0,75) y Eze :Cros:K (1:2,5:1).

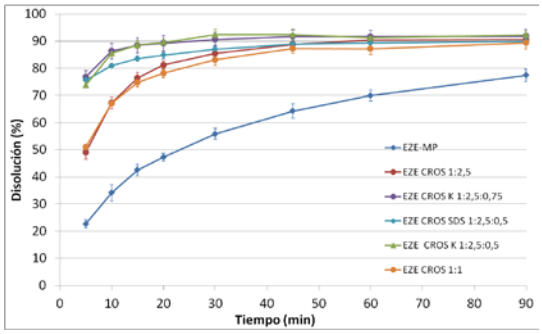


Fig.1: Estudio de velocidad de disolución de Eze MP,Eze:Cros (1:1), Eze:Cros (1:2,5), Eze :Cros:K (1:2,5:0,75), Eze :Cros:K (1:2,5:1), Eze:Cros:SDS (1:2,5:0,5).

La Ezetimiba materia prima (Eze MP) muestra un perfil de liberación lento, con porcentajes de disolución inferiores al 60% a los 30 min. El proceso tecnológico de solubilización y secado permite obtener una dispersión de la ezetimiba al estado amorfo sobre una matriz hidrofílica (Eze:Cros 1:2,5) presentando un elevado incremento el su perfil de disolución (85% a los 30 min).

La adición de surfactantes a las formulaciones (Eze:Cros:SDS 1:2,5:0,5, Eze:Cros:K 1:2,5:0,5 y Eze:Cros:K 1:2,5:0,75) permite obtener sistemas micelares al estado sólido con importante incremento en sus perfiles de disolución iniciales (5-15 min) [2,3]. Sin embargo la adición de una proporción mayor del surfactante Kolliphor RH40 (Eze:Cros:K 1:2,5:1) no supone un aumento significativo en la velocidad de disolución.

3.2.- Estudios de eficacia.

En la figura 2 se observa un incremento de los niveles de colesterol y LDL en los animales con dieta alta en grasas respecto a los animales control (dieta normal).

Estos niveles elevados de colesterol y LDL se ven reducidos tras un primer tratamiento de Ezetimiba durante 2 semanas. En los grupos que han sido tratados con las formulaciones de Eze que contienen un tensioactivo (Eze:Cros:SDS 1:2,5:0,5 y Eze :Cros:K 1:2,5:0,75) las concentraciones de colesterol y LDL son menores respecto al grupo tratado con Eze MP [3].

Aunque las diferencias no son significativas, las formulaciones Eze :Cros:K 1:2,5:0,75 presentan las menores concentraciones de colesterol. Este resultado puede estar relacionado con la mayor proporción de surfactante que contiene esta formulación.

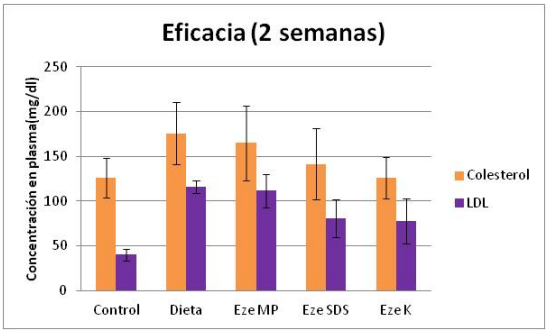


Fig.2: Niveles de colesterol y LDL tras la administración de Eze MP frente a formulaciones de Eze:Cros:K (1:2,5:1) y Eze:Cros:SDS (1:2,5:0,5).

4.- Conclusiones.

La utilización de formulaciones de Ezetimiba con la adición de tensioactivos favorece su disolución, mejorando la absorción del fármaco en el organismo.

Existe un mayor descenso de los niveles de colesterol y LDL tras la administración de la Ezetimiba durante las primeras semanas en las formulaciones que contienen tensioactivo.

5.- Referencias

[1] A. Jahangiri, M. Barzegar-Jalali, A. Garjani, Y. Javadzadeh, H. Hamishehkar, K. Asadpour-Zeynali, K. Adibkia. Eur J Pharm Sci. 82:21-30. 2016.

[2] R. Rashid, D.W. Kim, F.U. Din, O. Mustapha, A.M. Yousaf, J.H. Park, J.O. Kim, C.S. Yong, H.G. Choi. Carbohydrate Polymers. 130, 26-31. 2015.

[3] A. Jahangiri, M. Barzegar-Jalali, A. Garjani, Y. Javadzadeh, H. Hamishehkar, K. Asadpour-Zeynali, K. Adibkia. European Journal of Pharmaceutical Science. 82, 21-30. 2016.

Estudios de hepatotoxicidad en formulaciones de rápida disolución de Ezetimiba.

Victor GARCÍA HERRERO [(1)], Carlos TORRADO SALMERÓN [(1)], Javier CEREZO GARRETA [(1)], Santiago TORRADO DURÁN [(1)].

1. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Email de contacto: victor08@ucm.es

1.- Introducción

La Ezetimibe (EZE) es un fármaco de clase 2 dentro del BCS (Biopharmaceutics Classification System), empleado para el tratamiento de la hipercolesteremia solo o asociado a estatinas. En los ultimos años se han desarrollado distintos recursos tecnologicos para mejorar su velocidad de disolución [(1-2)].

En la ficha técnica del medicamento Ezetimiba, se desaconseja su empleo en pacientes con problemas hepaticos. Las dietas hipercolesterolemicas puede producer daños hepaticos. La metabolización de la EZE produce un ciclo enterohepático que puede incrementar esta toxicidad [(3)].

El objetivo de este trabajo es Desarrollar nuevas formulaciones micelares de Ezetimiba de rápida velocidad de disolución, estudiando su influencia . (ii) Estudiar la influencia de estas formulaciones sobre su hepatotoxicidad.

2.- Materiales y Métodos.

Ezetimiba (Eze), suministrados por Laboratorios Normon S.A. Madrid (España). Kolliphor® RH40 (K), surfactante no iónico. BASF S.L. Barcelona, (España), Dodecilsulfato sódico (SDS), surfactante iónico. Fagron Ibérica S.A.U. Barcelona, (España). Croscarmelosa sódica (Cros): Celulosa microcristalina (CM) suministrados por FMC Liége (Bélgica). El resto de los reactivos son de grado farmacéutico o superior.

2.1.- Elaboración de nuevas formulaciones de Ezetimiba.

Para la elaboración de dispersiones solidas (i) se disuelve la Eze y K en etanol, (ii) adición de la solución sobre Cros con agitación, (iii) secado a 40°C 24 h, (iv) adición de CM como polvo de carga, mezclado y tamización por 0,850 mm. Las formulaciones estudiadas son: Ezetimiba materia prima (Eze MP), Eze:Cros: (1:2,5), Eze:Cros:K (1:2,5:0,1) y Eze:Cros:K (1:2,5:0,6), Eze:Cros:K (1:2,5:0,75) y Eze:Cros:K (1:2,5:1).

2.2.- Estudio de velocidad de disolución.

Se realizan siguiendo el método descrito en la USP, aparato tipo II (paletas) a 50 r.p.m, con 500ml de medio de disolución a un pH 4,5 con 0,45% de SDS, a 37 ± 0,5°C. La lectura se realiza por espectrofotometría a 233 nm (r=0,999).

2.3.- Estudio de hepatotoxicidad en animales.

Se realiza en ratas Wistar machos estabuladas (220–270 g), cumpliendo el protocol del comité de ética de la CAM. La hiperlipemia se induce a los animales mediante una dieta alta en grasas durante 8 semanas, incluyendo en una dieta normal, grasa de cerdo (20% p/p), colesterol (2% p/p) y ác. cólico (0,25% p/p) [(4)]. A las 8 semanas se realiza el tratamiento con Ezetimiba (3 mg/kg) durante dos semanas, dividiendo los animales en 5 grupos de 6 animales cada uno (control dieta normal, control dieta grasa, Eze materia prima y Eze:Cros:K (1:2,5:0,75).

Para los estudios de hepatoxicidad, se toman muestras de suero a tiempos 0 y 2 semanas y se someten a un análisis bioquímico de alanine transaminasa (ALT) y aspartatotransaminasa (AST) mediante un kit análisis comercial.

3.- Resultados y Discusión.

3.1.- Estudio de velocidad de disolución.

La figura 1 muestra las velocidades de disolución de la Ezetimiba materia prima (Eze MP), de la dispersión sólida de Ezetimiba Eze:Cros (1:2,5) y de las preparaciones con surfactante no iónico.

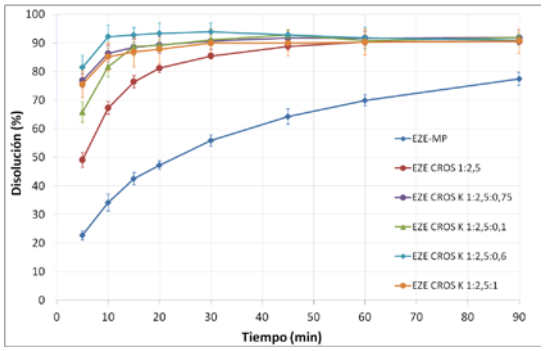


Fig.1: Estudio de velocidad de disolución de Eze MP, Eze:Cros (1:2,5), Eze:Cros:K (1:2,5:0,75), Eze:Cros:K (1:2,5:0,1), Eze:Cros:K (1:2,5:0,6), Eze:Cros:K (1:2,5:1).

La dispersion sólida (Eze:Cros 1:2,5) produce un elevado incremento en el perfil de disolución frente a la Eze MP. Esta mejora, posiblemente se deba al descenso de la cristalinidad de la Eze al incluirse en el excipiente hidrofílicos. Al incorporar surfactant a la formulación (Eze:Cros:K 1:2,5:0,1) una clara mejora en los primeros tiempos de disolución es observada (5-15 min). Al incrementar la proporción de surfactante en las formulaciones (Eze:Cros:K 1:2,5:0,6) y (Eze:Cros:K 1:2,5:0,75). aumentan sus perfiles de disolución. Finalmente las formulaciones con más altas proporciones de surfactante Eze:Cros:K (1:2,5:1) no consiguen mejorar el perfil de disolución de la Eze.

3.2.- Estudio de hepatotoxicidad en animales.

La dieta con alto contenido graso produce una esteatosis hepática incrementando de forma significativa ($p<0.05$) los valores de AST y ALT [(3)].

La administración de Ezetimiba muestra valores de AST y ALT similares a los de la Eze MP después de dos semanas de tratamiento.

Durante las dos primeras semanas de tratamiento las formulaciones con surfactantes (SDS y K) no mejoran los niveles de los enzimas hepáticos, estos resultados posiblemente estén relacionados con la alta actividad hepática que presentan las formulaciones durante este periodo.

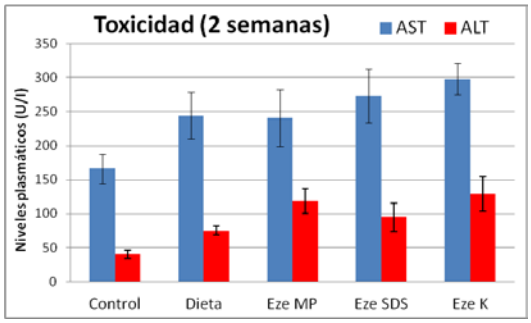


Fig. 2: Valores de enzimas hepáticos AST y ALT para los distintos grupos de animales después de dos semanas de tratamiento con las distintas formulaciones: Eze MP, Eze SDS (Eze:Cros:SDS 1:2,5:0,5), y Eze K (Eze:Cros:K 1:2,5:0,75).

Tratamientos más prolongados serán necesarios para mejorar la función hepática[(3)].

4.- Conclusiones

Las formulaciones con surfactant no iónico Eze:Cros:K (1:2,5:0,75) mejora el perfil de disolución de la Eze. Los niveles elevados de AST y ALT en el grupo con dieta grasa son indicativos de la existencia de un elevado daño hepatico en este grupo. Durante las 2 primeras semanas con todos los tratamientos de Eze, se mantienen estos altos valores de transaminasas hepaticas.

5.- Referencias

[1] A. Jahangiri, M. Barzegar-Jalali, A. Garjani, Y. Javadzadeh, H. Hamishehkar, K. Asadpour-Zeynali, K. Adibkia. Eur J Pharm Sci. 82:21-30. 2016.

[2] R. Rashid, D.W. Kim, F.U. Din, O. Mustapha, A.M. Yousaf, J.H. Park, J.O. Kim, C.S. Yong, H.G. Choi. Carbohydrate Polymers. 130, 26-31. 2015.

[3] A. Singh, T.K. Bhat, O.P. Sharma. of Clinical Toxicology. S4:001. 2011.

[4] A. Jahangiri, M. Barzegar-Jalali, A. Garjani, Y. Javadzadeh, H. Hamishehkar, K. Asadpour-Zeynali, K. Adibkia. European Journal of Pharmaceutical Science. 82, 21-30. 2016.

Efecto neuroprotector de flunarizina encapsulada en micropartículas de PLGA

Nicola PACCIONE, Sofia NEGRO, Virginia SANDOVAL, Emilia BARCIA

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

Email de contacto: nicolpac@ucm.es

1.- Introducción

Flunarizina, un derivado difenilpiperazínico, es un agente bloqueante de los canales lentos de calcio que actúa inhibiendo el proceso contráctil de la musculatura lisa vascular, lo que se traduce en una vasodilatación arteriolar con una reducción de la resistencia periférica. Se trata de un candidato potencial a ser incluido en un sistema de liberación controlada, ya que se utiliza a dosis bajas durante períodos prolongados de tiempo para el tratamiento de la migraña [1, 2].

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto neuroprotector de flunarizina encapsulada en micropartículas preparadas con el polímero PLGA (poli D,L láctico-co-glicólico).

2.- Materiales y métodos

2.1.- Elaboración de las micropartículas

Las microesferas de flunarizina hidrocloruro se elaboran mediante la técnica de evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A [3]. La emulsión se consigue añadiendo la fase interna, compuesta por 1 ml de CH_2Cl_2 en el que se disuelven 400 mg de PLGA (215 mg resómero 502 y 185 mg resómero 502H) y 244 mg de flunarizina hidrocloruro, sobre la fase externa de la emulsión, compuesta por una solución acuosa de PVA al 0,1%, en agitación con polytron a 3000 rpm. Tras evaporacíón del disolvente orgánico, las micropartículas se filtran, lavan y liofilizan.

2.2.- Caracterización de las micropartículas

2.2.1.- Eficacia de encapsulación

Se pesan 10 mg de microesferas que se disuelven en 1 ml de CH_2Cl_2. Se añaden 18 ml de metanol, se centrifugan a 5500 rpm, se toma una alícuota del sobrenadante que se filtra por 0,45 µm. La cuantificación de la flunarizina hidrocloruro se realiza por espectrofotometría de primera derivada con detección a 268 nm.

2.2.2.- Ensayos de cesión

Los ensayos de cesión se han realizado pesando 10 mg de microesferas que se suspenden en 6 ml de tampón fosfato a pH 7,4 que contiene un 1% de lauril sulfato sódico. Las muestras se introducen en un baño termostatizado a 37ºC con agitación constante. A intervalos de tiempo preestablecidos se extrae todo el volumen de muestra, que se repone con 6 ml del medio. Una vez filtradas las muestras, se procede a la cuantificación del principio activo. En todos los casos los ensayos se realizan por triplicado.

2.3.- Cultivos celulares

2.3.1.- Puesta a punto e incubación.

Para este estudio se ha utilizado la línea celular SKN-AS procedente de neuroblastoma humano. El crecimiento de las células se realiza a 37ºC en presencia de una atmósfera de CO_2 al 5% y un 95% de aire, en un medio DMEM enriquecido con glucosa (4500 mg/ml), 5% de suero fetal bovino, 10% de suero equino y un 1% de una mezcla de penicilina-estreptomicina. En la confluencia, se elimina el medio de cultivo y las células se separan por tripsinización seguido de centrifugación a 1500 rpm (10 min.). Las células se tratan durante 24 horas con distintas concentraciones de flunarizina (80, 120 y 180 µM) obtenidas de los ensayos de cesión de las micropartículas.

2.3.2.- Viabilidad celular.

La viabilidad celular se evalua por citrometría de flujo. Se obtienen además imágenes de las células mediante microscopía invertida de contraste de fases.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Caracterización de las micropartículas

La formulación de micropartículas desarrollada para flunarizina hidrocloruro presenta un tamaño medio de 64,29±3,88 µm y una eficacia media de encapsulación del 97,07±1,74%.

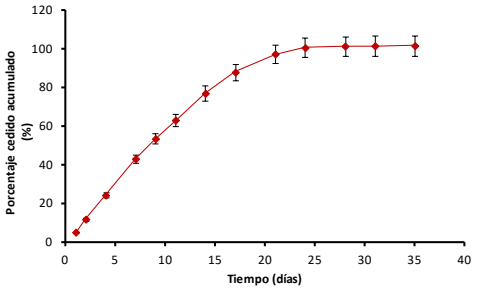


Fig. 1: Perfil medio de cesión de flunarizina hidrocloruro.

La cesión del principio activo se ajusta a una cinética de orden 0 durante 14 días. El valor medio de constante de velocidad de cesión es de 169 µg/día/10 mg de micropartículas.

3.2.- Cultivos celulares

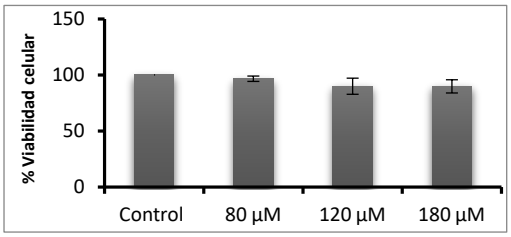


Fig. 2: Viabilidad celular media (%±DE) tras incubación de células SKN-AS con distintas concetraciones de flunarizina hidrocloruro durante 24 h.

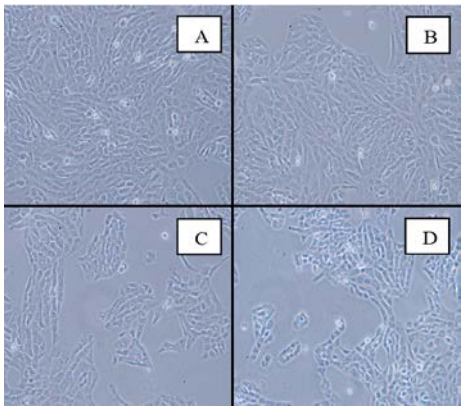


Fig. 3: Imágenes de células SKN-AS control (a), e incubadas durante 24 h con concentraciones de flunarizina de 80 µM (b), 120 µM (c) y 180 µM (d).

Los resultados de viabilidad celular ponen de manifiesto una muy ligera reducción de la misma a la concentración de 80 µM de flunarizina (96,58±4,2%) que se estabiliza en las dos concentraciones superiores ensayadas (120 y 180 µM) con valores elevados de viabilidad celular: 89,89±6,5% y 89,77±5,8%, respectivamente.

4.- Conclusiones

Se comprueba el efecto neuroprotector de flunarizina hidrocloruro formulada en micropartículas de PLGA como nuevo sistema de liberación controlada del fármaco en el tratamiento de la migraña.

5.- Agradecimientos

Grupo de investigación UCM "Administracion parenteral de medicamentos" (Grupo 910939).

6.- Referencias

[1] N. Karsana, D. Palethorpea, W. Rattanawonga, J. C. Marina, R. Bholaa, y P. J. Goadsbya, European Journal of Neurology, 25, 811-817, 2018.

[2] National institute for health and care excellence. http://nice.org.uk/guidance/esuom33. Último acceso septiembre 2018.

[3] R. Arshady, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 5, 315-334, 1990.

Importancia de las condiciones de preparación y del control de la composición del medio de dispersión en el diseño de coloides magnéticos para fines biotecnológicos.

Silvia FUERTE- RODRÍGUEZ [(1)], Kilian RAMIREZ-ELIAS[(1)], Fátima FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ [(1)] Gracia GARCÍA-GARCÍA[(1)], José L. ARIAS [(1-3)].

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.

Instituto Biosanitario de Granada (ibs. GRANADA). Servicio Andaluz de Salud (SAS)- Universidad de Granada, España.

Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

Email de contacto: sfrdocumentos@gmail.com

1.- Introducción

Los coloides magnéticos han sido ampliamente estudiados en aplicaciones biomédicas. Su capacidad de focalización por redireccionamiento mediante un imán posibilita que el transporte de fármaco sea más eficaz, y mejora su acumulación en la zona deseada [1].

La elevada sensibilidad de la técnica electroforética mediante potencial zeta (ζ) permite estudiar la carga eléctrica superficial de las nanopartículas (Nps) en dispersión. En base a esta técnica, y dado a la diferencia de carga entre butil(cianocrilato) (PBCA) y maghemita (γ-Fe_2O_3), se ha desarrollado un tipo de Nps compuestas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico (γ-Fe_2O_3/PBCA) con un tamaño adecuado para una posible administración por vía parenteral.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Materiales

Los materiales utilizados fueron suministrados por Merck KGaA (Alemania), a excepción del monómero Butilcianocrilato, suministrado por Loctite S.A (España).

2.2.- Métodología

Las NPs compuestas se elaboran a partir de la adición del monómero butil(cianocrilato) a un medio acuoso en agitación que contiene los núcleos de γ-Fe_2O_3 preparados mediante la oxidación de magnetita [2]. El proceso se realizó variando las masas relativas núcleo: monómero (2:4, 3:4, 4:4, 4:3, 4:2, 4:1).

La determinación de tamaños (n = 3) se realizó mediante espectroscopia de correlación de fotones, las muestras analizadas se prepararon en diluciones de ≈ 0.1% (p/v).

Las medidas de tamaño y de carga eléctrica superficial, se llevaron a cabo mediante el aparato Malvern-Zetasizer Nano-ZS, (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

Se prepararon dispersiones en agua bidestilada de varios tipos de Nps (PBCA, γ-Fe_2O_3 y γ-Fe_2O_3/PBCA variando las proporciones de masa utilizadas inicialmente en el proceso de formulación), con una concentración final ≈ 0.1 (p/v) para comparar la carga eléctrica superficial de cada una de ellas y determinar la proporción de masas óptima en el proceso de formulación de nanocompuestos.

Además, se estudió el comportamiento eléctrico de los diferentes tipos de NPs según el pH del medio de dispersión. Para ello, se prepararon dispersiones de KNO_3 (10^{-3} M), variando el pH (3 a 9). Tras el ajuste de pH se adicionan las NPs a cada preparación con una concentración final ≈ 0.1 (p/v). Después de 24 horas en contacto con el medio, a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica constante (25.0 ± 0.5 ºC, 50 rpm) se midió el potencial zeta (ζ, mV).

3.- Resultados

3.1.- Optimización del proceso de formulación

A medida que aumenta la masa de maghemita utilizada en el proceso de formulación, con respecto al monómero, el tamaño de la nanopartícula obtenida es cada vez mayor (*Tabla. 1*). La proporción 4:3 da lugar a las nanopartículas de mayor tamaño de todas las masas ensayadas. Por el contrario, la proporción 2:4 da lugar a las

NPs de menor tamaño, adecuado *a priori* para la vía parenteral (190 ± 10 nm).

Tabla.1: Relación de masa relativa y tamaño obtenido en el proceso de formulación de nanocompuestos.

γ-Fe_2O_3:PBCA	Tamaño (nm)
2:4	190 ± 10
3:4	340 ± 15
4:4	430 ± 30
4:3	700 ± 40
4:2	400 ± 20
4:1	Macrogregados

Con respecto al estudio de la carga eléctrica superficial las proporciones que dieron lugar a mejor perfil de recubrimiento fueron 2:4 y 3:4 ya que tenían una carga eléctrica superficial de mayor similitud a las Nps PBCA puras (*Fig. 1*).

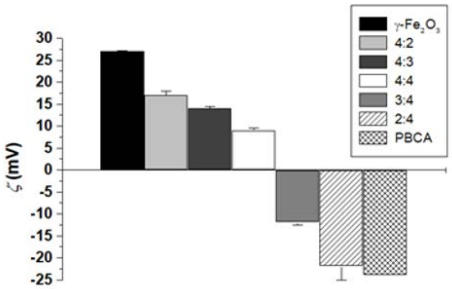


Fig.1: Histograma de potencial zeta (ζ, mV) de diferentes tipos de nanopartículas: γ-Fe_2O_3, PBCA, y γ-Fe_2O_3 /PBCA (4:2 - 2:4).

Los resultados más adecuados se obtuvieron para la proporción 2:4, las Nps resultantes tienen el menor tamaño de todos los ensayados y una carga eléctrica superficial con mayor similitud al polímero (*Fig. 1*), lo que indica un recubrimiento pleno de los núcleos de óxidos de hierro por el polímero.

3.2.- Estudio electroforético.

Se estudiaron las variaciones de potencial zeta de las Nps γ-Fe_2O_3 /PBCA obtenidas a partir de la proporción óptima (2:4) en función del pH del medio de dispersión y en comparación con Nps γ-Fe_2O_3 y Nps PBCA (*Fig. 2*).

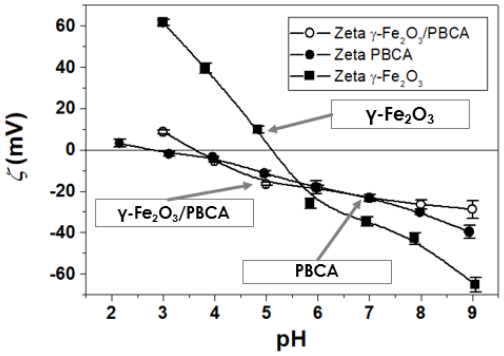


Fig.2: Variación de potencial zeta (ζ, mV) de tres tipos de nanopartículas en función del pH del medio de dispersión.

El estudio electroforético muestra la similitud eléctrica superficial entre el polímero PBCA y las NPs compuestas recubiertas, confirmando la eficacia de recubrimiento. Además, la figura 2 revela como varía la carga eléctrica de las Nps objetivo, esto indica que la composición del medio de dispersión posibilita el control del comportamiento eléctrico, siendo así, cabe esperar la formación de sistemas floculados apto para una vía de administración oral a pH ácido, mientras que a pH alcalinos cabe esperar la formación de sistemas defloculados idóneos *a priori* para la vía parenteral [3-4].

3.- Conclusiones

Se han definido unas condiciones óptimas para la formulación reproducible de Nps magnetopoliméricas con potencial aplicación biomédica. El control de la carga eléctrica superficial ha demostrado ser viable si se define la composición del medio de dispersión, ej. pH.

4.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-649 (Junta de Andalucía, España).

5.- Referencias

[1] LH. Reddy, JL. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur. Chem. Rev., 112, 5818–5878. 2012.

[2] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, J. Magn. Magn. Mater., 149, 6-9, 1995.

[3] MJ. Cózar-Bernal, V. Gallardo, E. Sáez-Fernández, MA. Holgado, J. Alvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, JL. Arias. Int J Pharm., 393, 161-6, 2010.

[4] J.L Arias, M. López-Viota, B. Clares, MA. Ruiz. Eur J Pharm Sci., 34, 257-62, 2008.

Diseño de un coloide magnético basado en maghemita para fines biomédicos

Silvia FUERTE- RODRÍGUEZ [(1)], Fátima FERNÁNDEZ- ÁLVAREZ [(1)] Gracia GARCÍA-GARCÍA[(1)], José L. ARIAS [(1-3)].

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Instituto Biosanitario de Granada (ibs. GRANADA). Servicio Andaluz de Salud (SAS)-Universidad de Granada, España.
3. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

Email de contacto: sfrdocumentos@gmail.com

1.- Introducción

Los coloides superparamagnéticos constituyen una interesante área de investigación en biomedicina por su guiado magnético como transportadores de agentes terapéuticos (fármacos y genes) y como agentes terapéuticos *per sé* por su capacidad hipertérmica. Su pequeño tamaño y estructura cristalina, responsable de la repuesta magnética, posibilita su uso como agente de diagnóstico en resonancia magnética de imagen (RMI), pudiendo constituir un sistema teranóstico. La teranosis implica diagnóstico y terapia en una misa plataforma posibilitando una terapia individualizada [1].

2.- Material y métodos

2.1.- Material

Los materiales utilizados fueron de calidad analítica, suministrados por Merck KGaA (Alemania).

Las líneas celulares utilizadas fueron obtenidas a través de la ATCC (*American Type Culture Collection*, EE.UU). La línea celular T-84 procede de carcinoma colorrectal de origen humano, mientras que CCD-18 es un linaje célular fibroblástico de colon humano no tumoral.

2.2.- Métodos

Las nanopartículas de maghemita (Nps γ-Fe_2O_3) se formularon mediante la oxidación de Nps de magnetita elaboradas por el método de co-precipitación [2].

En el estudio electroforético se repararon disoluciones de KNO_3 10^{-3} M a diferente pH (3-9). Se añadió una concentración $\approx$ 0.1 (p/v) de Nps γ-Fe_2O_3 a cada preparación. Tras 24 horas en contacto con el medio, a temperatura ambiente y agitación constante (25.0 ± 0.5 ºC, 50 rpm) se midió el potencial zeta (ζ, mV) mediante el aparato Malvern-Zetasizer Nano-ZS, (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

El estudio de la estructura cristalina de las Nps se llevó a cabo mediante el método Debye-Scherrer, utilizando un difractómetro automático (Bruker D8 Venture, EE.UU), la longitud de onda de medida fue 1.5405 Å (Cu-Kα). La muestra de Nps γ-Fe_2O_3 (0.5 g) para su medida se preparó por desecación.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM, en placas de 96 pocillos en monocapa, se incubaron a 37.0 ± 0.5 ºC en una atmósfera 5% CO_2. La medida de citotoxicidad de las Nps γ-Fe_2O_3 en ambas líneas celulares se determinó mediante el ensayo de proliferación MTT (n= 4). El ensayo se realizó incubando las células con diferentes concentraciones de NPs (50, 100, 300, 500, 700, 900 ng/mL y 10, 40, 70 y 100 µg/mL). Las medidas a 37.0 ± 0.5 ºC se realizaron transcurridas 72 horas [3].

3.- Resultados

3.1.- Caracterización electroforética

La figura 1 muestra el comportamiento electroforético de las Nps γ-Fe_2O_3 en función de la variación de pH del medio de

dispersión. Puede observarse el punto isoeléctrico característico de γ-Fe_2O_3 en torno a 5. Se estima que la carga eléctrica superficial del nanocompuesto puede ser controlada por el pH del medio de dispersión siendo predecible a pH extremos la formación de sistemas defloculados que podrían ser aptos para la vía parenteral [4].

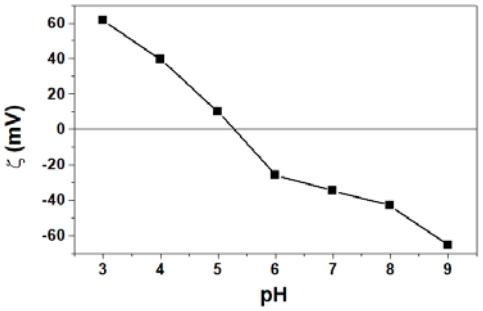


Fig. 1: Variacion de potencial zeta (ζ, mV) de nanopartículas de maghemita en función del pH del medio de dispersión.

3.2.- Estructura cristalina

La estructura cristalina de las Nps se define mediante el difractograma de rayos X que se observa en la figura 2, siguiendo la estructura cristalina típica de este óxido de hierro [5] la cual es responsable de sus propiedades magnéticas.

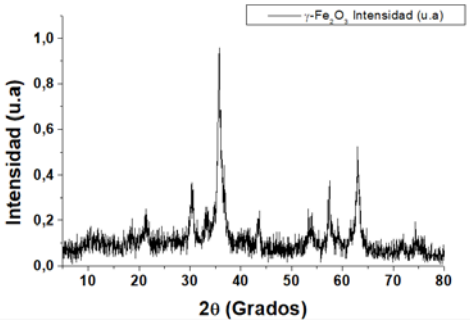


Fig. 2: Difractograma de rayos X de las Nps γ-Fe2O3.

3.3.- Viabilidad celular in vitro.

Se evaluó la viabilidad in vitro de las Nps γ-Fe_2O_3 en las líneas celulares T-84 (figura 3a) y CCD-18 (figura 3b) tras la adición de diferentes concentraciones de Nps. Se observó que la viabilidad era de en torno al 100%.

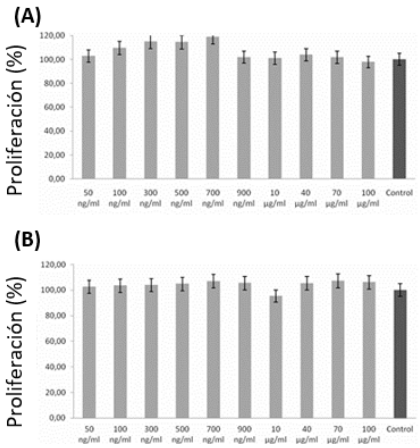


Fig. 6: Proliferación celular línea T-84 (A) y línea CCD-18 (B) tras 72 horas de la administración de Nps γ-Fe_2O_3.

4.- Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología de formulación reproducible de Nps γ-Fe_2O_3. Se están llevando a cabo estudios para su empleo como material en el diseño de nanotransportadores de fármacos y como agente de hipertermia magnética antitumoral. Las Nps formuladas tiene una estructura cristalina, propiedad fundamental para presentar superparamagnetismo. Además, la viabilidad *in vitro* en células de colon tanto tumorales como no tumorales es muy alta. Estas conclusiones indican que las Nps γ-Fe_2O_3 desarrolladas podrían utilizarse como herramienta terapéutica. Deberá realizarse más estudios sobre la capacidad superparamagnética de las Nps y su viabilidad *in vivo.*

5.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-649 (Junta de Andalucía, España)

6.- Referencias

[1] LH. Reddy, JL. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur. Chem. Rev., 112, 5818–5878. 2012.
[2] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, J. Magn. Magn. Mater., 149, 6-9, 1995.
[3] R. Ortiz, J. Prados, C. Melguizo, JL. Arias, MA. Ruiz, PJ. Ruiz, O. Caba, R. Luque, A. Segura, A. Aránega. Int. J. nanomedicine, 7, 95-107, 2012.
[4] JL. Arias, M. López-Viota, B. Clares, MA. Ruiz. Eur J Pharm Sci., 34, 257-62, 2008.
[5] B. Pérez-Artacho, V. Gallardo, MA. Ruiz, JL. Arias. J. Nanopart. Res., 14, 768, 2012.

A first step in the development of an anthelmintic oral liquid formulation: the stability study

Noelia A. MARTÍNEZ-MUÑOZ[1,2], Ángel V. DELGADO[3], José L. ARIAS[4-6]

1. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina.
2. Departamente de Química, Instituto de Química de San Luis (INQUISAL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de San Luis, Argentina.
3. Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España
4. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
5. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.
6. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: jlarias@ugr.es

1.- Introduction

Helminth infestation can cause morbidity and sometimes mortality: it affects cognitive processes; compromises nutritional status, induces tissue reactions, and causes intestinal obstruction or rectal prolapse. The treatment of helmintic diseases is a public health subject of great importance in tropical countries.

Praziquantel (PZQ) is a broad spectrum anthelmintic and has proved to be especially useful in the treatment of schistosomiasis [1,2], one of the most prevalent, though neglected, of the tropical infectious diseases. Although being the drug of choice in the treatment of the disease, PZQ cannot be found as an appropriate paediatric formulation. In fact, the majority of oral dosage forms are designed for adult patients, and they lack of dosing flexibility [3].

The aim of the work is to elucidate the stability of PZQ aqueous dispersions. The role of the ionic strength and pH in the aqueous media was investigated.

2.- Materials and methods

2.1.- Materials

All chemicals used in the preparation of the drug dispersions were of analytical quality (Guinama, Spain).

2.2.- Methods

The stability of the PZQ aqueous dispersions (0.5%, w/v) was characterized by UV-Vis spectrophotometric determinations (λ = 263 nm) as a function of time (PerkinElmer UV/Vis Lambda 25 spectrophotometer, PerkinElmer, USA). The formulations contained different ionic strengths, i.e. NaCl, $CaCl_2$, and $AlCl_3$, ranging from 10^{-5} to 10^{-1} M, at pH 5. The influence of the pH values (3 to 9) on the stability was also evaluated using the same methodology.

3.- Results and discussions

The PZQ sedimentation rate was determined by the electrolyte concentration. Generally speaking, there was a clear trend toward greater sedimentation rates as the electrolyte concentration become greater (see for instance Fig. 1). This is probably the consequence of the weight of the voluminous sediments that are formed at

greater ionic strengths, when the attractive forces (hydrophobicity) overcome the repulsive electrostatic interactions between the particles.

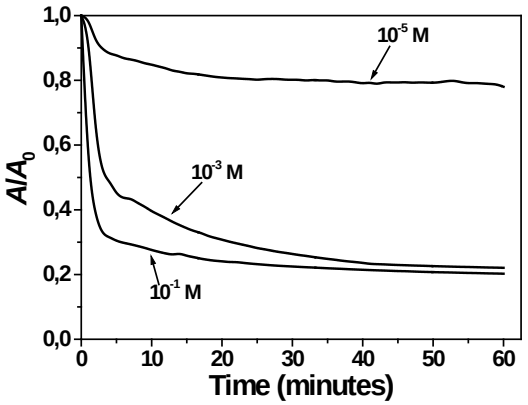


Fig. 1: Optical absorbance A (relative to its initial value, A_0) as a function of time for PZQ aqueous dispersions (pH 5) at the NaCl molar concentrations: 10^{-1}, 10^{-3}, and 10^{-5}.

Similarly, the pH of the aqueous media can also influence the stability of the drug dispersions (Fig. 2). In fact, acidic conditions determined a slightly clearer tendency for faster sedimentations. This may be the consequence of the slightly smaller surface electrical charge that the particles may acquire at these pHs, which may fail in preventing aggregation (hydrophobic attraction).

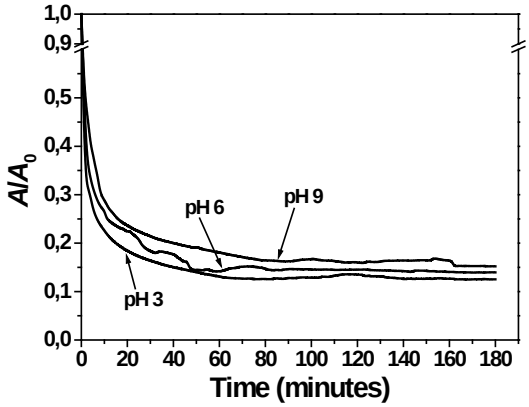


Fig. 2: Optical absorbance A (relative to its initial value, A_0) as a function of time for PZQ aqueous dispersions at pH 3 (○), 6 (□), and 9 (◊), in the presence of 10^{-3} M NaCl.

Finally, and independently of the electrolyte type and concentration, and pH values, the drug dispersions developed a "delayed" or "hindered" sedimentation.

4.- Conclusions

Chemical composition of the aqueous media where a solid drug is dispersed has a key role in the control of the stability of an oral liquid formulation. Electrokinetic and flocculation studies may help in completely defining the stability of these pharmaceutical preparations.

5.- Acknowledgements

Financial support from proyect PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, Spain).

6.- References

[1] C. Caffrey, Curr. Opin. Chem. Biol., 11, 433-439, 2007.

[2] H. Meier, G. Blaschke, J. Pharm. Biomed. Anal., 26, 409-415, 2001.

[3] J. Conway, L. Bero, C. Ondari, K. Wasan, J. Pharm. Sci., 102, 1419-1433, 2013.

[4] M.A. Ruíz-Martínez, M. Muñoz de Benavides, M.E. Morales-Hernández, V. Gallardo-Lara, Farmaco, 58, 1289-1294, 2003.

Desarrollo de una formulación farmacéutica de aplicación tópica con potencial utilidad en el tratamiento del acné

Tamara ALBARRÁN-MOLINA[(1)], Noelia A. MARTÍNEZ-MUÑOZ[(2,3)], Ángel V. DELGADO[(4)], José L. ARIAS[(1,5,6)]

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España.
2. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina.
3. Departamente de Química, Instituto de Química de San Luis (INQUISAL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de San Luis, Argentina.
4. Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.
5. Instituto Biosanitario de Granada (ibs.GRANADA), Servicio Andaluz de Salud (SAS) - Universidad de Granada, España.
6. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

e-mail de contacto: jlarias@ugr.es

1.- Introducción

El acné es una enfermedad inflamatoria de los folículos pilosebáceos, y representa una de las disfunciones dermatológicas más frecuentes de la piel [1]. Debido a las características dermatológicas de este tipo de pacientes es necesaria la elaboración de un gel hidrófilo. Este tipo de fórmula posee mayor cantidad de agua, sin componente oleoso. A su vez, estas preparaciones farmacéuticas se formulan asociando diferentes principios activos, p. ej. ácido salicílico y ácido glicólico, los cuales presentan acción queratolítica al reducir el espesor del estrato córneo e incrementar la eliminación de las escamas de éste. Por otra parte, y como recurso farmacotécnico, estas formulaciones requieren la adición de un agente humectante.

El presente trabajo propone el diseño de una formulación farmacéutica óptima destinada al tratamiento tópico del acné común. Con este fin se desarrolló un gel hidrófilo ácido, que estaría indicado en pieles grasas y que contiene salicílico y glicólico. Se ensayaron geles con dos tipos de agentes suspensores (Carbopol® 940 y carboximetilcelulosa sódica) y dos humectantes (glicerina y propilenglicol).

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Materiales

Las materias primas fueron suministradas por Fagrón (España) y Guinama (España). Los geles fueron elaborados con un agitador mecánico Ika Eurostar 60 digital con varilla de hélice de tres paletas. El estudio reológico (viscosimetría y oscilometría) se realizó en un dispositivo que constaba de un baño termostatizado con sistema de recirculación de agua, compresor de aire y un reómetro Böhlin CS40.

2.2.- Métodos

Los geles se elaboraron siguiendo el procedimiento normalizado de trabajo del Formulario Nacional PN/L/FF/003/00 [2]. El estudio reológico se acometió a 25.0 ± 0.5 ^{o}C, usando una configuración geométrica de cono plano en la placa superior y la placa inferior inmóvil (separación entre placas: 150 μm. Durante el estudio de extensibilidad se controló el pH con tiras indicadoras de pH (Merck) [3,4]. También se realizaron estudios organolépticos.

3.- Resultados y Discusión

De los suspensores estudiados, el Carbopol® 940 presentó mejores resultados en la formulación de los geles. En cuanto a los humectantes, los estudios organolépticos y de extensibilidad no demostraron diferencias

significativas entre los geles preparados con glicerina, y con propilenglicol. Se comprobó que los geles obtenidos presentaban un comportamiento de flujo no newtoniano con carácter pseudoplástico y con buena capacidad elástica (Fig. 1).

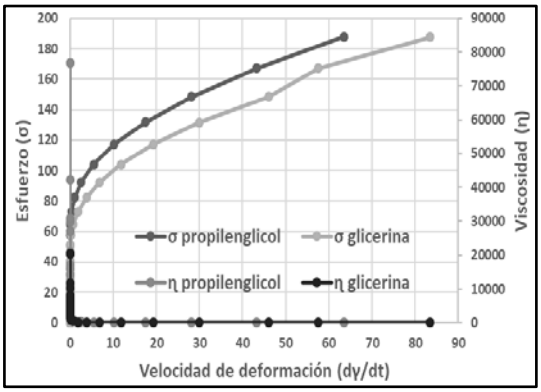


Fig. 1: Evolución del esfuerzo (σ) y de la viscosidad (η) en función la velocidad de deformación (dγ/dt) en las preparaciones elaboradas con los humectantes glicerina, y propilenglicol.

En la Fig. 1 queda patente cómo el incremento del esfuerzo y de la velocidad de deformación supone la disminución de la viscosidad. Además, se observa cómo el esfuerzo al que se someten ambos geles determina su comportamiento como fluidos no newtonianos independientes del tiempo, con carácter pseudoplástico (>1). Los geles elaborados con glicerina requirieron un menor esfuerzo para obtener la misma velocidad de deformación.

Finalmente, el ensayo de oscilometría (Fig. 2) puso de manifiesto un comportamiento típico elástico para todas las formulaciones. En ambos casos se observó cómo el módulo elástico (*G*') era mayor que el módulo viscoso (*G*").

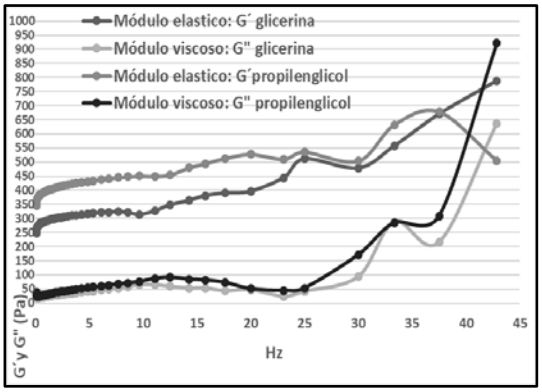


Fig. 2: Evolución de G´y G"(Pa) en función del barrido de frecuencias (Hz).

3.- Conclusiones

Se ha diseñado un gel ácido de Carbopol® que contiene salicílico y glicólico, y glicerina como humectante, que podría ser empleada en el tratamiento del acné. Los estudios organolépticos, de extensibilidad y reológicos así lo avalan.

4.- Agradecimientos

Proyecto PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).

5.- Referencias

[1] B. Urso, K.M. Updyke, R. Domozych, J.A. Solomon, I. Brooks, V. Burton, R.P. Dellavalle, Cutis, 102, 41-43, 2018.

[2] E. Sintas Ponte E, A. Vardulaki Operman, M.L. Tarno Fernández, A. Núñez Velázquez, coordinadores, *Formulario Nacional*, 2 ed., Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (España), 2015.

[3] E.A. Fernández-Montes, *Técnicas y Procedimientos en Formulación Magistral Dermatológica*, Editorial Alía, Madrid (España), 2005, pp. 73-80.

[4] M.A. Ruíz-Martínez, M. Muñoz de Benavides, M.E. Morales-Hernández, V. Gallardo-Lara, Farmaco, 58, 1289-1294, 2003.

CYCLODEXTRIN-FUNCTIONALIZED CELLULOSE FILTER PAPER FOR SELECTIVE CAPTURE OF DICLOFENAC

Ana M. ARES-FUENTES[(1)], Alejandro COSTOYA[(2)], Antonia M. CARRO[(1)], Rosa A. LORENZO[(1)], Angel CONCHEIRO[(2)], Carmen ALVAREZ-LORENZO[(2)]

1. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
2. Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R+DPharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Email de contacto: anamaria.ares.fuentes@rai.usc.es

1.- Introduction

A wide range of pharmaceutical compounds is used in human and veterinary medicine. These compounds, in their active form or as metabolites, are excreted to different water sources and industrial effluents. The increase in the use of pharmaceutical compounds leads to environmental pollution. This causes negative effects on health and the environment, generally in aquatic media [1].

The aim of this work is to design cyclodextrin-grafted filter paper for removal and subsequent analysis of common pharmaceuticals from water and saline media. For this purpose, a cellulosic material functionalized with β-cyclodextrin was prepared. The effects of variables such as adsorption and desorption time, suitable desorption solvent type, ionic strength and desorption conditions were evaluated.

2.- Material and methods

2.1.- Synthesis of acrylamidomethyl-β-cyclodextrin

β-cyclodextrin (14.98 g) and N-(hydroxymethyl) acrylamide (12.37 mL) were added to 1% HCl solution with magnetic stirrer and heated at 80°C for 30 minutes [2]. To stop the reaction, acetone was added and the mixture was kept at 4°C for 24h to precipitate the cyclodextrin derivative. Then, the precipitate was filtered under vacuum, washed with acetone and placed in vacuum desiccator at room temperature for 24 h. Finally, the modified cyclodextrin (β-CD-NMA) was stored at 4°C.

2.2-Funtionalization of filter papers with β-CD-NMA

Square fragments of filter paper (2x2 cm) were placed in water. Then a mixture of $FeSO_4$ x 7 H_2O 0.05 M and 30% H_2O_2 was added and heated at 55°C for 25 min [3]. Then, β-CD-NMA diluted in water was added and heated 55°C for 15 minutes. The paper pieces were washed twice with acetone solution and dried at 80°C for 20 min. Finally, they were kept at 50°C for 24h.

2.3-Adsorption experiments

Modified papers and non-modified control papers were tested for diclofenac (40 μg mL^{-1}) from three aqueous media: ultra-pure water, 0.9% NaCl and 3.5% NaCl solution at room temperature for different periods of time.

2.4-Desorption experiments

Releases studies were carried out with 5 mL of eluting solvents: water, 0.9% NaCl solution, EtOH, EtOH-NaOH (10 mM) (50:50, v:v), ACN-NaOH (10 mM) (50:50, v:v), IPA-NaOH (10 mM) (50:50, v:v) and IPA at different time intervals.

3.- Results and discussion

Diclofenac adsorption was investigated in aqueous media of different saline concentration. Non-modified control papers sorbed small amounts of diclofenac from the medium. Differently, β-CD-grafted papers trapped almost 64% of total drug in water solution. In 0.9% NaCl medium, functionalized paper sorbed almost 75% of total drug, while in 3.5% NaCl medium modified papers captured almost 88%, showing that an increase in ionic strength

produces a positive effect on extraction of the drug from water by β-CD-grafted papers. Moreover, 4 hours was selected as the optimum adsorption time because the uptake occurs at an almost constant rate for the first 4 hours.

The elution equilibrium was reached in 4 to 6 hours, depending on the medium. The equilibrium was attained earlier when the extraction medium was alkaline. The highest elution yield (73%) from papers loaded with diclofenac in purified water was obtained using IPA-NaOH 10 mM. For papers loaded in NaCl 0.9%, the best results were provided by ACN-NaOH 10 mM with around 72% elution yield, followed closely by EtOH-NaOH 10 mM. Similarly, desorption tests from papers loaded in 3.5% NaCl, showed the best results (71% yield) in ACN-NaOH 10 mM. Acetonitrile was more efficient than ethanol or isopropanol due to its higher polarity. The presence of the organic solvent and the alkaline pH diminished the stability constant of the inclusion complex, causing a rapid release of the diclofenac captured by the β-CD-paper functionalized.

4.-Conclusions

A cellulose material functionalized with β-CD was obtained applying the Fenton reaction. Adsorption time was fixed to 4h, when the amount of diclofenac sorbed was maximum. ACN-NaOH (10 mM) was the most appropriate eluent when saline medium was used for adsorption step. Overall, the grafting of cyclodextrins was revealed to be a very effective tool for removing diclofenac from aqueous environments.

5.- Acknowledgements

This work was supported by MINECO (SAF2017-83118-R and AGL2014-5364-R), Agencia Estatal de Investigación (AEI) Spain, Xunta de Galicia (ED431C 2016/008) and FEDER.

6.- References

[1] R. Rodríguez-Dorado, A.M. Carro, I. Chianella, K. Karim, A. Concheiro, R.A. Lorenzo, S. Piletsky, C. Alvarez-Lorenzo, Anal. Bioanal. Chem., 408, 6845-6856, 2016.

[2] U. Siemoneit, C. Schmitt, C. Alvarez-Lorenzo, A. Luzardo, F. Otero-Espinar, A. Concheiro, J. Blanco-Mendez, Int. J. Pharm., 312, 66-74, 2006.

[3] E. Vismara, L. Melone, G. Gastaldi, C. Cosentino, G. Torri, J. Hazardous Mat., 170, 798-808, 2009.

Estudio de biodistribución tisular de sistemas lipídicos nanoestructurados conteniento elosulfasa alfa en modelo murino

José Víctor ALVAREZ GONZÁLEZ [(1)], Lorena ALONSO ALCONADA [(3)], Mari Luz COUCE PICO [(2)], Asteria LUZARDO [(1)], Francisco OTERO ESPINAR [(1)]

1. Departamento de Farmacologia, Farmacia y Tecnologia Farmacéutica y, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela
2. Área de Pediatría, Facultad de Medicina e Odontoloxia, Universidad de Santiago de Compostela.
3. Fundacion Ramón Dominguez, Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Email de contacto: jvictor_alvarez@hotmail.com

1.- Introducción

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son enfermedades raras que se caracterizan por la deficiencia de enzimas lisosomales, que causan el acúmulo de ciertas substancias a nivel celular. Entre los posibles tratamientos de elección se encuentra la terapia de remplazo enzimático (ERT), que consiste en el aporte de la enzima deficitaria.

La enfermedad de Morquio A es una (EDL) que afecta a gran parte del organismo, siendo especialmente importante a nivel del musculo esquelético en donde genera lesiones y alteraciones muy graves (1). A día de hoy la ERT consiste en la administración de elosulfasa alfa, la enzima recombinante, mediante una perfusión semanal de 3 horas en dosis de 2 mg/kg. (2). El mayor inconveniente del tratamiento es que pese a las altas concentraciones plasmáticas alcanzadas, la distribución de las enzimas en los órganos y tejidos afectados es muy escasa, lo que limita su eficacia.

La aplicación de sistemas nanoparticulares puede ser una alternativa que mejore la distribución de estos fármacos (3). En nuestro grupo hemos desarrollado unos sistemas lipídicos nanoestructurados (NLC) capaces de inmovilizar enzimas utilizadas en ERT (4).

El objetivo de este trabajo, es determinar la biodistribución de NLC conteniendo la enzima elosulfasa alfa (enzima recombinante usada en la ERT de la enfermedad de Morquio A) en ratones WT.

2.- Materiales y métodos

Los NLC conteniendo elosulfasa alfa se prepararon de acuerdo a la patente nº 18 382513.2 (4). Para el estudio las NLC resuspendidas en agua Milli Q se tiñen con 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-perclorato de tetra-metillindodicarbocianina (DiD, Thermo).

El estudio de biodistribución fue aprobado por el comité de experimentación animal de la USC (15010/2015/001). El ensayo se realizó en ratones WT a los que se administraron 100µL de NLC mediante inyección intravenosa en la vena caudal de la cola. A las 24 horas post-administración los animales fueron anestesiados y sacrificados. Se les practicó la autopsia extrayéndoles los siguientes órganos: cerebro, hígado, riñón, bazo, pulmón, tejido muscular y cartílago y hueso de la rótula. Se emplearon 6 ratones para el experimento.

Parte de los tejidos se seccionan para su observación a través de microscopia electrónica de transmisión (JEOL TEM 1011). Las muestras fueron fijadas en glutaraldehido al 2,5% y tetraoxido de Osmio en buffer de cacodilato, y sumergidas en resina de epoxy Spurr´s, obteniéndose secciones ultra finas que fueron teñidas con acetato de uracilo y citrato de plomo.

El resto de las muestras fueron sumergidas en formol fijadas en parafina y cortada a través de un micrótomo. Una vez realizados los cortes se le añade una solución de DAPI con el fin de teñir los núcleos celulares, se inmovilizan con Mowiol y se observa

mediante microscopia confocal de fluorescencia.

3.- Resultados y discusión

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se fusionaron para completar una sección del tejido. Para ello se empleó el programa Photoshop CC. Además, se incluyen la ampliación de planos a diferentes objetivos x20, x40, x63, x100. En la figura 1 se muestran los resultados para el tejido cerebral

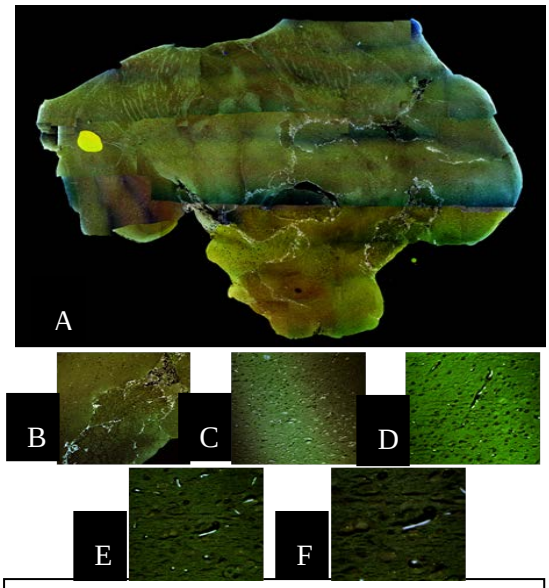


Fig.1-A) Cerebro de ratón después de 24 horas de administración en la cola con una solución de nanopartículas, B) Plano de cerebro de ratón donde se puede observar extravasación de nanopartículas desde los vasos al interior del tejido C) Imagen de cerebro ampliada a través de objetivo x20, D) Imagen de cerebro ampliada a través de objetivo x40, E) Imagen de cerebro ampliada a través de objetivo x63, F) Imagen de cerebro ampliada a través de objetivo x100.

Para completar el estudio del tejido del cerebro de ratón se tomaron muestras del mismo tejido a través de microscopia electrónica para confirmar la presencia de las NLC (figura 2).

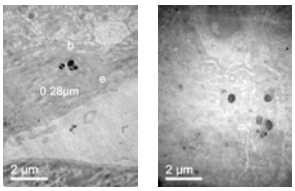


Fig.2 Izq)-Paso de NLC a través de la BHE, Der) NLC en el citoplasma de una neurona.

En las imágenes se observan las NLC distribuidas por el tejido, apreciando NLC en los planos obtenidos a los diferentes aumentos. Las imágenes de TEM muestran que las NLC son capaces de atravesar la barreta hematoencefalica y de llegar a las neuronas.

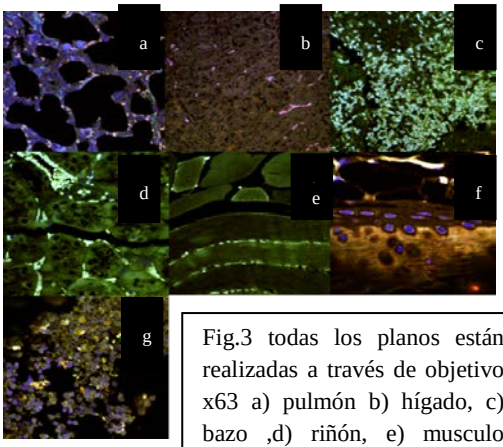


Fig.3 todas los planos están realizadas a través de objetivo x63 a) pulmón b) hígado, c) bazo ,d) riñón, e) musculo esquelético ,f) cartílago g) médula ósea.

En la figura 3 se muestran ejemplos de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal del resto de tejidos de los animales. Se observan NLC distribuidas en todos los tejidos estudiados, resultados que se confirman en las imágenes TEM.

4.-Conclusiones

Las NLC conteniendo elosulfasa alfa, son capaces de alcanzar de manera significativa los principales tejidos que se ven afectados en el síndrome de Morquio. Los estudios muestran que pueden vencer barreras como la hematoencefalica y llegar a tejidos como los del Sistema Nervioso Central.

5.- Referencias

[1] Hendriksz et al. Am J Med Genet A. 2015, 167 (1): 11–25.
[2] Qi et al. Clin Pharmacokinet. 2014, 53 (12): 1137-47
[3] Beloqui et al. Eur J Pharm Biopharm. 2013, 84 (2):309-14
[4] Alvarez González et al . Solicitud de patente nº 18 382513.2.

FAST SEPARATION AND QUANTIFICATION OF DESIGNER BENZODIAZEPINES AND Z-HYPNOTICS IN PLASMA USING MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS) AND UPLC-MS/MS

Ana M. ARES[(1)], Rosa A. LORENZO[(1)], Purificación FERNÁNDEZ[(2)], Antonia M. CARRO[(1)]

1. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
2. Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Email de contacto: anamaria.ares.fuentes@rai.usc.es

1.- Introduction

Z-hynotics (zolpidem, zaleplon and zopiclone) have been introduced as alternative to benzodiazepines in the treatment of the insomnia. In the last years, the consumption of these compounds has increased worldwide [1]. In addition, the illicit market of new psychoactive substances (NPS) is constantly growing, including designer benzodiazepines (DBZD) [2]. Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a miniaturization of solid-phase extraction (SPE). This technique follows the same principles of SPE, with the advantage that uses less amount of solvent and less sample volume, resulting in faster and low-cost technique. In addition, sorbent phase can be reused in successive extractions, unlike the cartridges used in SPE [3].

2.- Material and methods

2.1.- Microextraction by packed sorbent procedure

300 µL of plasma spiked with working standard solutions was mixed with 200 µL of MeOH. After centrifugation for 5 min at 15000 rpm, 300 µL of supernatant was collect and diluted with 200 µL of phosphate buffer (50 mM pH6) and centrifugated for 5 min at 15000 rpm and subjected to MEPS procedure. The sorbent was previously conditioned with 100 µL of MeOH and 100 µL with ultrapure water. Then, 100 µL of sample was loading, aspirating and discarding the same volume eight times through the sorbent phase. The phase was washed with 150 µL of 2.5% MeOH, dried for 0.5 min and analytes were eluted with 2 x 100µL of dichloromethane/2-propanol/ammonium hydroxide (78:20:2, v/v). The eluate was evaporated under nitrogen stream at 40 °C and reconstituted with 50 µL of mobile phase. The sorbent material was washed with 3 x 100 µL of 10% IPA I MeOH, 3 x 100 µL of 5% MeOH, 4 x 100 µL of water ultrapure, 4 x 100 µL of 0.1% formic acid and 4 x 100 µL of MeOH.

2.2-UPLC-MS/MS conditions

Chromatographic separation was carried out using an ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm particle size) at 55 °C. The mobile phase consisting in 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) was used in a gradient elution programme (0 min 90% A- 3.5 min 30% A, 4.0 min 90% until 5.0 min). A Xevo TQD mass spectrometer was used with an electro-spray ionization source operating in positive mode with: 0.6 kV of capillary voltage, ion source temperature of 120 °C, a flow rate of 50 L/h of nitrogen as nebulizer and a flow rate of 1100 L7h at 500 °C of nitrogen as drying gas.

2.3-Method validation

Method validation in terms of linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy (as trueness and precision components) and matrix effects was studied. The linearity of the method was investigated by analyzing in triplicate drug-free plasma samples spiked at eight concentrations from 0.5 to 5 ng/mL (50 ng/mL IS). The LOD and LOQ were considered as the lowest concentration resulting a signal to noise ratio of 3 and 10, respectively. The precision was assessed at three concentrations (10, 100 and 250 ng/mL) in QC samples analyzed in the same day and on different days to estimate the

intermediate precision using three and five replicates per concentration, respectively.

3.- Results and discussion

Six different systems of solvents were performed in order to select the best elution solvent. The best extraction efficiency was obtained using a ternary solvent forming by dichloromethane/2-propanol/ammonium hydroxide (78:20:2). The other factors to affect the extraction were studied in a screening design ($3^3 4^2$//16). Results provided an elution volume of 200 µL, 8 strokes, pH 6 and 150 µL of washing volume. Regarding the type of phase used, the polymeric sorbent provided the best results. An alternative study have been carried out with three sorbents (polymeric, mixed mode and C18), due to, polymeric is not usually used in MEPS. A validation study in terms of matrix matched, recovery and process efficiency was carried out at three concentrations. The results suggested the presence of matrix effect at some of three QC concentrations for many compounds using the three sorbent phases. However, when polymeric phase was used, the use of the IS calibration compensated the matrix effect and excellent results of recovery and process efficency were obtained. In view of these results, it is demonstrated that the best option for the simultaneous extraction of all the drugs studied is the polymeric phase. In terms of validation, regression analysis provides good determination coefficients ranged between 0.9932 and 0.9990 for all drug studied. LODs ranged from 0.5 to 5 ng mL^{-1} and LOQs ranged from 1 to 10 ng mL^{-1}. Precision results were expressed as relative standard deviation (%RSD). Excellent values were obtained and ranged from 0.1 to 6.5% RSD for intra-day precision and 0.5-10.6% RSD for inter-day precision. The trueness was evaluated using process efficiency and in terms of relative recovery. The values of process efficiency ranged from 63% to 117%. The values of relative recovery ranged from 61% to 123%. A total of seven plasma samples from overdoses cases were analyzed using the proposed method to evaluate its applicability in duplicate. DBZDs were not detected in any samples but the presence of zolpidem in all of them was confirmed <LOQ. Only one of these samples (sample 6, 2144 ng mL^{-1}) was quantified for zolpidem. The presence of other BZDs was also detected in all the analyzed samples.

4.-Conclusions

A fast method of MEPS combined with UPLC-MS/MS has been developed and validated for the analysis of five DBZDs and three Z-hypnotics in human plasma samples. The type of sorbent was investigated in order to select the most suitable for this purpose and polymeric phase allows simultaneous extraction of the target compounds with the best results. The application of the new method to the analysis of forensic samples reveals the consumption of zolpidem, together with other BZDs. Although DBZD were not found in these real samples, the method demonstrates the importance of having validated methods for the detection and quantification of DBZD as the market advances for the consumption of these NPS.

5.- Acknowledgements

This work was funded by Ministerio del Interior-DGT (Project SPIP2015-01838), Ministerio de Economía y Competitividad (Project AGL-2014-53647-R) of Spain, Xunta de Galicia (ED431C 2017/05), and the European Regional Development Fund (FEDER). The authors are grateful to Professor M.I. Loza (BioFarma Research Group–USC) for the instrumentation availability.

6.- References

[1] S. Sakshaug, M. Handal, V. Hjellvik, C. Berg, A. Ripel, I. Gustavsen, J. Mørland, S. Skurtveit, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 120, 292-298, 2017.

[2] K. R. Manchester, E. C. Lomas, L. Waters, F. C. Dempsey, P. D. Maskell, Drug Test. Anal., 10, 37-53, 2018.

[3] L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim, J. Chromatogr. B, 1043, 33-43, 2017.

Farmacocinética Poblacional de Ácido Valproico en pacientes epilépticos

Paulo TEIXEIRA SILVA [(1)], María José GARCÍA SÁNCHEZ [(1)], María José OTERO LOPEZ [(2)], Dolores SANTOS BUELGA [(1)].

1. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Calle Lic. Méndez Nieto, s/n, Salamanca.
2. Servicio de Farmacia, Hospital Universitário de Salamanca, Paseo de San Vicente, 139, Salamanca.

E-mail de contacto: paulo.rts@gmail.com

1.- Introducción

El ácido valproico (VPA) es un fármaco ampliamente utilizado en la práctica clínica desde que fue aprobado para el tratamiento de la epilepsia en 1967 en Francia. Desde entonces ha mostrado ser efectivo en diferentes indicaciones terapéuticas, como los síndromes de epilepsia focal o generalizada y los episodios de manía en desorden bipolar [1]. La monitorización de sus concentraciones plasmáticas es una práctica habitual en la clínica, como estrategia de ayuda al clínico en la optimización de su posología y como método directo para conocer la adherencia al tratamiento con este fármaco [2].

El objetivo de este estudio es desarrollar un modelo farmacocinético poblacional (popPK) de VPA actualizado para la población española y evaluarlo mediante validación interna y externa.

2.- Material y Métodos

2.1.- Pacientes

El estudio retrospectivo se desarrolló con los datos procedentes de la monitorización de VPA de pacientes incluidos en el programa de monitorización terapéutica de fármacos (TDM) del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Salamanca. Para el desarrollo del modelo se utilizaron 1341 muestras procedentes de 663 pacientes (1992-2013), mientras que para su validación se procesaron 1214 muestras de 546 pacientes recogidas con posterioridad.

2.2.- Modelización farmacocinética poblacional

El desarrollo del modelo popPK se realizó aplicando un método de modelos de efectos mixtos no lineales utilizando el programa NONMEM versión 7.3, con estimación FOCEI.

2.1.1.- Modelo Base

Debido a que las muestras fueron tomadas al final del intervalo posológico, la cual proporciona escasa información sobre los procesos de absorción y distribución, se mantienen fijos, de acuerdo a la bibliografía, los valores de la constante de absorción y volumen aparente de distribución [3].

2.1.2.- Modelo de Covariables

Se estudió la influencia de variables demográficas, antropométricas, de tratamiento y comedicación, incluyendo la influencia de la técnica analítica sobre la estimación del CL/F de VPA. Se realizó una selección preliminar de las covariables analizadas mediante inspección gráfica y aplicando un modelo aditivo generalizado. La construcción del modelo de covariables se llevó a cabo mediante el procedimiento de inclusión paso a paso (SCM). Los criterios de diagnóstico para la selección del modelo fueron las gráficas de bondad de ajuste, errores de estimación y *shrinkage*.

2.1.3.- Evaluación del modelo

La validación interna se hizo utilizando el método de *bootstrap* no paramétrico con reemplazamiento de 1000 replicados para cada modelo final.

Para la validación externa del modelo se utilizaron muestras más recientes procedentes de pacientes de características

similares a las de la población utilizada para desarrollar el modelo.

3.- Resultados y Discusión

El amplio margen de edad de los pacientes ha permitido, clasificarlos de acuerdo a esta variable en tres grupos independientes, los cuales se definieron a partir de la inspección de las gráficas de CL/F frente a la edad. El primer punto de corte se estableció en los 5 años (Fig. 1), edad de agrupamiento pediátrico no reportada hasta el momento en ningún otro estudio. El segundo grupo incluyó a pacientes entre 5 y 14 años, considerada ésta última como la edad de inicio de la pubertad. Finalmente el tercer grupo incluyó la población adulta con edad comprendida entre los 15 y los 82 años.

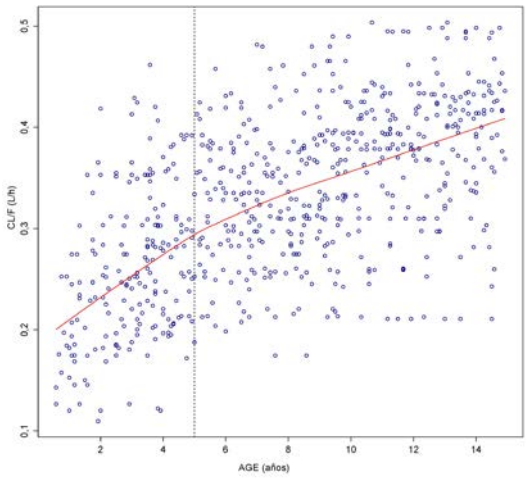


Fig. 1: Representación gráfica del CL/F (aclaramiento plasmático) de ácido valproico frente a AGE (edad) con corte a los 5 años.

Se desarrollaron tres modelos popPK correspondientes a cada uno de estos grupos, los cuales fueron evaluados mediante validación interna y externa. En la validación interna, las estimaciones de los parámetros de los modelos popPK propuestos se encuentran dentro del intervalo de confianza del 95 %, lo que confirma la adecuada capacidad descriptiva de los mismos. Los parámetros de evaluación externa en cada modelo para el parámetro CL/F muestran un bajo sesgo y una buena precisión de la capacidad predictiva de todos los modelos inicialmente desarrollados. Por ello y con objeto de desarrollar un modelo más potente y fiable estos datos utilizados en la validación de los modelos se combinaron con los empleados para el desarrollo de los mismos. Los modelos popPK para CL/F finamente obtenidos con todos los datos para cada grupo de edad fueron los siguientes:

Edad ≤5 años:

$$CL/F(L/h)=0{,}236\times e^{(0{,}061\times(TBW-15))}$$

5 años < Edad <15 años:

$$CL/F(L/h)=0{,}401\times e^{(0{,}655\times(BSA-1{,}2))}\times(1{,}40^{CBZ})$$

Edad ≥15 años:

$$CL/F(L/h)=0{,}607\times e^{(0{,}552\times(BSA-1{,}8))}\times(1{,}51^{CBZ})\times(1{,}64^{PHT})\times(1{,}34^{PB})$$

TBW: peso corporal total, BSA: área de superfície corporal, CBZ: carbamazepina, PHT: fenitoína, PB: fenobarbital.

En todos los casos, los errores de estimación fueron aceptables para los parámetros de efectos fijos (<9 %), de efectos aleatorios (<23 %), y de la contracción de la varianza (<35 %), lo que confirma la adecuación de los modelos propuestos.

4.- Conclusiones

Se han desarrollado y validado tres modelos popPK para VPA en pacientes epilépticos, dos en poblaciones pediátricas y uno en adultos. Los factores que han mostrado una influencia en la variabilidad interindividual de CL/F de este fármaco, además de la edad, han sido el TBW en niños menores de 5 años de edad; BSA y comedicación con CBZ en niños de 5 a 14 años de edad; y BSA y comedicación con CBZ, PHT y PB en la población adulta.

5.- Referencias

[1] T. Tomson, D. Battino, E. Perucca. The remarkable story of valproic acid. Lancet Neurology, 15, 141, 2016.

[2] D. Buelga, M. Sánchez, M. Lopez. Capítulo 4. Antiepilépticos. En:Monitorización de Fármacos en la Práctica Clínica (A. Hurlé, Ed.), Kindle Amazon, 2015, 85-112.

[3] S. Dutta, R. Reed. Distinct absorption characteristics of oral formulations of valproic acid/divalproex available in the United States. Epilepsy Research, 73, 275-283, 2007.

Estabilidad Térmica de Composites PMMA-HDL

Amanda D. LEÃO [(1)], Leandro M. FRANÇA [(1)], Felipe A. MARINHO [(1)], Kátia A.S. AQUINO [(2)], Mônica F.R. SOARES [(1)], José L. SOARES-SOBRINHO [(1)]

1. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Centro de Ciencias da Saude, Universidad Federal de Pernambuco. Recife- Brasil.
2. Departamento de Ciencias Energéticas, Universidad Federal de Pernambuco. Recife- Brasil.

Email de contacto:damasceno.leao@gmail.com

1.- Introducción

La incorporación de pequeñas cantidades de arcilla a polímeros pueden dar lugar a materiales con mejor tenacidad, resistencia mecánica y estabilidad térmica. [1]

Los hidróxidos duplos lamelares (HDLs) son arcillas aniónicas que pueden funcionar como refuerzo para polímeros, aumentando la estabilidad térmica y también sus propiedades tecnológicas. [2] El PMMA (polimetacrilato) es un polímero biocompatible. La formación de las cadenas poliméricas en la polimerización *in situ* puede provocar cambios en la estructura lamelar de los HDLs pudiendo originar composites exfoliados o intercalados generando una amplia variedad de sistemas. [3]

El objetivo de este trabajo fue obtener composites PMMA-HDL a través da polimerización *in situ* de PMMA. Los composites se caracterizaron por difractometría de Rayos X, infrarrojo y termogravimetría.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Reactivos

Los reactivos metacrilato de metilo (MMA), peróxido de benzoílo (PBO), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, KOH y $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ se obtuvieron de Sigma Aldrich®. Los disolventes metanol y metil-etil-cetona se obtuvieron de Merck. MMA y PBO se purificaron antes de usar.

2.2.- Reación de polimerización

Inicialmente se obtuvo HDL Mg_2Al-Cl por una reacción de coprecipitación.

La polimerización se llevó a cabo con 1% PBO (p/p) bajo agitación magnética durante 2 horas a 80ºC. Los composites PMMA-Mg_2Al-Cl se prepararon en proporciones de 0.25%, 0.5%, 1%, 2% y 3% de HDL.

Para la solubilización de los composites se utilizó metil-etil-cetona y se secaron por la técnica de casting. Los composites se trituraron criogénicamente con nitrógeno líquido[4] y el tamaño de las partículas estandarizado se seleccionó con tamices de 90 μm.

3.- Resultados y Discusión

El análisis de los difractogramas reveló que Mg_2Al-Cl presenta las señales a 30º 2ɵ de los picos característicos de HDL. Las distancias (dhkl) para el plano (003) se calcularon a través de la ecuación de Bragg y se obtuvieron d003 de aproximadamente 7.0Å (Fig.1), de acuerdo con lo observado para este tipo de HDL.

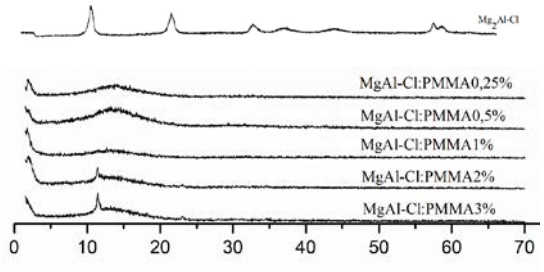


Fig.1 Difractogramas de Mg_2Al-Cl y de los composites.

Para los composites se observó la desaparición del pico basal que indica la exfoliación y dispersión del HDL. El pico que aparece en 2,5º 2ɵ corresponde a una distancia interplanar de 35,29 Å, que de acuerdo con la bibliografia coincide con la exfoliación de las lamelas.[5] El crecimiento de las cadenas de polímeros durante la polimerización *in situ* tuvo lugar dentro de las láminas y dio lugar al aumento progresivo del espacio intercolinal, hasta la exfoliación total y formación del composite. La ausencia

de otros planos cristalinos de los HDLs corrobora la exfoliación de los materiales. La banda ancha que aparece entre 10 y 20º 2ϴ corresponde a PMMA amorfa.

Los espectros de absorción IR de Mg_2Al-Cl (Fig. 2) mostraron bandas entre 700-800 cm^{-1} típicas de HDL que contienen cloruro.

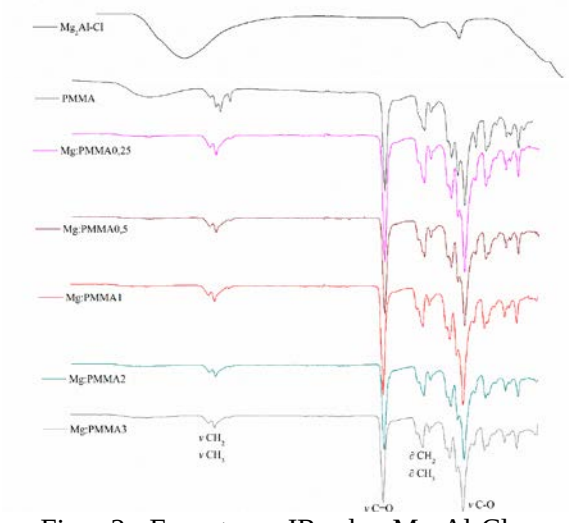


Fig. 2 Espectros IR de Mg_2Al-Cl, PMMA y composites.

Las bandas anchas de la región de 3500cm^{-1} se pueden atribuir a grupos de hidroxilo de moléculas de hidratación y grupos hidroxilo de lamelas. La banda 1630cm^{-1} puede ser atribuída a la deformación angular de las moléculas de agua.

Los espectros mostrar las bandas principales de PMMA que confirman la polimerización *in situ* en presencia del HDL. La presencia del grupo éster se observó a 1723cm^{-1} y el grupo C-O a 1143cm^{-1}. La presencia de los grupos CH_2 y CH_3 justifica las bandas 1439cm^{-1} y 1483cm^{-1}, respectivamente, y 2949cm^{-1}. También se observa la ausencia de bandas entre 1680-1620cm^{-1} del grupo C=C de MMA confirmando la formación del polímero.

Los datos termogravimétricos (Fig. 3) indican que a presencia de HDL no modifica el mecanismo de descomposición del PMMA, pero atenúa el primero evento de descomposición, lo que facilita una pequeña estabilización. Se observó un incremento porcentual del residuo debido al presencia del material inorgánico de HDL, como los óxidos simples y dobles de los cationes formados por las altas temperaturas.

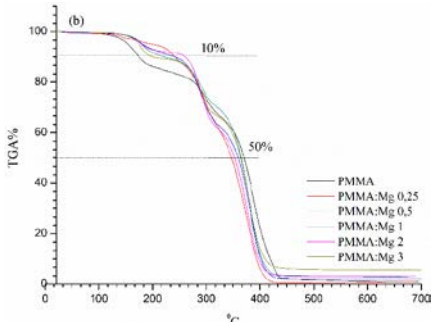


Fig. 3 Termogramas para los composites y para PMMA en atmósfera de N_2.

4.- Conclusiones

Es posible polimerizar *in situ* PMMA en presencia de HDL Mg_2Al-Cl, resultando en composites exfoliados e intercalados. Los composites obtenidos tienen mejor estabilidad térmica que PMMA solo.

5.- Agradecimientos

A CAPES por la concesión de una beca de investigación.

6.- Referencias

[1] Prado, B. R.; Bartolli, J. R. Synthesis and characterization of PMMA and organic modi fi ed montmorilonites nanocomposites via in situ polymerization assisted by sonication. **Applied Clay Science**, n. February, p. 0–1, 2018.

[2] Zhao, Yun Li, Feng; Zhang, Rui; Evans, David G; Duan, Xue Preparation of Layered Double- Hydroxide Nanomaterials with a Uniform Crystallite Size Using a New Method Involving Separate Nucleation and Aging Steps. ***Chem Mater***. n. 4, p. 4286–4291, 2002.

[3] Ali, Umar; Juhanni, Khairil; Abd, Buang; Nor Aziah. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Review.** n. June, p. 37–41, 2015.

[4] Moyo, L.; Focke, W.W.;Heidenreich, D.; Labuschagne, F.J.W.J.; Radusch, H.J. Properties of layered double hydroxide micro- and nanocomposites. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 1218–1227, 2013.

[5] Miyiata, S; Okada, A. The syntheses of hydrotalcite-like physico-chemical properties i : The systems Mg2+-Al3+-NO3-,Mg2+-Al3+-Cl-, Mg2+-Al3+-ClO4-, Ni2+-Al3+-Cl- and Zn2+-Al3+-Cl-. **Clays and Clay Minerals**, v. 23, p. 369–375, 1975.

Nanotechnology in medicine and challenges for the manufacturing of nanomedicines

Nádia R. AGUIAM [(1)], João A. LOPES[(1)],Helena F. FLORINDO[(1)], Liane MOURA[(1)]

1. Research Institute for Medicines (iMed.Lisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

Email contact: nadia.aguiam@campus.ul.pt , jlopes@ff.ulisboa.pt

1.- Introduction

"Nanomedicine" is the application of purposely designed nanoconstructs for better therapeutic and diagnostic outcomes, which cannot be otherwise achieved using micro or macro-systems. There is no nanomedicine, there is nanotechnology in medicine. Even if the expression "nanomedicine" is more proper to refer to "nanotechnology enabled medicine" in different sub-areas of medicine such as diagnostics, therapy or monitoring. Nanoconstructs may be in the form of nanocrystals, nanoparticles (polymeric or lipid or metallic), and any self-assemblage system of nanosized carrier for drug, vaccine, or genetic material [(1–4)]. By interacting with biological molecules, therefore at nanoscale, nanotechnology opens up a vast field of research and application. The production of nanoparticles is an exciting task in terms of reproducibility of size and polydispersity. The selection of materials and method of production of nanodevices is required because the in vitro and in vivo performances of the systems depend on the material characteristics as well as the production method.

Recently, FDA published a guidance to industry having in focus the development of human drug products in which a nanomaterial is present in the final dosage form [(5)]. This guidance focuses in specific considerations for quality assessment, in nonclinical and clinical studies, as they relate to the development of drug products containing nanomaterials. It is fundamental to identify and control the critical points during each manufacturing process. The application of quality-by-design (QbD) concepts, namely through process analytical technologies (PAT) has been useful to ensure an on-line/at-line quality assessment approach. These concepts lead to the implementation of International Conference on Harmonization (ICH) Q8 to Q11 that regulates the novel pharmaceutical developments [(6)].

2.- Manufacturing of nanomedicines

2.1.- Technology

Nanotechnology has revolutionized the pharmaceutical and biomedical research. Polymer, lipid, polymer-lipid grafts, metallic nanoparticles and carbon nanotubes are the nanosystems that have been most used in the new generation "nanomedicine".[(7,8)] It is essential to understand the method of production of these nanosystems and the scale-up (*Fig. 1*). Several methods are known for the production of nanoparticles depending upon the type of material such as polymer, lipid, and metal and all of them have notable features and limitations (*Fig. 2*).[(9)]

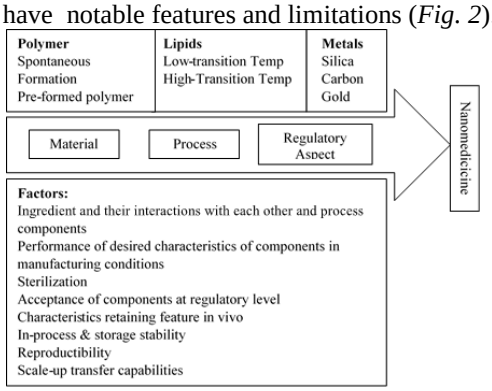


Fig. 1: Representation of material and process parameters, and regulatory aspects in the development of a "nanomedicine"

2.2.- Control

2.2.1.- Attributes

Little variations in the manufacturing process of nanomedicines could significantly affect the physicochemical properties such as size, shape, composition, crystallinity, solubility, viscosity, drug loading and release, and surface functionality.

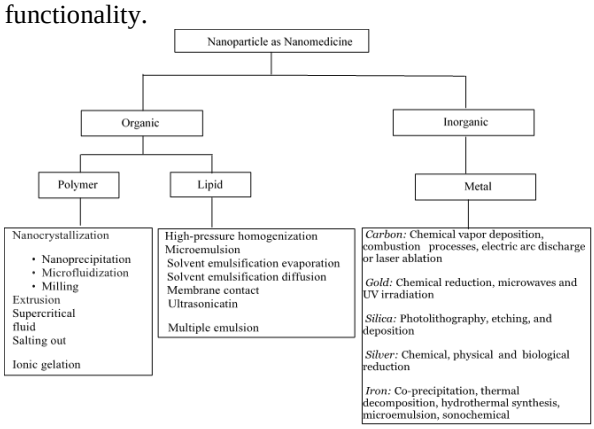


Fig. 2: Nanoparticle production as "nanomedicines" with various materials

From FDA-approved "nanomedicines", liposomes and polymeric nanoparticles have been the major components of nanoformulations-based drugs. These innovative systems are able to entrap considerable amounts of drugs and suffer modifications at surface to improve stability and/or to target specific molecules in the cell. Moreover, its reduced size allows to overcome membrane barriers and the release of entrapped therapeutic drugs at the desired target [(10)]. The methods of formulation could be classified as bottom-up or top-down [(11)]. The bottom-up nanoformulations are a less used manufacturing approach since the need of removal small traces of solvent continues to be a challenge for industry [(12)]. Thus, the substitution to aqueous solvents or low toxic solvents need to occur [(13)]. The high reactivity and surface area of nanomedicines may lead to cytotoxicity and genotoxicity problems [(14)].

2.2.2.- (Bio)analytical methods

The main reason of bionalysis in the pharmaceutical industry is to obtain a quantitative measure and metabolites of the drugs. The main goal is to achieve the pharmacokinetics, toxicokinetics, and bioequivalence and exposure response like pharmacokinetic/pharmacodynamic studies. Some techniques used in bioanalytical studies are Hyphenated techniques: LC–MS (liquid chromatography–mass spectrometry), GC–MS (gas chromatography–mass spectrometry), CE–MS (capillary electrophoresis–mass spectrometry) and Chromatographic methods: HPLC (high performance liquid chromatography) , Gas chromatography [(15-17)].

2.2.3.- Real-time control

During the last years the development on PAT is del ivering a platform for changing QbD based on pharmaceutical manufacturing [(18-19)]. Nowadays the methods and tools are easily available for pharmaceutical industry, which makes PAT possible for real time pharmaceutical process control. Real Time Release testing is defined in ICH Q8 (R2) part II as the ability to evaluate and ensure the quality of in-process and/or final product based on process data, which typically include a valid combination of measured material attributes and process controls. RTR testing does not eliminate all end product testing, an applicant may propose it for some attributes, not all. If all CQAs are assured by in-process monitoring of parameters and/or testing of materials, then end product testing might not be needed for batch release.

3.-Conclusions

Numerous methods have been developed in order to produce nanoparticles of desired characteristics but like most high technologies and taking into account the high regulation of pharmaceutical sector, it takes 10–15 years before reaching the market. Although methods such as membrane extrusion, supercritical fluid technology, and microfluidizer technology have scale-up capabilities, and few products of these technologies are in the market. On the basis of presently available literature and significant efforts in this area, it is expected that a significant number of nanodrugs or nanodevices will be approved. Consequently nanomedicine will translate many products from laboratory to market in future for various kind of therapeutics and clinical purposes. So far 50 nanodrugs were approved by FDA, and many more are under clinical trials phase II or even III.

The future of nanomedicines is looking towards for delivering the next generation of drugs, such as: molecularly targeted agents, toxin-like agents that induce cell death, DNA-/RNA-based therapeutics, peptides and drug combinations. The main challenges for these agents are increasing significant off-target accumulation and crossing the cell membrane.[(20)]

4.-Acknowledgments

Nádia Aguiam acknowledges the grant SFRH/BD/129786/2017 from Fundação para a Ciência e Tecnologia. Liane Moura acknowledges the grant SFRH/BPD/94111/2013 from Fundação para a Ciência e Tecnologia. This work received financial support from the European Union (FEDER funds through COMPETE) and National Funds (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) through project UID/DTP/04138/2013.

5.- References

[1] Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomedicine. 1, 22–30, 2005.

[2] Ladj R, Bitar A, Eissa MM, Fessi H, Mugnier Y, Le Dantec R, et al. Polymer encapsulation of inorganic nanoparticles for bio- medical applications. Int J Pharm., 458(1):230–41, 2013.

[3] Tang L, Cheng J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. Nano Today, 8:290–12, 2013.

[4] Khan MS, Vishakante GD, Siddaramaiah H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. Adv Colloid Interface Sci., 199–200:44–58,2013.

[5] Drug Products, I. B. P., that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry (2017). https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM588857.pdf.

Continuous manufacturing of pharmaceutical granules: a QbD approach

Rute CORDEIRO DIAS [(1)], Anssi-Pekka KARTTUNEN [(2)], André CANAS[(1)], Jarkko KETOLAINEN[(2)], João ALMEIDA LOPES[(1)], Ossi KORHONEN[(2)]

1. Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisbon, Portugal.

2. Promis Centre, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, Yliopistonranta 1, FI-70210 Kuopio, Finland.

Contact email: r.dias@campus.ul.pt

1.- Introduction

The pursue of delivering consistently a high-quality drug product has shifted the pharmaceutical manufacturing paradigm towards quality-by-design (QbD).[1] This systematic approach was applied in the production of granules by roller compaction (RC), as a main dry granulation technology nowadays. RC has lured attention from pharmaceutical industry since it's a cost-effective and a high throughput process and copes with substances sensitive to heat, moisture or solvents. [3] The implementation of a near-infrared system, as process analytical technology (PAT) tool to monitor the whole granulation process provides a method of real-time monitoring of the quality of granules. [2] [4] RC is a very suitable unit operation to be integrated in the context of continuous manufacturing. The main goals of this work were: 1. to efficiently design and monitor in real-time the quality of granules; 3. to build predictive models capable of predicting the size and density of the granules.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

The powder mixture consisted of: 60% microcrystalline cellulose, 24.5% lactose α-monohydrated, 15% paracetamol and 0.5% magnesium stearate.

2.1.- Methods

A design of experiments (DoE) was built using Modde (MKS,US). Different process variables were considered in the DoE. Raw materials were previously mixed in a continuous mixer and stored. The mixture was introduced into the dry granulator, a Hosokawa Pharmapaktor L200/30P with a flake crusher FC 200, and processed according to the DoE settings. A NIR spectrometer system collected spectra in-line for further analysis. These data were processed in Matlab (Mathworks, US) with the PLS toolbox (Eigenvector Research, US). Principal component analysis (PCA) was initially used to explore data variability. During granulation, for each DoE batch, four samples were collected at different time points. These samples were processed off-line in order to measure the size distribution (by light scattering) and density of granules. Process variables (CPPs) and process responses describing critical quality parameters of granules (CQAs) were identified and modelled by partial least squares regression (PLSR). Models were intended to predict the size and density of granules. The prediction ability was assessed by analysis of variance. Finally, granules were compressed in view of getting a tablet compaction profile.

3.- Results and Discussion

The experimental design performed for the granulation process is shown in Table 1. The PCA model built from NIR spectroscopy data showed a clear trajectory of the granulation process, as well as periods of time where process variables varied significantly.

Table 1: Performed experimental design.

Experience Name	Run Order	Roll Speed (rpm)	Compression Force (kN)	Mill Speed (rpm)
N1	2	3	15	50
N2	3	3	35	250
N3	5	8	15	250
N4	10	8	35	50
N5	11	3	15	250
N6	12	3	35	50
N7	4	8	15	50
N8	8	8	25	150
N9	9	5.5	35	150
N10	7	5.5	25	250
N11	1	5.5	25	150
N12	13	5.5	25	150
N13	6	5.5	25	150

During the granulation process, compression force (CF) wavered significantly, in contrast with the other DoE process variables which kept constant few minutes after process onset.

Table 2: Average size (d_{50}) and density (D.) of granules obtained at each experiment (Exp.)

Exp. Name	Bulk D. (g/ml)	Tapped D. (g/ml)	Size (µm)
N2	0.63	0.72	1009.40
N4	0.64	0.74	1120.33
N6	0.62	0.73	1057.05
N9	0.62	0.72	1028.87
N8	0.59	0.68	881.36
N10	0.59	0.69	890.76
N11	0.58	0.67	854.89
N12	0.58	0.69	996.03
N13	0.60	0.70	860.53
N1	0.55	0.64	699.67
N3	0.55	0.65	655.53
N5	0.54	0.64	648.58
N7	0.54	0.65	729.22

Table 2 displays bulk and tapped density and size of the granules according to the target CF (from 15kN at the bottom to 35 kN at the top of the table). It's clear that the size and density increase as the CF increases. In order to predict the physical properties of the granules (size and density), three regression models were built, one for each response: bulk density, tapped density and granules average size. All of them explained quite well the data (R^2 between 0.93 and 0.96) and reveal a good prediction ability (Q^2 between 0.89 and 0.91). All models are statistically significant (regression $p_{value} < 0.001$) and revealed a low root mean square error of prediction (0.01 g/ml for bulk and tapped density and 70.1 µm for the average granules size) thus evidencing robustness in predicting new data.

The tablet compression profile showed that the produced granules with higher compression forces gave rise to lower tensile strength tablets, which is in accordance with previous reports found in the literature. [5]

4.- Conclusions

The NIR spectroscopy proved to be a powerful monitoring tool since it was able to describe the granulation process and to find its sources of variability. Both granules density and size were strongly influenced by compression force, which is the main CPP. PLSR models demonstrated a good performance ($R^2 \geq 0.93$ and $Q^2 \geq 0.89$) in predicting size and density of the granules. As future work, it is important to add the formulation (e.g., physical/chemical descriptors of materials and composition) together with control of humidity and other possible relevant parameters, since granules' physical properties are deeply influenced by raw materials.

5.- References

[1] ICH, "Pharmaceutical Development Q8," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, vol. 8, no. August, pp. 1–28, 2009

[2] M. A. P. McAuliffe, G. E. Omahony, C. A. Blackshields, J. A. Collins, D. P. Egan, L. Kiernan, E. Oneill, S. Lenihan, G. M. Walker, and A. M. Crean, "The use of PAT and off-line methods for monitoring of roller compacted ribbon and granule properties with a view to continuous processing," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 19, no. 1, pp. 158–166, 2015.

[3] Mehta KA, Rekhi GS, Parikh DM. Extrusion/Spheronization as a Granulation Technique. Handb Pharm Granulation Technol. 2005;333–63

[4] D. Acevedo, A. Muliadi, A. Giridhar, J. D. Litster, and R. J. Romañach, "Evaluation of three approaches for real-time monitoring of roller compaction with near-infrared spectroscopy.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 3, pp. 1005–12, 2012.

[5] C. C. Sun and P. Kleinebudde, "Mini review: Mechanisms to the loss of tabletability by dry granulation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015.

Development of chitosan nanoparticles for encapsulation of *Thymus mastichina* essential oil

Filipa VAZ [(1)], Márcio RODRIGUES [(1,2)], Maximiano RIBEIRO [(1,2)], André RTS ARAUJO [(1,3)] Paula COUTINHO [(1,2)]

1. CPIRN-UDI/IPG, Centro de Potencial e Inovação em Recursos Naturais, Unidade de Investigação para o Desenvolvimento do Interior, Instituto Politécnico da Guarda, Av. Dr. Francisco de Sá Carneiro, Nº 50, 6300-559 Guarda, Portugal
2. CICS-UBI, Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal
3. LAQV/REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

Email de contacto: coutinho@ipg.pt

1.- Introduction

Thymus mastichina L. commonly known as "Bela-luz", "Sal puro" and "Tomilho-branco" is an aromatic plant endemic of the Iberian Peninsula that belongs to the family Lamiaceae [1]. It is and aromatic plant, whose essential oil has a strong odour of eucalyptus and presents analgesic, antiseptic, antispasmodic, anticancer, antibacterial, antifungal and antioxidant properties [2-4] among others. Inclusively this essential oil has been considered as a natural preservative of food and as nutraceuticals [2,5]. Essential oils usually are highly volatile and become unstable and lose their biological features when exposed to light, heat, pH, moisture, and oxygen. In order to overcome these issues, in this study we intended to develop chitosan nanoparticles for encapsulating *T. mastichina* essential oil (TEO).

2.- Materials and methods

The nanoparticles, without or with essential oil were prepared by ionic gelation of chitosan with sodium tripolyphosphate (TPP) adapted from the method described by Hosseini et al. [6]. Briefly, the chitosan solution (1%, w/v) was prepared using 1% acetic acid solution and this solution was filtered with a cellulose nitrate filter (0.45 µm). Then it was added the surfactant Tween 80 under agitation at 45ºC during 2 h. Posteriorly, 25 µL of TEO were added to 5 mL of aqueous chitosan solution stirring during 40 min. After this period, these mixture under ice were subjected to ultrasonication performed with a Sonifier® SFX150 apparatus during 40 min, in which were gradually dropped 5 mL of TPP (0,2%, w/v) solution into the mixture. Then the nanoparticles were centrifuged as 13000 rpm for 10 min and the nanoparticles were collected. The supernatants were used to evaluate free TEO using an ultraviolet-visible spectrophotometer (Multiskan GO Thermo Scientific®) at 220 nm in order to determine the encapsulation efficiency.

After several washing steps, the nanoparticles without or with TEO were characterised by Dynamic Light Scattering using Zetasizer Malvern® ZS for the determination of particle size, polydispersity index (PdI) and zeta potential.

All the samples were prepared and analysed in triplicate.

3.- Results and discussion

The chitosan polymer has been used in production of nanoparticles mainly due to its biocompatibility and biodegradability.

In the present study, the chitosan nanoparticles revealed to have a high capacity of TEO entrapment as determined by the efficiency encapsulation (83.6±2.9%).

The results of particle size and charge were summarized in Table 1.

Table 1.- Characteristics of nanoparticles with and without *T. mastichina* essential oil (TEO). Dh: hydrodynamic diameter; PDI: polydispersity index.

Assay	Dh (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
Without TEO	295.1 ± 28.8	0.265 ± 0.038	21.2 ± 2.6
With TEO	297.2 ± 19.0	0.257 ± 0.029	22.1 ± 4.3

The results showed that nanoparticles present a positive charge as were expected due to the amino groups of chitosan. Furthermore, the hydrodynamic diameter and the polydispersity index were optimum which revealed the good repeatability of the nanoparticle production.

Despite the entrapment of TEO in the nanoparticles the hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential values obtained were not affected by the TEO presence.

4.- Conclusions

In conclusion, *T. mastichina* essential oil loaded chitosan nanoparticles were successfully prepared by ionic gelation with TPP. The development of these nanoparticles could bring new potential biotechnological perspectives in the pharmaceutical and cosmetic fields.

5.- Acknowledgements

The authors acknowledge to the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) and COMPETE 2020 for the financial support under the research project "The development of dermo-biotechnological applications using natural resources in the Beira and Serra da Estrela regions - DermoBio" ref. SAICT-POL/23925/2016, presented in the Notice for the Presentation of Applications No. 02 / SAICT / 2016 - Scientific Research and Technological Development Projects (IC & DT) in Co-Promotion.

5.- References

[1] O. Póvoa, F. Delgado, *Tipos e espécies de PAM. Guia para a produção de plantas aromáticas e medicinais*, 2015. Available at: http://epam.pt/wp-content/uploads/2015/06/Guia_epam_tipos-e-especies_mai2015.pdf

[2] A. B. Cutillas, A. Carrasco, R. Martinez-Gutierrez, V. Tomas, J. Tudela, *T. mastichina L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities*, PLoS ONE, 13(1), 1-19, 2018.

[3] J. Gordo, P. Maximo, E. Cabrita, A. Lourenco, A. Oliva, J. Almeida, M. Filipe, P. Cruz, R. Barcia, M. Santos, H. Cruz, *T. mastichina: chemical constituents and their anti-cancer activity*, Natural Product Communications, 7(11), 1491-1494, 2012.

[4] S. M. Albano, A. Sofia Lima, M. Graça Miguel, L. G. Pedro, J. G., Barroso, A. C. Figueiredo, *Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants*, Records of Natural Products, 6(1), 35-48, 2012.

[5] L. Barros, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, From famine plants to tasty and fragrant spices: *Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal)*, LWT - Food Science and Technology, 44(2), 543-548, 2011.

[6] S. F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, *Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study*, Carbohydrate Polymers, 95(1), 50-56, 2013.

Novel antimicrobial pH-infection responsive coating for polymeric medical devices

M. Isabel RIAL-HERMIDA [1,2], Nicola J. IRWIN [2] and Colin P. McCOY [2]

1. Departamento de Farmacoloxía, Farmacia e Tecnoloxía Farmacéutica, Facutade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela. Campus Vida s/n. 15782. Santiago de Compostela, España.
2. School of Pharmacy, Queen's University of Belfast, 97 Lisburn Road, BT9 7BL, Belfast, Northern Ireland, United Kingdom.

Email de contacto: mariaisabel.rial@usc.es

1.- Introduction

Infections and biofilm formation associated with the long-term use of medical devices or implants have proven to be a difficult enemy to fight. Several approaches have been developed to address this problem in previous years, but with limited efficacy, particularly against biofilm formation and eradication [1].

It is well stablished an increase in the pH environment during the infection process, especially in the urinary infections [2]. This change in the pH environment caused by the presence of *Proteus mirabilis*, which is practically ubiquitous in urinary infections, has previously been exploited by our research team for triggering specific release of a model antibiotic in the presence of infecting microorganisms to ultimately prevent infection and associated biofilm formation [2,3].

Recently, there has been a growing interest in novel devices that are sensitive to changes in their local environment, for example, by changing their 3D-conformation or by accelerating the release of drug [4].

In the present work, we developed a system based on an antimicrobial compound, to release at elevated pH, which was included into a polymeric matrix, checking its bacterial efficiency and absence of cytotoxicity.

2.- Materials and Methods

2.1.- Materials

Trypsine/EDTA, MEM medium culture, Fetal Bovine Serum (FBS) and MTT Proliferation kit 1 were purchased from Sigma-Aldrich (UK).

2.2.- Methods

2.1.1.- Synthesis and physicochemical characterization of the novel compound

The synthesis of the novel compound (NC) was performance following a modification of the method described by Song et al (2012) and then included into a methacrylate matrix (data non-shown). For the characterization of compounds, Proton H^1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and infrared analysis was performed. Films were prepared with the composition of table 1.

Table 1. Composition of films.

Film	NC	AIBN	EGMA	HEMA
Control	0 g	0.06 g	0.06 g	5.88 g
5%	0.3 g	0.06 g	0.06 g	5.58 g
10%	0.6 g	0.06 g	0.06 g	5.28 g

2.1.2.- Determination of antimicrobial susceptibility

Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) were determined to ensure the antimicrobial activity of the novel active, following the CLSI broth dilution [5] with some modifications, against *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus.*

2.1.3.- Inhibition of bacterial adherence test

Discs of 1.1 cm of diameter of each formulation and the control, were placed in 24-well plates, and 1 mL bacterial suspensions were added of each sample by triplicate until the completely immersion of the samples. Following, the plates were placed in an orbital incubator at 37 ºC. After

24 h, 48 h, 7 days and 21 days, discs were removed from the wells with sterile forceps and washed three times with QSRS to remove any non-adherent bacteria. Medium was replaced daily. The samples were then individually placed in sterile McCartney bottles containing 5 mL of fresh QSRS, sonicated during 10 min and placing in vortex for 30 s. Several dilutions were prepared and then plated on.

2.1.4.- Cell proliferation test

Extraction from samples were performance under the guidelines of ISO standard (10993:5, cytotoxicity of medical devices). Murine fibroblast cells L929 (ATCC, LGC Standards, Manassas VA, USA) proliferation were determined using MTT proliferation test following the instructions of the manufacturer (MTT Proliferation Kit I, Roche, Germany).

3.- Results and discussion

A novel active was prepared for coating polymeric matrices with antimicrobial properties. FTIR and NMR was applied to confirm the desired structure as well as the bond with the polymeric matrix (data not shown). The MIC and the MBC values confirmed the antimicrobial activity at different pH's, physiological and infection one.

Antimicrobial coating was effective against *P. mirabilis* and *S. aureus*, regarding the inhibition of the bacterial adherence above the surface of the coating films (figure 1).

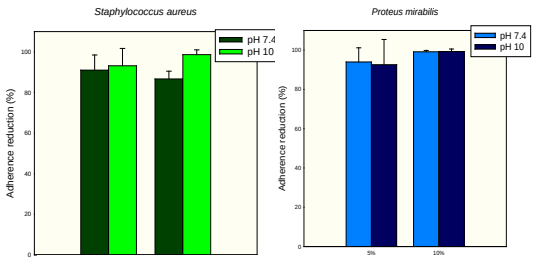


Figure 1. Bacterial adherence reduction after 21 days of incubation with S. aureus and P.mirabilis.

Antimicrobial coating films demonstrated a non-citotoxic profile, according with the results obtained in the proliferation test, with values greater than 75% of surviving cells after 24 hours of contact.

4.- Conclusions

The coating has demonstrated activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with reductions in bacterial adherence to surfaces coated with the novel technology in excess of 99.99% (four-logarithmic reductions) relative to control uncoated surfaces and with non-cytotoxic profile. This technology is, however, widely versatile and can be adapted to requirements for a variety of applications.

5.- Acknowledgments

Authors acknowledge NI Invest for the funding support. MI Rial-Hermida acknowledges J Moore and J Trotter for the technical help.

6.- References

[1]P Tenke, B Koves,K Nay, SJ Hultgren, W Mendling,B Wullt, M Grabe, FME Wagenlehner,M Cek, R Pickard, H Botto, KG Naber, TEB Johansen. World J Urol 30, 51–57,2012.

[2] NJ Irwin, CP McCoy, DS Jones, SP Gorman. Pharm Res 30, 857–865, 2013.

[3] CP McCoy, NJ Irwin,C Brady, DS Jones, L Carson, GP Andrews, SP Gorman. Mol Pharmaceutics 13, 2817–2822, 2016.

[4] C Alvarez-Lorenzo, A Concheiro. Mini-Rev Med Chem 8, 1065–1074, 2008.

[5] PA Wayne. CLSI document M07-A9". Clinical and Laboratoty Standards Institute 32, 1-43, 2012.

New hybrid molecule with high potential against melanoma: *in vitro* and *in vivo* evaluation

Jacinta O. PINHO, Magda FERREIRA, Eduarda MENDES, Maria de Jesus ROCHA, Joana D. AMARAL, Cecília M.P. RODRIGUES, Ana P. FRANCISCO, M Manuela GASPAR

Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, 1649-003, Portugal.

Email de contacto: jopinho@ff.ulisboa.pt

1.- Introduction

Melanoma is an aggressive disease with increasing incidence globally. Its prognosis is very poor and standard therapies are frequently ineffective, with severe toxic side effects. To overcome the therapeutic limitations and improve clinical outcomes, our group has recently synthesized a new triazene hybrid molecule (THM) displaying two distinct moieties covalently linked for a synergistic effect [1]. This THM exerts its activity by two mechanisms of action: 1) high specificity towards tyrosinase, an enzyme up-regulated in melanoma cells; 2) toxic alkylating properties. *In vitro*, this hybrid compound showed an antiproliferative effect towards human and murine melanoma cell lines, with IC_{50} values below 63 and 46 µM, respectively. To improve the *in vivo* therapeutic activity of THM, liposomes were used as a tool to promote a preferential targeting to tumour sites. THM was incorporated in long circulating liposomes with high loadings, and its effect was evaluated *in vivo* in a xenograft melanoma model.

2.- Materials and Methods

2.1.- Animals

C57Bl/6 mice (6-8 weeks old) were obtained from Charles River (Barcelona, Spain). Animal experiments were carried out according to European and Portuguese laws.

2.2.- Materials

Lipids were obtained from Avanti Polar Lipids (USA). DMEM, FBS and penicillin/streptavidin were obtained from Gibco Laboratories (Detroit, USA.). All other reagents were of analytical grade.

2.3.- Methods

THM was incorporated in nanoliposomes by the dehydration-rehydration method, followed by an extrusion step to reduce and homogenise their mean size [2]. THM quantification was performed by HPLC, and lipid content was determined by a spectrophotometric assay.

The antitumour activity was evaluated in a xenograft murine melanoma model [3]. Tumour induction was performed by s.c. injection of 1×10^5 B16F10 cells in the right flank of C57Bl/6 mice. After 10 days, animals received the formulations under study for 2 weeks. THM in free form (Free THM) or incorporated in liposomes (LIP THM) was administered i.v. at a dose of 12.5 mg/kg of body weight. Control group included tumour-bearing mice receiving PBS. At the end of treatment, mice were sacrificed, and their tumours analysed in terms of weight, histological evaluation, and caspase-3/7 and tyrosinase activity in protein extracts.

Caspase 3/7 activity was measured using the Caspase-Glo 3/7® Assay (Promega Corp., USA), by a previous method [4]. Briefly, 15 µg of total protein was incubated with the luminogenic substrate. Luminescence was measured using the GloMax®-Multi Detection System (Promega Corp.).

Tyrosinase activity was assessed by a previously described method [5]. Briefly, 60 µg of total protein extracted from the tumour samples was incubated at 37ºC with L-DOPA at 4 mg/ml. Absorbance was read at 490 nm.

.3.- Results and Discussion

The *in vitro* inhibitory effect of THM against human (MNT-1) and murine (B16F10) melanoma cell lines is shown in Table 1.

Table 1. Half-inhibitory concentration (IC_{50}) of THM 48 h after incubation with cells (MTS assay).

	IC_{50} (μM)
B16F10	46 ± 3
MNT-1	63 ± 5

Table 2 displays the physicochemical properties of the THM liposomes in terms of loading capacity (THM/Lip)f, incorporation efficiency (I.E.), size (Ø), polydispersity index (PdI) and zeta potential (ζ).

Table 2. Physicochemical parameters of THM liposomes prepared with PC:DSPE-PEG (2.85:0.15).

(THM/Lip)f (nmol/μmol)	**I.E.** (%)	**Ø (μm)** (PdI)	**ζ** (mV)
33 ± 1	101 ± 4	0.13 (< 0.1)	-5 ± 1

PC: phosphatidyl choline; DSPE-PEG: distearoyl phosphatidyl ethanolamine covalently linked to polyethylene glycol

THM nanoliposomes presented an I.E. of 100%, with a PdI under 0.1, demonstrating the high homogeneity of the suspension.

The *in vivo* results clearly showed a significant delay on tumour progression, particularly for mice treated with THM liposomes. This effect was confirmed by the lower tumour weight shown in Table 3.

Table 3. Average tumour weight of the experimental groups at the sacrifice day.

	Control	**Free THM**	**LIP THM**
Tumour weight (g)	2.3 ± 0.5	1.7 ± 0.4	0.7 ± 0.2

Next, we determined caspase-3/7 activity, a marker of cell apoptosis (Fig. 1A), and tyrosinase activity, the enzyme associated with melanocytes and overexpressed in melanoma cells (Fig. 1B), using tumour protein extracts. For the LIP THM group, an almost 3-fold increase on caspase 3/7 activity was observed, comparing to Control. Regarding tyrosinase activity, mice treated with liposomal THM displayed the lowest values. These results corroborate the superior antitumour effect of this hybrid compound when associated to a long circulating lipidic system.

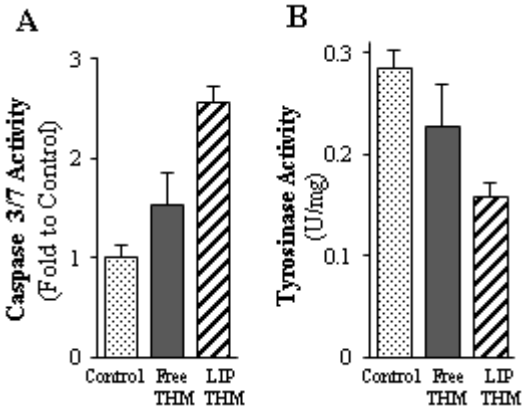


Fig. 1. Influence of THM treatment on **(A)** Caspase-3/7 activity and **(B)** Tyrosinase activity on tumour protein extracts from C57Bl/6 mice induced with xenograft melanoma. Control mice received i.v. administrations of PBS. Treated groups received free and liposomal THM at a dose of 12.5 mg/kg.

4.- Conclusions

THM was efficiently incorporated in nanosized long circulating liposomes. In the murine melanoma model, a strong correlation between tumour growth inhibition, increased caspase-3/7 activity and decreased tyrosinase activity, devoid of hepatic side effects, was observed for this nanoformulation. Overall, the results establish liposomal THM as a highly promising approach for melanoma treatment.

5.- Acknowledgments

Fundação para a Ciência e Tecnologia through projects: Pest-UID/DTP/04138/2013 and PTDC/MED-QUI/31721/2017.

6.- References

[1] A.M.C. Granada, *et al*., 1st Symposium on Medicinal Chemistry, University of Minho, Braga, Portugal, 2013.
[2] S. Calado, *et al*., J. Nanosci. with Adv. Technol., 1(4):9, 2016.
[3] V. Sainz, *et al*., Acta Biomater., 76: 193-207, 2018.
[4] D.M. Pereira, *et al*., Oncotarget, 7:34322-34340, 2016.
[5] A.S. Monteiro, *et al*., Eur. J. Med. Chem., 70:1-9, 2013.

Índice de autores

Aberturas, M.R. 181

Abizanda, G. 27

Abreu-Villela, R. 107, 109

Acar, D. 71

Acosta Contreras, F.N. 79

Ageitos, J.M. 67

Aguiam, N.R. 241

Aguiar, P. 133

Alambiaga Caravaca, A. 163

Albarrán-Molina, T. 229

Alexander, C. 25

Almeida, A. 29

Almeida, A. J. 85

Alonso Alconada, L. 233

Alonso González, M. 159

Alonso, M.J. 23, 49, 53, 121

Altay, A. 31

Alvarez González, J.V. 233

Alvarez-Lorenzo, C. 31, 39, 61, 73, 111, 119, 127, 141, 231

Alves, A. 29

Amaral, J.D. 249

Amaya, J.V. 167

Andrés-Guerrero, V. 75

Aquino, K.A.S. 239

Aquino, R.P. 61

Araujo, A.R.T. 201, 245

Ares-Fuentes, A.M. 231, 235

Arévalo Pérez, R. 193, 195

Arias, E. M. 35

Arias, J.L. 45, 175, 197, 199, 223, 225, 227, 229

Arranz-Romera, A. 33

Auriemma, G. 61

Aznar-Cervantes, S. 141

Balaguer Fernández, C. 163, 167

Baldrich, A. 187

Barcia Hernández, E. 157, 159, 221

Battaglia, G. 10

Bellés Medall, M.D. 145

Bendicho-Lavilla, C. 133

Benítez del Castillo, J.M. 71

Bermejo, M. 19, 103, 105, 139

Bettini, R. 31

Blanco-Fernandez, B. 89

Blanco-Méndez, J. 123, 131

Blanco-Prieto, M.J. 27, 51, 185

Bouré, C. 39

Boury, F. 39

Bravo-Osuna, I. 33, 75

Bueno-López, C. 167

Caballo-González, M. 71

Cabañero Resta, G.J. 69

Cabeza, L. 45

Calatayud Pascual, M.A. 163

Calviño-Sampedro, C. 49

Canas, A. 243

Caraballo, I. 59, 107, 109

Carbajo-Gordillo, A.I. 97

Carreras, J.J. 153, 155

Carro, A.M. 231, 235

Casanovas Santos, L. 65

Casas, M. 59

Castillo, Y. 189

Cenís, J.L. 39, 141

Cerezo Garreta, J. 219

Colino Gandarillas, C.I. 207

Concheiro, A. 31, 61, 73, 111, 231

Conde Penedo, A. 115, 117

Cordeiro Dias, R. 243

Cordeiro, M.F. 33

Córdoba, D. 159

Córdoba, M. 159

Corma, A. 139

Costoya, A. 231

Couce Pico, M.L. 233

Coutinho, P. 201, 245

Couvreur, P. 51

Crecente-Campo, J. 53

Csaba, N. 25, 67, 81

Cunarro, J. 23

Cunha-Filho, M. 95, 101

Davis, B.M. 33

De La Caba, C. 165

Delgado, A.V. 227, 229

Delmoral-Sanchez, J.M. 105

Desmaële, D. 51

Díaz-Rodríguez, P. 43, 57, 65, 81

Díaz-Tomé, V. 115, 117

Diéguez, C. 23

Diéguez-Docampo, A. 53

Diozzi, V. 185

Domenech Monsell, I. 163

Durán-Lobato, M. 23

Eiró, N. 43

Escalera Izquierdo, B. 209, 211

Escribano-Ferrer, E. 35, 183

Esquena-Moret, J. 183

Esteban-Pérez, S. 75

Etxabide, A. 165

Fariña, J.B. 93, 147

Farto-Vaamonde, X. 61

Fernandes Alves Da Silva, J.T. 101

Fernández Carballido, A. 159, 169

Fernández Garrosa, I. 201

Fernández, P. 235

Fernández-Álvarez, F. 45, 175, 197, 199, 223, 225

Fernandez-Campos, F. 89

Fernández-Ferreiro, A. 113, 115,117, 123, 129, 133

Fernández-Mariño, I. 53

Fernández-Paz, C. 83

Fernández-Paz, E. 81

Fernández-Romero, A.M. 203

Ferrando Piqueres, R. 145

Ferràs, J. 167

Ferreira, M. 29, 249

Figueroa-Becerra, E. 183

Figueroa-Campos, A. 19

Florindo, H.F. 241

Fortes Gris, E. 101

Fraguas-Sánchez, A.I. 173

Fraile Arce, S. 193

França, L.M. 239

Francisco, A.P. 249

Fuerte-Rodríguez, S. 45, 175, 197, 199, 223, 225

Gallego Arranz, T. 215

Gálvez Álvarez, N. 199

Garbayo, E. 27, 185

García Del Río, L. 43

García Díaz, B. 157

García Fernández, J.M. 97

García Herrero, V. 217, 219

García Martínez, T. 145

García Sánchez, M.J. 237

Garcia, A. 89, 179

García-Celma, M.J. 35, 183

García-Fuentes, M. 25, 67

García-García, G. 45, 175, 197, 199, 223, 225

García-González, C.A. 31, 63, 119, 127

Garcia-Herranz, D. 33

García-Molina, C. 203

García-Montoya, E. 99

García-Otero, X. 123

Garcion, E. 39, 141

Garrigues, T. 153, 155

Gaspar, D.P. 85

Gaspar, M.M. 29, 249

Gelfuso, G.M. 95

Gil González, A. 113

Gil-Alegre, M.E. 79

Gomes Pinho, L.A. 101

Gómez, I. 107, 181

Gómez-Amoza, J.L. 63

Gómez-Lado, N. 133

Gonçalves, L.M. 85

Gonella, A. 121

González Barcia, M. 117, 123

González Calleja, S. 201

González Navarro, C.J. 21

Gonzalez, J. 89

González-Álvarez, I. 19, 69, 103, 105, 137, 139

González-Álvarez, M. 19, 69, 103, 105, 137, 139

González-Barcia, M. 115, 129

González-Fernández, A. 53

González-Munguía, S. 125

González-Navarro, C.J. 41

González-Rodríguez, M.L. 135, 203, 205

Goyanes, A. 12

Gratieri, T. 95

Greiser, U. 75

Grenha, A. 29

Grimaudo, M.A. 73

Guerra-Varela, J. 53

Guerrero, P. 165

Guillot, A. 153, 155

Guiró, P. 35

Guo, L. 33

Gutiérrez Millán, C. 207

Gutiérrez-Lovera, C. 53

Guzmán-Navarro, M. 71

Heras Caballero, A.M. 79

Hernaez-Estrada, B. 161

Hernandez, R.M. 161, 165

Herrero-Vanrell, R. 14, 33, 71, 75

Hocsis Braga, J. 101

Horcajada, P. 83

Hsu, W.H. 25

Huamán Castillo, C.R. 79

Hurtado Marcos, C. 169

Igartua, M. 161, 165

Iglesias, S. 79

Irache, J.M. 21, 41

Irusta, S. 51

Irwin, N.J. 247

Ivanov, D.P. 25

Jesús Valle, M.J. de 201

Jiménez Blanco, J.L. 97

Jiménez-Castellanos, M.R. 91

Karttunen, A.P. 243

Ketolainen, J. 243

Kim, B. 137

Korhonen, O. 243

Kuentz, M. 107, 109

Lamela-Gómez, I. 131

Lanao, J.M. 193, 195, 207

Landín, M. 43, 57, 65, 77, 127

Las Heras, K. 165

Lastra, C.F. 189

Leão, A.D. 239

Linares, V. 5

Llabrés Martínez, M. 17, 55, 93, 125

Lopes, J.A. 13, 241, 243

López Sánchez, L. 171

López-Cano, J.J. 71

López-Castellano, A. 163, 167

López-Iglesias, C. 31, 127

López-Torres, I.I. 173

López-Viota, J. 47, 191

López-Viota, M. 47, 191

Lorenzo, R.A. 231, 235

Lozoya-Agullo, I. 103

Luaces Rodríguez, A. 113

Luciani-Giacobbe, L.C. 187

Luzardo-Álvarez, A. 131, 133, 233

Maderuelo Martín, C. 193, 195, 201

Malaquias, L.F.B. 95

Mangas Sanjuan, V. 143, 145, 179

Mano, J.F. 9

Mansor, M. H. 39

Manzo, R. 187

Marcos, A.V. 81

Margarucci, E. 177

Marinho, F.A. 239

Mariño, E. L. 189

Marques, R. 179

Martín-Casado, L. 175

Martinez de Pancorbo, M. 161

Martínez-López, A.L. 21

Martínez-Mañez, R. 137

Martínez-Martínez, M.T. 139

Martínez-Moreno, J. 151

Martínez-Muñoz, N.A. 227, 229

Mazo, M. 27

McCoy, C.P. 247

McMahon, S. 75

Medina Carrasco, S. 135

Melero, A. 153, 155

Melguizo, C. 175

Mendes, E. 249

Merino Sanjuan, M. 103, 145, 151, 171

Merino Sanjuán, V. 69, 137

Merino, V. 19, 139, 151, 171

Miñarro-Carmona, M. 99

Miralles Ibarra, P. 171

Miranda Sanz, M. 163

Modamio, P. 189

Molina-Martínez, I.T. 33, 71

Molpeceres, J. 181

Montejo Rubio, C. 169

Montoro, A. 153

Monzón, C. 93

Mora Forero, E. 189

Morales, J. 41

Moreira Alves, A. 201

Moreno, J. F. 191

Moreno, M.C. 89

Moura, L. 241

Munguía, O. 125

Nacher, A. 151

Naitlho, N. 205

Najberg, M. 39, 141

Nardi-Ricart, A. 99

Navarro, A. 105

Negro Alvarez, S. 169, 221

Nicoli, S. 73

Nofrerias-Roig, I. 99

Oliva Martín, A. 17, 55

Olivera, A. 49

Olivera, M.E. 187

Orta Cuevas, M.M. 135

Ortega-Torres, G. 173

Ortiz Mellet, C. 97

Ortiz, R. 175

Otero López, M.J. 237

Otero-Espinar, F.J. 113, 115, 117, 123, 129, 131, 133, 233

Paccione, N. 221

Palacios Garrote, M. 207

Parera, B. 47, 191

Pedraz, J.L. 161

Pelacho, B. 27

Peleteiro, M. 53

Pena Rodríguez, E. 89

Peña Cabia, S. 157

Peña Fernández, M.A. 209, 211

Peña-Fernández, A. 211

Peñalva, R. 41

Pérez Del Caz, M.D. 153

Pérez Fernández, R. 43

Pérez-Lozano, P. 99

Peris, J.E. 177, 179

Pinho, J.O. 29, 249

Pinho, L.A.G. 95

Piñar Corral, S. 135

Planelles, M. 103

Plano, D. 185

Pozo-Rodríguez, A. del 107, 149

Prados, J.C. 45

Prata Ribeiro, M. 201

Prieto, F. 205

Prósper, F. 27

Pulgar, A. 67

Quiroga Palacios, X. 113

Rabasco Álvarez, A.M. 135

Rabasco, A.M. 203, 205

Rama-Molinos, S. 57

Ramirez-Elias, K. 223

Reales, F. 211

Reboredo, C. 21

Remuñán-López, C. 57, 81, 83, 85

Rial-Hermida, M.I. 247

Ribeiro, M. 245

Rocha, M. de J. 249

Rodilla, V. 163, 167

Rodrigues Da Silva, I.C. 101

Rodrigues, C.M.P. 249

Rodrigues, M. 245

Rodriguez Berna, G. 139

Rodriguez, C. 35

Rodríguez-Bernaldo de Quiros, A. 77

Rodríguez-Galán, I.C. 91

Rodríguez-Gascón, A. 8, 107, 149

Rodríguez-Nogales, C. 51

Roldán, P. 107

Romero, E. 143

Rouco, H. 57, 81

Rueda, M. 205

Ruibal, A. 133

Ruiz-Picazo, A. 105

Sá-Barreto, L.C.L. 95, 101

Sailor, M.J. 137

Salcedo Mingoarranz, A. L. 157

Salcedo-Abraira, P. 83

Saludas, L. 27

Sancenón, F. 137

Sánchez Ávila, A. 213

Sánchez Navarro, A. 201

Sánchez, E. 125

Sánchez, I. 91

Sánchez, L. 53

Sánchez, M. 77

Sánchez, P. 25

Sánchez-Dengra, B. 19

Sandoval, V. 221

Sanmartin, C. 185

Santi, P. 73

Santos Buelga, D. 237

Santos-Rosales, V. 63, 119

Santos-Vizcaino, E. 161, 165

Santos-Vizcaino, S. 165

Santoveña, A. 93, 147

Sanz Ruiz, P. 173

Sebastiá, N. 153

Sebastián Morelló, M. 163

Sebastián, V. 51

Sena, C.M. 217

Sendón Lago, J. 43

Sendón, R. 77

Seoane-Viaño, I. 133

Simón-Yarza, T. 83

Soares, M.F.R. 239

Soares-Sobrinho, J.L. 239

Solans, C. 35

Solinís, M.A. 107, 149

Soriano, J.M. 153

Sosnik, A. 7

Souza Carnaúba, J. 101

Suárez-González, J. 147

Suñé-Negre, J.M. 99

Suñé-Pou, M. 99

Taboada, P. 11, 85

Tamarit, C. 167

Teixeira Silva, P. 237

Teruel, A.H. 137

Ticó-Grau, J.R. 99

Torrado Durán, S. 215, 217, 219

Torrado Durán, Susana 215

Torrado Salmerón, C. 217, 219

Torrecilla, J. 107, 149

Torres Pabón, N. 209

Torres, D. 49, 121

Torres-Suárez, A.I. 173

Tovar, S. 23

Traba, E.G. 25

Troconiz, I.F. 143

Tros de Ilarduya, C. 97

Uranga, J. 165

Usach, I. 177, 179

Vaquero Martín, J. 173

Varela-Calviño, R. 49

Varela-Fernández, R. 129

Varela-Garcia, A. 111

Vaz, F. 245

Vázquez-Álvarez, X.A. 65

Vázquez-Loureiro, P. 77

Vento, M. 179

Vicente-Pascual, M. 107, 149

Vilchez, J.L. 191

Villa Hermosilla, M.C. 169

Villaescusa, J.I. 153

Villalba Álvarez, M.E. 213

Vítor, J. 85

Vizoso, F.J. 43

Wang, J. 137

Wang, W. 75

Zarzuelo Castañeda, A. 213

Zuidema, J. 137