

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevos sistemas de liberación colónica
de meloxicam**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Navarro Ruiz

Directoras

Covadonga Álvarez Álvarez
Paloma Marina de la Torre Iglesias

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo galénico de nuevos sistemas de liberación colónica de meloxicam

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Navarro Ruiz

DIRECTOR

Covadonga Álvarez Álvarez
Paloma Marina de la Torre Iglesias

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

Desarrollo galénico de nuevos sistemas de liberación colónica de meloxicam

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Navarro Ruiz

Directores

Covadonga Álvarez Álvarez

Paloma Marina de la Torre Iglesias

Madrid 2020

Agradecimientos

Agradecimientos

Los agradecimientos aquí reflejados no engloban solamente el desarrollo de esta tesis si no también todas las cosas buenas que han llegado a mi vida con la decisión de realizarla:

- Gracias a la doctora Emilia Barcia, como Directora del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, por haberme permitido realizar esta tesis en el Departamento a su cargo.
- Gracias a mis profesoras, tutoras y directoras de tesis, las doctoras Paloma Marina de la Torre y Covadonga Álvarez, por darme la oportunidad de colaborar con ellas durante la carrera, y enseñarme que el camino de la investigación era una de mis opciones de futuro. Gracias por estos 7 años que hemos pasado juntas, con muchos cambios personales y laborales en los que siempre habéis estado presentes, dándome vuestro apoyo y vuestros conocimientos para ayudarme a ser una mejor profesional y a madurar como persona. Habéis formado una parte muy importante en mi vida y por eso os considero más que mis profesoras, más que mis tutoras y mucho más que mis directoras de tesis; os considero familia.
- Gracias a los profesores del departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, que durante la carrera y todo el desarrollo de mi tesis, han sabido motivarme, ayudarme, resolviendo mis dudas, y me han tratado siempre como a un compañero más; en especial a:
 - Mi tutora la doctora Susana Torrado, ya que sin ella no hubiera sido posible mi comienzo como doctoranda;
 - La doctora Paloma Ballesteros y el doctor Juan Torrado, que, como mis primeros profesores de galénica, me descubrieron la que, sin duda, ha sido mi asignatura favorita de toda la carrera de Farmacia y la que me ayudó a dar el paso para orientar mi futuro profesional en la dirección que está tomando;
 - El doctor Santiago Torrado, por las prácticas más divertidas de toda la carrera, con su carácter positivo, en las que me transmitió la pasión que él siente por esta rama de la investigación
 - Los doctores Damián Córdoba, Manuel Córdoba, Loli Serrano y Ana Fernández, por hacerme sentir parte del departamento durante mi estancia
- Gracias a todos mis compañeros del departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, con los que he compartido tantos momentos durante mi investigación
- Gracias al Doctor Juan José García, por su inestimable ayuda durante el desarrollo de mi tesis y por haberme apoyado tanto, con su buen humor, su

maravilloso corazón y su gran experiencia y conocimiento. Sin tu ayuda, Juan, esta tesis no hubiera sido posible.

- Gracias a mi madre, Berna Ruiz, que siempre está presente, por toda la ayuda recibida, por aguantar mis quebraderos de cabeza, los viajes y el estrés, y por ser el apoyo que siempre necesito.
- Gracias a mi compañero de vida, Sergio Sánchez, por facilitármela, y por ser la constante de todos mis cambios.

Gracias a todos, de corazón, por acompañarme en esta aventura que llega a su punto final.

Índice

Índice general

Agradecimientos	5
Índice de figuras	11
Índice de tablas	14
Palabras clave	15
Palabras clave	16
Abreviaturas	18
Resumen	20
Título:.....	20
Introducción:	20
Objetivo:	20
Materiales y métodos:	20
Resultados:.....	21
Conclusiones:.....	21
Abstract	23
Title:.....	23
Introduction:	23
Objective:.....	23
Materials and methods:	23
Results:	24
Conclusions:	24
Introducción, objetivo y planteamiento	26
Introducción	26
Objetivo:	29
Planteamiento:.....	29
Desarrollo teórico	31
Formas de liberación colónica:	31
SISTEMAS ENTÉRICOS:	31
MATRICES BIODEGRADABLES:	33
SISTEMAS DE LIBERACIÓN DEPENDIENTES DE LA PRESIÓN.....	34
SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADOS OSMÓTICAMENTE:	35
OTROS SISTEMAS DE LIBERACIÓN COLÓNICA:	35
Enfermedades a tratar:	39
Materiales y métodos:	42
Materiales	42

Materias primas.....	42
Reactivos y materiales auxiliares.....	63
Disoluciones tampón	65
Instrumental.....	66
Métodos.....	67
Preparación de formulaciones.....	67
Cuantificación del MLX	76
Ensayos <i>in vitro</i> – Solubilidad	78
Ensayos <i>in vitro</i> – Velocidad de disolución	79
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	81
Difracción de rayos X	84
Ensayos <i>in vivo</i> con formulación seleccionada	85
Análisis estadístico.....	89
Validación de métodos.....	90
Introducción:	90
Análisis de MLX por espectrofotometría directa UV	92
Análisis de MLX por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	97
Resultados y discusión:.....	102
Ensayos <i>in vitro</i>.....	102
Ensayos <i>in vitro</i> : Solubilidad de granulados de MLX.....	102
Ensayos <i>in vitro</i> : Velocidad de disolución	104
Ensayo <i>in vitro</i> : Homogeneidad de dosis de granulados	118
Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	119
Difractometría de rayos X	125
Ensayos <i>in vivo</i> con la formulación seleccionada	128
Primer ensayo en ratones.....	129
Segundo ensayo en ratones.....	133
Tercer ensayo en ratones	138
Conclusiones:	141
Bibliografía	144

Índice de figuras

Índice de figuras

Figura 1: PULSINCAP® [65]	33
Figura 2:: Diagrama de las capas de un sistema de liberación colónica con matrices biodegradables en las distintas partes del aparato gastrointestinal [83]	34
Figura 3: Sistema de liberación colónica dependiente de la presión [3]	34
Figura 4: Diagrama de OROS - Ctmu®; Colon Targeted multiple units [84]	35
Figura 5: Representación de la iPill [85]	36
Figura 6: Esquema de la cápsula "Enterion" [87]	37
Figura 7: Cápsula IntelliSite®, esquema del sistema y liberación del fármaco [89]	38
Figura 8: Envase de MLX utilizado en el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.	42
Figura 9: Molécula de MLX [105] [35]	43
Figura 10: Bote y detalle de polvo Metolose® 90SH 100 empleado en algunas de las formulaciones. Fuente Eva Navarro Ruiz	52
Figura 11: Diagrama de flujo de la producción de Metolose® [116]	53
Figura 12: Estructura química de la lactosa monohidrato [105]	56
Figura 133: Microfotografía SEM de cristales de lactosa Lactochem de Friesland Foods Domo a 200X y 10 kV de voltaje [117]	57
Figura 14: Frascos de Eudragit® RS 30D, FS 30D y NM 30D con los que se trabajó para el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.	60
Figura 15: Tipos de Eudragit® y su utilidad según la zona del tracto gastrointestinal donde se desee la liberación [122]	62
Figura 16: Lectura de pH-metro de un tampón realizado durante el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.	65
Figura 17: Esquema básico de la obtención de un granulado por granulación por vía húmeda en industria [130]	68
Figura 18: Granulación del MLX con Eudragit®. Fuente Eva Navarro Ruiz	69
Figura 19: Tamices utilizados en el desarrollo de la tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz	69
Figura 20: Muestras de algunos de los granulados realizados durante el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.	75
Figura 21: Foto del equipo de HPLC utilizado en el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.	77
Figura 22: Preparación de muestras en bases adecuadas para su posterior recubrimiento. Fuente Eva Navarro Ruiz.	81
Figura 23: Muestras preparadas para su recubrimiento. Fuente Eva Navarro Ruiz.	82
Figura 24: Microscopio electrónico de barrido Jeol® 6400 JSM del Centro Nacional de Microscopía. Fuente Eva Navarro Ruiz.	82
Figura 25: Microscopio electrónico de barrido con imagen de muestra analizada. Fuente Eva Navarro Ruiz.	83
Figura 26: Foto de ratones como los utilizados en el ensayo in vivo. Fuente Eva Navarro Ruiz.	85
Figura 27: Foto de la pantalla del HPLC mostrando cromatografías de muestras de ratones tratados. Fuente Eva Navarro Ruiz.	88
Figura 28: Recta de calibrado del MLX a pH 1,2 con absorbancia frente a concentración	93
Figura 29: Recta de calibrado del MLX a pH 6,8 con absorbancia frente a concentración	93
Figura 30: Recta de calibrado del MLX a pH 7,4 con absorbancia frente a concentración	94
Figura 31: Preparación de las diluciones seriadas de la disolución madre de MLX. Fuente Eva Navarro Ruiz	96
Figura 32: Cromatogramas de intestino grueso de ratón, siendo de arriba hacia abajo, Ratón control C3, Ratón tratado T1, Ratón tratado T2 y patrón 2,5 µg/ml	98
Figura 33: Linealidad del método de HPLC	99
Figura 34: Representación de los coeficientes de solubilidad de los distintos granulados y la materia prima a pH 6,8	102

<i>Figura 35: Gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,5 - 1,41 mm a pH 6,8, 37°C y 50 rpm</i>	106
<i>Figura 36: Representación gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,5 - 1,41 mm a pH 1,2, 6,8 y 7,4, 37 °C y 50 rpm</i>	108
<i>Figura 37: Representación gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,85 - 1,00 mm a pH 1,2, 6,8 y 7,4, 37 °C y 50 rpm</i>	109
<i>Figura 38: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,350 - 0,355 mm a pH 1,2, 6,8, y 7,4, 37 °C y 50 rpm</i>	112
<i>Figura 39: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,350 - 1,500 mm a pH 1,2, 37 °C y 50 rpm</i>	113
<i>Figura 40: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,35 - 1,50 mm a pH 6,8, 37 °C y 50 rpm</i>	115
<i>Figura 41: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,35 - 1,50 mm a pH 7,8, 37 °C y 50 rpm</i>	117
<i>Figura 42: Microfotografía de muestra de MLX, materia prima, a un aumento de 200X.</i>	119
<i>Figura 43: Microfotografía de muestra de MLX, materia prima, a un aumento de 1500X.</i>	120
<i>Figura 44: Comparación de microfotografías obtenidas por SEM a un aumento de 200X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C</i>	121
<i>Figura 45: Microfotografía de muestra CNM 2C, observada a través del aumento 200X del SEM</i>	122
<i>Figura 46: Comparación de microfotografías obtenidas por SEM a un aumento de 1500X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C.</i>	123
<i>Figura 47: Comparación de microfotografías a un aumento de 20X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C.</i>	124
<i>Figura 48: Microfotografía de muestra CNM 2C, a un aumento de 20X del SEM.</i>	124
<i>Figura 49: Difractogramas de rayos X en polvo de MLX, la formulación CNM y de su placebo y con ángulo de incidencia rasante (GID) de CNM</i>	126
<i>Figura 50: Difractogramas de rayos X en polvo de Lactosa, Metolose®, Eudragit® NM y el placebo del granulado CNM y con ángulo de incidencia rasante (GID) de CNM</i>	127

Índice de tablas

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Ejemplos de formulaciones de liberación colónica dependiente de pH comercializadas [69]</i>	32
<i>Tabla 2: Tipos de Metolose® [116]</i>	54
<i>Tabla 3: Tabla de propiedades físicas típicas de varios de los diferentes tipos de lactosa monohidrato comercialmente disponibles [117]</i>	58
<i>Tabla 4: Composición de granulado RS y CRS</i>	70
<i>Tabla 5: Composición de granulado FS y CFS</i>	70
<i>Tabla 6: Composición del granulado NM y CNM</i>	71
<i>Tabla 7: Composición de granulado RS + FS y granulado CRS + CFS</i>	72
<i>Tabla 8: Composición de granulado NM + FS y granulado CNM + CFS</i>	73
<i>Tabla 9: Composición de los granulados preparados para el SEM y el XPRD</i>	74
<i>Tabla 10: Absorbancias en el espectrofotómetro a 346 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX en pH 1,2, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos</i>	95
<i>Tabla 11: Absorbancias en el espectrofotómetro a 362 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX a pH 6,8, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos</i>	95
<i>Tabla 12: Absorbancias en el espectrofotómetro a 362 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX en pH 7,4, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos</i>	95
<i>Tabla 13: Áreas de los picos (x103) obtenidos en el HPLC con disoluciones de soluciones madre de MLX en ACN, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos</i>	99
<i>Tabla 14: Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen una concentración esperada de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml y 5µg/ml</i>	100
<i>Tabla 15: Ensayos de velocidad de disolución realizados a lo largo del desarrollo de la tesis</i>	104
<i>Tabla 16: Resultados del análisis estadístico con Statgraphics®</i>	110
<i>Tabla 17: Resultados de ensayo de homogeneidad de dosis 1 mg/kg de granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro</i>	118
<i>Tabla 18: Resultados de ensayo de homogeneidad de dosis 2 mg/kg de granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro</i>	118
<i>Tabla 19: Resumen de ensayos in vivo realizados</i>	128
<i>Tabla 20: Resultado del análisis de MLX por HPLC de muestras de plasma de ratón del primer ensayo tras 30 min de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)</i>	130
<i>Tabla 21: Resultados del análisis de MLX por HPLC de muestras de intestino delgado y grueso de ratón del primer ensayo tras 3h de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)</i>	131
<i>Tabla 22: Resultados del análisis de MLX por HPLC de muestras de intestino delgado y grueso de ratón del primer ensayo tras 6 h de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)</i>	132
<i>Tabla 23: Concentración plasmática de ratones tratados con la formulación CNM a dos dosis diferentes (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) después de 3, 6 y 8 h tras su administración, hallada por análisis en HPLC, en el segundo ensayo</i>	135
<i>Tabla 24: Cantidad de MLX en intestino grueso de ratones tratados con la formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) a 3, 6 y 8 h tras su administración, en el segundo experimento in vivo</i> ..	136
<i>Tabla 25: Cantidad de MLX en intestino delgado de ratones tratados con la formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) a 3 y 6 h tras su administración, en el experimento segundo</i>	137
<i>Tabla 26: Concentración plasmática de MLX, hallada por análisis en HPLC, en ratones tratados con formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso) a las 6 h tras su administración</i>	139
<i>Tabla 27: Cantidad de MLX, hallada por análisis en HPLC, en ratones tratados con formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso) a las 6 h tras su administración, en ciego, intestino grueso, intestino delgado y sus respectivos contenidos fecales</i>	139

Palabras clave

Palabras clave

Sistemas multiparticulares

Vectorización colónica

Meloxicam

Eudragit

Granulación

Abreviaturas

Abreviaturas

5-ASA: ácido 5 aminosalicílico

ACN: Acetonitrilo

AINES: Antiinflamatorios no esteroídicos

ANOVA: Análisis de varianza (ANalysis Of VAriance)

AR: artritis reumatoide

AUC: Área bajo la curva

CAP: Celulosa acetato ftalato

CRC: Cáncer colono-rectal

CV: Coeficiente de variación

DE: Desviación estándar

FAP: Poliposis adenomatosa familiar

GID: Método de difracción de rayos X por incidencia rasante

HNPCC: Cáncer colorrectal no poliposo hereditario

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HPMC: Hidroxi propil metil celulosa

IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory bowel disease)

IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

INR: International normalized ratio

MLX: Meloxicam

OROS: Sistema oral de liberación osmótica

SEM: Microscopio electrónico de barrido

XRPD: Cristalografía de rayos X (X-Ray Powder Diffraction)

Resumen

Resumen

Título:

DESARROLLO GALÉNICO DE NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN COLÓNICA DE MELOXICAM

Introducción:

El meloxicam (MLX) es un antiinflamatorio no esteroídico (AINE) de la familia Oxicam. Este grupo de AINEs se utiliza frecuentemente en el tratamiento de la artritis reumatoide y de inflamaciones postoperatorias. Es un buen antioxidante, y, recientemente, se le ha encontrado utilidad en la quimioprevención, quimiosupresión y protección UV.

El MLX es un inhibidor selectivo de COX-2, con alta selectividad y menores efectos secundarios gastrointestinales. Ya que es un fármaco con buena absorción en la región colónica, se están estudiando sus propiedades contra el cáncer de colon y otras enfermedades de esta área, por lo que es interesante investigar nuevas formulaciones de administración colónica de MLX.

En esta tesis se estudia el comportamiento de granulados sin y con un 5% de celulosa y con un tipo de Eudragit® (RS, FS o NM), y con mezclas de los polímeros RS + FS y NM + FS.

Objetivo:

El objetivo de esta tesis es el desarrollo y elaboración de nuevas formulaciones de liberación colónica de MLX con vehículos pH y tiempo dependientes.

Materiales y métodos:

Para el **desarrollo galénico de nuevos sistemas de liberación colónica de meloxicam (MLX)**, se ha estudiado la influencia de distintas proporciones de varios excipientes: Eudragit® RS, Eudragit® FS, Eudragit® NM, y celulosa (Metolose®), en los perfiles de disolución del MLX a diferentes pHs: 1,2, 6,8 y 7,4, simulando las condiciones del sistema gastrointestinal. A partir de los resultados de velocidad de disolución obtenidos de MLX, se han elaborado las formulaciones más adecuadas mediante granulación húmeda del principio activo con un 30% de Eudragit® del tipo seleccionado o de mezclas, añadiendo en algunos casos un 5% de celulosa (Metolose®). A continuación, se realizó la caracterización físico-química de la formulación con mejores resultados en los ensayos de cesión *in vitro* (granulado CNM) mediante distintas técnicas analíticas XRPD, GID y SEM. Así mismo se diseñó, el estudio *in vivo* de la formulación seleccionada, administrándola a un modelo animal con el fin de comprobar su eficacia de llegada al colon.

Resultados:

En los ensayos *in vitro* se observa que *con* el granulado seleccionado para los ensayos *in vivo* (granulado CNM) se incrementa la cesión del MLX materia prima y se obtienen mejores perfiles de disolución en comparación con el resto de formulaciones y el MLX materia prima en condiciones similares al tránsito gastrointestinal, obteniendo una cesión más sostenida gracias a la presencia de Metolose®.

La formulación seleccionada, aumenta su disolución de forma inversamente proporcional al diámetro del granulado, ya que ve incrementada su superficie específica. La formulación observada por SEM muestra una estructura prismática característica del MLX y además se observa, también un recubrimiento eficaz, y una distribución homogénea en un rango estrecho de tamaño (0,350 – 0,355 mm) que proporcionará una dosis homogénea consiguiendo una administración adecuada a través de las pequeñas cánulas utilizadas para los ensayos *in vivo*.

En los estudios de difracción de rayos X, realizados mediante difracción con ángulo de incidencia rasante (GID), se observa una alta concentración de lactosa en la superficie de los gránulos. También se comprueba que se mantiene la morfología original del resto de componentes.

Gracias a los ensayos *in vivo*, se logra que la formulación seleccionada llegue a intestino grueso, tras su administración de forma superior a las 6 h, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las dos dosis estudiadas, manteniendo una baja concentración plasmática. Esto demuestra que el granulado es capaz de llegar al lugar de acción sin degradarse, consiguiendo así el objetivo de esta tesis.

Conclusiones:

Se ha conseguido una formulación de MLX de liberación colónica, que llega en su mayor parte, intacto al intestino grueso, con una cesión elevada de MLX en el lugar de acción, gracias a la presencia de Metolose®. Esta liberación se ve sostenida a lo largo del tracto gastrointestinal por la utilización de Eudragit® NM y gracias a 4 granulaciones sucesivas, obteniéndose una forma y un tamaño homogéneo de 0,350 – 0,355 mm, apto para su administración oral, mediante una cánula para animales pequeños (dosis de 1mg/kg de peso), y apta para enfermedades que cursen con inflamación colónica como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y el cáncer de colon entre otras.

Abstract

Abstract

Title:

GALENIC DEVELOPMENT OF NEW MELOXICAM COLONIC RELEASE SYSTEMS

Introduction:

Meloxicam (MLX) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) of the Oxicam family. This group of NSAIDs is frequently used in the treatment of rheumatoid arthritis and postoperative inflammation. It is a good antioxidant, and recently it has been found useful in chemoprevention, chemosuppression, and UV protection.

MLX is a selective COX-2 inhibitor, with high selectivity and fewer gastrointestinal side effects. Due to MLX is a drug with good absorption in the colonic region, its properties against colon cancer and other diseases in this area are being studied, so it is interesting to investigate new formulations for colonic administration of MLX.

This thesis studies the behavior of granules without and with 5% cellulose and with a type of Eudragit® (RS, FS or NM), or with mixtures of the polymers RS + FS and NM + FS.

Objective:

The objective of this thesis is the development and elaboration of new colonic release formulations of MLX with pH and time dependent vehicles.

Materials and methods:

For the galenic development of new meloxicam (MLX) colonic release systems, the influence of different proportions of various excipients has been studied: Eudragit® RS, Eudragit® FS, Eudragit® NM, and cellulose (Metolose®), in the dissolution profiles of MLX at different pHs: 1.2, 6.8 and 7.4, simulating the conditions of the gastrointestinal system. From the dissolution rate results obtained from MLX, the most suitable formulations have been prepared by wet granulation of the active ingredient with 30% Eudragit® of the selected type or mixtures, adding in some cases 5% cellulose (Metolose®). Subsequently, the physico-chemical characterization of the formulation with better results in the *in vitro* tests (CNM granules), was carried out using different XRPD, GID and SEM analytical techniques. Besides, the *in vivo* study of the selected formulation was designed, administering it to an animal model in order to verify its effectiveness reaching the colon.

Results:

In the *in vitro* tests, it is observed that the release of the MLX raw material increases and better dissolution profiles are obtained with the granulate selected for the *in vivo* tests (CNM granulate) compared to the rest of the formulations and the MLX raw material under conditions similar to gastrointestinal transit, obtaining a more sustained release thanks to the presence of Metolose®.

The selected formulation increases its dissolution inversely proportional to the diameter of the granulate, as its specific surface area increases. The formulation observed by SEM shows a prismatic structure characteristic of MLX and an effective coating, in addition, is observed a homogeneous distribution in a narrow size range (0.350 - 0.355 mm) that will help to achieve a homogeneous dose by an adequate administration through the small cannulas used for *in vivo* tests.

In X-ray diffraction studies, performed using grazing angle of incidence (GID) diffractometry, a high concentration of lactose is observed on the surface of the granules. It is also verified that the original morphology of the rest of the components is maintained.

Thanks to *in vivo* tests it is possible to determine that the selected formulation reaches the large intestine, being greater at 6 h than at 3 h after administration, without statistically significant differences ($p > 0.05$) between the two doses studied, maintaining a low plasma concentration. This shows that the granulate can reach the site of action without degrading, achieving the objective of this thesis.

Conclusions:

A new MLX colonic release formulation has been achieved, which reaches the large intestine almost intact, with a high release of MLX at the site of action, thanks to the presence of Metolose®. This release is sustained throughout the gastrointestinal tract due to the use of Eudragit® NM and thanks to 4 successive granulations, obtaining a homogeneous shape and size of 0.350 - 0.355 mm, suitable for oral administration, through a cannula for small animals (dose of 1mg / kg of weight), and suitable for diseases that cause colonic inflammation such as ulcerative colitis, Crohn's disease and colon cancer, among others.

Introducción, objetivo y planteamiento

Introducción, objetivo y planteamiento

Introducción

Los sistemas de liberación selectiva a nivel colónico son sistemas con liberación diferida, que constituyen una interesante alternativa para la administración de determinados principios activos, ya que esta parte del tracto gastrointestinal supone en ocasiones un medio menos hostil que el estómago o el intestino delgado, especialmente en lo que se refiere a la actividad enzimática [1] [2] [3] [4] [5] [6]. Por otra parte, el factor que confiere al colon un valor especial en la administración de moléculas activas es el elevado tiempo de permanencia de la forma de dosificación en esta zona del intestino, hecho que resulta especialmente útil a la hora de prolongar la absorción sistémica de principios activos y así conseguir un efecto localizado en esa zona [3] [7] [8]. Los tramos más favorables para que se produzca la absorción de principios activos en el intestino grueso son el ciego y el colon ascendente, en donde los contenidos son todavía fluidos, permitiendo un mejor acceso de la molécula activa a la pared intestinal [1] [3] [6].

Estas zonas son también ideales para que tenga lugar la liberación de principios activos con los que se desea un efecto local que, de este modo, podrá tener lugar a lo largo de todo el colon

Las formulaciones de liberación colónica son, hoy en día, objeto central de la investigación en farmacia por sus aplicaciones tan atractivas, entre las cuales se pueden destacar:

- La mejora en el tratamiento de patologías localizadas a nivel colónico, como las enfermedades inflamatorias intestinales [5] [9].
- La vectorización colónica permite reducir la dosis que se administra, con lo que disminuye la posibilidad de aparición de efectos secundarios [1].
- Incremento de la baja biodisponibilidad oral que presentan la gran mayoría de las moléculas peptídicas, motivada en buena medida por la degradación que sufren a nivel gástrico e intestinal por la presencia de enzimas proteolíticas, cuya presencia es menor en el colon.
- Mejora del tratamiento de enfermedades sujetas a ritmos circadianos [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16], como el asma [17] [18] [19] o la artritis [20] [21], que presentan un recrudecimiento a determinadas horas del día, durante la noche en el asma nocturna o a primeras horas de la mañana en la artritis, por lo que la liberación colónica permitiría obtener un retraso en la cesión del principio activo

para adaptar el comienzo del efecto a aquellos momentos donde los síntomas se agravan. [7] [8] [9] [13] [14] [15] [16] [18] [19]

Los sistemas de liberación colónica tienen como objetivo liberar la sustancia activa en la última porción del intestino delgado, sin liberar prematuramente en el tracto gastrointestinal superior, para que esté libre en la primera porción del intestino grueso, el colon ascendente, que es una ventana de absorción para gran número de moléculas al permitir la administración de sustancias de alto peso molecular. El éxito de la liberación colónica requiere que el principio activo alcance el colon ascendente en un tiempo preciso. Además, se debe minimizar la pérdida de principio activo como consecuencia de la actividad enzimática propia del íleon o del secuestro del fármaco por las heces ya compactadas en el colon distal.

Por ello, y de una manera general, los objetivos de una forma de dosificación oral destinada a una absorción colónica se dirigen a:

- Proteger el principio activo a lo largo de tránsito gastrointestinal hasta su llegada al colon
- Uniformizar el tiempo de permanencia a nivel colónico
- Asegurar el reconocimiento del sistema por parte de la mucosa colónica
- Asegurar una zona de liberación específica, que puede estar determinada por las propias características fisiológicas de la zona.

Por eso, para la liberación colónica es importante considerar las propiedades fisiológicas del colon. En general, el tracto gastrointestinal sufre cambios de motilidad, contenido, actividad enzimática y pH desde el estómago hasta el intestino [22]. Para optimizar los sistemas de liberación colónica, se han estudiado varias posibilidades, de las que, en ese trabajo, destacamos la liberación pH dependiente y tiempo dependiente [23]

El colon posee un pH mucho mayor que el resto del tracto gastrointestinal, esto puede ser usado como una estrategia de liberación modificada. En otros trabajos se realizaron formulaciones pH dependientes con polímeros como celulosa acetato ftalato (CAP), hidroxipropil metil celulosa ftalatos (HPMCP) 50 y 55, y copolímeros de ácido metacrílico y metilmetacrilato (por ejemplo, Eudragit® S100, Eudragit® L, Eudragit® FS y Eudragit®P4135F) [24] [25]. Particularmente los polímeros de Eudragit® son los polímeros sintéticos más utilizados en el diseño de fármacos de liberación colónica porque ofrecen mucoadhesividad y liberación pH dependiente [26] [27]. El polímero ideal debe ser capaz de soportar el bajo pH del estómago y la parte proximal del intestino delgado, pero disolverse en el pH del íleon terminal y el colon. Como resultado, los sistemas de liberación colónica producidos con polímeros pH dependientes deben disolverse a un pH de 6.0 – 7.0 para retrasar la liberación del principio activo y evitar la degradación en el tracto gastrointestinal antes de alcanzar el colon.

Otros trabajos estudiados de liberación retardada y uniforme utilizaban Eudracol®. Este sistema está basado en recubrir el pellet con Eudragit® RL/RS y Eudragit® FS 30D, dando una liberación colónica específica de forma pH y tiempo dependiente. [28]

Para mejorar la especificidad por el colon, Naeem et al. [29] fabricaron nanopartículas de budesonida pH y tiempo dependientes para el tratamiento de la colitis. Estas nanopartículas se prepararon con Eudragit® FS30D y Eudragit® RS100. El Eudragit® FS30D es un polímero pH dependiente que se disuelve en ambientes por encima de 7.0, mientras que el Eudragit® RS100 es un polímero de liberación controlada tiempo dependiente, con baja permeabilidad. Combinando estos dos polímeros, se minimiza de una forma efectiva la liberación prematura en el tracto gastrointestinal superior, alcanzando la liberación colónica.

El pH del colon, que varía de 6.5 a 7.5, en condiciones normales, es muy sensible a alteraciones por la dieta, enfermedades, la toma de agua y el metabolismo microbiano [30]. Por ejemplo, pacientes con colitis ulcerosa, tienen un pH colónico más ácido comparados con individuos sanos. Esto daría liberación incompleta de sistemas con cubierta entérica. [31].

Teniendo en cuenta que el peristaltismo del segmento colónico es lento y que el contenido permanece largo tiempo en el colon, es interesante también el desarrollo de formulaciones colónicas tiempo dependiente [32]. Los sistemas de liberación colónica tiempos dependientes guían la liberación del principio activo por los tiempos de llegada del alimento tras la administración oral. En general, el tiempo de vaciado gástrico es de 15 – 180 min, mientras que la retención en el intestino delgado es de 3 – 4h; por lo que la liberación los sistemas tiempo dependiente suelen estar entorno a las 5 – 6h [33]. Actualmente, el fármaco se recubre con recubrimientos insolubles que son difíciles de descomponer y el tiempo de liberación se controla por la proporción y dosis del material de recubrimiento [23].

Durante el desarrollo de esta tesis se han estudiado distintos tipos de Eudragit® para lograr una liberación colónica del principio activo meloxicam (MLX).

El MLX es un AINE del grupo de los oxicams que actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, ejerciendo de este modo efectos antiinflamatorios, antiexudativos, analgésicos y antipiréticos. MLX también tiene propiedades antiendotóxicas ya que ha demostrado inhibir la producción de tromboxano B2 inducido por la administración de endotoxina de *Escherichia coli* en terneros y cerdos. [34] [35] [36] [37] [38].

El MLX es un antiinflamatorio no esteroídico (AINEs) que se distingue por inhibir en mayor grado COX-2 que la COX-1 tanto en su actividad ciclooxigenasa como la peroxidasa (eficiencia similar en pacientes con artritis reumatoidea y artrosis, acompañada de una mejor tolerancia gastrointestinal).

Debido a que este fármaco se absorbe bien en la región colónica, se están estudiando sus propiedades contra el cáncer de colon y enfermedades de esta área, por lo que es interesante investigar nuevas formulaciones de colónicas de esta sustancia activa [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47].

En las décadas pasadas, la prevalencia de las enfermedades colónicas ha aumentado mundialmente, demandando la efectividad de tratamientos locales para terapias más eficaces y seguras. De todas las enfermedades colónicas, el cáncer colonorrectal (CRC) causa el mayor número de muertes por cáncer en Europa (con más de 200,000 muertes anuales [48] y es el tercer cáncer más diagnosticado en el mundo [48] [49]. La incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) está también creciendo de manera alarmante en zonas como Asia, en las que antes había baja incidencia [50]. Consecuentemente, la necesidad de un tratamiento eficaz para las enfermedades colónicas es uno de los problemas mundiales de la salud pública.

Los sistemas de liberación colónica de MLX serían una buena propuesta para el tratamiento de estas enfermedades colónicas gracias a su efecto antiinflamatorio, a sus propiedades antes descritas y a que, recientemente se ha visto su utilidad en quimioprevención, quimiosupresión y protección UV [40] [41] [42] [43].

Objetivo:

El objetivo de esta tesis es el desarrollo y la elaboración de nuevas formulaciones de liberación colónica de MLX pH y tiempo dependientes.

Planteamiento:

El planteamiento para la realización de este trabajo es el siguiente:

1. Selección de los excipientes que permitan la liberación colónica del MLX (a pH 7,4).
2. Desarrollo de las formulaciones de MLX mediante la técnica de granulación húmeda.
3. Caracterización físico-química y estudio *in vitro* de las formulaciones desarrolladas, realizando estudios comparativos de velocidad de disolución de las formulaciones, simulando las condiciones del tracto gastrointestinal en los distintos pHs de las diferentes partes del mismo, durante 8h.
4. Selección de la formulación con mejores resultados *in vitro* para la realización de estudios *in vivo* y realización de estudios complementarios sobre su morfología y estructura cristalina
5. Realización de ensayos *in vivo* mediante la administración oral de la formulación seleccionada en ratones como animales de experimentación. Realizando todos los estudios de acuerdo con la directiva europea 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986, para la armonización de las leyes y procedimientos administrativas relacionadas con la protección de los animales destinados a la experimentación u otros fines científicos, estando el uso de animales plenamente justificado y poniendo todos los medios para asegurar el bienestar animal.

Desarrollo teórico

Desarrollo teórico

Formas de liberación colónica:

Las formas farmacéuticas de liberación colónica coinciden en la utilización de señales específicas que permiten el reconocimiento, por parte del sistema, de su llegada al colon, como son el cambio de pH que experimenta el contenido intestinal al alcanzar el colon, el tiempo de tránsito intestinal, parámetro relativamente constante que permite programar de manera precisa la llegada al colon o bien la presencia de enzimas procedentes de la flora bacteriana colónica [2] [51] [52] [28] [53] [54] [55].

Los sistemas basados en las dos primeras alternativas utilizan polímeros pH-sensibles, por lo que su comentario se realizará bajo la denominación de sistemas entéricos, mientras que en lo que respecta a la tercera alternativa (tiempo de tránsito gastro intestinal) se engloba en las matrices biodegradables. [51] [52] [28] [53] [54] [55] [1] [56]

SISTEMAS ENTÉRICOS:

Uno de los métodos para proteger al principio activo de su posible degradación a nivel gastrointestinal o conseguir una acción localizada en el colon es la utilización de polímeros de solubilidad dependiente del pH.

Para este fin se han propuesto polímeros de distinta naturaleza, fundamentalmente derivados celulósicos y acrílicos. Entre ellos, los copolímeros de los ácidos metacrílico y metilmetacrílico (Eudragits®) destacan como los que se utilizan más frecuentemente. [57] [58] [59] [60] [61].

Dependiendo de su composición, estos polímeros son insolubles a valores de pH inferiores a 6 (Eudragit® L) o 7 (Eudragit® S), pero se disuelven rápidamente tras la desprotonización de los grupos carboxílicos a valores superiores de pH. La utilización de esta alternativa tecnológica trata de explotar el supuesto incremento de pH que se detecta al ir avanzando en el tracto intestinal, y que alcanzaría su valor máximo a nivel del colon [56] [62] [63] [64]. Hoy en día se sabe, sin embargo, que tras un valor de $7,5 \pm 0,4$ en el íleon terminal, el pH disminuye hasta $6,4 \pm 0,6$ al pasar al ciego, por lo que, incluso utilizando los recubrimientos de Eudragit® S, no se asegura una liberación específica en el colon, sino que ésta comenzaría ya en las últimas porciones del intestino delgado. La mayor parte de los sistemas entéricos de liberación colónica descritos hasta el momento son cápsulas o comprimidos recubiertos, fundamentalmente con Eudragit® S o L, acetofalato de celulosa o microsferas elaboradas con estos polímeros o a partir de mezclas con otras variedades poliméricas [65] [66] [40] [67]

A pesar de la limitación que supondría la falta de especificidad de estos sistemas, existen varias formulaciones comercializadas (**Tabla 1**) para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal que liberan ácido 5 aminosalicílico (5 – ASA) a nivel colónico [56] [7] [68]. Tanto el 5-ASA como algunos corticoides utilizados para el mismo fin, así como péptidos y proteínas han sido y son objeto de un gran número de investigaciones relacionadas con esos sistemas.

Tabla 1: Ejemplos de formulaciones de liberación colónica dependiente de pH comercializadas [69]

Fármaco	Nombre comercial	Polímeros de recubrimiento	pH de disolución
Budesonida	Entrocort®	Eudragit® L 100-55, etilcelulosa	
	Budenofalk®	Eudragit® S	7
	Targit®	Cápsula recubierta de almidón	
Mesalazina	Claversal®	Eudragit® L 100	6
	Asacolin®	Eudragit® S	7
	Salofalk®	Eudragit® S	6
	Pentasa®	Pellets recubiertos de etilcelulosa	
	Mesazal®	Eudragit® L 100	6
	Calitofalk®	Eudragit® L 100	6
	Asacol®	Eudragit® S	7
Sulfasalazina	Azulfidine®	Celulosa acetato ftalato	6.2 - 6.5
	Colo-Pleon®	Eudragit® L 100-55	5.5

Otros sistemas se basan en la utilización del tiempo de tránsito en el intestino delgado para reconocer la llegada al colon [65] [68] [70] [71] [72] [73]

En este caso se recurre a un polímero entérico que se disuelve una vez que la formulación alcanza el intestino, lugar en el que comienza un periodo de latencia que se hace coincidir con el tiempo de permanencia en el intestino delgado (3 ± 1 horas). Algunos de estos dispositivos están constituidos por un núcleo (pellets o comprimidos) que incluye el principio activo, rodeado por dos cubiertas, una externa de carácter entérico (soluble a $\text{pH} > 5$) y la otra formada por un polímero hidrofílico hinchable (por ejemplo, la hidroxipropilmetilcelulosa), cuyas características condicionarán la duración del periodo de latencia [74] [75]

Un ejemplo es el Pulsincap® (**Figura 1**), que está constituida por un cuerpo hidrosoluble y una primera tapa hidrosoluble que se disuelve en el estómago, mientras que permanece una segunda tapa insoluble que se solubiliza cuando la cápsula alcanza el intestino delgado. [65] [57] [3] [4] [76]

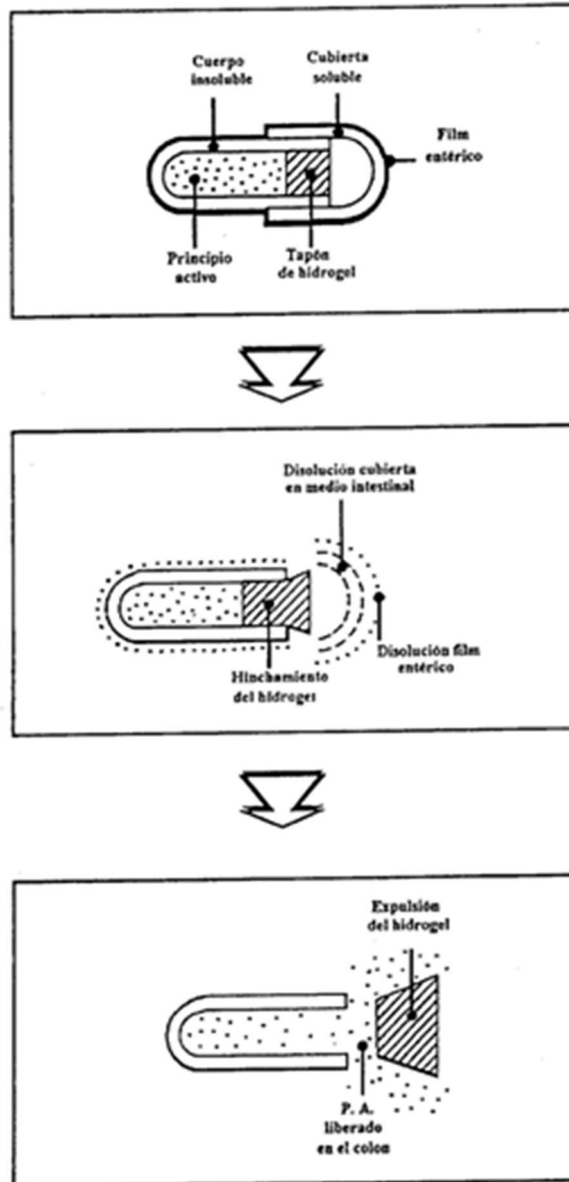


Figura 1: PULSINCAP® [65]

Otras estrategias de liberación colónica utilizan transportadores degradados específicamente por bacterias colónicas [77] [78] [79], sistemas bioadhesivos [80] o sistemas electrónicos [3] [81].

MATRICES BIODEGRADABLES:

Utilizan los mecanismos de degradación típicos de la abundante flora bacteriana existente a este nivel como polisacaridasas, azorreductasas y glucosidasas (**Figura 2**) [65] [68] [77] [78] [79] [82].

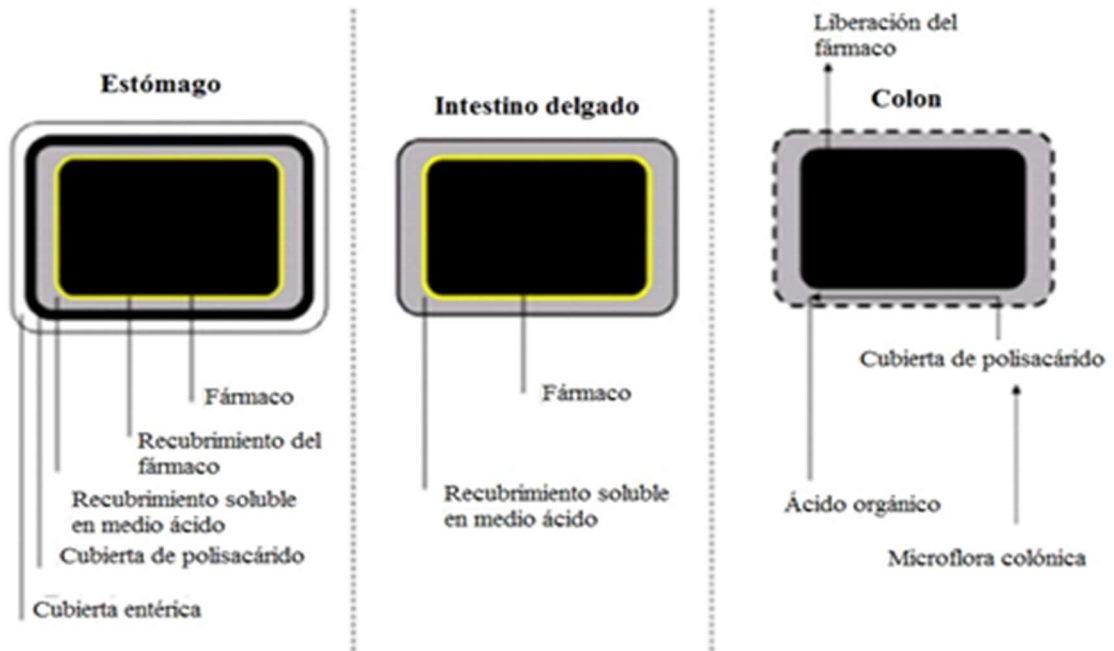


Figura 2:: Diagrama de las capas de un sistema de liberación colónica con matrices biodegradables en las distintas partes del aparato gastrointestinal [83]

SISTEMAS DE LIBERACIÓN DEPENDIENTES DE LA PRESIÓN [Figura 3]:

Con el aspecto de una cápsula, resistente a las presiones del tracto gastrointestinal superior, pero en respuesta a la presión elevada del colon, la forma de dosificación se conseguirá romper y liberar el fármaco en el sitio deseado [81].

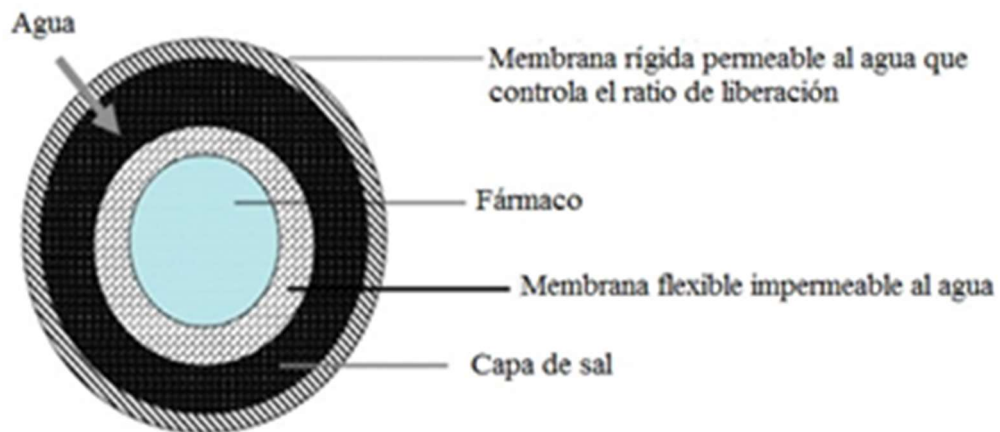


Figura 3: Sistema de liberación colónica dependiente de la presión [3]

SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADOS OSMÓTICAMENTE:

Depende de la presión osmótica ejercida por un agente osmótico en el compartimiento de los fármacos haciendo que éstos se liberen lentamente a través del orificio [81]. Un ejemplo de estos sistemas es el OROS – CT (**Figura 4**). El sistema OROS-CT puede ser una unidad osmótica individual o puede incorporarse como 5 – 6 unidades juntas, cada una de 4 mm de diámetro, encapsuladas en gelatina. Cada unidad contendrá un compartimiento de empuje y un compartimiento del principio activo, ambos rodeados de una membrana semipermeable, con un orificio de salida creado a través de la membrana cercana al compartimiento del principio activo [3].

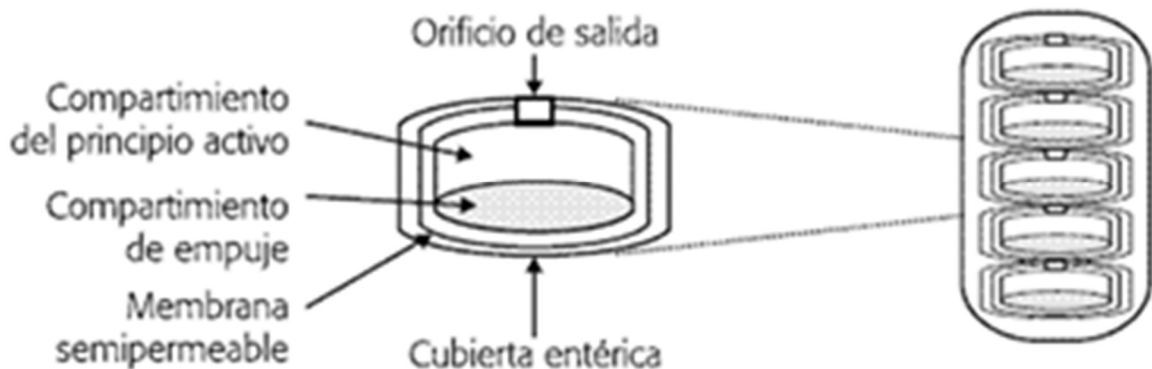


Figura 4: Diagrama de OROS - Ctmu®; Colon Targeted multiple units [84]

OTROS SISTEMAS DE LIBERACIÓN COLÓNICA:

- Philips' Intelligent Pill:

Es una cápsula que puede ser programada electrónicamente para controlar la liberación del fármaco de acuerdo a un perfil de liberación predefinido de dicho fármaco. (**Figura 5**). La "iPill" determina su localización en el tracto gastrointestinal midiendo la acidez del medio en el que se encuentra, y libera el fármaco de su reservorio mediante una bomba controlada por un microprocesador permitiendo una liberación programada del fármaco totalmente precisa. [81]

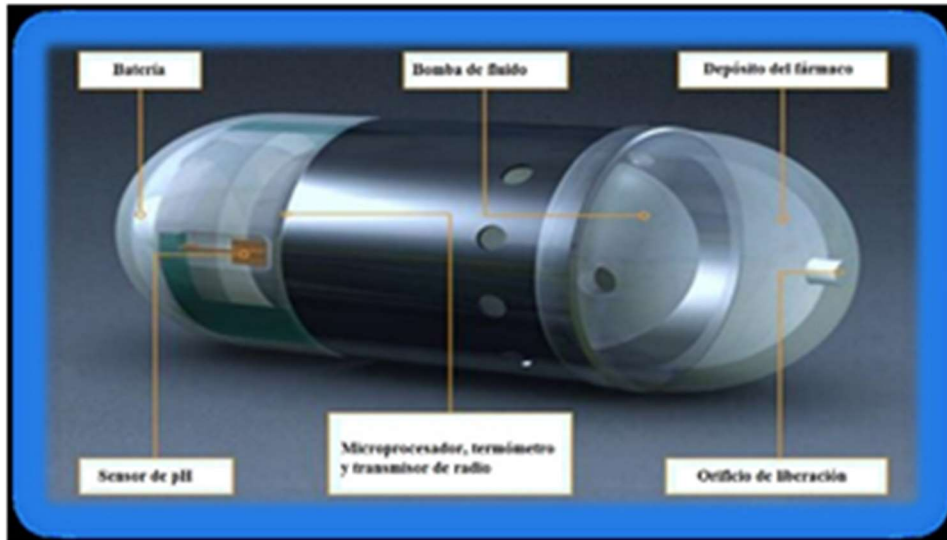


Figura 5: Representación de la iPill [85]

- Enterion capsule (**Figura 6**): En la base del reservorio del fármaco está la cara del pistón que está sujeta a un resorte comprimido por un filamento polimérico de gran fuerza tensora. Un marcador radiactivo se localiza dentro de una cámara separada para permitir la visualización en tiempo real de la localización de la cápsula [86] [87]. Cuando la cápsula alcanza la localización diana en el tracto gastrointestinal, el contenido se eyecta por la aplicación externa de un campo magnético oscilante que induce que se aumente la temperatura, se libere el resorte y se active el pistón.

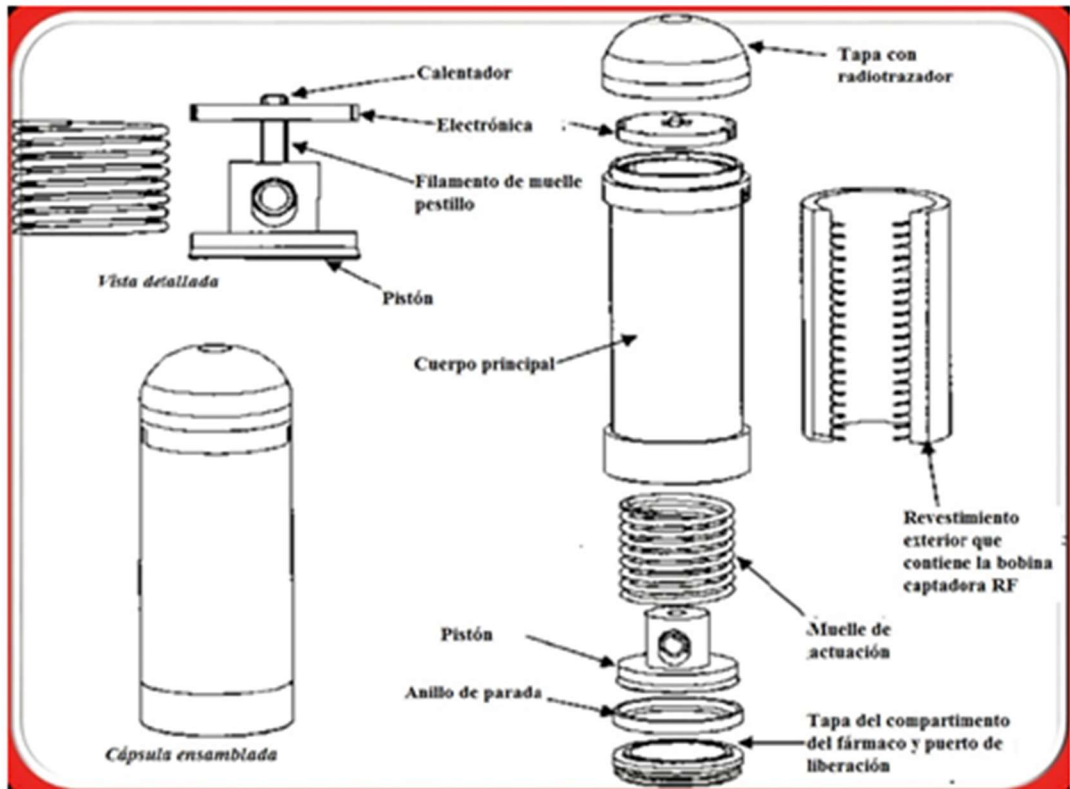


Figura 6: Esquema de la cápsula "Enterion" [87]

- InteliSite® capsule [88] [89] [90]: La formulación se carga en un depósito especialmente diseñado. Cuando la cápsula alcanza la localización deseada en el tracto gastrointestinal se activa por un campo magnético con radio frecuencia que induce la producción de calor causando una rotación que permite que el contenido sea liberado (**Figura 7**).

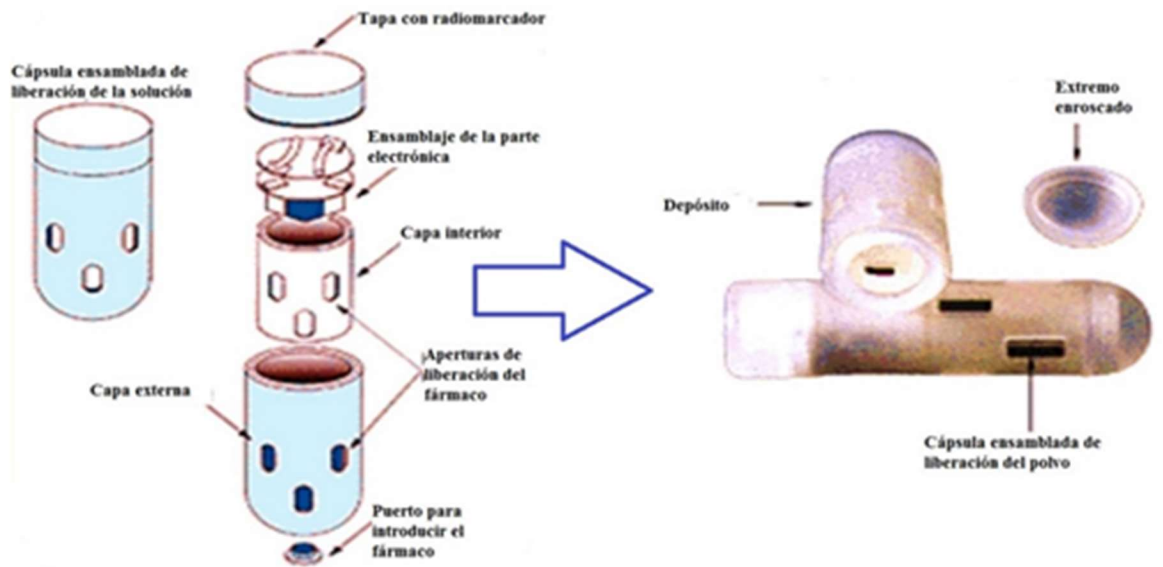


Figura 7: Cápsula IntelliSite®, esquema del sistema y liberación del fármaco [89]

Todos estos avances hacen posible el tratamiento de patologías locales colónicas o la absorción sistémica de fármacos que se pueden degradar en otras zonas del tracto gastrointestinal.

En esta tesis doctoral se formularán sistemas de liberación colónica basándonos en la utilización de polímeros pH y tiempo dependientes, con granulación húmeda.

Enfermedades a tratar:

Los sistemas de liberación colónica de MLX serían una buena propuesta para el tratamiento de estas patologías colónicas gracias a su efecto antiinflamatorio, a sus propiedades antes descritas y a que, recientemente se ha visto su utilidad en quimioprevención y quimiosupresión [40] [91] [92] [43] [93] [94] [95]

En las décadas pasadas, la prevalencia de las enfermedades colónicas aumentó mundialmente, demandando la efectividad de tratamientos locales para terapias más eficaces y seguras, como son los sistemas de liberación colónica.

La liberación colónica es de gran importancia para el tratamiento de enfermedades colónicas como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y el cáncer colonorrectal [96]. Los efectos adversos causados por el fármaco se disminuyen al limitar su absorción a circulación sistémica [2]. Los primeros acercamientos a la liberación colónica incluyen profármacos, sistemas pH y tiempo dependientes (como los desarrollados en el presente trabajo), sistemas biodegradables y activados por la microflora [97].

Utilizar polímeros con un perfil de solubilidad adecuado, con el pH como activador, permite basarnos en las variaciones de las condiciones del pH a lo largo del tracto gastrointestinal.

Aproximadamente 1,8 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer colorrectal (CRC) en 2018 [98]. Los tratamientos convencionales para el cáncer incluyen quimioterapia, radiación y cirugía. Tanto la quimioterapia como la radiación tienen frecuentemente efectos secundarios severos y toxicidad, afectando la calidad de vida de los pacientes. Además, se ha observado que las células cancerígenas son capaces de desarrollar resistencia a la quimioterapia y la radioterapia [99], lo que nos lleva a los investigadores a buscar nuevas alternativas de tratamiento.

Los factores de riesgo del CRC son factores no modificables como la edad y factores genéticos. El riesgo de desarrollar CRC aumenta tras los 40 años, y más del 90% de los casos de CRC se diagnostican en pacientes mayores de 50 años. Condiciones genéticas como poliposis adenomatosa familiar (FAP) y cáncer colorrectal no poliposo hereditario (HNPCC) son responsables de aproximadamente un 5 – 10% del CRC [100].

La localización más frecuente del CRC es en el colon proximal, seguido del recto y del colon distal. Localizaciones tumorales diferentes en el CRC tienen distinta clínica, pronóstico y respuesta a los tratamientos [101].

El CRC comienza normalmente como un pólipo con crecimiento localizado en el colon o recto. Los pólipos con características malignas tienen el potencial de progresar a cáncer, sin embargo, no todos los pólipos evolucionan a cáncer invasivo [101]. Con el tiempo el tamaño del pólipo aumenta por el crecimiento celular. Conforme el tumor crece, se vasculariza y las células cancerosas se pueden dispersar dando metástasis en sitios lejanos a través de la circulación linfática o sanguínea [94].

La enfermedad inflamatoria intestinal (inflammatory bowel disease o IBD) es una enfermedad inflamatoria crónica y compleja del tracto digestivo, desarrollada como consecuencia de la interacción de factores genéticos y medioambientales [102].

El término IBD se utiliza para describir la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [103]. La colitis ulcerosa afecta solamente al colon, mientras que la enfermedad de Crohn afecta al sistema digestivo completo. Se cree que alteraciones de las bacterias enterales pueden contribuir al IBD [2].

IBD es una enfermedad autoinmune, donde el sistema digestivo es atacado por el sistema inmune del cuerpo. Se ha visto que el IBD afecta a individuos con el 30 – 50% de biodiversidad de bacteria comensal reducida, como los firmicutes y los bacteroidetes [104].

En esta enfermedad, controlar la inflamación es uno de los primeros objetivos en el tratamiento, por ello los sistemas de liberación colónica de MLX podrían ser de utilidad para los pacientes afectados.

Materiales y métodos

Materiales y métodos:

Materiales

Materias primas

Meloxicam

El Meloxicam (MLX, Fagron[®], Barcelona España) utilizado es de grado farmacéutico (lote 804443) o superior.



Figura 8: Envase de MLX utilizado en el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.

DEFINICIÓN

El MLX es 4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-yl)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido (**Figura 9**), siendo su fórmula química C₁₄H₁₃N₃O₄S₂ y su peso molecular de 351,4g/mol [105].

El MLX es un sólido cristalino de color amarillo pálido, químicamente estable, no higroscópico, no es fotosensible y su log P (octanol-agua) es 3,43. [105] [35] [37] [106] [36] [107].

MLX puede ser extraído por cristalización a partir de los solventes orgánicos como tetrahydrofurano. La estructura del MLX obtenida de esta forma es caracterizada por un

equilibrio tautomérico de protones. El pK_a del MLX son 4,18 y 1,09 a valores de pH de 0 a 3 y 2,5 a 6,5, respectivamente [105] [37] [106] [107].

De esta forma, el comportamiento de ionización del MLX puede resumirse de la siguiente manera: en solución acuosa a un pH mayor de 4,18, el MLX se ioniza y la forma predominante es la forma aniónica; sin embargo, a un pH inferior de 4,18, el MLX puede existir en forma enólica o zwitterionica; en el caso de un medio muy ácido, se puede presentar en su forma catiónica.

La solubilidad acuosa del MLX es baja [105] [35] [37] [108]. La solubilidad en solución acuosa de los AINEs ácidos en el cual se incluye el MLX es dependiente de pH: la disminución del pH provoca un aumento en la proporción de fármaco no-ionizado a ionizado causando una disminución en la solubilidad; es decir, el MLX será insoluble en agua a un pH ácido – neutro y muy altamente soluble a pH básico.

El MLX es ligeramente soluble en acetona, soluble en dimetilformamida, y muy ligeramente soluble en etanol (96 %) y en metanol. [105] [108]

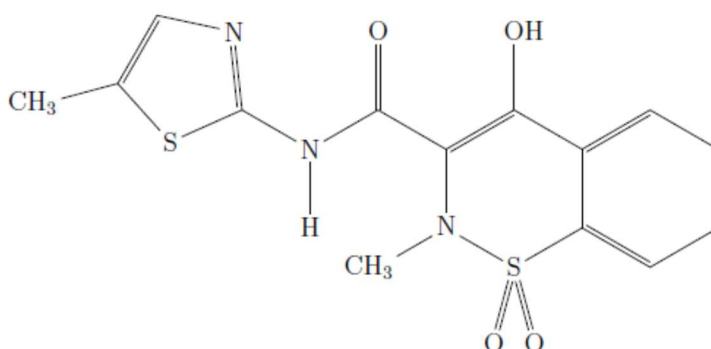


Figura 9: Molécula de MLX [105] [35]

GRUPO FARMACOTERAPÉUTICO

El MLX pertenece al grupo farmacoterapéutico de antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroídicos (AINE, familia Oxicam). Con la siguiente clasificación ATC:

- Nivel 3: M01A – Productos antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroideos
- Nivel 4: M01AC – Oxicams
- Nivel 5: M01A06 – Meloxicam
- Código ATCvet: QM01AC06.18

MLX es un AINE del grupo de los oxicams que actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, ejerciendo de este modo efectos antiinflamatorios, antiexudativos, analgésicos y antipiréticos. MLX también tiene propiedades antiendotóxicas ya que ha demostrado inhibir la producción de tromboxano B2 inducido por la administración de endotoxina de *Escherichia coli* en terneros y cerdos. [105] [35] [36] [37] [108]

MECANISMO DE ACCIÓN:

El MLX es un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) con actividades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas; se distingue por inhibir en mayor grado COX-2 que la COX-1 tanto en su actividad ciclooxigenasa como la peroxidasa, logrando una mejor tolerancia gastrointestinal gracias a la selectividad por la COX-2 [35] [37]

FARMACOTECNIA:

Según el sistema de clasificación biofarmacéutica [109] [110], el MLX es un fármaco de clase 2, es decir, baja solubilidad – alta permeabilidad, cuyo porcentaje de absorción oral se controla mediante el porcentaje de disolución en el tracto gastrointestinal.

El MLX está disponible para uso humano en comprimidos de administración oral que contienen 7,5 o 15 mg de MLX [111] indicados para el alivio de los signos y síntomas de la osteoartritis y la artritis reumatoide [112].

Los excipientes de dichos comprimidos de MLX incluyen dióxido de silicio coloidal, crospovidona, povidona, lactosa monohidrato, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y dihidrato de citrato de sodio. [112]

En veterinaria, se emplea por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas [113]. En ratón, la dosis recomendada es de 4mg/kg en dosis única, dando niveles en plasma durante 24h pero terapéuticos sólo durante 12h [114] [115].

CONTRAINDICACIONES:

El tratamiento con MLX está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad conocida al MLX. No debe administrarse en pacientes que han reportado reacciones anafilácticas a los AINE graves o potencialmente mortales [112].

USO EN EMBARAZO:

Este medicamento tiene categoría C en su uso en embarazo.

Efectos teratogénicos: El MLX provocó un aumento de la incidencia de defecto septal del corazón, un evento raro, a una dosis oral de 60 mg/kg/día (64,5 veces la dosis humana a 15 mg/día para un adulto de 50 kg basado en la conversión de área de superficie corporal) y embrioletalidad a dosis orales \geq 5 mg/kg/día (5,4 veces la dosis humana, como se señaló anteriormente) cuando los conejos fueron tratados durante toda la organogénesis. El MLX no fue teratogénico en ratas hasta una dosis oral de 4 mg/kg/día (aproximadamente 2,2 veces la dosis humana, como se señaló anteriormente) durante toda la organogénesis. Se observó una mayor incidencia de muertes fetales cuando se administraron dosis orales en ratas \geq 1 mg/kg/día durante la organogénesis. El MLX atraviesa la barrera placentaria.

No existen estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas. El MLX debe utilizarse durante el embarazo sólo si el beneficio potencial justifica el riesgo potencial para el feto.

Efectos no teratogénicos: Debido a los efectos conocidos de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos en el sistema cardiovascular fetal (cierre del conducto arterioso persistente), durante el embarazo (especialmente al final del embarazo) debe ser evitado.

El MLX causó una reducción en el índice de natalidad, nacidos vivos, y la supervivencia neonatal a dosis orales $\geq 0,125$ mg/kg/día (aproximadamente 0,07 veces la dosis humana de 15 mg/día para un adulto de 50 kg basado en la conversión de la superficie corporal) cuando las ratas fueron tratados durante el final del periodo de gestación y lactancia. No se han realizado estudios para evaluar el efecto de MLX sobre el cierre del conducto arterioso en los seres humanos; el uso de MLX durante el tercer trimestre del embarazo debe ser evitado. [112]

LACTANCIA

No se sabe si este medicamento se excreta en la leche humana, sin embargo, el MLX se excreta en la leche de ratas lactantes a concentraciones superiores a las del plasma. Debido a que muchos fármacos se excretan en la leche humana y debido al potencial de reacciones adversas graves en los lactantes de madres medicadas con comprimidos de MLX, se deberá decidir si interrumpir la lactancia o suspender el fármaco, teniendo en cuenta la importancia del medicamento para la madre. [112]

INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS [35] [36]

- IECA: Los AINE pueden disminuir el efecto antihipertensivo de los inhibidores de la ECA.
- Aspirina: Al igual que con otros AINE, la administración concomitante de MLX y aspirina, en general no se recomienda debido a la posibilidad de aumento de los efectos adversos, ya que puede resultar en un aumento de la frecuencia de úlceras gastrointestinales u otras complicaciones. Sin embargo, se recuerda que los comprimidos de MLX no son un sustituto de la aspirina para la profilaxis cardiovascular.
- Colestiramina: El pretratamiento durante cuatro días con colestiramina aumentó significativamente el aclaramiento de MLX en un 50 %. Dando lugar a una disminución de la $t_{1/2}$, a partir de 19,2 horas a 12,5 horas, y una reducción del 35% en el AUC. Lo que sugiere la existencia de una vía de recirculación para MLX en

el tracto gastrointestinal. La relevancia clínica de esta interacción no se ha establecido.

- Furosemda: los AINE pueden reducir el efecto natriurético de la furosemda y tiazidas en algunos pacientes. Esta respuesta se ha atribuido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas renales. Los estudios con agentes furosemda y MLX no han demostrado una reducción en el efecto natriurético. La farmacodinámica y la farmacocinética de dosis únicas y múltiples furosemda no son afectadas por múltiples dosis de MLX. Sin embargo, durante el tratamiento concomitante con MLX en comprimidos, los pacientes deben ser observados de cerca para detectar signos de disminución de la insuficiencia renal, así como para asegurar la eficacia diurética.

- Litio: En un estudio realizado en sujetos sanos, la concentración media de litio antes de la dosis y el AUC se incrementaron en un 21 % en los sujetos que recibieron dosis de litio de 804 - 1072 mg dos veces al día con MLX 15 mg, una vez al día, en comparación con los sujetos que recibieron litio en monoterapia. Estos efectos se han atribuido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas renales por los comprimidos de MLX. Los pacientes en tratamiento con litio deben ser estrechamente monitorizados para detectar signos de toxicidad del litio cuando se introduce el tratamiento con MLX, llegando a reajustar las dosis o a retirarlas.

- Metotrexato: Los AINE inhiben competitivamente la acumulación de metotrexato en riñón de conejo. Esto puede mejorar la toxicidad del metotrexato. Se debe tener precaución cuando los AINE se administran de forma concomitante con metotrexato.
En un estudio realizado en 13 pacientes con artritis reumatoide (AR) se evaluaron los efectos de múltiples dosis de MLX en la farmacocinética de metotrexato tomadas una vez por semana. El MLX no tuvo un efecto significativo sobre la farmacocinética de dosis únicas de metotrexato. *In vitro*, el metotrexato no desplazó al MLX de sus sitios de unión de suero humano.

- Warfarina: Los efectos de la warfarina y los AINE sobre la hemorragia GI son sinérgicos, de manera que los usuarios de ambos fármacos juntos tienen un riesgo de grave hemorragia gastrointestinal más alto que los usuarios de cualquiera de los fármacos por separado. La actividad anticoagulante debe ser monitorizada, sobre todo en los primeros días después de iniciar o cambiar la terapia en pacientes tratados con warfarina o agentes similares, ya que estos pacientes tienen un mayor riesgo de hemorragia.
El efecto de MLX en el efecto anticoagulante de la warfarina se estudió en un grupo de sujetos sanos que recibieron dosis diarias de warfarina que produjeron un INR (International Normalized Ratio) entre 1,2 y 1,8. En estos sujetos, el MLX

no alteró la farmacocinética de warfarina y el efecto anticoagulante de la warfarina promedio. Sin embargo, un sujeto mostró un aumento en INR 1,5 - 2,1. Se debe tener precaución cuando se administren comprimidos de MLX con warfarina ya que los pacientes que toman warfarina pueden experimentar cambios en el INR y un mayor riesgo de complicaciones de sangrado cuando se introduce un nuevo medicamento.

REACCIONES ADVERSAS:

Los ensayos clínicos y datos epidemiológicos sugieren que el uso de algunos AINEs (particularmente en dosis altas y en tratamientos prolongados) puede estar asociado con un pequeño aumento del riesgo de sufrir episodios tromboarteriales (ej: infarto de miocardio o accidente cerebrovascular). Se han notificado casos de edema, hipertensión e insuficiencia cardíaca asociados al tratamiento con AINE's

Las reacciones adversas observadas con más frecuencia son de naturaleza gastrointestinal. Pueden aparecer úlceras pépticas, perforaciones o hemorragias gastrointestinales, en ocasiones mortales, particularmente en ancianos. Se han descrito casos de náuseas, vómitos, diarrea, flatulencia, estreñimiento, dispepsia, dolor abdominal, melenas, hematemesis, estomatitis ulcerativa, exacerbación de colitis y enfermedad de Crohn, después de la administración. Con menor frecuencia, se ha observado gastritis.

Las reacciones adversas han sido clasificadas en apartados de frecuencias: utilizando el siguiente convenio:

Muy frecuentes (>1/10); frecuentes (>1/100, <1/10); poco frecuentes (>1/1.000, <1/100); raras (>1/10.000, <1/1.000); muy raras (<1/10.000), desconocidas (no se pueden estimar a partir de los datos disponibles) [112]

Reacciones Adversas.

A. Trastornos de la sangre y del sistema linfático

- Poco frecuentes: anemia.
- Raras: recuento celular sanguíneo anormal (incluyendo recuento diferencial en las células blancas), leucopenia; trombocitopenia
- Se han notificado casos muy raros de agranulocitosis.

B. Trastornos en el sistema inmunológico

- Poco frecuentes: otras reacciones alérgicas no anafilácticas
- Desconocidas: reacciones anafilácticas/anafilactoides.

C. Trastornos psiquiátricos:

- Raros: alteraciones del estado de ánimo, pesadillas.
- Desconocidas: estado de confusión, desorientación

D. Trastornos del sistema nervioso

- Frecuentes: cefaleas.
- Poco frecuentes: mareos, somnolencia.

E. Trastornos oculares

Raros: alteraciones visuales incluyendo visión borrosa, conjuntivitis

F. Trastornos del oído y del laberinto

- Poco frecuentes: vértigo
- Raros: tinnitus

G. Trastornos cardiacos

Raros: palpitaciones.

Se ha notificado insuficiencia renal asociada al tratamiento con AINES

H. Trastornos vasculares

Poco frecuentes: presión arterial aumentada, sofocos.

I. Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos

Raros: asma en determinados pacientes alérgicos al ácido acetilsalicílico y a otros AINEs.

J. Trastornos gastrointestinales

- Muy frecuentes: dispepsia, náuseas, vómitos, dolores abdominales, estreñimiento, flatulencia, diarrea.
- Poco frecuentes: hemorragias gastrointestinales oculta o macroscópica, hemorragia, estomatitis, gastritis, eructos.
- Raras: colitis, úlcera gastroduodenal, esofagitis
- Muy raras: perforación gastrointestinal
- La hemorragia gastrointestinal, la ulceración o perforación pueden ser graves, potencialmente mortales, especialmente en pacientes ancianos.

K. Trastornos hepatobiliares

- Poco frecuentes: alteraciones función hepática (p. ej. elevación de las transaminasas o de la bilirrubina).
- Muy raros: Hepatitis.

L. Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo

- Poco frecuentes: angioedema, prurito, rash.
- Raras: Reacciones adversas cutáneas graves: se han notificado Síndrome de Stevens-Johnson y necrosis epidérmica tóxica, urticaria
- Muy raras: dermatitis bullosa, eritema multiforme
- Desconocidas: reacciones de fotosensibilidad.

M. Trastornos renales y urinarios

- Poco frecuentes: retención de sodio y agua, hipercalemia, test anormal de la función renal (aumento de creatinina y/o urea en suero)
- Muy raras: fallo renal agudo en pacientes particulares con factores de riesgo

N. Trastornos generales y condiciones en el punto de administración

Poco frecuentes: Edema incluyendo edema de los miembros inferiores.

O. Información sobre reacciones adversas graves de carácter individual y/o de ocurrencia frecuente.

Se han notificado casos muy raros de agranulocitosis en pacientes tratados con MLX y otros medicamentos potencialmente mielotóxicos

P. Reacciones adversas que no han sido observadas todavía en relación con el medicamento pero que se aceptan generalmente por haber sido atribuidas a compuestos de la misma clase.

Daño renal orgánico probablemente derivando en insuficiencia renal aguda: se han notificado casos muy raros de nefritis intersticial, necrosis tubular aguda, síndrome nefrótico y necrosis papilar

PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS:

Desde el punto de vista farmacocinético, el MLX se caracteriza por una absorción algo lenta, aunque sea completa tras la administración oral. Alcanza su concentración máxima plasmática en 2 – 4h. Los antiácidos y alimentos no modifican la rapidez ni la magnitud de su absorción.

Su biodisponibilidad por vía oral es del 89% y su toma es de 5-6 horas, sufre metabolismo oxidativo hepático, con importante recirculación entero-hepática, lo que le da una semivida prolongada (20 – 50h, con variaciones interpersonales).

Se une de manera extensa a las proteínas plasmáticas (99%) y se distribuye al líquido sinovial, donde alcanza el 50% de la concentración plasmática, aproximadamente (aunque después de 7-12 días, las concentraciones son aprox. iguales en plasma y líquido sinovial). La principal transformación metabólica es la hidroxilación, mediada por citocromo P-450, y la glucuronidación, de forma que sólo el 5 – 10 % se excreta por orina y heces sin metabolizar.

Dosis altas de MLX en humanos (22,5mg diarios) se han asociado con un aumento del riesgo de eventos gastrointestinales graves, por lo que la dosis diaria de MLX no debe exceder los 15mg.

a. ABSORCIÓN:

La biodisponibilidad absoluta de los comprimidos de MLX [112] fue del 89 % después de una dosis única vía oral de 30 mg en comparación con 30 mg por

inyección i.v. Después de dosis intravenosas únicas, se muestra una farmacocinética proporcional a la dosis en el intervalo de 5 mg a 60 mg. Después de múltiples dosis orales la farmacocinética de los comprimidos de MLX era proporcional a la dosis en el intervalo de 7,5 mg a 15 mg. La concentración máxima (C_{max}) se alcanzó a las cuatro o cinco horas después de la administración de un comprimido de 7,5 mg de MLX en condiciones de ayuno, lo que indica una absorción prolongada del fármaco. Con dosis múltiples, las concentraciones en estado estacionario se alcanzaron en el día 5. Un segundo pico de concentración de MLX se produce alrededor de 12 a 14 horas tras la administración de la dosis, lo que sugiere el reciclaje biliar. [105] [108].

La administración de MLX tras alimentación rica en grasas incrementa un 22 % la C_{max} , mientras que la absorción (AUC) se mantiene sin cambios. Obteniendo un T_{max} de 5 – 6 horas. No se detectó interacción farmacocinética con la administración concomitante de antiácidos.

b. DISTRIBUCIÓN:

El volumen medio de distribución (V_{ss}) de MLX es de aproximadamente 10 L. El MLX se fija a las proteínas plasmáticas humanas, principalmente albúmina, en aproximadamente un 99,4 %, dentro del rango de dosis terapéuticas. La fracción unida a proteína es independiente de la concentración de fármaco, en el intervalo de concentración relevante en clínica; pero disminuye en pacientes con enfermedad renal.

Las mayores concentraciones de MLX se encuentran en hígado y riñón. Se detectan concentraciones comparativamente bajas en músculo esquelético y en grasa.

Tras la administración oral, en sangre se encuentra menos del 10 % del MLX administrado, como MLX libre en un 90 %.

Las concentraciones de MLX en el líquido sinovial, tras una dosis oral única, son del 40 – 50 % de las del plasma. La fracción libre en el líquido sinovial es 2,5 veces mayor que en plasma debido al menor contenido de albúmina.

c. METABOLISMO

El MLX se metaboliza casi completamente en cuatro metabolitos farmacológicamente inactivos. El principal metabolito, el Meloxicam-5'-carboxi (60 %) se forma por oxidación de un metabolito intermedio, el Meloxicam-5'-hidroximetil (9 %) mediado por el citocromo P450 con sus isozimas 2C9 y 3A4.

MLX se encuentra predominantemente en el plasma. En bovino, MLX es asimismo el producto mayoritario de excreción en la leche y la bilis, mientras que la orina contiene solamente trazas del compuesto inalterado.

En cerdos, la bilis y la orina contienen solamente trazas del compuesto inalterado.

d. ELIMINACIÓN:

La excreción del MLX se realiza predominantemente en forma de metabolitos, y se da de forma similar en orina y heces. El compuesto original, sin cambios, se excreta en trazas en orina (0,2 %) y heces (1,6 %).

La semivida de eliminación ($t_{1/2}$) oscila entre 15 y 20 horas. La vida media de eliminación es constante a través de las distintas dosis, lo que indica un metabolismo lineal dentro del rango de dosis terapéuticas.

El aclaramiento plasmático varía de 7 a 9 ml/min.

Metolose®

Metolose® (Metolose® 90 SH 100 (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japón), un éter de celulosa soluble en agua (lote 41003).



Figura 10: Bote y detalle de polvo Metolose® 90SH 100 empleado en algunas de las formulaciones. Fuente Eva Navarro Ruiz

Metolose® puede ser utilizado como aglutinante de formas farmacéuticas sólidas como comprimidos o granulados. Además, agrega multitud de funciones como retención de agua, espesor, coloide protector y liberación sostenida, entre otras, y está reconocido como una fibra no digerible.

Metolose® está compuesto por metilcelulosa (MC USP) y tres tipos de sustitución de hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa USP o HPMC), cada una disponible en distintos grados diferentes según su viscosidad. [116]

Es un éter de celulosa soluble en agua derivado de pulpa de celulosa. Para producirlo, la pulpa se trata con sosa cáustica para obtener una celulosa alcalina que se eterifica con

clorometano o con una combinación de clorometano y óxido de propileno a alta temperatura (**Figura 11**).

La celulosa no es soluble en agua debido a su estructura cristalina con fuertes uniones de hidrógeno intermoleculares. Cuando los átomos de hidrógeno de algunos de los grupos OH son sustituidos por grupos metilo o hidroxipropilo, los grupos metoxi e hidroxipropoxi resultantes interfieren con las uniones intermoleculares haciendo que las cadenas de polímero no estén unidas de forma tan potente entre ellas. Esto permite que el agua penetre en los espacios intermoleculares de la celulosa y el polímero se vuelve soluble en agua. Ésta es la razón por la que el Metolose® es soluble en agua mientras que la pulpa, fuente del Metolose®, no lo es.

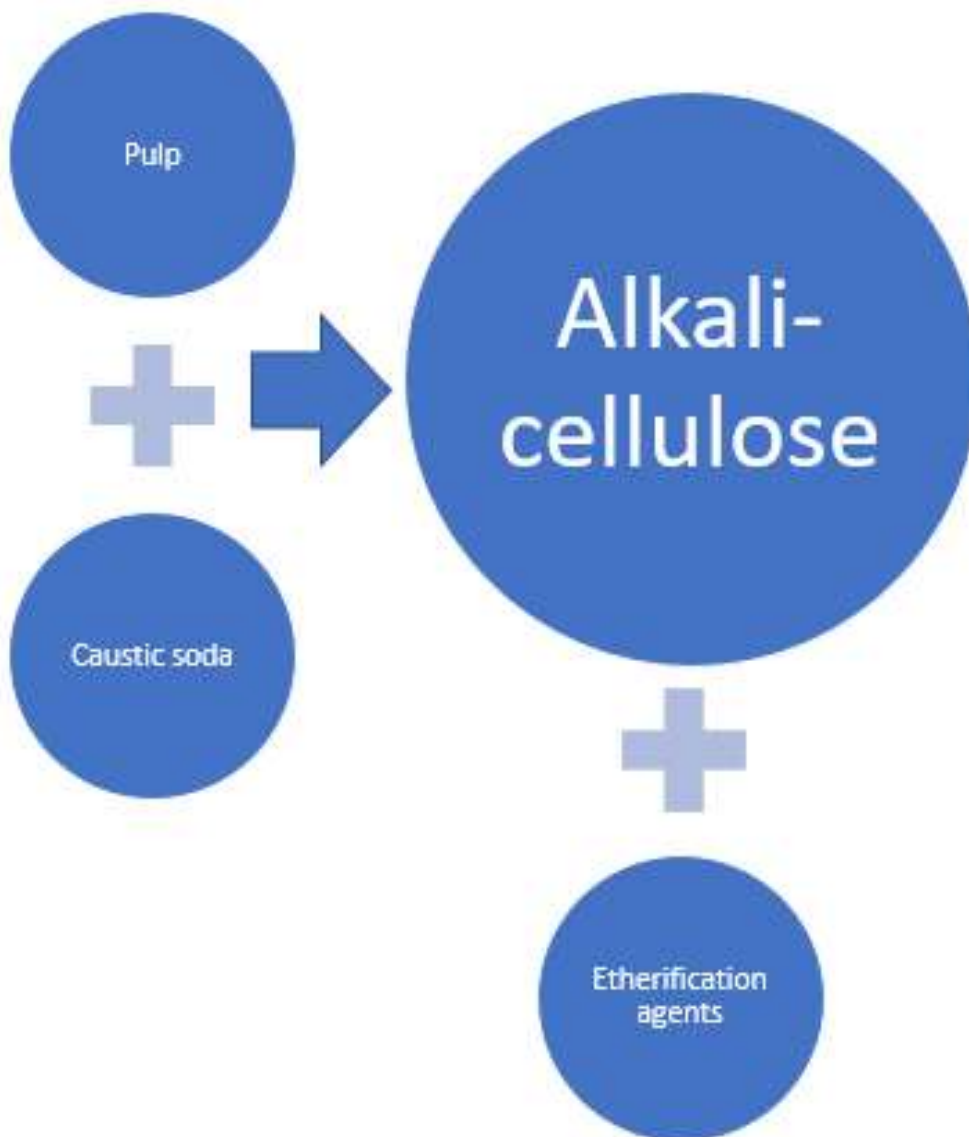


Figura 11: Diagrama de flujo de la producción de Metolose® [116]

Metolose® existe en muchos tipos con distintos niveles y formas de sustitución. Los tipos disponibles más frecuentes son SM, 60SH, 65SH y 90SH, el utilizado en esta investigación. Cada tipo de Metolose® se puede seleccionar en un amplio grado de viscosidades, como se ve en la siguiente tabla (**Tabla 2**):

Tabla 2: Tipos de Metolose® [116]

METOLOSE Methylcellulose / Hypromellose –Thickening agent							
Description	Grade	Labeled viscosity (mPa·s)	Methoxy (%)	Hydroxy-propoxy (%)	Thermal-gelation point(°C)	Mean particle size (µm)	Typical application
Methylcellulose USP Methylcellulose PhEur Methylcellulose JP	SM-4	4	29	—	55	70	Granule coating (less sticky)
	SM-15	15					Thickening agent Bulk laxative
	SM-25	25					
	SM-100	100					
	SM-400	400					
	SM-1500	1500					
SM-4000	4000						
Hypromellose USP (Substitution type 2910) Hypromellose PhEur (Substitution type 2910) Hypromellose JP (Substitution type 2910)	60SH-50 60SH-4000 60SH-10000	50 4000 10000	29	9	75	70	Thickening agent
Hypromellose USP (Substitution type 2906) Hypromellose PhEur (Substitution type 2906) Hypromellose JP (Substitution type 2906)	65SH50 65SH-400 65SH-4000	50 400 4000	29	7	75		Thickening agent
Hypromellose USP (Substitution type 2208) Hypromellose PhEur (Substitution type 2208) Hypromellose JP (Substitution type 2208)	90SH-4000 90SH-15000 90SH-100000	4000 15000 100000	23	8	85		Thickening agent

Características del Metolose® [116]:

1. Inodoro e insípido:
Metolose® es un polvo fibroso o granular, de color blanco a blanco brillante, prácticamente sin olor y sin sabor.
2. Bajo contenido en cenizas:
Como Metolose® es un compuesto orgánico no iónico, puede ser completamente quemado bajo las condiciones apropiadas. Puede también ser purificado de forma efectiva lavándose, por lo que su contenido en ceniza es muy bajo
3. Espesante soluble en agua:
A pesar de que el Metolose® es insoluble en agua caliente, es soluble en agua fría, dando una solución transparente y viscosa.
4. Precipitación térmica:
Una solución acuosa de gel Metolose® forma precipitados cuando se calienta a una cierta temperatura, pero revierte a la solución transparente cuando se enfría de nuevo, la temperatura de precipitación térmica depende del tipo de sustitución, la concentración y el rango de temperatura.
5. Resistente a la sal:

Metolose® no es iónico (no es un polielectrolito). Una solución acuosa de Metolose® es relativamente estable en presencia de sales inorgánicas o electrolitos orgánicos. Sin embargo, cuando la concentración de electrolitos supera un cierto límite, se puede producir su precipitación.

6. Estable en un amplio rango de pH:

La viscosidad de la solución de Metolose® no se ve afectada a penas por ácidos o bases, y es estable a un rango de pH 3,0 – 11. Sin embargo, la viscosidad tiende a disminuir durante un almacenamiento prolongado de la solución bajo condiciones ácidas o alcalinas.

7. Soluble en algunos solventes orgánicos:

Debido a la presencia de sus grupos metoxil y hidroxipropoxil relativamente hidrofóbicos, Metolose® es soluble en algunos solventes orgánicos y en mezclas de agua con estos.

8. Superficie activa:

Una solución acuosa de Metolose® tiene una gran superficie activa y funciones como agente coloidal protector y estabilizante para emulsiones, suspensiones o espumas.

9. Formación de película:

Metolose® aporta películas / films fuertes, flexibles y transparentes con buenas propiedades barrera contra aceites.

Propiedades del polvo:

- Apariencia: Polvo blanco o blanco brillante, fibroso o granular
- Densidad real: 1,26 – 1,31 g/ml
- Densidad aparente: 0,20 – 0,45 g/ml
- Densidad golpeada: 0,35 – 0,60 g/ml
- Ángulo de reposo 35 – 50º
- Temperatura de degradación: 280 – 300ºC
- Temperatura de auto ignición: aproximadamente 360ºC
- Higroscopicidad: dependiente del grado de sustitución

Aplicaciones de Metolose®:

- Retención de agua: Previene la pérdida y la evaporación de agua
- Fármacos en gel: Puede combinarse con otros polímeros sintéticos o agentes gelatinizantes para prevenir la separación de agua o alcohol de una formulación en gel
- Cataplasmas: Espesa la base de las cataplasmas mejorando su funcionalidad
- Fármacos en suspensión: Estabiliza las suspensiones
- **Comprimidos de liberación prolongada:** la propiedad de formar hidrogeles se puede utilizar para retrasar la liberación de los principios activos de los comprimidos. Para esto se utilizan principalmente los Metolose® SH.
- Complementos dietéticos: Es un polímero no digerible
- Cápsulas: Es un componente básico en las cápsulas de celulosa

Lactosa

Se utilizó lactosa monohidrato de calidad farmacéutica o superior (lote 8504090561) suministrado por Fagron® (Barcelona España).

La lactosa monohidrato (lactosum monohydricum) o O-β-D-Galactopiranosil(1→4)-α-D-glucopiranososa monohidrato [105] tiene como fórmula empírica $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, y su peso molecular es 360,31 g/mol.

Lactosum monohydricum

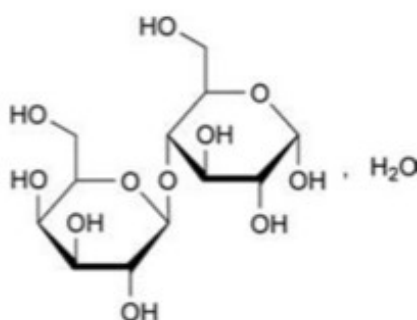


Figura 12: Estructura química de la lactosa monohidrato [105]

Es un polvo cristalino blanco o casi blanco. Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol (96 %).

Aplicaciones en formulaciones y tecnología farmacéutica:

La lactosa es ampliamente utilizada como relleno y diluyente en comprimidos y cápsulas, y en una medida más limitada en productos liofilizados y formulaciones pediátricas. La lactosa también se utiliza como diluyente en inhalaciones de polvo seco. [117]

Hay varios grados de lactosa disponibles comercialmente con diferentes propiedades físicas como la distribución del tamaño de partícula y las características de flujo. Estas diferencias permiten la selección del material más adecuado según su aplicación; por ejemplo, el rango de tamaño de partícula seleccionado para las cápsulas a menudo depende del tipo de máquina encapsuladora utilizada. Por lo general, los grados finos de lactosa se utilizan en la preparación de comprimidos por el método de granulación húmeda o cuando se tamiza durante el procesamiento, ya que el tamaño fino permite una mejor mezcla con los otros componentes de la formulación y utiliza el aglutinante de manera más eficiente. [117]

Otras aplicaciones de la lactosa incluyen el uso en productos liofilizados, donde se añade lactosa a las soluciones liofilizadas para aumentar el área superficial y ayudar a la cohesión. La lactosa también se utiliza en combinación con sacarosa (aproximadamente 1:3) para preparar soluciones de recubrimiento con azúcar. También puede ser utilizado

en inyecciones intravenosas. La lactosa también se utiliza en la fabricación de formulaciones de polvo seco para su uso como soluciones acuosas de recubrimiento de película.

Los grados de lactosa monohidrato de compresión directa están disponibles como granulado/aglomerado α -lactosa monohidrato, conteniendo pequeñas cantidades de lactosa anhidra. Las calidades de compresión directa se utilizan a menudo para contener cantidades pequeñas de principio activo, permitiendo hacer comprimidos sin granular. Otras lactosas de compresión directa son la lactosa anhidra y la lactosa obtenida por spray-drying. [117]

Descripción:

En estado sólido, la lactosa aparece como varias formas isoméricas, dependiendo de las condiciones de cristalización y secado, es decir, α -lactosa monohidrato, β -lactosa anhidra, y α -lactosa anhidra.

Las formas cristalinas estables de lactosa son la lactosa monohidrato, β -lactosa anhidra, y α -lactosa anhidra.

La lactosa se presenta como partículas cristalinas en polvo de blancas a blanquecinas. La lactosa es inodora y de sabor ligeramente dulce; la α -lactosa es aproximadamente un 20 % tan dulce como la sacarosa, mientras que la β -lactosa es aproximadamente un 40 % dulce.

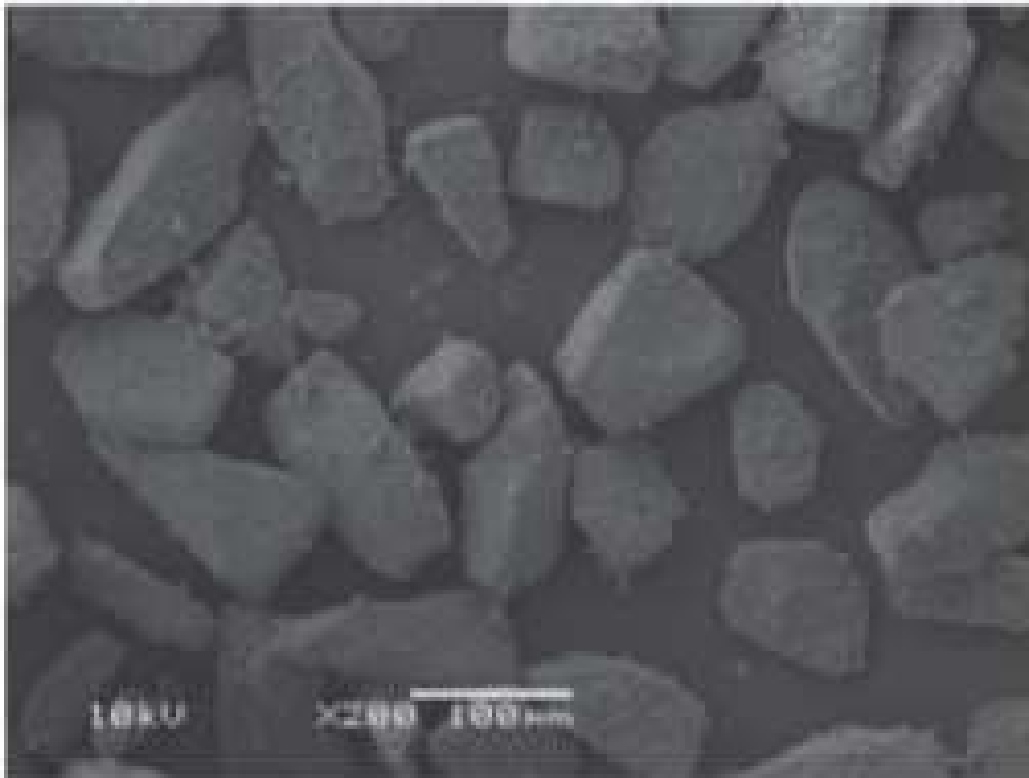


Figura 133: Microfotografía SEM de cristales de lactosa Lactochem de Friesland Foods Domo a 200X y 10 kV de voltaje [117]

Propiedades típicas [117]:

Índice de fractura: 0,0749 a presión de compresión 189,5 MPa y 0,0883 a presión de compresión de 191,0 MPa.

Índice de unión: 0,0081 a presión de compresión 189,5 MPa y 0,0052 a presión de compresión de 191,0 MPa.

Densidad 1,545 g/ml (α -lactosa monohidrato) y densidad aparente dependiente de la variedad comercializada de lactosa (**Tabla 3**)

Tabla 3: Tabla de propiedades físicas típicas de varios de los diferentes tipos de lactosa monohidrato comercialmente disponibles [117]

Supplier/grade	Density (bulk) (g/cm ³)	Density (tapped) (g/cm ³)	Water content (%)
DMV-Fonterra Excipients			
Pharmatose 50M	0.70	0.82	—
Pharmatose 60M	0.80	0.98	—
Pharmatose 70M	0.81	1.02	—
Pharmatose 80M	0.75	0.92	—
Pharmatose 90M	0.72	0.90	—
Pharmatose 100M	0.73	0.88	—
Pharmatose 110M	0.72	0.88	—
Pharmatose 125M	0.68	0.85	—
Pharmatose 130M	0.65	0.96	—
Pharmatose 150M	0.62	0.90	—
Pharmatose 200M	0.57	0.84	—
Pharmatose 350M	0.54	0.80	—
Pharmatose 450M	0.48	0.74	—
SuperTab 30GR	0.53	0.66	—
Friesland Foods Domo			
Lactochem Coarse Crystals	0.75	0.88	—
Lactochem Crystals	0.74	0.86	—
Lactochem Fine Crystals	0.73	0.85	—
Lactochem Extra Fine Crystals	0.73	0.86	—
Lactochem Coarse Powder	0.71	0.95	—
Lactochem Regular Powder	0.62	0.92	—
Lactochem Powder	0.64	0.89	—
Lactochem Fine Powder	0.61	0.84	—
Lactochem Extra Fine Powder	0.45	0.74	—
Lactochem Super Fine Powder	0.47	0.74	—
Meggle GmbH			
Capsulac 60	0.59	0.70	5.2
Granulac 70	0.72	0.90	5.2
Granulac 140	0.66	0.89	5.2
Granulac 200	0.54	0.80	5.2
Granulac 230	0.47	0.76	5.2
Primalac 40	0.47	0.54	5.2
Sachelac 80	0.60	0.71	5.2
Sorbolac 400	0.36	0.78	5.2
Spherolac 100	0.69	0.84	5.2
Tabletose 70	0.51	0.62	5.2
Tabletose 80	0.57	0.72	5.2
Tabletose 100	0.54	0.74	5.2
Sheffield Pharma Ingredients			
Monohydrate 80M	0.66	0.92	4.8-5.2
Monohydrate Impalpable	0.53	0.81	4.8-5.2

Estabilidad y condiciones de almacenaje:

Almacenado en condiciones de humedad superiores al 80% de humedad relativa, puede dar crecimiento de moho. Además, durante su almacenaje, puede desarrollar una coloración marrón, que se puede acelerar en condiciones de calor. La pureza de las distintas lactosas puede variar la evaluación de color, lo que puede ser importante en la formulación de comprimidos blancos.

La lactosa debe almacenarse en un lugar frío y seco, en un recipiente bien cerrado.

Incompatibilidades:

Se puede dar reacción de Maillard entre la lactosa y compuestos con un grupo amino primario, dando productos coloreados de amarillo o pardos. También se ha observado que esta reacción puede darse con aminos secundarios, parándose en la formación de la imina, sin coloración amarillo-parduzca.

La lactosa es también incompatible con aminoácidos, anfetaminas y lisinopril.

Seguridad:

La lactosa es ampliamente utilizada en formulaciones farmacéuticas como aglutinante y diluyente en formulaciones orales de cápsulas y comprimidos. También puede ser utilizado en inyecciones intravenosas. Las reacciones adversas a la lactosa se atribuyen en gran medida a la intolerancia a la lactosa, que ocurre en individuos con una deficiencia de la enzima intestinal lactasa [118] [119] [120] [121]. Esto provoca que no se pueda digerir la lactosa y puede conducir a calambres, diarrea, distensión y flatulencia. En individuos tolerantes a la lactosa, la lactasa hidroliza la lactosa en el intestino delgado a la glucosa y la galactosa, que luego se absorben. Los niveles de lactasa son normalmente altos al nacer, disminuyendo rápidamente en la primera infancia. La malabsorción de lactosa (hipolactasia) puede ocurrir a una edad temprana (4-8 años) y varía entre diferentes grupos étnicos. La lactosa se excreta sin cambios cuando se administra por vía intravenosa.

Los síntomas de la intolerancia a la lactosa son causados por el efecto de la lactosa no absorbida, que aumenta los niveles de agua y el sodio en el lumen. La lactosa no absorbida, al llegar al colon, y puede ser fermentada por la flora colónica, produciendo gas, que causa distensión abdominal y malestar.

La mayoría de los adultos consumen alrededor de 25 g de lactosa al día (500 ml de leche) sin síntomas [121]. Cuando aparecen los síntomas, por lo general son leves y dosis dependiente. La dosis de lactosa en la mayoría de los productos farmacéuticos rara vez supera los 2 g por día. Es poco probable que síntomas gastrointestinales graves pueden atribuirse a la lactosa en una forma convencional de dosificación sólida oral, especialmente en adultos que no han sido diagnosticados previamente con intolerancia grave a la lactosa.

Eudragit®

El Eudragit® utilizado es Eudragit® RS 30D, Eudragit® FS 30D y Eudragit® NM 30D, cortesía de Evonik Röhm, D (Alemania). Es una dispersión acuosa de un copolímero de etil acrilato y metil metacrilato.



Figura 14: Frascos de Eudragit® RS 30D, FS 30D y NM 30D con los que se trabajó para el desarrollo de esta tesis.
Fuente Eva Navarro Ruíz.

Los polímeros Eudragit® se pueden utilizar individualmente o en combinación para adaptarse prácticamente a cualquier perfil de liberación objetivo, incluida la liberación inmediata, retardada, sostenida, pulsante, acelerada y de orden cero. Las opciones estándar por capa de recubrimiento incluyen el uso de un único polímero Eudragit®, o una combinación de polímeros Eudragit® o con otros polímeros, así como otros excipientes orales y sustancias farmacológicas.

Los polímeros de liberación entérica Eudragit® ayudan a evitar la irritación de la mucosa gástrica durante el tránsito gastro-intestinal de ciertos medicamentos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). También tienen excelentes propiedades gastrorresistentes para evitar la degradación de las sustancias activas (API) sensibles al ácido, como enzimas, péptidos o inhibidores de la bomba de proteínas en el estómago [122].

Los polímeros Eudragit® para su liberación entérica se pueden combinar fácilmente entre sí, o con otros polímeros, para lograr un perfil de liberación específico para una

disolución rápida basada en el pH de un sitio objetivo como el intestino delgado superior a medio o el colon. Se suministran como dispersiones acuosas (30 % p/w), soluciones orgánicas o polvos finos, varios grados de polímero EUDRAGIT® L, S, FS y FL están disponibles con propiedades de disolución entre pH 5.5 y 7.0. Los polímeros para liberación entérica de Eudragit® también se pueden utilizar para desarrollar formulaciones de liberación modificadas con funcionalidades adicionales como la resistencia al alcohol, el enmascaramiento del sabor o la administración oral de productos biológicos [122].

Los polímeros para liberación entérica Eudragit® tienen aplicación en una amplia gama de formas de dosificación sólida oral. Al ser totalmente sintéticos, los polímeros Eudragit® proporcionan características de producto altamente estables en rangos de especificaciones estrechas. Todas las tecnologías de procesamiento farmacéutico comunes se pueden utilizar en función del grado de polímero específico, incluyendo recubrimiento de película acuosa y orgánica, extrusión de fusión en caliente, spray-drying, compresión directa y granulación. El procesamiento se puede hacer a temperaturas de producto bajas a moderadas para ayudar a reducir el consumo de energía y minimizar el estrés térmico para el principio activo [122].

Evonik® tiene un sólido historial comercial en el desarrollo de recubrimientos funcionales de liberación sostenida (**Figura 15**). Una amplia gama de polímeros EUDRAGIT® proporcionan liberación sostenida de fármacos tiempo - dependiente. Estos se pueden combinar fácilmente con otros polímeros Eudragit® así como otros polímeros o tecnologías de administración de medicamentos para controlar la tasa de liberación sostenida durante una duración específica [122].

Existe en el mercado una amplia variedad de polímeros Eudragit® para liberación sostenida: gránulos, polvos, dispersiones acuosas, como las utilizadas en esta investigación, o soluciones orgánicas. Todos son insolubles, e independientes del pH. Los polímeros Eudragit® RL con alta permeabilidad y los polímeros Eudragit® RS con baja permeabilidad se utilizan a menudo en combinación en diferentes proporciones para crear la permeabilidad objetivo-específica y, por lo tanto, la tasa deseada de absorción intestinal. El Eudragit® NM 30 D, neutro, con baja permeabilidad es otra opción atractiva, ya que se puede formular con todos los principios activos sin importar la carga iónica que tengan y en caso de que se requieran películas altamente flexibles, por eso fue uno de los tipos seleccionados para esta investigación.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron Eudragit® RS 30D, Eudragit® FS 30D y Eudragit® NM 30D, tanto solos como en combinaciones binarias siempre conteniendo el FS en la capa exterior.

TAKE CONTROL OF YOUR RELEASE PROFILE WITH EUDRAGIT®

IMMEDIATE RELEASE:

- Taste and odor masking, high and moisture protection
- Swallowability improvement
- Soluble in gastric fluid up to pH 5.0
- Swellable and permeable above pH 5.0
- Low viscosity
- High pigment binding capacity
- Excellent adhesion
- High effectiveness in film coatings

EUDRAGIT® E 100	Granules
EUDRAGIT® E 12,5	Organic solution
EUDRAGIT® E PO	Powder
EUDRAGIT® E PO ReadyMix	Powder

DELAYED RELEASE:

- Easily combined to achieve a specific dissolution pH
- Highly stable, with rapid dissolution for precise targeting
- Well-defined characteristics to safeguard the gastric mucosa from aggressive actives
- Able to protect the transit of APIs sensitive to gastric fluid

Small Intestine:

EUDRAGIT® L 30 D-55	Aqueous dispersion	soluble above pH 5.5
EUDRAGIT® L 100-55	Powder	soluble above pH 5.5
EUDRAGIT® FL 30 D-55	Aqueous dispersion	soluble above pH 5.5
EUDRAGIT® L 100	Powder	soluble above pH 6.0
EUDRAGIT® L 12,5	Organic solution	soluble above pH 6.0

Value-adding products:
PLASACRYL® HTP20
 Easy-to-use grafted and plasticizer premix, specifically designed for EUDRAGIT® L 30 D-55 formulations

Colonic delivery:

EUDRAGIT® S 100	Powder	soluble above pH 7.0
EUDRAGIT® S 12,5	Organic solution	soluble above pH 7.0
EUDRAGIT® FS 30 D	Aqueous dispersion	soluble above pH 7.0
EUDRAGIT® FS 100	Powder	soluble above pH 7.0

Value-adding products:
PLASACRYL® T20
 Easy-to-use grafted and plasticizer premix, specifically designed for EUDRAGIT® FS 30 D formulations

Monographs and DMFs are available for all EUDRAGIT® polymers upon request.

SUSTAINED RELEASE:

- Multiple combination options to control delivery throughout the GI tract
- Solutions for once-per-day dosing, pulsatile release and other custom profiles
- Insoluble with pH-independent permeability
- Flexible options for high or low permeability

EUDRAGIT® RL PO	Powder
EUDRAGIT® RL 100	Granules
EUDRAGIT® RL 30 D	Aqueous dispersion
EUDRAGIT® RL 12,5	Organic solution

- Insoluble, high permeability, pH-independent swelling
- Customized release profiles by combining with EUDRAGIT® RS at different ratios

EUDRAGIT® RS PO	Powder
EUDRAGIT® RS 100	Granules
EUDRAGIT® RS 30 D	Aqueous dispersion
EUDRAGIT® RS 12,5	Organic solution

- Insoluble, low permeability, pH-independent swelling
- Customized release profiles by combining with EUDRAGIT® RL at different ratios

EUDRAGIT® NM 30 D	Aqueous dispersion
-------------------	--------------------

- Insoluble, low permeability, pH-independent swelling
- Highly flexible, suitable as matrix formers

SOLUBILITY AND BIOAVAILABILITY ENHANCEMENT

- Polymer, process technology and formulation solutions
- Specialized in solid dispersion, API and silica technologies
- Well-defined processing characteristics for spray drying and hot melt extrusion
- Robust thermoplastic properties
- Broad miscibility with APIs and excipients
- Down-streaming and further processing options
- Predictive systems to select lead carrier excipients and process parameters for etabs

Immediate Release	Colon Targeting	Delayed Release
EUDRAGIT® E 100	EUDRAGIT® FS 100	EUDRAGIT® L 100
EUDRAGIT® E PO	EUDRAGIT® S 100	EUDRAGIT® L 100-55
EUDRAGIT® E 12,5		EUDRAGIT® L 12,5

Chemical® for equipment cleaning

- Customized divergences for EUDRAGIT® RL, RS, NE, NM, L, FL, FS and S
- Suitable for WP, CP and manual processes
- Highest cleaning efficiency
- Fast and safe cleaning process

Figura 15: Tipos de Eudragit® y su utilidad según la zona del tracto gastrointestinal donde se desee la liberación [122]

Reactivos y materiales auxiliares [105]

Etanol

El etanol o alcohol etílico es un líquido incoloro e inflamable con una temperatura de ebullición de 78,4 °C. Es miscible en agua en cualquier proporción. El utilizado es de calidad farmacéutica o superior.

Su fórmula química semidesarrollada es CH₃-CH₂-OH (C₂H₆O).

El etanol utilizado se obtuvo de Panreac® Química S.A., Barcelona.

Acetonitrilo

El acetonitrilo es un líquido incoloro, de fórmula CH₃CN. Es un disolvente polar miscible en agua, acetona y metanol. Su baja viscosidad y reactividad química le hacen un buen disolvente para la cromatografía líquida. Cuando se utiliza en espectrofotometría debe presentar un máximo de absorción de 0,01 desde 255 nm a 420 nm de longitud de onda [105].

El acetonitrilo utilizado se obtuvo de Panreac® Química S.A., Barcelona.

Fase móvil

Se utilizó una fase móvil compuesta por Ácido acético 2%: Acetonitrilo 50:50 [123]

Carboximetilcelulosa (CMC)

La carboximetilcelulosa sódica (CMC), también denominada carmelosa sódica, empleada es de baja sustitución (Fagron®, Barcelona España), conteniendo según la farmacopea europea [105] de un 2,0% a un 4,5% de sodio (NA) (sustancia seca).

Su apariencia es de fibras cortas o polvo blanco o casi blanco. Sin olor ni sabor, pero con alto poder higroscópico. [124]

Es prácticamente insoluble en acetona, etanol anhidro y tolueno [105].

La celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa sódica se utilizan para producir geles tixotrópicos que se utilizan como vehículos en suspensiones farmacéuticas y cosméticas. La carboximetilcelulosa sódica ayuda a la dispersión y sirve como coloide protector. En concentraciones menores al 1 % produce dispersiones de sólidos, mientras que en concentraciones superiores al 1,2 % produce geles tixotrópicos. Cuando se dispersa correctamente, da a la suspensión estabilidad y opacidad. Se utiliza en aerosoles nasales, aerosoles y lociones tópicas, suspensiones orales, emulsiones, cremas y geles [124].

La carboximetilcelulosa sódica es higroscópica, por lo que no debe exponerse a la humedad. Es estable en un rango de pH de 3,5 – 11. Debe conservarse en un lugar fresco y seco, evitando su exposición al calor excesivo. La carboximetilcelulosa es incompatible con agentes oxidantes fuertes [124].

La carboximetilcelulosa sódica se utiliza en una amplia gama de formulaciones farmacéuticas y tiene baja toxicidad oral, dérmica e inhalada. No es irritante para los ojos ni la piel, y no es sensibilizante. No se esperan efectos toxicológicos agudos significativos al trabajar con este excipiente [124].

En esta investigación se empleó por su **capacidad de hincharse en medio acuoso para formar geles**, ya que fue empleado al 1 % en un tampón de pH 4,5 como vehículo para facilitar la dispersión de los granulados que se administraron en los ensayos *in vivo*.

Agua purificada calidad HPLC [125]

Es agua desionizada MiliQ® utilizada como solvente.

Suero salino [126]

El suero salino empleado fue suero salino NaCl al 0,9 % de calidad farmacéutica o superior.

En esta investigación se utilizó para ayudar en la **homogeneización de las muestras biológicas** de los estudios *in vivo*.

Solución madre de MLX

Se prepararon soluciones madre de MLX para realizar la recta de calibrado en el espectrofotómetro, disolviendo 20 mg de MLX en 30ml de etanol y enrasando en un matraz aforado hasta 50 ml con tampón al pH correspondiente al que se quisiera hacer la recta de calibrado.

Disoluciones tampón [127]:

Tampón pH 1,2

El tampón pH 1,2 se obtuvo preparando una solución de HCl 0,1 N, para lo que se añadieron 41,40 ml de HCl al 37 % de riqueza en un matraz de 5 L para enrasar seguidamente con agua purificada.

Tampón pH 4,5

El tampón de pH 4,5 se preparó en un matraz aforado de 5 L de capacidad, con 14,95 g de acetato de sodio y 8,49 ml de ácido acético glacial, disolviendo y enrasando después con agua purificada.

Tampón pH 6,8

El tampón de pH 6,8 se preparó con KH_2PO_4 , pesando 6,81 g por cada litro de solución a preparar, y enrasando con agua purificada en un matraz aforado al volumen que se quisiera obtener.

Tampón pH 7,4

El tampón de pH 7,4 se obtuvo pesando 34,03 g de KH_2PO_4 y 7,82 g de NaOH por cada 5L de solución a preparar y enrasando con agua purificada al volumen correspondiente.

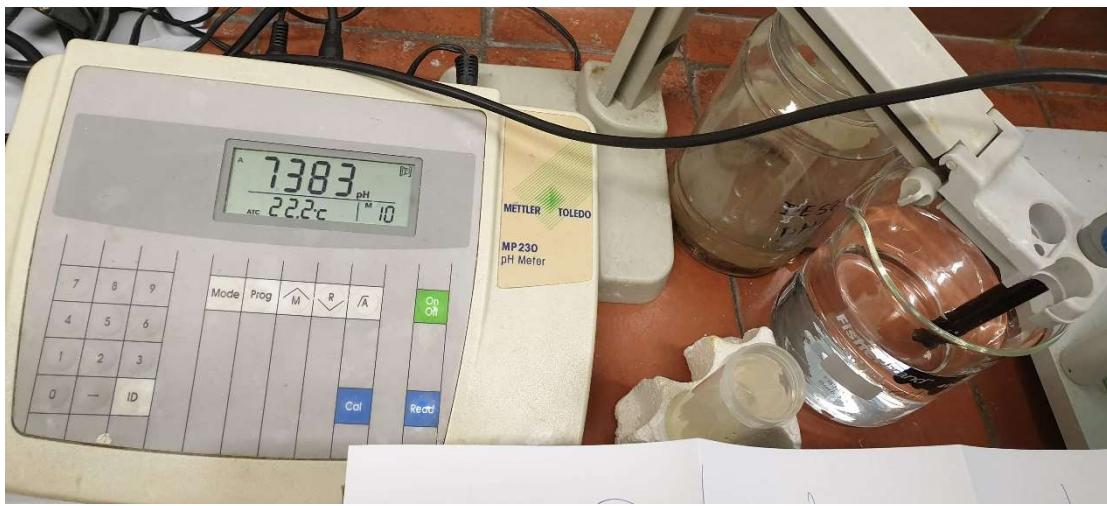


Figura 16: Lectura de pH-metro de un tampón realizado durante el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruíz.

Instrumental

- Agitador magnético-calefactor (Velp científica[®], Alemania).
- Balanza Mettler[®] AG 104 (Mettler-Toledo GmbH, Suiza)
- Balanza Microanalítica Sartorius[®] M5P Serie 30303388: con exactitud a partir de 20mg y cantidad mínima medible de 10mg.
- Centrífuga Universal 32 Hettich Zentrifugen[®]
- Agitador Vortex LP Thermo Scientific[®]
- Baño termostatzado de agitación. Memmert[®] modelo WB22 (Alemania).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Jasco[®] (Tokio, Japón) modular que consta de:
 - a. Estabilizador de tensión Salicru[®]
 - b. Desgasificador DG-2080-53-3-line Degasser (Jasco[®], Japón)
 - c. Unidad de gradiente ternaria LG-2080-02 Ternary Gradient Unit (Jasco[®], Japón): trabajamos de forma isocrática con una sola fase móvil
 - d. Bomba Jasco[®] PU-1580 Intelligent HPLC Pump (Jasco[®], Japón)
 - e. Inyector automático Gilson[®] 231 XL (Middleton, WI, U.S.A.)
 - f. Detector UV Jasco UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector (Jasco[®], Japón)
 - g. Ordenador, interfase y programa de integración de datos modelo Borwin 1.5 (JMBS Developments[®], Francia)
 - h. Columna de fase reversa Col. Mediterranea Sea[®]18 (Barcelona, España) de 250mm de longitud, 5.0 mm de diámetro y 5µm de diámetro interno.
- Equipo de difracción de rayos X: Philips[®] XPERT.
- Espectrofotómetro UV-Vis Pharma Specr[®] UV-1700.
- Estufas termostatzadas: Radiber[®] S.A., Minidigit II.
- Nevera programada a 4 °C. Corberó[®].
- Ultra-Turrax[®] IKA[®] T25 Digital Homogenizer
- pH-metro Mettler Toledo[®] MP230.
- Aparato de velocidad de disolución ERWEKA[®] Dissolution Tester DT 80
- Tamices de diámetros: 1,19 mm, 1,41 mm, 0,500 mm, 0,350 mm y 0,355 mm (FILTRA[®]).
- Análisis estadístico con el software Programa Statgraphics[®] 18
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol[®] 6400 JSM

Métodos

Preparación de formulaciones

Granulación húmeda

El objetivo general de la granulación por vía húmeda es aumentar el tamaño de las partículas [128], mejorar la forma de las mismas para facilitar su fluidez, conferir propiedades hidrofílicas a la superficie de las partículas y de los comprimidos (para facilitar su humectado y, consecuentemente, disgregación y disolución) y facilitar la compresibilidad [129] [130]

Los granulados pueden ser la forma farmacéutica final en el caso de preparaciones extemporáneas.

Ventajas de la granulación húmeda:

- Mejora la cohesión durante y después de la compresión
- Puede ser aplicado a una gran diversidad de polvos, permitiendo manipular polvos de muy baja densidad aparente
- Permite dispersar el color de manera homogénea.

Desventajas de la granulación húmeda:

- Su procedimiento conlleva un alto número de pasos, lo que se traduce en el empleo de mucho tiempo, fundamentalmente en el secado
- El gran número de horas de trabajo, y equipo aumentan los costes de manufactura
- Puede haber pérdidas en el proceso y, debido a los diferentes pasos, una probabilidad alta de contaminar el producto
- No es factible con principios activos sensibles a la temperatura
- Puede retrasar la liberación del principio activo

El proceso de obtención de un granulado por vía húmeda consta de 4 fases [130]:

1. Granulación propiamente dicha, que, a su vez, consta de 2 fases:
 - a. Mezclado en seco de los componentes:
 - b. Humectación con agua, solventes o una solución aglutinante. La función de la solución aglutinante es unir las partículas con el fin de formar agregados denominados gránulos [65].
2. Tamización húmeda o granulación de la masa húmeda obligándola a pasar por un tamiz para formar gránulos.
El proceso de tamización húmeda va a permitir controlar el tamaño de gránulo obtenido en la fase de amasado rompiendo los gránulos de gran tamaño generados [130].
3. Secado del granulado:

El contenido de humedad considerado adecuado es del 23 %, aunque dependerá, en cada caso, de las características particulares de los componentes incluidos en la fórmula. Para determinar el punto final del proceso de secado, es importante conocer las humedades de equilibrio de los componentes mayoritarios del comprimido.

4. Tamización seca: Tamización del granulado seco para obtener un tamaño de partícula adecuado y homogéneo.

La distribución de partículas obtenida juega un importante papel ya que afecta al flujo del granulado, uniformidad de contenido y disolución [130].

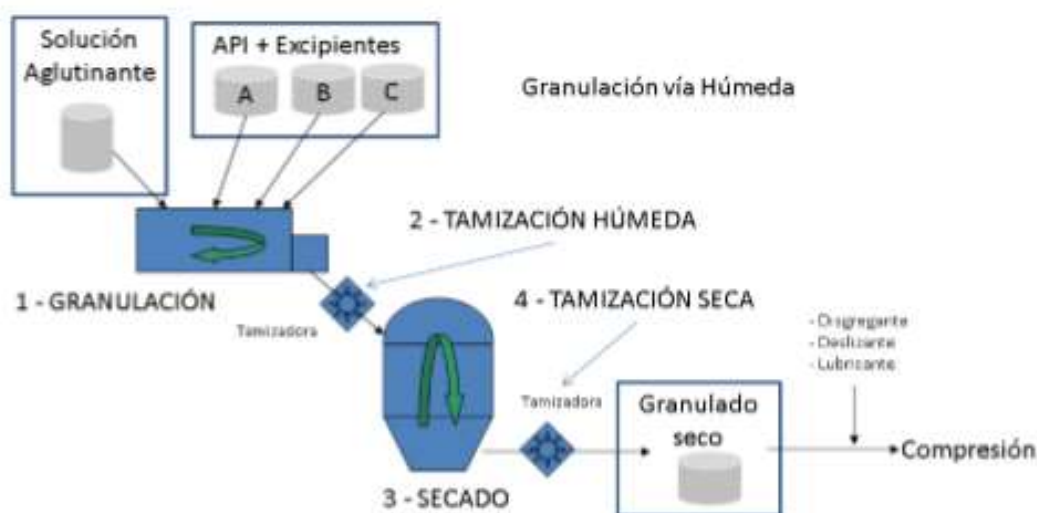


Figura 17: Esquema básico de la obtención de un granulado por granulación por vía húmeda en industria [130]

Durante la realización de esta tesis se fabricaron distintos tipos de granulados, con distintos diámetros.

La primera granulación, se realizó con un tamiz de 1,71 mm para seleccionar los granulados de tamaño 0,5 – 1,41 mm. De la misma manera se granularon los lotes siguientes.

En una segunda ocasión se prepararon lotes de granulados con el tamiz de 1,41 mm y seleccionando el tamaño de gránulo de 0,85 – 1 mm, para facilitar la administración en los ensayos *in vivo*.

Para continuar los ensayos *in vivo* y realizar pruebas complementarias se obtuvieron granulados con tamiz de 0,5 mm de los que se seleccionaron entre 0,350 – 0,355 mm. También, se granuló con un tamiz de 1,71 mm, seleccionando granulados de 0,350 – 1,41 mm para ensayos *in vitro* (Tablas 4 – 8).

Los granulados se realizan en 4 granulaciones sucesivas, dejando un día de secado entre cada una, hasta conseguir adicionar un 30 % aproximado de Eudragit®.



Figura 18: Granulación del MLX con Eudragit®. Fuente Eva Navarro Ruiz



Figura 19: Tamices utilizados en el desarrollo de la tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz

Granulado RS y CRS

El granulado RS contiene lactosa, MLX y Eudragit® RS. El último lote producido estaba formado por un 52,5 % de lactosa, un 17,5 % de MLX y un 30 % de Eudragit® RS.

El granulado CRS contiene lactosa, MLX, Metolose® y Eudragit® RS. El último lote producido estaba formado por un 47,5 % de lactosa, un 4,9 % de celulosa, un 17,6 % de MLX y un 30 % de Eudragit® RS (**Tabla 4**).

Tabla 4: Composición de granulado RS y CRS

NOMBRE GRANULADO	Granulado con tamiz 1,71 mm			Granulaciones con Eudragit RS				Rango 0,350 - 1,5 mm		
	MLX (mg)	Lactosa (mg)	Celulosa (mg)	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Total (mg)	Eudragit real	Peso teórico
CRS	201,8	543,9	55,6	280,1	293,1	276,6	294	1143,8	343,14	1144,44
% granulado CRS	17,63	47,53	4,86						29,98	100,00
RS	200,3	601,2	0	279,7	293,2	294,9	276	1143,8	343,14	1144,64
% granulado RS	17,50	52,52	0,00						29,98	100,00

Granulado FS y CFS

El granulado FS contiene lactosa, MLX y Eudragit® FS. El último lote producido estaba formado por un 52,7 % de lactosa, un 17,5 % de MLX y un 29,8 % de Eudragit® FS (**Tabla 5**).

El granulado CFS contiene lactosa, MLX, Metolose® y Eudragit® FS. El último lote producido estaba formado por un 47,5 % de lactosa, un 4,9 % de celulosa, un 17,5 % de MLX y un 30,1 % de Eudragit® FS.

Tabla 5: Composición de granulado FS y CFS

NOMBRE GRANULADO	Granulado con tamiz 1,71 mm			Granulaciones con Eudragit FS				Rango 0,350 - 1,5 mm		
	MLX (mg)	Lactosa (mg)	Celulosa (mg)	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Total (mg)	Eudragit real	Peso teórico
CFS	200,2	544,1	56,5	287	290,2	280,5	290	1147,7	344,31	1145,11
% granulado CFS	17,48	47,52	4,93						30,07	100,00
FS	200	601,3	0	278,3	299,7	274,9	282,4	1135,3	340,59	1141,89
% granulado FS	17,51	52,66	0,00						29,83	99,76

Granulado NM y CNM

El granulado NM contiene lactosa, MLX y Eudragit® NM. El último lote producido estaba formado por un 52,8 % de lactosa, un 17,7 % de MLX y un 29,5 % de Eudragit® NM (**Tabla 6**).

El granulado CNM contiene lactosa, MLX, Metolose® y Eudragit® NM. El último lote producido estaba formado por un 47,8 % de lactosa, un 4,9 % de celulosa, un 17,7 % de MLX y un 29,6 % de Eudragit® NM (**Tabla 6**).

Tabla 6: Composición del granulado NM y CNM

NOMBRE GRANULADO	Granulado con tamiz 1,71 mm			Granulaciones con Eudragit NM				Rango 0,350 - 1,41 mm		
	MLX (mg)	Lactosa (mg)	Celulosa (mg)	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Total (mg)	Eudragit real	Peso teórico
CNM	402,2	1088,4	112,4	559,2	562,8	562,7	562,7	2247,4	674,22	2277,22
% granulado CNM	17,66	47,80	4,94						29,61	100,00
NM	401,7	1200,8	0	560,8	555,8	558,5	558,5	2233,5	670,05	2272,55
% granulado NM	17,68	52,84	0,00						29,48	100,00

Granulado RS+FS y CRS+CFS

El granulado RS + FS contiene lactosa, MLX, Eudragit® RS y Eudragit® FS. El último lote producido estaba formado por un 52,5 % de lactosa, un 17,5 % de MLX, un 14,8 % de Eudragit® RS (en las dos primeras granulaciones) y un 15,0 % de Eudragit® FS (en las dos últimas granulaciones) (**Tabla 7**).

El granulado CRS + CFS contiene lactosa, MLX, Metolose®, Eudragit® RS y Eudragit® FS.

El último lote producido, estaba formado por un 47,1 % de lactosa, un 4,9 % de celulosa, un 17,3 % de MLX, un 14,6 % de Eudragit® RS (en las dos primeras granulaciones) y un 14,6 % de Eudragit® FS (en las dos últimas granulaciones) (**Tabla 7**).

Tabla 7: Composición de granulado RS + FS y granulado CRS + CFS

Granulado de nombre	RS + FS		CRS + CFS	
Granulado con tamiz de luz	2,0mm		2,0mm	
Rango seleccionado	0,350 - 1,5 mm		0,350 - 1,5 mm	
Composición				
Componente	peso (mg)	%	peso (mg)	%
MLX	200,4	17,6	200,2	17,6
Lactosa	600	52,6	544,2	47,8
Celulosa	0	0,0	56,2	4,9
Eudragit total	1135,4		1123,4	
1º granulación: RS	292,9		290	
2º granulación: RS	270,6		271,1	
RS total	563,5	14,8	561,1	14,8
3º granulación: FS	286,4		282,3	
4º granulación: FS	285,5		280	
FS total	571,9	15,0	562,3	14,8
Eudragit total real (30 % p)	340,62	29,9	337,02	29,6
Peso teórico total	1141,02	100,0	1137,62	100,0
Peso equivalente a 10 mg MLX	56,9		56,8	

Granulado NM+FS y CNM+CFS

El granulado NM + FS contiene lactosa, MLX, Eudragit® NM y Eudragit® FS. El último lote producido estaba formado por un 52,7 % de lactosa, un 17,6 % de MLX, un 14,8 % de Eudragit® NM (en las dos primeras granulaciones) y un 14,9 % de Eudragit® FS (en las dos últimas granulaciones) (**Tabla 8**).

El granulado CNM + CFS contiene lactosa, MLX, Metolose®, Eudragit® NM y Eudragit® FS.

El último lote producido estaba formado por un 47,1 % de lactosa, un 4,9 % de celulosa, un 17,6 % de MLX, un 15,3 % de Eudragit® NM (en las dos primeras granulaciones) y un 15,1 % de Eudragit® FS (en las dos últimas granulaciones) (**Tabla 8**).

Tabla 8: Composición de granulado NM + FS y granulado CNM + CFS

Granulado de nombre	NM + FS		CNM + CFS	
Granulado con tamiz de luz	1,6 mm		1,6 mm	
Rango seleccionado	0,350 - 1,5 mm		0,350 - 1,5 mm	
Composición				
Componente	peso (mg)	%	peso (mg)	%
MLX	201,2	17,6	204	17,6
Lactosa	602,3	52,7	544,5	47,1
Celulosa	0	0,0	57	4,9
Eudragit total	1131,4		1169,2	
1º granulación: NM	286,4		289,4	
2º granulación: NM	278,4		299,3	
NM total	564,8	14,8	588,7	15,3
3º granulación: FS	283,4		302	
4º granulación: FS	283,2		278,5	
FS total	566,6	14,9	580,5	15,1
Eudragit total real (30 % p)	339,42	29,7	350,76	30,3
Peso teórico total	1142,92	100	1156,26	100,00
Peso equivalente a 10 mg MLX	56,8		56,7	

Granulado placebo CNM

El granulado placebo, sin MLX, contiene lactosa, Metolose® y Eudragit® NM. Este granulado se realizó para su estudio en el SEM y XPRD. Para ello, se fabricaron 3 tipos de placebo (**Tabla 9**):

- Placebo completo: con las 4 granulaciones sucesivas de Eudragit® NM, para obtener un porcentaje similar al del granulado CNM de referencia.
- Placebo con una capa: Este placebo solo se granuló una vez con Eudragit® NM, teniendo un 9,58 % de polímero.
- Placebo con dos capas: Este placebo se sometió a dos granulaciones sucesivas de Eudragit® NM, obteniendo un 19,32 % de este material en su composición.

Tabla 9: Composición de los granulados preparados para el SEM y el XPRD

NOMBRE GRANULADO	Granulado con tamiz 0,5 mm			Granulaciones con Eudragit NM				Rango 0,350 - 0,355 mm		
	MLX (mg)	Lactosa (mg)	Celulosa (mg)	1ª	2ª	3ª	4ª	Total (mg)	Eudragit real	Peso teórico
CNM C1 (1 capa)	200,2	543,8	56,1	284,2	0	0	0	284,2	85,26	885,36
% granulado CNM C1	22,61	61,42	6,34						9,63	100,00
CNM C1 (2 capa)	200	544,3	55,6	289	287,2	0	0	576,2	172,86	972,76
% granulado CNM C2	22,59	61,48	6,28						19,52	109,87
Placebo 4 capas P4	0	743,88	56,1	282,5	285,2	282	282,6	1132,3	339,69	1139,67
% granulado P4	0,00	84,02	6,34						38,37	128,72
Placebo 1 capa P1	0	744,7	56,2	282,6	0	0	0	282,6	84,78	885,68
% granulado P1	0,00	84,11	6,35						9,58	100,04
Placebo 2 capas P2	0	746,1	56,2	285	285,3	0	0	570,3	171,09	973,39
% granulado P2	0,00	84,27	6,35						19,32	109,94



Figura 20: Muestras de algunos de los granulados realizados durante el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruiz.

Cuantificación del MLX

Espectrofotometría UV

Para poder valorar MLX en las formulaciones realizadas se ha puesto a punto un método analítico rápido y sencillo que es la técnica de la espectrofotometría ultravioleta (UV) normal.

Se seleccionaron distintas longitudes de onda para la realización del ensayo espectrofotométrico normal de MLX según el pH de estudio, tomando la longitud de onda en la que el MLX presentara un máximo de absorción en ese medio. A pH 7,4 fue de 361 nm, a pH 6,8 fue de 362 nm y, a pH 1,2 fue de 346 nm.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida es un método de separación cromatográfica basado en la diferencia en la distribución de las especies de la muestra entre dos fases inmiscibles, en donde la fase móvil es un líquido que circula a través de una fase estacionaria contenida en una columna [65] [131].

En nuestro caso, el HPLC nos permite analizar cuantitativamente en MLX en las formulaciones durante el estudio *in vivo*. El método utilizado fue validado según ICH. Se emplea un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Jasco (Tokio, Japón) modular, descrito en instrumental.

La interacción del analito con la fase estacionaria determina la separación de los componentes de la muestra, que será portada por la fase móvil. A continuación, se describen los conceptos más importantes que definen la técnica:

- Fase estacionaria: es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. La separación se consigue, dividiendo, adsorbiendo o por un proceso de intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria que usemos. La mayor parte de las separaciones se basan en mecanismos de reparto utilizando sílice modificada químicamente como fase estacionaria y disolventes polares como fase móvil. La fase estacionaria se encuentra empaquetada en la columna cromatográfica. La longitud y el diámetro interno de la columna afecta a la separación de los componentes. En nuestro caso, la columna utilizada fue una columna de fase reversa Col. Mediterránea Sea18 (Barcelona, España) de 250 mm de longitud, 5,0 mm de diámetro y 5 μ m de diámetro interno.

Fase móvil: es un disolvente o una mezcla de disolventes. En la cromatografía en fase normal se emplean disolventes menos polares, la presencia de agua en la fase móvil debe ser estrictamente controlada para obtener resultados reproducibles. En cambio, en la cromatografía en fase inversa, la utilizada en el desarrollo de esta tesis, se emplean fases móviles acuosas, con o sin disolventes

orgánicos. Generalmente se desgasifican antes del bombeo, mediante el paso de una corriente de helio, tratamiento de ultrasonidos o utilización en línea de módulos de membrana/vacío, para evitar la creación de burbujas de gas en la cubeta del detector.

Con la FM ácido acético 2 %: Acetonitrilo 50:50, la onda de lectura empleada fue 358 nm.

El equipo (**Figura 21**) de cromatografía líquida consiste en un sistema de bombeo que suministra la fase móvil a un caudal controlado, en nuestro caso el flujo utilizado es de 1ml/min. Un inyector que introduce la disolución con la muestra en la fase móvil. En nuestros ensayos el volumen de inyección fue de 100 μ l a temperatura ambiente. Además de la columna cromatográfica, un detector y un sistema de recogida de datos. El detector debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable el tiempo que dura el cromatograma. Además, debe ser insensible a los cambios de composición de la fase móvil.

Se tomaron tres tipos de muestras biológicas: intestinos, sangre y heces. Todas las muestras biológicas se trataron como se describe en el apartado de ensayos *in vivo*, página 128 y filtraron por un filtro de 0,45 μ m (Millipore®) antes de inyectarse en el HPLC. Se compararon los picos obtenidos y sus tiempos de retención, con los correspondientes de las muestras patrón, debiendo coincidir. Se compararon así mismo las muestras de los individuos tratados con los controles para descartar señales de ruido.

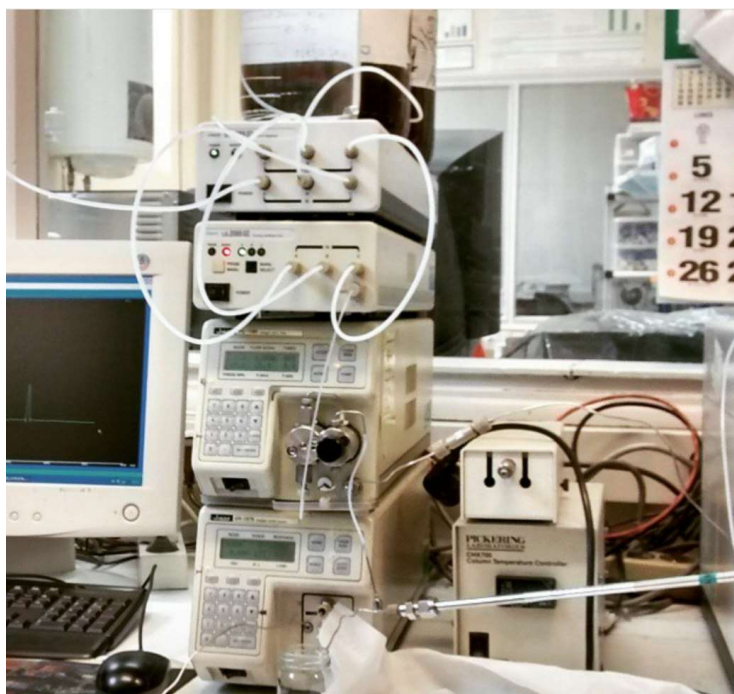


Figura 21: Foto del equipo de HPLC utilizado en el desarrollo de esta tesis. Fuente Eva Navarro Ruíz.

Ensayos *in vitro* – Solubilidad

Solubilidad de granulados

Se realiza un ensayo de solubilidad de los granulados con 3 mg de MLX o su cantidad equivalente en el granulado correspondiente, en 2 ml de tampón pH 6,8 en un baño termostático a 37 °C con agitación, durante 2 días. El ensayo se realizó por triplicado (n=3) con cada muestra.

La cantidad de MLX estudiada se calculó partiendo de la solubilidad del MLX a pH 6,8 que es de 0,266 mg/ml.

Las muestras se filtraron y se diluyeron en proporción 1/50 con un tampón de pH 6,8 para cuantificarse en el espectrofotómetro.

Homogeneidad de dosis de granulados

Previo al ensayo *in vivo*, se realizó una prueba de homogeneidad de dosis, ya que la selección del granulado a administrar se realizó de forma manual por la imposibilidad de pesar en la balanza un tamaño tan pequeño para la dosis elegida.

Se calculó que a cada ratón del ensayo se le deberían administrar 8 gránulos, que equivalían a 0,188 mg, al encontrar que, en 18,10 mg del granulado seleccionado había 770 gránulos.

El ensayo de homogeneidad de dosis (1 mg/kg) se realizó por quintuplicado (n= 5), contando 7 - 8 gránulos (0,350 – 0,355 mm diámetro) en 0,2 ml de solución de pH 4,5 + 1 % CMC, y así consiguiendo replicar las condiciones de administración del posterior ensayo *in vivo*. Añadiendo 10 ml de etanol a cada muestra, utilizando el ultrasonido para la disolución y filtrando por 0,45 µm y leyendo en el espectrofotómetro a 367 nm (máximo de absorción del MLX en presencia de etanol).

Se prepara también un ensayo de homogeneidad de dosis de 2 mg/kg, con 20 gránulos de 0,350 – 0,355 mm de diámetro. Y se realizó de la misma manera que el anterior.

Ensayos *in vitro* – Velocidad de disolución

Velocidad de disolución a pH 6,8

La primera prueba de velocidad de disolución (aparato I) se llevó a cabo con los granulados de 0,5 – 1,41 mm, con 10 mg de MLX de su peso equivalente. Con los vasos conteniendo 900 ml de pH 6,8, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con una velocidad de rotación de los cestillos de 50 rpm. Tomando muestras a los 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min (1 h), 120 min (2 h), 180 min (3 h), 240 min (4 h), 300 min (5 h), 360 min (6 h) y 390 min (6,5 h).

Las muestras tomadas del vaso se filtraban por filtros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore®) y se analizaban directamente en el espectrofotómetro sin necesidad de diluir.

Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4 con cambios de tampón

Se realizó un ensayo partiendo de 900 ml de pH 1,2 en los vasos del aparato I de velocidad disolución, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con los cestillos conteniendo el granulado de tamaño 1,19 – 1,41 mm, a una velocidad de 50 rpm. Se realizó con los granulados CNM, CNM + CFS y CFS. Se tomaban muestras a la hora y a las dos horas del comienzo del estudio. Para, seguidamente, a las 2 h, extraer cada vaso del aparato, filtrando el medio para no perder los gránulos que pudieran haber caído del cestillo, y volviendo a introducir el granulado, rellenando hasta 900 ml con tampón pH 6,8. Con este nuevo medio se tomaban muestras cada media hora, a las 2,5 h, 3 h, 3,5 h, 4 h, 4,5 h y 5 h, para cambiar a las 5 h el medio, filtrando nuevamente para no perder granulado.

El ensayo continuaba a pH 7,4 tomando muestras a las 5,5 h, 6 h, 6,5 h, 7 h, 7,5 h, 8 h y, finalmente a las 24 h. Como en el caso anterior, las muestras tomadas se filtraban por $0,45\text{ }\mu\text{m}$ y se analizaban sin necesidad de diluir.

Posteriormente, el mismo ensayo se llevó a cabo con el granulado de tamaño 0,85 – 1,00 mm de diámetro

Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4 en continuo

En este ensayo se estudiaron granulados de tamaño 0,350 – 0,355 mm, que por su pequeño tamaño caían del cestillo del aparato I de velocidad de disolución, por lo que, para no perder granulado en los cambios de medio, se decide emplear el método de la liberación retardada de la farmacopea [132], en el que hay una etapa ácida, con 750 ml de ácido clorhídrico (pH 1,2) durante 2 h, y una etapa amortiguadora, ajustando pH a los 5 primeros minutos tras las 2 h agregando la solución amortiguadora de fosfato tribásico para ajustar a pH 6,8, 250 ml. Para nuestro ensayo realizamos una adaptación de este método, para después alcanzar pH 7,4, añadiendo 5 ml de NaOH.

Las muestras tomadas se filtraban por 0,45 μm y se analizaban directamente en el espectrofotómetro.

Velocidad de disolución de granulado de tamaño 0,350 – 1,50mm

A pH 1,2

Se estudió la velocidad de disolución de los granulados de 0,350 – 1,50 mm de diámetro a pH 1,2, $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 50 rpm durante 2 h en las que se tomaron muestras a los 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min y 120 min.

Como siempre, las muestras tomadas se filtraban por 0,45 μm y se analizaban sin necesidad de diluir, a 346 nm de longitud de onda.

A pH 6,8

Se realizó el ensayo de velocidad de disolución con los granulados de tamaño 0,350 – 1,50 mm, a pH 6,8, $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 50 rpm de velocidad de giro de los cestillos. El ensayo dura 8 h en las que se toman muestras a los 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min y después cada hora hasta las 8 h incluidas.

Las muestras se filtraban por 0,45 μm y se analizaban sin necesidad de diluir a 362 nm

A pH 7,4

Se realizó el ensayo de velocidad de disolución a pH 7,4, con granulados de 0,350 – 1,50 mm de diámetro, en cestillos girando a 50 rpm y $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Leyendo las muestras tomadas a los 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min y después cada hora hasta las 8 h incluidas, tras filtrar, directamente en el espectro a 362 nm de longitud de onda.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó el estudio de distintas muestras mediante microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM) que es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia [132]. Para formar una imagen utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz.

Las imágenes se pueden obtener con electrones secundarios y retrodispersados, estas últimas nos dan información de variaciones composicionales de la muestra, mientras que las primeras permiten observar la textura y características morfológicas de las fases analizadas.

Para su observación mediante el SEM, las muestras se recubrieron de una capa delgada de oro-paladio, para darle el carácter conductor necesario para su estudio (**Figuras 22 – 23**).

Estudio de las formulaciones: El SEM barre la superficie de las muestras (los granulados seleccionados y la MLX materia prima con la que se pretendía comparar) con electrones acelerados que irán a un detector con electroimanes que mide la cantidad e intensidad de electrones devueltos por la muestra, formando figuras en tres dimensiones mediante imagen digital (**Figuras 24 y 25**).



Figura 22: Preparación de muestras en bases adecuadas para su posterior recubrimiento. Fuente Eva Navarro Ruiz.



Figura 23: Muestras preparadas para su recubrimiento. Fuente Eva Navarro Ruíz.



Figura 24: Microscopio electrónico de barrido Jeol® 6400 JSM del Centro Nacional de Microscopía. Fuente Eva Navarro Ruíz.



Figura 25: Microscopio electrónico de barrido con imagen de muestra analizada. Fuente Eva Navarro Ruiz.

Las muestras analizadas fueron preparadas de la siguiente manera: el MLX a estudio se granuló con lactosa y Eudragit® NM, a diferentes proporciones (**Tabla 9**), y un 5 % de celulosa (Metolose® 90 SH 100). Se seleccionaron los gránulos con un diámetro comprendido entre 0,350 y 0,355 mm. Se realizó, así mismo, un placebo, tal y como se describe en el apartado C1.12. Granulado placebo, con las cuatro granulaciones con Eudragit® NM, con una y con dos.

Se observó el granulado CNM de lote de tamaño 0,350 – 0,355mm, un granulado CNM con sólo una granulación con Eudragit® NM (de las 4 sucesivas que se aplicaban al granulado final) y otro con solo 2 granulaciones. Los placebos con las cuatro granulaciones con Eudragit® NM, con una y con dos; y, se observó también el MLX materia prima. Todas las muestras se observaron a distintos aumentos

Difracción de rayos X

Se empleó el método de polvo y barrido de superficie. Se dispersaron aproximadamente 20 mg de muestra sobre un portamuestras, y se introdujeron en un equipo difractómetro Philips X'PERT®. Cada muestra fue expuesta a una radiación Cu- α siendo los ángulos de incidencia desde 5° hasta 50°. Las condiciones del ensayo son de 40 mV de voltaje y 55 mA de intensidad. Los difractogramas obtenidos de las materias primas (MLX, lactosa, Metolose y Eudragit) y de la formulación CNM y de su placebo permiten conocer si las muestras son de naturaleza cristalina o amorfa.

También se ha utilizado el método de difracción de rayos X por incidencia rasante (GID), que consiste en que el ángulo de incidencia (θ) permanece fijo mientras que el detector se mueve de modo normal alrededor del eje del goniómetro [133]. Todas las mediciones se realizaron con un difractómetro Philips X'PERT®, donde la radiación fue la misma que para las medidas por el método de polvo. En este estudio hemos utilizado un ángulo de incidencia (θ) de 1°. Con anterioridad a las mediciones el equipo fue alineado y calibrado cuidadosamente. Se utilizó un portamuestras espacial que se podía ajustar a la altura de la muestra. En estas condiciones se midió la formulación CNM.

Ensayos *in vivo* con formulación seleccionada

Los estudios se realizaron en instalaciones de la UCM, que cumplen con los requerimientos legislativos relativos a las experimentaciones en animales.

Todos los estudios que se realizaron en este proyecto están de acuerdo con la directiva europea 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986, para la armonización de las leyes y procedimientos administrativas relacionadas con la protección de los animales destinados a la experimentación u otros fines científicos.

El uso de animales está plenamente justificado: en la búsqueda bibliográfica (PubMed y ScienceDirect) no se han encontrado métodos alternativos *in vitro* para relacionar la farmacocinética y la seguridad de estos tratamientos a septiembre de 2017. Sin embargo, existen una gran cantidad de artículos que emplean como modelo experimental a ratones para comparar los perfiles farmacocinéticos de distintas formulaciones de antiinflamatorios.

Se han puesto todos los medios para asegurar el bienestar animal.

Todos los ratones utilizados fueron Swiss CD1, de peso medio 32,5 g. (**Figura 26**)

Para los ensayos *in vivo* se seleccionó la formulación CNM.



Figura 26: Foto de ratones como los utilizados en el ensayo *in vivo*. Fuente Eva Navarro Ruiz.

Durante los ensayos *in vivo*, se fue mejorando la reproducibilidad de la dosis, disminuyendo el tamaño del granulado administrado a los animales, analizando un mayor número de parámetros y variables con cada nuevo ensayo, como la influencia de la hora de la toma de muestra, el vaciado gástrico con el alimento, y la retirada o no de heces en el análisis.

Primer ensayo de ratones

Se utilizaron ratones de 6 semanas de vida, en 4 grupos con 4 animales por grupo, tratados con dosis de 1 mg/kg peso, con granulado CNM de 0,85 - 1,00 mm de diámetro, que se administró vía oral con ayuda de una cánula y un volumen de 0,3 ml de una solución de pH 4,5, para que el principio activo administrado no se disolviera en el medio de administración, con un 1 % de carboximetil celulosa sódica (CMC). Al grupo control solo se le administró los 0,3 ml de tampón pH 4,5 con un 1% de CMC. Ambos grupos tuvieron alimento y agua *ad libitum*.

Se les sacrificó sin dolor, después de sedarlos, a los 30 min, 3 h y 6 h tras la administración de la formulación. En el grupo de la media hora solo se tomó sangre, en el resto se tomaron, como muestras, intestino delgado e intestino grueso, eliminando las heces por arrastre.

Tratamiento muestras:

- Las muestras sanguíneas se tomaron en un eppendorf con heparina, y se centrifugaron durante 12 min a 4500 rpm para recoger el sobrenadante. Este se congeló al menos durante 24 h a temperatura de -40 °C.
Tras descongelar a temperatura ambiente, se eliminó la capa mucosa formada y se añadieron 2 ml de ACN al plasma que se llevó a agitador durante 2 min. Se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 10 min para obtener el sobrenadante de cada muestra que se filtró con un filtro de 0,45 µm para analizar en el HPLC.
- Las muestras intestinales se pesaron, y, a las porciones cuyo peso era inferior a 0,5 g, se les añadió 0,5 ml de suero fisiológico y si el peso era igual o mayor a 0,5 g, se les añadió 1,0 ml de suero. Se homogeneizaron con un Ultra-Turrax® y se congelaron durante al menos 24 h a -40 °C.

Se descongelaron las muestras ayudándose de agua templada, se calcularon cuántos microlitros se podían tomar de cada muestra para añadir 1,2 veces más de ACN y agitar 2 min a 2500 rpm en un Vortex® para precipitar las proteínas. Luego se centrifugaron a 5000 rpm en la centrífuga durante 5 min para extraer el sobrenadante, y filtrar con filtro de 0,45 µm para analizar en el HPLC.

Segundo ensayo de ratones

Los animales utilizados fueron ratones, se tomaron 4 ratones por grupo, en ayuno y se trataron con dos dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso, con granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro, que se administró vía oral con ayuda de una cánula y un volumen de 0,3 ml de una solución de pH 4,5 con un 1 % de CMC. Al grupo control solo se le administró los 0,3 ml de solución pH 4,5 y 1 % de CMC. A los animales se les administró agua *ad libitum*.

Se tomaron muestras de sangre, intestino delgado e intestino grueso a distintos tiempos, 3 h, 6 h y 8 h, manteniendo las heces como parte de la muestra. El tratamiento de las muestras se realizó como en el primer ensayo

Tercer ensayo de ratones

El ensayo se realizó con el granulado CNM a dosis 1 mg/kg de peso en 3 ratones, a los que se les administró el granulado de tamaño 0,350 – 0,355 mm por vía oral, suspendido en 0,3 ml de una solución de pH 4,5 con 1 % de CMC, a través de una cánula, con una jeringa preparada para cada ratón. Las muestras se tomaron a las 6 h, analizando plasma, intestino delgado, intestino grueso, colon y las heces correspondientes a cada parte.

Se utilizaron 2 ratones como control a los que se les administró 0,3 ml de la solución pH 4,5 y 1 %CMC.

Los ratones estuvieron 8 h sin alimento antes del experimento y después se les administró agua *ad libitum*.

El tratamiento de muestras se realizó como en el primer y segundo ensayo, tratando las heces como si de muestras intestinales se tratara.

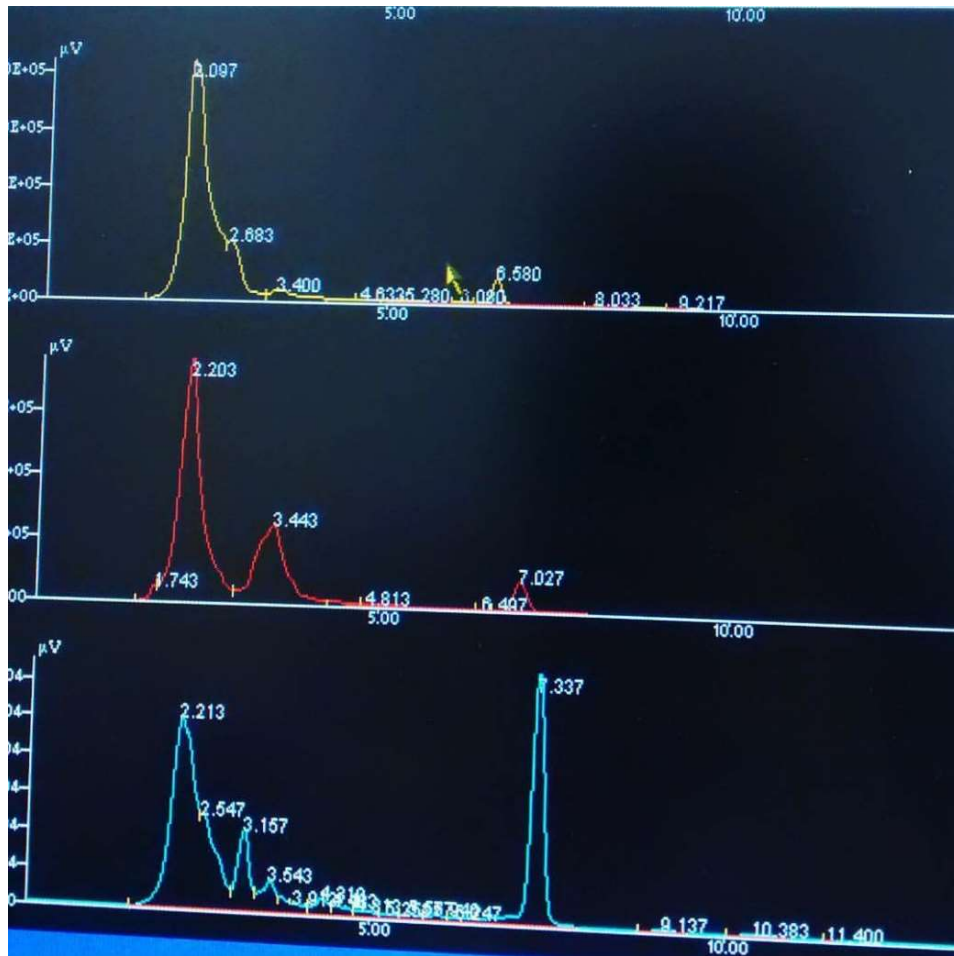


Figura 27: Foto de la pantalla del HPLC mostrando cromatografías de muestras de ratones tratados. Fuente Eva Navarro Ruíz.

Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics® 18. A continuación, se indican cuáles fueron los diferentes test aplicados en cada prueba.

Ensayos de velocidad de disolución in vitro

Los resultados obtenidos de los ensayos de disolución de diferentes formulaciones se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido por el método de la diferencia mínima significativa de Fisher para comparaciones múltiples. Un valor P de menos de 0,05 se consideró significativo.

Ensayos *in vivo*

Los valores de MLX obtenidos entre los diferentes grupos de tratamiento a diferentes dosis fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), realizándose el correspondiente análisis post hoc en el caso de rechazarse la hipótesis nula de igualdad entre las diferentes dosis ($P < 0,05$).

Validación de métodos

Introducción:

Según las “Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos”, la validación se debe aplicar no sólo a los procesos de fabricación, sino también a los métodos de análisis y control. La validación de los métodos analíticos es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de los resultados precisos y exactos, dentro de los atributos de calidad previamente establecidos. Es necesario validar para demostrar que los métodos son adecuados para los análisis propuestos en las condiciones descritas porque es parte integral del desarrollo de un método analítico, porque es necesario trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, y porque resulta mucho más económico trabajar con métodos validados. Para realizar la validación de los métodos analíticos se han tomado como referencia las directrices de la Conferencia Internacional de Harmonización (ICH) [134]. La validación del método analítico constó de las siguientes partes:

Especificidad

La especificidad es la capacidad del método para evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que se supone que pueden estar presentes, como impurezas o productos de degradación y que pueden interferir.

El objetivo es demostrar que se alcanza el nivel discriminatorio deseado en los ensayos de:

- Identificación: Consiste en establecer el nivel de discriminación adecuado entre compuestos de estructuras relacionadas que pueda estar presentes. Se verifica mediante la comparación de la muestra con un estándar de referencia, debidamente caracterizado, o por comparación entre muestras que contienen el analito con otras que no lo contienen.
- Impurezas: Consiste en demostrar la capacidad discriminatoria del método para separar el analito en presencia de las impurezas, productos de degradación o excipientes.

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como la capacidad para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en

un rango del procedimiento analítico definido. Se determina por tratamiento matemático, de los resultados obtenidos en el análisis de muestras con concentraciones crecientes de analito.

Exactitud

Se puede definir la exactitud de un método analítico como la capacidad de un método para medir un valor cercano al valor de la magnitud real.

Expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el obtenido con el procedimiento de ensayo. Da una indicación de los errores sistemáticos, y se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Se puede calcular a partir de 9 determinaciones sobre, al menos, 3 niveles de concentración

Precisión

Expresa el grado de concordancia o de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea, utilizando el procedimiento de ensayo indicado. Da idea de los errores aleatorios, se puede realizar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y se expresa como la varianza, desviación estándar y coeficiente de variación de una serie de medidas.

- Repetibilidad: Expresa la precisión del procedimiento de ensayo cuando es realizado por el mismo analista en cortos intervalos de tiempo, bajo condiciones iguales en cuanto a equipos, reactivos, condiciones experimentales y condiciones ambientales. Mide variaciones intra- ensayos.
- Precisión intermedia. Se refiere a las variaciones de un laboratorio, cuando el procedimiento se realiza en distintos días, analistas, equipo...
- Reproducibilidad. Expresa la precisión entre laboratorios, y se establece para los estudios de colaboración. En nuestro caso, no se ha realizado debido a que todos los ensayos son realizados en el mismo laboratorio.

Rango

El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración superior y la inferior del analito en la muestra, en donde ha podido ser demostrada la linealidad, precisión y exactitud del método.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico se expresa en el límite de detección y límite de cuantificación. El límite de detección es la cantidad más baja de un analito que puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto. Mientras el límite de cuantificación se define como la concentración más baja que puede determinarse cuantitativamente como aceptable en cuanto precisión y exactitud.

Análisis de MLX por espectrofotometría directa UV

El método analítico será empleado para la cuantificación de MLX en los siguientes ensayos: determinación del coeficiente de solubilidad de este principio activo y rendimiento del mismo en las formulaciones estudiadas.

SELECTIVIDAD:

La longitud de onda seleccionada para la realización del ensayo espectrofotométrico normal de MLX fue de 362 nm a pH 6,8 y pH 7,4 y 346 nm a pH 1,2, debido a que estas longitudes de onda eran a las que el fármaco presentaba máxima absorción en cada pH estudiado.

LINEALIDAD:

Se estudió la capacidad de este método para obtener resultados proporcionales a las concentraciones del analito dentro de un intervalo determinado. Su determinación se realiza para 5 concentraciones distintas a partir de una solución madre durante tres días consecutivos, Sus resultados se muestran en las siguientes tablas, obteniéndose las siguientes rectas de regresión para cada distinto pH estudiado:

pH 1,2

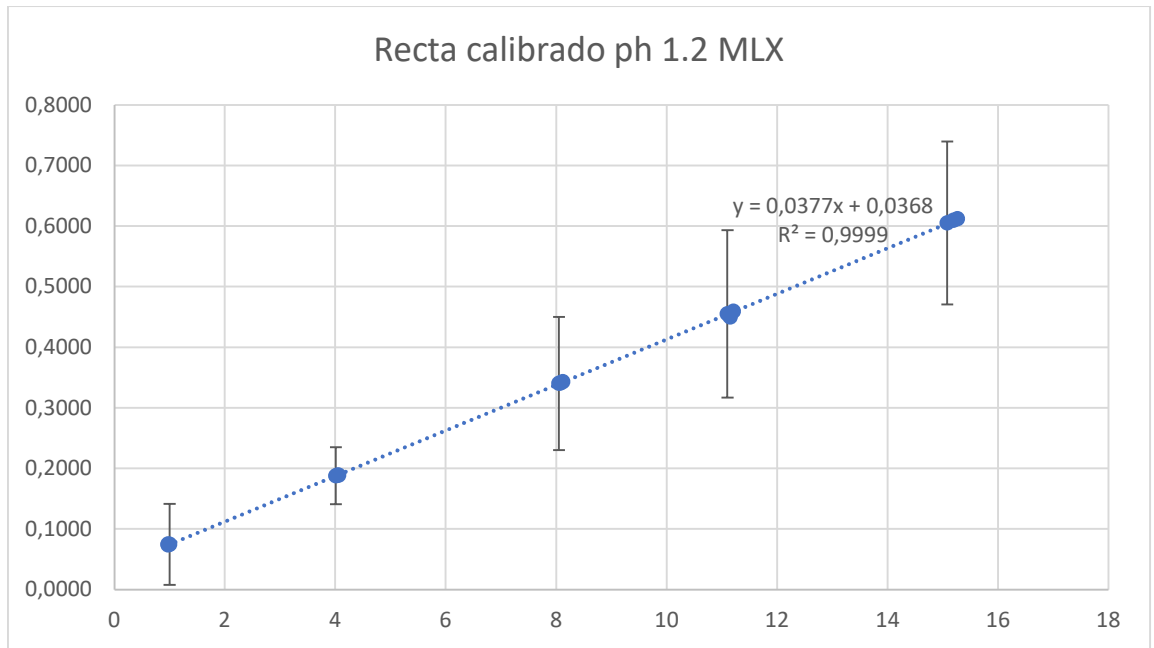


Figura 28: Recta de calibrado del MLX a pH 1,2 con absorbancia frente a concentración

pH 6,8

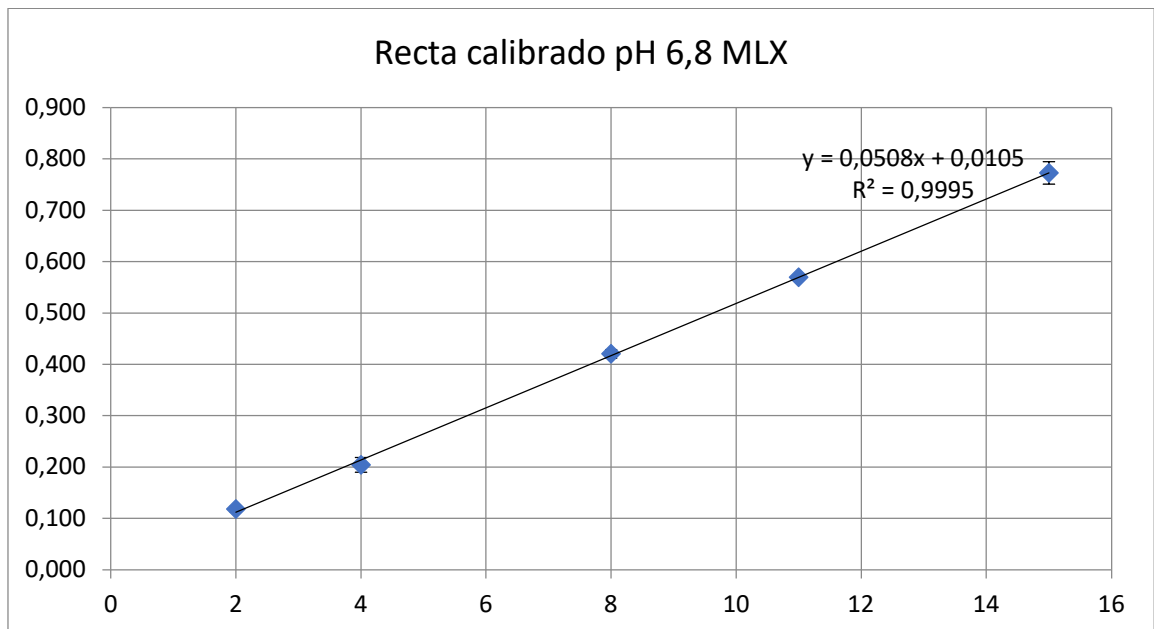


Figura 29: Recta de calibrado del MLX a pH 6,8 con absorbancia frente a concentración

pH 7,4

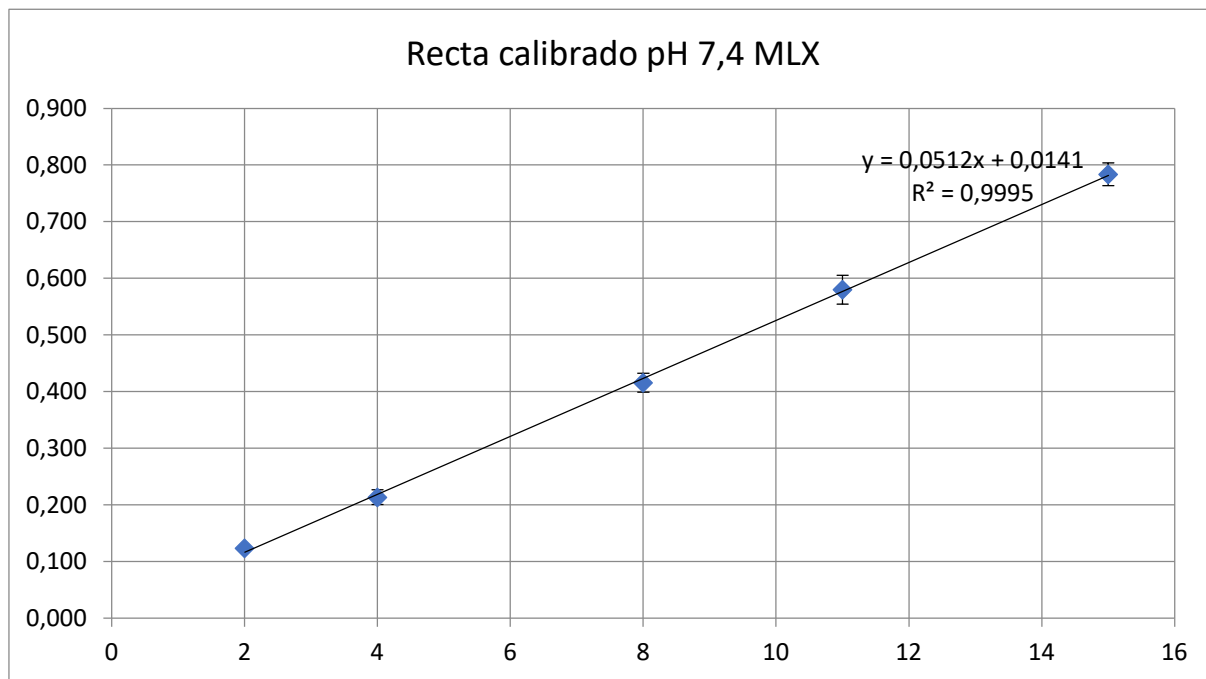


Figura 30: Recta de calibrado del MLX a pH 7,4 con absorbancia frente a concentración

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el método es lineal dentro del intervalo de concentración utilizado (de 1 µg/ml a 15 µg/ml), ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados, además es un método proporcional, puesto que la recta de calibración pasa por el origen de coordenadas.

PRECISIÓN:

La precisión se calcula a partir de estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

- REPETIBILIDAD: Según lo exigido por la ICH [35], se realizaron tres mediciones en las concentraciones preparadas, como se observa en las siguientes tablas (**Tablas 10 – 12**).
- PRECISIÓN INTERMEDIA: Este ensayo se realizó midiendo las muestras diferentes durante tres días seguidos

Tabla 10: Absorbancias en el espectrofotómetro a 346 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX en pH 1,2, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos

Concentración (µg/ml)	Media Día 1	Media Día 2	Media Día 3	Media global	Coefficiente variación
1	0,0745	0,0750	0,0734	0,0743	0,0668
4	0,1880	0,1890	0,1890	0,1887	0,0471
8	0,3403	0,3429	0,3410	0,3414	0,1098
11	0,4553	0,4530	0,4563	0,4549	0,1382
15	0,6104	0,6072	0,6095	0,6090	0,1347

Tabla 11: Absorbancias en el espectrofotómetro a 362 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX a pH 6,8, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos

Concentración (µg/ml)	Media Día 1	Media Día 2	Media Día 3	Media global	Coefficiente variación
1	0,124	0,119	0,112	0,118	0,006
4	0,216	0,215	0,188	0,504	0,014
8	0,417	0,415	0,430	0,421	0,008
11	0,575	0,567	0,566	0,569	0,005
15	0,760	0,798	0,760	0,773	0,022

Tabla 12: Absorbancias en el espectrofotómetro a 362 nm de disoluciones de unas soluciones madre de MLX en pH 7,4, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos

Concentración (µg/ml)	Media Día 1	Media Día 2	Media Día 3	Media global	Coefficiente variación
1	0,122	0,126	0,123	0,124	0,002
4	0,225	0,200	0,217	0,214	0,013
8	0,423	0,397	0,428	0,416	0,017
11	0,583	0,553	0,604	0,580	0,025
15	0,798	0,761	0,792	0,784	0,020

Todos los valores de C.V. son menores de 1% lo que permite considerar que este método presenta una muy buena repetibilidad y una buena precisión intermedia en el análisis de MLX. Al presentar en los casos de repetibilidad y precisión un C.V. menor del 5 % podemos considerar este método como preciso.



Figura 31: Preparación de las diluciones seriadas de la disolución madre de MLX. Fuente Eva Navarro Ruiz

SENSIBILIDAD:

Los límites de detección y cuantificación del método, calculados por la relación entre señal y ruido son respectivamente, 0,60 $\mu\text{g/ml}$ y 1,00 para pH 1,2, y 0,12 $\mu\text{g/ml}$ y 0,80 $\mu\text{g/ml}$, para los pHs de 6,8 y de 7,4.

Análisis de MLX por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación de MLX por HPLC en las muestras de estudio se ha desarrollado un nuevo método validado según ICH [134], observándose que el MLX tiene un tiempo de retención adecuado solo en el caso del uso de una gran cantidad de disolvente orgánico en la fase móvil.

Se emplea un cromatógrafo de líquido de alta resolución (HPLC) Jasco® (Tokio, Japón) modular que consta de: Bomba Jasco PU-1580, detector UV Jasco UV-1575 a 358 nm y un autoinyector Gilson® 231XL (Middleton, WI, U.S.A). Como fase estacionaria se emplea una columna de fase reversa Mediterránea Sea18 (Barcelona, España) con un diámetro interno de 5 µm, y dimensiones 25 × 0,5 cm.

Las condiciones de la fase móvil son las siguientes:

- Flujo de 1 ml/min.
- Composición: Variable a lo largo de los ensayos, siendo la composición final: Ácido acético 2 %: Acetonitrilo (50:50)
- Volumen de inyección: 100 µl.
- Intervalo de concentración seleccionada: MLX (0,3 - 7 µg/ml).
- Temperatura del ensayo: ambiente.
- Tiempo de análisis 30 min. El tiempo de retención es, aproximadamente, 10 min para MLX.

La preparación de las disoluciones a inyectar se describe a continuación:

- Disoluciones patrón: se emplean para la validación del método y se utilizan diariamente para la valoración de las muestras problema. Corresponden a soluciones realizadas con fase móvil de MLX a la 2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml. Se desechan una vez transcurridas 8 horas desde su preparación.
- Disoluciones de muestras problema: las disoluciones se preparan como se describe en el apartado C.5.1

VALIDACIÓN DEL MÉTODO:

SELECTIVIDAD:

Se han comparado los cromatogramas del patrón de MLX, la muestra control y la muestra con principio activo. Se ve que, al tiempo de retención en cuestión, 10 min aproximadamente, que corresponde al MLX, no hay ninguna interferencia. Por tanto, el método es selectivo para la determinación de MLX.

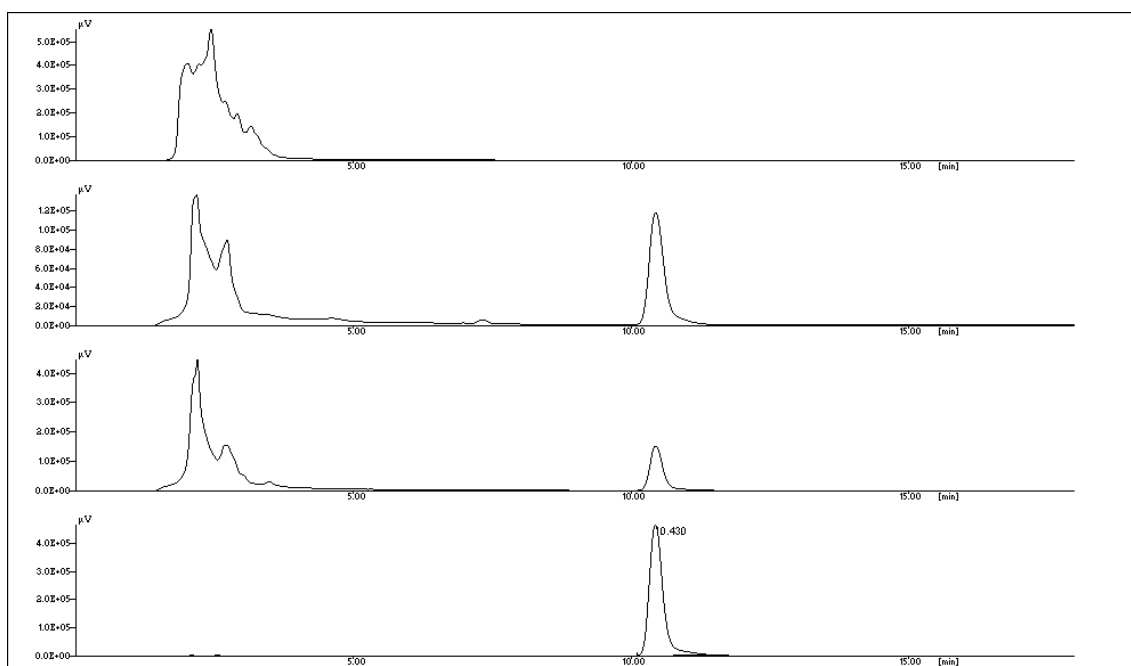


Figura 32: Cromatogramas de intestino grueso de ratón, siendo de arriba hacia abajo, Ratón control C3, Ratón tratado T1, Ratón tratado T2 y patrón 2,5 µg/ml

LINEALIDAD:

Se estudia la capacidad del método para obtener los resultados proporcionales a las concentraciones de analito dentro de un intervalo determinado. Su determinación se realizó con 5 concentraciones distintas a partir de la misma solución madre (**Tabla 13**).

Los buenos resultados permiten considerar que el método es lineal (**Figura 33**) para la cuantificación del MLX en el intervalo de trabajo.

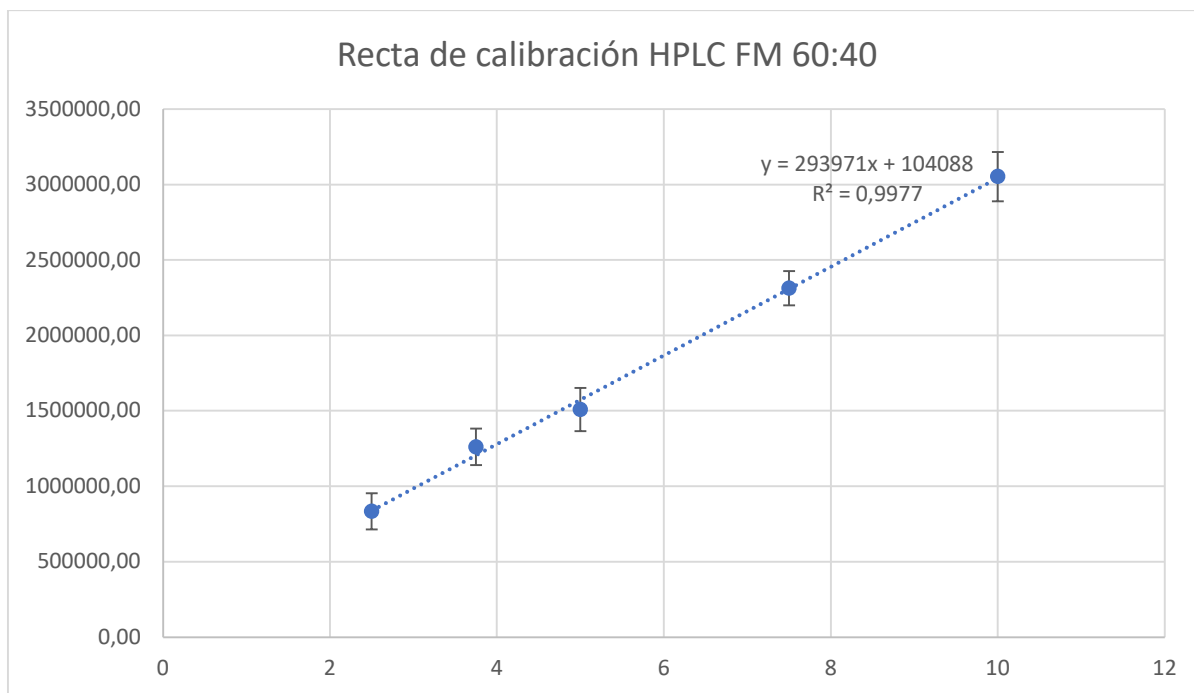


Figura 33: Linealidad del método de HPLC

PRECISIÓN:

La repetibilidad del método se determina a través de coeficiente de variación (C.V.). Se preparan las cinco soluciones madres del principio activo, analizándose los tres niveles de concentración alta, media y baja. Los valores obtenidos en áreas y sus C.V. se representan en la siguiente tabla: **(Tabla 13)**

Tabla 13: Áreas de los picos (x103) obtenidos en el HPLC con disoluciones de soluciones madre de MLX en ACN, preparadas según el método descrito en el apartado A2.8, en días sucesivos

Concentración (mcg/ml)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	MEDIA	DESVIACIÓN	CV%
2,5	815,44	822,77	829,16	865,50	841,27	834,83	17,53	2,13
3,75	1231,50	1261,50	1291,34	1261,56	1261,35	1261,45	21,16	1,50
5	1491,51	1500,74	1491,69	1585,83	1476,51	1509,26	100,37	2,58
7,5	2303,31	2323,62	2333,35	2303,38	2303,16	2313,36	14,26	0,55
10	3164,97	3032,69	3024,86	3024,48	3018,98	3053,20	62,67	1,83

Los valores de C.V. son aceptables ya que el valor más alto es 2,58 %. Se puede considerar que el método tiene buena repetibilidad para la determinación del MLX.

La precisión intermedia se determina con el análisis de tres concentraciones distintas en cinco días consecutivos, como se representa en la tabla anterior (**Tabla 13**).

EXACTITUD:

La exactitud se analiza mediante la recuperación de los analitos a partir de las muestras placebo o control a las que se ha adicionado concentraciones distintas de MLX, mostrando la capacidad del método de dar los resultados más próximos al valor real. Los resultados obtenidos se representan en la siguiente tabla. (**Tabla 14**)

Tabla 14: Resultados de recuperación de MLX en las muestras que contienen una concentración esperada de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml y 5µg/ml

Muestra control	Intestino delgado de ratón					
MLX adicionado a la muestra	Conc. MLX esperada (µg/ml)	MLX recuperado (µg/ml)	% recuperado	Media	Desviación	C.V.
Muestra + patrón 2 µg/ml	1	1,071	107,1	99,39	3,44	0,03
		0,947	94,7			
		1,003	100,3			
Muestra + patrón 5 µg/ml	2,5	2,47	98,8			
		2,506	100,24			
		2,420	96,8			
Muestra + patrón 10 µg/ml	5	4,923	98,46			
		5,022	100,43			
		4,886	97,72			

La recuperación es de $99,39 \pm 3,44$ % con los valores de C.V. no superiores al 5 %, a partir de estos resultados se puede considerar que el método desarrollado es exacto, no hay retenciones ni pérdidas del analito.

SENSIBILIDAD:

Para MLX, los límites de detección y de cuantificación del método en función a la relación entre señal y ruido son 0,02 µg/ml y 0,68 µg/ml respectivamente.

Resultados y discusión

Resultados y discusión:

Ensayos *in vitro*

Ensayos *in vitro*: Solubilidad de granulados de MLX

Se realizó el ensayo de solubilidad descrito en el apartado de materiales y métodos, con granulados de tamaño 0,5 – 1,41 mm de diámetro de diferentes formulaciones y el MLX materia prima. Los resultados obtenidos se observan en el siguiente gráfico (**Figura 34**).

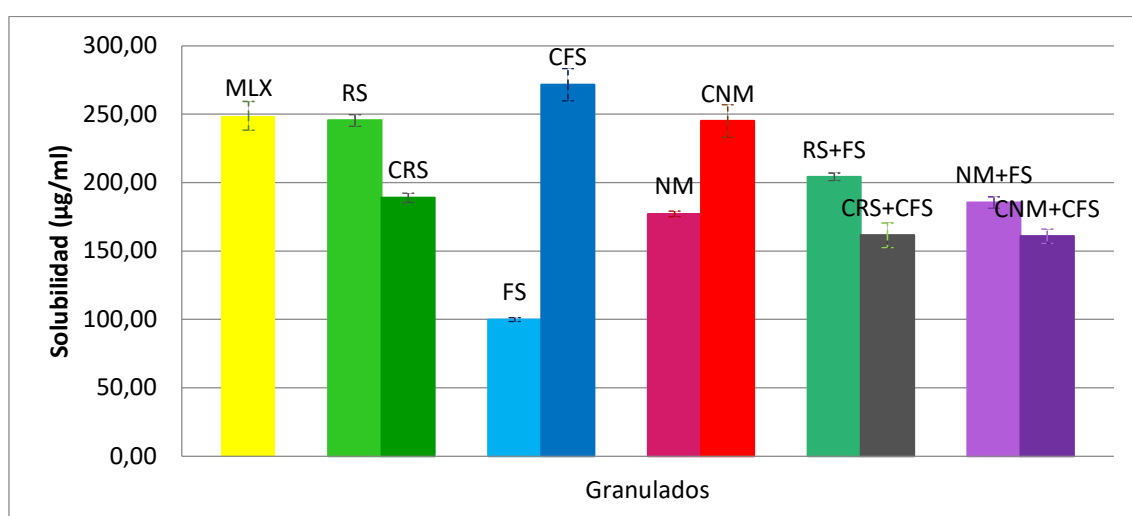


Figura 34: Representación de los coeficientes de solubilidad de los distintos granulados y la materia prima a pH 6,8

A este pH, el granulado con mayor coeficiente de solubilidad, incluso por encima del de la materia prima, es el CFS, granulado con celulosa y Eudragit® FS. Le sigue el MLX, materia prima, y los granulados RS, formulado con Eudragit® RS y el CNM, con Metolose® y Eudragit® NM con valores de solubilidad muy similares entre sí. Los demás granulados tienen un coeficiente de solubilidad inferior a 200 µg/ml, entre 190 µg/ml (RS + FS) y 160 µg/ml (CNM + CFS), excepto por el granulado FS, que es el de menor coeficiente de solubilidad, con un valor inferior a 100 µg/ml.

En otros estudios como el de Weyna D.R., y col. [135] analizaron la solubilidad del MLX a pH 6,5 y 37 °C, con respecto a co-cristales del principio activo, correlacionando los resultados con un ensayo *in vivo* en ratas, administrando una suspensión con la cantidad equivalente a 10 mg/kg de peso de MLX. Se demostró que las muestras que presentaban una mayor solubilidad a ese pH, también poseían una absorción oral superior y un comienzo de acción más temprana, por lo que cabe esperar que los granulados con coeficiente de solubilidad mayor al del MLX, tendrán una mayor absorción *in vivo*.

Se decidió comprobar estos resultados realizando un ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 y 37 °C de todos los granulados. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Ensayos *in vitro*: Velocidad de disolución).

Ensayos *in vitro*: Velocidad de disolución

Durante el desarrollo de esta tesis, se realizaron distintos ensayos de velocidad de disolución (apartado Ensayos *in vitro* – Velocidad de disolución de Materiales y métodos, página 79), mejorando las condiciones del medio de disolución, y se ensayaron distintos tamaños de granulado, que se clasifican en la siguiente tabla:

Tabla 15: Ensayos de velocidad de disolución realizados a lo largo del desarrollo de la tesis

Ensayo	pH	Tamaño gránulos	Volumen inicial del vaso	Duración del ensayo	Mejor granulado a las 8 h	Liberación del MLX materia prima a las 8 h
Velocidad de disolución a pH 6,8	6,8	0,50 – 1,41 mm	900 ml	24 h	CNM (88,77 ± 3,46 %)	78,10 ± 13,01 %
Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4, con cambios del tampón del medio disolución	1,2	1,19 – 1,41 mm	900 ml (se filtraba y se cambiaba de pH)	2 h	CNM (77,47 ± 1,67 %)	44,55 ± 5,25 %
	6,8			3 h (hasta 5 h)		
	7,4			19 h (hasta las 24 h)		
Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4, con cambios de tampón	1,2	0,85 – 1,00 mm	900 ml (se filtraba y se cambiaba de pH)	2 h	CNM (90,32 ± 2,34 %)	46,00 ± 5,23 %
	6,8			3 h (hasta 5 h)		
	7,4			19 h (hasta las 24 h)		
Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4 en continuo	1,2	0,350 – 0,355 mm	750 ml	2 h	CRS (95,40 ± 4,44 %) y CNM (95,04 ± 1,72 %), sin diferencias significativas ($p > 0,05$)	46,96 ± 4,91 %
	6,8		Se añaden 250 ml para pH 6,8	3 h (hasta 5 h)		
	7,4		Se añaden 5ml NaOH para alcanzar pH	19 h (hasta las 24 h)		
Velocidad de disolución a pH 1,2	1,2	0,35 – 1,50 mm	900 ml	2 h	CRS (10,26 ± 0,15 %) al tiempo máximo del ensayo (2 h)	3,63 ± 1,98 % al tiempo máximo del ensayo (2 h)
Velocidad de disolución a pH 6,8	6,8	0,35 – 1,50 mm	900 ml	8 h	CFS (100,00 ± 4,96 %)	96,14 ± 10,76 %
Velocidad de disolución a pH 7,4	7,4	0,35 – 1,50 mm	900 ml	8 h	CFS (100 ± 1,83 %)	100 ± 21,94 %

Todos los ensayos se llevaron a cabo con una cantidad de 10 mg de MLX o su equivalente en granulado, por triplicado (n= 3), a 37,0 ± 0,1 °C y con cestillos del equipo de velocidad de disolución girando a 50 rpm.

Velocidad de disolución a pH 6,8

Se realizó un primer ensayo de velocidad de disolución con 10 mg de MLX o su equivalente en granulado de diámetro 0,5 – 1,41 mm de distintas formulaciones (RS, CRS, FS, CFS, NM, CNM, RS + FS, NM + FS, CRS + CFS y CNM + CFS), en los cestillos del aparato de velocidad de disolución sumergidos en 900 ml de tampón a pH 6,8 a $37 \pm 0,1$ °C y rotando a 50 rpm, durante 24 h. Los resultados de este ensayo se encuentran representados en la **figura 35**.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron, para estudios posteriores, los granulados CNM, que con un $88,77 \% \pm 3,46$ disuelto, fue el granulado que más liberó a las 8 h, cediendo más que el principio activo de referencia, el MLX ($78,10 \pm 3,01 \%$ a las 8 h), seguido por el CFS, con un $66,34 \pm 2,12 \%$ a las 8 h y CNM + CFS con $61,86 \pm 2,60 \%$, ya que a este pH (colónico) es al que nos interesaría que comenzara la cesión del MLX.

Hyo-Kyung Han y Hoo-Kyun Choi [136], estudiaron la farmacocinética del MLX con sales de etanolamina mediante sus perfiles de disolución a pH 1,2 y 6,8 (*in vitro*), y con *ensayos in vivo* en ratas. Y demostraron que las formulaciones que presentaron un porcentaje de disolución más alto a pH 6,8 también tenían una absorción más rápida del principio activo en las ratas. Por lo que se espera que la formulación que presenta una mayor cesión a este pH, el granulado CNM, sea la que presente la mejor absorción *in vivo*.

Por ello, los tres granulados seleccionados (CFS, CNM y CNM + CFS) se utilizaron para realizar un estudio de velocidad de disolución a tres pHs, simulando el medio gastrointestinal.

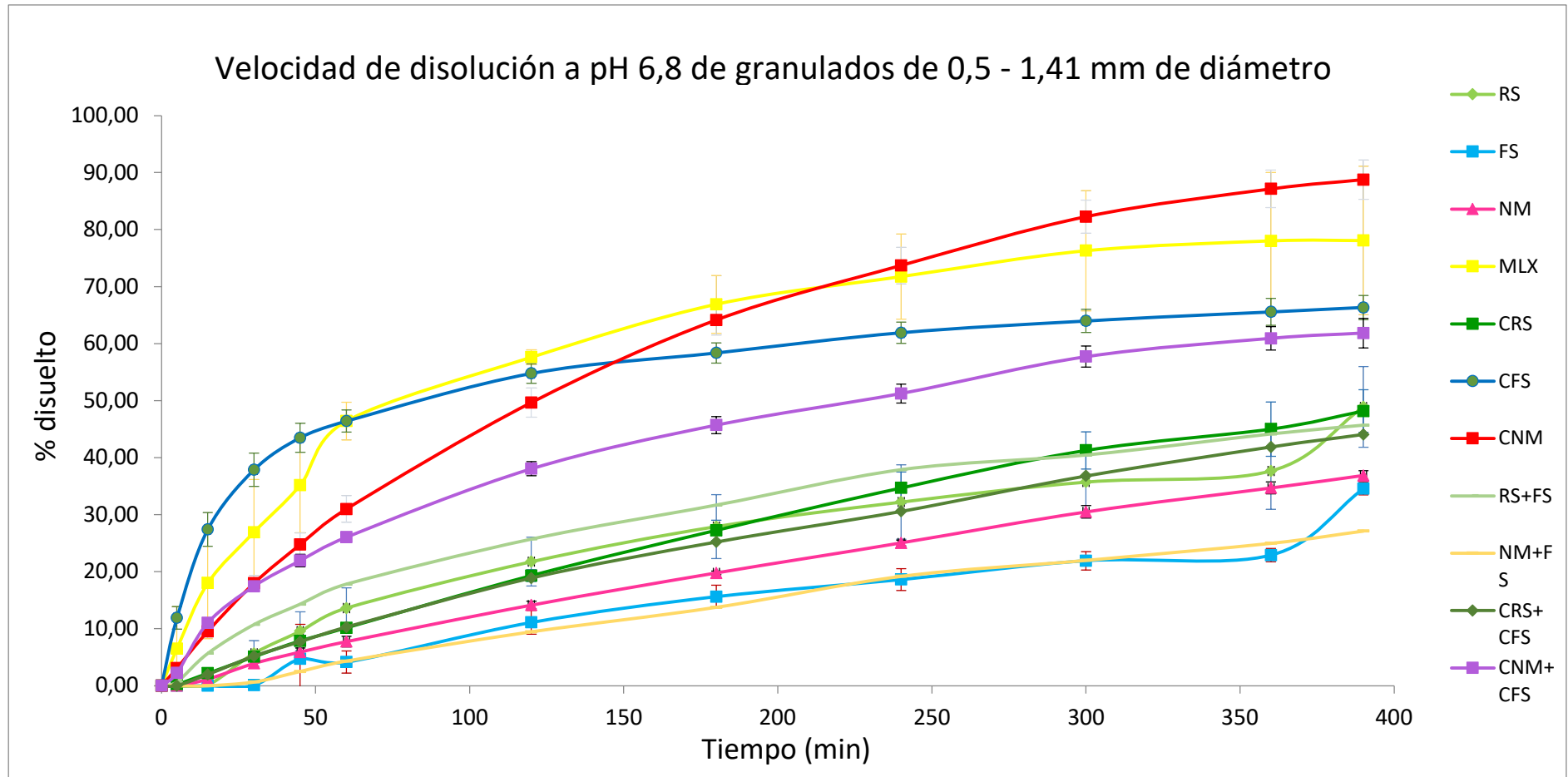


Figura 35: Gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,5 - 1,41 mm a pH 6,8, 37°C y 50 rpm

Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4, con cambios de tampón

Granulados de 1,19 - 1,41 mm de diámetro:

En este ensayo se mantuvieron los 10 mg de MLX o la cantidad equivalente de granulado de diámetro 1,19 – 1,41 mm, por triplicado (n= 3), con una velocidad de rotación de 50 rpm en cestillos sumergidos en 900 ml de medio simulado gástrico (pH 1,2) durante 2 h, se filtraba el medio recuperando los gránulos que hubieran podido caer del cestillo para volver a sumergirlos en 900 ml de pH 6,8, durante 3 h más, hasta que, tras volver a filtrar el medio, se cambiaba a pH 7,4, donde permanecían hasta completar las 24 h de ensayo. Se realizó solo con los granulados CFS, CNM y CNM + CFS, seleccionadas en el ensayo anterior.

Los resultados que se representan en la **figura 36**, demuestran que a las 8 h tras la administración, en este modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal, el granulado CNM sigue siendo el que más ha cedido, con un $77,47 \pm 1,67$ %; pero, tras el paso por el medio ácido, el siguiente mejor es el CNM + CFS, con un $51,19 \pm 4,73$ % y por último el CFS ($46,94 \pm 4,41$ %) al contrario de lo que ocurría cuando la velocidad de disolución se determinó únicamente a pH 6,8.

Como en otros estudios, en los que se comparan distintos comprimidos de MLX [137] [138] o diferentes dispersiones sólidas [139] [140], se aprecia que los perfiles de disolución varían mucho dependiendo de la formulación de la que se trate, a pesar de contener la misma cantidad equivalente de principio activo. Por lo que nos interesa seleccionar la formulación que mantenga una cesión alta del principio activo en el lugar de acción tras pasar sin apenas liberar, por el resto del tracto gastrointestinal

Como consecuencia de este resultado, se decide utilizar el granulado CNM para el primer ensayo *in vivo*.

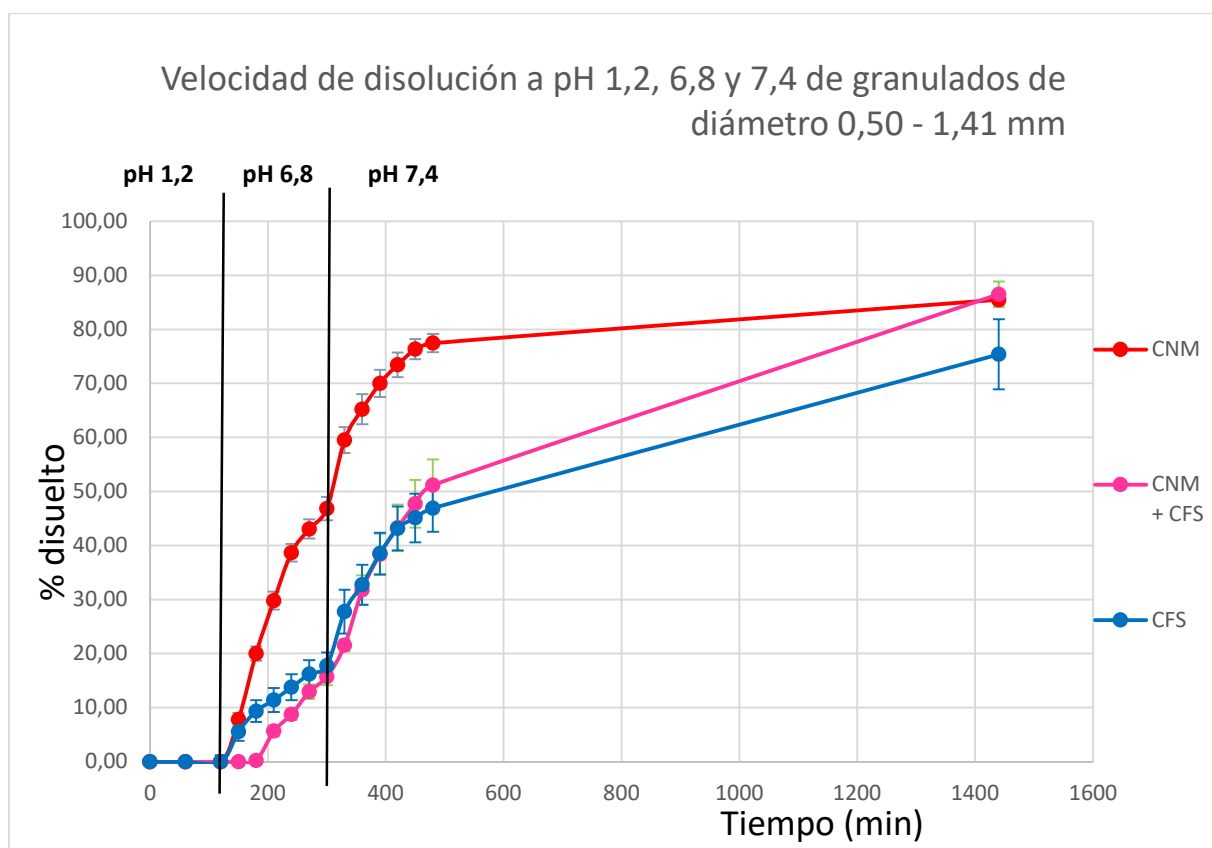


Figura 36: Representación gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulados de tamaño 0,5 - 1,41 mm a pH 1,2, 6,8 y 7,4, 37 °C y 50 rpm

Formulación de 0,85 – 1,00 mm de diámetro:

Durante la realización del primer ensayo *in vivo*, se observó que los gránulos eran demasiado grandes para pasar a través de la cánula de administración, por lo que, se tuvo que reducir el diámetro de los granulados formulados para que pudieran administrarse a los animales. El nuevo diámetro seleccionado fue 0,85 – 1,00 mm. Tras esta modificación, se realizaron nuevos ensayos de velocidad de disolución de los granulados ya estudiados, con el fin de observar si el diámetro influía en la cesión del MLX.

Los resultados representados en la **figura 37**, demuestran que el tamaño de los gránulos afectaba a su disolución, lográndose un mayor porcentaje de MLX disuelto a las 24 h en los granulados que presentaban mayor superficie específica, excepto en el caso del granulado CFS, pero no se alteraba el orden de disolución de los sistemas multiparticulares a las 8 h, ya que seguía siendo el CNM ($90,32 \pm 2,34$ %) el que más principio activo cedía a ese tiempo, frente al MLX con un $46,96 \pm 4,91$ % de liberación a las 8 h.

Estos resultados, son similares a los observados en varios artículos de la bibliografía, como en el publicado en el Journal of Pharmaceutical Sciences en enero de 2019 [141],

donde al comparar entre 4 rangos distintos de diámetros (de 45 – 75 μm , 75 – 125 μm , 125 – 250 μm , y 250 – 355 μm) de un principio activo, la reducción del tamaño de partícula mejoraba el comportamiento de disolución de las formulaciones en estudio, tanto en condiciones de no saturación (condiciones “sink”) como de saturación, siendo más leve el efecto en este último caso. Obteniendo el grupo de menor tamaño, concentraciones finales de 1,3 a 7 veces superiores a las del grupo de mayor tamaño de partícula.

La relación del tamaño de partícula y el porcentaje de disolución de fármacos también quedó demostrado en el estudio realizado por Chu KR y col. [142], donde se observó el comportamiento de disolución de fármacos poco solubles en agua, como la hidroclorotiazida, el aceclofenaco y el ibuprofeno, con 4 tamaños de partícula diferentes (< 45 μm , 45 – 150 μm , 150 – 250 μm y 250 – 600 μm), demostrando que a menor tamaño, se aumenta la superficie específica, aumentando así el porcentaje de disolución del principio activo. Esto ocurre igual con el MLX, el principio activo de esta tesis, y sus granulados correspondientes, que, al ver reducido su diámetro, aumentaban la cesión de fármaco al medio.

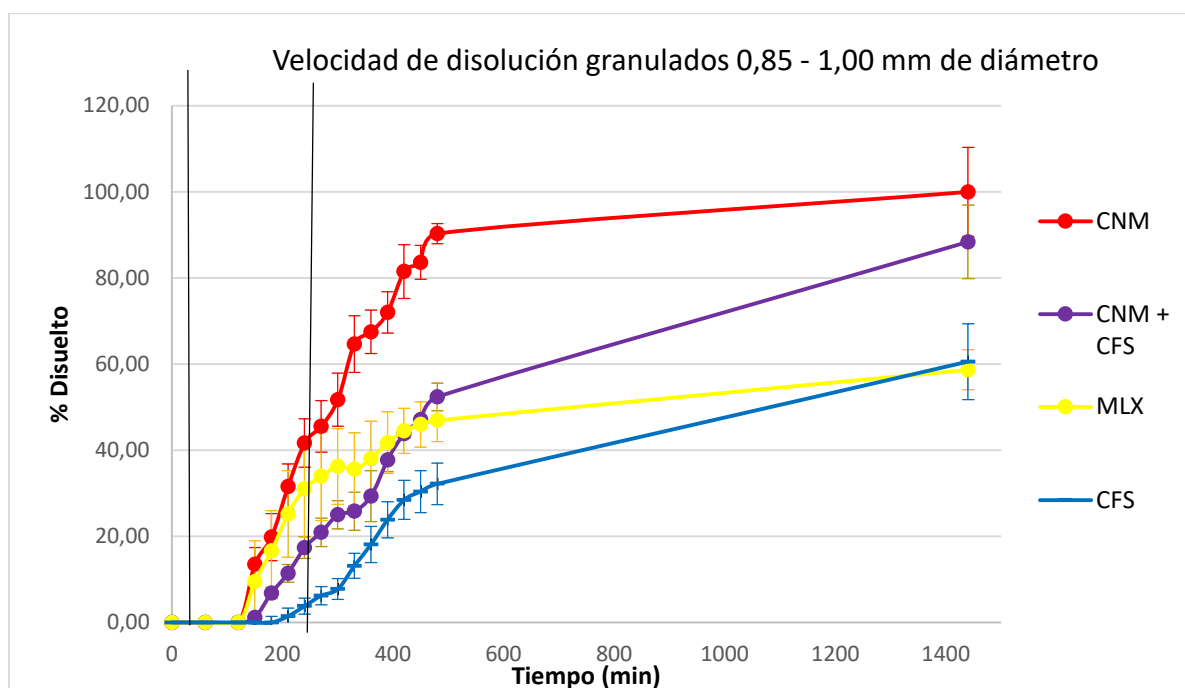


Figura 37: Representación gráfica del porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,85 - 1,00 mm a pH 1,2, 6,8 y 7,4, 37 °C y 50 rpm

Velocidad de disolución a pH 1,2, 6,8 y 7,4 en continuo

A pesar de reducir el tamaño de partícula de las distintas formulaciones se observó en los primeros ensayos *in vivo* que muchos de los gránulos no pasaban por la cánula de administración, por lo que se intentó reducir aún más el diámetro del gránulo, seleccionando los de tamaño 0,350 – 0,355 mm. Con ellos se realizó el estudio de homogeneidad de dosis que se comentará más adelante (ver apartado Ensayo *in vitro*: Homogeneidad de dosis de granulados). Pero, a la hora de realizar el ensayo de velocidad a tres pHs, no se pudo realizar cambiando el medio a distintos tiempos, ya que, por su pequeño tamaño, los granulados caían del cestillo del aparato de velocidad de disolución, y podrían perderse con los cambios de medio a pesar del filtrado del mismo. Por ello, se decidió emplear el método de disolución para formas farmacéuticas de liberación retardada de la farmacopea [132], ya descrito en el apartado de materiales y métodos, página 42.

En este ensayo, los resultados son muy diferentes a los perfiles de disolución de los granulados de tamaño 0,5 – 1,41 mm y 0,85 – 1,00 mm, no obstante, al reducir el diámetro del gránulo, los porcentajes de MLX disuelto desde todas las formulaciones son superiores por lo general.

Si se observa la **figura 38**, se ve claramente como, el CRS pasa a tener el perfil más elevado de disolución, hasta que a las 8 h ($95,40 \pm 4,44$ %) se ve igualado por el granulado CNM ($95,04 \pm 1,72$ %). El segundo perfil más elevado es el del granulado CRS + CFS ($91,92 \pm 0,44$ % a las 8 h), que a partir de las 7,5 h se ve superado por el CNM.

Para ver si existían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias obtenidas en los estudios velocidad de disolución de estos granulados a las 8 h, se realizó un análisis de varianza ANOVA, Statgraphics® (versión 18).

Tabla 16: Resultados del análisis estadístico con Statgraphics®

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21,9744	2	10,9872	1,44	0,3082
Intra grupos	45,7312	6	7,62187		
Total (Corr.)	67,7056	8			

La razón -F, que en este caso es igual a 1,44, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P es $< 0,05$, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 5 % de significación. Por lo que tanto el granulado CRS, como el CNM y el CRS + CFS son los granulados de mayor cesión a las 8 h.

El granulado CNM + CFS ($66,81 \pm 8,14$ % a las 8 h) y el CFS ($56,90 \pm 7,59$ % a las 8 h) quedan situados en un punto medio con respecto a los perfiles de las demás formulaciones, logrando ambos un incremento en la velocidad de liberación con respecto al MLX ($46,96 \pm 4,91$ %).

Se compararon los resultados de estas tres formulaciones, utilizando el programa Statgraphics®, para determinar qué resultados eran significativamente diferentes, siendo el granulado el CFS el que mostraba diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Mientras que el CNM + CFS y el MLX, no mostraban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos. Lo que significa que mientras el CNM + CFS libera el principio activo de forma similar a la materia prima, el CFS cede más lentamente.

A pesar del incremento en velocidad de disolución de los granulados CRS y CRS + CFS, que podrían competir con la CNM por ser la formulación de elección para los ensayos *in vivo*, nuestro granulado seleccionado continúa siendo el CNM porque su cesión es más sostenida a lo largo del tiempo, llegando a ser uno de los de mayor liberación de principio activo a las 8 h ($95,04 \pm 1,72$ %) y las 24 h ($100 \pm 1,88$ %) del ensayo.

Por otra parte, en un estudio sobre comprimidos de liberación inmediata con 7,5 mg de MLX [144], con un diseño similar al nuestro, se intentaron correlacionar los resultados *in vivo* con el estudio *in vitro* en pH 1,2, 4,5 y 6,8 a 50 rpm, observándose que los perfiles de disolución que *in vitro* discriminaban entre los diferentes comprimidos de estudio, no preveían con precisión los resultados *in vivo*. Por lo que los mejores resultados *in vitro* no tienen por qué ser los mejores en estudios *in vivo*. Por lo tanto el granulado CNM de tamaño 0,350 – 0,355 mm, aunque no tenga el de perfil más alto en este ensayo, tiene una cesión sostenida, por lo que podría permitir una alta liberación del principio activo al pH del lugar de acción y a unos tiempos acordes al tránsito intestinal.

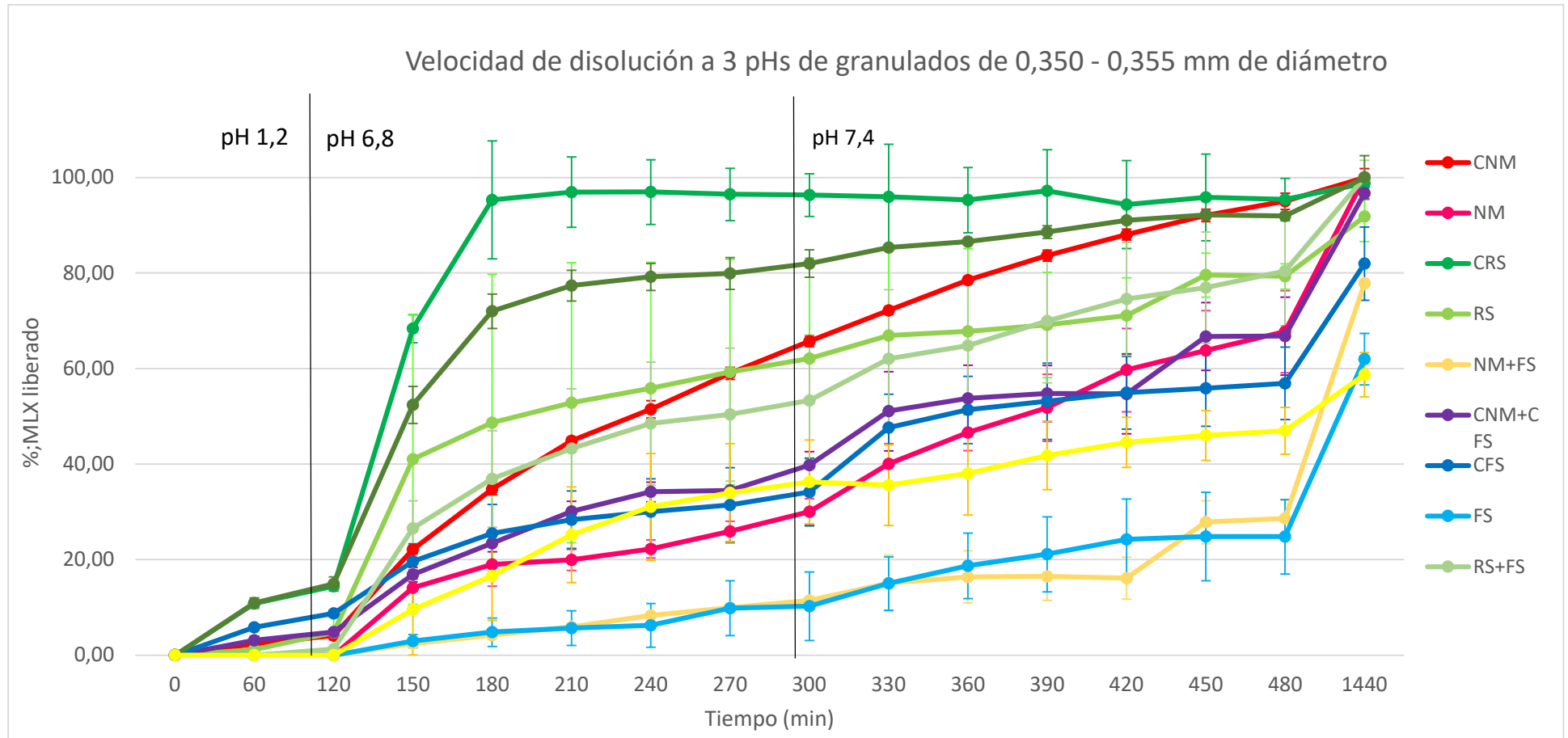


Figura 38: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,350 - 0,355 mm a pH 1,2, 6,8, y 7,4, 37 °C y 50 rpm

Velocidad de disolución del granulado de tamaño 0,35 – 1,50 mm a distintos pHs

Finalmente, se tomó el rango más amplio de diámetro utilizado, desde el menor tamaño escogido para el paso por la cánula de administración *in vivo* (0,350 mm), al tamaño superior de granulado de los primeros ensayos *in vitro* (1,50 mm) para recopilar los porcentajes de cesión de principio activo de cada granulado estudiado (RS, CRS, FS, CFS, NM, CNM, RS + FS, CRS + CFS, NM + FS y CNM + CFS) , frente a materia prima (MLX) y en los tres pHs a estudio (1,2, 6,8 y 7,4), analizados por separado (páginas 113 – 117).

Velocidad de disolución a pH 1,2

A pH 1,2 se observó que sólo los granulados con celulosa (Metolose®) y Eudragit® RS, es decir, el granulado CRS (10,26 ± 0,15 % a las 2 h de ensayo) y el CRS + CFS (5,86 ± 0,23 % a las 2 h), eran los únicos que comenzaban a liberar el principio activo (**Figura 39**), llegando a ceder más que el MLX materia prima, que se disolvía un 3,63 ± 1,98 % a las 2 h de ensayo.

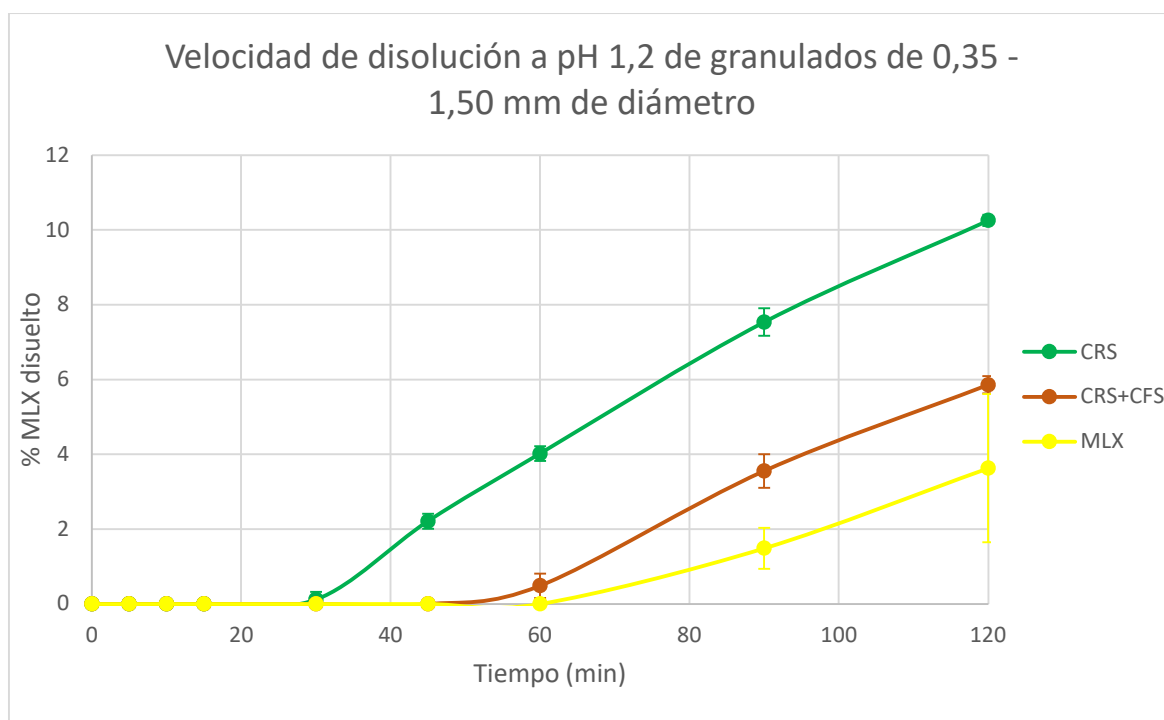


Figura 39: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,350 - 1,500 mm a pH 1,2, 37 °C y 50 rpm

Gracias al granulado CRS se consigue que a las 2 h el porcentaje disuelto del MLX llegue a un 10,25 ± 0,15 % más del doble que con el MLX materia prima (3,63 ± 1,98 %) en las mismas condiciones.

Parece que la sinergia entre el Metolose® y el Eudragit® RS consiguen que se libere más principio activo a pH 1,2, mientras que el uso de Eudragit® FS retrasa la cesión a este pH.

Otros autores [145] [146], emplean el Eudragit® RS para crear formulaciones de liberación sostenida independientes del pH, logrando un mayor retraso en la liberación cuanto mayor porcentaje de este Eudragit® contenían, y permitiendo reducir los efectos adversos de fármacos como el ropinirol.

Sin embargo, este resultado no es revelador para este estudio, ya que buscamos una formulación que libere en el lugar de acción deseado, el colon, por lo que podríamos descartar estas formulaciones que contienen un Eudragit® pH independiente, que comienzan a liberar al pH del estómago para centrarnos en las demás, que no cedan a este pH y lleguen intactas a otros niveles del tracto gastrointestinal.

Velocidad de disolución a pH 6,8

A pH 6,8 se evidenciaba que el granulado CNM a las 8h lograba liberar algo más ($98,48 \pm 2,28$ %) que el porcentaje que se disolvía del MLX materia prima ($96,14 \pm 10,76$ %) y de una forma más rápida (**Figura 40**), teniendo una cinética similar al granulado CNM + CFS, pero a los 180 min ($56,19 \pm 4,24$ % de liberación de principio activo del CNM a los 180min frente a los $59,23 \pm 8,04$ % del CNM+CFS) el CNM+CFS comenzaba a ceder más principio activo hasta llegar a un $100,00 \pm 9,30$ % al final del ensayo (8 h).

El granulado que más MLX liberaba a pH 6,8, era el CFS, con $100,00 \pm 4,96$ % a las 8 h, cediendo de forma más sostenida que el resto de formulaciones.

El resto de sistemas multiparticulares (FS, CRS, RS, NM, NM + FS, RS + FS y CRS + CFS) cedían menos MLX que el MLX materia prima a las 8h de ensayo, siendo los que menos cedían, el granulado NM ($39,93 \pm 1,51$ %) y el RS ($36,04 \pm 4,99$ %). Esto permite apreciar el efecto de añadir celulosa Metolose® al granulado, ya que, en todos los casos, los granulados con este excipiente liberaron mayor porcentaje de MLX que su correspondiente granulado sin celulosa. Esto puede ser debido a un efecto disgregante del Metolose®, que entre los espacios intermoleculares de la celulosa permite el paso del agua y, con ello, una mayor liberación del principio activo [147]. En artículos como el de Hirasawa N et al. [148] este efecto disgregante se estudió en comprimidos, y en otros estudios [149] [150], se comprobó como aumentaba la biodisponibilidad de los fármacos con los que se utilizaba, hasta en un 18% [150].

Diversas publicaciones consultadas [151] [152] [153] [154] [155] emplean el Eudragit® FS para crear formulaciones de liberación colónica, ya que la utilización de este material permite reducir la liberación a pH 6,8 [153] [154]; sin embargo, comparando con uno de los artículos [151] que estudiaba pellets de MLX de liberación colónica con un 15 % p/p de Eudragit®), se observó una liberación *in vitro* con suficiente resistencia gástrica (6 % de liberación a pH 6,8 y 100 % a pH 7,4) y una llegada al colon en los estudios *in vivo*, realizados en perros Beagle; por lo que esperábamos una liberación mucho más reducida de los granulados conteniendo este Eudragit®, CFS ($100,00 \pm 4,96$ %), FS ($78,86 \pm 2,80$ %), CNM + CFS ($100,00 \pm 9,30$ %) y NM + FS ($77,49 \pm 5,91$ %) que las obtenidas a

las 8 h del ensayo a pH 6,8. Estos altos valores hacen que se elimine la posibilidad de trabajar con este polímero, ya que sus altas cesiones a este pH harían que la formulación redujera su probabilidad de llegar al colon y ejercer allí su efecto.

Así mismo, tampoco interesarían las formulaciones que menos MLX liberaran (RS y NM) porque el granulado seleccionado debería comenzar a liberar el principio activo en este pH, por lo que no hemos seleccionado las siguientes formulaciones: la NM y la RS, que ya se habían descartado por comenzar a ceder en el medio simulado gástrico (pH 1,2), junto con la otra formulación que contenía el polímero de liberación independiente del pH, el sistema multiparticular CRS, y las formulaciones conteniendo Eudragit® FS, por su alta cesión de principio activo a pH 6,8. Dejando al granulado CNM como mejor opción para estudios posteriores.

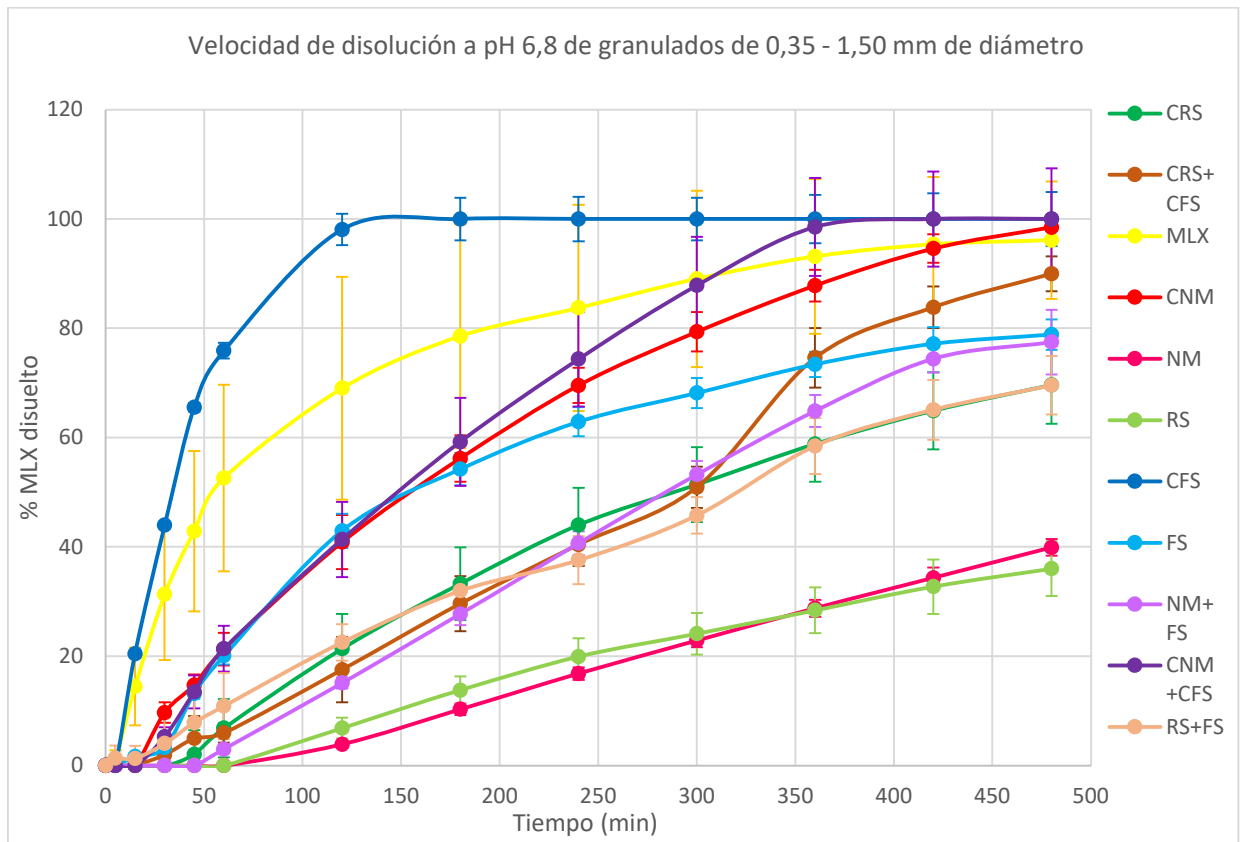


Figura 40: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,35 - 1,50 mm a pH 6,8, 37 °C y 50 rpm

Velocidad de disolución a pH 7,4

A pH 7,4 los resultados (**Figura 41**) son bastante diferentes de los de pH 6,8, ya que, aunque el granulado CFS sigue siendo una de las formulaciones que más principio activo cede durante todo el transcurso del ensayo ($100,02 \pm 1,83$ % a las 8 h), presenta como competidores, otras formulaciones que también contienen Eudragit® FS, el granulado FS ($100,00 \pm 0,74$ % a las 8 h), el granulado CNM + CFS ($100,00 \pm 1,00$ %), el NM + FS ($100,01 \pm 2,45$ %), el CRS + CFS ($100,00 \pm 17,42$ %) y el RS + FS ($100,00 \pm 6,79$ %). La cesión tan alta de principio activo por parte de los granulados que contienen Eudragit® FS era previsible gracias al estudio de algunas de las publicaciones ya citadas [151] [152] [153] [154] [155]

Sin embargo, el único granulado que consigue ceder tanto o más MLX a las 8 h que la materia prima ($100,00 \pm 21,94$ %), sin contener Eudragit® FS en su composición es el granulado CNM ($100,01 \pm 2,67$ %).

A este pH se sigue observando el efecto de la celulosa Metolose® en el perfil de liberación del granulado, consiguiendo que los granulados que lo contienen liberen mucho más MLX que los que no lo contienen, manteniendo una forma similar de perfil de liberación.

En base a estos resultados, si los analizáramos de forma aislada, parecería una buena opción seleccionar un granulado con Eudragit® FS en su composición para que la liberación de MLX en este pH fuera máxima, así como un granulado con Metolose®, pero como ya hemos visto, los granulados que contienen Eudragit® FS en su composición, liberan el principio activo a pH 6,8, por lo que podrían llegar a este pH, con una porcentaje de fármaco restante bajo.

También según los resultados obtenidos con esta velocidad de disolución, podríamos descartar los granulados que, a este pH, liberen menos principio activo que el MLX materia prima, como son el granulado CRS ($86,38 \pm 1,76$ %) y RS ($62,12 \pm 4,98$ %). Además, ya se había propuesto descartar estos granulados porque eran los que peor comportamiento tenían a pH 6,8, junto al NM, y, al contener Eudragit® RS, comenzaban a liberar demasiado temprano (pH 1,2).

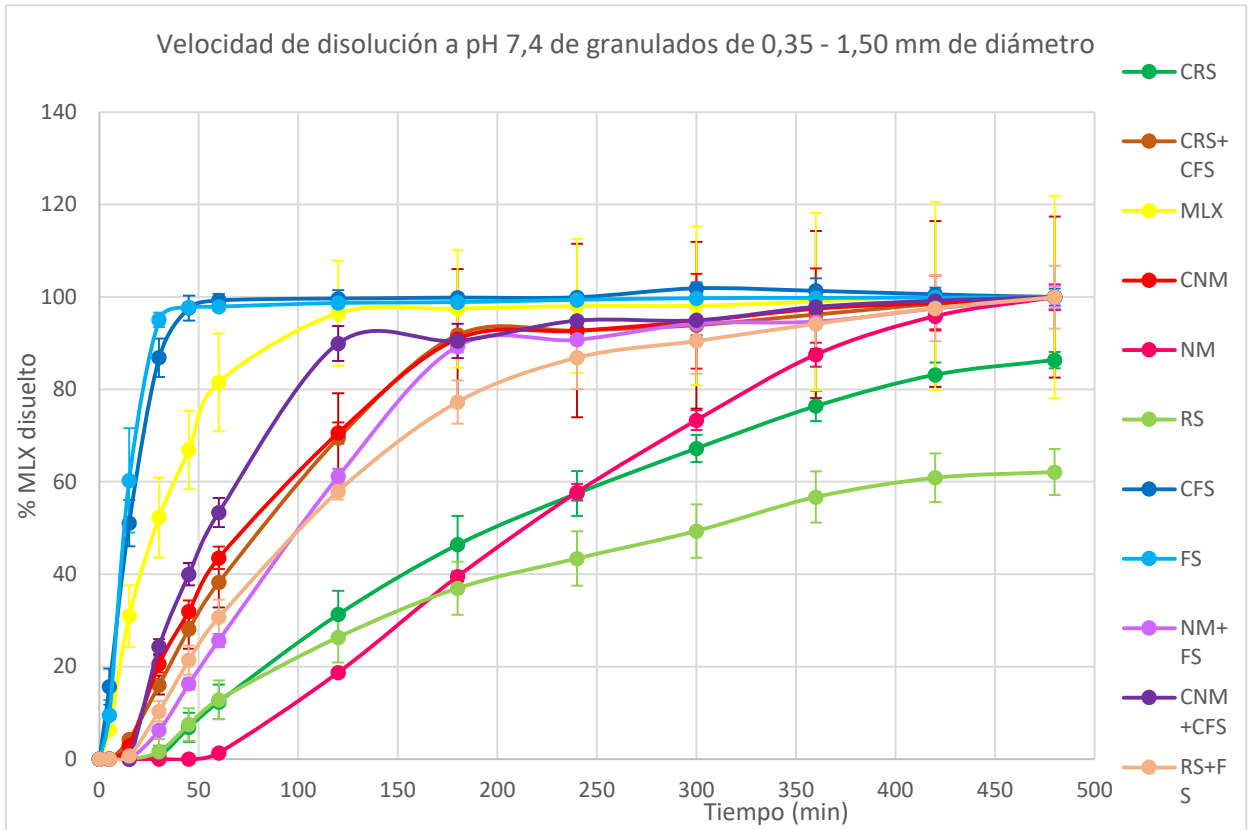


Figura 41: Porcentaje disuelto frente al tiempo (min) de 10 mg de MLX o la cantidad equivalente en granulado de tamaño 0,35 - 1,50 mm a pH 7,8, 37 °C y 50 rpm

Ensayo *in vitro*: Homogeneidad de dosis de granulados

Como ya se ha comentado, tras los primeros ensayos *in vivo* se observó que muchos de los gránulos no pasaban a través de la cánula de administración, lo que llevó a una reducción del diámetro del gránulo, seleccionando los de tamaño 0,350 – 0,355 mm.

La dosis para administrar a cada ratón era de un peso inferior al límite de la báscula del laboratorio por lo que se calculó el contenido en gránulos de 10 mg del producto y se extrapola la concentración de MLX contenida para calcular el número de gránulos a administrar a los ratones en función de la dosis estudiada.

Con la dosis de 1 mg/kg de peso, tomando 8 gránulos de 0,350 – 0,355 mm de diámetro de la formulación CNM, obtuvimos una dosis de $0,96 \pm 0,08$ mg/kg de peso de ratón (**tabla 17**), teniendo en cuenta que el peso medio de un ratón era de 32,5 g.

Tabla 17: Resultados de ensayo de homogeneidad de dosis 1 mg/kg de granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro

MUESTRA	ABS	CONC (mcg/ml)	MLX (mcg)	DOSIS (mg/kg)	MEDIA	DESVIACIÓN	C.V.
1.1	0,166	3,24	33,05	1,02	0,96	0,08	0,07
1.2	0,161	3,13	31,96	0,98			
1.3	0,169	3,30	33,71	1,04			
1.4	0,149	2,88	29,33	0,90			
1.5	0,141	2,70	27,58	0,85			

Con la dosis de 2 mg/kg de peso (**tabla 18**), tomamos 20 gránulos de 0,350 – 0,355 mm de diámetro de la formulación CNM, obteniendo una dosis de $2,04 \pm 0,12$ mg/kg de peso, teniendo en cuenta como peso medio de los roedores 32,5 g.

Tabla 18: Resultados de ensayo de homogeneidad de dosis 2 mg/kg de granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro

MUESTRA	ABS	CONC (mcg/ml)	MLX (mcg)	DOSIS (mg/kg)	MEDIA	DESVIACIÓN	C.V.
2.1	0,331	6,78	69,17	2,13	2,04	0,12	0,05
2.2	0,33	6,76	68,95	2,12			
2.3	0,319	6,52	66,54	2,05			
2.4	0,287	5,84	59,54	1,83			
2.5	0,323	6,61	67,42	2,07			

Debido al bajo coeficiente de variación (< 1), éste fue el método empleado en la administración de formulaciones durante los ensayos *in vivo* finales.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar las características de superficie y morfológicas de diferentes muestras: MLX materia prima, granulado CNM compuesto de MLX, lactosa, Metolose® y con 1, 2 y 4 capas de recubrimiento de Eudragit® NN, según la muestra, y placebo (que en lugar del principio activo tenía lactosa) con 2 y 4 capas de recubrimiento.

Se seleccionó el granulado CNM porque, de entre todos los estudiados, tenía las mejores características de velocidad de disolución para realizar el estudio *in vivo* posterior. Se realizó un estudio con distintas capas de Eudragit® para ver la distribución del polímero a lo largo del proceso de granulación.

Las imágenes obtenidas mediante la observación del MLX, materia prima, a distintos aumentos con esta técnica muestran las características morfológicas del fármaco, cuya estructura es en forma de unos reconocibles cristales cúbicos con superficie lisa de 3,5 µm de arista, identificables tanto a 200X (**Figura 42**) como a 1500X de aumento (**Figura 43**).

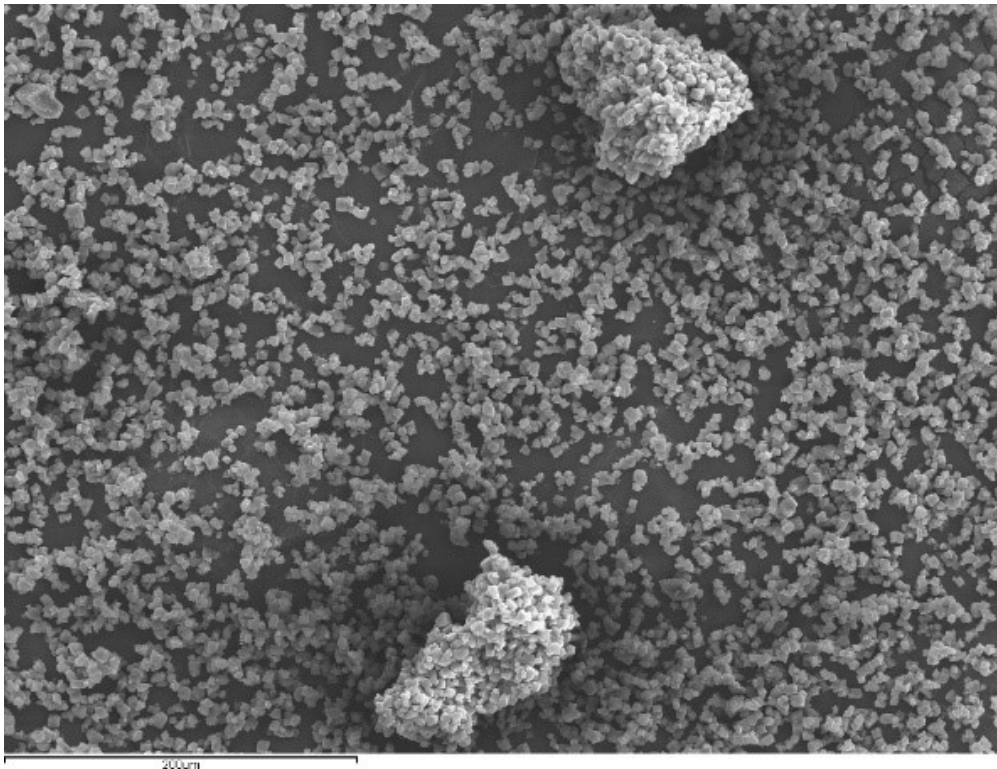


Figura 42: Microfotografía de muestra de MLX, materia prima, a un aumento de 200X.

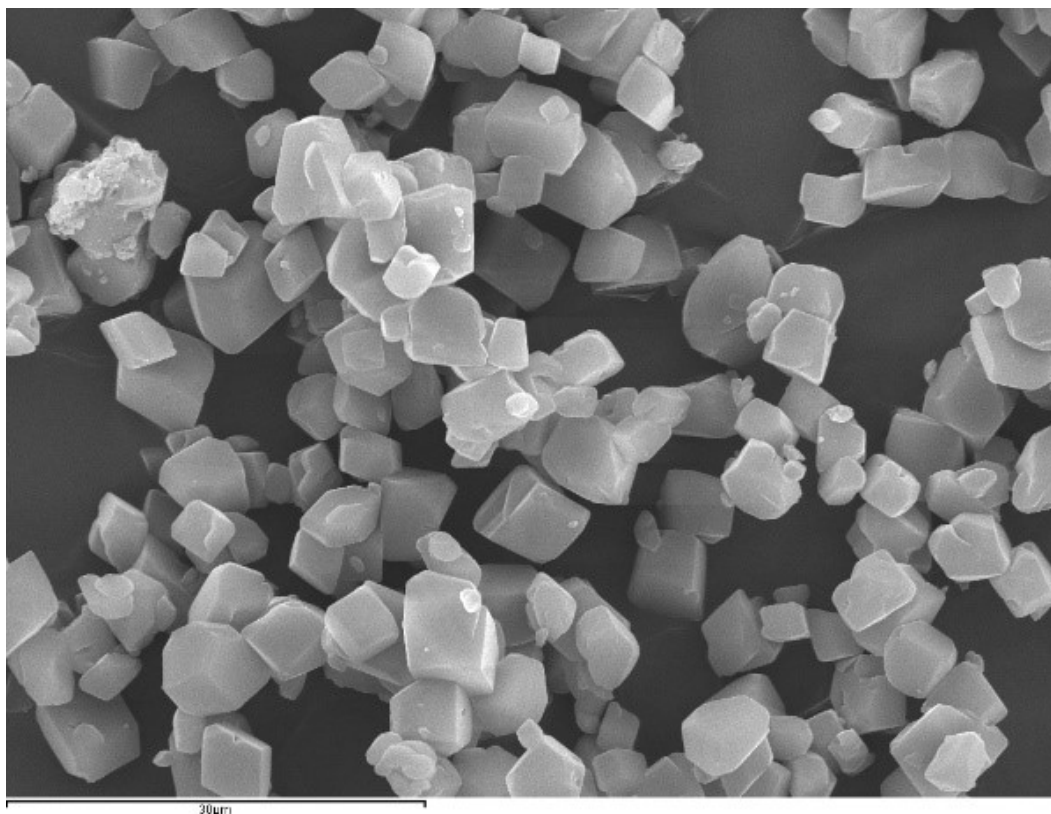


Figura 43: Microfotografía de muestra de MLX, materia prima, a un aumento de 1500X.

En otros artículos [156] [141] [157] [158] [159] [160] [117] [161] esta técnica también se emplea para caracterizar de forma fisicoquímica formulaciones de MLX, encontrando la misma estructura en las imágenes del microscopio electrónico. Esto ocurre en el artículo de Bartos C et al. [160] en cuya microfotografía del MLX materia prima, se pueden apreciar los característicos cristales angulares y prismáticos del fármaco.

Esa estructura tan característica del MLX se puede observar bien en los granulados analizados a 200X de aumento, así como su progresión a lo largo de las muestras con distintas capas de recubrimiento, percibiéndose más fácilmente en el granulado sometido a una única granulación con el Eudragit® NM (**Figura 44.A**), y difícilmente en el granulado final CNM, el realizado con cuatro granulaciones sucesivas con Eudragit® (**Figura 44.C**). Sin llegar a verse, puesto que no está presente, en los granulados placebo, independientemente de si sufrieron una única granulación con Eudragit®NM, como en el caso del PLACEBO 1C (**Figura 44.B**) o el mismo número de granulaciones sucesivas que la formulación seleccionada, el PLACEBO 4C (**Figura 44.D**).

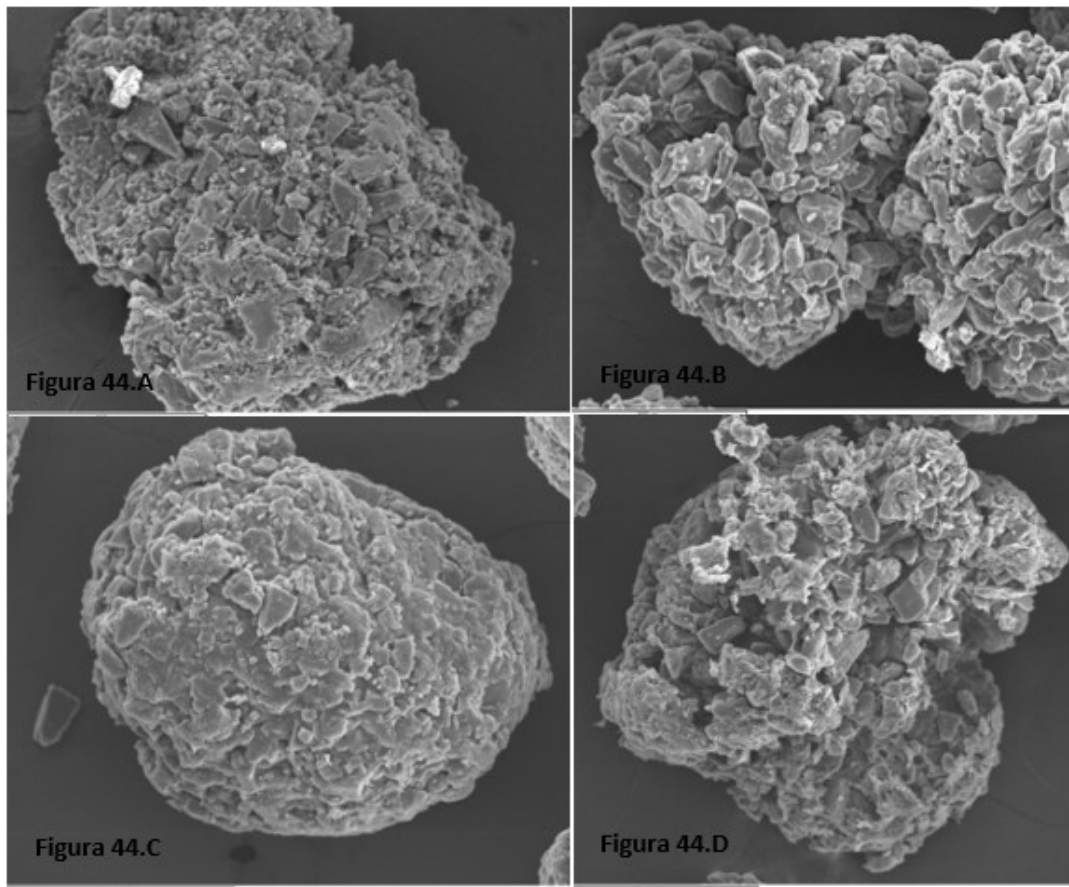


Figura 44: Comparación de microfotografías obtenidas por SEM a un aumento de 200X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C

Si comparamos la muestra de granulado CNM con una granulación (**Figura 44.A**) con la de todas las capas de Eudragit® (**Figura 44.C**) observamos una mayor presencia de cristales de MLX en la superficie del granulado con menor número de capas de aglutinante, lo que determina que el Eudragit® recubre de forma más efectiva la formulación con las 4 capas de polímero, permitiendo así la liberación modificada del principio activo. Esto se confirma con el análisis a 200X de aumento del SEM, de la muestra CNM C2 (**Figura 45**), con dos granulaciones sucesivas de Eudragit® NM, donde aún se aprecian los cristales de MLX pero de forma más leve que en el CNM C1 (**Figura 44A**).

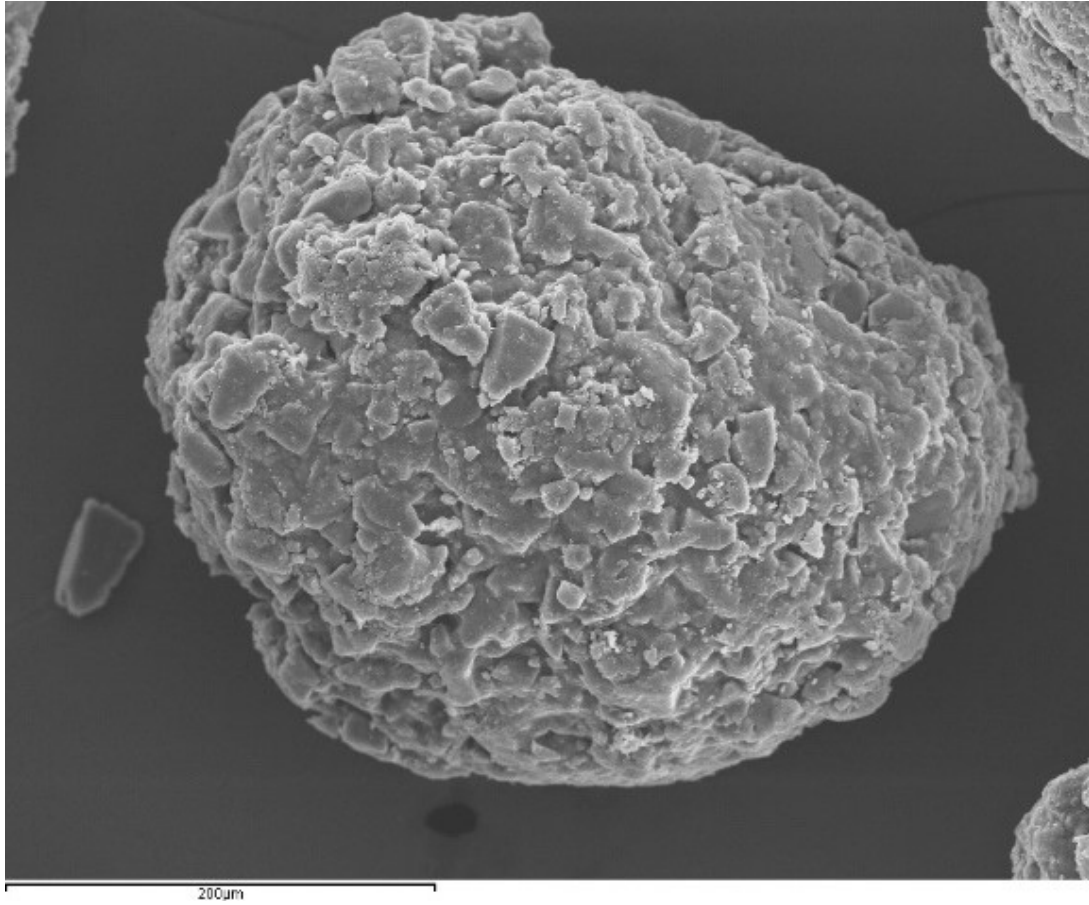


Figura 45: Microfotografía de muestra CNM 2C, observada a través del aumento 200X del SEM

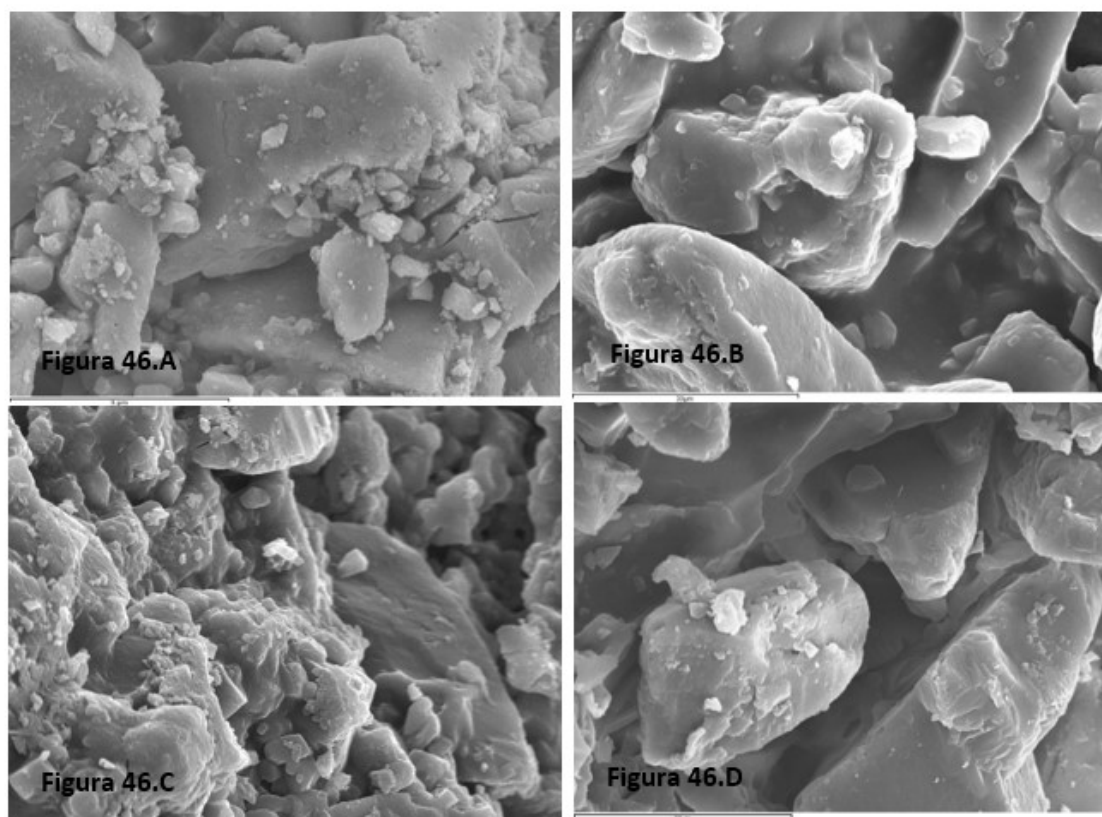


Figura 46: Comparación de microfotografías obtenidas por SEM a un aumento de 1500X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C.

Este detalle, se aprecia mejor en las microfotografías obtenidas con un aumento de 1500X (**Figura 46**). Este aumento, además permite comprobar que el MLX no se aprecia en ninguna de las muestras de placebo realizadas (**Figuras 46.B y 46.D**), independientemente de las granulaciones sucesivas a las que se sometieran, observándose la presencia de lactosa únicamente, fácilmente distinguible por sus cristales (**Figura 13**) representados en el Handbook of excipients [117]

En las imágenes obtenidas en el SEM a un aumento de 20X (**Figuras 47 y 48**), también se pudo apreciar la homogeneidad de los granulados realizados, de tamaño 0,350 – 0,355 nm, este hecho destaca, sobre todo, en el granulado final, el CNM 4C (**Figura 47.C**).

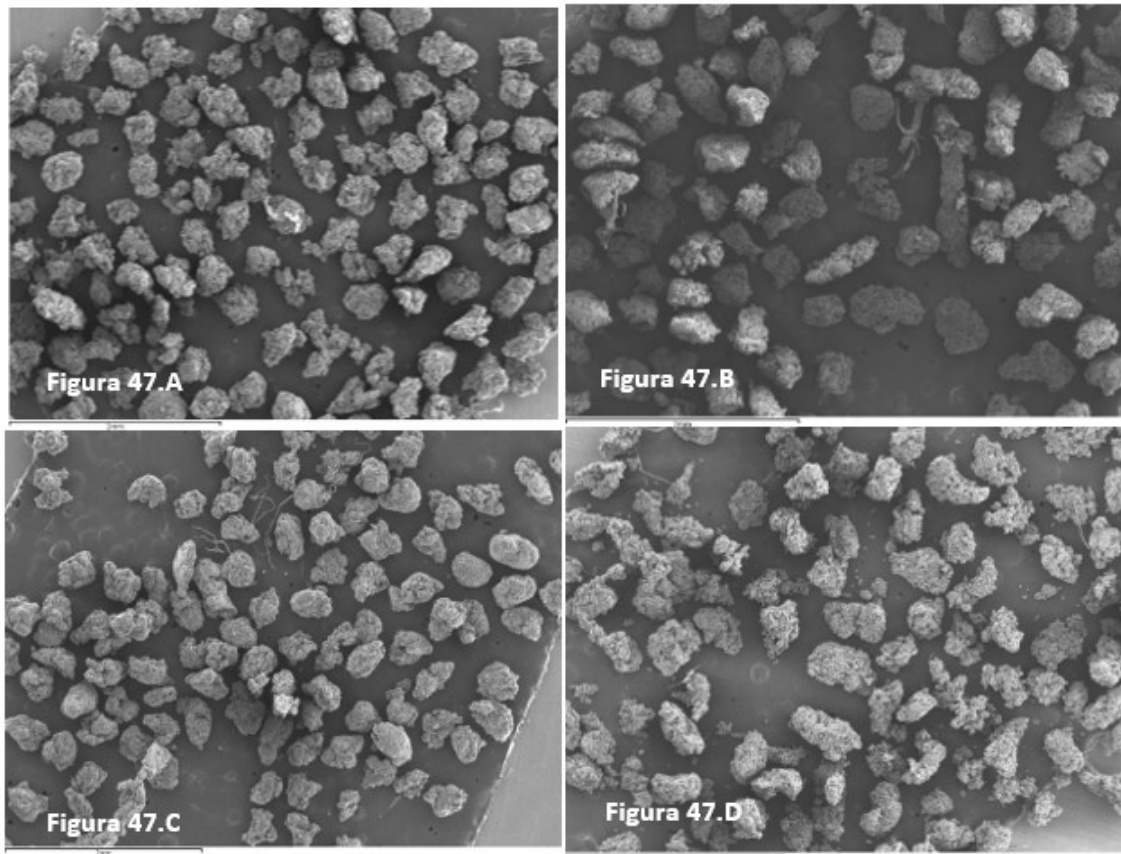


Figura 47: Comparación de microfotografías a un aumento de 20X: A CNM 1C; B PLACEBO 1C; C CNM 4C; D PLACEBO 4C.

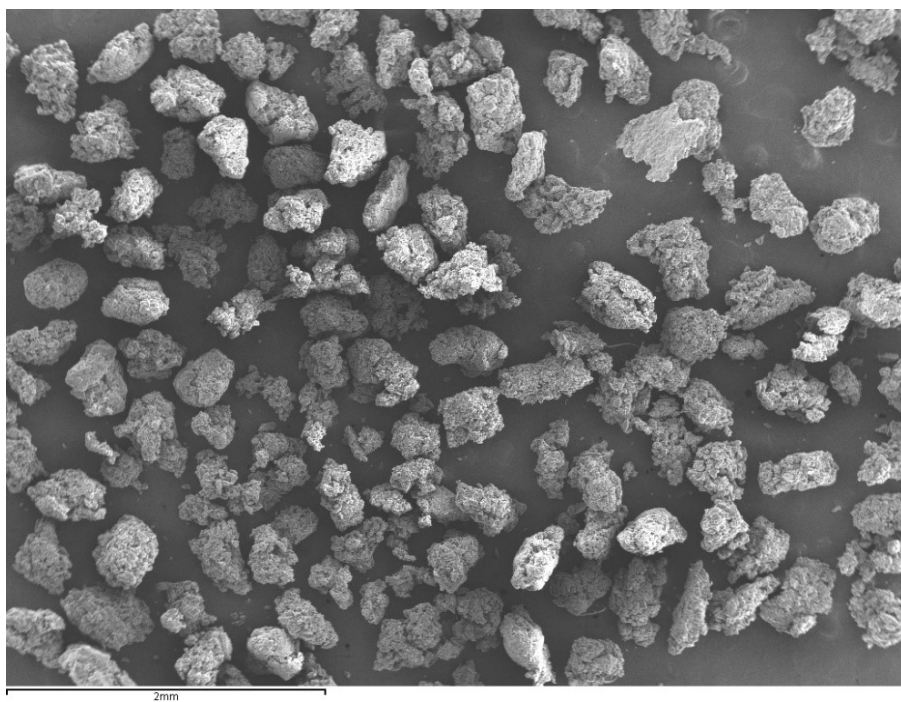


Figura 48: Microfotografía de muestra CNM 2C, a un aumento de 20X del SEM.

Difractometría de rayos X

Una técnica comúnmente usada para la caracterización física de materias primas es la difractometría de rayos X en polvo (XRPD). Mediante esta técnica, se analizaron la materia prima MLX, lactosa, Eudragit[®], Metolose[®] y el granulado CNM, un placebo de esta formulación realizado con lactosa y cuatro granulaciones sucesivas de Eudragit[®] NM. Para realizar una mejor evaluación de la superficie de la formulación seleccionada para los posteriores estudios *in vivo* (CNM) se utilizó la técnica de difractometría de rayos X con ángulo de incidencia rasante (GID) de 1^º [134]

La **figura 49** muestra las diferencias entre los difractogramas obtenidos por técnicas de XRPD y GID del granulado CNM que contiene MLX. El método clásico de XRPD muestra los principales picos característicos del MLX en el granulado CNM. Así mismo, cuando usamos la técnica GID también es posible distinguir los picos mayoritarios del MLX en posiciones del ángulo $2(\theta)$ de $8,5^\circ \pm 0,2$ y $14,54^\circ \pm 0,2$. En cambio, como cabía esperar, en el difractograma XRPD del granulado placebo de CNM no muestra ningún pico característico del MLX. En esta **figura 49** se muestra que el MLX materia prima se presenta, en su estado polimórfico III, el cuál se caracteriza por picos en las posiciones de $8,5^\circ \pm 0,2$, $10,7^\circ \pm 0,2$, $12,7^\circ \pm 0,2$ y $14,54^\circ \pm 0,2$ [162].

Sin embargo, con la técnica GID en la formulación CNM aparece un pico en la posición $28,4^\circ \pm 0,2$ con una intensidad bastante alta, que se corresponde con un componente del granulado especialmente cristalino y con cristales de gran tamaño, posiblemente debido a la lactosa. En todas las muestras analizadas por la técnica clásica de XRPD, a excepción del MLX materia prima, se aprecia un pico idéntico en esta posición, independientemente de contener MLX o no, por lo que se decide analizar los excipientes (**ver figura 50**) que componen ambos granulados CNM y su placebo, para intentar identificarlo. Se analizan así la lactosa, la celulosa Metolose[®] y el Eudragit[®] NM, éste último se dejó secar previamente en un vidrio de reloj, pulverizándolo posteriormente para poder someterlo a la técnica de difractometria XRPD.

Los difractogramas del Metolose[®] y Eudragit[®] NM presentaron halos que se pueden asociar con un estado semicristalino, pero mayoritariamente amorfo. La celulosa Metolose[®] puede presentar un modesto grado de cristalinidad que ha sido descrito con anterioridad por diversos autores [163] [164] [165], así como el Eudragit[®] [166] [167]. Se observó, de esta forma, que los picos de la posición $28,4^\circ \pm 0,2$ de los granulados CNM estudiados por la técnica clásica y GID y de su placebo se correspondían con los de la lactosa (**Figura 50**).

A la vista de estos resultados se podría confirmar que mediante la técnica GID podemos evaluar la superficie de los gránulos de la formulación CNM que contienen en su mayoría lactosa.

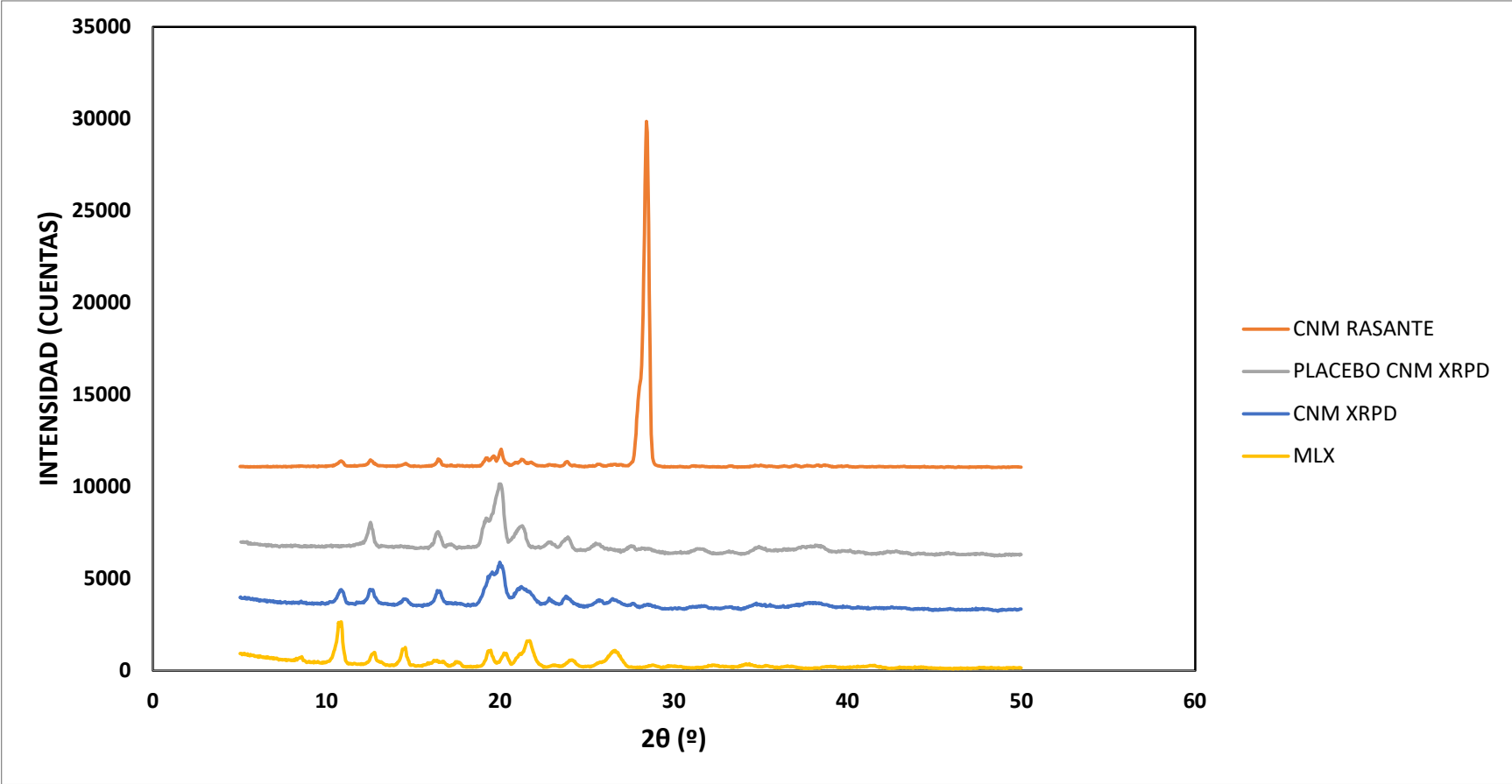


Figura 49: Difractogramas de rayos X en polvo de MLX, la formulación CNM y de su placebo y con ángulo de incidencia rasante (GID) de CNM

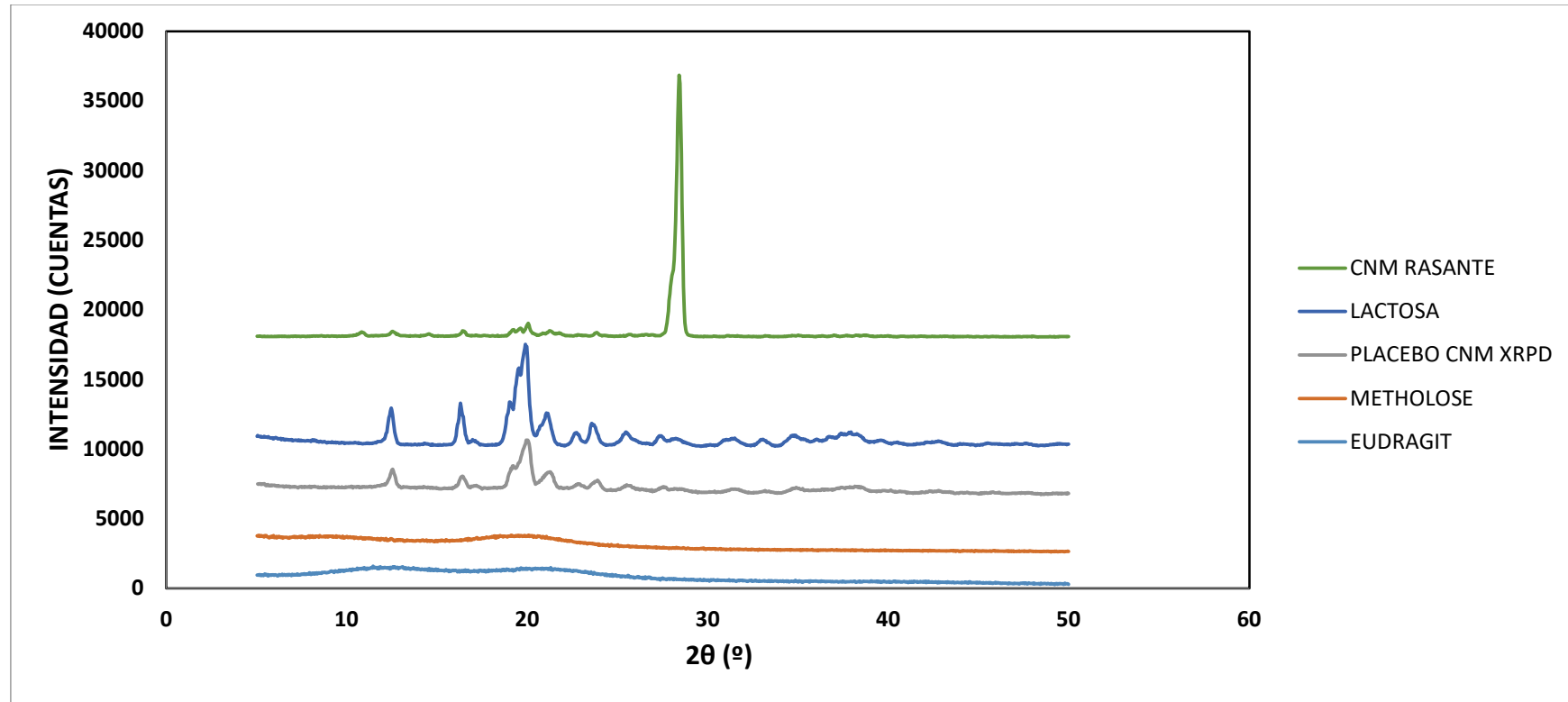


Figura 50: Difractogramas de rayos X en polvo de Lactosa, Metolose®, Eudragit® NM y el placebo del granulado CNM y con ángulo de incidencia rasante (GID) de CNM

Ensayos *in vivo* con la formulación seleccionada

Mediante los ensayos *in vivo* con ratones Swiss CD1, se pretende demostrar que la formulación seleccionada, el granulado CNM, llega al colon, su lugar de acción, liberando en esa zona el MLX de una forma adecuada.

Los ensayos llevados a cabo fueron los que se resumen en la siguiente tabla (**Tabla 19**)

Tabla 19: Resumen de ensayos *in vivo* realizados

Número de ensayo	Formulación, tamaño de diámetro (mm) y dosis administrada	Número de ratones por grupo	Tiempos de muestreo tejidos	Tejido analizado	Tiempo de muestreo del plasma	Tratamiento de heces	
1	CNM de 0,85 – 1,00 mm a 1 mg/kg de peso	4	3, 6 y 18 h	Intestino delgado e intestino grueso	30 min	Eliminadas de las muestras tomadas, por arrastre	
2	2.1	CNM de 0,350 – 0,355 mm a 1 mg/kg de peso	4	3, 6 y 8 h	Intestino delgado e intestino grueso	3, 6 y 8 h	Las heces permanecen para ser analizadas con su tejido correspondiente
	2.2	CNM de 0,350 – 0,355 mm a 2 mg/kg de peso	4	3, 6 y 8 h	Intestino delgado e intestino grueso	3, 6 y 8 h	
3	CNM de 0,350 – 0,355 mm a 1 mg/kg de peso.	3 problema y 2 control	6 h	Intestino delgado, intestino grueso y ciego	6 h	Las heces se extraen por arrastre de cada tejido y se analizan como una muestra a parte	

Primer ensayo en ratones

Se administraron dosis de 1 mg/kg peso del granulado CNM, formulación elegida por obtener los mejores resultados de velocidad de disolución, con un tamaño de 0,85 – 1,00 mm de diámetro. Otros tamaños de partícula y dosis similares se utilizaron en trabajos donde se ensayaron distintas formulaciones como suspensiones de MLX materia prima en terneros [168], formulaciones de liberación inmediata en ratas [169], comprimidos comerciales de 15mg de MLX en llamas [170], sistemas multiparticulares de liberación sostenida de MLX y otros analgésicos en ratones [115], MLX vía oral en dosis única y dosis múltiple en ratones [171] y una dispersión oral de un sistema multiparticular de MLX frente a su administración intramuscular en pingüinos africanos [172]. Tras la administración, se analizaron distintas muestras de plasma de los ratones Swiss sacrificados a los 30 min, y del intestino delgado y grueso, eliminando las heces por arrastre, tanto de los ratones sacrificados a las 3 h como aquellos sacrificados a las 6 h.

La concentración plasmática media de MLX hallada en el experimento nº 1 (**Tabla 20**) era de $0,44 \pm 0,20$ µg/ml a la media hora de la administración.

En otros estudios que utilizaban formulaciones de MLX, realizados en potros [173] de días de edad, al administrar dosis de 0,6 mg/kg de peso la concentración plasmática máxima obtenida fue de 1 µg/ml, mientras que si se administraban dosis de 3,0 mg/kg, las concentraciones variaban de 0,97 a 6,24 µg/ml. Las concentraciones plasmáticas máximas varían con la dosis administrada y con el animal de estudio, ya que en llamas [170], dosis orales como las administradas en este primer ensayo *in vivo* de la tesis, 1,0 mg/kg, daban una concentración plasmática máxima de 12 a 24 h, de 1,314 µg/ml, no llegando a 0,1 µg/ml a los 30 min. Sin embargo, en ratones, el animal de los ensayos realizados durante esta tesis, la concentración plasmática máxima ocurre a las 4 h tras la administración oral de MLX materia prima [174] y en dosis de 20,0 mg/kg fue de 16,7 µg/ml, mientras que a los 30 min de la administración, las concentraciones plasmáticas detectadas fueron en torno a 2,5 µg/ml, dejando de detectar MLX tras las 24 h de la administración. El t_{MAX} de 4 h también se repite en el artículo de Carrasco-Portugal M del C et al [175] donde la C_{MAX} es de $0,702 \pm 0,027$ µg/ml tras la administración oral de un comprimido de MLX de liberación inmediata de 7,5 mg de dosis en humanos.

En otro ensayo en ratones [115] se observa que la concentración plasmática máxima ocurre a las 2 h (5 µg/ml), tras la administración subcutánea de dosis de 1 mg/kg MLX materia prima, y pasadas 4 h tras la administración, la concentración plasmática disminuye llegando a ser indetectable a las 12 h.

Sin embargo, en publicaciones con formulaciones de liberación colónica de MLX [151] [40] [176], las concentraciones plasmáticas eran muy bajas, ya que el principio activo no comenzaba a ceder hasta pasadas 5 h tras la administración, lo que coincidía con su llegada al lugar de acción. En base a esa información, cabía esperar un aumento de la

concentración plasmática a tiempos mayores al estudiado en este primer estudio, por lo que en los siguientes ensayos se planteó la toma de muestras plasmáticas también a las 8 h.

Tabla 20: Resultado del análisis de MLX por HPLC de muestras de plasma de ratón del primer ensayo tras 30 min de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)

TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	RATÓN	IDENTIFICADOR	Conc (µg/ml)	Conc media (µg/ml)±DE
30 min (plasma)	1	Plasma 1	0,72	0,44 ± 0,20
	2	Plasma 2	0,43	
	3	Plasma 3	0,30	
	4	Plasma 4	0,31	

En las muestras intestinales tomadas a las 3 h de la administración (**Tabla 21**), en intestino delgado se observa una cantidad media de fármaco de $7,77 \pm 2,13$ µg, mientras que en el intestino grueso es de $2,65 \pm 0,55$ µg. Se deduce que el MLX está comenzando a llegar a intestino, ya que se sabe que, en ratones, a partir de los 30 min y hasta las 6 h el MLX pasa por el estómago, y no es hasta pasados los 90 min – 3 h que comienza a llegar al intestino grueso, ya que su presencia en heces no se detecta hasta las 3 h desde su administración. [174] [177] [178] [179]

Sin embargo, en las muestras tomadas tras 6 h de ser administradas las formulaciones (**Tabla 22**) la detección media de MLX tanto en intestino delgado ($9,86 \pm 5,90$ µg) como en intestino grueso ($2,70 \pm 0,37$ µg) son superiores porque el tiempo transcurrido ha permitido la llegada de más granulado a la zona.

Se trataron los resultados del análisis de muestras intestinales en HPLC con el programa Statgraphics®, resultando que la diferencia entre medias de cantidad de fármaco presente en intestino delgado e intestino grueso a las 3 h era estadísticamente significativa ($P < 0,05$), con un nivel de confianza del 95,0 %, sin embargo, a las 6 h la diferencia entre ambos intestinos dejaba de ser estadísticamente significativa ($P > 0,05$).

Una evolución similar de las concentraciones se observa en estudios de Mayur M Patel [176] [40], en los que distintos comprimidos de liberación colónica de MLX, unas con microesferas realizadas con Eudragit® S100 [176] y otras recubiertas con FS 30D [40] son administradas a conejos, logrando llegar intactas tras 5 h al colon, donde comienzan su cesión, demostrando así la viabilidad de las formulaciones para el tratamiento de enfermedades de esa zona.

De la misma forma, en el ensayo de Gao C et al. [151] realizado con perros Beagle a los que se administraron pellets recubiertos con Eudragit® FS 30D, se demostró que el recubrimiento con un 15 % de Eudragit® retardaba la liberación del principio activo (3,0

$\pm 0,8h$) frente a pellets sin recubrir ($0,6 \pm 0,3 h$) e igualmente, el recubrimiento con el polímero reducía la concentración plasmática hallada.

Los resultados de estos autores [151] [176] [176] son comparables con los de este primer ensayo *in vivo*, ya que los granulados a estudio contienen un 30 % de Eudragit®, por lo que cabría esperar que su liberación comenzara pasadas las 5 h de la administración, lo que concuerda con unas concentraciones intestinales medias más altas en las muestras de las 6 h que en las muestras de las 3 h.

A la vista de todos estos resultados, se decidió desarrollar otro experimento *in vivo*, el experimento nº 2, con dos dosis diferentes de fármaco, 1 mg/kg para el ensayo 2.1. y 2 mg/kg [173] para el ensayo 2.2, volviendo a analizar muestras de plasma, intestino delgado e intestino grueso, pero con la gran diferencia de no eliminar las heces, tomadas a las 3, 6 y 8 h tras la administración, para averiguar si en el primer experimento donde se habían eliminado las heces por arrastre, se habían alterado las cantidades de MLX halladas, la evolución de la concentración plasmática a las distintas horas y si a las 8 h se conseguía una mayor concentración en el lugar deseado, el colon.

Tabla 21: Resultados del análisis de MLX por HPLC de muestras de intestino delgado y grueso de ratón del primer ensayo tras 3h de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)

TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	RATÓN	IDENTIFICADOR	Cantidad MLX(μ g)	Cantidad MLX media (μ g) \pm DE
3 HORAS (Intestino delgado)	1	R1 3h ID	10,85	7,77 \pm 2,13
	2	R2 3h ID	6,77	
	3	R3 3h ID	7,41	
	4	R4 3h ID	6,03	
3 HORAS (Intestino grueso)	1	R1 3h IG	2,71	2,65 \pm 0,55
	2	R2 3h IG	2,04	
	3	R3 3h IG	2,48	
	4	R4 3h IG	3,36	

Tabla 22: Resultados del análisis de MLX por HPLC de muestras de intestino delgado y grueso de ratón del primer ensayo tras 6 h de administración de la formulación CNM (dosis 1mg/kg peso)

TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	RATÓN	IDENTIFICADOR	Cantidad MLX (μg)	Cantidad MLX media (μg) \pm DE
6 HORAS (intestino delgado)	1	R1 6h ID	12,33	9,86 \pm 5,90
	2	R2 6h ID	1,79	
	3	R3 6h ID	15,61	
	4	R4 6h ID	9,72	
6 HORAS (intestino grueso)	1	R1 6h IG	2,41	2,70 \pm 0,37
	2	R2 6h IG	2,40	
	3	R3 6h IG	3,19	
	4	R4 6h IG	2,77	

Segundo ensayo en ratones

Este ensayo se llevó a cabo con ratones Swiss CD1 tratados con dosis 1 mg/kg peso (ensayo 2.1) y 2 mg/kg peso (ensayo 2.2) de granulado CNM de 0,350 - 0,355 mm de diámetro. Se decidió cambiar el tamaño del granulado a administrar a los animales, por problemas de paso a través de la cánula de administración, reduciéndolo a un rango más estrecho para mejorar la homogeneidad de dosis.

El ensayo se realizó frente a un grupo control, se analizaron muestras de plasma, intestino delgado e intestino grueso (sin eliminar las heces), tomadas a las 3, 6 y 8 h tras la administración. En este ensayo además se confirmó si la eliminación de las heces por arrastre alteraba la cantidad de MLX hallada en el ensayo anterior, y se observó la evolución de la concentración plasmática a las distintas horas para comprobar si en el colon se apreciaba una mayor concentración a las 8 h.

Según artículos como el de Ingrao JC, et al [174], donde la dosis administrada fue de 20 mg/kg en ratones macho C57BL/6, nuestra dosis máxima de 2 mg/kg, sería segura para los animales en estudio.

Los resultados obtenidos en plasma (**tabla 23**) demuestran que la presencia del MLX en sangre es muy baja a las dosis administradas, así tras la administración de 1 mg/kg de peso de MLX, se alcanza una C_{max} a las 6 h de $0,076 \pm 0,029 \mu\text{g/ml}$, mientras que tras la administración de 2 mg/kg de peso de MLX, el máximo se alcanza a las 3 h ($0,213 \pm 0,031 \mu\text{g/ml}$), no llegando ninguno a la concentración observada en el primer ensayo *in vivo*, en el que, con un tamaño de partícula 0,85 – 1,00 mm, tras 30 min, en sangre se alcanzaba una C_{max} de $0,44 \mu\text{g/ml}$.

El hecho de que con la dosis 1 mg/kg se observen concentraciones plasmáticas más altas a las 6 h tras la administración y que con la dosis 2 mg/kg, estas se observen a las 3 h, reafirma los resultados del artículo anteriormente citado [174], donde la administración oral de 20,0 mg/kg de MLX, mostraba su C_{MAX} de $16,7 \mu\text{g/ml}$ a las 4 h, tras las cuales comenzaba a disminuir, mostrando menos de la mitad de esa C_{MAX} a las 6 h, llegando a ser indetectable a las 24 h.

Con estos resultados, observamos que la absorción sistémica de la formulación CNM es despreciable, ya que, en ningún caso, supera una concentración de $0,5 \mu\text{g/ml}$. Esto mismo sucede con otras formulaciones colónicas [151] [176] [40] [180], ya que liberan el fármaco entre 5 – 8 h y es cuando se empiezan a detectar resultados en sangre.

Estos hallazgos quedan confirmados en el artículo de Romero-Castro A, et al. [180] donde se comparan tres rutas de administración, intraperitoneal, oral e intravenosa de un derivado sintético del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) en ratas Wistar, logrando la llegada al intestino y al colon en las dos primeras rutas, ya que solamente una pequeña fracción del principio activo era absorbida en el estómago.

En los resultados del análisis de muestras de intestino grueso (**tabla 24**) se observa poca diferencia entre las cantidades medias halladas a cada tiempo de las dos dosis (1 mg/kg y 2 mg/kg), pero la variabilidad interindividual es elevada.

Al realizar el análisis estadístico mediante el programa Statgraphics® de las cantidades obtenidas en intestino grueso tras la administración de dosis 1 mg/kg y 2 mg/kg a las 3 h, y de las dos dosis a las 6 h, en ambos casos, el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias contiene el valor de 0, por lo que se confirma que no hay diferencia significativa entre las medias de las muestras de datos, con un nivel de confianza del 95,0 % ($p > 0,05$).

Observando la evolución de la concentración de MLX en el intestino grueso con respecto al tiempo, a las 6 h ($11,51 \pm 4,92 \mu\text{g}$ de MLX en dosis 1 mg/kg y $12,57 \pm 7,99 \mu\text{g}$ en dosis 2 mg/kg respectivamente) hay casi el doble de concentración que a las 3 h ($7,59 \pm 6,62 \mu\text{g}$ en dosis 1 mg/kg y $5,45 \pm 1,52 \mu\text{g}$ en el doble de dosis respectivamente), pero ésta descende a las 8 h a valores inferiores a los iniciales ($4,77 \pm 1,68 \mu\text{g}$ de MLX en la dosis 1 mg/kg y $4,57 \pm 4,42 \mu\text{g}$ en la de 2 mg/kg).

A pesar de que en diversos artículos de la bibliografía consultada [174] [181] [182] se administraron dosis de 20 mg/kg de peso en ratones, tanto por vía oral [174] como subcutánea, sin efectos adversos remarcados, y llegando a tener efectos positivos, al inducir radioprotección [182] [183], para ensayos posteriores en esta investigación se selecciona la dosis 1 mg/kg peso, puesto que aparentemente no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas a las 6 y 8 h y, además seguramente esta dosis poseerá menores efectos adversos ya que, a dosis 2 mg/kg de peso, se observó que uno de los ratones tratados tenía mal aspecto y presentaba temblores y sus intestinos estaban oscurecidos, quizá por presencia de sangre, lo que se podría relacionar con la toxicidad generada por el principio activo administrado. Se puso en evidencia que en estudios como el de Alencar et al. [184] en tratamientos de 2 mg/kg de MLX durante 16 días en perros se observaba el efecto ulcerogénico del principio activo, con un incremento de leucocitos y anemia, o el artículo publicado en 2011 en Toxicology International [185], en el que se observa el efecto tóxico de la administración de MLX con dosis de 1,2 y 2,4 mg/kg de peso, similares a las administradas en este segundo ensayo de la investigación, durante 28 días en ratas Wistar, registrando un aumento en leucocitos, neutrófilos, bilirrubina, creatinina y alcalina fosfatasa en plasma, que reflejaban hepatotoxicidad [186] y nefrotoxicidad. El aumento de creatinina en plasma también es notable en ensayos realizados con perros tratados con MLX a dosis 1 mg/kg y 2 mg/kg de peso [187].

En el intestino delgado, se puede apreciar cantidades de MLX inferiores a las presentes en el intestino grueso a las mismas horas de análisis (**tabla 25**), llegando a hallarse más del doble de concentración en intestino grueso ($7,59 \pm 6,62 \mu\text{g}$ a las 3 h y $11,51 \pm 4,92 \mu\text{g}$ de MLX a las 6 h) que en delgado ($3,34 \pm 0,46 \mu\text{g}$ a las 3 h y $3,87 \mu\text{g} \pm 2,79$ de MLX a las 6 h) al mismo tiempo de estudio en la dosis 1 mg/kg peso, y, en la dosis 2 mg/kg de peso, una cantidad muy similar en ambos intestinos ($5,45 \pm 1,52 \mu\text{g}$ en intestino grueso y $4,00 \pm 0,73 \mu\text{g}$ en intestino delgado) trascurridas 3 h de la administración del

granulado, y casi tres veces superior en el intestino grueso ($12,57 \pm 7,99 \mu\text{g}$) que en el delgado ($4,46 \pm 2,56 \mu\text{g}$); este resultado es lógico según los tiempos de tránsito intestinal en los ratones [175] [177] [178] [179]. En este caso no se llegaron a analizar las muestras de las 8 h en intestino delgado debido a los probables tiempos de tránsito intestinal [176] [40], y se decidió invertir recursos en el análisis del ensayo *in vivo* posterior, porque tras 8 h de administración la presencia del MLX es menor en esta zona del tracto gastro-intestinal.

Tabla 23: Concentración plasmática de ratones tratados con la formulación CNM a dos dosis diferentes (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) después de 3, 6 y 8 h tras su administración, hallada por análisis en HPLC, en el segundo ensayo

Dosis (mg/kg peso)	TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	RATÓN	IDENTIFICADOR	Conc ($\mu\text{g/ml}$) plasmática	Conc media ($\mu\text{g/ml}$) \pm DE
DOSIS 1	3 HORAS	1	D1 3H R1	0,095	0,036 \pm 0,035
		2	D1 3H R2	0,026	
		3	D1 3H R3	0,002	
		4	D1 3H R4	0,021	
	6 HORAS	1	D1 6H R1	0,050	0,076 \pm 0,029
		2	D1 6H R2	0,052	
		3	D1 6H R3	0,122	
		4	D1 6H R4	0,078	
	8 HORAS	1	D1 8H R1	0,094	0,058 \pm 0,036
		2	D1 8H R2	0,054	
		3	D1 8H R3	0,001	
		4	D1 8H R4	0,083	
DOSIS 2	3 HORAS	1	D2 3H R1	0,169	0,213 \pm 0,031
		2	D2 3H R2	0,210	
		3	D2 3H R3	0,255	
		4	D2 3H R4	0,220	
	6 HORAS	1	D2 6H R1	0,005	0,042 \pm 0,051
		2	D2 6H R2	0,130	
		3	D2 6H R3	0,030	
		4	D2 6H R4	0,005	
	8 HORAS	1	D2 8H R1	0,097	0,081 \pm 0,047
		2	D2 8H R2	0,025	
		3	D2 8H R3	0,149	
		4	D2 8H R4	0,051	

Tabla 24: Cantidad de MLX en intestino grueso de ratones tratados con la formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) a 3, 6 y 8 h tras su administración, en el segundo experimento in vivo

DOSIS (mg/kg peso)	TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	IDENTIFICADOR DE IG	Cantidad MLX (µg)	Cantidad MLX media (µg) ± DE
DOSIS 1	3 HORAS	D1 3H R1	13,70	7,59 ± 6,62
		D1 3H R2	14,71	
		D1 3H R3	1,30	
		D1 3H R4	0,67	
	6 HORAS	D1 6H R1	10,56	11,51 ± 4,92
		D1 6H R2	16,08	
		D1 6H R3	15,56	
		D1 6H R4	3,84	
	8 HORAS	D1 8H R1	6,91	4,77 ± 1,68
		D1 8H R2	5,90	
		D1 8H R3	2,98	
		D1 8H R4	3,29	
DOSIS 2	3 HORAS	D2 3H R1	5,43	5,45 ± 1,52
		D2 3H R2	4,03	
		D2 3H R3	7,92	
		D2 3H R4	4,41	
	6 HORAS	D2 6H R1	21,47	12,57 ± 7,99
		D2 6H R2	4,13	
		D2 6H R3	19,58	
		D2 6H R4	5,11	
	8 HORAS	D2 8H R1	7,64	4,57 ± 2,42
		D2 8H R2	1,42	
		D2 8H R3	3,16	
		D2 8H R4	6,05	

Tabla 25: Cantidad de MLX en intestino delgado de ratones tratados con la formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso y 2 mg/kg peso) a 3 y 6 h tras su administración, en el experimento segundo

DOSIS (mg/kg peso)	TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	IDENTIFICADOR DE ID	Cantidad MLX (μg)	Cantidad media MLX (μg) \pm DE
DOSIS 1	3 HORAS	D1 3H R1	3,66	3,34 \pm 0,43
		D1 3H R2	2,72	
		D1 3H R3	3,81	
		D1 3H R4	3,71	
	6 HORAS	D1 6H R1	1,24	3,87 \pm 2,79
		D1 6H R2	7,61	
		D1 6H R3	5,51	
		D1 6H R4	1,11	
DOSIS 2	3 HORAS	D2 3H R1	4,63	4,00 \pm 0,73
		D2 3H R2	3,67	
		D2 3H R3	4,74	
		D2 3H R4	2,95	
	6 HORAS	D2 6H R1	3,44	4,46 \pm 2,56
		D2 6H R2	6,44	
		D2 6H R3	0,76	
		D2 6H R4	7,19	

Tercer ensayo en ratones

En el tercer ensayo, realizado con ratones Swiss CD1, se mantuvo el tamaño de granulado CNM seleccionado en el ensayo anterior, 0,350 – 0,355 mm, a la dosis de 1 mg/kg de peso, por los motivos ya expuestos, tomando las muestras a las 6 h tras la administración, ya que en los ensayos *in vivo* anteriores se demostró que era el tiempo al que la presencia de MLX en los tejidos era más elevada. Además, las muestras tomadas de intestino se dividieron en intestino delgado, intestino grueso y ciego, eliminando sus respectivos contenidos en heces por arrastre y conservándolos también para su análisis, con el objetivo de localizar de una forma más efectiva la liberación del principio activo MLX.

Los resultados (**Tabla 26**) del análisis en HPLC de las muestras plasmáticas tomadas a las 6 h tras la administración en ratones tratados con dosis 1 mg/kg de peso del granulado CNM en tamaño 0,350 – 0,355 mm muestran una concentración plasmática de MLX casi nula ($0,06 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$), lo que se podría traducir en una baja absorción sistémica, lo que reafirma los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* realizados anteriormente, y que es propio del tipo de liberación en estudio, siendo ésta, la liberación colónica [151] [40] [176] [180]

En la **tabla 27**, de los resultados del análisis en HPLC de las muestras de intestino delgado, intestino grueso, ciego y sus respectivos contenidos fecales, se observa que, en todos los casos, el contenido fecal presentaba mayor presencia de MLX que el tejido en el que se hallaba, lo que no significa necesariamente que el granulado hubiera liberado el principio activo en esa área, ya que podría haber continuado su trayectoria intestinal. Sin embargo, la mayor cantidad de MLX la presentaba el contenido fecal del intestino grueso ($10,36 \pm 6,42 \mu\text{g}$), lo que significa que, en su mayoría, el granulado había conseguido llegar intacto hasta ese tramo del tracto gastrointestinal.

En cambio, el tejido que mayor cantidad presentaba del principio activo fue el intestino delgado ($3,35 \pm 3,13 \mu\text{g}$), de lo que podemos deducir que el granulado CNM comenzaba a liberar MLX en esa zona.

Tabla 26: Concentración plasmática de MLX, hallada por análisis en HPLC, en ratones tratados con formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso) a las 6 h tras su administración

DOSIS (mg/kg peso)	TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	IDENTIFICADOR DE MUESTRA	Conc plasmática (µg /ml)	Conc media (µg /ml) ± DE
PLASMA	PLASMA	Tratado 1 plasma	0,06	0,06 ± 0,05
		Tratado 2 plasma	0,13	
		Tratado 3 plasma	0,00	

Tabla 27: Cantidad de MLX, hallada por análisis en HPLC, en ratones tratados con formulación CNM (dosis 1 mg/kg peso) a las 6 h tras su administración, en ciego, intestino grueso, intestino delgado y sus respectivos contenidos fecales

DOSIS (mg/kg peso)	TIEMPO TRAS ADMINISTRACIÓN	IDENTIFICADOR DE MUESTRA	Cantidad MLX (µg)	Cantidad MLX media (µg) ± DE
CIEGO	TEJIDO	Tratado 1 ciego	0,02	0,03 ± 0,03
		Tratado 2 ciego	0,07	
		Tratado 3 ciego	0,01	
	CONTENIDO FECAL (CF)	Tratado 1 CF ciego	0,06	0,48 ± 0,64
		Tratado 2 CF ciego	0,00	
		Tratado 3 CF ciego	1,38	
INTESTINO GRUESO (IG)	TEJIDO	Tratado 1 IG	4,65	1,79 ± 2,03
		Tratado 2 IG	0,43	
		Tratado 3 IG	0,27	
	CONTENIDO FECAL (CF)	Tratado 1 CF IG	7,00	10,36 ± 6,42
		Trata	19,35	
		Tratado 3 CF IG	4,73	
INTESTINO DELGADO (ID)	TEJIDO	Tratado 1 ID	1,12	3,35 ± 3,13
		Tratado 2 ID	1,35	
		Tratado 3 ID	7,77	
	CONTENIDO FECAL (CF)	Tratado 1 CF ID	4,88	3,31 ± 2,33
		Tratado 2 CF ID	5,03	
		Tratado 3 CF ID	0,01	

A la vista de los resultados obtenidos podemos decir que se ha conseguido desarrollar un granulado de CNM para administración colónica diseñado para que alcance el intestino grueso, su lugar de acción, donde se liberará el principio activo MLX de manera mayoritaria, como habíamos previsto en los estudios de solubilidad y velocidad de disolución, obteniendo una forma farmacéutica con una morfología y una liberación adecuada para dicho efecto.

Conclusiones:

1. Se han diseñado distintos sistemas multiparticulares de MLX para administración colónica. Las formulaciones contienen distintos excipientes: lactosa, celulosa (Metolose®) y Eudragit® NM, FS o RS y combinaciones de estos polímeros.
2. Se estudió la solubilidad de los diferentes sistemas multiparticulares a pH 6,8. El granulado con mayor coeficiente de solubilidad, incluso por encima del de la sustancia activa, es el CFS, granulado con celulosa y Eudragit® FS. A continuación, le siguen con valores de solubilidad muy similares entre sí el MLX, materia prima, y los granulados RS, formulado con Eudragit® RS y el CNM, con Metolose® y Eudragit® NM. Los granulados restantes (RS + FS, CNM + CFS y FS) poseen coeficientes de solubilidad inferiores a 200 µg/ml.
3. El granulado CNM incorpora Eudragit® NM y la celulosa (Metolose®) aumentando la velocidad de disolución del MLX, a pH 6,8, mejorando la liberación del MLX en más de un 10% con respecto a las demás formulaciones y a la materia prima.
4. En condiciones de similitud con el tránsito gastrointestinal (paso por pH 1,2, 6,8 y 7,4), el granulado CNM, presenta las mejores características de liberación del MLX, superando al resto de granulados con el mismo tipo de Eudragit®, así como al MLX materia prima. Además, posee una cesión más sostenida con respecto a las otras formulaciones estudiadas, llegando a ser a las 8 h una de las que más MLX libera, posiblemente gracias a la presencia de Metolose® en su composición, y consiguiendo que no libere a pH gástrico, donde no interesa su cesión.
5. El tamaño de partícula de los gránulos afecta directamente a su superficie específica y por lo tanto a su velocidad de disolución. Se logra un mayor porcentaje de MLX disuelto en los granulados de menor diámetro, sin alterar el orden de los perfiles de disolución de los granulados a las 8 h.
6. Los resultados de SEM muestran la estructura prismática característica del MLX materia prima. Además, se observa que la granulación con CNM consigue recubrir de forma eficaz al MLX, para que su liberación sea sostenida a lo largo de todo el tracto gastrointestinal; y se muestra que este granulado posee una forma homogénea con un rango estrecho de tamaño de partícula, 0,350 – 0,355 mm, lo que facilitó su administración a través de las pequeñas cánulas en los ensayos *in vivo* realizados, permitiendo conseguir una dosificación homogénea.
7. Los resultados de difracción de rayos X de la formulación CNM demuestran que como se esperaba tras el proceso de granulación, la morfología original de todos los componentes se mantiene, observándose los picos característicos del

polimorfo III del MLX y de la estructura cristalina de la lactosa, y el estado semicristalino casi amorfo en su mayoría para el Eudragit NM y celulosa Metolose®. Así mismo, mediante la técnica de difracción con ángulo de incidencia rasante (GID) se ha observado que los gránulos poseen en su superficie grandes cristales de lactosa.

8. Con respecto a los ensayos *in vivo*, se ha conseguido que la formulación seleccionada CNM llegue a intestino. Se han obtenido resultados similares a dosis bajas (1mg/kg y de 2 mg/kg) comprobándose una mayor presencia de MLX a las 6 h en intestino grueso, manteniendo una concentración plasmática baja en todo momento. De lo que se puede deducir que el granulado CNM poseería acción local, con concentraciones plasmáticas casi inexistentes.

9. Se ha logrado una formulación de MLX de liberación colónica, que llega en su mayor parte, intacto al intestino grueso, con una cesión sostenida a lo largo del tracto intestinal por la utilización de Eudragit® NM en 4 granulaciones sucesivas y una liberación elevada de principio activo en el lugar de acción, gracias a la presencia de Metolose®. Asimismo, posee una forma y un tamaño homogéneo, idóneo para la administración oral, mediante cánula si fuera necesario en animales pequeños, en dosis de 1mg/kg de peso, y posiblemente apta para enfermedades que cursen con inflamación colónica como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y el cáncer de colon entre otras.

Bibliografía

Bibliografía

- [1] R. Martínez Pacheco, Tratado de tecnología Farmacéutica, Vol II, Madrid: Síntesis, 2016.
- [2] A. K. Philip y B. Philip, «Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches,» nº 25, 2010.
- [3] M. Chourasia y S. Jain, «Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems,» nº 6, pp. 33 - 66, 2003.
- [4] A. Basit y J. Bloor, «Perspectives on colonic drug delivery,» nº 185, 2003.
- [5] R. Friend y G. Chang, «Drug Glycosides: Potential prodrugs for colon specific drug delivery,» *J. Med. Chem.*, nº 28, pp. 51 - 57, 1985.
- [6] B. Singh, K. Kim, J. Swabrick y J. Boylan, In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, New York: Marcel Dekker, 2002.
- [7] L. Asghar y S. Chandran, «Multiparticulate Formulation Approach to Colon Specific Drug Delivery: Current Prospective,» *J. Pharm. Pharm. Sci.*, nº 9, pp. 327 - 338, 2006.
- [8] D. Friend R, «New Oral Delivery Systems for Treatment of Inflammatory Bowel Disease,» *Adv. Drug Deliver. Rev.*, nº 57, pp. 247 - 265, 2004.
- [9] F. Theeuwes, G. Guittard y P. Wong, «Delivery of drugs to colon by oral dosage forms». US Patent Patente 4904474, 1990.
- [10] P. Konturek, T. Brzozowski y S. Konturek, «Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract,» *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 2, nº 62, pp. 139 - 150, 2011.
- [11] H. Lin y M. Farkas, «Altered Circadian Rhythms and Breast Cancer: From the Human to the Molecular Level,» *Front Endocrinol (Lausanne)*, nº 9, p. 2019, 2018.
- [12] R. El-Athman, L. Fuhr y A. Religio, «A Systems-Level Analysis Reveals Circadian Regulation of Splicing in Colorectal Cancer,» *EBioMedicine*, nº 33, pp. 68 - 81, 2018.
- [13] L. Fuhr, R. El-Athman, R. Scrima y e. al., «The Circadian Clock Regulates Metabolic Phenotype Rewiring Via HKDC1 and Modulates Tumor Progression and Drug Response in Colorectal Cancer,» *EBioMedicine*, nº 33, pp. 105 - 121, 2018.

- [14] X. Liu, R. Yu, L. Zhu, X. Hou y K. Zou, «Bidirectional Regulation of Circadian Disturbance and Inflammation in Inflammatory Bowel Disease,» *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 10, nº 23, pp. 1741 - 1751, 2017.
- [15] N. Labrecque y N. Cermakian, «Circadian Clocks in the Immune System,» *J. Biol. Rhythms*, vol. 4, nº 30, pp. 277 - 290, 2015.
- [16] C. Scheiermann, J. Gibbs, L. Ince y A. Loudon, «Clocking in to immunity,» *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, nº 18, pp. 423 - 437, 2018.
- [17] M. Wilkinson, R. Maidstone, A. Loudon y e. al., «Circadian rhythm of exhaled biomarkers in health and asthma,» *Eur. Respir. J.*, vol. 4, nº 54, 2019.
- [18] P. Downton, J. Early y J. Gibbs, «Circadian rhythms in adaptive immunity,» *Immunology*, nº 10, 2019.
- [19] M. Smolensky, R. Hermida, A. Reinberg, L. Sackett-Lundeen y F. Portaluppi, «Circadian disruption: New clinical perspective of disease pathology and basis for chronotherapeutic intervention.,» *Chronobiol. Int.*, vol. 8, nº 33, pp. 1101 - 1119, 2016.
- [20] M. Cutolo, «Circadian rhythms and rheumatoid arthritis,» *Joint Bone Spine*, vol. 3, nº 86, pp. 327-333, 2019.
- [21] L. Hand, T. Hopwood, S. Dickson y e. al., «The circadian clock regulates inflammatory arthritis,» *FASEB J*, vol. 11, nº 30, pp. 3759-3770, 2016.
- [22] S. Marks, J. Schneider y S. Keely, «Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue,» *Nanomedicine*, nº 11, p. 1117 – 1132, 2015.
- [23] H. Cheng, S. Huang y G. Huang, «Design and application of oral colon administration system,» *J. of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, nº 34, p. 1590 – 1596, 2019.
- [24] A. Newton, L. Prabakaran y K. Jayaveera, «Pectin-HPMC E15LV vs pH sensitive polymer coating films for delayed drug delivery to colon: A comparison of two dissolution models to asses colonic targeting performance in-vitro.,» *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, nº 5, pp. 1 - 16, 2012.
- [25] Nidhi, M. Rashid, V. Kaur, S. Hallan, S. Sharma y N. Mishra, «Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review.,» *Saudi Pharm. J.*, nº 24, p. 458 – 472, 2016.
- [26] J. Naik y M. Waghulde, «Development of vildagliptin loaded Eudragit® microspheres by screening design: In vitro evaluation.,» *J. Pharm. Investig.*, nº 48, p. 627 – 637, 2018.

- [27] S. Hua, «Orally administered liposomal formulations for colon targeted drug delivery.,» *Front. Pharmacol.*, nº 5, p. 138, 2014.
- [28] M. Patel, «Cutting-edge technologies in colon-targeted drug delivery systems.,» *Expert Opin. Drug Deliv.*, nº 8, p. 1247 – 1258, 2011.
- [29] M. Naeem, M. Choi, J. Cao, Y. Lee, M. Ikram, S. Yoon, J. Lee, H. Moon, M. Kim, Y. Jung y e. al., «Colon-targeted delivery of budesonide using dual pH-and time-dependent polymeric nanoparticles for colitis therapy.,» *Drug Des. Devel. Ther.*, nº 9, p. 3789 – 3799, 2015.
- [30] A. Bak, M. Ashford y D. Brayden, «Local delivery of macromolecules to treat diseases associated with the colon.,» *Adv. Drug Deliv. Rev.*, nº 2 - 27, pp. 136 - 137, 2018.
- [31] A. Maroni, S. Moutaharrik, L. Zema y A. Gazzaniga, «Enteric coating for colonic drug delivery: State of the art.,» *Expert Opin. Drug Deliv*, nº 14, p. 1027 – 1029, 2017.
- [32] S. Vemula y P. Veerareddy, «Development, evaluation and pharmacokinetics of time-dependent ketorolac tromethamine tablets.,» *Exper. Opin. Drug Deliv.*, nº 10, pp. 33 - 45, 2013.
- [33] H. Park, H. Jung, M. Ho y e. al., «Colon-targeted delivery of solubilized bisacodyl by doubly enteric-coated multiple-unit tablet.,» *Eur. J. Pharm. Sci.*, nº 102, p. 172 – 179, 2017.
- [34] USP, The United States pharmacopeia., Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: The National Formulary, 2003.
- [35] F. Informations, «Meloxicam official FDA informations, side effects and uses” *Drugs.com.*,» [En línea]. Available: www.drugs.com/pro/meloxicam.htm. [Último acceso: Agosto 2020].
- [36] B. I. V. G. USA, «Professional insert NADA 141 - 213». USA Patente 6184222.
- [37] S. Sweetman y Martindale, *The complete drug reference*, 37ª Ed, 2012.
- [38] *British Pharmacopeia*, 2020.
- [39] R. Srivastava, D. Kumar y K. Pathak, «Colonic luminal surface retention of meloxicam microsponges delivered by erosion based colon-targeted matrix tablet.,» *Inter. J. of Pharm.*, nº 427, pp. 153-162, 2012.
- [40] M. Patel y A. Amin, «Formulation and development of release modulated colon targeted system of meloxicam for potential application in the prophylaxis of colorectal cancer.,» *Drug Deliv.*, nº 18, pp. 281 - 293, 2011.

- [41] M. Tsujii, «COX-2 inhibitor and colon cancer,» *Gan to Kagaku Ryoho*, nº 28, p. 1799 – 1805, 2001.
- [42] A. Goldman, C. Williams, H. Sheng, L. Lamps, V. Williams y e. al., «Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells.,» *Carcinogenesis*, nº 19, p. 2195 – 2199, 1998.
- [43] Y. Tsubouchi, S. Mukai, Y. Kawahito, R. Yamada, M. Kohno y e. al., «Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer.,» *Anticancer Res.*, nº 20, p. 2867 – 2872, 2000.
- [44] V. Jain y R. Singh, «Development and characterization of Eudragit RS100 loaded microsponges and its colonic delivery using natural polysaccharides,» *Acta Pol. Pharm: Drug Res.*, nº 67, p. 407 – 415, 2010.
- [45] T. Woraphatphadung, W. Sajomsang, P. Gonil, A. Treetong, P. Akkaramongkolporn y e. al., «pH-responsive polymeric micelles based on amphiphilic chitosan derivatives: Effect of hydrophobic cores on oral meloxicam delivery.,» *Int. J. Pharm.*, nº 497, p. 150 – 160, 2016.
- [46] L. Palugan, M. Cerea, L. Zema, A. Gazzaniga y A. Maroni, «Coated pellets for oral colon delivery.,» *J. Drug Del. Sci. Tech.*, nº 25, p. 1 – 15, 2015.
- [47] E. Navarro Ruiz, C. Álvarez Álvarez, J. García Rodríguez, S. Torrado Durán, S. Torrado Durán y e. al., «New Multi-Particle Systems for Colon-Targeted Meloxicam.,» *J. App. Pharm.*, nº 8, p. 221, 2016.
- [48] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser y F. Bray, «Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018.,» *Eur. J. Cancer.*, nº 103, p. 356 – 387, 2018.
- [49] N. Keum y E. Giovannucci, «Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies.,» *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, nº 16, p. 713 – 732, 2019.
- [50] S. Ng, C. Bernstein, M. Vatn, P. Lakatos, E. Loftus, C. Tysk, C. O'morain, B. Moum y J. Colombel, «Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of inflammatory Bowel Disease (IOIBD). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease.,» *Gut*, nº 62, pp. 630 - 649, 2013.
- [51] I. Ordás, L. Eckmann, M. Talamini, D. Baumgart y W. Sandborn, «Ulcerative colitis,» *Lancet*, vol. 9853, nº 380, pp. 1606-1619, 2012.

- [52] G. Monif, «Is ulcerative colitis a disease of a dysfunctional microbiota?», *Med Hypotheses*, vol. 131, 2019.
- [53] M. Patel, «Colon: a gateway for chronotherapeutic drug delivery systems», *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 9, nº 12, pp. 1389 - 1395, 2015.
- [54] A. Banerjee, S. Pathak, V. Subramaniam, G. M. R. y R. Verma, «Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives.», *Drug Discov Today*, vol. 8, nº 22, pp. 1224 - 1232, 2017.
- [55] S. Amidon, J. Brown y V. Dave, «Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches.», *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, nº 16, pp. 731 - 741, 2015.
- [56] H. Shahdadi Sardo, F. Saremniad, S. Bagheri, A. Akhgaru, H. Afasiabi Garekani y F. Sadeghi, «A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted drug delivery systems», *Int J Pharm*, nº 558, pp. 367 - 379, 2019.
- [57] S. Thakral, N. Thakral y D. Majumdar, «Eudragit: a technology evaluation», *Opin Drug Deliv*, vol. 1, nº 10, pp. 131 - 149, 2013.
- [58] M. Widjaja, J. Gan, J. Talpaneni y R. Tjandrawinata, «Determination of Eudragit® L100 in an Enteric-Coated Tablet Formulation Using Size-Exclusion Chromatography with Charged-Aerosol Detection.», *Sci Pharm*, vol. 3, nº 86, p. 38, 2018.
- [59] M. Rodriguez, J. Antúnez, C. Taboada, B. Seijo y T. D., «Colon – specific delivery of Budesonide from microencapsulated cellulosic cores: evaluation of the efficacy against colonic inflammation in rats.», *J. Pharm Pharmacol.*, nº 53, p. 1207, 2001.
- [60] H. Patel y M. Gohel, «A Review on Enteric Coated Pellets Composed of Core Pellets Prepared by Extrusion-Spheronization», *Recent Pat Drug Deliv Formul*, vol. 2, nº 13, pp. 83 - 90, 2019.
- [61] J. Barbosa, M. Al-Kauraishi, A. Smith, B. Conway y H. Merchant, «Achieving gastroresistance without coating: Formulation of capsule shells from enteric polymers.», *Eur J Pharm Biopharm*, nº 144, pp. 174-179, 2019.
- [62] M. Oja y U. Maran, «pH-permeability profiles for drug substances: Experimental detection, comparison with human intestinal absorption and modelling.», *Eur J Pharm Sci*, nº 123, pp. 429-440, 2018.
- [63] V. Pandit, A. Kumar, M. Ashawat, C. Verma y P. Kumar, «Recent Advancement and Technological Aspects of Pulsatile Drug Delivery System - A Laconic Review.», *Curr Drug Targets.*, vol. 10, nº 18, pp. 1191-1203, 2017.

- [64] M. Ashord, J. Fell, D. Attwood, H. Sharma y P. Woodhead, «An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon.,» *J Control Rel*, nº 26, p. 213, 1993.
- [65] R. Martinez Pacheco, *Tecnología Farmacéutica*. Vol III, Madrid: Síntesis, 2016.
- [66] W. Zhang, K. Mahuta, B. Mikulski y e. al., «Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery.,» *Pharm Dev Technol.*, vol. 1, nº 21, pp. 127-130, 2016.
- [67] M. Dew, R. Ryder, N. Evans, B. Evans y J. Rhodes, «Colonic release of 5-aminosalicylic acid from an oral preparation in active ulcerative colitis.,» *Br. J. Clin. Pharmacol.*, nº 16, p. 185–187, 1983.
- [68] Y. Karrant, C. Neut, D. Wils, F. Siepmann y e. al., «Colon targeting with bacteria-sensitive films adapted to the disease state.,» *Eur. J. Pharm. Biopharm*, vol. 1, nº 73, p. 74 – 81, 2009.
- [69] V. Bansal, R. Malviya, M. T y P. Sharma, «Novel Prospective in Colon Specific Drug Delivery System.,» *Polim Med*, vol. 2, nº 44, pp. 109 - 118, 2014.
- [70] F. Esseku y M. Adeyeye, «Bacteria and pH-sensitive polysaccharide-polymer films for colon targeted delivery.,» *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, vol. 5, nº 28, pp. 395-445, 2011.
- [71] J. Xu, Y. Lin, P. Boulas y M. Peterson, «Low colonic absorption drugs: risks and opportunities in the development of oral extended release products.,» *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 2, nº 15, pp. 197-211, 2018.
- [72] N. Belali, N. Wathoni y M. Muchtaridi, «Advances in orally targeted drug delivery to colon.,» *J Adv Pharm Technol Res.*, vol. 3, nº 10, pp. 100-106, 2019.
- [73] A. Prakash y A. Markham, «Oral delayed-release mesalazine: a review of its use in ulcerative colitis and Crohn's disease.,» *Drugs*, vol. 3, nº 57, pp. 383-408, 1999.
- [74] A. Bose, A. Elyagoby y T. Wong, «Oral 5-fluorouracil colon-specific delivery through in vivo pellet coating for colon cancer and aberrant crypt foci treatment.,» *Int J Pharm.*, Vols. %1 de %21 - 2, nº 468, pp. 178-186, 2014.
- [75] R. de Alencar, A. de Oliveira, E. Lima, M. da Cunha-Filho, S. Taveira y R. Marreto, «Compacted Multiparticulate Systems for Colon-Specific Delivery of Ketoprofen.,» *AAPS PharmSciTech*, vol. 6, nº 18, pp. 2260-2268, 2017.
- [76] V. Sinha y R. Kumria, «Colonic drug delivery: prodrug approach.,» *Pharm Res.*, vol. 5, nº 18, pp. 557-564, 2001.
- [77] P. Maharshi, S. Singh, M. Gulati y e. al., «A Novel Three-pronged Approach for Colon Delivery of Sulfasalazine: Concomitant Use of pH- Responsive, Microbially

- Triggered Polymers and Liquid Solid Technology,» *1038-1054.*, vol. 7, nº 15, pp. 1038-1054., 2018.
- [78] R. Dev, V. Bali y K. Pathak, «Novel microbially triggered colon specific delivery system of 5-Fluorouracil: statistical optimization, in vitro, in vivo, cytotoxic and stability assessment.,» *Int J Pharm*, Vols. %1 de %21 - 2, nº 411, pp. 142-151, 2011.
- [79] T. Eom, W. Yoo, S. Kim y A. Khan, «Biologically activatable azobenzene polymers targeted at drug delivery and imaging applications.,» *Biomaterials*, nº 185, pp. 333-347, 2018.
- [80] E. Akala, O. Elekwachi, V. Chase y e. all., «Organic redox initiated polymerization process for the fabrication of hydrogel for colon specific drug delivery.,» *Drug Dev Ind Pharm.*, nº 29, p. 375, 2003.
- [81] K. Vinaykumar, T. Sivakumar, T. Tamizhmani y e. all., «Colon targeting drug delivery system: A review on recent approaches.,» *Int. J. Pharm. Biomed. Sci*, vol. 1, p. 11 – 19, 2011.
- [82] R. Valluru, Siddaramaiah y K. TMP, «Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system,» *J. Mater. Sci. Mater Med*, nº 19, pp. 2131 - 2136, 2008.
- [83] V. Sinha y R. Kumria, «Microbially triggered drug delivery to the colon,» *Eur J Pharm Sci*, vol. 3, nº 18, 2003.
- [84] Y. Baena, M. Aragón, P. Sandoval, J. Rosas y L. Ponde D'León, «Osmotically controlled oral drug delivery systems,» *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*, vol. 35, nº 2, 2006.
- [85] «Página web Philips,» [En línea]. Available: www.wearephilips.com. [Último acceso: Diciembre 2019].
- [86] D. Parasrampurua, T. Kanamaru, A. Connor y e. al., «Evaluation of regional gastrointestinal absorption of edoxaban using the enterion capsule.,» *J Clin Pharmacol*, vol. 11, nº 55, pp. 1286-1292., 2015.
- [87] I. Wilding, P. Hirst y A. Connor, «Development of a new engineering-based capsule for human drug absorption studies.,» *Pharm Sci Technolo Today*, vol. 3, nº 11, pp. 385-392, 2000.
- [88] M. McGirr, S. McAllister, E. Peters, A. Vickers, A. Parr y A. Basit, «The use of the IntelliSite companion device to deliver mucoadhesive polymers to the dog colon.,» *Eur J Pharm Sci*, Vols. %1 de %24 - 5, nº 36, pp. 386-391, 2009.

- [89] N. Clear, A. Milton, M. Humphrey y e. al., «Evaluation of the Intelisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon.,» *Eur J Pharm Sci.*, vol. 4, nº 13, pp. 375-384, 2001.
- [90] R. O'Connor-Semmes, E. Sandefer, E. Hussey y e. al., «Regional gastrointestinal delivery of remogliflozin etabonate in humans.,» *Biopharm Drug Dispos*, vol. 2, nº 34, pp. 79 - 86, 2013.
- [91] X. Che, C. Chen, X. Ye y e. al., «Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro.,» *Oncol Rep*, vol. 3, nº 35, pp. 1680-1688, 2016.
- [92] J. Sheng, H. Sun, F. Yu, B. Li, Y. Zhang y Y. Zhu, «The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer.,» *Int J Med Sci.* , vol. 8, nº 17, pp. 1095-1101, 2020.
- [93] S. Ramalingam y C. Belani, «Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer.,» *Clin Lung Cancer.* , vol. 4, nº 5, pp. 245-253, 2004.
- [94] J. Brown y R. DuBois, «Cyclooxygenase as a target in lung cancer.,» *Clin Cancer Res.* , Vols. %1 de %212 - 2, nº 10, pp. 4266 - 4269, 2004.
- [95] N. Tołoczko-Iwaniuk, D. Dziemiańczyk-Pakieta, B. Nowaszewska, K. Celińska-Janowicz y W. Mityk, «Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention - Review.,» *Curr Drug Targets.*, vol. 3, nº 20, pp. 302-315, 2019.
- [96] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey y e. al., «Drug delivery systems: an update review.,» *Int. J. Pharm. Investig.*, nº 2, pp. 2 - 11, 2012.
- [97] S. Zhou, B. Zhang, X. Liu, Z. Teng, M. Huan, T. Yang y e. al., «A new natural angelica polysaccharide based colon-specific drug delivery system.,» *J. Pharm. Sci.*, nº 98, p. 4756 – 4768, 2009.
- [98] «World Cancer Research Fund International: Colorectal Cancer Statistics. 2019.,» 2019.
- [99] M. Yallapu, M. Jaggi y S. Chauhan, «Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics.,» *Curr. Pharm. Des*, nº 19, p. 1994 – 2010, 2013.
- [100] F. Haggar y R. Boushey, «Colorectal cancer epidemiology incidence, mortality, survival and risk factors.,» *Clin. Colon. Rectal. Surg.*, nº 22, p. 191 – 197, 2009.
- [101] R. Siegel, K. Miller, S. Fedewa, D. Ahnen, R. Meester, A. Barzi y e. al., «Colorectal cancer statistics, 2017.,» *CA Cancer J. Clin*, nº 67, p. 177 – 193, 2017.

- [102] M. Kumar y R. Awasthi, «Development of metronidazole-loaded colon targeted microparticulate drug delivery system.,» *Polim. Med.*, vol. 2, nº 45, p. 57 – 65, 2015.
- [103] A. Vaidya, A. Jain, P. Khare, R. Agrawal y S. Jain, «Metronidazole loaded pectin microspheres for colon targeting.,» *J. Pharm. Sci.*, vol. 11, nº 98, p. 4229 – 4236, 2009.
- [104] M. Nicholas, S. Panaganti, L. Prabakaran y K. Jayveera, «Novel colon specific drug delivery system: A review.,» *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 10, nº 2, p. 2545 – 2561, 2011.
- [105] Farmacopea europea. Ed. 10.0. Monografías.
- [106] S. Rishabh y e. al, «Internat. J. of Pharm.,» nº 427, pp. 153 - 162, 2012.
- [107] G. Friton y E. Salamon, «Meloxicam in veterinary medicine,» 2005.
- [108] «Monografía de comprimidos de Meloxicam,» USP43-NF38-2771, 2020 USP.
- [109] G. Amidon, H. Lennernas y J. Crison, «A theoretical basis for bio pharmaceuticals drugs classification: the correlation of in vitro drug product dissolution.,» *Pharm. Res.*, nº 12, p. 413–420, 1999.
- [110] C. Wu y L. Benet, «Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a bio pharmaceuticals drug disposition classification system.,» *Pharmaceutical Research*, nº 22, pp. 11 - 23, 2005.
- [111] «Centro de información online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA),» [En línea]. Available: www.aemps.gob.es/cima. [Último acceso: Agosto 2020].
- [112] Teva, «Ficha técnica de Meloxicam Teva 15 mg comprimidos EFG».
- [113] M. Shukla, G. Singh, B. Sindhura, A. Telang, G. Rao y J. Malik, «Comparative plasma pharmacokinetics of meloxicam in sheep and goats following intravenous administration.,» *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, nº 145, p. 528 – 532, 2007.
- [114] M. Dunbar, K. Walkowiak, J. Faustich, A. Rendahl y M. Graham, «Preliminary evaluation of sustained-release compared with conventional formulations of meloxicam in Sheep (*Ovis aries*).,» *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 3, nº 58, p. 339 – 345, 2019.
- [115] L. Kendall, R. Hansen, K. Dorsey, S. Kang, P. Lunghofer y D. Gustafson, «Pharmacokinetics of sustained-release analgesics in mice.,» *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, nº 53, p. 478 – 484, 2014.

- [116] S.-E. C. C. L. C. & P. E. Department, «Metolose,» *www.metolose.jp/e*, p. 6/500, 2005.
- [117] R. C. Rowe, P. J. Sheskey y M. E. Quinn, «Lactose, monohydrate,» de *Handbook of pharmaceutical excipients - 6th Edition*, USA, RPS Publishing, 2009, pp. 364 - 365.
- [118] M. Bedine y T. Bayless, «Intolerance of small amounts of lactose by individuals with low lactase levels.,» *Gastroenterology* , nº 65, p. 735– 743, 1973.
- [119] E. Gudmand-Hoyer y K. Simony, «Individual sensitivity to lactose in lactose malabsorption.,» *Am J Dig Dis*, vol. 3, nº 22, p. 177–181, 1977.
- [120] M. Lorner y e. al., «Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities.,» *Aliment Pharmacol Ther* , vol. 2, nº 27, pp. 93 - 103, 2008.
- [121] F. Suarez y A. Savaiano Dennis, «Diet, genetics, and lactose intolerance.,» *Food Technol*, vol. 3, nº 51, p. 74–76, 1997.
- [122] E. Industries, «Página web de Evonik Industries,» [En línea]. Available: <https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/eudragit/>. [Último acceso: Junio 2020].
- [123] V. García-Herrero, C. Torrado-Salmeron, J. García-Rodríguez, T. G. y S. Torrado-Santiago, «Submicellar liquid chromatography with fluorescence detection improves the análisis of naproxen in plasma and brain tissue.,» *J Sep Sci.*, pp. 1 - 8, 2019.
- [124] R. C. Rowe, P. J. Sheskey y M. E. Quinn, «Cellulose Microcrystalline and Carboxymethylcellulose Sodium,» de *Handbook of pharmaceutical excipients - 6th Edition*, USA, RPS Publishing , 2009, pp. 134 - 135.
- [125] R. C. Rowe, P. J. Sheskey y M. E. Quinn, «Water,» de *Handbook of pharmaceutical excipients - 6th Edition*, USA, RPS Publishing, 2009, pp. 766 - 770.
- [126] R. C. Rowe, P. J. Sheskey y M. E. Quinn, «Sodium Chloride,» de *Handbook of pharmaceutical excipients - 6th Edition*, USA, RPS Publishing, 2009, pp. 637 - 639.
- [127] F. Europea, «Recommendations on dissolution testing,» de *European Pharmacopoeia* , 10.0, pp. 801 - 803.
- [128] H. Kristensen y T. Schaefer, «A review of pharmaceutical wet granulation.,» *Drug. Dev. Ind. Pharm*, nº 13, pp. 803 - 872, 1987.

- [129] J. Carstensen, *Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms*, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, 1993.
- [130] F. Lassa Suescun, *Implementación de un procedimiento de fabricación de comprimidos de tamoxifeno en planta industrial*, Tesis doctoral, 2016.
- [131] F. Europea, «European Pharmacopeia 10.0,» de *Liquid Chromatography*, p. 2.2.29..
- [132] U. 2020, «Método A de disolución de formas farmacéuticas de liberación retardada,» de *The United States Pharmacopeia*, USP43-NF38 – 711, 2020.
- [133] C. Ibáñez, *Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales*, Ministerio de Educación, 2004.
- [134] M. Gómez-Burgaz, G. Torrado y S. Torrado, «Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymer complexes of chitosan and carboxymethylcellulose during in vitro clarithromycin release.,» *Eur J Pharm Biopharm.*, vol. 1, nº 73, p. 130, 2009.
- [135] *I. H. T. Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology*, ICH Topic Q2B.
- [136] D. Weyna, M. Cheney, N. Shan, M. Hanna y e. al., «Improving Solubility and Pharmacokinetics of Meloxicam via Multiple-Component Crystal Formation.,» *Mol. Pharmaceutics* , vol. 7, nº 9, p. 2094–2102, 2012.
- [137] H. Han y H. Choi, «Improved absorption of meloxicam via salt formation with ethanalamines,» *Eur J Pharm Biopharm.*, vol. 1, nº 65, p. 99-103. , 2007.
- [138] L. Simionato, L. Petrone, M. Baldut, S. Bonafede y A. Segall, «Comparison between the dissolution profiles of nine meloxicam tablet brands commercially available in Buenos Aires, Argentina.,» *Saudi Pharm J.*, vol. 4, nº 26, p. 578-584, 2018.
- [139] R. Noor, S. Hasan, F. Hassan y A. Rehman, «Formulation and Dissolution enhancement of Meloxicam tablets using Polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer and Povidone in combination.,» *Pak J Pharm Sci.* , vol. 2, nº 30, p. 407-414, 2017.
- [140] D. Setyawan, M. Dewi y D. Isadiartuti, «Ternary solid dispersion to improve solubility and dissolution of meloxicam.,» *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, vol. 6, nº 30, 2019.
- [141] A. Fathanah, D. Setyawan y R. Sari, «Improving solubility and dissolution of meloxicam by solid dispersion using hydroxypropyl methylcellulose 2910 3 cps and nicotinamide,» *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, vol. 6, nº 30, 2019.

- [142] K. Zheng, Z. Lin, M. Capece, K. Kunnath, L. Chen y R. Davé, «Effect of Particle Size and Polymer Loading on Dissolution Behavior of Amorphous Griseofulvin Powder.,» *J Pharm Sci.*, vol. 1, nº 108, p. 234-242, 2019.
- [143] K. Chu, E. Lee, S. Jeong y E. Park, «Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs.,» *Arch Pharm Res.*, vol. 7, nº 35, p. 1187-1195, 2012.
- [144] C. Jin, C. Zhao, D. Shen, W. Dong, H. Liu y Z. He, «Evaluating bioequivalence of meloxicam tablets: is in-vitro dissolution test overdiscriminating?,» *J Pharm Pharmacol*, vol. 2, nº 70, pp. 250 - 258, 2018.
- [145] A. Akhgari y A. Tavakol, «Prediction of Optimum Combination of Eudragit RS/Eudragit RL/Ethyl Cellulose Polymeric Free Films Based on Experimental Design for Using as a Coating System for Sustained Release Theophylline Pellets.,» *Adv Pharm Bull*, vol. 2, nº 6, pp. 219 - 225, 2016.
- [146] P. Kashif, A. Madni, M. Ashfaq y e. al., «Development of Eudragit RS 100 Microparticles Loaded with Ropinirole: Optimization and In Vitro Evaluation Studies.,» *AAPS PharmSciTech.*, vol. 5, nº 18, p. 1810-1822, 2017.
- [147] J. Papp, S. Marton, K. Süvegh y R. Zelkó, «The influence of Metolose structure on the free volume and the consequent metoprolol tartrate release of patches.,» *Int J Biol Macromol.*, vol. 1, nº 44, pp. 6 - 8, 2009.
- [148] N. Hirasawa, S. Ishise, H. Miyata y K. Danjo, «Application of nilvadipine solid dispersion to tablet formulation and manufacturing using crospovidone and methylcellulose as dispersion carriers.,» *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, vol. 2, nº 52, pp. 244-247, 2004.
- [149] N. Nagai, Y. Yamasaki, T. Nakamura, H. Otake y N. Okamoto, «Effect of Methylcellulose (Cellulose Derivatives) on Ibuprofen-crushing Efficiency in Nano Pulverizer NP-100,» *Yakugaku Zasshi*, vol. 1, nº 139, pp. 123-130, 2019.
- [150] K. Xu, L. Li, M. Cui y e. al., «Cold Chain-Free Storable Hydrogel for Infant-Friendly Oral Delivery of Amoxicillin for the Treatment of Pneumococcal Pneumonia.,» *ACS Appl Mater Interfaces.*, vol. 22, nº 9, pp. 18440-18449, 2017.
- [151] C. Gao, J. Huang, Y. Jiao y e. al., «In vitro release and in vivo absorption in beagle dogs of meloxicam from Eudragit FS 30 D-coated pellets.,» *Int J Pharm.*, Vols. %1 de %21 - 2, nº 322, p. 104-112, 2006.
- [152] E. Moqhimipour, M. Rezaei, M. Kouchak y e. al., «Effects of coating layer and release medium on release profile from coated capsules with Eudragit FS 30D: an in vitro and in vivo study.,» *Drug Dev Ind Pharm.*, vol. 5, nº 44, p. 861-867, 2018.

- [153] F. Rasool, M. Ahmad, G. Murtaza, H. Khan y S. Khan, «Eudragit FS based colonic microparticles of metoprolol tartrate.,» *Acta Pol Pharm*, vol. 2, nº 69, p. 347-353, 2012.
- [154] F. Zhang, «Physicochemical properties and mechanisms of drug release from melt-extruded granules consisting of chlorpheniramine maleate and Eudragit FS.,» *Drug Dev Ind Pharm.*, vol. 4, nº 42, p. 563-571, 2016.
- [155] H. Ibrahim, T. Ahmed, M. Hussain y e. al., «Development of meloxicam in situ implant formulation by quality by design principle.,» *Drug Dev Ind Pharm.*, vol. 4, nº 40, p. 66-73, 2014.
- [156] K. Nowak, K. Bodek, A. Szterk y e. al., «Preclinical assessment of the potential of a 3D chitosan drug delivery system with sodium meloxicam for treating complications following tooth extraction.,» *Int J Biol Macromol*, nº 133, p. 1019-1028, 2019.
- [157] P. Shende, R. Gaud, R. Bakal y D. Patil, «Effect of inclusion complexation of meloxicam with β -cyclodextrin- and β -cyclodextrin-based nanosponges on solubility, in vitro release and stability studies.,» *Colloids Surf B Biointerfaces*, nº 136, p. 105-110, 2015.
- [158] S. Fattahpour, M. Shamanian, N. Tavakoli y e. al., «An injectable carboxymethyl chitosan-methylcellulose-pluronic hydrogel for the encapsulation of meloxicam loaded nanoparticles.,» *Int J Biol Macromol.*, nº 151, p. 220-229, 2020.
- [159] T. Osmałek, B. Milanowski, A. Froelich y e. al., «Design and characteristics of gellan gum beads for modified release of meloxicam.,» *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 8, nº 43, p. 1314-1329, 2017.
- [160] C. Bartos, P. Szabó-Révész, C. Bartos, G. Katona, O. Jójárt-Laczkovich y R. Ambrus, «The Effect of an Optimized Wet Milling Technology on the Crystallinity, Morphology and Dissolution Properties of Micro- and Nanonized Meloxicam.,» *Molecules*, vol. 4, nº 21, p. 507, 2016.
- [161] S. Noolkar, N. Jadhav, S. Bhende y S. Killedar, «Solid-state characterization and dissolution properties of meloxicam-moringa coagulant-PVP ternary solid dispersions.,» *AAPS PharmSciTech.*, vol. 2, nº 14, p. 569-577, 2013.
- [162] J. Jacon Freitas, O. Santos Viana, R. Bonfilio, A. Doriguetto y M. de Araújo, «Analysis of polymorphic contamination in meloxicam raw materials and its effects on the physicochemical quality of drug product.,» *Eur J Pharm Sci*, nº 109, pp. 347-358, 2017.

- [163] D. Medarević, K. Kachrimanis, Z. Djurić y S. Ibrić, «Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin.,» *Eur J Pharm Sci*, nº 78, pp. 273-285, 2015.
- [164] S. Farias y J. Boateng, «Development and functional characterization of composite freeze dried wafers for potential delivery of low dose aspirin for elderly people with dysphagia.,» *Int J Pharm.* , Vols. %1 de %21 - 2, nº 553, pp. 65-83., 2018.
- [165] S. Khan, J. Boateng, J. Mitchell y V. Trivedi, «Formulation, characterisation and stabilisation of buccal films for paediatric drug delivery of omeprazole.,» *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, nº 16, pp. 800-810., 2015.
- [166] S. Salatin, J. Barar, M. Barzegar-Jalali, K. Adibkia, M. Alami-Milani y M. Jelvehgari, «Formulation and Evaluation of Eudragit RL-100 Nanoparticles Loaded In-Situ Forming Gel for Intranasal Delivery of Rivastigmine.,» *Adv Pharm Bull*, vol. 1, nº 10, pp. 20-29, 2020.
- [167] J. Yoo, N. Giri y C. Lee, «pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery.,» *Int J Pharm*, Vols. %1 de %21 - 2, nº 403, pp. 262-267, 2011.
- [168] M. Olson, B. Ralston, L. Burwash, H. Matheson-Bird y N. Allan, «Efficacy of oral meloxicam suspension for prevention of pain and inflammation following band and surgical castration in calves.,» *BMC Vet Res*, vol. 1, nº 12, p. 102, 2016.
- [169] A. Aghazadeh-Habashi y F. Jamali, «Pharmacokinetics of meloxicam administered as regular and fast dissolving formulations to the rat: influence of gastrointestinal dysfunction on the relative bioavailability of two formulations.,» *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 3, nº 70, pp. 889 - 894, 2008.
- [170] A. Kreuder, J. Coetzee, L. Wulf y e. al., «Bioavailability and pharmacokinetics of oral meloxicam in llamas.,» *BMC Vet Res*, nº 8, p. 85, 2012.
- [171] D. Fredholm, J. Carpenter, B. KuKanich y M. Kohles, «Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after oral administration of single and multiple doses.,» *Am J Vet Res.*, vol. 4, nº 74, p. 636-641, 2013.
- [172] J. Morrison, C. Greenacre, R. George, S. Cox y T. Martín-Jiménez, «Pharmacokinetics of a Single Dose of Oral and Intramuscular Meloxicam in African Penguins (*Spheniscus demersus*).,» *J Avian Med Surg*, vol. 2, nº 32, p. 102-108, 2018.
- [173] S. Raidal, S. Edwards, J. Pippia, R. Boston y G. Noble, «Pharmacokinetics and safety of oral administration of meloxicam to foals.,» *J Vet Intern Med*, vol. 2, nº 27, p. 300-307, 2013.

- [174] J. Ingraio, R. Johnson, E. Tor, Y. Gu, M. Litman y P. Turner, «Aqueous stability and oral pharmacokinetics of meloxicam and carprofen in male C57BL/6 mice.,» *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 5, nº 52, p. 553-559, 2013.
- [175] M. C. Carrasco-Portugal, J. Aguilar-Carrasco, M. Luján, G. Reyes-García, R. Medina-Santillán y F. Flores-Murrieta, «Further evidence for interethnic differences in the oral pharmacokinetics of meloxicam.,» *Clin Drug Investig*, vol. 5, nº 5, p. 307-313, 2005.
- [176] M. Patel, «Formulation and development of di-dependent microparticulate system for colon-specific drug delivery.,» *Drug Deliv Transl Res.*, vol. 2, nº 7, pp. 312-324, 2017.
- [177] U. Busch, J. Schmid, G. Heinzl y e. al., «Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans.,» *Drug Metab Dispos*, vol. 6, nº 26, p. 576-584, 1998.
- [178] K. Grunewald y T. Tucker, «Gastric emptying in exercised mice.,» *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.*, vol. 2, nº 80, p. 173-175, 1985.
- [179] M. Osinski, T. Seifert, B. Cox y G. Gintant, «An improved method of evaluation of drug-evoked changes in gastric emptying in mice.,» *J Pharmacol Toxicol Methods.*, vol. 2, nº 47, p. 115-120, 2002.
- [180] A. Romero-Castro, M. Gutiérrez-Sánchez, J. Correa-Basurto, M. Rosales Hernández, I. Padilla Martínez y J. Mendieta-Wejebe, «Pharmacokinetics in Wistar Rats of 5-[(4-Carboxybutanoyl)Amino]-2-Hydroxybenzoic Acid: A Novel Synthetic Derivative of 5-Aminosalicylic Acid (5-ASA) with Possible Anti-Inflammatory Activity,» *PLoS One*, vol. 7, nº 11, 2016.
- [181] A. Sarfaty, C. Zeiss, A. Willis, J. Harris y P. Smith, «Concentration-dependent Toxicity after Subcutaneous Administration of Meloxicam to C57BL/6N Mice (Mus musculus).,» *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 6, nº 58, pp. 802-809, 2019.
- [182] M. Hofer, M. Pospíšil, J. Holá, A. Vacek, D. Streitová y V. Znojil, «Inhibition of cyclooxygenase 2 in mice increases production of g-csf and induces radioprotection.,» *Radiat Res.*, vol. 5, nº 170, pp. 566-571, 2008.
- [183] M. Hofer, M. Pospíšil, V. Znojil y e. al., «Meloxicam, a cyclooxygenase 2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice.,» *Radiat Res*, vol. 3, nº 166, pp. 556-560, 2006.
- [184] M. Alencar, M. Pinto, D. Oliveira, A. Pessoa, P. De, I. Candido y e. al., «Margin of safety of Meloxicam in dogs: deleterious effects on blood cells and gastrointestinal tract.,» *Cienc Rural*, nº 33, p. 525 – 532, 2003.

- [185] R. Mahaprabhu, A. Bhandarkar, B. Jangir, S. Rahangadale y N. Kurkure, «Ameliorative effect of ocimum sanctum on meloxicam induced toxicity in wistar rats.,» *Toxicol Int*, vol. 2, nº 18, pp. 130-136, 2011.
- [186] P. Staerckel y Y. Horsmans, «Meloxicam-induced liver toxicity.,» *Acta Gastroenterol Belg*, vol. 2, nº 62, pp. 255-256, 1999.
- [187] M. Alencar, M. Pinto, D. Oliveira, A. Pessoa, P. De, I. Candido y e. al., «Evaluation of the pharmacological activity of meloxicam on renal function in dogs.,» *Cienc Animal*, nº 12, p. 25–33, 2002.
- [188] S. Amidon, J. Brown y V. Dave, «Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches.,» *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, nº 16, pp. 731 - 741, 2015.