

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas formulaciones orales de naproxeno para
el tratamiento de la migraña**

**Development of novel oral formulations of naproxen for the
treatment of migraine**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Guarnizo Herrero

Director

Santiago Torrado Durán

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevas formulaciones orales de naproxeno para el tratamiento de
la migraña.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Guarnizo Herrero

Director

Santiago Torrado Durán

Madrid, 2020

©Víctor Guarnizo Herrero, 2020

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

FACULTY OF PHARMACY

Department of Pharmaceutics and Food Technology



Ph.D. THESIS

Development of novel oral formulations of naproxen for the treatment of migraine.

Víctor Guarnizo Herrero

Under the supervision of the PhD:

Santiago Torrado Durán

Madrid, 2020

©Víctor Guarnizo Herrero, 2020

AGRADECIMIENTOS:

Son muchas las personas a quien no puedo dejar de agradecer su esfuerzo, ayuda, disposición y auténtica calidad profesional y humana que me han llevado a concluir esta Tesis Doctoral. A todos ellos, siempre os tendré en mi recuerdo y por ello os doy mi más sincero agradecimiento:

- En primer lugar, al equipo decanal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a la Dirección del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia, por haberme acogido en su seno, permitirme crecer y aprender como alumno de Máster y Doctorado y haber podido utilizar instalaciones, material y equipos sin impedimento. A todos los profesores con los que he pasado horas de prácticas y que me han brindado su conocimiento para terminar esta tesis.
- A la Universidad Alcalá de Henares y a todos sus profesores y trabajadores por haberme permitido realizar diferentes estudios y estancias de investigación en sus dependencias. Hace 10 años que empecé mis estudios allí y cada vez que voy me reciben como en casa.
- A la Universidad de Chile y sobre todo al departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas de la facultad de Farmacia por haberme acogido durante el último año. Gracias a todos los profesores y trabajadores.
- A Begoña Escalera Izquierdo, directora del departamento de ciencias biomédicas de la universidad de Alcalá por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en la Universidad de Alcalá de Henares.
- A Cristina María Tristão Sena, profesora de fisiología de la facultad de medicina de la Universidad de Coímbra, por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su departamento.
- A mi director de Tesis, Dr. Santiago Torrado Durán, un enorme profesor, investigador y trabajador que además reúne todas las características que se

necesitan para ser un gran director de tesis. Durante estos últimos 5 años que llevo en la facultad ha sido como un padre, me ha ayudado, me ha aconsejado, me ha enseñado todo lo que sé y siempre le estaré agradecido. Espero que esta aventura no acabe aquí y podamos seguir trabajando juntos. Muchas gracias.

- A mi profesor de Chile, Dr. Javier Eduardo Morales Valenzuela, profesor e investigador superlativo, que me ha enseñado muchísimas cosas nuevas en el ámbito de la fisicoquímica farmacéutica y me ha dado la oportunidad de aprender de él, tanto profesional como personalmente. Muchas gracias por todo lo que me has ayudado en este tiempo y espero que podamos seguir colaborando juntos.
- A todos mis compañeros de departamento, muchas horas compartiendo laboratorio, balanza de precisión, cafetería, cervezas, muses y prácticas. Quiero mencionar especialmente a Esther, Mario, Teresa, Mónica, Vero y Nico. Me he sentido apoyado y me habéis ayudado a resolver dudas, tomar decisiones y pasar también buenos ratos que me han hecho terminar este trabajo. Gracias de corazón.
- No podría dejar de mencionar a todos los compañeros de la Universidad de Chile que me han ayudado, pero me gustaría hacer mención especial al profesor Dr. Germán Gunther Sapunar y a mis compañeros de laboratorio Dr. Francisco Arriagada y Guillermo Montero, gracias Pancho y Memo.
- A mi amigo y futuro doctor Carlos Torrado Salmerón. Quien nos iba a decir que hace 5 años, durante las prácticas de la carrera me animaras a hacer un máster en la UCM y que después de eso, hiciéramos el doctorado. Durante estos 5 años seguramente hemos pasado más tiempo juntos que con cualquier otra persona, y la verdad que se me ha pasado volando. Ha habido tiempo para todo, para reírnos, para enfadarnos, para trabajar mucho y hasta para vivir juntos en Portugal. Por todo, muchas gracias, siempre seguirás siendo mi amigo y espero que también en un futuro seamos compañeros.

- A todos mis amigos y amigas, que siempre han tenido palabras de ánimo y han sabido sacarme una sonrisa. Quien iba a pensar que el fundador de los PACOS llegara a ser doctor. A partir de ahora, Dr. Topo.
- A toda mi familia, por estar siempre interesados en lo que hago y creer en mi en todo momento. Muchas gracias en especial a mi madre y a mi abuela, las dos mujeres que me han criado, me han ayudado siempre y han hecho lo imposible para que yo tuviera de todo. La vida no os lo ha puesto fácil y aun así siempre habéis salido victoriosas, para mí sois unas heroínas, muchas gracias por ser como sois, os quiero mucho.
- A Marina, por su apoyo durante todo este tiempo, su cariño, su optimismo y por tener siempre una sonrisa. Gracias por compartir conmigo todos estos años y en especial nuestra aventura por tierras chilenas, contigo todo es más fácil, por eso, muchas gracias por estar ahí siempre. Te quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS:.....	15
RESUMEN.....	19
SUMMARY.....	27
I. INTRODUCCIÓN.....	33
1.1. INTRODUCCIÓN:.....	35
1.2. BIBLIOGRAFÍA:.....	40
II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO - OBJECTIVES AND APPROACH.....	45
2.1. OBJETIVOS:.....	47
2.2. PLANTEAMIENTO:.....	48
2.3. OBJECTIVES:.....	49
2.4. APPROACH:.....	50
III. PARTE TEÓRICA:.....	51
3.1. MIGRAÑA:.....	53
3.1.1. Factores desencadenantes:.....	53
3.1.2. Fases de la migraña:.....	54
3.1.3. Tipos de migraña:.....	56
3.1.4. Tratamientos farmacológicos:.....	57
3.2. NAPROXENO:.....	60
3.2.1. Descripción y estructura química:.....	60
3.2.2. Mecanismo de acción:.....	61
3.2.3. Características farmacocinéticas:.....	61
3.2.4. Indicaciones terapéuticas:.....	63
3.2.5. Posología y pauta de administración:.....	63
3.2.6. Reacciones adversas:.....	64
3.2.7. Contraindicaciones:.....	65
3.2.8. Interacciones:.....	65
3.2.9. Embarazo y Lactancia:.....	68
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS:.....	69
3.3.1. Métodos para la velocidad de disolución:.....	69
3.3.2. Métodos para el análisis de muestras biológicas:.....	71
3.4. NAPROXENO COMERCIALIZADO EN ESPAÑA:.....	74
3.5. REVISIÓN DE ESTUDIOS PARA LA ELABORACION DE FORMULACIONES DE NAPROXENO DE RÁPIDA DISOLUCIÓN:.....	76
3.6. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS EXCIPIENTES UTILIZADOS: ...	78

3.6.1. (HPMC) hidroxipropilmetilcelulosa:.....	79
3.6.2. Croscarmelosa sódica:	80
3.6.3. SDS (luaril sulfato sódico):.....	81
3.7. BIBLIOGRAFÍA:	82
IV. PARTE EXPERIMENTAL 1:	87
FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	87
4.1. INTRODUCCIÓN:.....	89
4.2. MATERIALES:.....	90
4.2.1. Productos y Reactivos:.....	90
4.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio:	90
4.2.3. Tratamiento de los datos:.....	91
4.3. MÉTODOS:.....	92
4.3.1. Desarrollo de las formulaciones:.....	92
4.3.2. Formulaciones sin excipientes:	93
4.3.3. Formulaciones con excipientes:.....	94
4.3.4. Caracterización de las formulaciones:	96
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	99
4.4.1. Caracterización SEM:	99
4.4.2. Difracción por rayos x (XRPD):	104
4.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC):	108
4.4.4. Estudios de disolución:	111
4.5. DISCUSIÓN FINAL:	127
4.6. BIBLIOGRAFÍA:	129
V. PARTE EXPERIMENTAL 2:.....	133
DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE NAPROXENO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.	133
5.1. INTRODUCCIÓN:.....	135
5.2. MATERIALES:.....	137
5.2.1. Productos y reactivos:	137
5.2.2. Animales:	137
5.2.3. Aparatos y equipos de laboratorio:	137
5.2.4. Tratamiento de los datos:.....	138
5.3. MÉTODOS:.....	139
5.3.1. Estudios de solubilidad en Fases móviles submicelares:	139
5.3.2. Condiciones cromatográficas:	139
5.3.3. Validación del método:	140

5.3.4. Especificidad:	141
5.3.5. Estándar interno:	142
5.3.6. Exactitud y precisión:	142
5.3.7. Recuperación:	142
5.3.8. Parte "in vivo":	143
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	148
5.4.1. Elección de la fase móvil:	148
5.4.2. Validación del método:	153
5.4.3. Análisis de muestras de plasma y muestras de cerebro en ratones:	159
5.5. DISCUSIÓN FINAL:	164
5.6. BIBLIOGRAFÍA:	165
VI. PARTE EXPERIMENTAL 3:	169
ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS	169
6.1. INTRODUCCIÓN:	171
6.2. MATERIALES:	172
6.2.1. Productos y reactivos:	172
6.2.2. Animales:	172
6.2.3. Aparatos y equipos de laboratorio:	172
6.2.4. Tratamiento de los datos:	173
6.3. MÉTODOS:	174
6.3.1. Preparación de las formulaciones:	174
6.3.2. Parte "in vivo":	175
6.3.3. Método de cuantificación:	178
6.4. RESULTADOS:	181
6.4.1. Linealidad:	181
6.4.2. Precisión y recuperación:	182
6.4.3. Estudios de farmacocinética:	183
6.4.4. Parámetros farmacocinéticos: AUC, C_{max} y T_{max}	185
6.5. ESTUDIOS DE EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES:	189
6.6. DISCUSIÓN FINAL:	192
6.7. BIBLIOGRAFÍA:	194
VII. PARTE EXPERIMENTAL 4:	197
FORMULACIONES CON CHITOSAN	197
7.1. INTRODUCCIÓN:	199
7.2. MATERIALES:	201
7.2.1. Productos y Reactivos:	201

7.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio:	201
7.2.3. Tratamiento de los datos:.....	202
7.3. MÉTODOS:.....	203
7.3.1. Desarrollo de las formulaciones:.....	203
7.3.2. Formulaciones sin excipientes:	204
7.3.3. Formulaciones con excipientes:.....	204
7.3.4. Estudios de velocidad de disolución:	208
7.4. RESULTADOS:.....	209
7.4.1. Resultados ensayos velocidad disolución:.....	209
7.5. DISCUSIÓN FINAL:	217
7.6. FUTUROS ESTUDIOS:	219
7.7. BIBLIOGRAFÍA:	221
VIII.....	225
CONCLUSIONES-CONCLUSIONS	225
8.1. CONCLUSIONES:.....	227
8.2. CONCLUSIONS:.....	229
IX. ANEXO 1: PUBLICACIÓN 1	231
X. ANEXO 2: PUBLICACIÓN 2	243

ABREVIATURAS:

ACN	Acetonitrilo
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
A-NAP	Naproxeno base en forma anhidra
ARA II	Antagonistas de Receptores de Angiotensina II
ATP	Adenosín Trifosfato
AUC	Área bajo la curva
AUC _{0-2h}	Área bajo la curva desde tiempo 0 hasta las 2 horas
AUC _{0-7h}	Área bajo la curva desde tiempo 0 hasta las 7 horas
AUC _{0-∞}	Área bajo la curva desde tiempo 0 hasta el final
CAI	Centro de Asistencia a la Investigación
CATI	Computer Assisted Telephone Interview
CC	Control de Calidad
CEI-EA	Comité de Ética de Investigación y Experimentación Animal
C _{max}	Concentración máxima
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CIMA	Centro de información de medicamentos de la AEMPS
CMC	Carboximetilcelulosa
CNME	Centro Nacional de Microscopía Electrónica
Coef	Coeficiente
Conc	Concentración
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
C/P	Relación Cerebro Plasma
CYP	Citocromo
DER	Desviación Estándar Relativa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
EI	Estándar Intern

ER	Error Relativo
FACC	Formulaciones de alta proporción de croscarmelosa y con chitosán
FACC-5%	Formulación de alta proporción de croscarmelosa y chitosán al 5%
FACC-10%	Formulación de alta proporción de croscarmelosa y chitosán al 10%
FACC-15%	Formulación de alta proporción de croscarmelosa y chitosán al 15%
FBCC	Formulaciones de baja proporción de croscarmelosa y con chitosán
FBCC-5%	Formulación de baja proporción de croscarmelosa y chitosán al 5%
FBCC-10	Formulación de baja proporción de croscarmelosa y chitosán al 10%
FBCC-15%	Formulación de baja proporción de croscarmelosa y chitosán al 15%
FC	Formulaciones con Croscarmelosa
FC-5%	Formulación con Croscarmelosa al 5%
FC-10%	Formulación con Croscarmelosa al 10%
FC-15%	Formulación con Croscarmelosa al 15%
FD	Formulaciones con Disgregantes
FD-5%	Formulación con Disgregante al 5%
FD-10%	Formulación con Disgregante al 10%
FD-15%	Formulación con Disgregante al 15%
Fig	Figura
FP	Formulación Polimérica
FS	Formulaciones con Surfactantes
FS-3%	Formulación con Surfactante al 3%
FS-6%	Formulación con Surfactante al 6%
FS-10%	Formulación con Surfactante al 10%
FS-12%	Formulación con Surfactante al 12%
FSC	Formulaciones con Surfactantes y Chitosán
FSC-5%	Formulación con surfactante y chitosán al 5%
FSC-10%	Formulación con surfactante y chitosán al 10%
FSC-15%	Formulación con surfactante y chitosán al 15%
HVLP	High Volume Low Pressure
HPLC	High performance liquid chromatography
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa

ICH	International Council for Harmonisation
IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IRTF	Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (InfraRed spectroscopy Fourier Transform)
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
Lim	Límite
M	Molar
MF	Formulación Mezcla física
NAP	Naproxeno base materia prima
NAP-MP	Formulación de naproxeno base materia prima
NAP Na	Naproxeno sódico materia prima
NAP:RH 40	Formulación de naproxeno base y Cremophor RH 40
NAP:SDS	Formulación de naproxeno base y lauril sulfato sódico
NAP:T 80	Formulación de naproxeno base y Tween 80
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PG	Prostaglandinas
RH 40	Cremophor RH 40
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscope)
SDS	Lauril sulfato sódico
TR	Tiempo de Retención
T 80	Tween 80
T _{max}	Tiempo máximo
TX	Tromboxanos
UCM	Universidad Complutense de Madrid
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
XRPD	Difracción de polvo por rayos-x (x-ray Diffraction Patterns)

RESUMEN

RESUMEN:

Desarrollo de nuevas formulaciones orales de naproxeno para el tratamiento de la migraña.

INTRODUCCIÓN:

La migraña es una de las afecciones que más población padece en todo el mundo, por ese motivo, es de gran interés mejorar y/o desarrollar nuevos tratamientos que traten y ayuden a las personas que la sufren.

Actualmente los tratamientos se pueden dividir en 2 modalidades: los tratamientos agudos y los tratamientos profilácticos. Existen multitud de medicamentos para tratar estas modalidades, pero los que aparecen indicados en ambas, son los AINES. Dentro de los AINES, el naproxeno es el que mejores características reúne para intentar perfeccionar su formulación.

Las razones principales para centrarse en el naproxeno son dos. La primera es su gran uso generalizado; y la segunda es su posible margen de mejora, esto es debido tanto a su alta dosis de inicio (1000mg), como a su lenta liberación (T_{max} 2-4h). Por ello, lo que se pretende es tanto mejorar su biodisponibilidad, como el tiempo de efecto, disminuyendo así la dosis efectiva y el tiempo de actuación.

Para intentar mejorar esos dos parámetros se necesitan varios excipientes que ayuden a su rápida disolución y absorción. Los excipientes seleccionados bibliográficamente para la mejora son HPMC, croscarmelosa sódica y SDS.

OBJETIVOS Y RESULTADOS:

El objetivo principal de la tesis es el desarrollo y creación de una formulación oral de naproxeno en la que, mediante el empleo de disgregantes hidrofílicos y surfactantes, mejore su velocidad de disolución y permita alcanzar rápidas concentraciones

plasmáticas y cerebrales. Para completar este *objetivo principal* de la tesis se realizan los siguientes objetivos parciales:

Creación y puesta a punto de un método analítico que permita analizar cantidades pequeñas de naproxeno en muestras biológicas de plasma y cerebro. Y por último, comprobar que la formulación de naproxeno desarrollada podría ser un tratamiento efectivo para los ataques de migraña, mediante la realización de estudios de biodisponibilidad en plasma y de biodistribución en cerebro.

RESULTADOS:

Tras el desarrollo galénico de multitud de formulaciones, sus correspondientes caracterizaciones y ensayos de velocidad de disolución, se llegó a la conclusión de que la formulación FS-10% fue la que mejores resultados obtuvo, y por ello, fue la elegida como el posible tratamiento para la migraña.

El siguiente paso fue la creación de un método analítico que permitiera la cuantificación de naproxeno en muestras biológicas y, además, investigar la mejor distribución cerebro/plasma del naproxeno entre formulaciones con diferentes surfactantes, para así saber cuál era mejor para tratamientos "in vivo". El método de análisis elegido fue el de HPLC submicelar con detección por fluorescencia, ya que al utilizar en su fase móvil un surfactante, hizo que concentraciones muy bajas de naproxeno se pudieran cuantificar. Los resultados que se obtuvieron en este desarrollo nos permiten concluir que el SDS es mejor que RH 40 y T 80, tanto para el método analítico, como para la administración de la formulación "in vivo".

Tras el desarrollo del método analítico y de los estudios con diferentes surfactantes, se hicieron los estudios de farmacocinética "in vivo" con la formulación que contenía SDS, (FS-10%). Los datos que se obtuvieron de estos estudios fueron muy positivos, ya que, los parámetros estudiados (AUC_{0-2h} , C_{max} , T_{max}) dieron unos resultados significativamente mejores para la formulación FS-10% con respecto a la de referencia.

Los datos obtenidos se podrían resumir en que la formulación FS-10% alcanza mayores niveles plasmáticos y cerebrales de naproxeno en un menor tiempo, y por tanto, podría tratar los ataques de migraña mejor que la de referencia.

Por último, se hicieron estudios en los que tomando la formulación FS-10% como referencia, se sustituyó el HPMC y el SDS por el chitosán. Estos últimos ensayos se desarrollaron para intentar igualar o mejorar los resultados anteriores, cambiando excipientes inactivos por otro que tuviera la misma función y, además, añadiera beneficios. Los resultados obtenidos hasta ahora son esperanzadores, ya que la formulación de chitosán FACC-10% ha dado valores en la velocidad de disolución semejantes a los que dio FS-10%.

CONCLUSIONES:

1. La adición de determinados excipientes hace que se mejoren las características del naproxeno base materia prima. La adición de (HPMC) y croscarmelosa permiten la elaboración de dispersiones sólidas. La incorporación de SDS permite elaborar sistemas micelares que mejoran la disolución del Naproxeno.
2. La formulación que mejores resultados obtuvo, tanto en los estudios de caracterización como sobre todo en los ensayos de velocidad de disolución, fue la denominada en este trabajo como FS-10%.
3. La utilización de diferentes métodos para la caracterización de formulaciones, como la microscopia electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido, son imprescindibles para conocer y entender las propiedades y los efectos que tienen los excipientes en las diferentes formulaciones.

4. La utilización de sistemas micelares de naproxeno en estudios “in vivo”, da como resultado que estos sistemas micelares tengan concentraciones más altas de naproxeno a nivel plasmático y cerebral, en comparación con el naproxeno materia prima. Los sistemas micelares con SDS mostraron una mayor concentración tanto plasmática como cerebral que las micelas (Cremophor® RH 40) o (Tween® 80).
5. El método de HPLC submicelar con detección por fluorescencia es un método analítico óptimo para la cuantificación de naproxeno en bajas concentraciones. Este método al utilizar en su fase móvil un surfactante, incrementa la detección por fluorescencia, permitiendo cuantificar concentraciones muy bajas de naproxeno en cerebro. Este método quedó comprobado y validado a través de los estudios de farmacocinética “in vivo”.
6. Los estudios de farmacocinética “in vivo” muestran que la formulación FS-10% obtuvo unos resultados de biodisponibilidad superiores al naproxeno de referencia. Todos los parámetros estudiados (AUC_{0-2h} , C_{max} y T_{max}) tuvieron resultados significativamente mejores.
7. La formulación FS-10% alcanza mayores niveles plasmáticos y cerebrales de naproxeno en un tiempo menor y, por lo tanto, la formulación FS-10% podría ser un tratamiento más adecuado para tratar los ataques de migraña con respecto a la formulación de referencia.
8. La incorporación de chitosán a la formulación FS-10%, y la eliminación en ésta de HPMC y SDS, da unos resultados de velocidad de disolución semejantes a

los de FS-10%. Además, esperamos que la adición de chitosán a la formulación pueda ser eficaz para disminuir la irritación gástrica que produce el naproxeno.

SUMMARY

SUMMARY:

Development of novel oral formulations of naproxen for the treatment of migraine.

INTRODUCTION:

Migraine is one of the most worldwide-spread health conditions. Hence, it is of pronounced interest to improve current treatments and/or develop novel treatments that would improve patients' health.

Currently, treatments can be divided into 2 modalities based on the status of the condition: acute treatments, for ongoing migraine episodes, and prophylactic treatments, as preventive treatment. Out of the large group of medicines being used as treatment, NSAIDs products are commonly used at both modalities. Within NSAIDs products, naproxen's characteristics has shown great feasibility when used for optimizing formulation.

Naproxen has been selected due to two main reasons. Firstly, its widespread use; and secondly, its potential margin of improvement, as a result of both its high starting dose (1000mg), and its slow release (T_{max} 2-4h). Thus, the aspiration would be to improve both its bioavailability and the time of effect, consequently decreasing the effective dose and the time of action.

In order to try to improve these two parameters, several excipients are needed to help their rapid dissolution and absorption. The following excipients were selected bibliographically: HPMC, sodium croscarmellose and SDS.

OBJECTIVES AND RESULTS:

The main objective of the thesis is the development and creation of an oral formulation, naproxen's based that together with different excipients improves dissolution rates with respect to the reference formulations, with the purpose of being used for the treatment

of migraine. This is the main objective of the thesis, from which the following new secondary objectives are derived in order to complete the main one:

Creation and development of an analytical method that allows the analysis of low quantities of naproxen in biological samples of plasma and brain. And finally, to validate that the formulation of naproxen developed could be an effective treatment for migraine attacks, through "in vivo" pharmacokinetic studies.

RESULTS:

Across all the galenic formulations developed with their corresponding characterizations and dissolution rate tests, it was concluded that the FS-10% formulation was the one that obtained the best results, and therefore, it was chosen as the potential treatment for migraine.

The next step was the creation of an analytical method that would allow the quantification of naproxen in biological samples and, in addition, investigate the best brain/plasma distribution of naproxen between formulations with different surfactants, in order to know which one was better for "in vivo" treatments. The chosen method of analysis was submicellar-HPLC with fluorescence detection, thanks to having both fluorescence detection and the use of a mobile phase surfactant made it possible to quantify very low concentrations of naproxen. The results obtained in this development were reasonably good, it was concluded that SDS has shown better results than RH 40 and T 80 at both the analytical method, and for the administration of the "in vivo" formulation.

After the development of the analytical method and studies with different surfactants, the "in vivo" pharmacokinetic studies were done with the formulation containing SDS (FS-10%). The data obtained from these studies was very positive, since the parameters studied (AUC_{0-2h} , C_{max} , T_{max}) gave significantly better results for the FS-10% formulation with respect to the reference. The data obtained could be outlined as the FS-10%

formulation reaches higher plasma and brain levels of naproxen in a shorter time, and therefore, could treat migraine attacks better than the reference one.

Finally, studies were conducted taking the FS-10% formulation as a reference, 2 excipients were changed for chitosan. These latter trials were developed in an endeavor to match or improve previous results by exchanging inactive excipients for one that had the same function and also added benefit. The results obtained so far are encouraging, since the formulation of chitosan FACC-10% has given dissolution rate values similar to those from FS-10%.

CONCLUSIONS:

1. The addition of certain excipients improves the characteristics of the naproxen raw material. The addition of (HPMC) and croscarmellose allows for the production of solid dispersions. The addition of SDS allows for the elaboration of micellar systems that improve the dissolution of Naproxen.
2. The formulation which obtained the best results, both in characterization studies and mainly in dissolution rate tests, was the one so-called in this work as FS-10%.
3. The use of different methods for the characterization of formulations, such as scanning electron microscopy, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry, are essential to know and understand the properties and effects that excipients have on different formulations.
4. The use of naproxen micellar systems in "in vivo" studies results in these micellar systems having higher concentrations of naproxen at the plasma and brain level, compared to the naproxen raw material. Micellar systems with

SDS showed higher concentrations at both plasma and brain levels than either of the micelles (Cremophor® RH 40) or (Tween® 80).

5. The submicellar HPLC method with fluorescence detection is an optimal analytical method for quantifying naproxen at low concentrations. This method, via using a surfactant in its mobile phase, increases the detection by fluorescence, allowing the quantification of very low concentrations of naproxen in biological brain samples. This method was tested and validated through "in vivo" pharmacokinetic studies.
6. "In vivo" pharmacokinetic studies showed that the FS-10% formulation achieved bioavailability results higher than the reference naproxen raw material. All measured parameters (AUC_{0-2h} , C_{max} , T_{max}) had significantly better results.
7. The FS-10% formulation reaches higher plasma and brain levels of naproxen in a shorter time and, therefore, the FS-10% formulation could be a more suitable treatment for treating migraine attacks with respect to the reference.
8. The incorporation of chitosan into the FS-10% formulation, and the elimination of HPMC and SDS from the formulation, gave dissolution rate results similar to those of FS-10%. Thus, chitosan could replace these two excipients and, moreover, could reduce the gastric irritation caused by naproxen.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN:

La migraña es una cefalea que afecta a una elevada cantidad de población y muchas veces el paciente sufre varios casos en el último año. La prevalencia de la migraña a lo largo de la vida es de alrededor del 13% en países occidentales (Merikangas, K.R. y Lateef, T., 2013). En España se hizo un estudio epidemiológico CATI, (Porta-Ettesam, J. et al, 2010), que reveló que la prevalencia es del 12,6%, siendo el doble en mujeres que en hombres, afectando más a los adultos jóvenes que a los mayores de 50 años y teniendo un mayor porcentaje en la raza caucásica que en la africana o asiática (Stewart, W.F. et al, 1996).

En España padecen migraña más de 5 millones de personas según datos de 2019 de la Sociedad Española de Neurología, el tener un brote de migraña o simplemente padecerla, altera la calidad de vida de quien la padece, ya que reduce su rendimiento e incluso puede llegar a hacer que tengan que parar totalmente su actividad. Esto es un grave problema social, familiar y laboral ya que puede incapacitar en cualquier momento del día. Según la OMS es la 8º enfermedad más discapacitante y la 1º dentro de las enfermedades neurológicas. De hecho, las enfermedades neurológicas ocasionan 43 millones de “años perdidos por discapacidad” y más de la mitad es debido a las migrañas (Lozano, R. et al, 2012). Estos datos se deben no sólo por la capacidad discapacitante, sino por la enorme frecuencia con la que se dan, ya que es más frecuente que enfermedades como la epilepsia, la esclerosis múltiple o el Parkinson. Cabe destacar que esta enfermedad no sólo tiene una enorme carga personal, sino que además tiene un gran coste económico para la sociedad, producido tanto por el coste de los fármacos como por los costes indirectos (Láinez, J.M. et al, 2011). España es uno de los países donde más cuesta económicamente, en torno a 1500 euros por persona al año, de los cuales la mayoría es por costes indirectos derivados de la disminución del rendimiento y absentismo laboral y no tanto por los tratamientos farmacológicos o consultas. (Linde, M. et al, 2012).

Los medicamentos para el tratamiento de la migraña se pueden dividir en 2 modalidades. Los primeros son medicamentos para el tratamiento agudo, es decir, para el momento en el que se produzca el ataque y los segundos son medicamentos profilácticos, es decir, para prevenir que aparezcan los ataques.

Con respecto a los medicamentos para el tratamiento agudo, los que han demostrado mayor eficacia y se utilizan con mayor frecuencia son los de familia de los triptanes y los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Dentro los triptanes, los más usados son el Sumatriptán, Zolmitriptán y Rizatriptán y dentro de los AINES el Ibuprofeno y el Naproxeno. Cabe destacar que con anterioridad existió otro grupo de fármacos muy utilizados (la ergotamina y sus derivados), pero en la actualidad están en desuso.

El tratamiento profiláctico de la migraña está indicado en pacientes con migrañas recurrentes y/o con intensidad elevada que hace que perjudique su vida cotidiana. Se suele recomendar a pacientes con más de 2 crisis mensuales de migraña. Los fármacos más utilizados son los siguientes: betabloqueantes, antagonistas de los canales de calcio, antidepresivos (tricíclicos y ISRS), toxina botulínica A, (AINES)...

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), por tanto, son útiles tanto para el tratamiento sintomático como para el tratamiento profiláctico, de ahí que sean la primera opción cuando un paciente comienza con crisis de migraña, ya que pueden servir tanto en las crisis agudas como para estadios menores. Además, también suele ser la primera elección como tratamiento debido a que son los más seguros y los que menos efectos secundarios tienen.

Dentro de los distintos AINES, aunque presentan características similares entre ellos, el naproxeno está considerado como fármaco de primera elección frente al dolor intenso, llegando a ser el segundo AINE más consumido en España por detrás del Ibuprofeno, según fuentes del CIMA. El naproxeno es el tratamiento de elección en dolores agudos

como artritis reumatoide, artrosis, episodios agudos de gota, destacando su uso en el ataque de migraña. En los últimos años el naproxeno se prescribe y se consume cada vez más para el tratamiento puntual o prolongado de la migraña. Sin embargo, es importante destacar que las dosis de naproxeno que se recomiendan para el tratamiento agudo de las migrañas leves o moderadas, es de 750mg y continuar a la media hora con 250mg más. Esta dosis es muy elevada y aumenta el riesgo de efectos adversos graves como úlceras o hemorragias gastrointestinales.

El empleo de nuevas formulaciones con una mayor biodisponibilidad plasmática y elevada biodistribución cerebral nos permitirá disminuir las dosis de naproxeno utilizadas, disminuyendo el riesgo de hemorragias gastrointestinales.

En base a estas indicaciones, el objetivo principal de la tesis fue el desarrollo de formulaciones de naproxeno que mejoren tanto su biodisponibilidad como su biodistribución a cerebro, disminuyendo también el tiempo de comienzo de acción analgésica, especialmente importante en los pacientes que sufren un ataque agudo de migraña.

Una vez que se seleccionó el naproxeno como principio activo para tratar los ataques agudos de migraña, se procede a seleccionar los excipientes que permitan obtener una rápida velocidad de disolución (Girotra, P. y Singh, S.K., 2016). En los últimos años ha habido un aumento en el desarrollo de nuevos tratamientos para estos ataques agudos, incluidos comprimidos de rápida liberación (Sheftell, F.D. et al, 2005; Sheshala, R. et al, 2011; Stange, U. et al, 2014). El hecho de intentar mejorar su acción se debe a que se ha reportado que el naproxeno tiene una baja permeabilidad (Figuroa, C.E. y Bose, S., 2013) y que su escasa solubilidad y baja partición disminuye su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (Sheha, M., 2012). Además, el naproxeno es un fármaco poco soluble que requiere altas concentraciones plasmáticas para lograr concentraciones cerebrales efectivas en la migraña.

Las formulaciones orales actuales de naproxeno tienen varios inconvenientes, como el lento inicio de acción, baja biodisponibilidad y gran variabilidad inter-sujeto en la tasa de absorción (T_{max}) (Choi, H.G. et al, 2015). Los valores plasmáticos de T_{max} para el naproxeno son de entre 2 y 4 h, por tanto, el desarrollo de nuevas formulaciones de rápida disolución, que producen un rápido inicio de acción y que mejoran parámetros farmacocinéticos como los valores de C_{max} , T_{max} y AUC_{0-t} , en plasma y cerebro para las primeras 2-4 h después de la dosificación son particularmente importante y atractivas (Choi, H.G. et al, 2015; Haberer, L.J. et al, 2010).

En los últimos años ha habido varios grupos de investigadores que han intentado a través de diferentes estrategias mejorar la formulación de naproxeno. Algunas de ellas es la adición de un polímero hidrófilo como HPMC (Ha, E.S. et al, 2015; Kumar, S. y Burgess, D.J., 2014; Mishra, B. et al, 2015), o de surfactantes (Li, M. et al, 2016; Mosquera-Giraldo, L.I. et al, 2014; Stange, U. et al, 2014) para evitar problemas de aglomeración y mejorar la humectabilidad.

Los derivados celulósicos no iónicos son un amplio grupo de polímeros hidrofílicos que proporcionan propiedades interesantes en medios acuosos. El uso de polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxipropilcelulosa han demostrado mejorar la estabilización estérica y electrostática de las estructuras cristalinas (Figueroa, C.E. y Bose, S., 2013). En solución acuosa, produjeron resultados importantes en la estabilización de la formulación debido a la presencia de enlaces de hidrógeno con el núcleo hidrofóbico del principio activo (Douroumis, D. et al, 2007; Mishra, B. et al, 2015). La creación de formulaciones de disolución rápida utilizando estos polímeros hidrófilos como agente aglutinante podrían reducir la hidrofobicidad de los cristales del fármaco. Por tanto, el uso de derivados celulósicos mejora la estabilidad e incrementan las características hidrófilas en la superficie de las partículas con el medio acuoso.

Además, el uso de surfactantes puede prevenir la agregación de micropartículas y nanopartículas mejorando la estabilidad de las suspensiones de nanocristales (Kumar, S. y Burgess, D.J., 2014). Surfactantes tales como el lauril sulfato sódico (SDS) también mejora la velocidad de disolución de fármacos poco solubles (Mosquera-Giraldo, L.I. et al, 2014). Sin embargo, se requieren grandes cantidades de surfactantes para lograr una alta disolución de naproxeno (Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009). La adición de SDS con polímeros hidrófilos como HPMC produce un efecto de sinergia entre HPMC y SDS, y facilita la interacción con la superficie del cristal. Estos sistemas HPMC-SDS hidrófilos requieren pequeñas cantidades de agente surfactante para obtener una rápida disolución con medicamentos hidrofóbicos (Li, M. et al, 2016). Excipientes hidrofílicos como Pharmacoat (Li, M. et al, 2016), Avicel pH 102, Cab-o-sil (Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009), y manitol (Figueroa, C.E. y Bose, S., 2013) se han utilizado como promotores de la adsorción en varios fármacos y surfactantes. Estos surfactantes, con los promotores de adsorción ayudan a dispersar el fármaco en el entorno gastrointestinal. Por tanto, una alternativa interesante es usar un disgregante hidrofílico, como la croscarmelosa sódica o glicolato sódico de almidón, que por su alta capacidad de embeber agua sea capaz de mejorar la interacción entre el fármaco y el agua, aumentando la dispersabilidad de las partículas hidrofóbicas del fármaco en un medio gastrónitestinal con una menor cantidad de excipiente (Maghsoodi, M. et al, 2008; Maggi, L. et al, 2013; Matji, A. et al, 2017).

Por tanto, el empleo de un tensioactivo como el SDS y de un superdisgragante como la croscarmelosa en la formulación es muy interesante para intentar mejorarla.

Por estos motivos, se decidió el uso de diferentes excipientes en el desarrollo de la nueva formulación de rápida disolución: HPMC, CROSCARMELOSA Y SDS.

1.2. BIBLIOGRAFÍA:

- Choi, H.G., Jeon, J.Y., Kwak, S.S., Kim, H., Jin, C., Im, Y.J., Kim, E.Y., Wang, H.M., Kim, Y., Lee, S.Y., Kim, M.G. (2015). Pharmacokinetic comparison study of a combination containing 500 mg of Naproxen and 20 mg of Esomeprazole: a randomized single-dose, 2-way crossover, open-label study in healthy Korean men. *Clin. Ther.* 1, 83–93.
- Douroumis, D., Bouropoulos, N., Fahr, A., (2007). Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 645–653.
- Figueroa, C.E., Bose, S., (2013). Spray granulation: importance of process parameters on in vitro and in vivo behavior of dried nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1046–1055.
- Girotra, P., Singh, S.K., (2016). A comparative study of orally delivered PBCA and ApoE coupled BSA nanoparticles for brain targeting of sumatriptan succinate in therapeutic management of migraine. *Pharm. Res.* 33, 1682–1695.
- Ha, E.S., Choo, G.H., Baek, I.H., Kim, J.S., Cho, W., Jung, Y.S., Jin, S.E., Hwang, S.J., Kim, M.S., (2015). Dissolution and bioavailability of lercanidipine–hydroxypropylmethyl cellulose nanoparticles with surfactant. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 218–222.
- Haberer, L.J., Walls, C.M., Lener, S.E., Taylor, D.R., McDonald, S.A., (2010). Distinct pharmacokinetic profile and safety of a fixed-dose tablet of sumatriptan and naproxen sodium for the acute treatment of migraine. *Headache* 50, 357–373.
- Kumar, S., Burgess, D.J., (2014). Wet milling induced physical and chemical instabilities of naproxen nano-crystalline suspensions. *Int. J. Pharm.* 466, 223–232.

- Láinez J.M., Casado, I., Gómez, M., Medrano, V., (2011). Impacto socioeconómico y clasificación de las cefaleas. En: Diaz Insa, S y comité del grupo de estudio de cefaleas, Eds. Guía oficial de la Sociedad Española de Neurología para el diagnóstico y tratamiento de las cefaleas. No.10. Barcelona: Prous Science, 2011; pp. 1-18.
- Li, M., Lopez, N., Bilgili, E., (2016). A study of the impact of polymer–surfactant in drug nanoparticle coated pharmatose composites on dissolution performance. *Adv. Powder. Technol.* 27, 1625–1636.
- Linde, M., Gustavsson, A., Stovner, L. J., Steiner, T. J., Barré, J., Katsarava, Z., et al. (2012). The cost of headache disorders in Europe: the Eurolight project. *European journal of neurology*, 19(5), 703-711.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. (2010). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2095-2128
- Maggi, L., Bruni, G., Maietta, M., Canobbio, A., Cardini, A., Conte, U., (2013). II. Technological approaches to improve the dissolution behavior of nateglinide, alipophilic insoluble drug: co milling. *Int. J. Pharm.* 454, 568–572.
- Maghsoodi, M., Taghizadeh, O., Martin, G.P., Nokhodchi, A., (2008). Particle design of naproxen-disintegrant agglomerates for direct compression by a crystallo-coagglomeration technique. *Int. J. Pharm.* 351, 45–54.
- Matji, A., Carvajal, L., Conde, F., Peña, M.A., Donato, N., Serrano, D.R., Torrado, J.J., (2017). Effect of the characteristics of raw material ibuprofen on roller compaction and dissolution. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 30, 1–8.

- Merikangas, K.R., Lateef, T., (2013). Epidemiology and quality of life with migraine. En: Fernández de las Peñas C, Chaitow L, Schoenen J, Eds. Multidisciplinary Management of Migraine. Pharmacological, manual and other therapies. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2013; pp. 1-7.
- Mishra, B., Sahoo, J., Dixit, P.K., (2015). Formulation and process optimization of naproxen nanosuspensions stabilized by hydroxy propyl methyl cellulose. Carbohydr. Polym. 127, 300–308.
- Mosquera-Giraldo, L.I., Trasi, N.S., Taylor, L.S., (2014). Impact of surfactants on the crystal growth of amorphous celecoxib. Int. J. Pharm. 461, 251–257.
- Porta-Etessam, J., Lopez-Gil, A., Matías-Guiu, J., & Fernández, C. (2010). Validación de un cuestionario diagnóstico para migraña adaptado para encuesta telefónica asistida por ordenador. Neurología, 25(3), 163-167.
- Sheftell, F.D., Dahlöf, C.G., Brandes, J.L., Agosti, R., Jones, M.W., Barrett, P.S., (2005). Two replicate randomized, double-blind, placebo-controlled trials of the time to onset of pain relief in the acute treatment of migraine with a fastdisintegrating/rapid-release formulation of sumatriptan tablets. Clin. Ther. 27, 407–417.
- Sheha, M., (2012). Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. Arch. Pharm. Res. 35, 523–530.
- Sheshala, R., Khan, N., Darwis, Y., (2011). Formulation and optimization of orally disintegrating tablets of sumatriptan succinate. Chem. Pharm. Bull. 59, 920– 928.
- Stange, U., Führling, C., Gieseler, H., (2014). Formulation, preparation, and evaluation of novel orally disintegrating tablets containing taste-masked naproxen sodium granules and naratriptan hydrochloride. J. Pharm. Sci. 103, 1233–1245.
- Stewart, W.F., Lipton, R.B., Liberman, J., (1996). Variation in migraine prevalence by race. Neurology; 47: 52-59.

- Tiong, N., Elkordy, A.A., (2009). Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 373–384.

II. OBJETIVOS Y
PLANTEAMIENTO -
OBJECTIVES AND
APPROACH

II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO - OBJECTIVES AND APPROACH

2.1. OBJETIVOS:

Los objetivos de este trabajo doctoral quedan resumidos en:

Objetivo principal:

Desarrollo y creación de una formulación oral de naproxeno en la que, mediante el empleo de disgregantes hidrofílicos y surfactantes, mejore su velocidad de disolución y permita alcanzar rápidas concentraciones plasmáticas y cerebrales.

Objetivos secundarios:

Creación y puesta a punto de un método analítico que permita analizar cantidades pequeñas de naproxeno en muestras biológicas de plasma y cerebro.

Comprobar que la formulación de naproxeno desarrollada podría ser un tratamiento efectivo para los ataques de migraña, mediante la realización de estudios de biodisponibilidad en plasma y de biodistribución en cerebro.

2.2. PLANTEAMIENTO:

Para la realización de este trabajo se siguieron las siguientes etapas:

1. Elaboración galénica de formulaciones de naproxeno con los diferentes excipientes (HPMC, Croscarmelosa sódica y SDS). Caracterización fármaco técnica de estas formulaciones mediante estudios de microscopia electrónica, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido.
2. Puesta a punto de un estudio de velocidad de disolución que permita evaluar las diferentes formulaciones de naproxeno, con el fin de seleccionar las proporciones de los distintos excipientes que presenten los perfiles de disolución más rápidos.
3. Desarrollo de un método de cromatografía líquida submicelar con detector de fluorescencia que sea rápido, preciso y reproducible, para cuantificar concentraciones bajas de naproxeno en muestras de plasma y cerebro.
4. Estudios de biodisponibilidad en plasma y biodistribución en cerebro de las nuevas formulaciones de naproxeno, para seleccionar las formulaciones con una rápida acción analgésica.
5. Estudiar la posibilidad de desarrollar nuevas formulaciones de rápida disolución de naproxeno, en las que los nuevos excipientes además de tener propiedades activas, tengan la capacidad de disminuir el riesgo de lesiones gastro-intestinales producidas por el naproxeno.

2.3. OBJECTIVES:

The objectives of this thesis are summarized in:

Main objective:

Development and creation of an oral formulation, naproxen's based that together with different excipients improves dissolution rates with respect to the reference formulations, with the purpose of being used for the treatment of migraine.

Secondary objectives:

Creation and development of an analytical method that allows the analysis of low quantities of naproxen in biological samples of plasma and brain.

Perform bioavailability studies in plasma and biodistribution in brain to verify that the developed formulation of naproxen could be an effective treatment for migraine attacks.

2.4. APPROACH:

To carry out this work, the following stages were followed:

1. Galenic preparation of naproxen formulations with the different excipients (HPMC, Croscarmellose sodium and SDS). Drug-technical characterization of these formulations by electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), and differential scanning calorimetry (DSC).
2. Development of a dissolution rate study to evaluate the different naproxen formulations, in order to select the proportions of the different excipients that present the fastest dissolution profiles
3. Development of a rapid, accurate and reproducible submicellar liquid chromatography method with fluorescence detector to quantify low concentrations of naproxen in plasma and brain samples.
4. Studies of bioavailability in plasma and biodistribution in brain of the novel formulations of naproxen, to select the formulations with a fast analgesic action.
5. Study the possibility of developing new fast-dissolving formulations of naproxen, in which the new excipients, in addition to having active properties, have the ability to reduce the risk of gastro-intestinal lesions produced by naproxen.

III. PARTE TEÓRICA:

III. PARTE TEÓRICA

3.1. MIGRAÑA:

La migraña es una cefalea primaria que suele aparecer por primera vez en la pubertad y que posteriormente afecta principalmente a personas entre los 35 y los 45 años de edad. Es una afección muy frecuente, de base genética, que afecta a entre el 12% y el 16% de la población general, siendo la incidencia más alta en las mujeres. Este tipo de cefalea tiene como síntoma principal el dolor de cabeza muy intenso, provocado por la liberación de sustancias inflamatorias causantes del dolor alrededor de los nervios y vasos sanguíneos de la cabeza (Linde, M. et al, 2012; Zavala, H. y Saravia, B., 2003). Se debe distinguir la migraña de otros tipos de cefaleas o dolores de cabeza como: cefalea tensional, cefalea en brotes y/o cefaleas secundarias originadas por multitud de causas, como gripe, meningitis, traumatismos craneoencefálicos y tumores cerebrales (Burstein, R. et al, 2015; OMS, 2012).

La migraña se caracteriza por ser recurrente, a menudo durante toda la vida, aunque dependiendo de la persona pueden aparecer episodios desde una vez por semana hasta una vez al año. Las crisis de migraña pueden estar precedidas de manifestaciones neurológicas variadas (aura) y que consisten en trastornos visuales o sensación de hormigueo en labio, lengua y la mitad de la cara. El dolor suele ser de gran intensidad, con una duración de entre 4 y 72 horas que afecta a la mitad derecha o izquierda de la cabeza, acompañada de sensibilidad a la luz (fotofobia), náuseas y vómitos. (Goadsby, P. J., 2009; Saravia, 2003; OMS, 2012).

3.1.1. Factores desencadenantes:

Existen una serie de factores que pueden provocar que aparezcan las crisis de migrañas. Entre los más usuales se encuentran los siguientes:

- Alimentación: Los periodos de ayuno o el consumo de ciertos alimentos pueden desencadenar crisis de migraña. Los alimentos que más influyen son: queso, fruta, chocolate, café y bebidas alcohólicas, en especial el vino tinto (Sharav, Y. y Benoliel, R., 2011; Burstein, R. et al, 2015).
- Horas de sueño: Los cambios en el patrón de sueño y dormir más o menos horas de lo habitual son un factor que puede desencadenar la crisis de migraña (Titus, F. y Pozo, P., 2009).
- Factores psicológicos: estrés, ansiedad, preocupaciones o los impactos emocionales, suelen desencadenar en alguna ocasión la aparición de una crisis. También los cambios bruscos atmosféricos como los cambios de presión atmosférica y el viento intenso suelen ser un factor desencadenante.
- Ciclo menstrual: El 50% de las mujeres que padecen migrañas refieren que han detectado una relación entre la presencia de crisis y determinado momento del ciclo hormonal femenino. Los días en que aparecen con más frecuencia los episodios migrañosos son los previos a la menstruación. Se cree que esto se debe al descenso en los niveles de estrógenos circulantes que tiene lugar de forma natural en esa fase del ciclo. (Titus, F. y Pozo, P., 2009)

3.1.2. Fases de la migraña:

Se pueden distinguir cuatro fases en el episodio de migraña, los pródromos, el aura, la fase de dolor y los posdromos o resolución, aunque a menudo no están todas presentes. (Dodick, D.W., 2018).

- Fase 1: Pródromos

Los pródromos son una serie de síntomas o sensaciones muy variadas y a veces sutiles que se presentan por regla general varias horas antes del dolor y están presentes en la mayor parte de los pacientes con migraña. Algunos de los más frecuentes son

irritabilidad, bostezos continuos, falta de atención, palidez y deseo compulsivo de ingerir alimentos dulces. A diferencia del aura, estos signos premonitorios pueden aparecer muchas horas e incluso días antes del ataque agudo de migraña (Dodick, D.W., 2018; Mateos, V. 2010).

- Fase 2: Aura

El aura se presenta en torno al 25% de los pacientes con migraña y dura aproximadamente entre media hora y una hora. Esta fase se da antes del dolor y cuando desaparece el aura hay un intervalo menor de una hora sin síntomas y posteriormente comienza el ataque agudo de migraña (Mateos, V. 2010). Los síntomas más característicos de esta fase son visuales y de los más diversos, lo más típico es que se manifieste con una zona ciega del campo visual acompañada de destellos luminosos. En otras ocasiones, el aura provoca pérdida de sensibilidad y sensación de hormigueo que afecta a la mitad de la cavidad bucal y se extiende posteriormente al miembro superior y la mano del mismo lado. Con menos frecuencia pueden producirse deficiencias motoras que ocasionan dificultad para hablar o pérdida de movilidad en la mitad del cuerpo. Todos estos síntomas son reversibles (Dodick, D.W., 2018; Mateos V, 2010).

- Fase 3: Dolor

Esta fase comienza con un dolor leve que aumenta progresivamente en intensidad hasta ser un dolor moderado/fuerte dependiendo de la persona y del brote. El dolor suele afectar a la mitad derecha o izquierda de la cabeza, y se acompaña de una serie de síntomas característicos como el malestar a la luz y a los ruidos (fotofobia y fonofobia). Además, se pueden presentar sensaciones pulsátiles que provoca frecuentemente náuseas y vómitos. La duración de esta fase es la más compleja de analizar ya que

puede variar dependiendo del brote y de la persona desde las 3 horas hasta las 24 horas si no se realiza ningún tratamiento farmacológico o si éste es ineficaz (Mateos, V. 2010).

- Fase 4: Posdromo o Resolución

El dolor disminuye progresivamente hasta desaparecer por completo, sin embargo, la mayor parte de los pacientes manifiestan que después de las crisis no se encuentran bien y presentan cansancio, somnolencia y falta de concentración, es lo que se conoce como posdromos, una fase que se da después del dolor y que tarda en desaparecer hasta la normalidad previa al brote. (Dodick, D.W., 2018; Mateos, V. 2010).

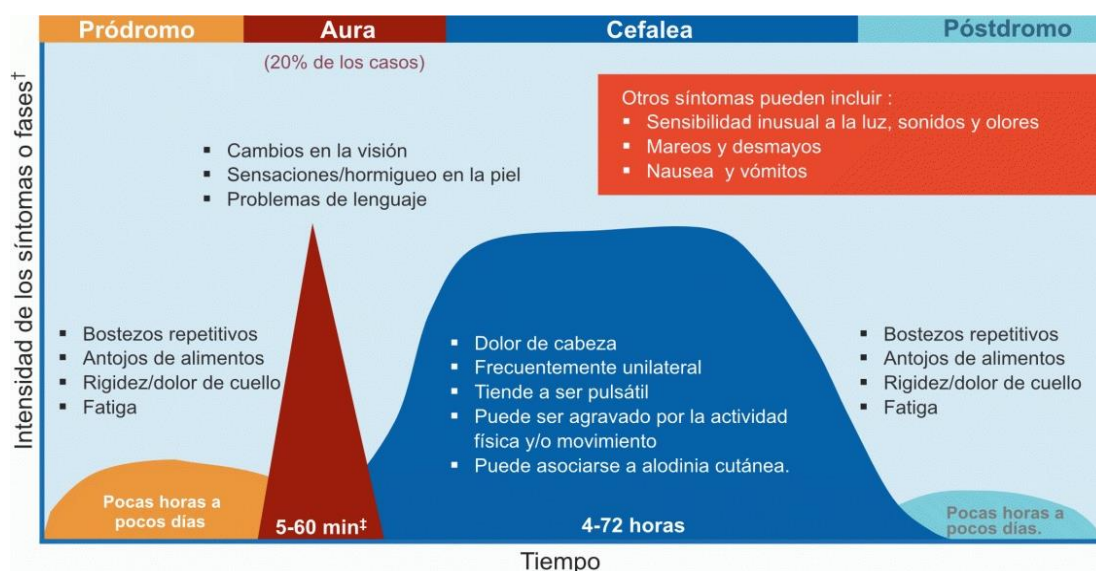


Figura 1. Fases de la migraña con sus características y tiempos. Imagen de Medical Academy.

3.1.3. Tipos de migraña:

Pueden distinguirse diferentes clases de migraña según los síntomas que se presenten, las más usuales son la migraña con aura o sin aura (Manzoni, G.C. et al, 2011; Láinez, J.M. et al, 2011).

- Migraña con aura o migraña clásica: Es el tipo de migraña que viene precedida por los síntomas que se dan en la fase del aura, que comúnmente se

experimenta como una distorsión en la visión. Corresponde aproximadamente al 25% del total de los casos totales de migraña (Ramírez, S.F. y Urrea, E., 2012).

- Migraña sin aura o migraña común: Este tipo de migraña carece de aura. Muchos pacientes experimentan una sensación extraña y presienten antes de presentar un ataque, estos síntomas se llaman pródromos y no deben confundirse con el aura. La migraña sin aura es la más frecuente y afecta aproximadamente al 75% de las personas Ramírez, S.F. y Urrea, E., 2012).
- Otras variedades de migraña poco comunes, menos del 5%, son la migraña hemipléjica, migraña de tipo basilar, migraña retiniana, aura sin migraña y migraña oftalmopléjica.

3.1.4. Tratamientos farmacológicos:

Para el tratamiento de la migraña, los medicamentos que han demostrado mayor eficacia y que se utilizan con mayor frecuencia son la familia de los triptanes y los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como el ibuprofeno o el naproxeno. Cabe destacar que con anterioridad existió otro grupo de fármacos muy utilizados, como son la ergotamina y sus derivados.

Tanto la Ergotamina como sus derivados son fármacos específicos para el tratamiento de la migraña. En 1937 Harold G. Wolff y John Graham demostraron que la ergotamina tiene un efecto vasoconstrictor sobre las arterias temporales. La Ergotamina es un derivado del cornezuelo del centeno, que actúa sobre el músculo liso vascular cerebral. El mecanismo de acción de la ergotamina consiste en una vasoconstricción periférica mediante el bloqueo de los receptores alfa-adrenérgicos, esto produce una supresión o reducción del dolor de cabeza por una disminución de la actividad serotoninérgica a nivel central. El efecto prolongado de la ergotamina y sus derivados pueden originar cefalea de rebote, por lo que se recomienda no utilizarlos más de dos veces por semana (Perrin, V.L., 1985). Este tipo de medicamentos se utilizaron con mucha frecuencia antes

de la salida al mercado de los triptanes, que en la actualidad presentan la misma eficacia y una mayor seguridad que la ergotamina, por ese motivo, la mayoría de estos medicamentos ya están retirados o en desuso (Caffaratti, M. et al, 2008).

Agonistas selectivos de receptores 5-HT₁ (Triptanes):

En la actualidad los derivados de la ergotamina se han visto parcialmente desplazados por los triptanes, debido a la mayor seguridad de estos últimos. Hay que tener en cuenta que deben transcurrir 24 horas desde la administración de ergotamina hasta la administración de triptanes, si se realizase el cambio de un tipo de fármaco al otro.

Los triptanes son agonistas selectivos de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} y con unos efectos más débiles en 5-HT_{1A}, 5-HT_{5A} Y 5-HT₇. No presentan efectos sobre el receptor serotoninérgico 5-HT₂, receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, muscarínicos o de benzodiazepinas. Esta acción sobre los receptores serotoninérgicos produce una vasoconstricción de los vasos sanguíneos cerebrales. Además de esto, la familia de los triptanes (a excepción del sumatriptán), interaccionan con el sistema trigémino vascular, reducen la liberación de neuropéptidos y la extravasación proteica en los vasos sanguíneos de la duramadre, y la consecuente inflamación de meninge que puede estar relacionada con la aparición del dolor (Cameron, C. et al, 2015).

Existen diferentes tipos de triptanes, entre los cuales destacan: Sumatriptán, Rizatriptán y Zolmitriptán. Además de los triptanes comentados anteriormente, existen otros agonistas selectivos de receptores 5-HT₁ utilizados en el tratamiento de la migraña: Almotriptán, Eletriptán, Frovatriptán, Naratriptán.

Otros antimigrañosos:

En el tratamiento de la migraña se puede utilizar el Pizotifeno, este fármaco es un derivado piperidínico con acción orexígena, estimulador del apetito, al ser un antagonista de los receptores de serotonina 5-HT₂, también tiene efecto anticolinérgico y antihistamínico. Se ha comprobado que tiene una elevada eficacia en el tratamiento de la migraña, aunque su eficacia aparece al mes de iniciar el tratamiento. Su eficacia como antimigrañoso puede deberse a su acción como antagonista serotoninérgico, algunos estudios han destacado que su efecto también puede producirse por un bloqueo de los canales de calcio (Ramírez, S.F. y Urrea, E., 2012).

Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la migraña:

En el tratamiento de la fase aguda de la migraña se utilizan algunos analgésicos como el Ácido acetilsalicílico o el Paracetamol, estos fármacos son se utilizan en migrañas de moderada intensidad y se recomienda su administración en forma líquida para obtener efecto con mayor rapidez. También pueden utilizarse algunos antiinflamatorios no esteroídicos, algunos de los AINES más utilizados en este tipo de tratamientos son el ibuprofeno, ketoprofeno o naproxeno (Ramírez, S.F. y Urrea, E., 2012).

Además del uso de tratamientos farmacológicos cuando existe el ataque de migraña también se utilizan tratamientos farmacológicos con uso profiláctico, es decir antes de que ocurran estos ataques.

El tratamiento profiláctico de la migraña está indicado en pacientes con migrañas recurrentes y/o con intensidad elevada que hace que perjudique su vida cotidiana. Se suele recomendar a pacientes con más de 2 crisis mensuales de migraña. Los fármacos más utilizados son los siguientes: betabloqueantes, antagonistas de los canales de calcio, antidepresivos tricíclicos, antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antiserotoninérgicos, neuromoduladores, toxina botulínica A, (AINES) y

más recientemente anticuerpos monoclonales humanos. Estos últimos son un nuevo grupo de fármacos que se administran mensualmente como una inyección subcutánea para los casos de migraña en adultos con, al menos, 4 días de migraña al mes. (Sprenger, T. et al, 2018).

3.2. NAPROXENO:

3.2.1. Descripción y estructura química:

El naproxeno es un principio activo analgésico, antiinflamatorio y antipirético que pertenece a un grupo de fármacos denominados antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Dentro de este grupo, se incluye en el grupo de los derivados del ácido arilpropiónico. El nombre químico es el de ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico, su fórmula química es $C_{14}H_{14}O_3$ y su peso molecular es de 230g/mol. (Real Farmacopea Española 5ª Edición. 2015).

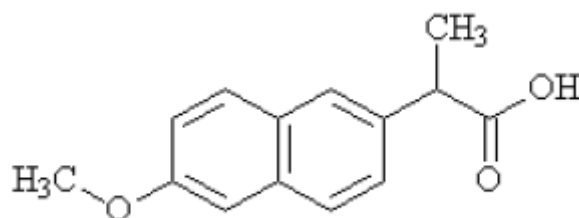


Figura 2. Estructura química del naproxeno.

Los derivados propiónicos tienen un carácter quiral, siendo la forma S (+) la farmacológicamente activa. Los preparados farmacéuticos de naproxeno contienen solamente el enantiómero S (+). (Real Farmacopea Española 5ª Edición. 2015).

3.2.2. Mecanismo de acción:

El naproxeno actúa impidiendo la síntesis de prostaglandinas y otros prostanoides, mediante la inhibición competitiva y reversible de la ciclooxigenasa (COX), esta inhibición es estereoespecífica.

La COX es la enzima encargada de convertir el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX). Algunas de estas moléculas participan en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis produce sus efectos terapéuticos. Es conveniente apuntar que el naproxeno no inhibe el conjunto de la cascada del ácido araquidónico (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

Existen al menos dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), con localizaciones y funciones diferentes. La COX-1 tiene características de enzima constitutiva, se encuentra en la mayoría de los tejidos y está relacionada con la síntesis de prostaglandinas protectoras de la mucosa gastrointestinal y el mantenimiento del flujo sanguíneo renal. En cambio, la COX-2 tiene características de enzima inducible, en la mayoría de los tejidos tras la estimulación por agentes inflamatorios y se relaciona con la producción de prostaglandinas implicadas en la inflamación, el crecimiento celular y la regulación de la ovulación. El naproxeno inhibe de manera no selectiva la actividad enzimática de ambas isoformas. (Brutzkus, J.C. et al, 2020; CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.3. Características farmacocinéticas:

- Absorción: el naproxeno puede ser administrado por vía oral, intramuscular o rectal. A través del tracto gastrointestinal es absorbido rápidamente y tiene una biodisponibilidad del 99%. La absorción rectal es buena pero más lenta que la oral. En ambos casos, la

absorción es completa. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan a las 2-4 horas. El grado de absorción no se ve afectado significativamente por cualquiera de los alimentos o la mayoría de antiácidos (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

- **Distribución:** está presente en la sangre principalmente como fármaco inalterado. Tiene un volumen de distribución de 0,16 L/kg y difunde a través de la barrera placentaria y lactosanguínea. A niveles terapéuticos se une a la albúmina sérica en más de un 99%. A dosis altas se produce saturación en la unión a proteínas plasmáticas por lo que aumenta el aclaramiento renal. La vida media plasmática es de entre 12 y 15 horas, lo que le permite alcanzar un estado estacionario a los 3 días de iniciar un tratamiento con un régimen de dosis dos veces al día (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

- **Metabolismo:** es metabolizado en el hígado por desmetilación y conjugación, dando lugar a 6-O-demetilnaproxeno y otros metabolitos sin actividad biológica significativa. El sistema del citocromo P450 (CYP), principalmente CYP2C9 es el encargado de realizar estas reacciones. El metabolismo en niños es similar al de los adultos. La enfermedad hepática alcohólica crónica reduce la concentración plasmática total de naproxeno, pero aumenta la concentración del naproxeno no ligado. En los ancianos, la concentración plasmática del naproxeno no ligado se incrementa a pesar de que la concentración plasmática total no se modifica (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

- **Excreción:** la excreción es casi en su totalidad a través de la orina (95%), por filtración glomerular, principalmente como naproxeno conjugado con una fracción del fármaco inalterada (<1%). Su semivida de eliminación es de 12-15 h y su aclaramiento de 0,13 mL/min/kg. Una pequeña cantidad, 3% o menos de la dosis administrada, se excreta en las heces. En pacientes con insuficiencia renal se pueden acumular metabolitos (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.4. Indicaciones terapéuticas:

El naproxeno está indicado en multitud de afecciones como en el tratamiento sintomático de la artritis reumatoide y otros síndromes reumatoides como osteoartrosis, episodios agudos de gota, espondilitis anquilosante y trastornos agudos musculoesqueléticos que cursan con dolor e inflamación. Además de esas indicaciones, es muy utilizado para el tratamiento de la dismenorrea, ataques agudos de migraña, dolor y estados febriles (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.5. Posología y pauta de administración:

La dosis usual diaria para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartrosis y espondilitis anquilosante oscila entre 500 mg y 1.000 mg tomados en dos dosis en intervalos de 12 horas. Para el tratamiento de trastornos agudos musculoesqueléticos y dismenorrea se recomienda una dosis inicial de 500 mg seguida de 250 mg a intervalos de 6-8 horas según se necesite, con una dosis máxima diaria tras el primer día de 1.250 mg. En el caso del tratamiento de episodios agudos de gota el protocolo a seguir es una dosis inicial de 750 mg seguida, al cabo de 8 horas de una de 500 mg y luego seguir con 250 mg a intervalos de 8 horas hasta que el ataque haya remitido. En las crisis de migraña se recomienda una dosis de 750 mg al primer síntoma, seguida de 250 mg al cabo de media hora y continuando con 500mg cada 8 horas si fuese necesario.

En niños, que estén en tratamiento de artritis reumatoide juvenil, la dosis será de 10 mg/kg/día a intervalos de 12 h. En insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca o insuficiencia hepática se reducirá la dosis.

Este medicamento se administra por vía oral, preferiblemente durante o después de las comidas. Los comprimidos deben tragarse completos, sin partarlos o aplastarlos (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.6. Reacciones adversas:

Todas las reacciones adversas en el tratamiento con naproxeno son muy raras, dándose menos de 1 caso por cada 10.000 pacientes. Las reacciones adversas más comunes, son las gastrointestinales, renales y cardíacas. Las reacciones adversas pueden minimizarse utilizando la dosis mínima eficaz durante el menor tiempo posible para controlar los síntomas. Los pacientes de edad avanzada y/o debilitados son particularmente susceptibles a los efectos adversos.

Las reacciones de naturaleza gastrointestinal son las más frecuentes. El riesgo de hemorragia gastrointestinal, úlcera o perforación es mayor cuando se utilizan dosis crecientes, en pacientes con antecedentes de úlcera y en ancianos. Estos pacientes deben comenzar el tratamiento con la dosis menor posible. Se recomienda prescribir a estos pacientes tratamiento concomitante con agentes protectores (misoprostol o inhibidores de la bomba de protones). Los AINES lesionan la mucosa gastroduodenal por dos mecanismos diferentes: un efecto local agudo, que es dependiente del pH y varía con el preparado usado; y un efecto sistémico, que es menos específico y ocurre sin contacto con la mucosa. (Brutzkus, J.C. et al, 2020).

El naproxeno, como la mayoría de los AINES, es un ácido débil que, a pH bajo, es soluble en lípidos y atraviesa las membranas plasmáticas de las células de la superficie gastrointestinal. Al pH intracelular se ioniza, perdiendo liposolubilidad y siendo parcialmente atrapado dentro de dichas células. En esta situación, lesiona las células de la mucosa por diversos mecanismos que incluyen: desacoplamiento de fosforilación oxidativa mitocondrial, reducción de la formación de ATP, aumento de la permeabilidad de la mucosa, pérdida de Na⁺ y K⁺ intracelular, retrodifusión de H⁺ desde la luz gástrica e inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PG). Esta acción inhibitoria de la síntesis de PG desencadena una serie de reacciones que termina con la irritación de la pared de la mucosa gástrica (Brutzkus, J.C. et al, 2020).

Trastornos renales y urinarios: hematuria, nefritis intersticial, síndrome nefrótico, renopatía, insuficiencia renal y necrosis papilar renal.

Trastornos cardiovasculares: palpitaciones, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión y vasculitis. Se han notificado edema, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca. Datos de ensayos clínicos y estudios epidemiológicos sugieren que el empleo de algunos AINES (especialmente en dosis altas y en tratamientos de larga duración) puede asociarse con un moderado aumento del riesgo de acontecimientos aterotrombóticos (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.7. Contraindicaciones:

Hipersensibilidad al naproxeno o al naproxeno sódico o a alguno de los excipientes de la formulación. Pacientes con antecedentes de reacciones alérgicas graves a otros antiinflamatorios no esteroideos.

Úlcera péptica/hemorragia gastrointestinal activa o recidivante (dos o más episodios diferentes de ulceración o hemorragia comprobados). (Brutzkus, J.C. et al, 2020).

Antecedentes de hemorragia gastrointestinal o perforación relacionados con tratamientos anteriores con anti-inflamatorios no esteroideos (AINES). Insuficiencia renal, hepática o cardíaca de carácter grave. Tercer trimestre de embarazo. Niños menores de 2 años de edad. Pacientes con colitis ulcerosa. Hemorragia cerebral (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.8. Interacciones:

La administración concomitante de un antiácido o de colestiramina, así como la ingesta de alimentos, puede retrasar la absorción de naproxeno, pero no afecta a su grado de absorción.

Debido a la elevada unión a proteínas plasmáticas, puede interactuar con otros fármacos que se unan a la albúmina, como los anticoagulantes cumarínicos, las sulfonilureas, las hidantoínas y otros AINES, incluido el ácido acetilsalicílico. Los pacientes que reciban simultáneamente una hidantoína, sulfonamida o sulfonilurea deben ser observados para el ajuste de la dosis si es necesario.

Se considera insegura la toma de AINES en combinación con anticoagulantes de tipo dicumarínico, dado que pueden aumentar los efectos de los anticoagulantes.

Debe evitarse el uso concomitante de dos o más AINES, incluyendo los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2, debido a los riesgos acumulados de inducir efectos adversos graves relacionados con los AINES y a un efecto sinérgico.

Se recomienda precaución cuando se co-administre con diuréticos, ya que puede disminuir el efecto diurético. Se ha notificado que el efecto natriurético de la furosemida es inhibido por algunos fármacos de esta clase. Los diuréticos pueden aumentar el riesgo de nefrotoxicidad de los AINES.

Se ha descrito una inhibición del aclaramiento renal de litio, lo que conduce a aumentos en las concentraciones plasmáticas de este, pudiendo alcanzarse niveles tóxicos.

El naproxeno y otros medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos pueden reducir el efecto de los antihipertensivos, tales como los betabloqueantes, debido a una inhibición de prostaglandinas con efecto vasodilatador.

Puede aumentar el riesgo de insuficiencia renal asociada con el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y de antagonistas de receptores de angiotensina II (ARAII). Los AINE y los ARAII ejercen un efecto sinérgico en la reducción de la filtración glomerular, que puede ser exacerbado en caso de alteración de la función renal. La administración de esta combinación a pacientes ancianos o deshidratados,

puede llevar a un fallo renal agudo por acción directa sobre la filtración glomerular. Se recomienda una monitorización de la función renal al iniciar el tratamiento, así como una hidratación regular del paciente. Además, esta combinación puede reducir el efecto antihipertensivo de los IECA y de los ARAll, lo que provoca una pérdida parcial de su eficacia (debida a la inhibición de prostaglandinas con efecto vasodilatador).

La administración concomitante con probenecid aumenta los niveles plasmáticos de naproxeno y prolonga considerablemente su vida media.

Se recomienda precaución cuando se administre simultáneamente con el metotrexato, debido a la posible potenciación de su toxicidad, ya que reduce la secreción tubular de metotrexato en modelos animales, y por lo tanto, su aclaramiento.

Los AINES pueden exacerbar la insuficiencia cardiaca, reducir el índice de filtrado glomerular y aumentar los niveles plasmáticos de glucósidos cardíacos cuando se administran conjuntamente.

Como con todos los AINES, se aconseja precaución cuando se administre con ciclosporina, por un aumento del riesgo de nefrotoxicidad, debido a efectos mediados por las prostaglandinas renales.

Los AINES no deben utilizarse 8-12 días después de la administración de mifepristona, dado que pueden reducir los efectos de esta.

Al igual que con todos los AINES, se debe tener precaución cuando se administren conjuntamente con corticosteroides debido al incremento del riesgo de ulceración gastrointestinal o hemorragia. Si se reduce o retira la administración de esteroides durante el tratamiento con naproxeno, la disminución de la dosis debe ser lenta y los pacientes han de ser vigilados estrechamente para detectar cualquier indicio de efectos

secundarios, incluida una insuficiencia renal o una exacerbación de los síntomas de artritis.

Hay un aumento del riesgo de hemorragia gastrointestinal cuando se combina con agentes antiplaquetarios y trombolíticos, debido a una inhibición de la función plaquetaria y de su acción irritante sobre la mucosa gastroduodenal. También se incrementa este riesgo al asociarlo con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).

Cuando los AINES se administran con tacrolimus, hay un posible riesgo de nefrotoxicidad.

Existe un aumento del riesgo de toxicidad hematológica cuando se administran con zidovudina.

Se sugiere que se interrumpa temporalmente la terapia con naproxeno 48 horas antes de que las pruebas de función suprarrenal se lleven a cabo, ya que puede interferir con algunas pruebas de los esteroides 17-cetogénicos. De manera similar, puede interferir con algunas pruebas de ácido 5-hidroxiindolacético en orina (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.2.9. Embarazo y Lactancia:

Se han descrito anomalías congénitas asociadas con la administración de AINES en la mujer; el naproxeno puede afectar negativamente a la circulación fetal e inhibir las contracciones con mayor posibilidad de hemorragia en la madre y el niño. Debido a esto, además de estar contraindicado en el tercer trimestre del embarazo no se recomienda su administración durante el primer y el segundo trimestre de embarazo. El naproxeno se excreta con la leche por lo que no se recomienda su administración a madres lactantes (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS:

Existen multitud de métodos analíticos para analizar diferentes principios activos tanto en muestras "in vitro" como en muestras biológicas "in vivo".

Los estudios "in vitro" que se van a hacer para cuantificar la concentración de naproxeno en las diferentes formulaciones son a través de ensayos de velocidad de disolución. La velocidad de disolución va a ser muy importante ya que a través de estos ensayos se sabrá que formulación de todas las creadas, es la que mejor perfil de disolución tiene, y por tanto, la que obtiene una concentración de naproxeno mayor en menor tiempo.

3.3.1. Métodos para la velocidad de disolución:

En los ensayos de velocidad de disolución existen multitud de factores que intervienen en el proceso: temperatura, rpm, el medio de disolución etc.... Sin embargo, el factor más importante en estos ensayos es el método de análisis de las muestras.

Existen varios métodos analíticos que podrían servir para la cuantificación de naproxeno en estos ensayos de velocidad de disolución. Tras una extensa búsqueda bibliográfica, los dos métodos más utilizados son la espectroscopia UV y la espectroscopia de fluorescencia (Ibrahim, M. A. et al, 2019; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009; Sádecká, J. et al, 2001; Damiani, P. et al, 2002).

Los métodos de espectroscopia UV han sido utilizados en distintos estudios para evaluar la velocidad de disolución de formulaciones de naproxeno. Hay que tener en cuenta que, en las formulaciones además del naproxeno hay otros excipientes, y por tanto, éstos no deben interferir en su cuantificación (Kasten, G. et al, 2018). El naproxeno tiene un máximo de lectura a una longitud de onda de análisis cercana a los 270 nm y por tanto, los excipientes no deben influir sobre la selectividad de la lectura. En la mayoría de los estudios que utilizan este método de espectroscopia UV, se observa que no se

producen interferencias de los excipientes con el naproxeno al emplear longitudes de análisis cercanas a 271 nm (Ibrahim, M. A. et al, 2019; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009). Pocos estudios emplean longitudes de onda mucho mayores a las anteriores, pero esto se puede llegar a producir cuando alguno de los componentes de la formulación produce interferencias a longitudes de análisis menores, llegando a analizarse a los 332nm (Guo, Z. et al, 2013).

Los excipientes que se van a utilizar en las diferentes formulaciones de la tesis no deberían presentar interferencias con el naproxeno; pero, aunque existiera alguna pequeña interferencia, ésta se vería disminuida en el gran volumen del medio de disolución (Ibrahim, M.A. et al, 2019). Incluso en algún estudio sin excipientes, se permite utilizar estudios de disolución en condiciones NO SINK (Kasten, G. et al, 2018). La mayoría de estos estudios utilizan rangos de concentraciones entre 1µg/ml a 25 µg/ml; se realizan en medio gástrico simulado, (Ibrahim, M.A. et al, 2019; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009) o en tampón fosfato pH 6,8 (Kasten, G. et al, 2018) y además, emplean en todos los estudios el método de paletas a 50 ó 100 rpm. El método de espectroscopia UV, por tanto, puede ser un candidato idóneo para su empleo en los estudios de disolución.

En la siguiente tabla se resumen las características utilizadas en los diferentes ensayos de velocidad de disolución para formulaciones con naproxeno, en los que el método de análisis fue por espectroscopia UV:

Tabla 1. Resumen diferentes estudios de velocidad disolución del naproxeno.

Formulación	λ (nm)	V. Disol.	Equipo	Ref
Liquid-solid	271 nm	SGF 1000 mL	Ap II 50 rpm	Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009
Adsorción en sílices mesoporosa	332 nm	pH 6,8 900 mL	Ap II 50 rpm	Guo, Z. et al, 2013
Sales Co-amorfas	271 nm	pH 6,8 150 mL	Ap II 100 rpm	Kasten, G. et al, 2018
Co-Liofilizado	272 nm	HCl 0,1N 500 mL	Ap II 100 rpm	Ibrahim, M.A. et al, 2019

El otro método de análisis, espectroscopía por fluorescencia también ha sido utilizado en varios estudios para la cuantificación de Naproxeno en distintas formulaciones. De hecho, (Damiani, P. et al, 2002; Sádecká, J. et al, 2001) desarrollaron distintos métodos de fluorescencia con unas longitudes de onda de excitación de 271 y 230nm y de emisión de 353 y 355nm respectivamente; permitiendo obtener rangos de concentración mucho más bajos que los del método ultravioleta. Sin embargo, el principal inconveniente de este método es que la utilización de medios acuosos interfiere en los análisis, y esto es un gran problema, ya que se pretende analizar directamente de los medios acuosos utilizados en los estudios de velocidad de disolución.

Por ese motivo, se descartó el método de fluorescencia utilizándose el método de espectroscopia UV para analizar los estudios de velocidad de disolución.

3.3.2. Métodos para el análisis de muestras biológicas:

Con respecto al método de análisis de los estudios "in vivo", existen multitud de factores que influyen en la elección, pero hay dos que van a ser determinantes, el tipo de muestra a analizar y la concentración de naproxeno en éstas. Al tratarse de estudios para el tratamiento de la migraña, es importante analizar la concentración de naproxeno tanto

a nivel plasmático como cerebral durante diferentes momentos después de la administración. Por ese motivo, se necesita de un método de análisis que sea adecuado para cuantificar concentraciones de naproxeno muy bajas en muestras cerebrales y plasmáticas.

Existen varios métodos analíticos que podrían servir para la cuantificación de naproxeno en muestras biológicas, pero hay que tener en cuenta que además de poder cuantificar concentraciones bajas de naproxeno y de fácil acceso, Tras una extensa búsqueda bibliográfica, los dos métodos más utilizados para nuestros análisis son HPLC UV y HPLC con detección por fluorescencia (Hu, Y. et al, 2013; Helmy, S. A. y El Bedaiwy, H. M., 2013; Zakeri-Milani, P. et al, 2005).

El método de análisis y cuantificación de naproxeno por HPLC UV ha sido bastante utilizado, generalmente analizado a una longitud de onda de 270-273nm (Kumar, S. et al, 2015; Zakeri-Milani, P. et al, 2005; Braig, V. et al, 2019). Dentro de los análisis de naproxeno en muestras plasmáticas, se han hecho varios estudios, con un rango aproximado de concentraciones de 5-55 $\mu\text{g/ml}$, un límite de detección de 1 $\mu\text{g/ml}$, una recuperación del 97,5% y una sensibilidad muy alta (Hu, Y. et al, 2013; Martín, M. J. et al, 1999; Karami, Z. et al, 2019). Los resultados de esos estudios demuestran que este método es óptimo para el análisis de naproxeno en muestras plasmáticas. Sin embargo, el rango de concentraciones que permite analizar hace que no sea sensible para el análisis de las muestras de cerebro, en las cuales, la concentración de naproxeno es bastante menor. Por ese motivo, este método no sería adecuado para el análisis de todas las muestras.

Por otro lado, el método HPLC con detección por fluorescencia también ha sido bastante usado para el análisis de naproxeno. (Theodoridis, G. et al, 2004; Rezk, M.R. et al, 2014; Hu, Y. et al, 2013).

Para el análisis de naproxeno en muestras biológicas, se han utilizado diferentes longitudes de onda de excitación y emisión. Para los ensayos con muestras de orina se usaron longitudes de onda de excitación y de emisión de 230nm y 350nm respectivamente (Theodoridis, G. et al, 2004). Para los ensayos en muestras de plasma se han usado longitudes excitación y de emisión de 270nm y 340-350nm respectivamente (Tashtoush, B.M. y Al-Taani, B.M., 2003; Sakaguchi, Y. et al, 2011). El rango aproximado de concentraciones que permite analizar este método es de 0,05-80 $\mu\text{g/ml}$, con un límite de detección de 0,02 $\mu\text{g/ml}$, una recuperación del 95,5% y una sensibilidad muy alta.

En la siguiente tabla se resumen las características de los ensayos de naproxeno en muestras biológicas utilizando análisis por HPLC con detección por fluorescencia:

Tabla 2. Resumen de las características de HPLC de fluorescencia para naproxeno.

Tipo de muestra	λ emisión (nm)	λ excitación (nm)	Rango concentraciones	Ref
Orina	230 nm	350 nm	0,05-20 $\mu\text{g/ml}$	Theodoridis, G. et al, 2004
Plasma	270 nm	340 nm	0,5-80 $\mu\text{g/ml}$	Tashtoush, B.M. y Al-Taani, B.M., 2003
Plasma	270 nm	350 nm	0,1-50 $\mu\text{g/ml}$	Sakaguchi, Y. et al, 2011

Los resultados de esos estudios revelan que las concentraciones plasmáticas de naproxeno que se pueden analizar son al menos 10 veces mayores que las que se pueden analizar a través del HPLC UV. Por tanto, este método de HPLC con detección por fluorescencia es el elegido para la realización de nuestros estudios ya que quedó demostrado que puede llegar a analizar concentraciones más bajas de naproxeno.

3.4. NAPROXENO COMERCIALIZADO EN ESPAÑA:

Existen 7 fármacos de naproxeno autorizados y comercializados en España, todo ellos bajo prescripción médica. La forma farmacéutica mayoritaria es la del comprimido, ya que 6 de ellos usan esa y sólo uno es en cápsulas duras. Cabe destacar que la mayoría de los fármacos contienen en la formulación un disgregante, pero ninguno lleva tensioactivo. A continuación, se detallan los fármacos comercializados con los principios activos y excipientes que los componen:

- NAPROXENO NORMON 500 mg COMPRIMIDOS EFG LABORATORIOS NORMON, S.A.: principios activos: naproxeno; excipientes: croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio y óxido de hierro (E-172), autorizado (31/01/2007), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.
- VIMOVO 500 mg/20 mg COMPRIMIDOS DE LIBERACION MODIFICADA ASTRA ZENECA FARMACEUTICA SPAIN, S.A.: principios activos: naproxeno base, esomeprazol magnésico; excipientes: croscarmelosa sódica, monoestearato de glicerol, polidextrosa, parahidroxibenzoato de metilo (e-218). nº registro: 73182, autorizado (21/03/2011), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.
- LUNDIRAN 250 mg Cápsulas duras INDUSTRIA QUIMICA Y FARMACEUTICA VIR, S.A.: principios activos: naproxeno; excipientes: estearato magnésico. nº registro: 54246, autorizado (01/07/1977), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.
- NAPROSYN 500 mg COMPRIMIDOS ATNAHS PHARMA NETHERLANDS B.V.: principios activos: naproxeno base; excipientes: povidona K-90, croscarmelosa sódica, óxido de hierro (E-172) y estearato de magnesio. nº registro: 56267,

autorizado (01/09/1983), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.

- NAPROXENO ARISTO 500 MG COMPRIMIDOS GASTRORRESISTENTES EFG ARISTO PHARMA IBERIA, S.L.: principios activos: naproxeno; excipientes: povidona K 90, croscarmelosa sódica y estearato de magnesio. Además incluye una película gastrotresistente. nº registro: 77727, autorizado (04/07/2013), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.
- NAPROXENO AUROBINDO 500 MG COMPRIMIDOS EFG LABORATORIOS AUROBINDO, S.L.U.: principios activos: naproxeno; excipientes: lactosa monohidrato, almidón de maíz, carboximetilalmidón sódico (de patata), povidona (E1201), óxido de hierro amarillo (E172) y estearato de magnesio (E470b). nº registro: 80806, autorizado (26/04/2016), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica, con receta.
- NAPROXENO RATIOPHARM 500 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS EFGRATIOPHARM ESPAÑA, S.A.: principios activos: naproxeno base; excipientes: almidón de maíz, glicerol, carboximetilalmidón sódico. nº registro: 61370, autorizado (01/05/1997), comercializado, medicamento sujeto a prescripción médica con receta.

Base de datos de (CIMA. Centro de información de medicamentos, 2020).

3.5. REVISIÓN DE ESTUDIOS PARA LA ELABORACION DE FORMULACIONES DE NAPROXENO DE RÁPIDA DISOLUCIÓN:

En los fármacos analgésicos poco solubles como el naproxeno, es especialmente importante el empleo de distintos recursos tecnológicos que permitan mejorar su velocidad de disolución con el fin de alcanzar antes su acción analgésica (Kasten, G. et al, 2018). Los estudios de la industria farmacéutica para mejorar la velocidad de disolución de fármacos poco solubles se basan en dos mecanismos principales: El primero en la elaboración de distintos sistemas farmacéuticos que disminuyan el tamaño de partícula del naproxeno. El segundo en la incorporación de polímeros o excipientes hidrófilos que al situarse sobre la superficie de los cristales del fármaco, favorezca la hidratación y un mayor contacto con el medio de disolución. En la tabla 3 se muestra un resumen de los distintos recursos utilizados para mejorar la velocidad de disolución del naproxeno.

Tabla 3. Resumen de los distintos recursos tecnológicos utilizados para mejorar la velocidad de disolución en formulaciones de rápida disolución.

Sistema Farmacéutico	Componentes	Características	Velocidad Disolución	Autor
Nanosuspensiones	HPMC	500 nm y descenso cristalinidad	Más del 80% en 10 min	Mishra, B. et al, 2015
Sales de arginina	Arginina	Cristalina amorfa	4,5-6 veces mayor que NAP (No Sink)	Kasten, G. et al, 2018
Dispersión sólida	NP:Quercetina 1:2	Amorfo	Más del 80% en 15 min	Ibrahim, M.A. et al, 2019
Sistema Líquido en sólido	Cremophor® 20%	Amorfo	35-40% en 10 min	Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009
Nanopartículas	Manitol 77,6% HPC 2,9%	Nanodispersión	Más del 80% en 1 min	Braig, V. et al, 2019
Complejos Mesoporosos	Material mesoporoso 40-60%	Adsorción poros y descenso cristalinidad	40-60% en 10 min	Guo, Z. et al, 2013

El empleo de procesos de reducción del tamaño de partícula permite la obtención de nanosuspensiones o nanopartículas de pequeño tamaño (500 nm) que reduce la cristalinidad del naproxeno (Braig, V. et al, 2019; Mishra, B. et al, 2015). La incorporación de excipientes cristalinos como el manitol (Braig, V. et al, 2019) o polímeros hidrófilos como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) presentan un efecto estabilizante evitando los problemas de recristalización (Mishra, B. et al, 2015) y favorecen la rápida disolución del naproxeno alcanzando porcentajes de disolución superiores al 80% en menos de 10 minutos.

El empleo de procesos de formación de sales solubles se obtiene mediante la incorporación de sustancias que al recristalizar produce la formación de estructuras cristalinas de rápida disolución. La incorporación de soluciones de arginina antes del proceso de secado permite la formación de sales co-amorfas de naproxeno/arginina (Kasten, G. et al, 2018), mientras que la incorporación de sustancias amorfas como la quercetina permite la elaboración de dispersiones sólidas de naproxeno:quercetina en ratios (1:2) que presentan una forma amorfa de rápida disolución (Ibrahim, M.A. et al, 2019). Un mecanismo similar es utilizado en procesos de elaboración de liquisolid, que mediante la incorporación de un surfactante cremophor consigue una estructura amorfa de rápida disolución en medio intestinal (Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009), mientras que la adsorción de naproxeno en los poros de materiales mesoporosos derivados de la sílice, permitirán reducir la cristalinidad del naproxeno y controlan su proceso de recristalización, procesos que facilitarán la rápida disolución del naproxeno (Guo, Z. et al, 2013). Estos sistemas permitirán la rápida disolución de naproxeno.

A la vista de estos procesos, la incorporación de pequeños porcentajes de polímeros celulósicos hidrofílicos y de surfactantes, pueden ser interesantes para mejorar la disolución del naproxeno mediante pequeños porcentajes de excipientes.

3.6. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS EXCIPIENTES UTILIZADOS:

Una vez se han explicado las características principales del naproxeno, se hace lo mismo con los excipientes utilizados en el desarrollo de la formulación. Estos excipientes junto con los métodos farmacéuticos necesarios se utilizarán para obtener formas parcialmente amorfas, y por tanto, que se disuelvan más rápido.

Para la formulación se utilizarán una serie de excipientes para intentar mejorar la formulación. El primer excipiente fue la celulosa HPMC, fue seleccionado con la intención de intentar que la formulación sea parcialmente amorfa y provocar que ésta se disuelva antes y por tanto, se absorba y haga el efecto deseado en el menor tiempo posible. Se elaborarán diferentes formulaciones con diferentes proporciones de la celulosa, para seleccionar la proporción más adecuada.

El segundo excipiente fue un disgregante (croscarmelosa sódica), seleccionado para aumentar la disgregación de la formulación y favorecer de esta forma la disolución del naproxeno. De la misma forma que con la celulosa, su proporción más adecuada se determina mediante el desarrollo empleo de distintas formulaciones con proporciones crecientes de este disgregante.

La incorporación del tensioactivo SDS a la formulación, mejorará la velocidad de disolución del naproxeno en la formulación. Se elaborarán distintas formulaciones con distintas proporciones de tensioactivo, comparando la influencia de las distintas proporciones de surfactante/disgregante sobre la disolución del naproxeno.

3.6.1. (HPMC) hidroxipropilmetilcelulosa:

La hidroxipropilmetilcelulosa es el Éter 2-hidroxipropilmetílico de la celulosa, es una mezcla de ésteres metílicos e hidroxipropílicos de la celulosa y debe cumplir con las especificaciones descritas en la (Real Farmacopea Española 5ª Edición. 2015) y la Farmacopea Americana (United States Pharmacopeia USP 43-NF 38. 2019).

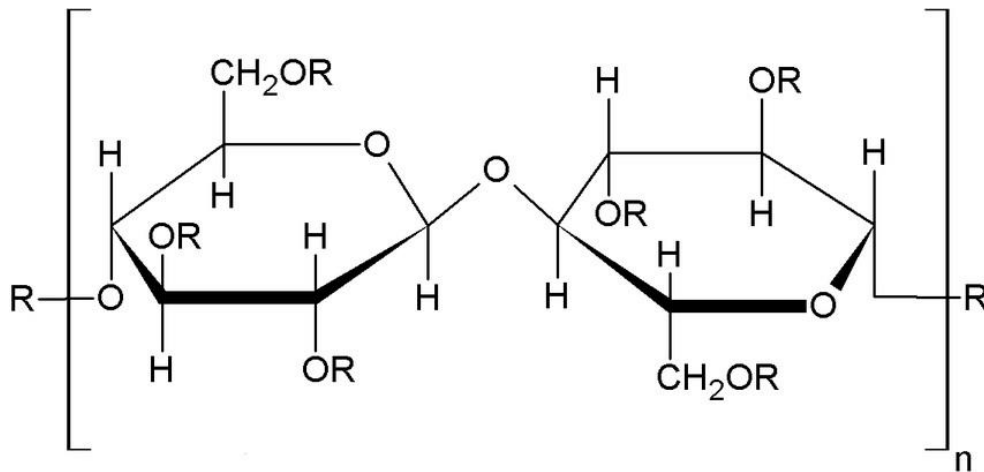


Figura 3. Fórmula molecular del HPMC. *R puede ser H, CH₃ o CH₃CH(OH)CH₂. (United States Pharmacopeia 38. 2015).

Las ventajas que tiene HPMC son que tiene una excelente compatibilidad con los ingredientes activos y una buena disgregación en partículas más pequeñas que provocan una mejor disolución. (Démuth, B. et al, 2018)

Se realizarán distintos ensayos con diferentes proporciones HPMC para conocer qué cantidad de celulosa es la adecuada para la elaboración de la formulación.

3.6.2. Croscarmelosa sódica:

La croscarmelosa sódica es la sal sódica de la celulosa parcialmente o-(carboximetilada) entrecruzada. Es un polvo blanco o blanco grisáceo, prácticamente insoluble en acetona, en etanol y tolueno. (Real Farmacopea Española 5ª Edición. 2015).

La croscarmelosa sódica tiene un alto grado de hinchamiento, siendo capaz de absorber varias veces su propio peso en agua, esto mejora la capacidad de disgregación de la formulación y caracteriza a la croscarmelosa como superdisgregante. (Rowe, R.C. et al, 2009). El hinchamiento de la croscarmelosa se atribuye a la hidratación del grupo carboximetilo y por ese motivo el grado de sustitución determina la funcionalidad de ésta. Se suele utilizar en combinación con diluyentes, como es el caso de algunas celulosas. Su fórmula empírica es $C_8H_{15}NaO_8$ y su peso: 262,18 g/mol. (European Pharmacopoeia 9th Ed. (2019)).

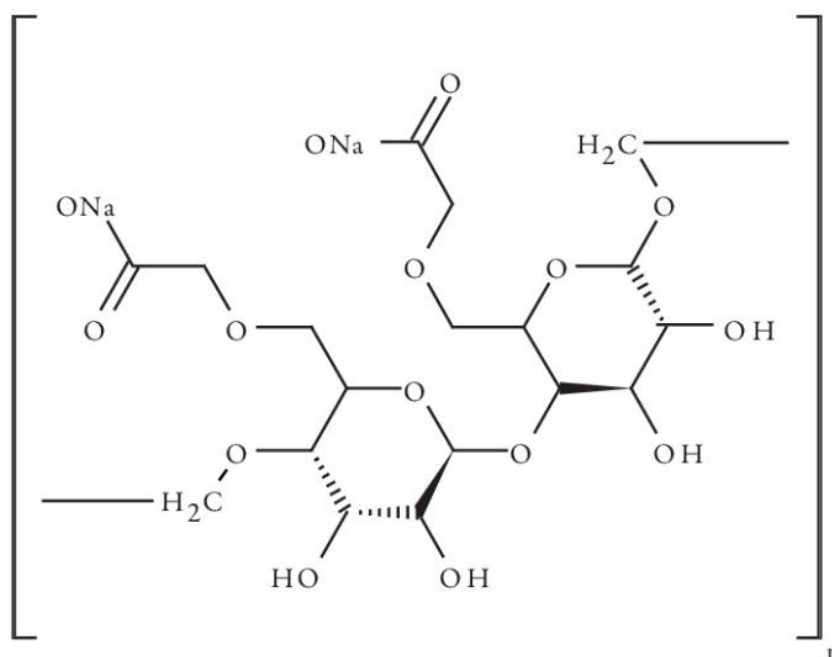


Figura 4. Estructura química de la Croscarmelosa Sódica.

3.6.3. SDS (lauril sulfato sódico):

Descripción y estructura química:

Existen multitud de nombres para este compuesto, la más conocidas en España son Lauril sulfato sódico o dodecilsulfato sódico. El SDS se prepara por sulfonación del dodecanol ($C_{12}H_{25}OH$) seguida de una neutralización con carbonato sódico. El SDS está compuesto por cristales pequeños blancos o amarillo pálido y es fácilmente soluble en agua, formando una solución opalescente. (Real Farmacopea Española 5ª Edición. 2015).

El SDS es un agente solubilizante aniónico utilizado en formulaciones con principios activos hidrofóbicos, como es el caso del naproxeno que utilizo en la formulación. Su fórmula molecular es $NaSO_4C_{12}H_{25}$ y su peso molecular de 288,38 g/mol. (European Pharmacopoeia 9th Ed. (2019)).

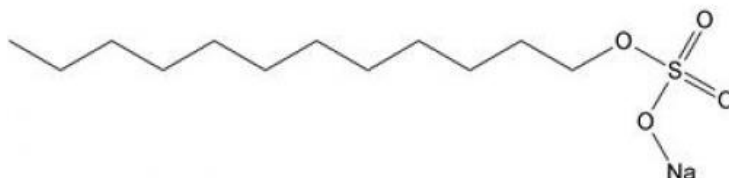


Figura 5. Estructura química del SDS.

3.7. BIBLIOGRAFÍA:

- Braig, V., Konnerth, C., Peukert, W., Lee, G. (2019). Enhanced dissolution of naproxen from pure-drug, crystalline nanoparticles: A case study formulated into spray-dried granules and compressed tablets. *International journal of pharmaceutics*, 554, 54–60.
- Brutzkus, J. C., Shahrokhi, M., Varacallo, M. (2020). Naproxen. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Burstein, R., Nosedá, R., Borsook, D. (2015). Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(17), 6619–6629.
- Caffaratti, M.; Lascano, V.; Vega, E.M.; Briñón, M. C. 2008. Centro de Información de Medicamentos (CIMA). "Ergotamina: Riego de isquemia cerebral y/o periférica". [en línea]. <http://cime.fcq.unc.edu.ar/ergotamina.htm>. [16/03/2020]
- CIMA. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [En línea]. <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm> [consultado 23/05/2020]
- Cameron, C., Kelly, S., Hsieh, S. C., Murphy, M., Chen, L., Kotb, A., Peterson, J., Coyle, D., Skidmore, B., Gomes, T., Clifford, T., Wells, G. (2015). Triptans in the Acute Treatment of Migraine: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Headache*, 55 Suppl 4, 221–235.
- Damiani, P., Bearzotti, M., Cabezón, M. A. (2002). Spectrofluorometric determination of naproxen in tablets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 29(1-2), 229–238.
- Démuth, B., Galata, D. L., Balogh, A., Szabó, E., Nagy, B., Farkas, A., Hirsch, E., Pataki, H., Vigh, T., Mensch, J., Verreck, G., Nagy, Z. K., Marosi, G. (2018). Application of hydroxypropyl methylcellulose as a protective agent against

magnesium stearate induced crystallization of amorphous itraconazole. *Pharm Sci.* Aug 30;121:301-308.

- Dodick D. W. (2018). A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. *Headache*, 58 Suppl 1, 4–16.
- European Pharmacopeia 9th Edition. Bruselas. Belgium.: European Council of Europe. (2019).
- Goadsby P. J. (2009). Pathophysiology of migraine. *Neurologic clinics*, 27(2), 335–360.
- Guo, Z., Liu, X. M., Ma, L., Li, J., Zhang, H., Gao, Y. P., Yuan, Y. (2013). Effects of particle morphology, pore size and surface coating of mesoporous silica on Naproxen dissolution rate enhancement. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 101, 228–235.
- Helmy, S. A., El Bedaiwy, H. M. (2013). Comparative in vitro dissolution and in vivo bioavailability of diflunisal/naproxen fixed-dose combination tablets and concomitant administration of diflunisal and naproxen in healthy adult subjects. *Drug research*, 63(3), 150–158.
- Hu, Y., Song, C., Liao, J., Huang, Z., Li, G. (2013). Water stable metal-organic framework packed microcolumn for online sorptive extraction and direct analysis of naproxen and its metabolite from urine sample. *Journal of chromatography. A*, 1294, 17–24.
- Ibrahim, M. A., Shazly, G. A., Elossaily, G. M., Ezzeldin, E., Aleanizy, F. S. (2019). Physicochemical, pharmacokinetics, and histological evaluation of new naproxen-quercetin co-lyophilizate to diminish drug-induced gastric irritations in rats. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 27(3), 413–421.
- Karami, Z., Sadighian, S., Rostamizadeh, K., Hosseini, S. H., Rezaee, S., Hamidi, M. (2019). Magnetic brain targeting of naproxen-loaded polymeric

- micelles: pharmacokinetics and biodistribution study. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 100, 771–780.
- Kasten, G., Lobo, L., Dengale, S., Grohgan, H., Rades, T., Löbmann, K. (2018). In vitro and in vivo comparison between crystalline and co-amorphous salts of naproxen-arginine. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 132, 192–199.
 - Kumar, S., Shen, J., Zolnik, B., Sadrieh, N., Burgess, D. J. (2015). Optimization and dissolution performance of spray-dried naproxen nano-crystals. *International journal of pharmaceutics*, 486(1-2), 159–166.
 - Láinez J.M., Casado, I., Gómez, M., Medrano, V., (2011). Impacto socioeconómico y clasificación de las cefaleas. En: Diaz Insa, S y comité del grupo de estudio de cefaleas, Eds. *Guía oficial de la Sociedad Española de Neurología para el diagnóstico y tratamiento de las cefaleas*. No.10. Barcelona: Prous Science, 2011; pp. 1-18.
 - Linde, M., Gustavsson, A., Stovner, L. J., Steiner, T. J., Barré, J., Katsarava, Z., et al. (2012). The cost of headache disorders in Europe: the EuroLight Project. *Eur J Neurol* 2012; 19: 703-711.
 - Manzoni, G. C., Bonavita, V., Bussone, G., Cortelli, P., Narbone, M. C., Cevoli, S., D'Amico, D., De Simone, R., Torelli, P., ANIRCEF (Associazione Neurologica Italiana Ricerca Cefalee) (2011). Chronic migraine classification: current knowledge and future perspectives. *The journal of headache and pain*, 12(6), 585–592.
 - Martín, M. J., Pablos, F., González, A. G. (1999). Simultaneous determination of caffeine and non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and blood plasma by reversed-phase HPLC from linear gradient elution. *Talanta*, 49(2), 453–459.

- Mateos, V., (2010). Migraña y otras cefaleas. Barcelona: Elsevier España S.L. 500 p.
- Mishra, B., Sahoo, J., Dixit, P.K., (2015). Formulation and process optimization of naproxen nanosuspensions stabilized by hydroxy propyl methyl cellulose. Carbohydr. Polym. 127, 300–308.
- Organización Mundial de la Salud. (2012). "Cefaleas". [en línea]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs277/es/>. [17/01/2020].
- Perrin, V. L., (1985). Clinical pharmacokinetics of ergotamine in migraine and cluster headache. Clinical pharmacokinetics, 10(4), 334–352.
- Ramírez, S.F., Urrea, E., (2012). Guía de diagnóstico y tratamiento de la cefalea. Colombia: Asociación Colombiana de Neurología; 2012.
- Real Farmacopea Española 5ª Edición., Ministerio de Sanidad y Consumo., Madrid. España (2015).
- Rezk, M. R., Michael, A.M., Lotfy, H. M., El-Kadi, A. O., Shehata, M. A., (2014). A rapid and sensitive HPLC assay of some concomitant antimigraine drugs. J. Chromatogr. Sci. 2014, 52, 704–706.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients (6.a ed.). Pharmaceutical Pr.
- Sakaguchi, Y., Yoshida, H., Hayama, T., Yoshitake, M., Itoyama, M., Todoroki, K., Yamaguchi, M., Nohta, H. (2011). Fluorous derivatization and fluorous-phase separation for fluorometric determination of naproxen and felbinac in human plasma. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 55(1), 176–180.
- Sádecká, J., Cakrt, M., Hercegová, A., Polonský, J., Skacáni, I. (2001). Determination of ibuprofen and naproxen in tablets. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 25(5-6), 881–891.
- Sharav, Y., Benoliel, R., (2011). Dolor orofacial y cefalea. Barcelona: Elsevier España S.L. 442 p.

- Sprenger, T., Viana, M., Tassorelli, C. (2018). Current Prophylactic Medications for Migraine and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 15(2), 313–323.
- Tashtoush, B. M., Al-Taani, B. M. (2003). HPLC determination of naproxen in plasma. *Die Pharmazie*, 58(9), 614–615.
- Theodoridis, G., Lontou, M. A., Michopoulos, F., Sucha, M., Gondova, T. (2004). Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography: Application in the analysis of pharmaceuticals in urine. *Analytica chimica acta*, 516(1-2), 197-204.
- Tiong, N., Elkordy, A. A. (2009). Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 73(3), 373–384.
- Titus, F., Pozo, P., (2009). *El médico en casa. Comprender la migraña*. Barcelona: Ediciones Amat S.L. 154 p.
- United States Pharmacopeia 43, National Formulary 38. Rockville.Md USA. The United States Pharmacopeial Convection (2019).
- Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005). Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(3-4), 624–630.
- Zavala, H., Saravia, B., (2003). Epidemiología e impacto socioeconómico de la migraña. *Rev. Neurol. Arg.*, 28 (2): 79-84.

IV. PARTE EXPERIMENTAL 1:
FORMULACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN

IV. PARTE EXPERIMENTAL 1: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN:

La primera parte práctica de la tesis consiste en desarrollar diferentes formulaciones de rápida disolución de naproxeno, para ello es necesario la incorporación de diferentes excipientes seleccionados previamente a través de la literatura. Los excipientes seleccionados fueron los comentados anteriormente (HPMC, croscarmelosa sódica y SDS). Con este procedimiento lo que se pretende es conseguir formulaciones de naproxeno base que, al unirse a estos excipientes en proporciones variables, mejoren la formulación de naproxeno de referencia.

Para saber si las formulaciones creadas son mejores que la de referencia, lo que hay que conocer son las características y propiedades de las formulaciones, y para eso hay que hacer una serie de estudios. Los estudios que se realizarán en todas las formulaciones creadas se basarán en la caracterización (SEM, rayos X y DSC) y en ensayos de velocidad de disolución. A través de estos estudios se puede conocer las propiedades de las diferentes fórmulas y elegir cuál de ellas es la mejor e interesa más en estos estudios.

En definitiva, esta parte experimental se basa en la creación y elección de una formulación de rápida disolución de naproxeno, que pueda llegar a ser un tratamiento para los ataques agudos de migraña.

4.2. MATERIALES:

4.2.1. Productos y Reactivos:

En estos estudios se utilizarán los siguientes productos y reactivos:

- Naproxeno y Naproxeno sódico obtenido de Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China). Donado por HC Clover.
- Croscarmelosa sódica producida por FMC (Philadelphia, USA).
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de (Methocel E15LV) (Dow Chemical),
- Lauril sulfato sódico (SDS) obtenido por Sigma (Copenhagen, Denmark).
- Agua obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Billerica, USA).
- HCL Panreac® (Barcelona, Spain).
- Filtros Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF 0,45 µm, Cork, Ireland).

Todos los reactivos y químicos utilizados tenían grado analítico.

4.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio:

- Tamices de diferentes diámetros.
- Estufa Memmert.
- Material de vidrio.
- Pequeño aparataje de laboratorio.
- Agitador Vortex.
- Agitador magnético-calefactor RCT basic. Ika Labortechnik (Germany).
- Morteros de ágata.
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Balanza Microanalítica Sartorius M5P Serie 30303388.
- Espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpec Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Aparato velocidad de disolución ERWEKA DT80 (Heusenstamm, Germany).
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol JSM-6400 (Tokio, Japón).
- Metalizador de muestras (Q150RS Quorum technologies, Laughton, UK).

- Difractómetro de rayos X (Philips X'Pert-MPD, Almelo, Netherlands).
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC 3 Star System Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.

4.2.3. Tratamiento de los datos:

Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA).

4.3. MÉTODOS:

4.3.1. Desarrollo de las formulaciones:

Lo primero que se realizó en la parte experimental fue el desarrollo de las diferentes formulaciones, desde la materia prima hasta las formulaciones con celulosa, superdisgregante y tensioactivo. El orden que se siguió para el desarrollo de las formulaciones fue de menor a mayor grado de complejidad, es decir, se partió por las materias primas y se continuó con las formulaciones con uno, dos o tres excipientes en diferentes proporciones. En la siguiente tabla podemos ver las formulaciones creadas con su respectivo nombre (código) y las proporciones de cada excipiente.

Tabla 4. Composición de las diferentes formulaciones empleadas.

Código formulación	Naproxeno	HPMC (%)	Croscarmelosa sódica(%)	SDS (%)
NAP Na	110mg	0	0	0
NAP	100mg	0	0	0
A-NAP	100mg	0	0	0
FP	100mg	1,5	0	0
FD-5%	100mg	1,5	5	0
FD-10%	100mg	1,5	10	0
FD-15%	100mg	1,5	15	0
FS-3%	100mg	1,5	10	3
FS-6%	100mg	1,5	10	6
FS-10%	100mg	1,5	10	10
FS-12%	100mg	1,5	10	12
MF	100mg	1,5	10	10

Hay que tener en cuenta que los % de los excipientes son con respecto al Naproxeno y no al % total en la formulación. Por ejemplo, para la formulación FS-10%, por cada 100mg de naproxeno tiene 1,5mg de HPMC, 10mg de croscarmelosa sódica y 10mg de SDS.

4.3.2. Formulaciones sin excipientes:

4.3.2.1. Formulación NAP Na:

El naproxeno sódico materia prima (NAP Na) no tiene ningún excipiente y lo único que se hizo para la obtención de esta fórmula fue tamizar 750mg de Naproxeno sódico a través de un tamiz de 0,840 mm; el polvo resultante se pasó por otro tamiz de luz 0,297mm, quedándose sólo con la fracción de naproxeno entre 0,840-0,297mm. El producto resultante se guardó para los diferentes ensayos. Cabe destacar que este naproxeno sódico materia prima (NAP Na) se utilizó como referencia en los estudios de rayos x, DSC y velocidad de disolución.

4.3.2.2. Formulación NAP:

El Naproxeno base materia prima (NAP) no tiene ningún excipiente y lo único que se hizo para la obtención de esta fórmula fue tamizar 750mg de naproxeno base a través de un tamiz de 0,840 mm, el polvo resultante se pasó por otro tamiz de luz 0,297mm, quedándose sólo con la fracción de naproxeno entre 0,840-0,297mm. Este proceso de tamización se realizó al igual que en la formulación anterior y en todas las formulaciones siguientes, para así tener el mismo tamaño de gránulo en todas ellas. El producto resultante se guardó para los diferentes ensayos. Esta formulación fue usada para la caracterización por SEM, rayos x y DSC, además de para los ensayos de velocidad de disolución.

4.3.2.3. Formulación A-NAP:

La forma anhidra del naproxeno base tampoco tiene ningún excipiente, pero sí se obtuvo a través de un tratamiento, ya que se pesaron 750 mg de naproxeno base y se tamizó de la misma manera que las formulaciones anteriores, pero con la diferencia de que el polvo resultante fue secado en una estufa a 60°C durante 48 h. El producto resultante se guardó para los diferentes ensayos. Esta formulación también fue usada para la caracterización por SEM, rayos x y DSC, además de los estudios de velocidad de disolución.

4.3.3. Formulaciones con excipientes:

4.3.3.1. Formulación (FP):

La formulación polimérica es la primera que contiene algún excipiente, un 1,5% de HPMC (p/p) y es la primera que se va a formular a través de granulación húmeda. La HPMC se incorporó al naproxeno a través de una solución al 2% de HPMC en agua. Para ello se pesaron 750mg de naproxeno que se mezclaron en un mortero con 560 microlitros de la solución de aglutinante (2% de HPMC p/v). La masa húmeda resultante, se pasó a través de un tamiz como las formulaciones anteriores y los gránulos se secaron en una estufa a 60°C durante 48 h para posteriormente seleccionar la fracción de 0,297-0,840 mm como las formulaciones anteriores.

4.3.3.2. Formulaciones disgregantes (FD-5%, FD-10%, FD-15%):

Las formulaciones disgregantes (FD) además de tener el 1,5% de aglutinante (HPMC) van a contener un 5, 10 ó 15% de disgregante (croscarmelosa sódica). Estas formulaciones también se hicieron a través de granulación húmeda y para ello lo que hizo fue juntar en un mortero 750mg de naproxeno con la cantidad correspondiente de croscarmelosa sódica a cada formulación (37,5mg en la FD-5%, 75mg en la FD-10% y 112,5mg en la FD-15%). Se mezcló el naproxeno con la correspondiente cantidad de croscarmelosa con ayuda de una espátula y una vez la mezcla estuvo homogénea se añadió 560 microlitros de la solución de HPMC al 2% (p/v) como aglutinante. La masa húmeda resultante que quedó se pasó a través de un tamiz de 0,840 mm como las formulaciones anteriores y los gránulos se secaron en una estufa a 60°C durante 48 h para posteriormente hacer el cribado de la fracción de 0,297-0,840 mm como las formulaciones anteriores.

4.3.3.3. Formulaciones surfactantes (FS-3%, FS-6%, FS-10% y FS-12%):

Las formulaciones tensioactivas o formulaciones surfactantes (FS) son las que van a contener algún tensioactivo. En concreto va a tener además del 1,5% de aglutinante (HPMC) y 10% de disgregante (croscarmelosa sódica) un 3, 6, 10 y 15% de tensioactivo (SDS) y se nombran como FS-3%, FS-6%, FS-10% y FS-12%. Este lauril sulfato sódico (SDS) se va a incorporar a la formulación a través de la solución aglutinadora, es decir, se va a añadir la cantidad de SDS que corresponde a cada formulación a la solución acuosa que contiene un 2% de HPMC (p/v) y que se agita durante 24 h. Al igual que las anteriores formulaciones, se hace por granulación húmeda, la cual se realizó mezclando 750 mg de naproxeno con 75 mg del disgregante, y luego se agregó 560 microlitros de la solución aglutinante que contenía tanto HPMC como SDS. Después de mezclarlo, la masa húmeda fue tamizada a través de un tamiz de 0,840 mm y los gránulos se secaron en una estufa a 60°C durante 48 h. El producto final fue cribado para aislar la fracción de 0,297-0,840 mm como las formulaciones anteriores.

4.3.3.4. Formulación (MF):

La formulación mezcla física (MF) contiene la proporción de principio activo y excipientes (p/p) indicada en la tabla 4, y se preparó mezclando manualmente el naproxeno y los excipientes en un mortero con la ayuda de una espátula.

4.3.4. Caracterización de las formulaciones:

Este proceso de caracterización sirve para conocer las principales características físicas y químicas de las formulaciones, tales como su aspecto, las propiedades térmicas, morfología, cristalinidad, y su índice de disolución. Por tanto, gracias a estas pruebas podremos concluir cual es la mejor formulación.

4.3.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Estos estudios se hicieron para conocer el aspecto superficial de las formulaciones. Para ello se colocó una pequeña muestra de las diferentes formulaciones en una cinta adhesiva de doble cara en el soporte oportuno. Una vez fijada la muestra, se pulverizó a vacío con una fina capa de oro y paladio utilizando un metalizador de recubrimiento por pulverización, (Q150RS Quorum technologies, Laughton, Reino Unido). Después del recubrimiento, las muestras se analizaron con un Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6400 (Tokio, Japón) operado a una tensión de aceleración de 20 kV. Todas las micrografías se hicieron con un aumento de X1000 y X5000. Estos ensayos tuvieron lugar en el CNME (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, ubicado en la Universidad Complutense de Madrid, Spain).

4.3.4.2. Difracción de polvo por rayos x (XRPD):

Este ensayo realiza un estudio de barrido de la superficie de las partículas. La difracción de rayos X permite saber el grado de cristalinidad de las muestras. Las diferentes formulaciones fueron colocadas en un porta muestras y los patrones de rayos X fueron registrados en un difractómetro de rayos X (Philips X'Pert-MPD, Almelo, Países Bajos). Las muestras fueron irradiadas con radiación monocromatizada de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) y el rango de ángulos escaneado fue desde 5° hasta 50° (2θ) con un tamaño de paso de 0.04° y un tiempo de 1s por cada paso en todos los casos. El voltaje utilizado fue de 40mV y la intensidad de 55mA. Los estudios se realizaron en el CAI (Centro de Asistencia a la Investigación, Universidad Complutense de Madrid, Spain).

4.3.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC):

Este análisis se realiza para conocer las propiedades térmicas de las formulaciones utilizadas en este estudio. Para estos ensayos de DSC, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido de tipo (Mettler Toledo de modelo DSC 3 Star system). La temperatura para estos estudios fue calibrada utilizando el estándar de referencia de calibración del elemento químico indio (In), que es de 156,60°C. Las muestras se pesaron con precisión dentro de las cacerolas de aluminio que se usan para este equipo y fueron selladas herméticamente con sus respectivas tapas de aluminio. Después las muestras fueron calentadas de 30°C a 300°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo purga constante de nitrógeno seco a 20 mL/min. Se utilizó como referencia/patrón una cápsula de aluminio vacía y sellada de la misma manera que la muestra. Todas las muestras analizadas presentaban una cantidad equivalente a 1,82 mg de naproxeno base.

4.3.4.4. Características del estudio de velocidad de disolución:

Los ensayos se realizaron cumpliendo condiciones SINK, para lo cual, empleamos una cantidad correspondiente de naproxeno base de 18,2mg en cada una de las formulaciones para evitar que se produzca la saturación del medio. Las cantidades totales de las formulaciones fueron las siguientes: NAP Na= 20 mg (equivalente a 18,2 mg de Naproxeno base). NAP= 18,2 mg; A-NAP= 18,2 mg; FP= 18,5 mg; FD-5%= 19,4 mg; FD-10%= 20,3 mg; FD-15%= 21,2 mg; FS-3%= 20,8 mg; FS-6%= 21,4 mg; FS-10%= 22,1 mg; FS-12%= 22,5 mg; MF= 22,1 mg. Esta cantidad de Naproxeno es debida a que una cantidad mayor llegaría a la saturación del ensayo en la velocidad de disolución.

El método que se llevó a cabo para realizar los estudios de velocidades de disolución fue el del método USP de agitación por paletas (tipo 2), con un equipo de disolución ERWEKA DT 80 (Heusenstamm, Alemania) con las siguientes características: 900 ml de un medio de disolución a pH 1,2 (ácido clorhídrico 0,1 M), a una velocidad de 50

r.p.m. y con una temperatura del medio de $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Las muestras (5mL) se recogieron en intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos y fueron filtradas a través de un filtro Millipore (Millex-HV, PVDF hidrófilo $0,45\ \mu\text{m}$, Cork, Irlanda). Para la realización del ensayo de velocidad de disolución se adicionarán primero la muestra de la formulación, seguida de los 900ml de medio de disolución previamente atemperado a 37°C ; iniciando en ese momento el ensayo de velocidad de disolución.

La cantidad de naproxeno disuelto se determinó a 270nm con un espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpec Shimadzu, Kyoto, Japón). Para cada formulación y cada tiempo de muestra se hicieron ensayos por triplicado con su desviación estándar correspondiente.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.4.1. Caracterización SEM:

Tras los ensayos realizados en el microscopio electrónico de barrido (SEM), se obtuvieron multitud de imágenes, de las cuales se han hecho un pequeño resumen de las más importantes en la siguiente imagen.

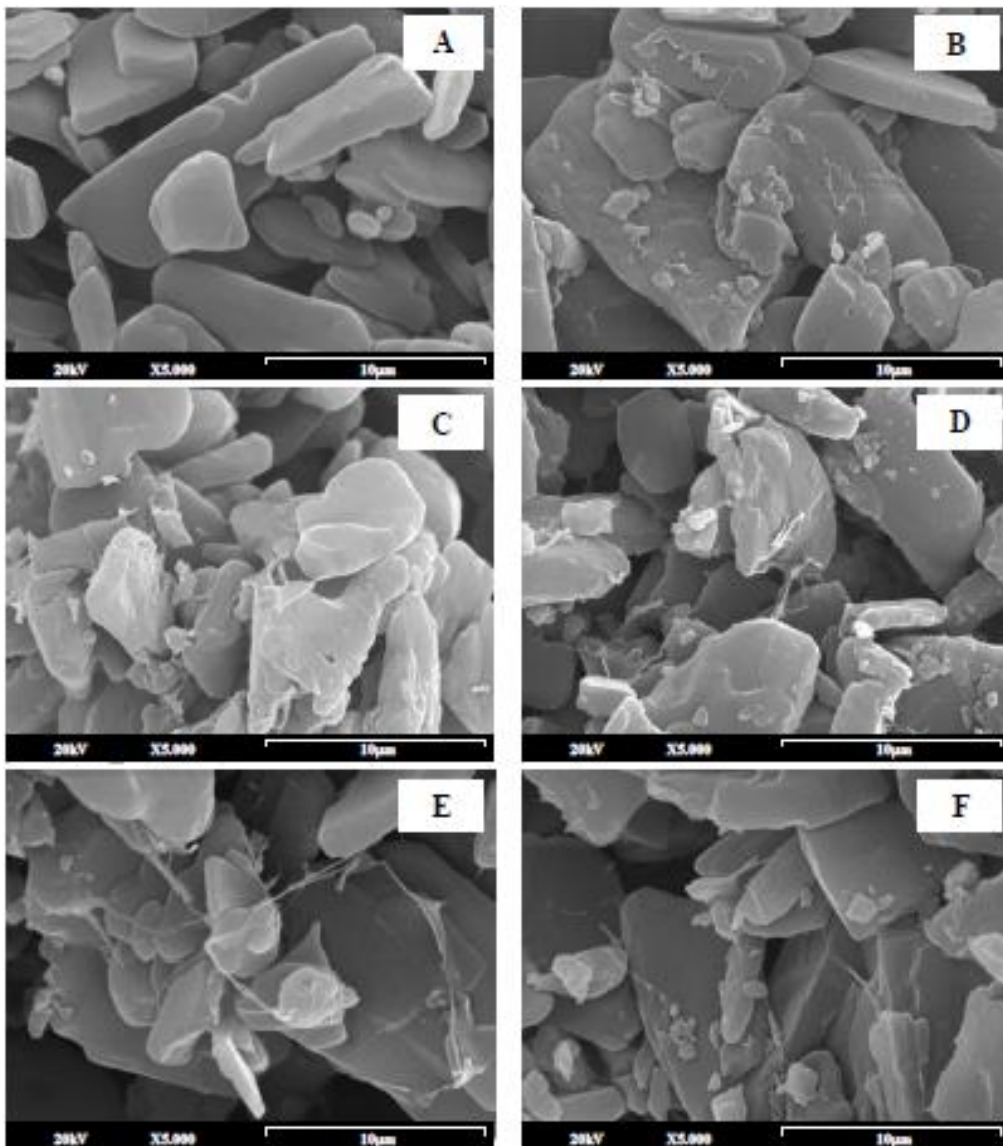


Figura 6. Microfotografías SEM hechas con un aumento de 5000x de las formulaciones más características: NAP=(A), FP=(B), FD-5%=(C), FD-10%=(D), FS-3%=(E), FS-10%=(F).

La materia prima, NAP (Fig.7) tiene una forma prismática con cristales laminares de forma irregular con tamaños entre 3 y 20 μm . Las partículas del naproxeno mostraron una alta tendencia a la aglomeración. Esta alta aglomeración de partículas se suele dar en sustancias hidrofóbicas, produciendo una disminución del flujo y retrasando la velocidad de disolución (Censi, R. et al, 2015; Matji, A. et al, 2017).

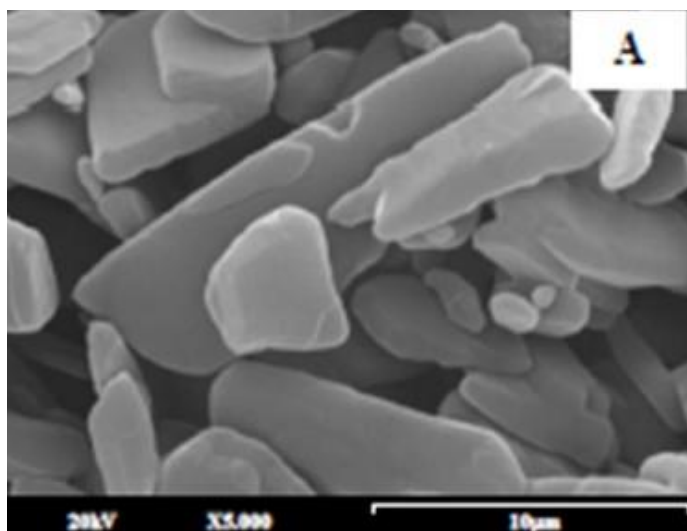


Figura 7. Microfotografía a 5000x de la formulación NAP.

La formulación polimérica (FP) que contiene naproxeno base y HPMC tiene partículas de tamaño algo más grandes y se puede apreciar que tienen una superficie porosa. En su figura (Fig.8) se observa la existencia de una capa/película delgada entre los cristales de naproxeno, esta capa se ha producido por a la adición de HPMC a la formulación. La razón por la cual el HPMC se encuentre en la superficie de los cristales de naproxeno se debe a que las cadenas hidrófilas/hidrofílicas del HPMC favorecen la unión de éste con el naproxeno. La presencia de polímeros hidrofílicos, como en este caso el HPMC hace disminuir la hidrofobia del naproxeno y por tanto, promueve la interacción entre el fármaco y el agua (Maghsoodi, M. et al, 2008; Mishra, B. et al, 2015).

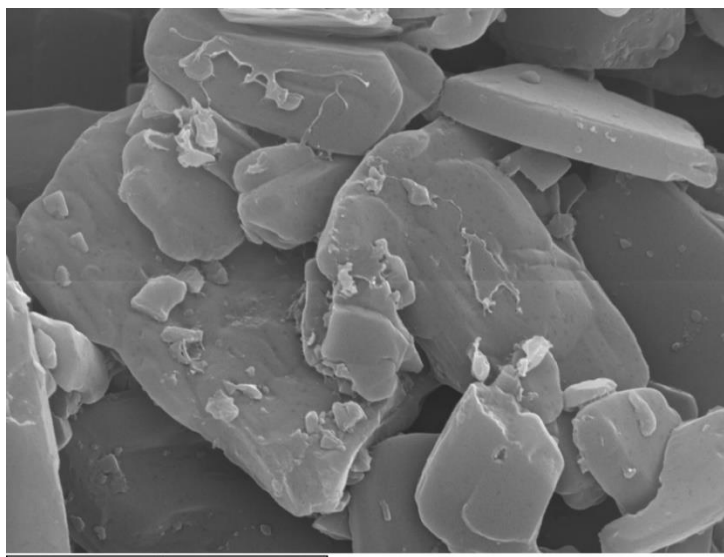


Figura 8. Microfotografía a 5000X de la formulación FP, correspondiente a la figura 6B.

Las formulaciones FD-5% (Fig.9) y FD-10% (Fig.10) contienen además de HPMC, un 5% y un 10% de croscarmelosa sódica respectivamente. Estas imágenes muestran tamaños de cristales semejantes a los anteriores, pero en ellas se aprecia claramente la presencia de una película entre los cristales de naproxeno. Lo interesante de estas formulaciones es que la morfología original del disgregante (croscarmelosa sódica) desapareció, es decir, que este disgregante hidrofílico se dispersó homogéneamente en la película de HPMC. Anteriores estudios revelaron cambios similares en la morfología de otros disgregantes en los aglomerados de naproxeno-disgregante (Maghsoodi, M. et al, 2008).

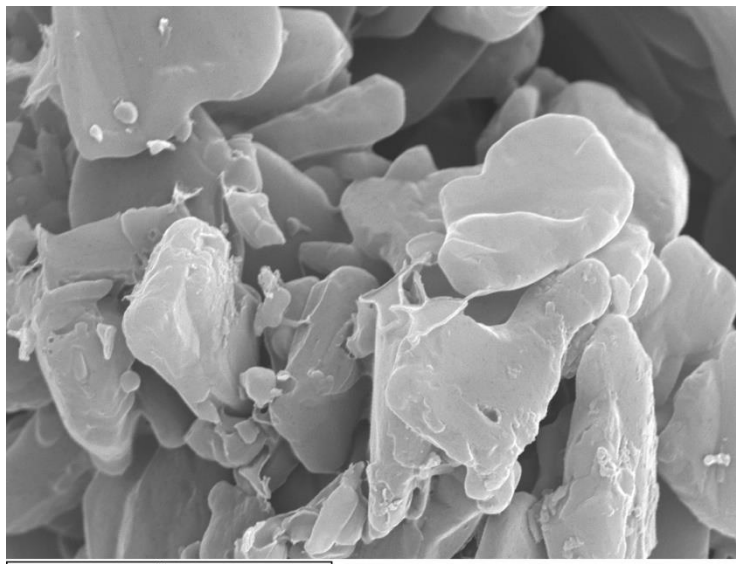


Figura 9. Microfotografía a 5000X de la formulación FD-5%, correspondiente a la figura 6C.

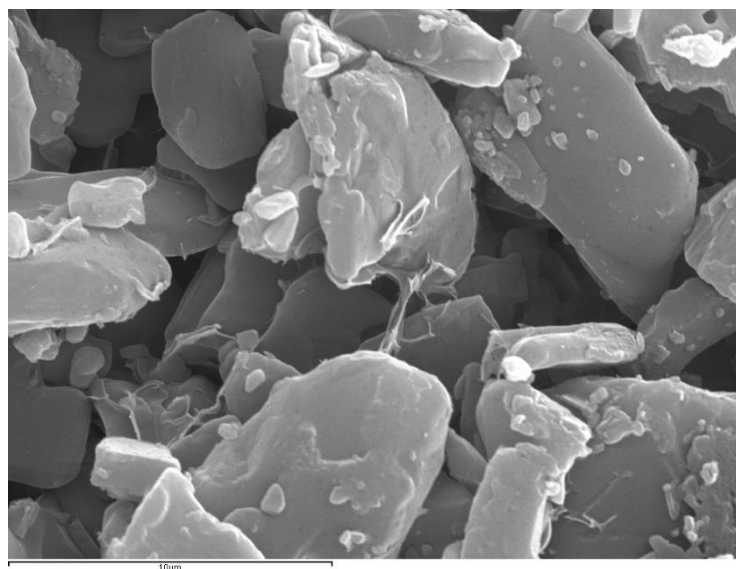


Figura 10. Microfotografía a 5000X de la formulación FD-10%, correspondiente a la figura 6D.

Las formulaciones FS-3% (Fig.11) y FS-10% (Fig.12) contienen HPMC, un 10% de croscarmelosa sódica y además un 3 y 10% de SDS. Los tamaños y morfología de los cristales de naproxeno siguen siendo igual a las formulaciones anteriores, sin embargo, la adición de surfactante a la formulación produce un cambio significativo en la morfología de una película hidrófila sobre los cristales de naproxeno. En estas formulaciones se produce un cambio en la capa superficial, al añadir el tensioactivo la película es más delgada que en las otras formulaciones sin SDS (Fig.9,10). La adición

de este tensioactivo produce un aumento de la miscibilidad del disgregante, lo que facilita que la película de un valor adecuado para cubrir la superficie del cristal (Mishra, B. et al, 2015). La micrografía SEM (Fig.11,12) muestra sinergismos entre el HPMC y el SDS. El SDS facilita la humectabilidad y la dispersión de la película de HPMC sobre los cristales de naproxeno (Silva, S. et al, 2011).

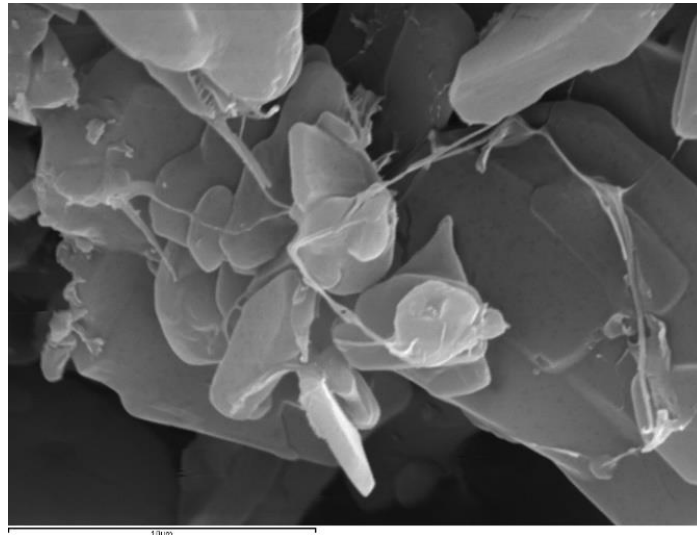


Figura 11. Microfotografía a 5000X de la formulación FS-3%, correspondiente a la figura 6E.

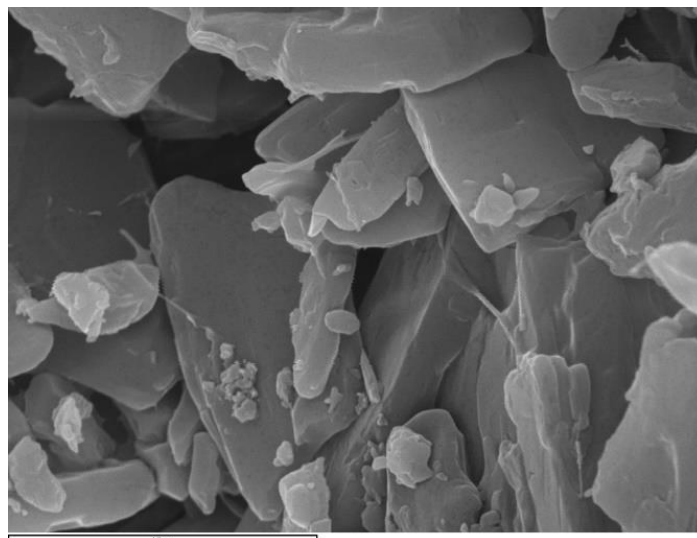


Figura 12. Microfotografía a 5000X de la formulación FS-10%, correspondiente a la figura 6F.

4.4.2. Difracción por rayos x (XRPD):

Tras los ensayos realizados en el difractor de rayos X, se obtuvieron multitud de difractogramas diferentes, de los cuales se ha hecho un pequeño resumen de los más importantes en las siguientes imágenes.

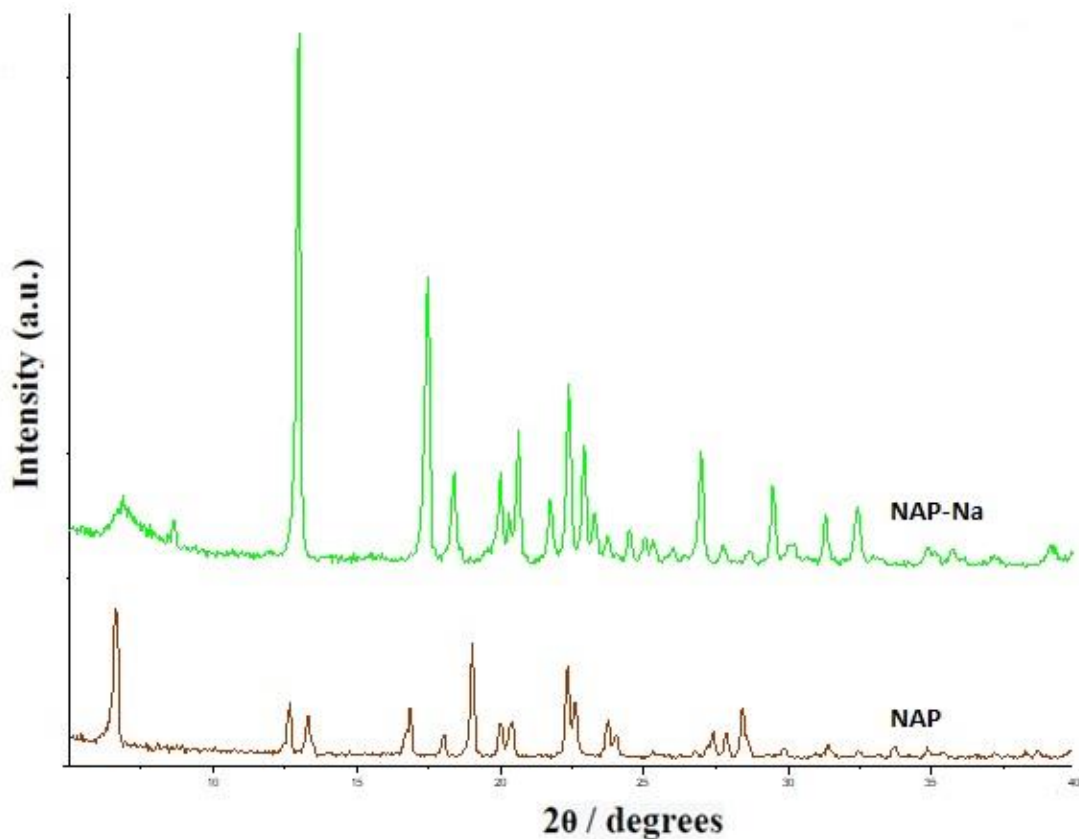


Figura 13. Representación de los difractogramas para el naproxeno sódico (NAP Na) y el naproxeno base materia prima (NAP).

En la figura 13 se compara el naproxeno sódico frente al naproxeno base, al comparar el NAP base frente al NAP Na en los estudios de rayos X vemos como el NAP presenta los siguientes picos de difracción de 6,63; 12,65; 13,35; 18,99; 20,34; 22,47 y 23,80 2θ u mientras que el NAP Na presenta sus picos mayoritarios a 12,98; 17,46; 20,62; 22,38 y 26,98 2θ u. La mayor intensidad que muestran los picos de NAP Na frente a NAP posiblemente se pueda relacionar con una mayor cristalinidad. Estos cristales de NAP

Na se deben a la formación de la sal sódica del naproxeno. (Kumar, S. y Burgess, D., 2014; Di Martino, P. et al, 2001; Joiris, E. et al, 2008).

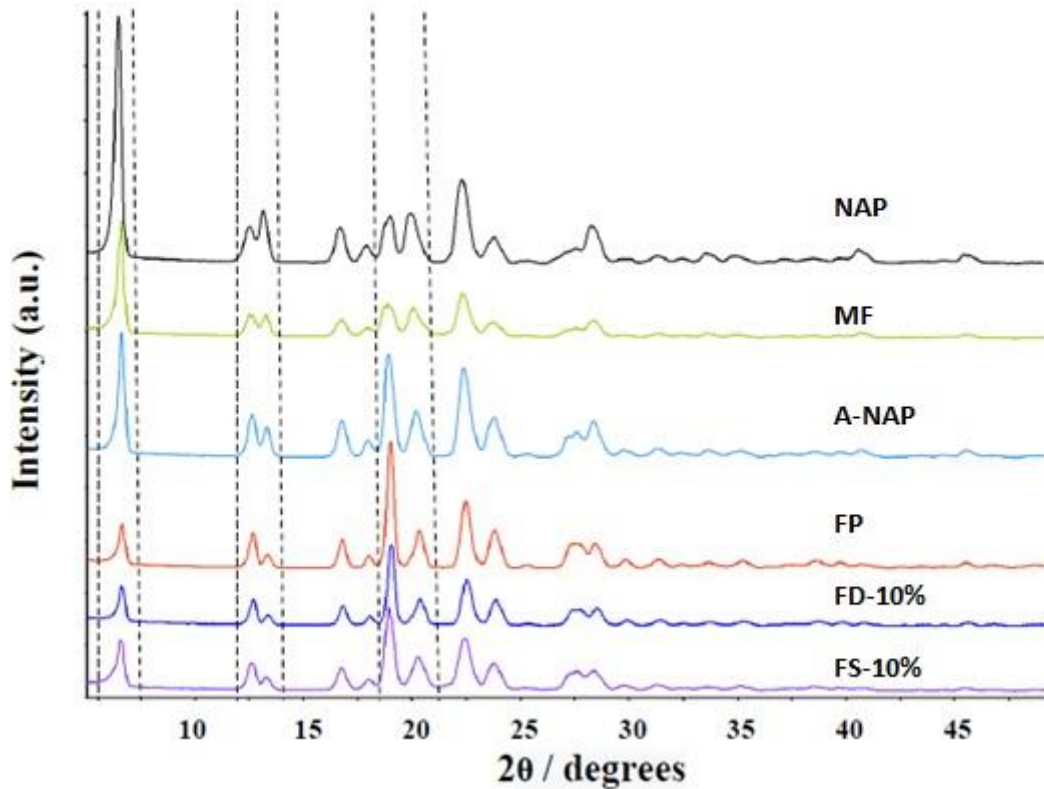


Figura 14. Representación de los difractogramas más representativos de cada tipo de formulación: naproxeno materia prima (NAP), mezcla física (MF), naproxeno anhidro (A-NAP), formulación polimérica (FP), formulación disgregante (FD-10%) y formulación surfactante.

El NAP presentó un patrón característicamente cristalino con varios picos con alta intensidad a los ángulos de difracción de 6,63; 12,65; 13,35; 18,99; 20,34; 22,47 y 23,80 2θ . Estos patrones de rayos x fueron similares a los reportados por otros autores (Maghsoodi, M. et al, 2008). Los patrones de difracción de rayos x del NAP están probablemente relacionados con las estructuras hidratadas con secciones de carboxílicos/ H_2O con puentes de hidrogeno, alternando con secciones que contienen moléculas de naproxeno sin carboxílicos/ H_2O . Los procesos de deshidratación requieren la reorganización de secciones de la molécula del naproxeno para su transformación a la forma anhidra (Bond, A.D. et al, 2014).

La forma A-NAP mostró ángulos de difracción muy similares al patrón de NAP, pero con una marcada disminución de la intensidad en los ángulos de 6,63 y 13,35 2θ , y un incremento en intensidad en los ángulos 12,65 y 18,99 2θ . Los resultados para estas formas son similares a otros estudios de naproxeno (Bond, A.D. et al, 2014) y carbamazepina (Tian, F. et al, 2007), esto es debido a las transformaciones que se dan de la formas hidratadas-anhidras. Sin embargo, estudios sobre la forma de naproxeno de sodio han mostrado ángulos de difracción y valores de intensidad diferentes en comparación con las formas de materia prima de naproxeno (Censi, R. et al, 2015).

La presencia de polímeros hidrófilos como el HPMC en la mezcla física (MF), revela los patrones característicos de rayos x de la forma anhidra (A-NAP). En general se dieron valores de intensidad similares para los picos característicos, esto está relacionado con una ausencia de naproxeno amorfo en la superficie cristalina. Sin embargo, en la figura 14 se muestra una disminución significativa en la intensidad en los ángulos bajos (6,63 2θ), lo que se puede explicar por el efecto plastificante producido por la película de HPMC sobre la superficie cristalina del naproxeno. Este polímero muestra una preferencia por el naproxeno en forma anhidra y aumenta la hidrofilia de las partículas de principio activo sin producir formas amorfas sobre la superficie de los cristales del naproxeno. Esto puede explicarse por el efecto estabilizador en la cristalinidad de los polímeros hidrófilos (Bose, S. et al, 2012).

Los patrones de rayos x para la mezcla física (MF) son similares a los de NAP. Estos resultados muestran que bajas proporciones de excipientes con una estructura semicristalina no cambian el parámetro de cristalinidad del NAP (Maghsoodi, M. et al, 2008).

La adición de croscarmelosa sódica (FD-10%), no produce cambios en los picos de difracción del naproxeno; los valores de intensidad sólo disminuyen en ángulos bajos (6,63 y 13,35 2θ).

La adición de SDS a la formulación surfactante (FS-10%), no produce cambios en los picos de difracción del naproxeno; los valores de intensidad sólo disminuyen en ángulos bajos (6,63 y 13,35 2θ), similar a lo que pasó con FP o FD-10%.

Diferentes proporciones de SDS (3%, 6% o 10%) producen disminuciones similares en los valores de intensidad a 6,63 y 13,35 2θ . Se dieron parámetros similares para todas las proporciones de SDS estudiadas. Estos resultados indican la existencia de una interacción de la película HPMC-SDS con los cristales de naproxeno. La presencia de SDS facilita la incorporación del HPMC en la superficie del naproxeno, pero sin producir ningún cambio que indique la presencia de formas amorfas sobre la superficie de los cristales de naproxeno. El efecto plastificante del surfactante explicaría la mayor estabilidad en la superficie de los cristales del fármaco cuando se añaden diferentes surfactantes a películas poliméricas hidrófilas (Kumar, S. y Burgess, D., 2014).

4.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC):

Tras los ensayos realizados en el calorímetro diferencial de barrido (DSC), se obtuvieron multitud calorimetrías, de las cuales se ha hecho un pequeño resumen de las más importantes en la siguiente imagen.

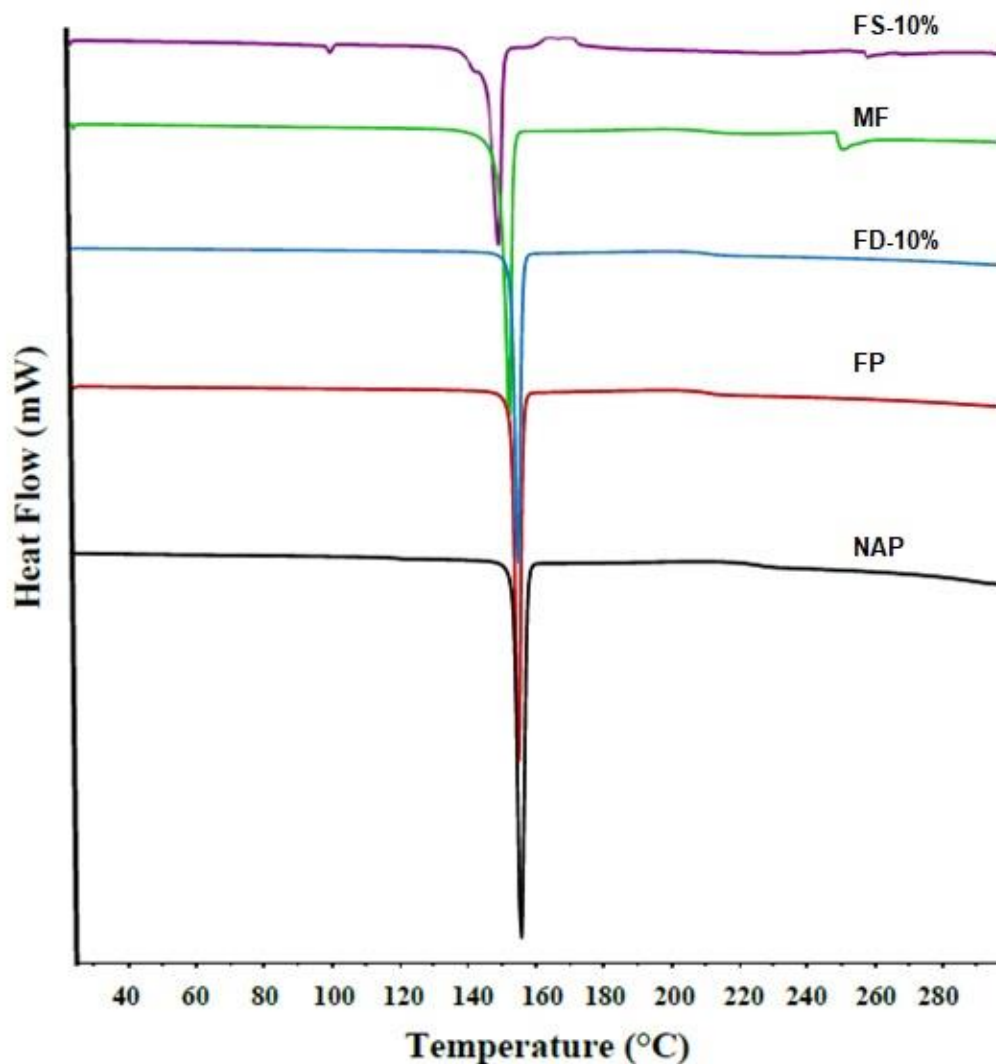


Figura 15. Calorimetría diferencial de barrido de las formulaciones NAP, FP, FD-10%, MF y FS-10%.

El NAP muestra un pico endotérmico agudo a 156,92°C, debido a su fusión con una entalpía de fusión 140,54 J/g, correspondiente a su forma cristalina. Estos resultados son similares a los valores de la forma anhidro (A-NAP) (temperatura de fusión de 157,49°C y entalpía de fusión de 139,8 J/g). Los resultados del DSC muestran valores similares para ambas formas cristalinas, y también fueron similares a las obtenidas en

otras publicaciones (Zerrouk, N. et al, 2004; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009). Los métodos de difracción de rayos x fueron más adecuados para identificar las formas anhídrido y las formas hidratadas en estas formulaciones (Censi, R. et al, 2015).

Las formulaciones FP y FD-10% muestran picos de fusión característicos del naproxeno a 156,56°C y 155,06°C respectivamente. Estas temperaturas similares indican que no hubo cambios significativos en la cristalinidad o interacción entre el fármaco y los excipientes en estas formulaciones. La forma del pico de la fusión y las entalpías para la formulación MF son similares a las de la materia prima, mostrando que no aparecen en las formas parcialmente amorfas en la superficie de los cristales de naproxeno. Varios estudios confirman que el uso de bajos porcentajes de polímeros hidrófilos (0,5-1,5%)(Kumar, S. y Burgess, D., 2014; Mishra, B. et al, 2015) no producen formas amorfas en la superficie de los cristales de la materia prima. La ausencia de regiones amorfas en la superficie de los cristales puede ser causada por la baja proporción de estos polímeros hidrófilos (Kumar, S. y Burgess, D., 2014).

La formulación FD-10% muestra una ligera disminución en la entalpía de fusión del pico correspondiente al naproxeno, esto se puede deber al efecto de dilución provocado por la cantidad de disgregante añadido en la formulación. Es muy difícil identificar la presencia de HPMC o del disgregante en los estudios de DSC, ya que estos polímeros tienen estructuras semicristalinas y al adicionarse en proporciones inferiores al 10%, los ensayos de DSC no detectan ninguna interacción en el pico endotérmico del naproxeno. Otros disgregantes hidrófilos como el glicolato de almidón o el almidón tampoco mostraron desplazamiento en los picos endotérmicos de los fármacos poco solubles (Maghsoodi, M. et al, 2008).

Todas las formulaciones con SDS (FS-3%, FS-6%, FS-10% y FS-12%) mostraron una disminución en sus temperaturas de fusión. En la figura 15, se observa como la formulación FS-10% es la que tiene un pico de fusión menor, en concreto a 150,92°C, mientras que el más parecido es el de la formulación MF, a 154,32°C. Esta disminución

puede atribuirse a una interacción del HPMC-SDS con los cristales del naproxeno durante el proceso de granulación. En el proceso de auto-asociación del HPMC-SDS, la presencia del surfactante tiene un efecto marcado en la unión de las cadenas de HPMC a los cristales del naproxeno. El SDS disminuye la tensión entre una solución acuosa y las cadenas HPMC. La unión de moléculas de surfactante a polímeros como el HPMC puede modificar la polaridad del polímero. Las cadenas de HPMC pueden progresivamente convertir el polímero no iónico en un polielectrolito debido a la carga de repulsión (Cheow, W.S. et al, 2014). Las películas de HPMC asociadas al SDS se extienden más ampliamente sobre el cristal de naproxeno que sin él (ver Fig.12).

4.4.4. Estudios de disolución:

4.4.4.1. Validación del método analítico:

Selectividad:

Estudio de especificidad del naproxeno en agua. Se realizó un barrido similar del medio de disolución a pH 1,2.

Todas las muestras fueron filtradas y analizadas mediante un barrido espectrofotométrico entre 200-400nm. Se determinó la intensidad máxima del naproxeno sin interferencia del resto de excipientes. El espectrofotómetro utilizado para este barrido fue: Shimadzu UV-1700 PharmaSpec UV-VIS Spectrophotometer.

Recta de calibrado:

Para la validación de los ensayos fue necesario la elaboración de una recta de calibrado de naproxeno. Esta recta de calibrado se realizó a partir de distintas concentraciones de naproxeno comprendidas entre 0,0027mg/ml a 0,0271mg/ml. Se prepararon 3 disoluciones madre de 0,271mg/ml utilizando agua como disolvente, esto se realizó mediante la pesada de 27,1mg en una balanza de precisión y con su posterior disolución en un matraz aforado de 100ml con agua.

Con cada una de estas disoluciones madre se realizaron diferentes diluciones: 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 y 1,00ml en 10ml de disolvente a pH 1,2 (0,1 M) en cada una de ellas, dando las siguientes concentraciones: 0,0027mg; 0,0054; 0,0083; 0,0108; 0,0136; 0,0163; 0,0190; 0,0217; 0,0244; 0,0271mg/ml. A continuación, se mide la absorbancia de cada una de las diluciones preparadas con concentraciones conocidas. La absorbancia se mide con una longitud de onda de 270nm, esta longitud de onda se obtuvo a partir de barridos de soluciones de naproxeno realizados en el ensayo de selectividad, dando como valor de medición de referencia 270nm. El espectrofotómetro utilizado para la medida de la absorbancia fue: Shimadzu UV-1700 PharmaSpec UV-VIS Spectrophotometer.

A partir de los valores obtenidos en cada dilución de las 3 disoluciones madre, se hicieron 3 rectas de calibrado. Con los valores de estas 3 rectas de calibrado, se hizo una recta de calibrado final a partir de la media de las 3.

Exactitud y precisión de la recta de calibrado:

Exactitud:

Para comprobar la exactitud del método se prepararon 3 disoluciones madre de concentración 0,271mg/ml de naproxeno.

De cada disolución madre se realizaron diluciones como en el proceso anterior para obtener las siguientes concentraciones teóricas: 0,0108; 0,0136; 0,0163mg/ml. Tras la elaboración de las diluciones, estas muestras se analizaron en el espectrofotómetro para verificar que la concentración de las muestras realizadas es la misma que la teórica.

Precisión:

Para comprobar la precisión del método se realizó un estudio de repetibilidad inter-días e inter-personas. Para este proceso se realizó el mismo procedimiento explicado en el apartado de exactitud, en 3 días distintos y con 3 personas distintas.

4.4.4.2. Selectividad:

Para determinar la longitud de onda máxima del naproxeno, se realizó un barrido espectrofotométrico de una muestra de naproxeno desde los 200nm hasta los 400nm, obteniendo los siguientes resultados:

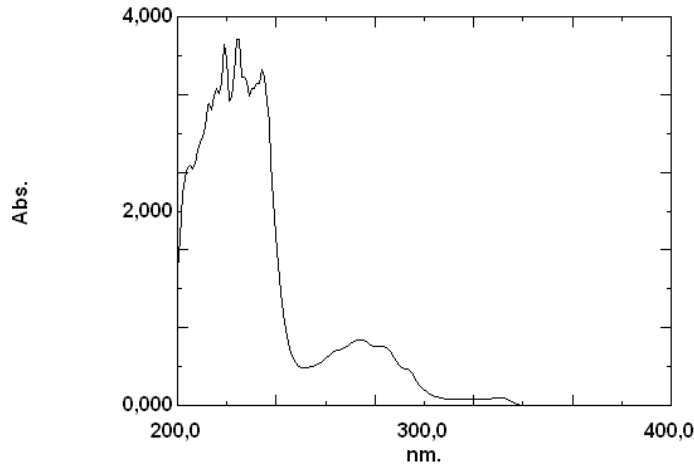


Figura 16. Barrido espectrofotométrico de una muestra de naproxeno.

Como podemos observar en la figura, la longitud de onda más adecuada para la medición del naproxeno es de 270nm, dado que a esta longitud de onda no existe interferencia con el medio de disolución y a longitudes de onda inferiores (220 nm) se producen interferencias entre las distintas materias primas utilizadas en este trabajo.

4.4.4.3. Linealidad:

Se realizó una recta de calibrado para determinar las concentraciones de naproxeno dentro del rango de concentraciones que se utilizará en los ensayos de velocidad de disolución. Se realizó una correlación entre las concentraciones teóricas obtenidas mediante diluciones a partir de una muestra patrón y sus valores absorbancias.

A partir de los datos de absorbancia y de las concentraciones teóricas de cada uno de ellos, se pudieron representar las 3 rectas de calibrado correspondientes a cada disolución madre, dando lugar a las siguientes gráficas:

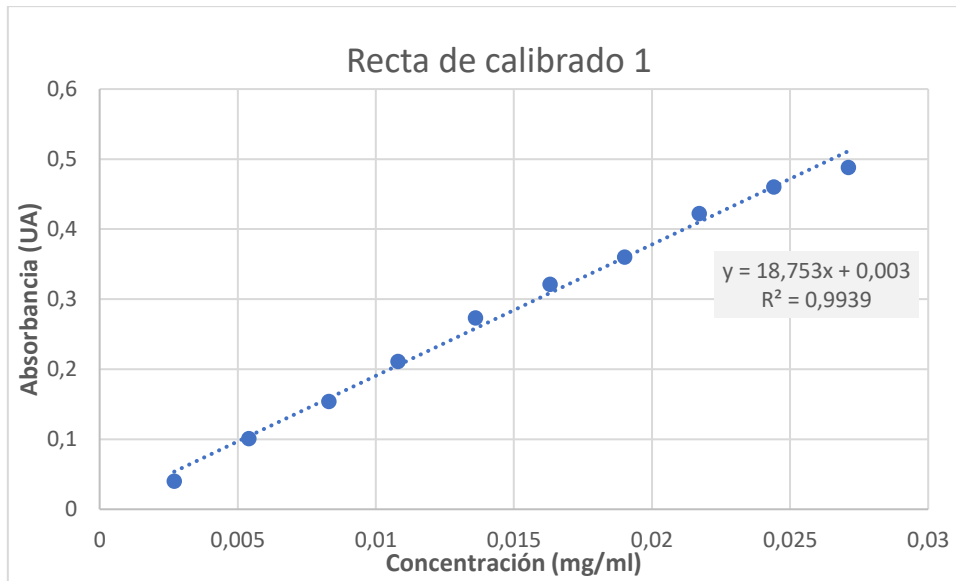


Figura 17. Representación gráfica de las concentraciones de naproxeno mg/mL frente a sus valores de absorbancia a 270 nm. Disolución madre 1.

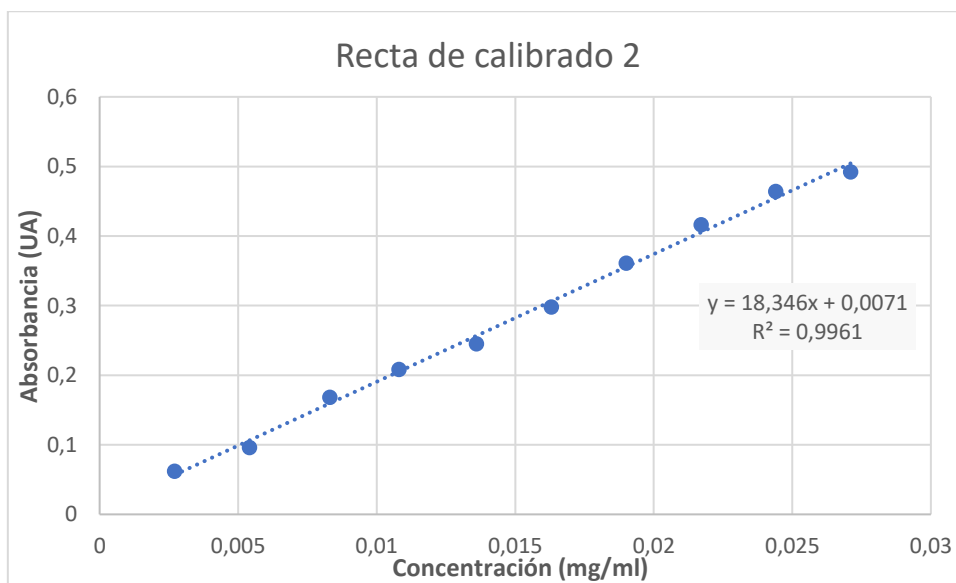


Figura 18. Representación gráfica de las concentraciones de naproxeno mg/mL frente a sus valores de absorbancia a 270 nm. Disolución madre 2.

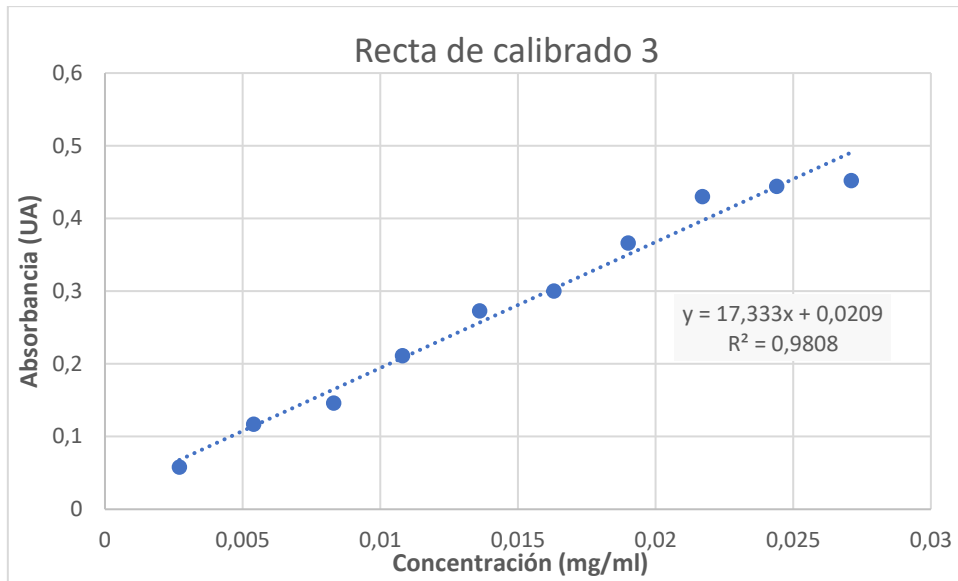


Figura 19. Representación gráfica de las concentraciones de naproxeno mg/mL frente a sus valores de absorbancia a 270 nm. Disolución madre 3.

A partir de los datos de absorbancia media de las tres soluciones madres y de sus concentraciones teóricas, podemos representar la recta de calibrado final. Su resultado se muestra en la siguiente gráfica:

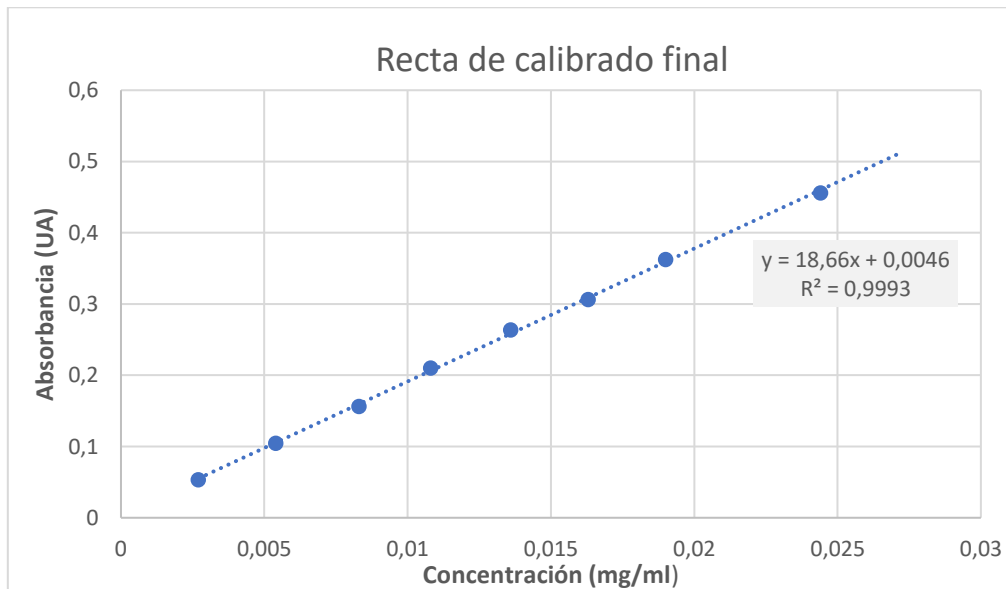


Figura 20. Representación gráfica de las concentraciones de naproxeno mg/mL frente a sus valores de absorbancia a 270 nm. Recta media de tres soluciones madres diferentes.

En esta gráfica se representa la relación lineal entre las variables de la concentración de naproxeno (x) y de la absorbancia del naproxeno (y). En esta gráfica se ha obtenido la siguiente ecuación de la recta: $y = 18,66x + 0,0046$ y, con un rango de concentraciones entre 2,7 y 27 $\mu\text{g/mL}$, y con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9993. Al presentar un coeficiente de correlación superior a 0,999 consideramos la recta de calibrado adecuada para su utilización en los ensayos de velocidad de disolución.

4.4.4.4. Ensayos de Exactitud:

Para conocer la exactitud de los datos obtenidos para la recta de calibrado. Se realizó un análisis de los datos obtenidos a partir de tres disoluciones madre. El análisis de los datos se representa en la siguiente tabla:

Tabla 5. Datos obtenidos a partir del ensayo de exactitud.

Muestra	Conc. obtenida (mg/ml)	Conc. teórica (mg/ml)	Porcentaje de error (%)
DM 1	0,0113	0,0108	4,4
DM 2	0,0111	0,0108	2,8
DM 3	0,0117	0,0108	5,3
DM 1	0,0131	0,0136	-3,6
DM 2	0,0142	0,0136	4,2
DM 3	0,0143	0,0136	5,0
DM 1	0,0162	0,0163	-0,9
DM 2	0,0166	0,0163	2,3
DM 3	0,0165	0,0163	1,4

Tabla 6. Datos obtenidos a partir del ensayo de exactitud.

Muestra	Conc. obtenida (mg/ml)	Conc. teórica (mg/ml)	Porcentaje de error (%)
DM 1	0,0113	0,0108	4,4
DM 2	0,0111	0,0108	2,8
DM 3	0,0117	0,0108	5,3
DM 1	0,0131	0,0136	-3,6
DM 2	0,0142	0,0136	4,2
DM 3	0,0143	0,0136	5,0
DM 1	0,0162	0,0163	-0,9
DM 2	0,0166	0,0163	2,3
DM 3	0,0165	0,0163	1,4

Los resultados de la tabla nos muestran los porcentajes de error calculados a partir de las concentraciones reales frente a las concentraciones teóricas de cada una de las muestras. Para los métodos de análisis según la ICH Q2 (2005), se considera que este porcentaje de error no debe ser superior a un 5%. Como se observa en esta tabla sólo existe un valor con error mayor del 5%, posiblemente atribuido a un error de preparación del analista.

4.4.4.5. Ensayos de precisión:

Para los ensayos de precisión se realizaron una serie de estudios de repetibilidad con tres soluciones madre. El estudio de repetibilidad se realizó en tres días distintos y por tres personas diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 7. Datos del ensayo de repetibilidad. Resultados de la solución madre 1.

Dilución (ml/ml)	Muestra	Conc. obtenida (mg/ml)
0,4/10	Día 1; Individuo 1	0,0113
	Día 2; Individuo 2	0,0112
	Día 3; Individuo 3	0,0114
0,5/10	Día 1; Individuo 1	0,0135
	Día 2; Individuo 2	0,0129
	Día 3; Individuo 3	0,0130
0,6/10	Día 1; Individuo 1	0,0162
	Día 2; Individuo 2	0,0164
	Día 3; Individuo 3	0,0159

A partir de los datos obtenidos en la tabla podemos calcular la media y el coeficiente de variación de cada una de las diluciones. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 8. Media y coeficiente de variación del ensayo de repetibilidad de la disolución madre 1.

Dilución (ml/ml)	Media (mg/ml)	Coef. Variación
0,4/10	0,0113	0,8849
0,5/10	0,0131	2,4476
0,6/10	0,0161	1,5567

Tabla 9. Datos del ensayo de repetibilidad. Resultados de la solución madre 2.

Dilución (ml/ml)	Muestra	Conc. obtenida (mg/ml)
0,4/10	Día 1; Individuo 1	0,0112
	Día 2; Individuo 2	0,0110
	Día 3; Individuo 3	0,0112
0,5/10	Día 1; Individuo 1	0,0143
	Día 2; Individuo 2	0,0141
	Día 3; Individuo 3	0,0142
0,6/10	Día 1; Individuo 1	0,0166
	Día 2; Individuo 2	0,0169
	Día 3; Individuo 3	0,0165

A partir de los datos obtenidos en la tabla podemos calcular la media y el coeficiente de variación de cada una de las diluciones. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 10. Media y coeficiente de variación del ensayo de repetibilidad de la disolución madre 2.

Dilución (ml/ml)	Media (mg/ml)	Coef. Variación
0,4/10	0,0111	1,0371
0,5/10	0,0142	0,7042
0,6/10	0,0166	1,2489

Tabla 11. Datos del ensayo de repetibilidad. Resultados de la solución madre 3.

Dilución (ml/ml)	Muestra	Conc. obtenida (mg/ml)
0,4/10	Día 1; Individuo 1	0,0119
	Día 2; Individuo 2	0,0118
	Día 3; Individuo 3	0,0116
0,5/10	Día 1; Individuo 1	0,0143
	Día 2; Individuo 2	0,0142
	Día 3; Individuo 3	0,0144
0,6/10	Día 1; Individuo 1	0,0167
	Día 2; Individuo 2	0,0164
	Día 3; Individuo 3	0,0164

A partir de los datos obtenidos en la tabla anterior podemos calcular la media y el coeficiente de variación de cada una de las diluciones. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 12. Media y coeficiente de variación del ensayo de repetibilidad de la disolución madre 3.

Dilución (ml/ml)	Media (mg/ml)	Coef. Variación
0,4/10	0,0117	1,2981
0,5/10	0,0143	0,6993
0,6/10	0,0165	1,0497

4.4.4.6. Sensibilidad:

Límite de detección. De acuerdo con la relación de señal ruido que presenta nuestro método de análisis a continuación se determina su límite de detección:

3*U.A.	0,002
Conc (µg/ml)	18,66

Lím. Detección = 0,322 µg/ml

Límite de cuantificación. De acuerdo con la relación de señal ruido que presenta nuestro método de análisis, a continuación, se determina su límite de cuantificación:

10 *U.A.	0,002
Conc (µg/ml)	18,66

Lím. Cuantificación = 1,072 µg/ml

En base a estos resultados confirmamos que el método analítico a 270nm muestra ser el adecuado, presentando una buena selectividad, una adecuada linealidad, exactitud y repetibilidad en el rango de concentraciones establecido de 2,7 – 27 µg/ml. Estableciendo un límite de detección de 0,322 µg/ml y un límite de cuantificación de 1,072 µg/ml.

En base a estos ensayos y según las guías de validación de métodos analíticos, podemos utilizar este método de validación bajo aplicando ICH Q2 (R1) (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005).

4.4.4.7. Resultados ensayos velocidad disolución:

A través de los estudios de velocidad de disolución de las distintas formulaciones, se realizaron las diferentes gráficas donde se mostraron los diferentes perfiles de disolución, dividiéndose principalmente en formulaciones sin tensioactivos y con tensioactivos. Todas las formulaciones se hicieron por triplicado y tienen su desviación

estándar correspondiente. En los datos de la gráfica se encuentran los % de naproxeno liberado a cada tiempo del estudio.

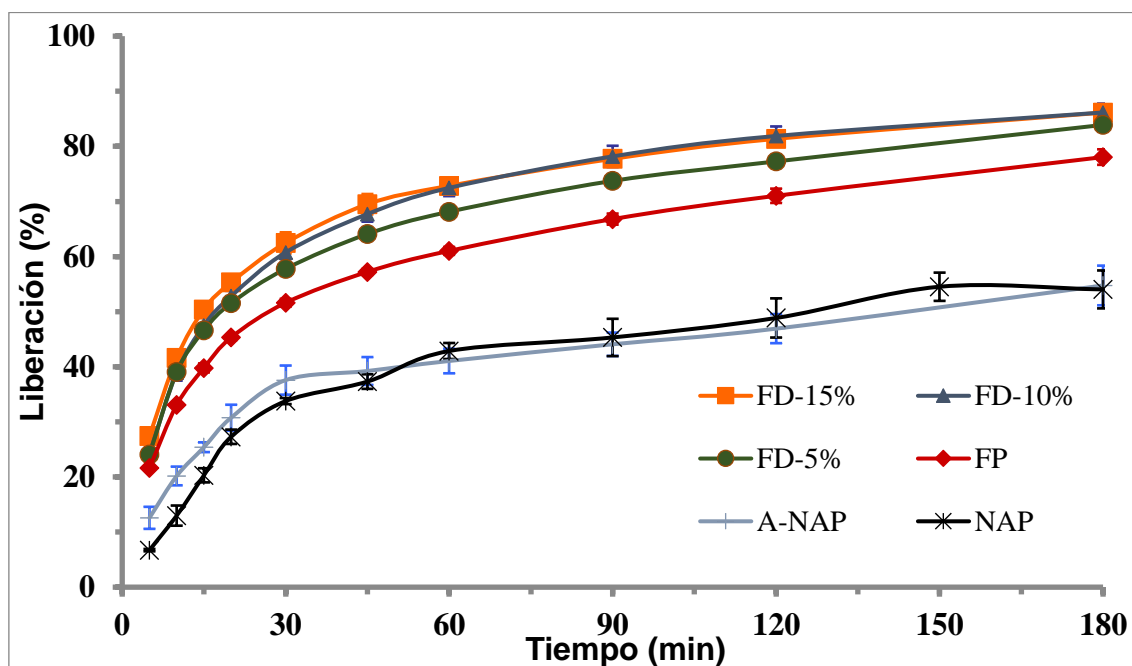


Figura 21. Velocidad de disolución para las formulaciones de: NAP, A-NAP, FP, FD-5%, FD-10% y FD-15%.

Lo primero que se observa es una gran diferencia en los perfiles de disolución entre 2 grupos, los que contienen excipientes con los que no. Las dos formulaciones que no tienen excipientes, NAP y A-NAP presentan valores significativamente más bajos de disolución que el resto. La formulación de NAP muestra unos valores de $12,99 \pm 1,83\%$ y de $33,78 \pm 0,55\%$ durante los 10 y 30 minutos que son muy semejantes a los valores de la formulación A-NAP. Estos valores nos indican que ambos tienen unos perfiles de disolución bajos. El hecho de que no haya diferencias significativas entre la forma anhidra y la hidratada podría explicarse por la fuerte hidrofobia observada en la superficie del cristal de naproxeno. Otras materias primas similares al naproxeno, con anillos de benceno hidrofóbicos y grupos metilo y carbonilo contribuyen a aumentar la hidrofobia. La hidrofobia y el pequeño tamaño de las partículas de naproxeno favorecen la aglomeración, obstaculizan la humectabilidad y retrasan la disolución (Li, H. et al, 2015).

A diferencia de las formulaciones sin excipientes, las dispersiones sólidas tienen un perfil de disolución mayor. La formulación polimérica con HPMC (FP) tuvo un perfil de disolución mucho mayor que las formulaciones sin HPMC, la formulación (FP) aumentó al $33,07 \pm 0,33\%$ a los 10 min ($P < 0,05$) y al $51,62 \pm 0,72\%$ a los 30 min ($P < 0,05$). Por tanto, prácticamente duplicó el % de naproxeno liberado con respecto a las formulaciones sin excipientes. Posiblemente, durante el proceso de granulación, el polímero hidrófilo HPMC se posiciona en la superficie anhidra de los cristales de naproxeno, lo que mejora su interacción con el medio acuoso. Los resultados de la difracción de rayos X (Fig.14) indicaron que la cristalinidad del naproxeno cambió como resultado de la interacción del HPMC en la superficie de los cristales de naproxeno. Estos resultados de la difracción de rayos X se corroboraron con los obtenidos en los estudios de velocidad de disolución. Además, varios trabajos han demostrado interacciones similares entre diferentes polímeros hidrófilos con materias primas poco solubles (Zerrouk, N. et al, 2004; Li, H. et al, 2015; Mishra, B. et al, 2015).

La adición de distintas proporciones del disgregante croscarmelosa sódica a la formulación de naproxeno (FD-5%, FD-10% y FD-15%), produjo un aumento en la disolución en comparación con las formulaciones que no tenían excipientes y además también aumentó con respecto a la formulación polimérica que contenía solo HPMC. Los disgregantes hidrofílicos, en este caso la (croscarmelosa sódica) produjo un aumento del carácter hidrófilo en la superficie del naproxeno y por tanto, hizo que la velocidad de disolución aumentara. Este efecto se puede comprobar al comparar los datos obtenidos entre la formulación FP y las FD-5%, FD-10% y FD-15%. El % de disolución a los 30 min aumentó de $51,62 \pm 0,72\%$ en la formulación (FP) a $57,78 \pm 0,49\%$ (FD-5%) y $60,76 \pm 1,21\%$ (FD-10%). Estos datos confirmaron que sí que existen diferencias significativas entre las formulaciones que contienen croscarmelosa sódica (FD-5%, FD-10% y FD-15%) y la formulación con HPMC sin disgregante (FP). Sin embargo, hay que destacar que se observaron porcentajes de disolución similares entre

las formulaciones con croscarmelosa al 10% (FD-10%) y al 15% (FD-15%) (ver Fig.21). Estos datos permiten considerar que la adición del 10% de disgregante fue suficiente para permitir la máxima interacción entre la superficie del principio activo y el agua (Maghsoodi, M. et al, 2008).

En la siguiente gráfica se representan las diferentes velocidades de disolución de las formulaciones que contiene tensioactivo, además de la de referencia y la formulación disgregante que presenta mejores perfiles de disolución.

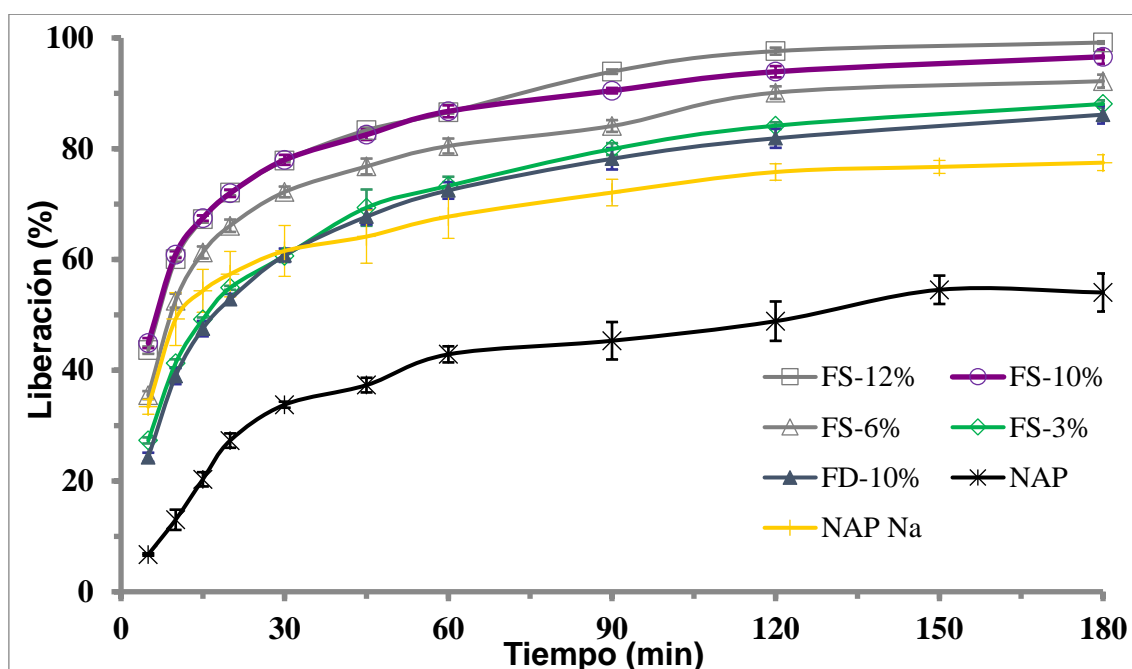


Figura 22. Velocidad de disolución para las formulaciones de: NAP, NAP Na, FD-10%, FS-3%, FS-6%, FS-10% y FS-12%.

La formulación que tiene SDS en menor proporción (FS-3%) nos dio valores de disolución similares al de las formulaciones sin tensioactivo (FD-10%). Sin embargo, una proporción de SDS del 6% fue suficiente para producir un HPMC más delgado entre las superficies de los cristales de naproxeno, y por tanto, mejorar los valores de disolución. La baja proporción de SDS en la formulación del FS-3% no pudo reducir la tensión superficial en la capa de agua de HPMC alrededor de las partículas de naproxeno y por ese motivo no mejoró los valores de disolución.

Las formulaciones de FS-6% y FS-10% mostraron perfiles de disolución más altos en los primeros 30 minutos de disolución. A los 30 min, los porcentajes de disolución de naproxeno para FS-6% fueron de $72,19 \pm 0,97\%$ y de $77,99 \pm 0,90\%$ para FS-10%. La adición de SDS a las formulaciones obliga a que la parte hidrofílica del HPMC aumente su contacto con la superficie del cristal del naproxeno. Este hecho se puede comprobar en las imágenes de SEM (Fig.11,12) de las formulaciones que contienen HPMC y SDS, en donde se ve la creación de una película delgada como resultado de la interacción entre el polímero (HPMC) y el tensioactivo (SDS). Además, el SDS al 10% mostró una sinergia SDS-HPMC en los estudios DSC (Fig.15). Se comprueba que los resultados que habíamos obtenido en las diferentes pruebas de caracterización con la formulación FS-10% se corroboran con una mejora en la velocidad de disolución. Probablemente, la presencia del surfactante reduce la tensión superficial de las cadenas del polímero hidrofílico HPMC, y su carácter iónico promueve el carácter polielectrolítico de las cadenas HPMC. Esta sinergia de HPMC-SDS mejora la humectabilidad de los cristales de naproxeno (Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009). Sin embargo, la formulación con SDS al 12% no aumentó la velocidad de disolución en comparación con la formulación FS-10% ($P > 0.05$). Estos resultados nos indican que la mejora en la velocidad de disolución con la incorporación de SDS se da con una adición máxima de alrededor del 10% de SDS; y que agregando más surfactante no se mejora la humectación de las partículas de naproxeno dispersas en el medio de disolución.

En la figura 22 también se representa el perfil de disolución del NAP Na materia prima, el cual presenta en tiempos cortos (30 min), un perfil de disolución intermedio. Los datos del NAP Na presentan mucha mayor variabilidad en los porcentajes de disolución del fármaco en comparación con las formulaciones de SDS. Esta gran variabilidad "in vitro" para NAP Na podría explicar la mayor variabilidad entre sujetos observada para T_{max} en diferentes estudios farmacocinéticos de naproxeno sódico en humanos (Choi, H.G. et al, 2015).

Se comparó las formulaciones FS-10% y NAP Na y se observó una mejora significativa ($P < 0.05$) en las formulaciones con surfactante comparadas con las formulaciones que utilizan la sal sódica del naproxeno. Así los porcentajes a los 30 minutos para el NAP Na y FS-10% fueron de $(61,54 \pm 4.59\%$ y $77.99 \pm 0,90\%$ respectivamente).

4.5. DISCUSIÓN FINAL:

La adición de diferentes excipientes ha hecho que se mejoren las características del naproxeno base materia prima.

Los diferentes métodos utilizados para la caracterización de las fórmulas: microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido han sido imprescindible para conocer las propiedades de las formulaciones y los cambios que iban experimentando éstas al cambiar los excipientes y sus proporciones. Estas pruebas de caracterización ayudaron a entender y seleccionar las mejores formulaciones. Además, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, colaboré en otros estudios que me ayudaron a comprender y utilizar mejor las diferentes técnicas para la caracterización y el desarrollo de ensayos “in vitro” (Benavent, C. et al, 2019).

La realización de estudios con cantidades crecientes de cada excipiente permitió seleccionar la cantidad de HPMC, croscarmelosa sódica y SDS más adecuada para aumentar la disolución del naproxeno. La incorporación de cada uno de estos excipientes en un determinado porcentaje mejoró la velocidad de disolución del naproxeno.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de velocidad de disolución han permitido seleccionar la mejor formulación (FS-10%). El mayor perfil de disolución de la formulación de FS-10% y su baja variabilidad podría explicarse por la presencia de interacciones poliméricas de HPMC-SDS que evitan la aglomeración hidrofóbica de los cristales de naproxeno. Estos resultados de la formulación FS-10% permiten mejorar distintas características de la formulación, como el aumento del área de contacto sobre la superficie y su humectabilidad. Los estudios de velocidad de disolución han sido muy útiles para conocer los porcentajes de disgregante y surfactante para obtener concentraciones más elevadas de principio activo al comienzo de la disolución.

En estos estudios, la formulación FS-10% es una buena candidata para un rápido inicio del efecto terapéutico con baja variabilidad, característica particularmente importante en los ataques agudos de migraña.

A la vista de estos estudios se selecciona la formulación FS-10%, para sus posteriores estudios en animales. Con esta finalidad, a continuación, se procede al desarrollo y validación de un método analítico, a través del cual se pueda cuantificar la concentración de naproxeno en diferentes muestras biológicas.

Por último, destacar que los estudios de esta parte de la experimentación, junto con otros de la parte experimental 3, dieron como resultado una publicación internacional.

(Ver Anexo I).

4.6. BIBLIOGRAFÍA:

- Benavent, C., García-Herrero, V., Torrado, C., Torrado-Santiago, S. (2019). Nystatin antifungal micellar systems on endotracheal tubes: development, characterization and in vitro evaluation. *Die Pharmazie*, 74(1), 34–38.
- Bond, A.D., Cornett, C., Larsen, F.H., Qu, H., Rajjada, D., Rantanen, J., (2014). Structural basis for the transformation pathways of the sodium naproxen anhydrate- hydrate system. *IUCr J.* 20, 328–337.
- Bose, S., Schenck, D., Ghosh, I., Hollywood, A., Maulit, E., Ruegger, C., (2012). Application of spray granulation for conversion of a nanosuspension into a dry powder form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 35–43.
- Censi, R., Rascioni, R., Di Martino, P., (2015). Changes in the solid state of anhydrous and hydrated forms of sodium naproxen under different grinding and environmental conditions: evidence of the formation of new hydrated forms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 92, 192–203.
- Cheow, W.S., Kiew, T.Y., Yang, Y., Hadinoto, K., (2014). Amorphization strategy affects the stability and supersaturation profile of amorphous drug nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5, 1611–1620.
- Choi, H.G., Jeon, J.Y., Kwak, S.S., Kim, H., Jin, C., Im, Y.J., Kim, E.Y., Wang, H.M., Kim, Y., Lee, S.Y., Kim, M.G., (2015). Pharmacokinetic comparison study of a combination containing 500 mg of Naproxen and 20 mg of Esomeprazole: a randomized single-dose, 2-way crossover, open-label study in healthy Korean men. *Clin. Ther.* 1, 83–93.
- Di Martino, P., Barthélémy, C., Palmieri, G. F., Martelli, S. (2001). Physical characterization of naproxen sodium hydrate and anhydrate forms. *European journal of pharmaceutical sciences*, 14 (4), pp. 293-300
- ICH Harmonized Tripartite Guideline (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1), Geneva, 2005.

[https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)

[Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)

- Joiris, E., Di Martino, P., Malaj, L., Censi, R., Barthélémy, C., Odou, P. (2008). Influence of crystal hydration on the mechanical properties of sodium naproxen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (1), pp. 345-356.
- Kumar, S., Burgess, D.J., (2014). Wet milling induced physical and chemical instabilities of naproxen nano-crystalline suspensions. *Int. J. Pharm.* 466, 223–232.
- Li, H., Thompson, M.R., O'Donnell, K.P., (2015). Examining drug hydrophobicity in continuous wet granulation within a twin screw extruder. *Int. J. Pharm.* 496, 3–11.
- Maghsoodi, M., Taghizadeh, O., Martin, G.P., Nokhodchi, A., (2008). Particle design of naproxen-disintegrant agglomerates for direct compression by a crystallo-coagglomeration technique. *Int. J. Pharm.* 351, 45–54.
- Matji, A., Carvajal, L., Conde, F., Peña, M.A., Donato, N., Serrano, D.R., Torrado, J.J., (2017). Effect of the characteristics of raw material ibuprofen on roller compaction and dissolution. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 30, 1–8.
- Mishra, B., Sahoo, J., Dixit, P.K., (2015). Formulation and process optimization of naproxen nanosuspensions stabilized by hydroxy propyl methyl cellulose. *Carbohydr. Polym.* 127, 300–308.
- Silva, S., Antunes, F.E., Sousa, J., Valente, A., Pais, A., (2011). New insights on the interaction between hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulfate. *Carbohydr. Polym.* 86, 35–44.
- Tian, F., Zhang, F., Sandler, N., Gordon, K.C., McGoverin, C.M., Strachan, C.J., Saville, D. J., Rades, T., (2007). Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 466–474.

- Tiong, N., Elkordy, A.A., (2009). Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 373–384.
- Zerrouk, N., Mennini, N., Maestrelli, F., Chemtob, C., Mura, P., (2004). Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. *Eur J. Pharm Biopharm.* 57, 93–99

V. PARTE EXPERIMENTAL 2:
DESARROLLO DE UN
MÉTODO ANALÍTICO PARA
EL ANÁLISIS DE
NAPROXENO EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS.

V. PARTE EXPERIMENTAL 2: DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE NAPROXENO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

5.1. INTRODUCCIÓN:

Una vez se desarrollaron varias formulaciones de naproxeno y tras sus respectivas caracterizaciones y pruebas de velocidad de disolución, se concluyó cuál de ellas era la mejor de todas, en este caso la formulación FS-10%.

Esta formulación tiene buenas características y buen perfil de disolución “in vitro”, por tanto, el siguiente paso en la investigación será probar esa misma formulación “in vivo” para tratar los ataques agudos de migraña. Para estos estudios “in vivo”, se realizarán análisis de diferentes muestras biológicas (plasma, cerebro, suero...) y para eso, lo primero será desarrollar un método analítico reproducible, rápido y fiable.

Para la realización de los estudios “in vivo” se estimó que había que analizar tanto el plasma como el cerebro de los animales; por tanto, el método analítico a desarrollar tiene que ser muy preciso, ya que las concentraciones de naproxeno en cerebro son muy bajas.

Existen varios métodos para determinar el naproxeno en muestras de plasma (Yilmaz, B. et al, 2014; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009; Della Rocca, G. et al, 2014; Sakaguchi, Y. et al, 2011; Rezk, M.R. et al, 2014) y tejido cerebral (Ruiz-Ángel, M.J. et al, 2010). El empleo de la fluorescencia nativa del naproxeno puede utilizarse para cuantificar un rango bajo de concentraciones, adecuada para determinar las concentraciones de naproxeno en el cerebro. La fluorescencia nativa de muchas materias primas además se aumenta mediante el uso de micelas de diferentes surfactantes (catiónicos, no iónicos e iónicos) (Silva, R.A. et al, 2008). Hay estudios que muestran que estos sistemas micelares o submicelares mejoran la intensidad de los compuestos de débil fluorescencia, como es el caso del naproxeno.

Por ese motivo, un método HPLC submicelar con monómeros de surfactantes en la fase móvil, producirá el recubrimiento de tensioactivos en la fase estacionaria (Ruiz-Ángel,

M.J. et al, 2009; Belal, F. et al, 2018). Este método puede ser adecuado para este proceso, ya que podría aumentar la intensidad de la fluorescencia del naproxeno (Silva, R.A. et al, 2008). Se sabe además que en presencia de $\geq 60\%$ de acetonitrilo en la fase móvil, la absorción parcial del tensioactivo no se produce (Ruiz-Ángel, M.J. et al, 2010; Ortiz-Bolsico, C. et al, 2015). En cambio, con proporciones de acetonitrilo entre 40 y 60%, este método podría tener ventajas en términos de eficiencia, forma del pico, selectividad y tiempo de análisis frente a otros métodos como el de la fase invertida (RP-HPLC) (Hadjmohammadi, M. R. y Nazari, S.J.S.S., 2013).

Las concentraciones que se darán en las muestras de cerebro serán bajas, por ese motivo debemos de intentar obtener los niveles de respuesta más altos posibles. Conocemos que con tensioactivos aniónicos como el SDS (Yilmaz, B. et al, 2014; Zidan, D.W. et al, 2018; Eid, M. et al, 2017; Petr, J., 2017) y sistemas micelares con surfactantes no iónicos como el Tween 80 (T 80) (Mohamed, A.I. et al, 2016) o Cremophor RH 40 (RH 40) (Zidan, D.W. et al, 2018; Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009), se mejora la solubilidad de fármacos poco solubles. Por tanto, aprovecharemos el desarrollo de este método analítico para probar nuestra formulación (FS-10%) y además probar otras 2 formulaciones en iguales proporciones que la elegida, pero con Tween 80 y Cremophor RH 40. Con este procedimiento evaluamos distintos sistemas micelares con diferentes surfactantes frente a nuestra formulación FS-10%.

Por todos estos motivos, se decidió desarrollar un método HPLC submicelar con detección por fluorescencia para la cuantificación de naproxeno en muestras biológicas validado por las directrices de la ICH; y además aplicar este método de análisis para terminar de seleccionar un sistema micelar (Tween, Cremophor o SDS) que nos permita obtener las concentraciones más altas de naproxeno en cerebro.

5.2. MATERIALES:

5.2.1. Productos y reactivos:

En estos estudios se utilizarán los siguientes productos y reactivos:

- Naproxeno de Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China).
Donado por HC Clover.
- Croscarmelosa sódica producida por FMC (Philadelphia, USA).
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de (Methocel E15LV) (Dow Chemical),
- Lauril sulfato sódico (SDS) obtenido por Sigma (Copenhagen, Denmark).
- Tween® 80 (T 80), Cremophor® RH 40 (RH 40), de Sigma® (Munich, Germany).
- Tramadol de laboratorios Normon® (Tres cantos, Madrid, Spain).
- Carboximetilcelulosa (CMC 1000) obtenida por Sigma (Copenhagen, Denmark).
- Ácido acético glacial para HPLC (purity >99.8%) de Panreac® (Barcelona, Spain).
- Acetonitrilo grado HPLC por Scharlau® (Barcelona, Spain).
- Agua obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Billerica, USA).
- Filtros Millipore® HVLP 45 µm filter (Millipore Iberica, Madrid, Spain).

Todos los reactivos y químicos utilizados tenían grado analítico.

5.2.2. Animales:

- 24 ratones adultos machos de la especie BALB/c.

5.2.3. Aparatos y equipos de laboratorio:

- Tamices de diferentes diámetros.
- Estufa Memmert.
- Congelador
- Material de vidrio.
- Pequeño aparataje de laboratorio.
- Agitador Vortex.

- Agitador magnético-calefactor RCT basic. Ika Labortechnik (Germany).
- Morteros de ágata.
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Balanza Microanalítica Sartorius M5P Serie 30303388.
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.
- HPLC Agilent® 1100 equipado con un detector de fluorescencia Agilent® G1321A (Agilent Technologies, Madrid, Spain) multi-longitud de onda λ .
- Columna Zorbax® SB C-8 250 x 4,6 mm, 5 μ m. (Agilent Technologies, Madrid, Spain).
- Centrífuga (Hettich Universal 32, Tuttlingen, Germany).
- Concentrador de muestras Savant® SpeedVac Concentrator. (Holbrook, USA).

5.2.4. Tratamiento de los datos:

Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA).

5.3. MÉTODOS:

5.3.1. Estudios de solubilidad en Fases móviles submicelares:

Para conocer la solubilidad, se colocan cantidades elevadas de naproxeno dentro de viales con 5 mL de solución de las diferentes fases móviles submicelares (SDS, Tween y Cremophor). Los frascos se sellan y se almacenan a una temperatura constante (25°C), y se someten a agitación durante 24 h hasta que el equilibrio es evidente. Después de las 24h, las suspensiones se centrifugan a 15 000 rpm durante 15 min. Una vez centrifugadas, las muestras se diluyen con acetonitrilo y se analizan por metodología HPLC para poder conocer las respectivas concentraciones de naproxeno. Con este estudio se puede saber cuál de los 3 sistemas micelares es más afín al naproxeno, es decir, en cual hay mejor solubilidad. Se realizan estudios estadísticos comparativos entre las concentraciones de naproxeno por la prueba t de student y se consideran valores significativos aquellos en los que $p < 0,05$.

5.3.2. Condiciones cromatográficas:

El equipo utilizado para llevar a cabo la metodología fue un sistema de cromatografía líquida Agilent® 1100 (Madrid, España) equipado con un detector de señal fluorescente Agilent® G1321A multi-longitud de onda λ . Este equipo se utilizó para el análisis de HPLC de las muestras biológicas. La longitud de onda de excitación del detector de fluorescencia se fijó a 280 nm y las longitudes de onda de emisión se fijaron en 310 nm (estándar interno) y 360 nm (naproxeno), respectivamente. La columna que se utilizó para los procesos de separación fue una columna Zorbax® SB-C8 (Agilent Technologies, Madrid, España) 250 × 4,6 mm, 5 μ m. Las fases móviles estudiadas consisten en tres soluciones diferentes con 2% de ácido acético y proporciones de acetonitrilo/agua (40:60, 50:50 y 60:40, v/v). Así, el estudio submicelar comprende un total de 9 fases móviles. Esto se debe a las 3 proporciones variables de la fase móvil y a los 3 tipos de tensioactivo. Estos tensioactivos tuvieron unas concentraciones de 0,007 M SDS, 0,0008 M RH 40 y 0,0015 M T 80, que se obtuvieron pesando el 0,2% (p/v) de

cada tensioactivo y disolviendo en solución acuosa (2% ácido acético). El análisis de las muestras se realizó con un flujo de 1,0 mL/min durante un tiempo total de 10 min. Una vez completado el análisis, el sistema cromatográfico fue lavado usando un gradiente lineal de 2% de ácido acético/ACN.

5.3.3. Validación del método:

Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación. Las soluciones madre de naproxeno se prepararon disolviendo en una cantidad de metanol para obtener una concentración final de 0,2 mg/mL. Esta será la solución patrón a partir de la cual se desarrolla las rectas de calibrado.

Las muestras de calibración se prepararon de manera diferente dependiendo del tipo de muestra biológica, plasma o cerebro, ya que las concentraciones que se van a obtener son diferentes. Para plasma se hizo una recta de 8 puntos con concentraciones que fueron desde 2,7 a 16,3 $\mu\text{g/mL}$ y para las de cerebro también se hizo una recta de 8 puntos con concentraciones desde 0,21 a 2,38 $\mu\text{g/g}$. Todas estas muestras se prepararon mediante la adición a muestras de plasma y cerebro de ratón sin principio activo, con la cantidad apropiada de naproxeno.

Todos los estándares de calibración (puntos de la recta) se prepararon añadiendo 100 μL de la mezcla de solución de trabajo estándar en los que se encuentra el naproxeno correspondiente para cada muestra, 450 μL de acetonitrilo y 100 μL de muestra de plasma o cerebro de ratón blanco (sin fármaco). Una vez mezcladas, se filtraron a través de filtros 45 μm Millipore® HVLP filter (Millipore Iberica, Madrid) y se inyectaron en el HPLC para su análisis.

Las muestras de CC (control de calidad) se prepararon añadiendo 100,0 μL de mezcla de solución de trabajo estándar en los que está el naproxeno, a 100,0 μL de plasma y cerebro (sin principio activo). Estos controles de calidad (CC) se hicieron a tres concentraciones diferentes (control de calidad bajo, medio y alto). Para el plasma las

concentraciones fueron (9,23; 12,30 y 15,37 $\mu\text{g/mL}$), y otras tres concentraciones diferentes para cerebro (0,54; 0,72 y 0,90 $\mu\text{g/g}$). Las muestras de (CC) se mezclaron con 450 μL de acetonitrilo para verificar la integridad del método.

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. La linealidad del ensayo bioanalítico para los compuestos del ensayo, se evaluó a través de una recta de calibración de ocho puntos con plasma o cerebro, preparados y ensayados en 3 días consecutivos. Se realizó un análisis de regresión con un factor de ponderación de $1/x^2$ para evaluar la linealidad y generar las ecuaciones de calibración estándar. Se determinaron el límite de detección (LD) más bajo y el límite de cuantificación (LC) más bajo aplicando ICH Q2 (R1) (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005), que puede ser cuantitativamente determinado con una precisión del 15% (Martins, S.M. et al, 2012).

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. El objetivo de la validación de este procedimiento analítico es poder demostrar que es apto para el propósito que buscamos. Las características analíticas típicas en la validación son: linealidad, especificidad, límite de detección, límite cuantificación, precisión y exactitud.

5.3.4. Especificidad:

La especificidad del ensayo fue investigada mediante el análisis de muestras controles de seis lotes independientes de plasma y cerebro, siguiendo las directrices de la ICH Q2 (R1) (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005).

5.3.5. Estándar interno:

El uso del estándar interno (EI) se hizo para evitar y detectar posibles errores en el análisis del naproxeno. El estándar interno es una sustancia que se añade a todas las muestras y estándares, en una cantidad conocida, y que además tiene que tener cantidad suficiente para poder ser determinado sin producir ningún tipo de interferencia en el análisis.

En este estudio se probaron diferentes principios activos como el ibuprofeno, atenolol o tramadol, pero se decidió usar como estándar interno el Tramadol, ya que la señal de emisión es comparable a la del naproxeno, pero ocurre a diferente longitud de onda, por lo que se pueden analizar ambos fármacos sin problemas de interferencias espectrales. Al llevar a cabo el análisis de la muestra, se determina simultáneamente la lectura de emisión del naproxeno y del tramadol.

En todas las muestras, tanto cerebrales como plasmáticas se añadió una concentración constante de tramadol, esta concentración fue 1 µg/ml.

5.3.6. Exactitud y precisión:

La exactitud y la precisión intra-lote se determinaron mediante el análisis de seis réplicas de muestras de control de calidad (CC) a tres concentraciones diferentes para el plasma (9,23; 12,30 y 15,37 µg/mL), y otras tres concentraciones diferentes para cerebro (0,54; 0,72 y 0,90 µg/g). Estos análisis se hicieron durante 3 días consecutivos. La exactitud intra- e inter-días fue expresada con su error relativo (ER) mientras que la precisión intra- e inter-días fue expresada con su desviación estándar relativa (DER) (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005).

5.3.7. Recuperación:

La recuperación se calculó comparando la concentración obtenida de la inyección directa en la fase móvil de una solución de principio activo con una concentración conocida (100%); frente a la concentración que dio una muestra de plasma o cerebro

con la misma concentración de principio activo. El porcentaje de recuperación se determinó comparando las concentraciones que dieron tres muestras de control de calidad CC (9,23; 12,30 y 15,37 $\mu\text{g/mL}$) para muestras de plasma y (0,54; 0,72 y 0,90 $\mu\text{g/g}$) para muestras de cerebro, con los estándares extraídos que contenían la misma cantidad de principio activo.

5.3.8. Parte "in vivo":

5.3.8.1. Formulaciones de agentes tensioactivos para estudios "in vivo":

Para la preparación de las formulaciones con agentes tensioactivos para los estudios "in vivo", lo que se hizo fue seguir el método de elaboración utilizado en la primera parte de la experimentación.

En la siguiente tabla se pueden ver las formulaciones creadas con su respectivo nombre y las proporciones de cada excipiente.

Tabla 13. Composición de las formulaciones utilizadas en los ensayos.

Código formulación	Naproxeno	HPMC (%)	Croscarmelosa sódica (%)	SDS (%)	Cremophor RH 40 (%)	Tween 80 (%)
NAP-MP	100mg	0	0	0		
NAP:SDS	100mg	1,5	10	10	0	0
NAP:RH 40	100mg	1,5	10	0	10	0
NAP:T 80	100mg	1,5	10	0	0	10

Hay que tener en cuenta que los % de los excipientes son con respecto al naproxeno y no al % total en la formulación. Por ejemplo, para la formulación NAP:SDS, por cada 100mg de naproxeno habrá 1,5mg de HPMC, 10mg de croscarmelosa sódica y 10mg de SDS.

Formulación NAP-MP:

El naproxeno base materia prima (NAP-MP) no tiene ningún excipiente y lo único que se hizo para la obtención de esta fórmula fue tamizar 750mg de naproxeno base a través de un tamiz de 0,840 mm y desechar las partículas que pasan por un segundo-tamiz de luz 0,297mm, trabajando sólo con la fracción de naproxeno entre 0,840-0,297mm. El producto resultante se guardó para los diferentes ensayos.

Formulación NAP:SDS:

La formulación NAP:SDS es la misma que en la parte experimental 1 llamamos fórmula tensioactiva o formulación surfactante (FS-10%). Esta formulación va a contener 1,5% de aglutinante (HPMC), 10% de disgregante (croscarmelosa sódica) y un 10% de tensioactivo (SDS). El lauril sulfato sódico (SDS) se va a incorporar a la formulación en la solución aglutinante, es decir, se va a añadir 75mg de SDS a una solución acuosa que contiene un 2% de HPMC (p/v) que se somete a agitación durante 24 h. El procedimiento a seguir fue por granulación húmeda, la cual se realizó mezclando 750 mg de naproxeno con 75 mg del disgregante, y luego se agregó 560 microlitros de la solución aglutinante que contenía tanto HPMC como SDS. Después de mezclarlo, la masa húmeda fue tamizada a través de un tamiz de 0,840 mm y los gránulos se secaron en estufa a 60°C durante 48 h. El producto final fue tamizado para aislar la fracción de 0,840-0,297 mm como las formulaciones anteriores.

Formulación NAP:RH 40:

La formulación tensioactiva o formulación surfactante NAP:RH 40 va a contener además del 1,5% de aglutinante (HPMC) y 10% de disgregante (croscarmelosa sódica) un 10% de tensioactivo, que en este caso es el cremophor RH 40. Este tensioactivo se va a incorporar a la formulación a través de la solución aglutinante, es decir se va a añadir 75mg de cremophor RH 40 (previamente calentado*) a una solución acuosa que contiene un 2% de HPMC (p/v) y que se agita. Al igual que la anterior formulación, se

hace por granulación húmeda, mezclando 750 mg de naproxeno con 75 mg del disgregante, y luego se agregó la solución aglutinante que contenía tanto HPMC como cremophor RH 40. Después de mezclarlo, la masa húmeda fue tamizada a través de un tamiz de 0,840 mm y los gránulos se secaron en estufa a 60°C durante 48 h. El producto final fue tamizado para aislar la fracción de 0,840-0,297 mm como las formulaciones anteriores.

Formulación NAP:T 80:

La formulación tensioactiva o formulación surfactante NAP:T 80 va a contener además del 1,5% de aglutinante (HPMC) y 10% de disgregante (croscarmelosa) un 10% de tensioactivo, que en este caso es el Tween 80. Este tensioactivo se va a incorporar a la formulación a través de la solución aglutinante, es decir se va a añadir 75mg de tween (previamente calentado*) a una solución acuosa que contiene un 2% de HPMC (p/v) y que se agita. Al igual que las anteriores formulaciones, se hace por granulación húmeda, mezclando 750 mg de naproxeno con 75 mg del disgregante, y luego se agregó la solución aglutinante que contenía tanto HPMC como tween 80. Después de mezclarlo la masa húmeda fue tamizada a través de un tamiz de 0,840 mm y los gránulos se secaron en estufa a 60°C durante 48 h. El producto final fue tamizado para aislar la fracción de 0,840-0,297 mm como las formulaciones anteriores.

*Para las formulaciones en las que estén presentes el tween 80 o el cremophor 40, estos tensioactivos deberán ser tratados previamente (fusión a baño maría), ya que, a temperatura ambiente se encuentran en estado sólido y no pueden incorporarse homogéneamente a la formulación.

5.3.8.2. Preparaciones de muestras de plasma y cerebro:

Para poder llevar a cabo los estudios "in vivo" se compraron veinticuatro ratones. Los ratones eran machos adultos de la especie BALB/c, con 8 semanas de edad y tenían un peso corporal de 18-24 g. Todos los animales fueron comprados en Harlan Interfauna,

Barcelona, España. El desarrollo de estos experimentos con animales fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Alcalá, Madrid, España (ES28005000 1165).

Para estos ensayos se utilizaron las 4 formulaciones distintas anteriormente preparadas: NAP-MP, NAP:T 80, NAP:RH 40 y NAP:SDS. El naproxeno base se utilizó como referencia (NAP-MP) y las otras 3 formulaciones sirvieron para estudiar los sistemas micelares con tres surfactantes diferentes: NAP:T 80, NAP:RH 40 y NAP:SDS. Todas las formulaciones se administraron a los animales por vía oral a través de una sonda buco-gástrica. Para la administración de la dosis a los ratones se preparó una suspensión de carboximetilcelulosa al 0,50% que fue utilizada como vehículo para las formulaciones. La cantidad de formulación correspondiente a 5 mg/kg de naproxeno se resuspendió en 0,3 mL de solución de carboximetilcelulosa justo antes de su administración a cada ratón. Para obtener las diferentes muestras biológicas, a los diferentes tiempos, se anestesió a los 6 ratones por grupo, utilizando una inyección de uretano al 15%. Los animales fueron anestesiados para el procedimiento de toma de muestras de sangre y posterior sacrificio por dislocación cervical. Cada muestra de sangre (aproximadamente 1,5 mL) se recogió por punción cardiaca en viales heparinizados y después se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min para obtener el plasma. Para las muestras de cerebro, los cerebros fueron extirpados después de la eutanasia de los ratones, pesados, lavados con 0,5 mL de solución salina y homogenizados durante 1 min. Las muestras de plasma y los tejidos homogeneizados fueron almacenados a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción (García-Herrero, V. et al, 2017).

5.3.8.3. Análisis de las muestras:

Para la cuantificación del plasma, se descongelaron las muestras y se tomaron alícuotas de plasma de 200 μL . A cada muestra se le adicionó 50 μL de solución de estándar interno (tramadol al 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta solución se mezcla con 450 μL de acetonitrilo en un mezclador vortex por 2 min, luego se centrifugó todo a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó de nuevo a 5000 rpm durante 5 minutos,

después de esta segunda centrifugación, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro HVLP Millipore® de 45 µm (Millipore Iberica, Madrid, España) y se determinaron por el método de fluorescencia HPLC.

Para cuantificar las muestras de cerebro, 200 µL del tejido homogéneo de cerebro se trató de la misma manera que las muestras de plasma. El sobrenadante de la última extracción se concentró a 50°C durante 2 h en el concentrador (Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA).

Una vez concentradas las muestras, se añadieron 200µL de fase móvil a cada tubo y se mezcló con vortex durante 2 minutos a 2200 rpm. La muestra fue filtrada través de un filtro HVLP Millipore® de 45 µm (Millipore Iberica, Madrid, España) antes del análisis por HPLC. El naproxeno se determinó por el método de fluorescencia HPLC. Los estudios estadísticos comparativos de las diferentes formulaciones se hicieron usando la prueba de T de student por parejas. Un valor $p < 0,05$ se consideró significativo.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.4.1. Elección de la fase móvil:

5.4.1.1. Adsorción de los tensioactivos en la fase estacionaria. Solubilidad:

Los surfactantes se añaden a las fases móviles hidro-orgánicas para mejorar la fluorescencia nativa del naproxeno, provocando además un tiempo de retención muy reducido. En el desarrollo de este método se han estudiado fases móviles submicelares con diferentes porcentajes de ACN (40, 50 y 60%) y además con diferentes surfactantes. (Ortiz-Bolsico, C. et al, 2015).

Se hicieron unos estudios de solubilidad de naproxeno en todas las posibles fases móviles, tanto en la fase móvil hidro-orgánicas, como en las fases móviles submicelares (T 80/ACN, RH 40/ACN y SDS/ACN), las 4 fases con las diferentes proporciones de 2% de ácido acético/agua/ACN (60:40, 50:50 y 40:60). Todos los resultados se pueden ver en la siguiente tabla.

Tabla 14. Solubilidad del naproxeno ($\mu\text{g/mL}$) en las diferentes fases móviles: fase móvil hidroalcohólica Agua/ACN y las fases móviles con soluciones acuosas ácidas/ACN: H₂O/ACN, T 80/ACN, RH 40/ACN y SDS/ACN. Estos estudios se realizan en proporciones: 60:40, 50:50 y 40:60.

Fases Móviles	2% ácido acético/ACN 60:40	2% ácido acético/ACN 50:50	2% ácido acético/ACN 40:60
Sin surfactantes	80,77 \pm 4,65	299,75 \pm 6,08	475,74 \pm 5,19
SDS	121,71 \pm 4,47* (p=0,0003)	345,61 \pm 8,22* (p=0,0021)	473,29 \pm 7,94
RH 40	101,61 \pm 2,95* (p=0,0060)	344,40 \pm 9,76* (p=0,0029)	466,27 \pm 7,00
T 80	89,33 \pm 2,95	324,29 \pm 9,68* (p=0,0082)	450,85 \pm 9,49

* Diferencia significativa frente a la fase sin surfactante (p < 0,05).

Las fases móviles con altas proporciones de ACN (40:60) mostraron los valores más altos de solubilidad, pero no se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre la fase móvil hidro-orgánica sin surfactante y las diferentes fases móviles con los sistemas submicelares. Estos resultados indican que los sistemas submicelares se interrumpen a una concentración del 60% de ACN v/v. El aumento de la solubilidad del naproxeno está relacionado sólo con la alta proporción de ACN en la fase hidro-orgánica, que en este caso es del 60%.

Las solubilidades de naproxeno en las fases 50:50 fueron un poco menores que en las del 40:60, pero sin embargo, todas las fases móviles submicelares intermedias (50:50) mostraron una mayor solubilidad de naproxeno (véase la tabla 14) en comparación con la que no tiene surfactante ($p < 0,05$). Estos resultados de solubilidad confirman la presencia de estructuras submicelares en estas fases móviles de soluciones acuosas de surfactante-orgánicas (50:50).

Finalmente, las proporciones más bajas de ACN en la fase móvil (60:40) permitieron la formación de algunas estructuras submicelares estables. El tensioactivo aniónico SDS en la fase móvil submicelular (60:40) es el que mayor la solubilidad de naproxeno tiene ($121,71 \pm 4,47 \mu\text{g/mL}$). En esta fase móvil submicelular (60:40), los demás tienen valores menores, como es el caso del surfactante no iónico Tween 80 (60:40) ($89,33 \pm 2,95 \mu\text{g/mL}$) o del que no tiene ningún tensioactivo ($80,77 \pm 4,65 \mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$). Probablemente, la baja relación molar del Tween 80 (0,0015 M) en esta fase móvil produjo una disminución de la estructura submicelar, que redujo la solubilidad del naproxeno (Mohamed, A.I. et al, 2016). El aumento de la solubilidad de naproxeno en fases móviles con solución surfactante en los ratios de ACN (50:50 y 40:60) está relacionado con la formación de fases móviles submicelares (Ortiz-Bolsico, C. et al, 2015). En estas condiciones, las fases orgánicas con 0,007 M SDS/ACN 50:50 v/v mostró una estructura submicelar con SDS similar a otros estudios (Hadjmohammadi, M. R. y Nazari, S.J.S.S., 2013).

5.4.1.2. Fluorescencia y parámetro de las fases móviles:

A raíz de estos resultados, se decidió continuar los estudios con las fases móviles intermedias, es decir, con la fase móvil hidro-orgánica 2% ácido acético/ACN (50:50) v/v; la fase móvil submicelar de tween 0,0015M, T 80/ACN (50:50) v/v; la fase móvil de cremophor 0,0008M RH 40/ACN (50:50) v/v y la fase móvil con el tensioactivo aniónico (SDS) 0,007 M SDS/ACN (50:50) v/v.

Lo siguiente que se hizo, fue realizar un barrido de las 4 fases móviles anteriormente seleccionadas para conocer la fluorescencia del naproxeno en cada una de ellas. La figura 23 muestra los diferentes barridos de fluorescencia que tiene el naproxeno en las diferentes fases móviles.

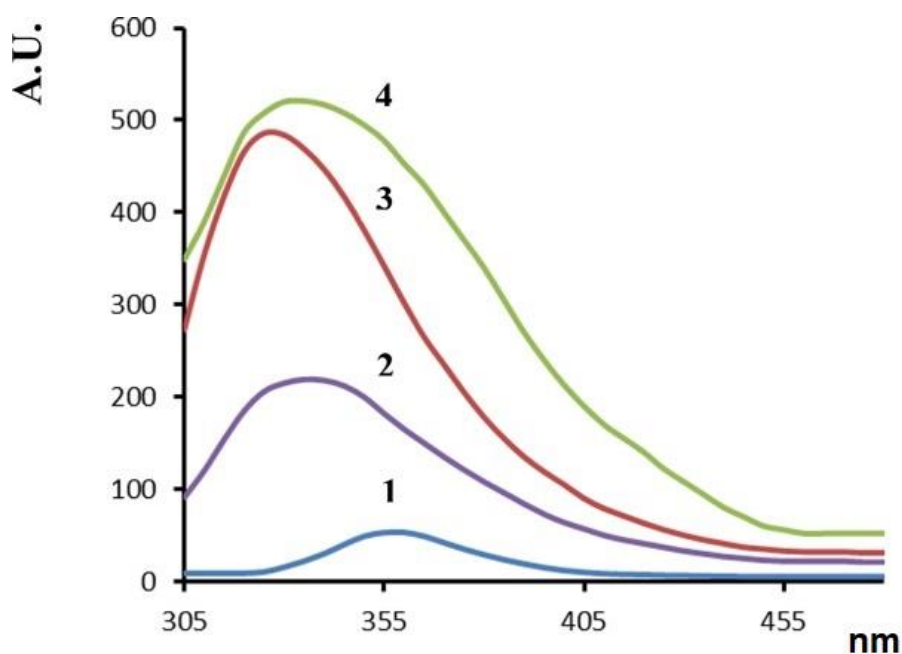


Figura 23. Barridos de fluorescencia de naproxeno en diferentes fases móviles. Línea 1: 2% ácido acético/ACN [50:50] v/v; línea 2: T-80/ACN 50:50 v/v; línea 3: RH-40/ACN (50:50) v/v y línea 4: SDS/ACN (50:50) v/v.

La línea número 1 es la fase hidro-orgánica (2% ácido acético/ACN (50:50) v/v) y el resto correspondería a las diferentes fases móviles con surfactantes.

La fase móvil hidro-orgánica 2% ácido acético/ACN (50:50) v/v (línea 1) presenta un pico de emisión máximo a 360 nm correspondiente a la fluorescencia nativa del naproxeno. La fase móvil submicelar de tween 0,0015M T 80/ACN 50:50 v/v (línea 2) muestra un ligero cambio en el pico a (335 nm), con una mejora muy notable en los valores de intensidad con respecto a la primera (4,3 veces mayor). El tensioactivo no iónico T 80 produce probablemente estructuras submicelares con un ligero aumento de la intensidad de la fluorescencia del naproxeno (Mohamed, A.I. et al, 2016). La fase móvil de cremophor 0,0008M RH-40/ACN (50:50) v/v (línea 3) tiene un pico de emisión máximo en 325 nm, con un fuerte aumento de la intensidad de la fluorescencia de naproxeno con respecto a la primera (9,9 veces) y de más del doble con la segunda. Una fluorescencia similar que aumenta con RH 40 comparada con la de T 80 ya habían sido descritas anteriormente con diferentes principios activos (Zidan, D.W. et al, 2018). La fase móvil con el tensioactivo aniónico (SDS) 0,007 M SDS/ACN (50:50) v/v (línea 4), fue la que produjo una fluorescencia mayor que el resto, siendo 10,8 veces mayor que la que no tenía ningún surfactante, y su máxima fluorescencia de emisión fue a los 335 nm. El incremento similar de la señal de fluorescencia al añadir SDS a la fase móvil se ha observado previamente con otras materias primas con fluorescencia nativa (Mostafa, A.M. et al, 2019). Estos resultados indican que las fases móviles que contiene SDS presentaron mejores resultados de fluorescencia que el resto, pero para poder seleccionar la fase móvil definitiva se debe tener en cuenta los distintos parámetros cromatográficos que se producen con las distintas fases móviles. Estos parámetros cromatográficos son los tiempos de retención, altura, anchura y simetría del pico.

Tabla 15. Tiempo de retención TR (min), Altura (LU), Simetría, Anchura (min) y platos teóricos obtenidos con las distintas fases móviles en proporciones hidro-orgánicas 50:50.

Fases Móviles	Ácido acético/ACN (50:50)	SDS /ACN (50:50)	T 80/ACN (50:50)	RH 40/ACN (50:50)
TR (min)	7,283	5,101	6,980	6,859
Altura (LU)	42,52	46,64	32,96	13,16
Simetría	0,92	0,90	0,95	0,92
Anchura (min)	0,151	0,1368	0,1872	0,1421
Platos	12866	7693	7695	6735

En estos estudios se observó una disminución en los tiempos de retención en todas las fases móviles submicelares (SDS/ACN, RH 40/ACN, y T 80/ACN) pero con diferencia, fue la fase móvil submicelar de SDS la que mostró el tiempo de retención más corto (5,10 min), mientras que la RH 40 y T 80 tuvieron tiempos de retención muy parecidos (6,86 y 6,98 min) en comparación con la fase móvil sin tensioactivo (7,28 min). Además, se observaron diferencias entre los valores teóricos de platos y anchura de picos en las diferentes fases móviles submicelares. Las fases móviles submicelares no iónicas (0,0008 M RH 40/ACN y 0,0015 M T 80/ACN) mostraron una mayor retención de los picos (6,86 y 6,98, respectivamente) y grandes anchuras de pico (0,142 y 0,187 respectivamente). Estos surfactantes no iónicos RH 40 y T 80 produjeron menos interacciones entre los monómeros submicelares con los silanoles ionizados en el sistema convencional de fase estacionaria a base de sílice, lo que conlleva una menor eficiencia. Esto podría deberse al hecho de que una parte significativa de la capa de surfactante en la fase estacionaria reduce el efecto de enmascaramiento sobre los grupos de silanol (Ortiz-Bolsico, C. et al, 2015). Sin embargo, los monómeros del SDS revelan una mayor desorción del surfactante en la fase móvil (0,007 M SDS/ACN). Así

pues, la fase móvil de SDS tuvo un pico de retención inferior (5,10 min), un ancho de pico menor (0,137 min), una mayor altura (46,64 LU) y una mejor eficiencia (valores de 7693) en comparación con las otras fases móviles submicelares. Estos resultados indican que esta fase móvil mejora la penetración de los solutos y tiene una interacción menor con las cadenas de silanol. Estos resultados posiblemente pueden deberse a una mayor asociación entre el monómero iónico del surfactante y el alquilo unido a la sílice de la fase estacionaria (Hadjmohammadi, M. R. y Nazari, S.J.S.S., 2013). El surfactante monocapa fue así parcialmente recubierto en la fase estacionaria, resultando dar tiempos de retención cortos (Ortiz-Bolsico, C. et al, 2015; Richardson, A.E. et al, 2017; Eid, M. et al, 2017; Petr, J., 2017).

Por estos resultados y motivos expuestos, la fase móvil submicelar de SDS (0,007M SDS/ACN 50:50 v/v) fue seleccionada para analizar las bajas concentraciones de naproxeno en los tejidos como el cerebro.

5.4.2. Validación del método:

5.4.2.1. Especificidad:

El método utilizó la detección por fluorescencia debido a su alta sensibilidad y la especificidad en el plasma y el tejido cerebral. A partir de los barridos de fluorescencia del estándar interno (tramadol) y del naproxeno, se seleccionaron longitudes de onda de emisión de 310 nm (EI) y 360 nm (NAP) y la misma longitud de onda de excitación para ambos 280 nm.

La figura 24 muestra el cromatograma típico de una muestra de cerebro, en donde se ve tanto el pico del tramadol (EI), con un tiempo de retención de 3,94 min, como el pico del naproxeno a los 5,10 min, utilizando la fase móvil submicelar (0,007 M SDS/ACN (50:50) v/v).

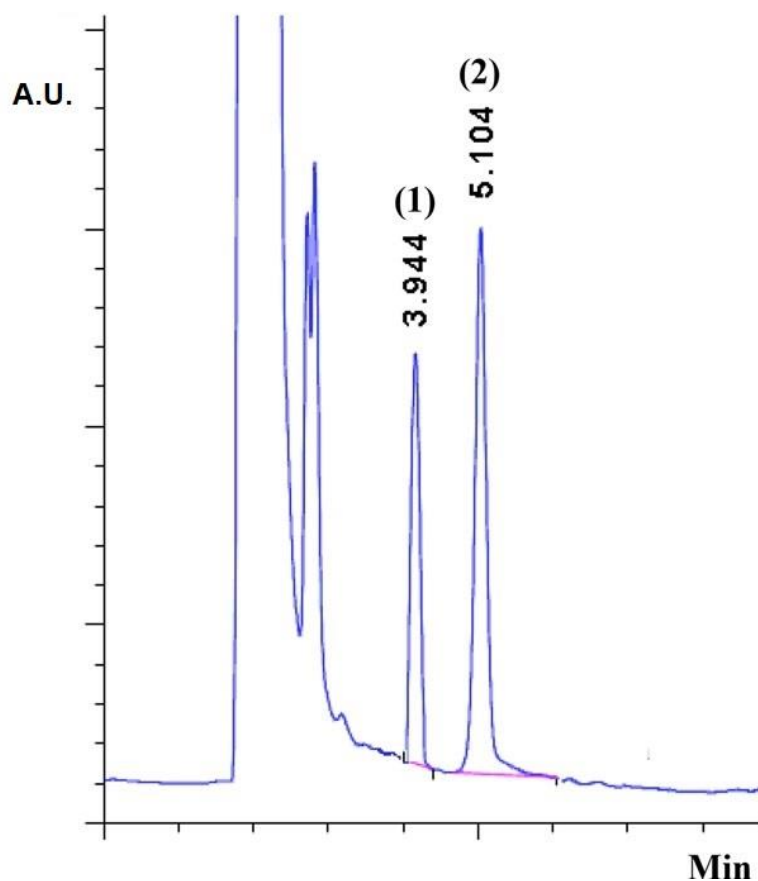


Figura 24. Cromatograma HPLC por fluorescencia de una muestra de cerebro en la que están presentes tanto el pico del estándar Interno (1) como el del naproxeno (2), con sus respectivos tiempos de retención.

La selectividad de nuestro método se evaluó comparando los cromatogramas de plasma y cerebro del grupo control, con los cromatogramas preparados introduciendo las soluciones estándar en las correspondientes muestras de blanco (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005). Esta fase móvil submicelar con detección por fluorescencia fue selectiva tanto para los métodos de plasma como para los del cerebro. No se observaron picos de interferencia de componentes endógenos del plasma o del cerebro en el tiempo de retención ni del naproxeno ni del estándar interno, o cerca de ellos, indicando la alta selectividad de este método. Esta técnica de detección por fluorescencia por HPLC con la fase móvil submicelar aumenta la fluorescencia nativa

del naproxeno (Rezk, M.R. et al, 2014; Gallo, P. et al, 2010) y fue selectiva para muestras de plasma y cerebro.

5.4.2.2. Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación:

Los parámetros de las rectas de calibración lineal se realizaron a partir del análisis estadístico de tres estudios preparados de forma independiente, de rectas de calibración de ocho puntos en muestras de plasma y cerebro.

La ecuación de regresión media para las muestras de plasma fue $y = 2886x (\mu\text{g/ml}) + 45,09$; ($R^2 = 0,997$).

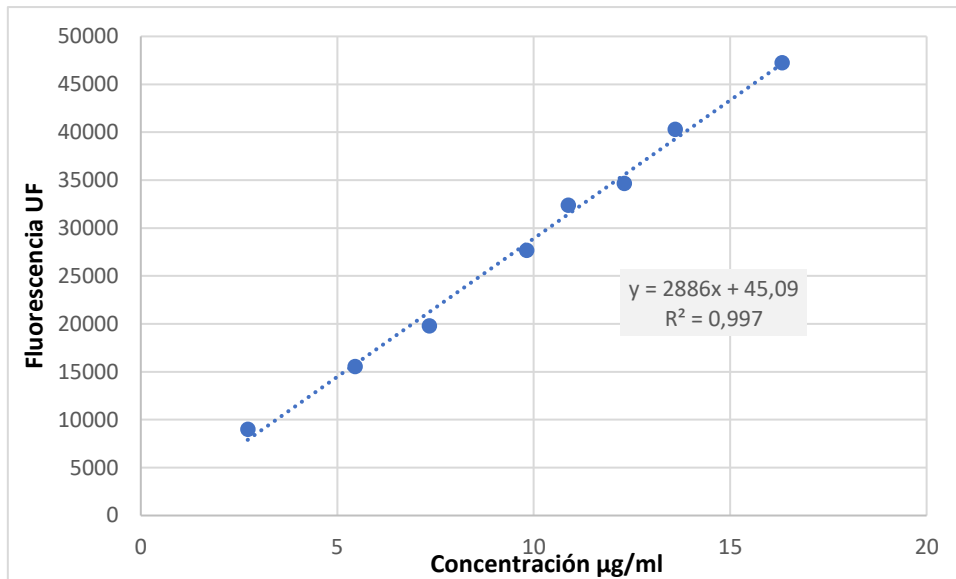


Figura 25. Recta de calibrado para las muestras de plasma.

La ecuación de regresión media para las muestras de cerebro fue $y = 151,9x (\mu\text{g/g}) + 12,50$ ($R^2 = 0,9975$).

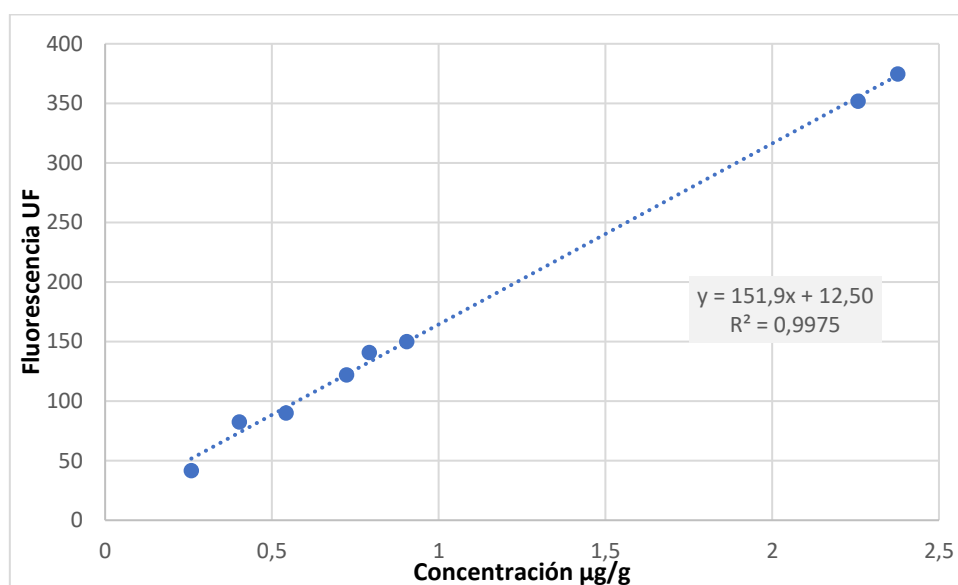


Figura 26. Recta de calibrado para muestras de cerebro.

Los ensayos fueron lineales entre 0,25 y 2,5 µg/g. Aunque existen diferentes métodos para determinar naproxeno en muestras de plasma (Della Rocca, G. et al, 2014), sólo unos pocos estudios han determinado éste en el cerebro (Sheha, M., 2012; Andersen, C.A. et al, 2017). El (LD) límite de detección de 0,08 µg/g y el (LC) límite de cuantificación de 0,25 µg/g fueron adecuados para determinar las concentraciones de naproxeno en las muestras de cerebro y sus desviaciones estándar siempre fueron >15% (Martins, S.M. et al, 2012).

5.4.2.3. Precisión y exactitud:

Para determinar la precisión y la exactitud, se realizaron análisis por triplicado para cada una de las tres concentraciones propuestas para cerebro y para plasma. Los métodos de cuantificación del naproxeno con las muestras control en plasma y el tejido cerebral se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 16. Precisión y exactitud intra e interdías de muestras de plasma.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Precisión DER (%)		Exactitud ER (%)	
	Intradías	Interdías	Intradías	Interdías
9,23	2,96	1,46	1,75	0,70
12,30	1,45	3,05	-1,00	2,86
15,37	0,74	0,24	-1,67	0,40

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje, mientras que ER (%) representa el error relativo en porcentaje frente al valor teórico.

Tabla 17. Precisión y exactitud intra e interdías de muestras de cerebro.

Concentración ($\mu\text{g/g}$)	Precisión DER (%)		Exactitud ER (%)	
	Intradías	Interdías	Intradías	Interdías
0,54	1,64	2,75	-0,43	-2,09
0,72	2,26	2,38	1,45	1,79
0,90	0,17	0,80	-0,90	-1,84

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje, mientras que ER (%) representa el error relativo en porcentaje frente al valor teórico.

La media de los valores de precisión intra e inter-día para todas las muestras de plasma presentaron una (DER) entre 0,74-2,96 y 0,24-3,05 (%) respectivamente, (estos valores fueron similares a los obtenidos por otros autores en muestras de plasma (Yilmaz, B. et

al, 2014; Yehia, A.M. y Essam, H.M., 2016). En las muestras de cerebro, la media de valores de precisión intra e inter-día presentaron una (DER) entre 0,17-2,26 y 0,80-2,75 (%), respectivamente. Estos resultados coinciden con datos previamente publicados en el cerebro (Sheha, M., 2012; Yehia, A.M. y Essam, H.M., 2016). (ver tabla 16 y 17).

La exactitud tanto en plasma como cerebro fue buena ya que el porcentaje de error relativo (ER) intra e inter-día en plasma estuvo entre -1,67 a 1,75% y de 0,40 a 2,86% respectivamente y el error relativo (ER) intra e inter-día en cerebro entre -0,90 a 1,45% y de -2,09 a 1,79% respectivamente (ver tabla 16 y 17).

5.4.2.4. Recuperación:

La recuperación se calculó comparando la concentración obtenida de la inyección directa en la fase móvil de una solución de principio activo con una concentración conocida (100%).

Tabla 18. Recuperación de las muestras de plasma con su media y desviación estándar relativa DER (%).

Recuperación		
Concentración (µg/ml)	Media (%)	DER (%)
9,23	95,09	0,56
12,30	93,33	1,83
15,37	96,64	0,48

Tabla 19. Recuperación de las muestras cerebrales con su media y desviación estándar relativa DER (%).

Recuperación		
Concentración (µg/g)	Media (%)	DER (%)
0,54	95,06	4,05
0,72	95,55	2,81
0,90	96,25	0,31

Estos valores oscilaron entre 93,33 y 96,64 y entre 95,06 y 96,25% para las muestras de plasma y de cerebro, respectivamente (Tablas 18 y 19). Además, los DER (%) obtenidos en las muestras del plasma estuvieron entre 0,48 y el 1,86% y las del cerebro entre el 0,31 y el 4,05% en todos los experimentos; estos resultados de recuperación de las muestras de cerebro fueron similares a los de otros estudios (Yilmaz, B. et al, 2014; Ruiz-Ángel, M.J. et al, 2009). Estos datos sugieren que este método tiene una excelente precisión y reproducibilidad y puede ser considerado adecuado para cuantificar naproxeno en muestras de plasma y tejidos cerebrales.

5.4.3. Análisis de muestras de plasma y muestras de cerebro en ratones:

Para el análisis de las muestras biológicas se utilizó el método HPLC submicelar con detección por fluorescencia validado en el apartado anterior.

Los análisis de plasma y de tejido cerebral se realizaron 1 h después de la administración oral de las diferentes formulaciones (NAP-MP, NAP:RH 40, NAP:T 80 y NAP:SDS) y se siguieron las condiciones y procedimientos descritos en el apartado de tratamiento de muestras biológicas de métodos. La figura 27 muestra las concentraciones de naproxeno en plasma y tejido cerebral después de la administración de las 4 formulaciones diferentes.

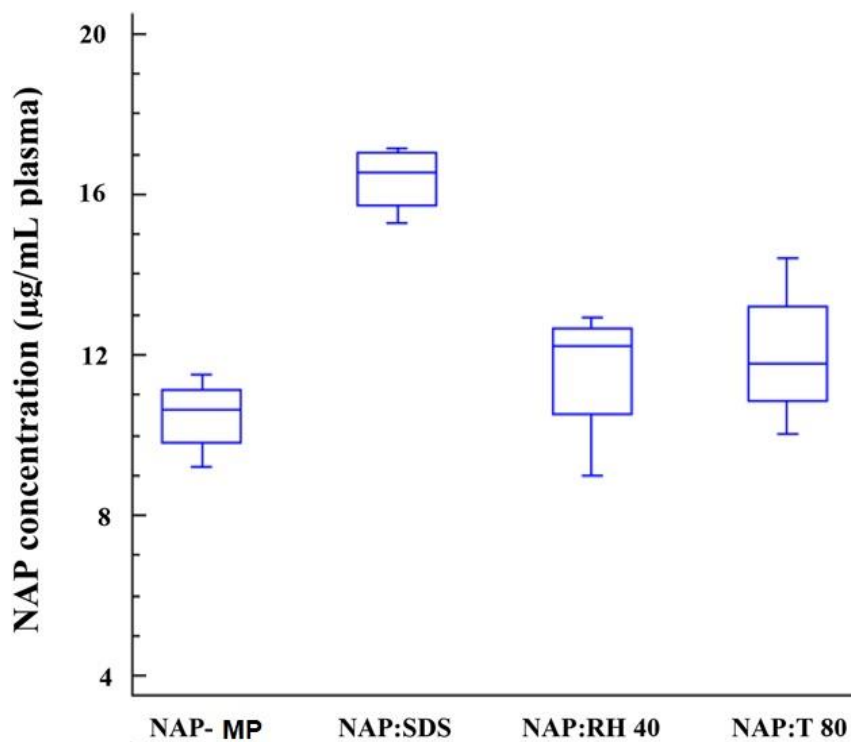


Figura 27. Concentraciones plasmáticas de naproxeno obtenidas después de la administración de las formulaciones de naproxeno materia prima (NAP-MP) y de los distintos sistemas micelares de naproxeno: (NAP:SDS), (NAP:RH 40) y NAP:T 80).

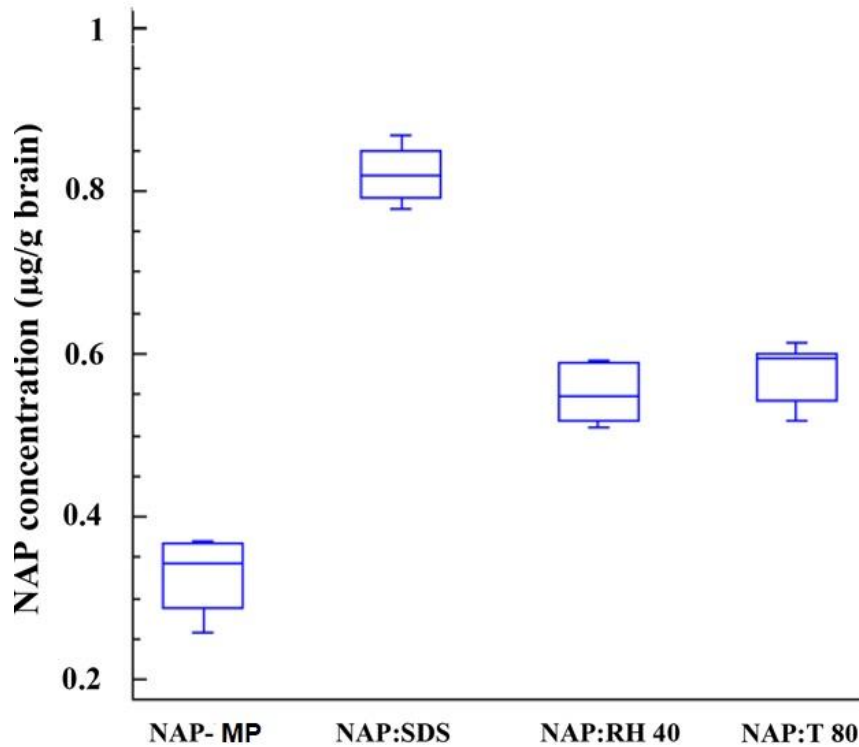


Figura 28. Concentraciones cerebrales de naproxeno obtenidas después de la administración de naproxeno (NAP-MP) y de los distintos sistemas micelares de naproxeno: (NAP:SDS), (NAP:RH 40) y NAP:T 80).

Las concentraciones para la formulación del NAP-MP fueron de $10,49 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$ y $0,33 \pm 0,039 \mu\text{g/g}$ para el plasma y el tejido cerebral, respectivamente. Estos valores fueron semejantes con los anteriores valores publicados de T_{max} y C_{max} (Yilmaz, B. et al, 2014; Sheha, M., 2012). La correlación entre las proporciones cerebro/plasma (proporciones C/P) para la NAP-MP mostraron un valor bajo (0,031) (Della Rocca, G. et al, 2014). El uso de sistemas micelares con los diferentes surfactantes produce un aumento de los valores de naproxeno en plasma y tejidos cerebrales en comparación con NAP-MP. La adición de tensioactivos en los sistemas micelares, por lo tanto, aumentó las concentraciones de naproxeno en plasma y cerebro después de 1h de la administración en el siguiente orden: NAP-MP << NAP:RH 40 < NAP:T 80 < NAP:SDS. La presencia de tensioactivos no iónicos (RH 40 y T 80) mostraron una relación C/P de 0,047 para ambas formulaciones. Las concentraciones más altas se obtuvieron con

NAP:SDS en comparación con el NAP-MP. Una hora después de la administración, las concentraciones de plasma y cerebro de NAP:SDS comparadas con las de NAP-RM fueron 1,45 y 2,52 veces, respectivamente. En este caso, la correlación entre las relaciones C/P para el NAP:SDS presentada el valor más alto en comparación con los otros surfactantes (relación C/P de 0,055). Un estudio reciente indica que los surfactantes como el T 80 fueron transferidos rápidamente desde la circulación del plasma a otros tejidos antes que al cerebro (Miyazawa, T. et al, 2015). Sin embargo, la absorción intestinal de las micelas SDS se relacionó con una mayor acumulación en el cerebro (Wang, G. et al, 2016). Por otro lado, estudios adicionales podrían ser adecuados para determinar cómo las diferentes proporciones de SDS en sistemas micelares podrían modificar la relación C/P.

Por tanto, de las 4 formulaciones estudiadas, la formulación que mejores concentraciones cerebrales y ratios C/P presentó fue la NAP:SDS, descrita en el apartado de estudios farmacotécnicos como FS-10%.

Cabe destacar que durante el desarrollo del doctorado colaboré en estudios de biodistribución de anfotericina B en distintos órganos (López-Sánchez, A. et al, 2018). Estos estudios me permitieron adquirir experiencia en la manipulación de animales de experimentación, en la obtención de muestras plasmáticas y en la extracción de órganos, que me ha sido de gran utilidad para la extracción del cerebro en los estudios de concentraciones cerebrales de naproxeno.

Para analizar las concentraciones en los distintos tejidos se observó que durante la homogenización, la cantidad de agua adicionada por órgano depende del carácter fibroso del tejido. La colaboración en los estudios de biodistribución de nuevas formulaciones de anfotericina B me permitió conocer que órganos como el cerebro y el riñón necesitan volúmenes más bajos por gramo de órgano en su proceso de homogenización, mientras que órganos como el hígado requiere mayores volúmenes

de agua por gramo de órgano por su mayor carácter fibroso (López-Sánchez, A. et al, 2018).

5.5. DISCUSIÓN FINAL:

Tras los ensayos realizados, se ha conseguido desarrollar un método analítico cuantitativo de HPLC submicelar con detección por fluorescencia. Este método al tener tanto detección por fluorescencia como utilizar en su fase móvil surfactante, hace que concentraciones muy bajas de naproxeno puedan ser cuantificadas. Además, este método también ha sido validado para determinar los niveles de naproxeno en muestras de plasma y cerebro de ratón. Este método fue sensible, robusto, y adecuado para análisis clínicos rutinarios que impliquen un gran número de muestras.

Por otro lado, el método se usó para investigar la distribución cerebro/plasma del naproxeno en una serie de formulaciones que contenían surfactantes diferentes y así saber cuál de esas formulaciones era mejor para tratamientos "in vivo". Todos los sistemas micelares tuvieron concentraciones más altas de naproxeno a nivel plasmático y cerebral en comparación con la NAP materia prima. Sin embargo, las micelas de SDS mostraron una mayor concentración tanto plasmática como cerebral que las micelas de RH 40 o T 80.

El objetivo de esta parte experimental era conseguir un método analítico capaz de analizar concentraciones de naproxeno en muestras biológicas y además conocer que formulación tenía mejor biodisponibilidad en ratones. Una vez acaba esta parte, se consiguió tanto desarrollar el método analítico, como seleccionar una formulación de naproxeno base con buenos datos tanto "in vitro" como "in vivo". Por ese motivo, los estudios de esta parte experimental fueron publicados en una revista internacional. (Ver anexo II).

Los buenos resultados obtenidos en el desarrollo de esta parte experimental, hace que se desarrolle un estudio farmacocinético en ratones para probar la formulación FS-10%.

5.6. BIBLIOGRAFÍA:

- Andersen, C.A., Perfetti, P., Nibbio, M., Bellini, M., Angelini, R., Fornasier, M., Andersen., (2017). Brain penetration assessment in vivo: a reliable and simple method in anesthetized rats at steady state. *J. Neurosci. Methods.* 232, 199–206.
- Belal, F., Ibrahim, F., Sheribah, Z. A., Alaa, H., (2018). Micellar HPLCUV method for the simultaneous determination of levodopa, carbidopa and entacapone in pharmaceuticals and human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1091:36–45.
- Della Rocca, G., Di Salvo, A., Cagnardi, P., Marchesi, M. C., Conti, M. B., (2014). Naproxen in the horse: pharmacokinetics and side effects in the elderly. *Res. Vet. Sci.* 96, 147–152.
- Eid, M., El-Shabrawy, Y., El-Shaheny, R., (2017). Green micellar_HPLC analysis of three angiotensin-converting enzyme inhibitors in their mixtures with hydrochlorothiazide and modeling of their retention behavior by fitting to Foley's model. *J. Sep. Sci.* 40, 3646– 3654.
- Gallo, P., Fabbrocino, S., Dowling, G., Salini, M., Fiori, M., Perretta, G., Serpe, L., (2010). Confirmatory analysis of non-steroidal antiinflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 1217, 2832–2839.
- García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, J. J., López-Sánchez, A., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., (2017). Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 529, 381–390.
- Hadjmohammadi, M. R., Nazari, S.J.S.S., (2013). Separation optimization of aniline and seven 4-substituted anilines in high-submicellar liquid

chromatography using empirical retention modeling and Derringer's desirability function. *J. Sep. Sci.* 36, 3667–3672.

- ICH Harmonized Tripartite Guideline (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1), Geneva, 2005.
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- López-Sánchez, A., Pérez-Cantero, A., Torrado-Salmerón, C., Martín-Vicente, A., García-Herrero, V., González-Nicolás, M.Á., Lázaro, A., Tejedor, A., Torrado-Santiago, S., García-Rodríguez, J.J., Capilla, J., Torrado, S. (2018) Efficacy, biodistribution, and nephrotoxicity of experimental Amphotericin B Deoxycholate formulations for pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*; 62(7).
- Martins, S.M., Wendling, T., Gonçalves, V. M., Sarmiento, B., Ferreira, D. C., (2012). Development and validation of a simple reversed phase HPLC method for the determination of camptothecin in animal organs following administration in solid lipid nanoparticles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 880, 100–107.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Harigae, T., Onuma, R., Kimura, F., Fujii, T., Miyazawa, T., (2015). Distribution of β -carotene-encapsulated polysorbate 80-coated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in rodent tissues following intravenous administration. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 7223–7230.
- Mohamed, A.I., Omar, M. A., Hammad, M. A., Mohamed, A. A., (2016). Development and validation of highly sensitive stability indicating spectrofluorimetric method for determination of Amlodipine in pharmaceutical preparations and human plasma. *J. Fluoresc.* 26, 2141–2149.
- Mostafa, A.M., Rageh, A.H., Ali, M. F. B., Mohamed, F. A., (2019). Micelle and inclusion complex enhanced spectrofluorimetric methods for determination of

Retugabine: Application in pharmaceutical and biological analysis. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 15, 251–261.

- Ortiz-Bolsico, C., Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., (2015). Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate on a C18 column under micellar and high submicellar conditions in reversed-phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 38, 550–555.
- Petr, J., (2017). Rapid determination of the critical micelle concentration by Taylor dispersion analysis in capillaries using both direct and indirect detection. *J. Sep. Sci.* 40, 1421–1426.
- Rezk, M.R., Michael, A.M., Lotfy, H. M., El-Kadi, A. O., Shehata, M. A., (2014). A rapid and sensitive HPLC assay of some concomitant antimigraine drugs. *J. Chromatogr. Sci.* 52, 704–706.
- Richardson, A.E., McPherson, S. D., Fasciano, J. M., Pauls, R. E., Danielson, N. D., (2017). Corrigendum to “Micellar liquid chromatography of terephthalic acid impurities”. *J. Chromatogr A.* 1491, 67– 74.
- Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J. R., García- Alvarez-Coque, M. C., (2009). Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr A.* 1216, 1798–1814.
- Ruiz-Ángel, M.J., Torres-Lapasió, J. R., Carda-Broch, S., GarcíaÁlvarez- Coque, M. C., (2010). Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1217, 7090–7099.
- Sakaguchi, Y., Yoshida, H., Hayama, T., Yoshitake, M., Itoyama, M., Todoroki, K., Yamaguchi, M., Nohta, H., (2011). Fluorous derivatization and fluorous-phase separation for fluorometric determination of naproxen and felbinac in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 176–180.
- Sheha, M., (2012). Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. *Arch. Pharm. Res.* 35, 523–530.

- Silva, R.A., Wang, C.C., Fernández, L.P., Masi, A.N., (2008). Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Talanta*. 76, 166–171.
- Tiong, N., Elkordy, A. A., (2009). Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 373–384.
- Wang, G., Wang, J.J., Li, F., To, S.S., (2016). Development and evaluation of a novel drug delivery: pluronics/SDS mixed micelle loaded with myricetin in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci.* 105, 1535–1543.
- Yehia, A.M., Essam, H.M., (2016). Development and validation of a generic high-performance liquid chromatography for the simultaneous separation and determination of six cough ingredients: robustness study on core-shell particles. *J. Sep. Sci.* 39, 3357–3367.
- Yilmaz, B., Asci, A., Erdem, A. F., (2014). HPLC method for naproxen determination in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *J. Chromatogr. Sci.* 52, 584–589.
- Zidan, D.W., Elmasry, M. S., Hassan, W. S., Shalaby, A. A. (2018). Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Luminescence*. 33, 232–242.
- Zidan, D.W., Elmasry, M. S., Hassan, W. S., Shalaby, A. A. (2018). Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Luminescence*. 33, 326–335.

VI. PARTE EXPERIMENTAL 3:
ESTUDIOS
FARMACOCINÉTICOS

VI. PARTE EXPERIMENTAL 3: ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.

6.1. INTRODUCCIÓN:

Uno de los objetivos principales de este estudio era conseguir una formulación de naproxeno que presente un tiempo corto para alcanzar su acción y que además los niveles de principio activo en el organismo fueran iguales o superiores a los de referencia. Para llegar a eso, se necesita una formulación adecuada, un método analítico validado y un estudio farmacocinético.

Una vez desarrollados tanto la formulación como el método analítico, se realizará el estudio farmacocinético en ratones.

Los estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos permiten investigar la absorción, distribución y eliminación de un fármaco en el organismo, por lo general mediante la medición de la concentración del fármaco en la sangre, la orina y los tejidos en el transcurso de un determinado tiempo. Estos estudios de farmacocinética se usan para caracterizar la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME) de un compuesto, ya sea en la sangre o en otros lugares, y se suelen emplear en las fases de desarrollo de una nueva forma farmacéutica con potencial terapéutico de un programa de desarrollo de fármacos.

Por estos motivos, el estudio farmacocinético en ratones es clave para saber si la formulación FS-10% presentaba unos resultados mejores que la formulación de referencia, y por consiguiente, si podría llegar a ser un tratamiento efectivo contra los ataques agudos de migraña.

6.2. MATERIALES:

6.2.1. Productos y reactivos:

En estos estudios se utilizarán los siguientes productos y reactivos:

- Naproxeno de Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China).
Donado por HC Clover.
- Croscarmelosa sódica producida por FMC (Philadelphia, USA).
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de (Methocel E15LV) (Dow Chemical),
- Lauril sulfato sódico (SDS) obtenido por Sigma (Copenhagen, Denmark).
- Tramadol de laboratorios Normon® (Tres cantos, Madrid, Spain).
- Carboximetilcelulosa (CMC 1000) obtenida por Sigma (Copenhagen, Denmark).
- Ácido acético glacial para HPLC (purity >99.8%) de Panreac® (Barcelona, Spain).
- Acetonitrilo grado HPLC por Scharlau® (Barcelona, Spain).
- Agua obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Billerica, USA).
- Filtros Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF 0,45 µm, Cork, Ireland).

Todos los reactivos y químicos utilizados tenían grado analítico.

6.2.2. Animales:

- 60 ratones adultos hembra de la especie CD-1.

6.2.3. Aparatos y equipos de laboratorio:

- Tamices de diferentes diámetros.
- Estufa Memmert.
- Congelador
- Material de vidrio.
- Pequeño aparataje de laboratorio.
- Agitador Vortex.
- Agitador magnético-calefactor RCT basic. Ika Labortechnik (Germany).

- Morteros de ágata.
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Balanza Microanalítica Sartorius M5P Serie 30303388.
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.
- HPLC Agilent® 1100 equipado con un detector de fluorescencia Agilent® G1321A (Agilent Technologies, Madrid, Spain) multi-longitud de onda λ .
- Columna Zorbax® SB C-8 250 x 4,6 mm, 5 μ m. (Agilent Technologies, Madrid, Spain).
- Centrífuga (Hettich Universal 32, Tuttlingen, Germany).
- Concentrador de muestras Savant® SpeedVac Concentrator. (Holbrook, USA).

6.2.4. Tratamiento de los datos:

- Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA).
- WinNonlin versión 5.2 (Pharsight Co, Mountain View, CA, USA).

6.3. MÉTODOS:

6.3.1. Preparación de las formulaciones:

Para la realización de la parte experimental, lo primero que se hizo fue la preparación de las formulaciones que se iban a probar en el estudio farmacocinético. Para el estudio farmacocinético se optaron por probar dos formulaciones, la formulación control NAP y la formulación seleccionada a través de los diferentes estudios, FS-10%.

6.3.1.1. Formulación NAP:

El naproxeno base materia prima (NAP) no tiene ningún excipiente y lo único que se hizo para la obtención de esta fórmula fue tamizar 750mg de naproxeno base a través de un tamiz de 0,840 mm, el polvo resultante se pasó por otro tamiz de luz 0,297mm, quedándonos sólo con la fracción de naproxeno entre 0,840-0,297mm. El producto resultante se guardó para los ensayos.

6.3.1.2. Formulación FS-10%:

La formulación surfactante FS-10% va a contener un 1,5% de aglutinante (HPMC) 10% de disgregante (croscarmelosa sódica) y el 10% de tensioactivo (SDS). El lauril sulfato sódico (SDS) se va a incorporar a la formulación a través de la solución aglutinante, es decir se va a añadir 75mg de SDS a una solución acuosa que contiene un 2% de HPMC (p/v) y que se agita durante 24 h. La incorporación, al igual que las anteriores formulaciones, se hace por granulación húmeda, la cual se realizó mezclando 750 mg de naproxeno con 75 mg del disgregante, y luego se agregó 560 microlitros de la solución aglutinante que contenía tanto HPMC como SDS. Esta solución se mezcló con el naproxeno en un mortero de vidrio, la masa húmeda fue tamizada a través de un tamiz de 0,840 mm y los gránulos se secaron en estufa a 60°C durante 48 h. El producto final fue tamizado para aislar la fracción de 0,297-0,840 mm como la formulación anterior.

Una vez preparadas las formulaciones, se almacenaron a temperatura de 20°C, protegidos de la luz y la humedad (desecador). Se preparó suficiente cantidad de formulación para poder administrar la misma cantidad a los 6 grupos de animales que

ese emplearan para tomar las muestras de tejido cerebral a los distintos tiempos, para cada una de las fórmulas estudiadas. Para cada análisis se pesó la misma cantidad de formulación y se reconstituyó en los mismos mL de carboximetilcelulosa al 0,75% en los 6 diferentes grupos de tiempo. Esto se hizo así ya que, si se hiciese una única reconstitución para todos los ratones, la diferencia de tiempo entre la administración del primer ratón y la del último podría suponer un error, debido a que el naproxeno se podría estar liberando antes de ser administrado al animal.

6.3.2. Parte “in vivo”:

6.3.2.1. Animales y dosificación:

El procedimiento experimental para conocer la farmacocinética de las dos diferentes formulaciones: NAP y FS-10%, fue realizado con 60 ratones adultos hembra de la especie CD-1, todos ellos con un peso medio de $21,2 \pm 3,1$ g.

Estos 60 ratones fueron divididos en dos partes, 30 para cada formulación y los 30 ratones por formulación, se dividieron en seis grupos de cinco ratones cada uno, correspondiendo cada grupo a un determinado tiempo de la curva farmacocinética (15, 30 min y 1, 2, 4, y 7 h). Este experimento con animales fue aprobado por el Comité de Ética Animal en la Universidad Complutense, (Madrid, España).

Todas las formulaciones fueron administradas por vía oral a través de un sistema de sonda buco-gástrico. El tratamiento se administró en una sola dosis equivalente a 10 mg/kg de naproxeno. Se decidió esa dosificación ya que existían estudios anteriores con uso de naproxeno en animales en los que se realizaron dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg (Della Rocca, G. et al, 2014; Sheha, M., 2012; Zerrouk, N. et al, 2004). Las concentraciones de plasma en esos estudios son similares a los que se obtienen en los humanos después de la administración de naproxeno en dosis bajas (200 mg) y altas (500 mg) respectivamente (Choi, H.G. et al, 2015; Yilmaz, B. et al, 2014). La realización del estudio en dosis de 10 mg/kg nos permite evaluar el posible aumento de parámetros farmacocinéticos a dosis bajas. Esto es interesante, ya que, si se lograra un aumento

importante en las concentraciones de naproxeno con dosificaciones bajas, podría utilizarse esta nueva formulación de naproxeno solamente a dosis bajas.

Para la administración de la dosis a los ratones se preparó una suspensión de carboximetilcelulosa al 0,75% que fue utilizada como vehículo para la materia prima (NAP) y de la formulación (FS-10%). La cantidad de formulación correspondiente se resuspendió en la cantidad de solución de carboximetilcelulosa justo antes de administrar 0,3mL a cada ratón. En esos 0,3mL de formulación resuspendida estaba la cantidad correspondiente de naproxeno de 10mg/kg.

Para obtener las diferentes muestras biológicas, se anestesió a cinco ratones por grupo utilizando una inyección de uretano (1,5 g/kg) en diferentes momentos, para así poder obtener las muestras en el tiempo exacto después de las dosis. Los animales fueron anestesiados para el procedimiento de toma de muestras de sangre y posteriormente dislocados cervicalmente. Las muestras de cerebro se recogieron después de la dislocación del animal y comprobación de la muerte de éstos.

6.3.2.2. Muestras de sangre y cerebro:

Las muestras de sangre, (aprox. 1 mL) se recogieron por punción cardiaca para los siguientes puntos temporales: 15, 30 min y 1, 2, 4, y 7 h. En total fueron 5 muestras de sangre por cada tiempo y fórmula. Estas muestras sanguíneas fueron transferidas y heparinizadas a eppendorfs, después de lo cual se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min para obtener el plasma. Para las muestras de cerebro, después de la eutanasia de los ratones, se extirparon los cerebros, se pesaron, se lavaron con 0,5 mL de solución salina y se homogeneizaron durante 1 min. Tanto las muestras de plasma como los tejidos cerebrales homogeneizados fueron almacenados a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta ser analizados.

6.3.2.3. Análisis de las muestras de sangre:

Para la cuantificación de las diferentes alícuotas de plasma, lo primero fue descongelar las muestras. Se tomaron 200 μL de cada una de ellas y se le adicionó 50 μL de solución de estándar interno (tramadol al 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta solución se mezcló con 450 μL de acetonitrilo en un mezclador vortex durante 2 min y después se centrifugó la mezcla a 4500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó de nuevo a 4500 rpm durante 5 minutos, después de esta segunda centrifugación, el sobrenadante fue filtrado a través de un Millipore Filtro (Millex-HV, PVDF hidrófilo 0,45 mm, Cork, Irlanda) y 50 μL de cada muestra fue inyectado en el HPLC para la cuantificación de naproxeno de la muestra.

6.3.2.4. Análisis de las muestras de cerebro:

Para la cuantificación de las diferentes muestras de cerebro, lo primero fue descongelar las muestras y obtener 0,5 mL del tejido homogeneizado de cada muestra. Estos 0,5ml se mezclaron en un vórtex durante 2 min con 1 mL de acetonitrilo y 50 μL de solución de estándar interno (tramadol al 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 4500 rpm (Hettich Universal 32, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante se recuperó y se volvió a centrifugar de la misma manera. Se tomaron 600 μL del líquido y se concentran en un concentrador de muestras (Savant Concentrador SpeedVac, Holbrook, EE.UU.) durante 2 horas a 50°C. Una vez concentradas las muestras, se añadieron 450 μL de acetonitrilo a cada tubo y se mezcló con vortex durante 2 minutos a 2200 rpm. La muestra fue filtrada a través de un filtro Millipore (Millex-HV, PVDF hidrófilo 0,45 mm, Cork, Irlanda) y 50 μL del líquido filtrado se inyectó directamente en el sistema de HPLC.

6.3.3. Método de cuantificación:

6.3.3.1. Cuantificación del naproxeno por cromatografía líquida:

Para la cuantificación del naproxeno en el plasma y en las muestras de tejido cerebral se utilizó el método creado y validado en la parte experimental 2.

Por tanto, se utilizó un método analítico cuantitativo de HPLC submicelar con detección por fluorescencia. El equipo fue el mismo, HPLC Agilent® 1100 equipado con un detector de fluorescencia Agilent® G1321A (Agilent Technologies, Madrid, Spain) multi-longitud de onda λ ; la columna Zorbax® SB C-8 250 x 4,6 mm, 5 μ m. (Agilent Technologies, Madrid, Spain). La fase móvil consistió en una fase móvil submicelar de SDS 0.007M con acetonitrilo y el ácido acético al 2% en el agua (50:50, v/v), el flujo móvil fue de 1 mL/min durante 10 minutos, la cantidad de muestra inyectada fue de 50 μ l y las longitudes de onda fueron para la excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 310 y 360 nm (empleada para el estándar interno).

6.3.3.2. Rectas de calibración, precisión y recuperación:

Se realizó una revalidación del método de análisis debido principalmente al factor tiempo ya que desde que se hizo el método hasta que se realizaron los estudios farmacocinéticos pasó bastante tiempo y los cambios en la emisión de la lámpara del equipo de HPLC podría haber experimentado algún pequeño cambio. Además, la dosificación y la especie de los animales de estos ensayos también fueron diferentes, justificando la realización de esta revalidación.

Todo el procedimiento de preparación de muestras se realizó de forma similar al apartado de validación del método. Para el plasma se hizo una recta de 8 puntos con concentraciones que fueron desde 2,7 a 25 μ g/mL y para las de cerebro también se hizo una recta de 8 puntos con concentraciones desde 0,21 a 2,38 μ g/g. Todas estas muestras se prepararon mediante la adición a muestras de plasma y cerebro de ratón sin principio activo, con la cantidad apropiada de naproxeno.

Además de las correspondientes rectas de calibrado, se calculó la precisión y la recuperación como en la parte experimental para las muestras plasmáticas y cerebrales. (García-Herrero, V. et al, 2019).

6.3.3.3. Análisis farmacocinético:

Las propiedades farmacocinéticas del naproxeno se analizaron mediante análisis no compartimentales.

Se calcularon diferentes valores farmacocinéticos clásicos como son: Concentración máxima (C_{max}), el tiempo máximo (T_{max}), área bajo la curva (AUC) y se calculó además la relación cerebro/plasma C/P.

En el campo de la farmacocinética, habitualmente el área bajo la curva (AUC) se calcula desde el momento en el que se administra el fármaco hasta el momento en el que la concentración plasmática del principio activo no es significativa. En este caso, se calculó desde el momento en el que se administró el fármaco hasta que la concentración de naproxeno en la muestra no fue significativa para el estudio. El área bajo la curva representa la exposición total del organismo a un principio activo y facilita la evaluación y comparación de los perfiles de biodisponibilidad entre fármacos.

El momento en el que se detecta la concentración máxima del principio activo en la sangre u otro tejido se llama T_{max} , y la concentración máxima del principio activo detectada en el torrente circulatorio o en otro tejido se llama C_{max} . Los datos de C_{max} y T_{max} se obtuvieron directamente de los valores medidos. El resto de los parámetros farmacocinéticos se estimaron en base a los valores medios de la concentración ($n = 5$), determinados para cada punto mediante análisis farmacocinético no compartimentado utilizando el programa WinNonlin versión 5.2 (Pharsight Co, Mountain View, CA, USA).

El parámetro farmacocinético del área bajo curva de la concentración de fármaco se realiza desde el tiempo cero hasta la última concentración significativa del estudio 7h (AUC_{0-7h}), siguiendo el método trapezoidal. Del mismo modo que se calculó el (AUC_0).

^{2h}), Esto cálculo se hizo debido a que en este estudio es muy importante la distribución y liberación del fármaco en las primeras horas desde la administración.

Además, se calculó la relación existente entre las concentraciones de naproxeno en cerebro frente a las concentraciones en plasma (C/P). Este cálculo se hizo mediante la división de la concentración de cerebro frente a la del plasma, sabiendo que cuanto mayor sea este valor, mayor concentración de naproxeno en cerebro se alcanzó.

6.3.3.4. Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA). Todos los valores se indicaron con su desviación estándar relativa (DER). El análisis estadístico de los datos se hizo con la t de student para dos grupos, y en una sola dirección. Un valor $p < 0,05$ se consideró como una diferencia significativa para los datos análisis.

6.4. RESULTADOS:

6.4.1. Linealidad:

La ecuación de regresión para el análisis de las muestras de plasma fue:

$$y = 2674,1x (\mu\text{g/ml}) + 22,43 (R^2 = 0,9975).$$

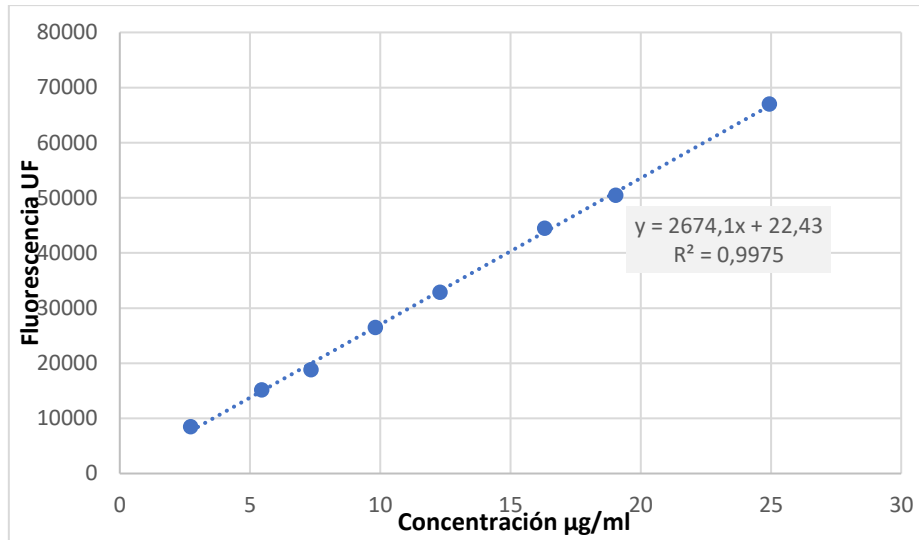


Figura 29. Recta de calibrado para los estudios farmacocinéticos de muestras plasmáticas.

La ecuación de regresión para el análisis de las muestras de cerebro fue:

$$y = 148,57x (\mu\text{g/g}) + 10,90 (r^2 = 0,998).$$

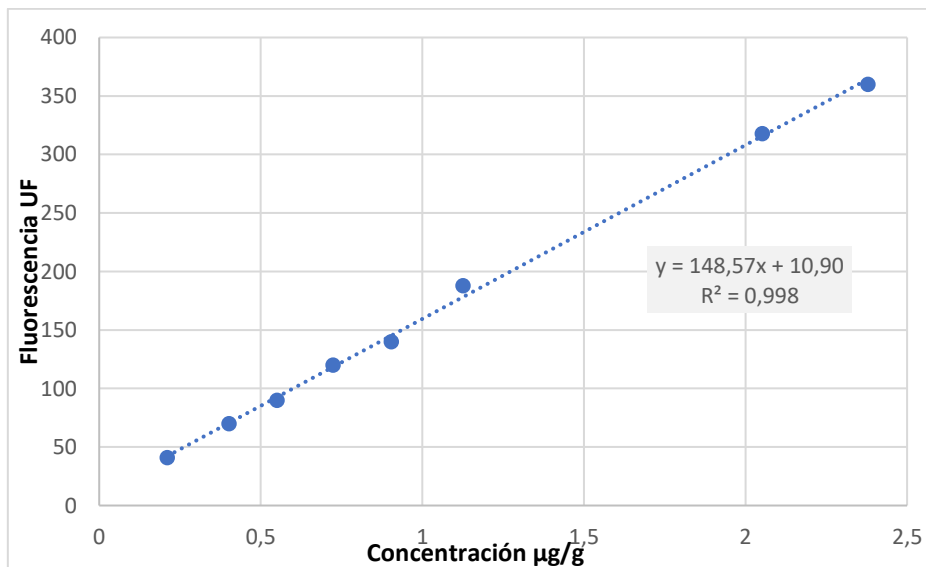


Figura 30. Recta de calibrado para los estudios farmacocinéticos de muestras cerebrales.

Los ensayos tanto para plasma como para cerebro fueron lineales entre 2,7 y 25 µg/ml y 0,21 y 2,38 µg/g respectivamente. Por tanto, se utilizaron estas rectas de calibrado para el análisis de los estudios de farmacocinética en ratones.

6.4.2. Precisión y recuperación:

Se determinó la recuperación y la precisión tanto en muestras de cerebro como de plasma para confirmar que no hay errores debido al cambio de animales ni otros factores. En las siguientes tablas se pueden ver las precisiones y las recuperaciones para cerebro y plasma por triplicado con sus respectivas desviaciones.

Tabla 20. Precisión intra e interdías de muestras de plasma.

Precisión DER (%)		
Concentración (µg/ml)	Intradías	Interdías
9,23	2,25	0,62
12,30	0,85	2,05
15,37	1,54	2,37

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje.

Tabla 21. Precisión y exactitud intra e interdías de muestras de cerebro.

Precisión DER (%)		
Concentración (µg/g)	Intradías	Interdías
0,54	0,64	1,17
0,72	1,89	0,98
0,90	2,17	2,01

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje.

Tabla 22. Recuperación de las muestras de plasma con su media y desviación estándar relativa DER (%).

Recuperación		
Concentración (µg/ml)	Media (%)	DER (%)
9,23	97,19	1,89
12,30	95,71	1,42
15,37	95,18	0,88

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje.

Tabla 23. Recuperación de las muestras cerebrales con su media y desviación estándar relativa DER (%).

Recuperación		
Concentración (µg/g)	Media (%)	DER (%)
0,54	96,09	0,84
0,72	95,27	1,73
0,90	96,04	0,55

*DER (%) representa la desviación estándar relativa en porcentaje.

6.4.3. Estudios de farmacocinética:

Concentraciones:

En las siguientes figuras se muestran los perfiles de concentración plasmática y concentración cerebral a lo largo del tiempo tanto de la formulación de rápida disolución (FS-10%), como los perfiles de la suspensión NAP de referencia.

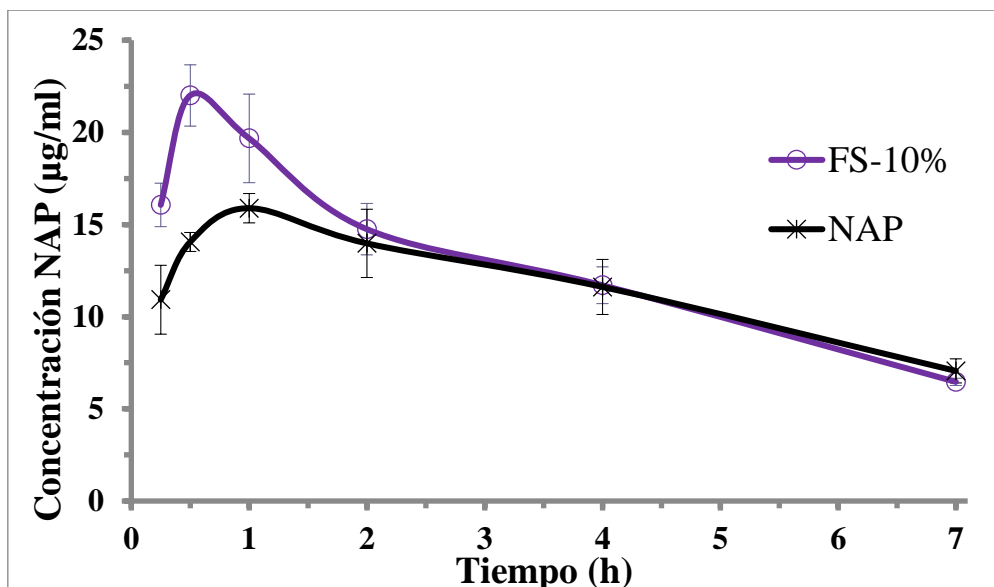


Figura 31. Concentraciones plasmáticas de naproxeno en las formulaciones FS-10% y NAP en los diferentes puntos temporales.

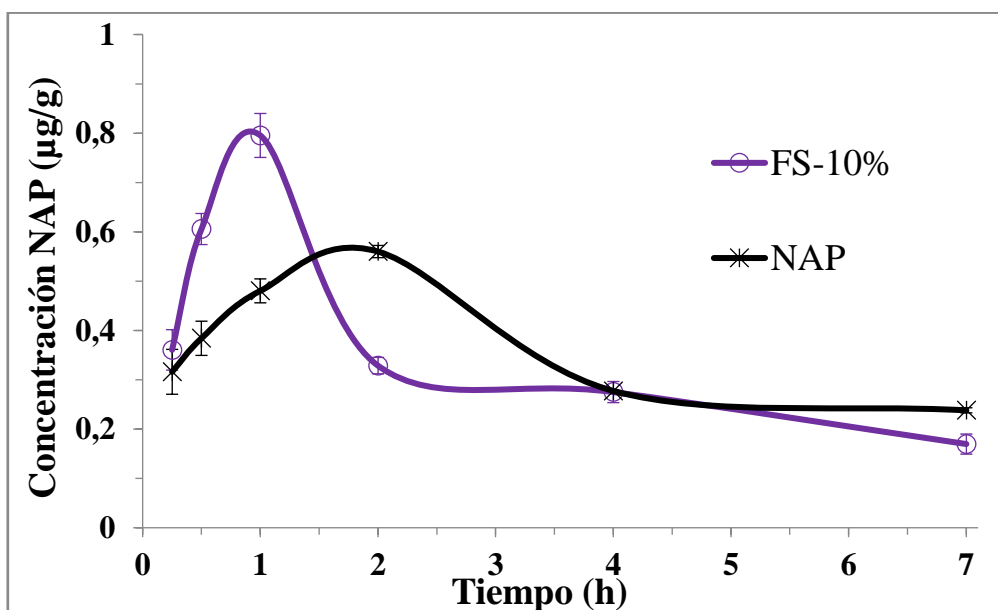


Figura 32. Concentraciones cerebrales de naproxeno en las formulaciones FS-10% y NAP en los diferentes puntos temporales.

En la figura 31 se muestran las concentraciones plasmáticas $\mu\text{g/ml}$ que tuvieron a largo del tiempo (15, 30min y 1, 2, 4 y 7h) la formulación FS-10% (morada) y la formulación de referencia NAP (negra). En la figura se observa que la formulación FS-10% tiene unas concentraciones mayores y que sus concentraciones plasmáticas mayores aparecen un poco antes que las de la formulación de referencia NAP.

En la figura 32 se muestran las concentraciones cerebrales $\mu\text{g/g}$ que tuvieron a largo del tiempo (15, 30min y 1, 2, 4 y 7h) la formulación FS-10% (morada) y la formulación de referencia NAP (negro). Se puede comprobar, que la formulación FS-10% comparada con la formulación de referencia NAP tiene unas concentraciones mayores y además, éstas se dan antes en el tiempo.

6.4.4. Parámetros farmacocinéticos: AUC, C_{max} y T_{max} .

Para poder garantizar una acción efectiva contra un ataque agudo de migraña se deben alcanzar altas concentraciones cerebrales de naproxeno en las primeras 2 h después de la administración del fármaco. Por esa razón durante los últimos años se han estudiado a través de diferentes parámetros farmacocinéticos, la respuesta que tienen diferentes medicamentos de acción rápida frente a la migraña en las primeras horas después su administración, para así poder evaluar si estos medicamentos pueden ser efectivos frente a los ataques de migraña o no. (Cleves, C. y Tepper, S.J., 2008; Girotra, P. y Singh, S.K., 2016).

Por ese motivo en este estudio, se ha puesto mayor interés en evaluar la farmacocinética de los fármacos durante las 2 primeras horas desde la administración oral. Para ello hemos evaluado no sólo el área bajo la curva del tiempo total, desde la administración hasta las 7h ($\text{AUC}_{0-7\text{h}}$) sino que se analizó el área bajo la curva desde el tiempo 0 a las 2h ($\text{AUC}_{0-2\text{h}}$). También se han calculado las diferentes relaciones entre las concentraciones de cerebro y plasma (C/P) durante las primeras 2 h después de la administración. Además de calcular tanto para plasma como para cerebro sus respectivas C_{max} y T_{max} en las 2 formulaciones. Todos estos datos se ven expresados de manera más detallada en la siguiente tabla:

Tabla 24. Valores plasmáticos y cerebrales de: (AUC_{0-7h}), (AUC_{0-2h}), C_{max} y T_{max} de las formulaciones SF-10% y NAP con sus respectivas desviaciones estándar relativas (DER).

	Formulación NAP		Formulación FS-10%	
	Plasma	Cerebro	Plasma	Cerebro
AUC_{0-7h}	84606 ± 4259,58	6424,0 ± 137,66	94136,20 ± 7103,00	6615,34 ± 671,61
AUC_{0-2h}	31001,52 ± 1560,81	2446,00 ± 52,41	40424,86 ± 3050,24	3081,77 ± 312,87
C_{max}	15,89 ± 0,80	1,40 ± 0,03	22,00 ± 1,66	1,97 ± 0,20
T_{max}	1h (0,5-4h)	2h (2h)	0,5h (0,5-1h)	1h (0,5-1h)

Como se ve en la Tabla 24 los valores de (AUC_{0-7h}) para plasma o cerebro son similares entre ambas formulaciones, aunque un poco más bajo en la formulación de referencia NAP. Esto puede atribuirse al hecho de que en el ambiente gastrointestinal, la presencia de tensioactivos endógenos como por ejemplo, las sales biliares y las lecitinas mejoren la humectación y solubilización de fármacos poco solubles como el naproxeno (Fong, S.Y. et al, 2015). Además, estos datos revelan que la cantidad de naproxeno que se absorbió de ambas formulaciones fue la misma, pero que se distribuyó de manera diferente en el tiempo, dándose de manera más rápida en una formulación que en la otra.

La presencia de una ventana de absorción relativamente larga para el naproxeno explicaría los valores de $AUC_{0-\infty}$ similares con diferentes tasas de disolución (Figuroa, C.E. y Bose, S., 2013).

Como se dijo antes, varios autores han estudiado durante los últimos años para los tratamientos contra migraña, el AUC cerebral durante las primeras 2 h desde la administración, para así evaluar el efecto “in vivo” de las formulaciones de rápida disolución (Cleves, C. y Tepper, S.J., 2008).

En este caso, las AUC_{0-2h} fueron positivos; en primer lugar, para la formulación FS-10%, el % del AUC_{0-2h} de plasma y cerebro con respecto al AUC_{0-7} fue del 43,94 y del 46,58% respectivamente, mientras que para la formulación NAP fue del 36,64 y del 38,07% respectivamente. Comparando los valores de la formulación FS-10% con los de la referencia NAP, los de FS-10% dan unos valores del 30% más en plasma y del 10% más en cerebro. Por tanto, estos datos nos revelan que la formulación FS-10% durante las 2 primeras horas se libera más rápidamente y por tanto tiene una absorción en los tejidos mayor que la formulación de referencia NAP.

La biodisponibilidad oral durante las primeras 2 h después de la administración para FS-10% se incrementó claramente. La disolución de la formulación FS-10% fue inducida por las interacciones hidrofílicas de polímero-surfactante (HPMC-SDS), que fue la fuerza impulsora para mejorar tanto la velocidad de disolución como la absorción oral. La mayor absorción de fármacos poco solubles se incrementó por procesos relacionados con la mejora en la velocidad de disolución o del aumento de la solubilidad del fármaco a través de la ayuda de tensioactivos (Tiong, N. y Elkordy, A.A., 2009) y sistemas sobresaturados (Kim, M.S. et al, 2013).

Los valores medios de C_{max} para la formulación FS-10% fueron de $22,00 \pm 1,66$ y $1,97 \pm 0,20$ para plasma y cerebro respectivamente y para la formulación NAP de $15,89 \pm 0,8$ y $1,40 \pm 0,03$ para plasma y cerebro respectivamente.

Los valores de C_{max} son similares a los obtenidos en plasma humano con dosis bajas de naproxeno (Yilmaz, B. et al, 2014).

La comparación de los valores que dio la formulación FS-10% con respecto a la de referencia NAP, indican que las concentraciones plasmáticas y cerebrales aumentaron 1,38 veces y 1,41 veces respectivamente. Por lo tanto, la mayor velocidad de disolución obtenida con la interacción hidrofílica HPMC-SDS está relacionada con el aumento de la absorción oral "in vivo" de naproxeno durante las etapas iniciales. Se observaron

aumentos similares en la C_{max} (plasma) al incorporar polímero hidrofílico o surfactante en fármacos poco solubles (Kim, M.S. et al, 2013).

Las relaciones entre las concentraciones de cerebro y plasma (C/P), por el contrario fueron similares para ambas formulaciones (0,05 a 0,06). Estas proporciones son similares a las obtenidas para los diferentes AINES poco solubles como el naproxeno (Andersen, C.A. et al, 2014).

Estos resultados indican que la presencia de SDS en la formulación FS-10% no favorece el cruce de la barrera hematoencefálica. La relación C/P máxima (0,10) se obtuvo a las 0,5 h en FS-10% y 1 h en NAP. Las relaciones C/P más altas pueden estar relacionadas con valores más altos de concentración de naproxeno en plasma, aumentando el porcentaje de la fracción de naproxeno libre de plasma disponible para cruzar la barrera hematoencefálica. Estos incrementos en las proporciones C/P en las 2 primeras horas después de la administración ya se habían observado en estudios de otro medicamento antimigrañoso (Girotra, P. y Singh, S.K., 2016).

Con respecto al T_{max} , fue mucho más corto en la formulación FS-10% (0,5 h y 1 h) para plasma y cerebro respectivamente, comparado con los valores que muestra la formulación de referencia NAP (1h y 2h) para plasma y cerebro respectivamente. Como era de esperar, los valores máximos que se dieron en el cerebro fueron más tardíos que los valores máximos plasmáticos, esto sucedió en ambas formulaciones. El valor de T_{max} para la formulación FS-10% fue más corto que la suspensión NAP de referencia, esto está correlacionando con diferentes estudios (Kim, M.S. et al, 2013).

La razón por la que la formulación FS-10% tenga una C_{max} mayor y un T_{max} más corto, puede estar relacionado con una mayor hidratación en el ambiente gastrointestinal, aumentando su perfil de disolución, y permitiendo que el fármaco sea más fácilmente permeable a la hidratación gastrointestinal cuando se incluye HPMC-SDS en la formulación. En este sistema, los cristales de naproxeno tienen una tensión superficial

baja y podría evitar la saturación en el ambiente gastrointestinal (Reitz, E. et al, 2013), mientras que para la suspensión de la formulación de referencia NAP, la presencia de mayor hidrofobicidad entre los cristales de naproxeno produce una interacción más lenta entre el fármaco y el agua, y por tanto, ralentiza la absorción final.

Las diferencias que se han dado en: AUC_{0-2h} , C_{max} y T_{max} en muestras de cerebro, pueden considerarse muy importantes para prevenir o tratar los primeros síntomas de un ataque de migraña.

6.5. ESTUDIOS DE EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES:

Todos los estudios realizados durante el desarrollo de la tesis fueron realizados cumpliendo con la normativa actualmente en vigor y aprobados por los diferentes comités éticos. Estos estudios fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la UCM y por el Comité de Ética de Investigación y Experimentación Animal (CEI-EA) de la Universidad de Alcalá.

Como he comentado en diferentes partes de la tesis, a la hora de desarrollar una nueva formulación antimigrañosa de rápido efecto, los estudios farmacocinéticos son muy importantes, ya que son los que nos hacen saber si esa nueva formulación tiene los parámetros necesarios para una liberación rápida. Los ensayos “in vitro” son importantes y necesarios para saber y confirmar que la formulación presenta los resultados deseados, sin embargo, necesitamos ensayos “in vivo” para corroborar que los resultados “in vitro” son semejantes a los “in vivo”. Estos resultados “in vivo” son esenciales si nuestro objetivo es intentar que la formulación sea un potencial fármaco para humanos ya que uno de los primeros pasos es comprobar que en animales de laboratorio cumplen la principal función deseada.

Por ese motivo, y a raíz de la importancia de los estudios de farmacocinética con animales de experimentación y la intención de aplicarlos en diferentes futuros estudios se decidió realizar el curso para manejo de animales de experimentación.

Los cursos de experimentación animal que se realizaron y se superaron fueron a través de Animalaria Formación y Gestión, S.L.:

-Función de Eutanasia de los animales: Función B.

-Función de Realización de los Procedimientos: Función C.

Ambos cursos de experimentación animal son reconocidos por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid para toda España, con fecha 6 de Abril de 2016 (Referencia CAM O566-7).

Una vez obtenidos los cursos de manipulación de animales de experimentación, utilicé dichos cursos para concluir la parte final de mi tesis doctoral y además colaboré en diferentes estudios en los que la experimentación animal junto con ensayos de farmacocinética y biodisponibilidad fueron claves.

Uno de esos estudios en los que colaboré y puse en práctica los conocimientos adquiridos en los cursos fue en la mejora de la relación farmacocinética/farmacodinámica en el tratamiento con voriconazol de aspergilosis invasiva (Gallego-Arranz, T. et al, 2020). Durante estos estudios se tomaron diferentes muestras de sangre y de órganos a diferentes tiempos y se aplicaron otras técnicas necesarias para la realización de estudios de farmacocinética en animales de experimentación.

Otro estudio en el que colaboré y en el que realicé una estancia de investigación internacional en Coimbra, fue en el que se realizaron estudios de eficacia de una formulación de ezetimiba en ratas hiperlipidémicas (Torrado-Salmerón, C. et al, 2019). Durante este estudio se administraron por vía oral diferentes formulaciones durante 4-8 semanas en ratas hiperlipidémicas y se fueron recogieron a lo largo del tiempo

diferentes muestras biológicas y órganos. A través de la toma de esas muestras y de los órganos pudimos conocer y comparar la eficacia a lo largo del tiempo de nuestra nueva formulación de ezetimiba frente a la formulación de referencia en ratas hiperlipidémicas. Otro estudio que se realizó con respecto a la mejora de formulaciones de ezetimiba fue (Torrado-Salmerón, C. et al, 2020). En este estudio se hicieron ensayos de farmacocinética en ratas para comprobar la mejora de la biodisponibilidad y de la eficacia en nuevas formulaciones de ezetimiba.

Gracias a la obtención de los cursos de manipulación y experimentación animal y de los estudios en los que colaboré anteriormente citados, obtuve muchos nuevos conocimientos. Algunos de los conocimientos obtenidos fue saber como se mejora la relación farmacocinética/farmacocinética y se reduce la toxicidad de fármacos gracias a la utilización de excipientes para la rápida liberación (Gallego-Arranz, T. et al, 2020). Estos estudios me han podido ayudar para desarrollar en un futuro un estudio en el que se reduzca la cantidad de naproxeno para disminuir los posibles daños gástricos en los pacientes que reciben tratamiento con naproxeno.

Otro de los conocimientos obtenidos fue aprender como se desarrolla un estudio de eficacia en ratas, comparando diferentes formulaciones durante un tiempo prolongado (Torrado-Salmerón, C. et al, 2019). Este estudio me ha ayudado a poder desarrollar en un futuro un estudio de eficacia de naproxeno frente a otros antiinflamatorios o entre diferentes formulaciones de naproxeno en los que se valorará el daño que sufre la cavidad gástrica e intestinal al uso prolongado de antiinflamatorios.

6.6. DISCUSIÓN FINAL:

El objetivo de esta parte experimental fue hacer un estudio farmacocinético en ratones en los que se probaran la mejor formulación creada de naproxeno (FS-10%) y compararla con una formulación referencia de naproxeno NAP. Tras los ensayos realizados, se da por conseguido el estudio farmacocinético “in vivo” que se esperaba.

Los datos que nos han dado estos estudios han sido muy positivos, ya que los parámetros estudiados (AUC_{0-2h} , C_{max} , T_{max}) han tenido resultados significativamente mejores para la formulación FS-10% que la de referencia. Estos datos obtenidos se podrían resumir en que la formulación FS-10% alcanza mayores niveles plasmáticos y cerebrales de naproxeno en un menor tiempo, por tanto, podría tratar los ataques de migraña mejor la de referencia.

El único dato que no ha reflejado ni resultados positivos ni negativos ha sido la relación entre concentración de naproxeno en cerebro y plasma C/P. Los resultados obtenidos reflejan que la adición de SDS a la formulación no hace que penetre mayor cantidad de naproxeno la barrera hematoencefálica pero lo que si se ha concluido es que la adición de ese tensioactivo hace que el naproxeno llegue antes al cerebro y por tanto pueda tratar antes el ataque agudo de migraña.

Además, en esta parte experimental se ha utilizado el método analítico creado en la parte experimental 2, y se ha puesto de manifiesto que es un buen método para el análisis de gran cantidad de muestras con concentraciones bajas de naproxeno en plasma y cerebro, y también, que el tratamiento analítico de las muestras biológicas ha sido rápido y eficaz.

El resultado de este estudio farmacocinético junto con el desarrollo de las formulaciones en la parte experimental 1, ha arrojado resultados concluyentes que fueron publicados en una revista científica internacional. (Ver Anexo I).

La obtención de los cursos para manipulación y experimentación con animales han sido muy importantes para la finalización de mis estudios “in vivo” y además me ha ayudado a realizar la colaboración en otros estudios en los que he adquirido conocimientos, técnicas y procedimientos que me gustaría utilizar en futuros estudios.

6.7. BIBLIOGRAFÍA:

- Andersen, C.A., Perfetti, P., Nibbio, M., Bellini, M., Angelini, R., Fornasier, M., (2014). Brain penetration assessment in vivo: a reliable and simple method in anesthetized rats at steady state. *J. Neurosci. Methods.* 232, 199–206.
- Choi, H.G., Jeon, J.Y., Kwak, S.S., Kim, H., Jin, C., Im, Y.J., Kim, E.Y., Wang, H.M., Kim, Y., Lee, S.Y., Kim, M.G., (2015). Pharmacokinetic comparison study of a combination containing 500 mg of Naproxen and 20 mg of Esomeprazole: a randomized single-dose, 2-way crossover, open-label study in healthy Korean men. *Clin. Ther.* 1, 83–93.
- Cleves, C., Tepper, S.J., (2008). Sumatriptan/naproxen sodium combination for the treatment of migraine. *Expert. Rev. Neurother.* 8, 1289–1297.
- Della Rocca, G., Di Salvo, A., Cagnardi, P., Marchesi, M.C., Conti, M.B., (2014). Naproxen in the horse: pharmacokinetics and side effects in the elderly. *Res. Vet. Sci.* 96, 147–152.
- Figueroa, C.E., Bose, S., (2013). Spray granulation: importance of process parameters on in vitro and in vivo behavior of dried nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1046–1055.
- Fong, S.Y., Ibisogly, A., Bauer-Brandl, A., (2015). Solubility enhancement of BCS Class II drug by solid phospholipid dispersions: spray drying versus freeze-drying. *Int. J. Pharm.* 496, 382–391.
- Gallego-Arranz, T., Pérez-Cantero, A., Torrado-Salmerón, C., Guarnizo-Herrero, V., Capilla, J., Torrado-Durán, S. (2020). Improvement of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole. Reduced drug toxicity through novel rapid release formulations. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 193, 111119.
- García-Herrero, V., Torrado-Salmerón, C., García-Rodríguez, J. J., Torrado, G., Torrado-Santiago, S. (2019). Submicellar liquid chromatography with

fluorescence detection improves the analysis of naproxen in plasma and brain tissue. *Journal of separation science*, 42(9), 1702–1709.

- Girotra, P., Singh, S.K., (2016). A comparative study of orally delivered PBCA and ApoE coupled BSA nanoparticles for brain targeting of sumatriptan succinate in therapeutic management of migraine. *Pharm. Res.* 33, 1682–1695.
- Kim, M.S., Kim, J.S., Cho, W., Cha, K.H., Park, H.J., Park, J., Hwang, S.J., (2013). Supersaturatable formulations for the enhanced oral absorption of sirolimus. *Int. J. Pharm.* 445, 108–116.
- Reitz, E., Vervaet, C., Neubert, R.H., Thommes, M., (2013). Solid crystal suspensions containing griseofulvin _Preparation and bioavailability testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 193–202
- Sheha, M., (2012). Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. *Arch. Pharm. Res.* 35, 523–530.
- Tiong, N., Elkordy, A.A., (2009). Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 373–384.
- Torrado-Salmerón, C., Guarnizo-Herrero, V., Cerezo-Garreta, J., Torrado Durán, G., Torrado-Santiago, S. (2019). Self-Micellizing Technology Improves the Properties of Ezetimibe and Increases Its Effect on Hyperlipidemic Rats. *Pharmaceutics*, 11(12), 647.
- Torrado-Salmerón, C., Guarnizo-Herrero, V., Gallego-Arranz, T., Del Val-Sabugo, Y., Torrado, G., Morales, J., Torrado-Santiago, S. (2020). Improvement in the Oral Bioavailability and Efficacy of New Ezetimibe Formulations- Comparative Study of a Solid Dispersion and Different Micellar Systems. *Pharmaceutics*, 12(7), 617.
- Yilmaz, B., Asci, A., Erdem, A.F., (2014). HPLC method for naproxen determination in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *J. Chromatogr. Sci.* 52, 584–589.

- Zerrouk, N., Mennini, N., Maestrelli, F., Chemtob, C., Mura, P., (2004). Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. *Eur J. Pharm Biopharm.* 57, 93–99.

**VII. PARTE EXPERIMENTAL 4:
FORMULACIONES CON
CHITOSAN**

VII. PARTE EXPERIMENTAL 4: FORMULACIONES CON CHITOSAN.

7.1. INTRODUCCIÓN:

Los últimos estudios de la tesis se han desarrollado en la Universidad de Chile durante una estancia internacional. En esta parte se ha trabajado en la incorporación de chitosán a una formulación de naproxeno base, partiendo de la formulación que ya dio buenos resultados, es decir, incorporar chitosán a la formulación FS-10%.

Para esta última parte lo que se hizo fue sustituir al menos un excipiente sin propiedades farmacológicas de la formulación anterior, por uno que pudiera hacer la misma función de excipiente y que además tuviera propiedades farmacológicas que mejorase la formulación. Por ese motivo y tras una búsqueda bibliográfica se decidió utilizar el chitosán y sustituirlo por la celulosa HPMC.

El chitosán tiene un elevado interés en el campo farmacéutico debido a sus buenas propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad y falta de toxicidad, además de su amplia disponibilidad, bajo coste y alta versatilidad de uso (Dodane, V. y Vilivalam, V.D.,1998; Illum, L.,1998; Paul, W. y Sharma, C.P., 2000; Ritthidej, G.C. et al, 1994; Schippern, G. et al, 1997). Además, su capacidad para mejorar las propiedades de disolución y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles ha sido probada (Bhise, K.S. et al, 2007; Bhise, K.S. et al, 2008; Portero, A. et al, 1998) y en concreto se demostró la efectividad del chitosán para mejorar las propiedades de disolución del naproxeno (Corti, G. et al, 2008; Mura, P. et al, 2001; Maestrelli, F. et al, 2004; Zerrouk, N. et al, 2004). Finalmente, su actividad antiácida y antiulcerosa (Ghosh, P. et al, 2012) le hacen ser un buen candidato para prevenir o reducir la irritación gástrica inducido por algunos principios activos, como ya se estudió con otros fármacos antiinflamatorios (Açikgoz, M. et al, 1995).

Para realizar estos estudios se probaron diferentes proporciones de chitosán con el resto de componentes, para conseguir una formulación con un perfil de disolución similar

a la formulación FS-10%. Por ese motivo lo primero que se hizo fue desarrollar diferentes formulaciones con chitosán y probar su velocidad de disolución.

La intención tras el desarrollo de las diferentes formulaciones con chitosán y conocer sus velocidades de disolución, es continuar con los estudios de estas nuevas formulaciones, empezando por la caracterización con estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IRTF), fotografía SEM, rayos x (XRDP) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Además, en un futuro se pretende probar esa formulación "in vivo" para comprobar que la nueva formulación tiene las mismas o mejores características que la formulación FS-10%.

7.2. MATERIALES:

7.2.1. Productos y Reactivos:

En estos estudios se utilizarán los siguientes productos y reactivos:

- Naproxeno y Naproxeno sódico obtenido de Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China). Donado por HC Clover.
- Croscarmelosa sódica producida por FMC (Philadelphia, USA).
- Chitosán de peso molecular medio, viscosidad de 200000 cps por Sigma-Aldrich®.
- Lauril sulfato sódico (SDS) obtenido por Sigma-Aldrich®.
- Ácido acético glacial (purity >99.8%) de por Sigma-Aldrich®
- Agua obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Billerica, USA).
- HCL obtenido Merck® (Darmstadt, Germany).
- Filtros Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF 0,45 µm).

Todos los reactivos y químicos utilizados tenían grado analítico.

7.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio:

- Tamices de diferentes diámetros.
- Estufa.
- Material de vidrio.
- Pequeño aparataje de laboratorio.
- Agitador Vortex.
- Agitador magnético-calefactor.
- Morteros de ágata.
- Balanza Mettler AG 104. Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach).
- Purificador de agua Milli-Q Millipore.
- Aparato velocidad de disolución Agilent 708-DS.

- Espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (Agilent Technologies, Shanghai, China)

7.2.3. Tratamiento de los datos:

Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA).

7.3. MÉTODOS:

7.3.1. Desarrollo de las formulaciones:

El desarrollo de estas nuevas formulaciones plantea nuevos retos, ya que la incorporación de chitosán y la eliminación de HPMC hizo que la elaboración de las formulaciones variase en comparación con las de los anteriores estudios.

Las primeras formulaciones que se elaboraron sin contar a las de referencia (naproxeno sódico y el naproxeno base), fueron formulaciones con las mismas proporciones de la fórmula de los estudios anteriores (FS-10%), pero con chitosán en vez de HPMC y a su vez, jugando con los porcentajes de chitosán. Tras esta primera fase se decidió elaborar formulaciones desde las más básicas a las más complejas, incluyendo variaciones de proporciones de los excipientes para conocer cual es mejor. Todas las formulaciones elaboradas en estos estudios se pueden ver en la siguiente tabla junto con su respectivo nombre y las proporciones de cada excipiente.

Tabla 25. Composición de las diferentes formulaciones empleadas con chitosán.

Código formulación	Naproxeno	Croscarmelosa sódica(%)	SDS (%)	Chitosán (%)
NAP Na	110mg	0	0	0
NAP	100mg	0	0	0
FSC-5%	100mg	10	10	5
FSC-10%	100mg	10	10	10
FSC-15%	100mg	10	10	15
FC-5%	100mg	5	0	0
FC-10%	100mg	10	0	0
FC-15%	100mg	15	0	0
FBCC-5%	100mg	5	0	5
FBCC-10	100mg	5	0	10
FBCC-15%	100mg	5	0	15
FACC-5%	100mg	10	0	5
FACC-10%	100mg	10	0	10
FACC-15%	100mg	10	0	15

Hay que tener en cuenta que los % de los excipientes son con respecto al naproxeno y no al % total en la formulación. Por ejemplo, para la formulación FACC-10%, por cada 100mg de naproxeno tiene 10mg de croscarmelosa sódica, 0mg de SDS y 10mg de chitosán.

7.3.2. Formulaciones sin excipientes:

Las formulaciones sin excipientes fueron las mismas ya usadas en los apartados anteriores, tanto NAP Na como NAP, es decir, las materias primas de naproxeno sódico y naproxeno base. Ambas formulaciones siguieron el mismo tratamiento que en los ensayos anteriores.

7.3.3. Formulaciones con excipientes:

7.3.3.1. Formulaciones surfactantes con chitosán: (FSC-5%, FSC-10%, FSC-15%)

Las formulaciones surfactantes con chitosán (FSC) son las que van a contener principio activo (naproxeno), tensioactivo (SDS), superdisgregante (croscarmelosa) y chitosán. Estas formulaciones tienen la misma composición que la formulación FS-10% pero cambiando la celulosa HPMC por chitosán en diferentes proporciones. Al cambiar uno de los componentes del conjunto, el procedimiento de formulación también se modificó.

En concreto van a tener un 10% de disgregante (croscarmelosa sódica), un 10% de tensioactivo (SDS) y un 5, 10 y 15% de chitosán y se nombraron como FSC-5%, FSC-10%, FSC-15% respectivamente.

Estas formulaciones de rápida disolución son preparadas según el siguiente procedimiento: Se pesaron 500 mg de naproxeno Base y 50 mg de croscarmelosa sódica (superdisgregante) a los cuales se le añadió 750 µl de agua y se trabajó hasta mezcla homogénea. Por otro lado, se añadió a un mortero ágata 25, 50 y 75mg de chitosán, dependiendo de la formulación, correspondiendo a las formulaciones FSC-5%, FSC-10% y FSC-15%. La cantidad de chitosán correspondiente a cada formulación se humectó con 150 µl de anhídrido acético y se trabajó con mano de mortero hasta pasta

homogénea. Este proceso es determinante ya que con el anhídrido acético lo que se produjo es la parcial acetilación del quitosán (Anraku, M. et al, 2010). Una vez incorporado el anhídrido acético al quitosán, se añadió la mezcla de naproxeno con croscarmelosa sobre el mortero con quitosán y por último se trabajó con mano del mortero hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez se consiguió la mezcla homogénea de todos los componentes de la formulación se dejó secar en una estufa a 40°C durante 3h. Pasado ese tiempo se tamizó la mezcla a través de diferentes tamices hasta lograr aislar la fracción comprendida entre los 0,297-0,840 mm. Lograda la fracción deseada se dejó secar por completo durante 24h en una estufa a una temperatura de 40°C.

7.3.3.2. Formulaciones con croscarmelosa: (FC-5%, FC-10%, FC-15%)

Las formulaciones con croscarmelosa sódica (FC) son las que van a contener sólo principio activo (naproxeno base) y superdisgregante (croscarmelosa). Estas formulaciones se desarrollaron para conocer qué proporción de superdisgregante obtiene mejores resultados sin el uso de ningún excipiente más.

En concreto van a tener un 5, 10 y 15% de superdisgregante (croscarmelosa sódica), y se nombraron como FC-5%, FC-10% y FC-15% respectivamente.

Estas formulaciones de rápida disolución son preparadas según el siguiente procedimiento: Se pesaron 500 mg de Naproxeno Base y 25, 50 y 75mg de croscarmelosa (superdisgregante) correspondiendo cada cantidad de croscarmelosa a las formulaciones FC-5%, FC-10% y FC-15% respectivamente. Una vez pesadas las cantidades correspondientes de ambas materias se añadió 750 µl de agua y se trabajó hasta conseguir una mezcla homogénea se dejó secar en una estufa a 40°C durante 3h. Pasado ese tiempo se tamizó la mezcla a través de diferentes tamices hasta lograr aislar la fracción comprendida entre los 0,297-0,840 mm. Lograda la fracción deseada se dejó secar p durante 24h en una estufa a una temperatura de 40°C.

7.3.3.3. Formulaciones de baja proporción de croscarmelosa y chitosán: (FBCC-5%, FBCC-10% y FBCC-15%).

Las formulaciones de baja proporción de croscarmelosa sódica y con chitosán (FBCC) son las que van a contener principio activo (naproxeno base), superdisgregante (croscarmelosa sódica) y chitosán. Estas formulaciones al contrario que la de partida (FS-10%), no contiene ni tensioactivo (SDS) ni HPMC.

Estas formulaciones presentan un 5% de disgregante (croscarmelosa sódica), y además una cantidad variante de chitosán (5, 10 y 15%). Estas formulaciones se nombraron como FBCC-5%, FBCC-10%, FBCC-15% respectivamente.

Estas formulaciones de rápida disolución son preparadas según el siguiente procedimiento: Se pesaron 500 mg de naproxeno Base y 25 mg de croscarmelosa (superdisgregante) a los cuales se le añadió 750 µl de agua y se trabajó hasta mezcla homogénea. Por otro lado, se añadió a un mortero ágata 25, 50 y 75mg de chitosán, dependiendo de la formulación, correspondiendo a las formulaciones FBCC-5%, FBCC-10% y FBCC-15%. La cantidad de chitosán correspondiente a cada formulación se humectó con 150 µl de anhídrido acético y se trabajó con mano de mortero hasta pasta homogénea. Una vez incorporado el anhidro acético al chitosán, se añadió la mezcla de naproxeno con croscarmelosa sobre el mortero con chitosán y por último se trabajó con mano del mortero hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez se consiguió la mezcla homogénea de todos los componentes de la formulación se dejó secar en una estufa a 40°C durante 3h. Pasado ese tiempo se tamizó la mezcla a través de diferentes tamices hasta lograr aislar la fracción comprendida entre los 0,297-0,840 mm y se dejó secar durante 24h en una estufa a una temperatura de 40°C.

7.3.3.4. Formulaciones de alta proporción de croscarmelosa y chitosán: (FACC-5%, FACC-10% y FACC-15%).

Las formulaciones de alta proporción de croscarmelosa con chitosán (FACC) son las que van a contener principio activo (naproxeno base), superdisgregante (croscarmelosa sódica) y chitosán. Es decir, estas formulaciones son iguales que las anteriores, pero sólo modificando la cantidad de croscarmelosa.

Estas formulaciones contienen un porcentaje del 10% de disgregante (croscarmelosa sódica), y además una cantidad variante de chitosán (5, 10 y 15%). Estas formulaciones se nombraron como FACC-5%, FACC-10%, FACC-15% respectivamente.

Estas formulaciones de rápida disolución son preparadas según el siguiente procedimiento: Se pesaron 500 mg de Naproxeno Base y 50 mg de croscarmelosa (superdisgregante) a los cuales se le añadió 750 µl de agua y se trabajó hasta mezcla homogénea. Por otro lado, se añadió a un mortero ágata 25, 50 y 75mg de chitosán, dependiendo de la formulación, correspondiendo a las formulaciones FACC-5%, FACC-10% y FACC-15%. La cantidad de chitosán correspondiente a cada formulación se humectó con 150 µl de anhídrido acético y se trabajó con mano de mortero hasta pasta homogénea. Una vez incorporado el anhidro acético al chitosán, se añadió la mezcla de naproxeno con croscarmelosa sobre el mortero con chitosán y por último se trabajó con mano del mortero hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez se consiguió se secó y se tamizó como el resto de las formulaciones anteriores.

7.3.4. Estudios de velocidad de disolución:

Los ensayos se realizaron cumpliendo condiciones SINK, para lo cual, empleamos una cantidad correspondiente de naproxeno base de 18,2mg en cada una de las formulaciones para evitar que se produzca la saturación del medio.

Teniendo en cuenta la cantidad de naproxeno base o sódico de cada formulación, la cantidad total de cada formulación fue la siguiente: NAP Na= 20mg (equivalente a 18,2 mg de Naproxeno base). NAP= 18,2mg; FSC-5%= 22,7mg; FSC-10%=23,66mg; FSC-15%= 24,57mg; FC-5%= 19,11mg; FC-10%= 20,02mg; FC-15%=20,93mg; FBCC-5%= 20,02mg; FBCC-10%= 20,93mg; FBCC-15%= 21,84mg; FACC-5%= 20,93mg; FACC-10%= 21,84mg; FACC-15%= 22,75mg;

Esta cantidad de naproxeno es debida a que una cantidad mayor llegaría a la saturación del ensayo en la velocidad de disolución.

El método que se llevó a cabo para realizar los estudios de velocidades de disolución fue el del método USP de agitación por paletas (tipo 2), con un equipo de disolución Agilent 708-DS con las siguientes características: 900 ml de un medio de disolución a pH 1,2 (ácido clorhídrico 0,1 M), a una velocidad de 50 rpm y con una temperatura del medio de $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Muestras de 5mL se recogieron en intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos y fueron filtradas a través de un filtro Millipore (Millex-HV, PVDF hidrófilo 0,45 μm).

La cantidad de naproxeno se determinó a 270 nm con un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (Agilent Technologies, Shanghai, China).

Para cada formulación y cada tiempo de muestra se hicieron ensayos por triplicado con su desviación estándar correspondiente. Todos los ensayos de esta parte siguieron el procedimiento de estudios anteriores (García-Herrero, V. et al, 2017).

7.4. RESULTADOS:

7.4.1. Resultados ensayos velocidad disolución:

A través de los estudios de velocidad de disolución de las distintas formulaciones se realizaron las gráficas donde se muestran los diferentes perfiles de disolución, dividiéndose en los diferentes grupos de formulaciones. Todas las formulaciones se hicieron por triplicado con su desviación estándar correspondiente. En los datos de las gráficas se muestran los % de naproxeno liberado a cada tiempo del estudio. Las formulaciones de NAP y NAP Na, es decir las de principio activo sin ningún excipiente se hicieron como referencia para conocer si las nuevas formulaciones mejoraban los datos de éstas.

7.4.1.1. Formulaciones surfactantes con chitosán: (FSC-5%, FSC-10%, FSC-15%):

Los primeros resultados que se obtuvieron fueron los que se dieron de las formulaciones basadas en la FS-10%, es decir, en las formulaciones en las que se cambiaba HPMC por chitosán.

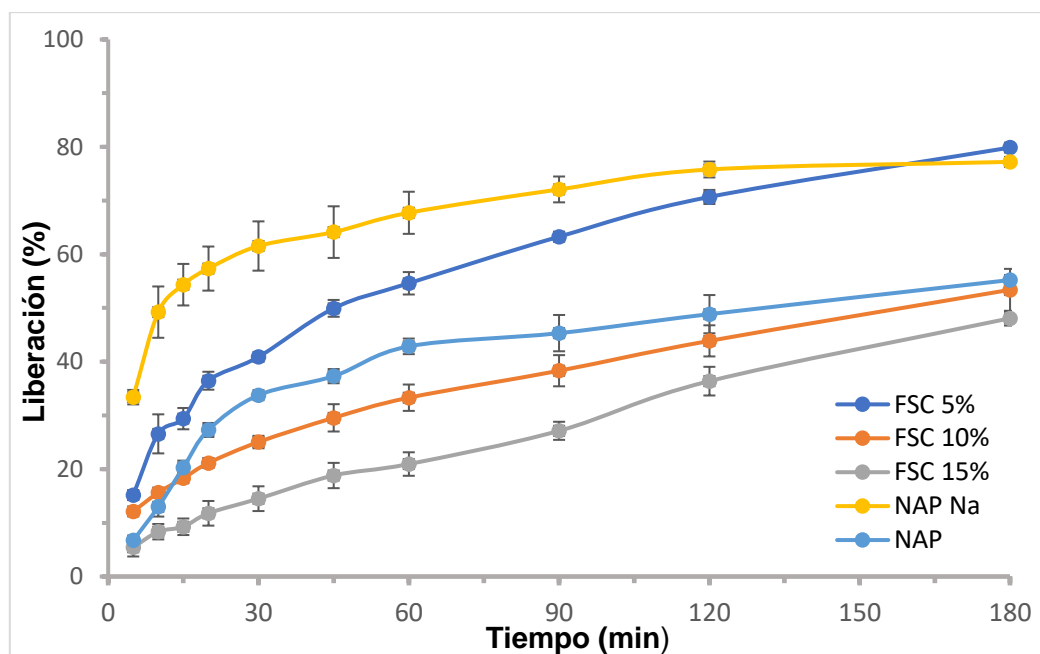


Figura 33. Velocidad de disolución para las formulaciones de NAP, NAP Na, FSC-5%, FSC-10% y FSC-15%.

Lo primero que se observa es una gran diferencia en los perfiles de disolución que tienen excipientes frente a los que no tienen y eso que el naproxeno es hidrofóbico y el pequeño tamaño de las partículas de naproxeno favorecen la aglomeración, obstaculizan la humectabilidad y retrasan la disolución (Li, H. et al, 2015). En esta grafica se observa que todas las formulaciones con excipientes son bastante peor que la formulación de NAP Na y sólo una, FSC-5% es mejor que la de NAP. Sin embargo, cuando comparamos esta formulación FSC-5% con la formulación NAP Na a los 30 min tiene un porcentaje disuelto de $61,54 \pm 4,59$ frente los $40,88 \pm 0,54$ de FSC-5%, que es la mejor formulación con excipientes. En este estudio se puede desprender varias conclusiones, una es que un exceso de cantidad de chitosán, favorece un perfil de liberación más sostenido del naproxeno base. Así la única que ha conseguido liberar más del 50% ha sido la que menor cantidad de chitosán contenía (FSC-5%).

Estos valores de disolución tan bajos son debido a que el cambio de HPMC por chitosán y la presencia del tensioactivo SDS hace, que los cristales de naproxeno queden encerrados en el entramado de la matriz de chitosán y la presencia de estas proporciones de SDS en la formulación no sean capaces de mejorar la disolución del naproxeno durante los primeros tiempos del estudio de disolución. Posiblemente, durante el proceso de granulación, el polímero hidrófilo HPMC que se usaba en las otras formulaciones se posicionaba en la superficie anhidra de los cristales de naproxeno, lo que mejoraba su interacción con el medio acuoso. La ausencia de este polímero hidrofílico y la presencia de la matriz de chitosán dificulta la disolución del naproxeno. Otra de las causas es la interacción que se produce entre el chitosán y el tensioactivo SDS, ya que el tensioactivo se queda atrapado en el chitosán y puede no favorecer a la disolución del Naproxeno (Worthen, A.J. et al, 2019).

A raíz de estos resultados, se decidió reconstruir la formulación desde el principio y se comenzó modificando los porcentajes del superdisgregante (croscarmelosa sódica).

7.4.1.2. Formulaciones croscarmelosa: (FC-5%, FC-10% y FC-15%)

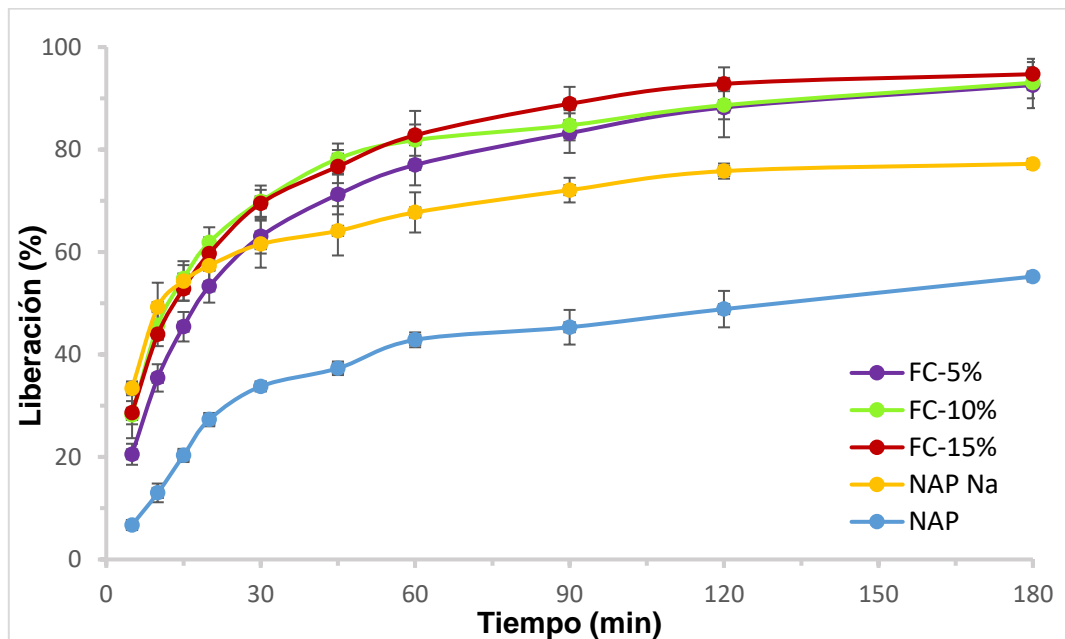


Figura 34. Velocidad de disolución para las formulaciones de NAP, NAP Na, FC-5%, FC-10% y FC-15%.

La adición de distintas proporciones de disgregante croscarmelosa sódica a la formulación de naproxeno (FC-5%, FC-10% y FC-15%) produjo un aumento en la disolución en comparación con los principios activos sin excipientes y además también aumentó con respecto a las formulaciones anteriores de FSC-5%, FSC-10% y FSC-15%. Los disgregantes hidrofílicos, en este caso la (croscarmelosa sódica) produjo un aumento del carácter hidrófilo en la superficie del naproxeno favoreciendo la velocidad de disolución. Este efecto se puede comprobar al comparar los datos obtenidos entre la formulación NAP o NAP Na y las FC-5%, FC-10% y FC-15%. El % de disolución a los 30 min fue superior en cualquiera de las formulaciones de croscarmelosa con respecto a las de NAP o NAP Na. Estos datos confirmaron que sí que hay diferencias significativas entre las formulaciones que contienen croscarmelosa (FC-5%, FC-10% y FC-15%) y las formulaciones de referencia NAP base y NAP Na.

Sin embargo, hay que destacar que se observaron porcentajes de disolución similares entre todas las formulaciones con croscarmelosa, tanto al 5% (FC-5%), al 10% (FC-

10%) y como al 15% (FC-15%) (ver Fig. 34). Los datos de las formulaciones (FC-10%) y (FC-15%) son prácticamente iguales lo que nos permiten considerar que la adición del 10% de disgregante es suficiente para permitir la máxima interacción entre la superficie del principio activo y el agua (Maghsoodi, M. et al, 2008). Sin embargo, la formulación con 5% aunque fue significativamente algo menor, no lo fue demasiado. Estos resultados hacen que también tengamos en cuenta este porcentaje de croscarmelosa sódica al 5% en los futuros estudios, ya que al incorporar el chitosán, un exceso de croscarmelosa podría afectar negativamente, por ese motivo se decidió seguir con el desarrollo de la formulación tanto con 5% de croscarmelosa como con el 10%.

7.4.1.3. Formulaciones con bajos porcentajes de croscarmelosa y chitosán: (FBCC-5%, FBCC-10%, FBCC-15%).

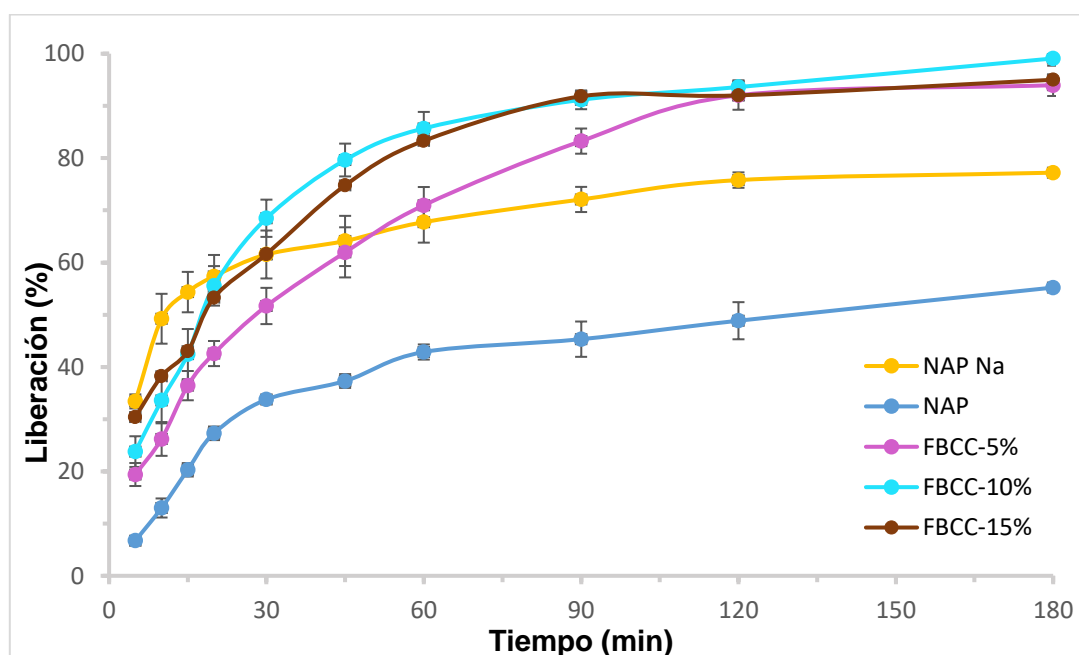


Figura 35. Velocidad de disolución para las formulaciones de NAP, NAP Na, FBCC-5%, FBCC-10% y FBCC-15%.

Estas formulaciones contienen cantidades fijas de naproxeno base, de croscarmelosa (5%) y una cantidad variable de chitosán, que fueron del 5%, 10% y 15%.

A través de los datos obtenidos se pudo saber que con una proporción del 5% de croscarmelosa y un 10% o 15% de chitosán, a los 45 min mejoran los resultados con respecto a las formulaciones de referencia. Sin embargo, un bajo porcentaje de chitosán con bajo porcentaje de croscarmelosa no obtiene buenos resultados para nuestra formulación, ya que hasta los 90min no se obtienen mejores resultados frente a los de referencia. Cabe destacar que entre las 2 formulaciones que tienen buenos resultados FBCC-10% y FBCC-15% existen diferencias significativas tanto a los 30 como a los 45min, ya que la formulación de FBCC-10% tiene $68,48 \pm 3,57$ y $79,64 \pm 2,14$ frente a los $61,62 \pm 3,09$ y $74,78 \pm 2,04$. Posiblemente, la concentración excesiva de chitosán en estas formulaciones hace que el naproxeno se quede atrapado dentro de la matriz de chitosán y no pueda disolverse con mayor rapidez (Abioye, A.O. et al, 2016). Por tanto, estos resultados son buenos ya que nos revelan que tanto un exceso de chitosán (15%) como un defecto (5%) hacen que no se obtengan resultados óptimos para la liberación del naproxeno. Por tanto, la formulación que se selecciona con bajos porcentajes de croscarmelosa es la que contiene un 10% de chitosán (FBCC-10%).

7.4.1.4. Formulaciones con altos porcentajes de croscarmelosa y chitosán: (FACC-5%, FACC-10%, FACC-15%).

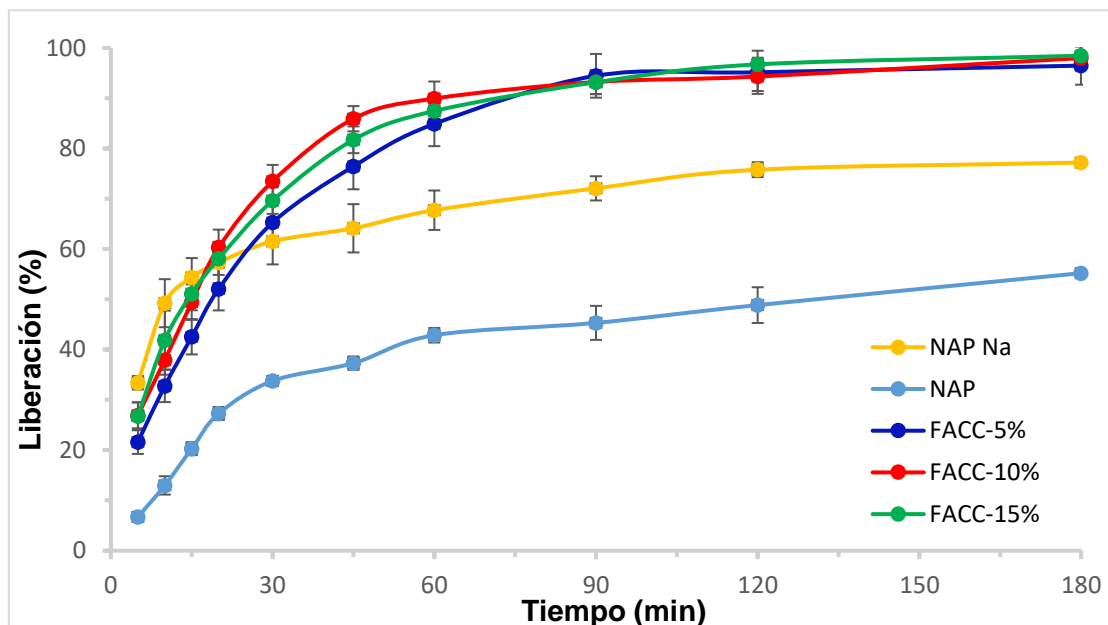


Figura 36. Velocidad de disolución para las formulaciones de NAP, NAP Na, FACC-5%, FACC-10% y FACC-15%.

Las formulaciones con altos porcentajes de croscarmelosa con chitosán contienen cantidades fijas de naproxeno base, de croscarmelosa (10%) y cantidades variables de chitosán, que fueron del 5%, 10% y 15%.

A través de los datos obtenidos se pudo saber que con una proporción del 10% de croscarmelosa y un 5%, 10% o 15% de chitosán desde los 30min se mejoran los resultados con respecto a las formulaciones de referencia NAP base y NAP Na. Antes de esos 30 min la formulación NAP Na es la mejor, pero hay que tener en cuenta que ésta tiene una gran variabilidad "in vitro", gran desviación entre ensayos, lo que podría explicar la mayor variabilidad entre sujetos observada para T_{max} en diferentes estudios farmacocinéticos de NAP Na en humanos (Choi, H.G. et al, 2015).

Por tanto, a partir de los 30 min cualquier formulación con chitosán, es mejor que las de referencia. Sin embargo, tanto con un bajo porcentaje de chitosán (5%), como un alto

porcentaje (15%), obtienen peores resultados que un porcentaje medio de chitosán, esto ocurre igual que en las formulaciones anteriores en los que la croscarmelosa estaba en baja concentración. Estos resultados nos confirman que el excipiente limitante en la formulación, no es la croscarmelosa, sino el chitosán, que necesita una determinada cantidad media para ayudar a la liberación, ya que un bajo porcentaje de croscarmelosa no ayuda a la liberación del naproxeno y un exceso de chitosán produce una estructura matricial que entorpece la liberación del principio activo.

Estos resultados nos revelan que las formulaciones que contienen un porcentaje medio son las que tienen mejores resultados, en este caso, la formulación seleccionada fue la que contiene un 10% de chitosán (FACC-10%).

7.4.1.5. Todas las formulaciones:

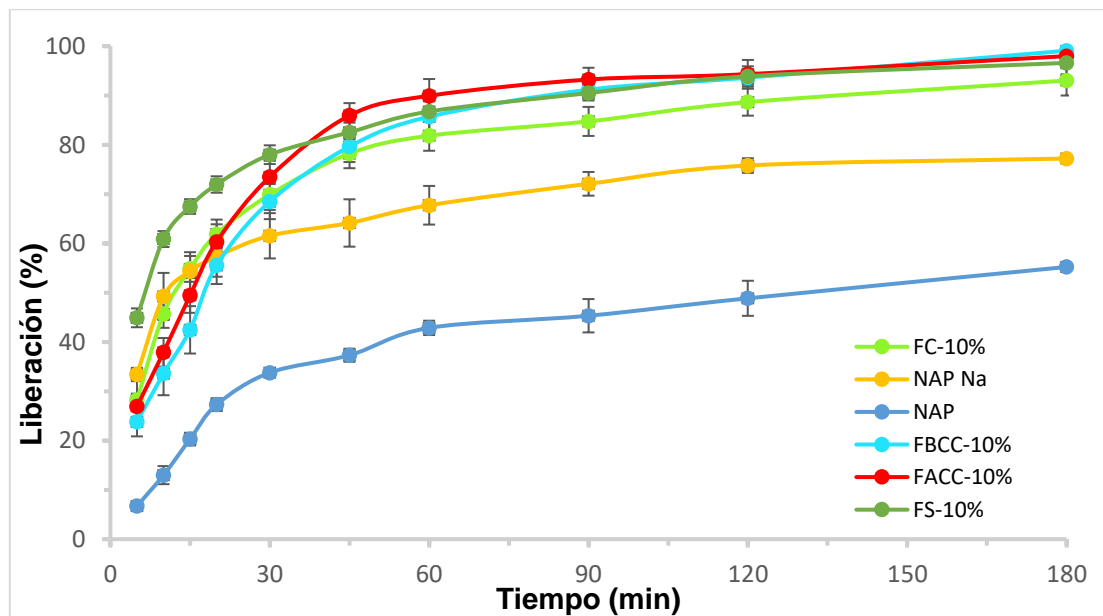


Figura 37. Velocidad de disolución para las formulaciones de NAP, NAP Na, FC-10%, FS-10%, FBCC-10% y FACC-10%.

En esta gráfica se han incorporado las formulaciones sin excipientes de referencia NAP base y NAP Na, junto con las mejores formulaciones de cada grupo. Lo primero que se observa es la mejora que se produce en los perfiles de disolución de las formulaciones que contienen excipientes frente a las formulaciones de referencia NAP base y NAP Na.

Además, en esta última gráfica se han incorporado los valores que se obtuvieron en estudios anteriores “in vitro” de la formulación FS-10% para saber si alguna de estas nuevas formulaciones mejora los resultados de FS-10%.

En este sentido, durante los primeros 20 min, FS-10% tiene mejores resultados que cualquiera de las nuevas formulaciones, sin embargo, a partir de los 30 min ya no existe diferencias significativas con FACC-10% e incluso a partir de los 45 min la nueva formulación ya tiene mejores resultados que FS-10%.

En esta gráfica se ha comprobado que la mejor formulación de las nuevas, es FACC-10%. Esta nueva formulación es algo más lenta durante los primeros 20 min que FS-10%, pero a partir de los 30 min es igual o mejor, y por tanto, es un buen resultado ya que podría obtener resultados “in vivo” muy semejantes a FS-10% e incluso podría tener mayores beneficios al incorporar el chitosán que podría tener un efecto gastroprotector.

7.5. DISCUSIÓN FINAL:

La intención de esta parte experimental era conseguir una formulación de naproxeno base que tuviera un perfil de disolución rápido semejante al encontrado con la formulación FS-10% pero que incorporase en la formulación el chitosán.

A través de los diferentes ensayos de velocidad de disolución y las diferentes formulaciones, se lograron perfiles de disolución semejantes a la formulación FS-10%. Para la elaboración de estas nuevas formulaciones de chitosán se tuvieron que hacer cambios y eliminar de la formulación la celulosa HPMC y el tensioactivo SDS; éste último debido a la interacción que sufría con el chitosán y que producía que en vez de crear una liberación más rápida, el naproxeno se quedase encerrado y tardase más en su liberación. Además, a través de los diferentes estudios se observa que tanto un defecto como un exceso de cantidad de chitosán, hace que el naproxeno no se libere rápidamente, llegando a la conclusión de que un 10% de chitosán con respecto al naproxeno es el porcentaje óptimo.

A raíz de todos los ensayos realizados se llegó a la conclusión de que la formulación FACC-10% presenta los perfiles de disolución más rápidos y es la que podría probarse en diferentes estudios para comprobar, si además de una liberación de naproxeno rápida y óptima, se consigue un efecto gastroprotector al incorporar el chitosán.

Por tanto, la formulación FACC-10% es la elegida para continuar en un futuro con diferentes experimentos "in vivo" en los cuales se comprobaría su farmacocinética e incluso se podría estudiar la eficacia de esta nueva formulación con chitosán frente a otras. Estos estudios "in vivo" podrían consistir en primer caso, en un estudio de farmacocinética semejante al ya realizado en anteriores formulaciones, para comprobar su liberación y distribución. Posteriormente un estudio para ver si la presencia del chitosán disminuye la gastrotoxicidad del naproxeno. En el estudio de eficacia se comprobaría si esta formulación tiene mejores resultados frente a otras formulaciones antiinflamatorias con el uso prolongado; ya que la incorporación del chitosán y la

eliminación de tensioactivos, hace que esta formulación pudiera producir menos lesiones en el tracto gastrointestinal durante el uso prolongado frente a otras formulaciones antiinflamatorias.

7.6. FUTUROS ESTUDIOS:

Esta parte experimental no está acabada, ya que aún faltan muchas pruebas y ensayos por completar. La situación que hemos vivido durante el último año y en especial en Chile, ha hecho que algunos experimentos no se hayan podido realizar, pero en un futuro próximo se pretenden continuar con los mismos y completar los estudios de estas formulaciones. Además, durante la estancia se colaboró en otros estudios del grupo de investigación, consiguiendo publicar algunos de esos estudios. (Arriagada, F. et al, 2020)

Algunos de los estudios que se van a hacer para continuar y terminar con esta parte, son estudios de caracterización y del grado de acetilación.

Los estudios de caracterización y humectabilidad serían semejantes a los hechos en otros estudios de la tesis e incluirían estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IRTF), fotografías a través de microscopio electrónico de barrido (SEM), rayos x (XRDP) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Estos estudios intentarían explicar los resultados observados en los estudios de velocidades de disolución.

Los estudios del grado de acetilación del chitosán mediante estudios de IRTF podrían permitirnos ajustar la cantidad de anhídrido acético incorporado al chitosán.

Con la realización de estos últimos estudios de caracterización y los ya aportados de velocidad de disolución se pretende conseguir una publicación internacional. En un futuro un poco más lejano se pretende hacer estudios farmacocinéticos y de eficacia “in vivo” con la formulación más prometedora con chitosán que hasta este momento es FACC-10%.

El estudio farmacocinético “in vivo” nos permitirá relacionar que los resultados obtenidos “in vitro” se reproducen también en estudios “in vivo” para obtener una formulación de liberación rápida de naproxeno base. Por otro lado, realizar un estudio de eficacia

analgésica y un estudio de administración prolongada, para evaluar la posible disminución de la irritación gastrointestinal de esta formulación frente a otras formulaciones antiinflamatorias. Este beneficio podría darse debido a que el uso continuado de antiinflamatorios afecta a la mucosa gastrointestinal y al posible efecto protector de las mucosas que presenta el chitosán. Por tanto, un estudio de eficacia “in vivo” en el que se comparasen diferentes formulaciones antiinflamatorias comerciales frente a la formulación de chitosán, sería un buen estudio para conocer la capacidad protectora de éste en formulaciones antiinflamatorias durante un uso prolongado.

7.7. BIBLIOGRAFÍA:

- Abioye, A.O., Armitage, R., Kola-Mustapha, A.T., (2016). Thermodynamic Changes Induced by Intermolecular Interaction Between Ibuprofen and Chitosan: Effect on Crystal Habit, Solubility and In Vitro Release Kinetics of Ibuprofen. *Pharm Res.* 33(2):337-57.
- Açikgoz, M., Kas, H.S., Haşçelik, Z., Milli, U., Hincal, A.A., (1995). Chitosan microspheres of diclophenac sodium. II: In vitro and in vivo evaluation, *Pharmazie* 50. 275–277.
- Anraku, M., Arahira, M., Mady, F.M., Khaled, K.A., Yamasaki, K., Seo, H., Imai, T., Otagiri, M., (2010). Enhancement of dissolution and bioavailability of flurbiprofen by low molecular weight chitosans. *Pharmazie.* 65(7):461-6.
- Arriagada, F., Ugarte, C., Günther, G., Larraín, M. A., Guarnizo-Herrero, V., Nonell, S., Morales, J. (2020). Carminic Acid Linked to Silica Nanoparticles as Pigment/Antioxidant Bifunctional Excipient for Pharmaceutical Emulsions. *Pharmaceutics*, 12(4), 376.
- Bhise K.S., Dhumal R.S., Chauhan B., Paradkar A.R., Kadam S.S., (2007). Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling, erosion and drug release from chitosan matrices. *AAPS PharmSciTech.* 8(2): Article 44.
- Bhise K.S., Dhumal R.S., Paradkar A.R., Kadam S.S., (2008). Effect of drying methods on swelling, erosion and drug release from chitosan–naproxen sodium complexes. *AAPS PharmSciTech.* 9:1–12.
- Choi, H.G., Jeon, J.Y., Kwak, S.S., Kim, H., Jin, C., Im, Y.J., Kim, E.Y., Wang, H.M., Kim, Y., Lee, S.Y., Kim, M.G., (2015). Pharmacokinetic comparison study of a combination containing 500 mg of Naproxen and 20 mg of Esomeprazole: a randomized single-dose, 2-way crossover, open-label study in healthy Korean men. *Clin. Ther.* 1, 83–93.

- Corti, G., Maestrelli, F., Cirri, M., Mura, P., Zerrouk, N., (2008). Dissolution and permeation properties of naproxen from solid-state systems with chitosan. *Drug Deliv.* 15(5):303-12.
- Dodane, V., Vilivalam, V.D., (1998). Pharmaceutical Applications of Chitosan. *Pharmaceutical Science Technology Today*, 1, 246-253.
- García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, J. J., López-Sánchez, A., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., (2017). Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 529, 381–390.
- Ghosh, P., Bhise, K.S., Paradkar, A.R., Bodhankar, S.L., Kadam, S.S., (2012). Reduced ulcerogenic potential and antiarthritic effect of chitosan-naproxen sodium complexes. *AAPS PharmSciTech.* (3):896-902.
- Illum, L., (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.* 15. 1326–1331.
- Li, H., Thompson, M.R., O'Donnell, K.P., (2015). Examining drug hydrophobicity in continuous wet granulation within a twin screw extruder. *Int. J. Pharm.* 496, 3–11.
- Maestrelli, F., Zerrouk, N., Chemtob, C., Mura, P., (2004). Influence of chitosan and its glutamate and hydrochloride salts on naproxen dissolution rate and permeation across Caco-2 cells. *Int J Pharm.* 1;271(1-2):257-67.
- Maghsoodi, M., Taghizadeh, O., Martin, G.P., Nokhodchi, A., (2008). Particle design of naproxen-disintegrant agglomerates for direct compression by a crystallo-coagglomeration technique. *Int. J. Pharm.* 351, 45–54.
- Mura, P., Zerrouk, N., Faucci, M.T., Mennini, N., Chemtob, C., (2001). Effect of chitosan on dissolution properties of naproxen, in: G. Barratt, D. Duchene, F. Fattal, J.Y. Legendre (Eds.), *New Trends in Polymers for Oral and Parenteral*

Administration: From Design to Receptors, Editions de Sante', Paris. pp. 192–195.

- Paul, W., Sharma, C.P., (2000). Chitosan, a drug carrier for the 21th century, STP Pharma Sci. 10, 5–22.
- Portero, A., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., (1998). Effect of chitosan and chitosan glutamate enhancing the dissolution properties of the poorly water soluble drug nifedipine, Int. J. Pharm. 175, 75–84.
- Ritthidej, G.C., Chomto, P., Pummangura, S., Menasveta, P., (1994). Chitin and Chitosan as disintegrants in paracetamol tablets, Drug Dev. Ind. Pharm. 20, 2109–2134.
- Schippern, G., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., Deboer, A.G., Varum, K.M., Artursson, P., (1997). Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs, Pharm. Res. 14, 923–929.
- Worthen, A.J., Irving, K.S., Lapitsky, Y., (2019). Supramolecular Strategy Effects on Chitosan Bead Stability in Acidic Media: A Comparative Study. Gels. 25;5(1):11.
- Zerrouk, N., Mennini, N., Maestrelli, F., Chemtob, C., Mura, P., (2004). Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. Eur J. Pharm Biopharm. 57, 93–99.

VIII.

CONCLUSIONES-CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONES-CONCLUSIONS

8.1. CONCLUSIONES:

1. La adición de determinados excipientes hace que se mejoren las características del naproxeno base materia prima. La adición de (HPMC) y croscarmelosa sódica permiten la elaboración de dispersiones sólidas. La incorporación de SDS permite elaborar sistemas micelares que mejoran la disolución del naproxeno.
2. La formulación que mejores resultados obtuvo, tanto en los estudios de caracterización como sobre todo en los ensayos de velocidad de disolución, fue la denominada en este trabajo como FS-10%.
3. La utilización de diferentes métodos para la caracterización de formulaciones, como la microscopia electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido, son imprescindibles para conocer y entender las propiedades y los efectos que tienen los excipientes en las diferentes formulaciones.
4. La utilización de sistemas micelares de naproxeno en estudios "in vivo", da como resultado que estos sistemas micelares tengan concentraciones más altas de naproxeno a nivel plasmático y cerebral en comparación con el naproxeno materia prima. Los sistemas micelares con SDS mostraron una mayor concentración tanto plasmática como cerebral que las micelas (Cremophor® RH 40) o (Tween® 80).
5. El método de HPLC submicelar con detección por fluorescencia es un método analítico óptimo para la cuantificación de naproxeno en bajas concentraciones. Este método al utilizar en su fase móvil un surfactante, incrementa la detección por fluorescencia, permitiendo cuantificar concentraciones muy bajas de

naproxeno en cerebro. Este método quedó comprobado y validado a través de los estudios de farmacocinética "in vivo".

6. Los estudios de farmacocinética "in vivo" muestran que la formulación FS-10% obtuvo unos resultados de biodisponibilidad superiores al naproxeno de referencia. Todos los parámetros estudiados (AUC_{0-2h} , C_{max} y T_{max}) tuvieron resultados significativamente mejores.
7. La formulación FS-10% alcanza mayores niveles plasmáticos y cerebrales de naproxeno en un tiempo menor y, por lo tanto, la formulación FS-10% podría ser un tratamiento más adecuado para tratar los ataques de migraña con respecto a la formulación de referencia.
8. La incorporación de chitosán a la formulación FS-10%, y la eliminación en ésta de HPMC y SDS, da unos resultados de velocidad de disolución semejantes a los de FS-10%. Además, se espera que la adición de chitosán a la formulación, pueda ser eficaz para disminuir la irritación gástrica que produce el naproxeno.

8.2. CONCLUSIONS:

1. The addition of certain excipients improves the characteristics of the naproxen raw material. The addition of (HPMC) and croscarmellose allows for the production of solid dispersions. The addition of SDS allows for the elaboration of micellar systems that improve the dissolution of Naproxen.
2. The formulation which obtained the best results, both in characterization studies and mainly in dissolution rate tests, was the one so-called in this work as FS-10%.
3. The use of different methods for the characterization of formulations, such as scanning electron microscopy, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry, are essential to know and understand the properties and effects that excipients have on different formulations.
4. The use of naproxen micellar systems in "in vivo" studies results in these micellar systems having higher concentrations of naproxen at the plasma and brain level, compared to the naproxen raw material. Micellar systems with SDS showed higher concentrations at both plasma and brain levels than either of the micelles (Cremophor® RH 40) or (Tween® 80).
5. The submicellar HPLC method with fluorescence detection is an optimal analytical method for quantifying naproxen at low concentrations. This method, via using a surfactant in its mobile phase, increases the detection by fluorescence, allowing the quantification of very low concentrations of naproxen in biological brain samples. This method was tested and validated through "in vivo" pharmacokinetic studies.

6. "In vivo" pharmacokinetic studies showed that the FS-10% formulation achieved bioavailability results higher than the reference naproxen raw material. All measured parameters (AUC_{0-2h} , C_{max} , T_{max}) had significantly better results.

7. The FS-10% formulation reaches higher plasma and brain levels of naproxen in a shorter time and, therefore, the FS-10% formulation could be a more suitable treatment for treating migraine attacks with respect to the reference.

8. The incorporation of chitosan into the FS-10% formulation, and the elimination of HPMC and SDS from the formulation, gave dissolution rate results similar to those of FS-10%. Thus, chitosan could replace these two excipients and, moreover, could reduce the gastric irritation caused by naproxen.

**IX. ANEXO 1:
PUBLICACIÓN 1**



Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: *In vitro* and *in vivo* studies



Víctor García-Herrero^a, Carlos Torrado^a, Juan José García-Rodríguez^b,
Alicia López-Sánchez^a, Susana Torrado^{a,c}, Santiago Torrado-Santiago^{a,c,*}

^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain

^b Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain

^c Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2017

Received in revised form 3 July 2017

Accepted 8 July 2017

Available online 11 July 2017

Chemical compounds studied in this article:

Naproxen (PubChem CID:156391)

Naproxen sodium (PubChem

CID:23681059)

Sodium dodecyl sulfate (PubChem

CID:3423265)

Hypromellose (PubChem CID:57503849)

Keywords:

Naproxen

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

Surfactant

Disintegrant

Dissolution rate

Oral bioavailability

ABSTRACT

In this study, a new surface-modified naproxen was developed to enhance brain concentration in acute migraine treatment. Fast-dissolving naproxen granules were made by mixing hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) sodium dodecyl sulphate (SDS) and sodium croscarmellose with micronized naproxen particles. The aim of this study was to evaluate the effect of adding proportions of SDS to the HPMC film caused changes in the polymer chains of the HPMC, producing a new hydrophilic HPMC-SDS structure. These formulations with different HPMC/SDS ratios were characterised using electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), and differential scanning calorimetry (DSC). SDS 10% (w/w) produced a highly hydrophilic HPMC-SDS structure on the surface of the naproxen microparticles. The fast dissolution granules (SF-10%) showed a significant improvement in the dissolution rate of naproxen. Pharmacokinetic studies were conducted with mice, showing an improvement of C_{max} (1.38 and 1.41-fold) and AUC_{0-2h} (30% and 10% higher) for plasma and brain samples compared to the reference naproxen suspension. The faster T_{max} ratio for SF-10% may be related to increased hydration in the gastrointestinal environment, enabling the drug to permeate the gastrointestinal hydration layer more easily due to the presence of the hydrophilic HPMC-SDS structure in the formulation.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Migraine is a complex condition with a wide variety of symptoms. For many people, its main feature is a painful headache. Other symptoms include feeling sick, vomiting and sensitivity to light and sound. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used to treat migraine headaches (Sheshala et al., 2011).

A rapid onset of the therapeutic effect is required in acute migraine attacks (Girotra and Singh, 2016). Different drugs used for migraine attacks such as sumatriptan, rizatriptan and zolmitriptan, and analgesics such as ibuprofen and naproxen, have been investigated to develop rapid dissolution systems. There has been

an increase in the development of new treatments for these acute conditions, including fast-disintegrating tablets (Sheftell et al., 2005; Sheshala et al., 2011; Stange et al., 2014).

Naproxen has been reported to have low permeability and prolonged absorption throughout the gastrointestinal tract (Figueroa and Bose, 2013). Its poor solubility and low partitioning decrease its ability to cross the blood-brain barrier (BBB) (Sheha, 2012). In the steady state, naproxen achieved a low brain/plasma ratio (approx. 0.03 B/P ratio), similar to that obtained with indomethacin (approx. 0.05 B/P ratio), but lower than with ibuprofen (approx. 0.11 B/P ratio) (Andersen et al., 2014). Naproxen is a poorly soluble drug that requires high plasma concentrations to achieve effective brain concentrations in migraine. Current oral naproxen formulations have several drawbacks, such as the slow onset of action, low bioavailability and large inter-subject variability in the absorption rate (T_{max}) (Choi et al., 2015). The plasma values of T_{max} for naproxen were between 2 and 4 h

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, 28040, Spain.
E-mail address: torrado2@ucm.es (S. Torrado-Santiago).

(Della Rocca et al., 2014; Sheha, 2012). Fast-dissolving formulations of naproxen that produce a rapid onset of action and improve pharmacokinetic parameters such as C_{max} , T_{max} and AUC_{0-t} values in plasma and brain for the first 2 or 4 h after dosing are particularly important in these formulations (Choi et al., 2015; Haberer et al., 2010). The improved B/P ratios for 2 h post oral administration have been used to evaluate the onset of action (Girotra and Singh, 2016).

Microparticles and nanoparticles were obtained by milling (wet and dry) in order to improve naproxen plasma and brain pharmacokinetic parameters. The last few years have seen the publication of different strategies for naproxen formulation, including the addition of a hydrophilic polymer such as HPMC (Ha et al., 2015; Kumar and Burgess, 2014; Mishra et al., 2015), or surfactants (Li et al., 2016; Mosquera-Giraldo et al., 2014; Stange et al., 2014) to avoid agglomeration problems and improve wettability. Some studies report that these formulations may have similar dissolution profiles to those obtained with naproxen sodium formulations.

Nonionic cellulose derivatives are a broad group of hydrophilic polymers which provide interesting properties in aqueous media. The use of hydrophilic polymers such as hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and hydroxypropyl cellulose have been shown to enhance the steric and electrostatic stabilisation of the crystal (Figueroa and Bose, 2013). In aqueous solution, they produced important results in the stabilisation of the formulation due to hydrogen bonding to the hydrophobic core of the drug (Douroumis et al., 2007; Mishra et al., 2015). Fast-dissolving granules using these hydrophilic polymers as a binding agent can reduce the hydrophobicity of drug crystals, for which the solution is rate-limiting.

Surfactants can prevent the aggregation of microparticles and nanoparticles by improving the stability of nanocrystalline suspensions (Kumar and Burgess, 2014). Surfactants such as sodium dodecyl sulphate (SDS) also improve the dissolution rate of poorly soluble drugs (Mosquera-Giraldo et al., 2014). However, large amounts of surfactants are required to achieve a high naproxen solution (Tiong and Elkordy, 2009). The addition of SDS with hydrophilic polymers such as HPMC produces a synergistic effect between HPMC and SDS, and facilitates interaction with the crystal surface. These hydrophilic HPMC-SDS systems require smaller amounts of surfactant agent to obtain a rapid dissolution rate with hydrophobic drugs (Li et al., 2016). Hydrophilic excipients such as Pharmacoat (Li et al., 2016), Avicel pH 102, Cab-o-sil (Tiong and Elkordy, 2009), and mannitol (Figueroa and Bose, 2013) have been used as adsorption carriers in various drugs and surfactants. These surfactants in adsorption carriers help disperse the drug in the gastrointestinal environment. An interesting alternative is to use a hydrophilic disintegrant such

as croscarmellose sodium or sodium starch glycolate, which may improve drug-water interaction by increasing dispersibility with a lower amount of excipient (Maghsoodi et al., 2008; Maggi et al., 2013; Matji et al., 2017).

The aim of this study was to develop fast-dissolving granules with a hydrophilic structure of HPMC-SDS for application with different drugs used in migraine treatment. In this work, naproxen was used as a model drug, and *in vitro* and *in vivo* improvements produced in these immediate release formulations were studied. The influence of SDS and HPMC polymer on the surface of poorly water-soluble drugs such as naproxen was investigated with different techniques such as scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD) and differential scanning calorimetry (DSC). The improvement in the dissolution profiles allows the most effective polymer and surfactant ratios to be selected for *in vivo* studies. The differences in pharmacokinetic parameters for SF-10% in C_{max} , AUC_{0-2h} , B/P ratios, and T_{max} (plasma and brain) may be considered critical to prevent or treat the first symptoms of a migraine attack.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Naproxen and naproxen sodium were obtained from Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China). Croscarmellose sodium was procured from FMC (Philadelphia, USA). Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel E15LV) (Dow Chemical), sodium dodecyl sulphate and carboxymethylcellulose sodium salt (CMC 1000) were obtained from Sigma (Copenhagen, Denmark). Water was obtained from the Milli-Q water purification system (Billerica, USA). All reagents and chemicals used were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of formulations

Naproxen raw material (NAP) and anhydrous naproxen (A-NAP) were used for the characterization (SEM, XPRD, and DSC) and dissolution studies. A-NAP was obtained by drying in an oven at 60 °C for 48 h. Sodium naproxen raw material (NAP Na) was used as a reference in the dissolution studies.

2.2.1.1. Polymeric formulation (PF). Naproxen granules containing 1.5% HPMC (w/w) were obtained by wet granulation (PF). 750 mg of naproxen was mixed with 560 μ L of the binder solution (2% HPMC w/v). The wet mass was passed through a 0.840 mm sieve and the granules were dried in an oven at 60 °C for 48 h. The final product was sieved to isolate the 0.297–0.840 mm fraction, see Table 1.

Table 1
Composition of the different formulations.

Formulation Code	Naproxen (mg)	Binder HPMC (%)	Disintegrant Croscarmellose (%)	Surfactant SDS (%)
NAP Na ^a	100	–	–	–
NAP	100	–	–	–
A-NAP	100	–	–	–
PF	100	1.5	–	–
DF-5%	100	1.5	5	–
DF-10%	100	1.5	10	–
DF-15%	100	1.5	15	–
SF-3%	100	1.5	10	3
SF-6%	100	1.5	10	6
SF-10%	100	1.5	10	10
SF-12%	100	1.5	10	12
PM	100	1.5	10	10

^a NAP Na: Sodium naproxen.

2.2.1.2. Disintegration formulation (DF). The disintegration formulation (DF) contains proportions of naproxen to croscarmellose of 100:5, 100:10 and 100:15 (w/w) (DF-5% DF-10% and DF-15% respectively). A 2% HPMC solution (w/v) was used as the binder. Wet granulation was done by mixing 750 mg of naproxen with the amount of disintegrant for each formulation, then adding 560 μ L of the binder solution (2% HPMC w/v). After mixing, the wet mass was sieved and dried as a polymeric formulation (PF), see Table 1.

2.2.1.3. Surfactant formulation (SF). The surfactant formulation (SF) contains proportions of naproxen to surfactant (SDS) of 100:3, 100:6, 100:10 and 100:12 (w/w) (SF-3%, SF-6%, SF-10 and SF-12%). In these formulations, binder solutions were made by mixing different proportions of surfactants to an aqueous solution containing 2% HPMC (w/v) and stirring during 24 h. Wet granulation was done by mixing 750 mg of naproxen with 75 mg of disintegrant, then adding 560 μ L of the binder solution. After mixing, the wet mass was sieved and dried as a polymeric formulation (PF), see Table 1.

2.2.1.4. Physical mixture (PM). The physical mixture (PM) containing the proportion of drug to excipients (w/w) shown in Table 1 was prepared by manually mixing the naproxen and excipients in a ceramic bowl using a polymeric spatula. This formulation was used directly for the XRPD and DSC analysis.

2.2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were mounted on a double-sided adhesive tape and sputtered under vacuum with a thin gold-palladium layer using a sputter coater metallizator, (Q150RS Quorum technologies, Loughton, UK). After coating, the samples were analysed with a Jeol JSM-6400 (Tokyo, Japan) scanning electron microscope operated at an acceleration voltage of 20 kV. All micrographs were made at a magnification of X100 and X5000.

2.2.3. X-ray powder diffraction (XRPD)

The XRPD patterns were recorded on an X-ray diffractometer (Philips X'Pert-MPD, Almelo, Netherlands). The samples were irradiated with monochromatized CuK α radiation ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) and the 5–50° 2 θ degree range was scanned at a step size of 0.04° and a time of 1 s per step in all cases (CAI diffraction RX, Universidad Complutense de Madrid).

2.2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

Samples were mounted on a double-sided automatic thermal analyser system (DSC 3 Star System Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). The temperature was calibrated using the Indium Calibration Reference Standard (transition point: 156.60°C). Samples were accurately weighed into aluminium pans, then hermetically sealed with aluminium lids and heated from 30°C to 300°C with a heating rate of 10°C/min under constant purging of dry nitrogen at 20 mL/min. An empty pan, sealed in the same way as the sample, was used as a reference.

2.2.5. Dissolution studies

Dissolution studies were performed using the USP paddle method (apparatus 2) in ERWEKA DT 80 (Heusenstamm, Germany) dissolution equipment. The apparatus was set up with a rotational speed of 50 rpm and 900 mL of dissolution medium (0.1 M hydrochloric acid). The temperature was maintained at 37.0 \pm 0.5°C throughout the dissolution study. Different formulations dosed with an amount equivalent to 18.2 mg of naproxen were placed in the dissolution vessels. Samples were collected at time intervals of 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 and 180 min and filtered through a Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF

0.5 μ m, Cork, Ireland). The quantity of NAP was determined at 270 nm using a spectrophotometer (UV-1700 PharmaSpec Shimadzu, Kyoto, Japan). The cumulative amount of naproxen released from the system was determined from the following calibration curve: $y = 0.0254 x + 0.0071$ ($r^2 = 0.9988$). Each determination at each time point was performed in triplicate and the error bars on the graphs represented the standard deviation.

2.2.6. Pharmacokinetic study in mice

2.2.6.1. Animals and dosing. The experimental procedure was performed with 60 female CD-1 mice in two different formulations: NAP and SF-10%. Six groups of five mice with an average weight of 21.2 \pm 3.1 g were used for each formulation. This animal experiment was approved by the Animal Ethics Committee at the Complutense University, (Madrid, Spain).

All the formulations were administered orally via bucco-gastric tube. The treatment was administered in a single dose with 10 mg/kg of naproxen. Studies of naproxen in animals were performed at doses of 10 mg/kg and 20 mg/kg (Della Rocca et al., 2014; Sheha, 2012; Zerrouk et al., 2004). Plasma concentrations in these studies are similar to those obtained in humans following administration of naproxen at low (200 mg) and high (500 mg) doses respectively (Choi et al., 2015; Yilmaz et al., 2014). Conducting the study in doses of 10 mg/kg allows us to evaluate the possible increase in pharmacokinetic parameters at low doses.

A suspension of 0.75% carboxymethylcellulose sodium was used as a vehicle for the raw material drug and the formulation. Five mice per group were anaesthetized using an intraperitoneal injection of urethane (1.5 g/kg) at different times. The animals were anaesthetized for the blood sampling procedure and then dislocated. Brain samples were collected after animal dislocation.

2.2.6.2. Blood and brain sampling. Blood samples (approx. 1 mL) were collected by cardiac puncture for the following time points: 15, 30 min and 1, 2, 4, and 7 h (p.o.), transferred to heparinized eppendorfs and centrifuged at 9000 rpm for 15 min to obtain plasma. For the brain samples, after the euthanasia of the mice, the brains were excised, washed with 0.5 mL saline and homogenised for 1 min. The plasma and tissue homogenates were stored at –20°C until extraction.

2.2.6.2.1. Blood sample analysis. For quantification in plasma aliquots, 200 μ L of plasma were thawed and mixed with 450 μ L acetonitrile in a vortex mixer for 2 min and centrifuged at 4500 rpm for 5 min. The supernatant was centrifuged again at 4500 rpm for 5 min and then filtered through a Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF 0.45 μ m, Cork, Ireland).

2.2.6.2.2. Brain sample analysis. Each tissue sample was homogenised with 0.5 mL of water prior to analysis. 0.5 mL of tissue homogenate was vortex-mixed for 2 min with 1 mL of acetonitrile. The mixture was centrifuged for 5 min at 4500 rpm twice (Hettich Universal 32, Tuttlingen, Germany). The resulting liquid was collected and 600 μ L was concentrated (Savant SpeedVac Concentrator, Holbrook, USA). 450 μ L of acetonitrile was added to each tube and vortex mixer for 2 min at 2200 rpm. The sample was filtered through a Millipore filter (Millex-HV, Hydrophilic PVDF 0.45 μ m, Cork, Ireland). 50 μ L of the supernatant was directly injected into the HPLC system.

2.2.6.3. Naproxen quantification by liquid chromatography. The naproxen in plasma and brain tissue samples was quantified by an optimised high-performance liquid chromatography (HPLC) method (Agilent 1100 series FLD G1321A), equipped with a 50 μ L loop. Samples were separated using a Zorbax SB C-8 column

(250 × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 2% acetic acid in water (50:50, v/v), the flow rate of the mobile phase was 1 mL/min, and the detection wavelength shown on screen was set with an extension wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 360 nm.

The calibration curve ($y = 2674.1x + 22.43$) was built using blank mice serum with a range of concentrations of 0.21–2.38 μg/g ($r^2 \geq 0.9975$) for the fluorescence method. The intraday and interday precision (RSD) for this method was <2.26% and <2.38% respectively. Recoveries were higher than 95% in all samples.

2.2.6.4. Pharmacokinetic analysis. The pharmacokinetic properties of naproxen were analysed using non-compartmental analysis. C_{\max} and T_{\max} were obtained directly from the measured values.

The remaining pharmacokinetic parameters were estimated based on the mean concentration values ($n = 5$) determined at each time point by non-compartmental pharmacokinetic analysis using WinNonlin version 5.2 (Pharsight Co, Mountain View, CA, USA). The pharmacokinetic parameters evaluated were the maximum blood concentration of the drug (C_{\max}), the time taken to reach maximum blood concentration (T_{\max}), and the area under the drug concentration time-curve from time zero to the time of the last quantifiable drug concentration (AUC_{0-t}), calculated using the trapezoidal method.

2.2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statgraphics plus 5.1 (Statpoint Technologies Inc, VA USA). All values were indicated as mean ± standard deviation (SD). The statistical analysis of the data

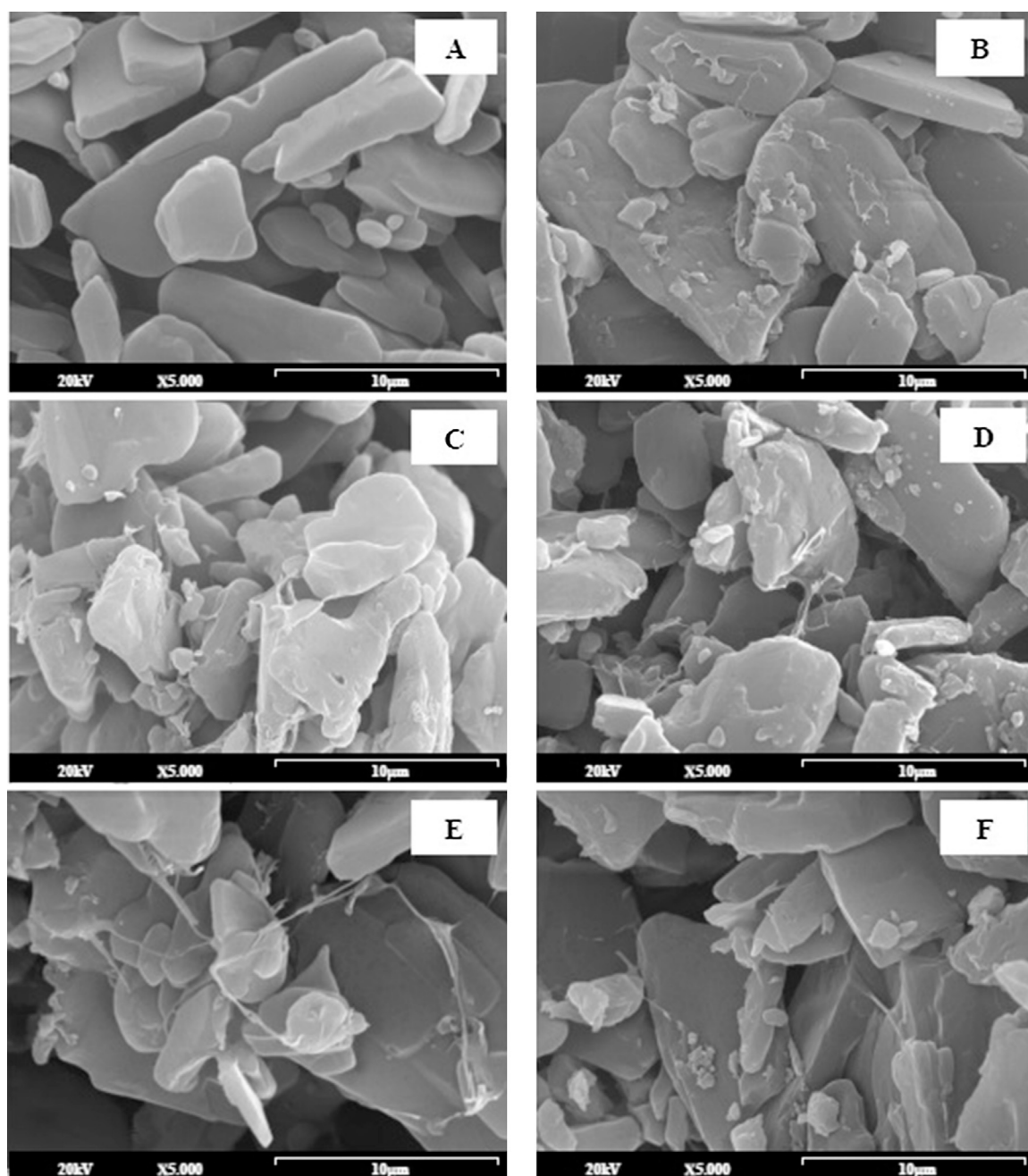


Fig 1. SEM micrographs of surface-modified naproxen formulations: raw material (A), PF (B), DF-5% (C), DF-10% (D), SF-3% (E), SF-10% (F). Photographs were taken at a magnification of 5000x.

was done with Student's *t*-test for two groups, and one-way. A *p*-value <0.05 was considered as a significant difference for data analysis.

3. Results

3.1. SEM characterization

The microphotographs of NAP raw material PF, DF-5%, DF-10%, SF-3% and SF-10% are shown in Fig. 1 the NAP raw material (Fig. 1A) has a prismatic form with irregular shaped laminar crystals of varying sizes between 3 and 20 μm . The particles showed a high tendency to agglomeration. The high agglomeration of particles in hydrophobic drugs due to electrostatic charges produced during granulation or grinding decreases flow characteristics and delays the dissolution rate (Censi et al., 2015; Matji et al., 2017).

The PF granulate has larger particles with a porous surface at a magnification of $\times 5000$ (Fig. 1B). A characteristically thinner HPMC film could be observed between the NAP crystals. The orientation of the hydrophilic HPMC chains favours the bonding of this film on the surface of the NAP crystals. The presence of hydrophilic polymers decreases the hydrophobicity of NAP and promotes drug-water interaction (Maghsoodi et al., 2008; Mishra et al., 2015).

The effect of adding 5% (DF-5%) and 10% (DF-10%) of intra-granular croscarmellose can be seen in Figs. 1C and 1D. These micrographs clearly show the presence of thicker films between the NAP crystals where the original morphology of the disintegrant disappeared. These results indicate that this hydrophilic disintegrant was homogeneously dispersed in the HPMC film. Previous studies revealed similar changes in the SEM morphology of other disintegrants in naproxen-disintegrant agglomerates (Maghsoodi et al., 2008).

The effect of adding 3% (SF-3%) and 10% (SF-10%) of SDS are shown in Fig. 1E and 1F at a magnification of $\times 5000$. The addition of surfactant to the formulation produces a significant change in the morphology of the hydrophilic film on NAP crystals, which is thinner than others in different formulations without SDS (Fig. 1D). This can be explained by the effect of SDS at between 3% and 12%. The addition of this surfactant produces an increase in the miscibility of the disintegrant, leading to a thinner film with an adequate value to cover the surface of the crystal (Mishra et al., 2015). The SEM micrograph shows synergisms between HPMC and

SDS. The SDS facilitates the wettability and dispersion of the HPMC film on the NAP crystals (Silva et al., 2011).

3.2. X-ray powder diffraction (XRPD): characterization of structure and crystal size

Fig. 2 shows the XRPD patterns of the pure naproxen raw material (NAP), physical mixture (PM), anhydrate form (A-NAP), PF, DF-10% and SF-10%. NAP (Fig. 2) presented a typically crystalline pattern with several characteristic sharp peaks at diffraction angles of 6.63° , 12.65° , 13.35° , 18.99° , 20.34° , 22.47° , and 23.80° 2θ . These XRPD patterns were similar to those reported by other authors (Maghsoodi et al., 2008).

The A-NAP form (Fig. 2) showed very similar diffraction angles to the NAP form with a marked decrease in intensity at low diffraction angles such as 6.63° and 13.35° 2θ , and an increase in intensity at the angles 12.65° and 18.99° 2θ . The results for these forms are similar to other studies, due to the transformation of the hydrate-anhydrous forms in raw materials such as naproxen base (Bond et al., 2014) and carbamazepine (Tian et al., 2007). However, studies on the sodium naproxen form have shown different diffraction angles and intensity values in comparison with naproxen raw material forms (Censi et al., 2015). The XRPD diffraction patterns of NAP are probably related to hydrate structures with carboxylate/ H_2O sections, alternating with sections containing naproxen molecules without carboxylate/ H_2O . Dehydration processes require the reorganization of the naproxen molecule sections for their transformation to the anhydrous form (Bond et al., 2014).

The presence of hydrophilic polymers such as HPMC in the formulation (PF) reveals the characteristic XRPD patterns of the anhydrous form of NAP. Similar intensity values at the characteristic peaks were due to the absence of amorphous NAP on the crystal surface. However, Fig. 2 shows a significant decrease in intensity at low angles (6.63° 2θ), which can be explained by the plasticizing effect produced by the HPMC film around the NAP crystal surface. This polymeric film shows a preference for the NAP anhydrous form and increases the hydrophilization of drug particles without producing amorphization over the surface of NAP crystals. This may be explained by the stabilising effect on the crystallinity of hydrophilic polymers (Bose et al., 2012).

The XRPD patterns for the physical mixtures (PM) are similar to NAP. These results show that low proportions of excipients with a

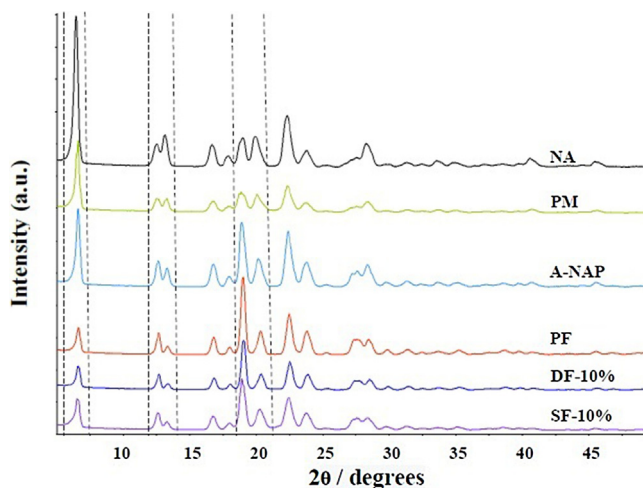


Fig. 2. XRPD patterns of: naproxen raw material (NAP), physical mixture (PM), anhydrate form (A-NAP) and different formulations with polymer (PF), disintegrant (DF-10%) and surfactant (SF-10%).

semi-crystalline structure do not change the crystallinity parameters of NAP (Maghsoodi et al., 2008).

The addition of sodium dodecyl sulphate to the formulation (SF-10%) does not produce changes in the diffraction peaks of NAP; intensity values only decrease at low angles (6.63° and $13.35^\circ 2\theta$) similar to PF or DF-10%.

Different proportions of SDS (3%, 6% or 10%) produce similar decreases in the intensity values at 6.63° and $13.35^\circ 2\theta$ (see Fig. 1). Similar XPDR parameters were found for all proportions of SDS studied. These results indicate the existence of an interaction of HPMC-SDS films with NAP crystals. The presence of SDS facilitates the incorporation of HPMC film on the anhydrous NAP surface, without any change indicating surface amorphization on NAP crystals. The plasticizing effect of the surfactant would explain the greater stability on drug surface crystals observed when different surfactants are added to hydrophilic polymeric films (Kumar and Burgess, 2014).

3.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Fig. 3 shows the DSC curves of the NAP, PF, DF-10%, PM and SF-10% formulations. NAP shows a sharp endothermic peak at 156.92°C , due to its melting with an enthalpy of 140.54 J/g , corresponding to its crystalline form. These results are similar to the values for the NAP anhydrate form (A-NAP) ($T_m = 157.49^\circ\text{C}$ and $\Delta H_{\text{fusion}} = 139.8\text{ J/g}$). The DSC results show similar values for both crystalline forms, and were also similar to those obtained in other studies (Zerrouk et al., 2004; Tiong and Elkordy, 2009). X-ray diffraction methods were more suitable for identifying anhydrous and hydrated forms in these formulations (Censi et al., 2015).

PF and DF-10% formulations show melting peaks characteristic of NAP at 156.56°C and 155.06°C respectively. These results indicate that there were no significant changes in crystallinity or interaction between drug and excipients in these formulations. The peak shape of the drug fusion and the enthalpies for PF are similar to the NAP raw material, showing there was no amorphization on the surface of the NAP crystals. Several studies confirm that the use

of low percentages of hydrophilic polymers (0.5–1.5%) (Kumar and Burgess, 2014; Mishra et al., 2015) do not produce the amorphization of surface drug crystals. The absence of amorphous regions on the surface of the crystals may be caused by the stabilising effect observed for these hydrophilic polymers (Kumar and Burgess, 2014).

DF-10% shows a slight decrease in the fusion enthalpy of the peak corresponding to NAP (Fig. 3), which may be attributed to the effect of dilution by the amount of disintegrant in the formulation. It is very difficult to identify the presence of HPMC or disintegrant in DSC scans, since these polymers have semicrystalline structures and no evident sharp peaks. Nor did the DSC studies detect any interaction at the NAP endothermic peak. Other hydrophilic disintegrants such as starch glycolate, starch also showed no displacement at the endothermic peaks of poorly-soluble drugs (Maghsoodi et al., 2008).

All formulations with SDS (SF-3%, SF-6%, SF-10% and SF-12%) showed a decrease in melt temperature. Fig. 3 has an endothermic peak at 150.92°C on the SF-10% formulation, different from the PM melting peak (154.32°C). This decrease can be attributed to an interaction of HPMC-SDS with the NAP crystals during the granulation process. In the self-association process of HPMC-SDS, the presence of surfactant has a marked effect on the binding of the HPMC chains to the NAP crystals. SDS decreases interfacial tension between an aqueous solution and HPMC chains. The binding of surfactant molecules to polymers like HPMC may modify the polarity of the polymer. The HPMC chains progressively convert the non-ionic polymer into a polyelectrolyte due to charge repulsion (Cheow et al., 2014). HPMC films associated with SDS are more widely extended over the NAP crystal than without it (see SEM Fig. 1).

3.4. Dissolution studies

Fig. 4 shows the dissolution profiles of NAP, A-NAP, PF, DF-5%, DF-10% and DF-15%. The NAP formulation, with values of $12.99 \pm 1.83\%$ and $33.78 \pm 0.55\%$ for 10 and 30 min, shows slow

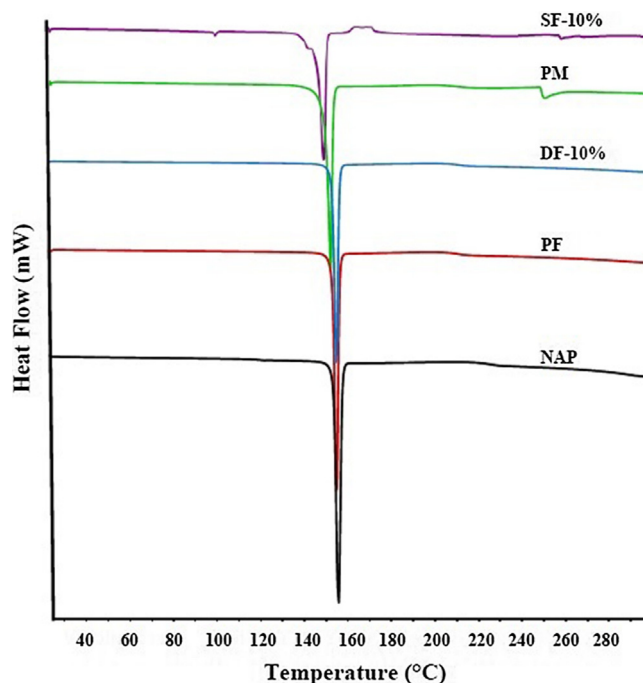


Fig. 3. DSC thermograms of: naproxen raw material (NAP), physical mixture (PM) and different formulations with polymer (PF), disintegrant (DF-10%) and surfactant (SF-10%).

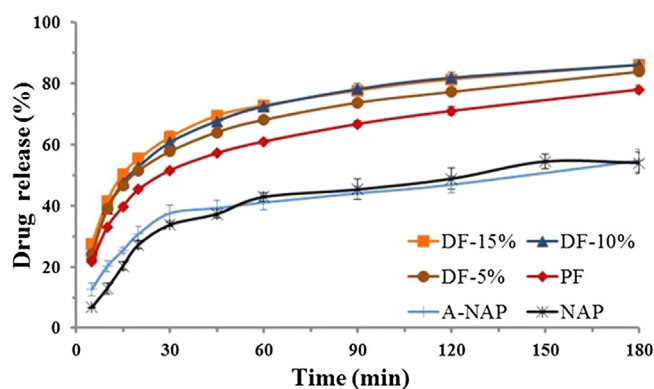


Fig. 4. *In vitro* dissolution profiles of naproxen raw material (NAP), anhydrate form (A-NAP), polymeric formulation (PF) and formulations with different concentrations of disintegrant (DF-5%, DF-10%, DF-15%).

dissolution rates similar to the anhydrous formulation (A-NAP). These results indicate that there are no significant differences ($P > 0.05$) at 10 and 30 min between anhydrous and hydrate forms, which could be explained by the strong hydrophobicity observed on the naproxen crystal surface. Different raw materials similar to naproxen, with hydrophobic benzene rings, methyl and carbonyl groups, contribute to increasing hydrophobicity. The hydrophobicity and the small size of the naproxen particles favoured agglomeration, hindered wettability and delayed the dissolution profile (Li et al., 2015).

The granulate formulation containing HPMC (PF) had a faster dissolution rate than the formulation without HPMC, with an increase of $33.07 \pm 0.33\%$ at 10 min ($P < 0.05$) and $51.62 \pm 0.72\%$ at 30 min ($P < 0.05$). During the granulation process, the hydrophilic surface of the HPMC polymer is positioned on the anhydrous surface of the NAP crystals, which improves its interaction with the aqueous environment. X-ray diffraction results (Fig. 2) indicated that the crystallinity of the naproxen changed as a result of the interaction of HPMC on naproxen surfaces. Various studies have proved similar interactions between different hydrophilic polymers and poorly soluble drugs (Zerrouk et al., 2004; Ha et al., 2015; Mishra et al., 2015).

The addition of disintegrants to the naproxen formulation (DF-5%, DF-10% and DF-15%) produced an increase in the dissolution profiles compared to NAP and PF formulations (see Fig. 4). During the first 30 min, the dissolution rate of DF-5% and DF-10% also improved in comparison with the NAP formulation. Hydrophilic disintegrants produced an increase in the hydrophilic character on the NAP surface. Dissolution at 30 min increased from $51.62 \pm 0.72\%$ (PF) to $57.78 \pm 0.49\%$ (DF-5%) and $60.76 \pm 1.21\%$ (DF-10%). However, similar dissolution rates were observed in

formulations with the addition of 10% (DF-10%) and 15% (DF-15%) of disintegrant (see Fig. 4). The addition of 10% disintegrant was sufficient to allow the maximum surface area to promote drug-water interaction (Maghsoodi et al., 2008).

Fig. 5 shows the dissolution rates of the NAP, DF-10%, SF-3%, SF-6%, SF-10% and SF-12% formulations, and NAP Na. SF-3% indicates a similar dissolution profile to formulations without SDS (DF-10%). However, an SDS proportion of 6% was sufficient to produce a thinner HPMC film between the surfaces of the naproxen crystals. The low proportion of SDS in the SF-3% formulation was unable to reduce the surface tension in HPMC-water layer around the naproxen particles.

SDS-6% and SDS-10% (Fig. 5) had higher dissolution profiles in the first 30 min of dissolution. At 30 min, percentages of $72.19 \pm 0.97\%$ were observed in SF-6% and $77.99 \pm 0.90\%$ in SF-10%. The addition of SDS to the formulations forces the hydrophilic part of the HPMC to increase its contact with the naproxen crystal surface. HPMC-SDS formulations showed thin films as a result of the interaction between the polymer (HPMC) and surfactant (SDS), see Fig. 1 E and 1 F. SDS at 10% showed an SDS-HPMC synergism in the DSC studies (Fig. 3). Probably, the presence of the surfactant reduces the surface tension of the chains in the HPMC hydrophilic polymer, and its ionic character promotes the polyelectrolytic character of the HPMC chains. This HPMC-SDS synergism improves the wettability of the NAP crystals (Tiong and Elkordy, 2009). The amounts of SDS in these formulations (SDS-6% and SDS-10%) are 0.6 and 1.0 mg/kg respectively, these are SDS amounts commonly used in different formulations for oral use. However, the formulation with 12% SDS did not increase the dissolution rate in comparison with the SF-10% formulation ($P > 0.05$). These results indicate a maximum improvement in the dissolution rate

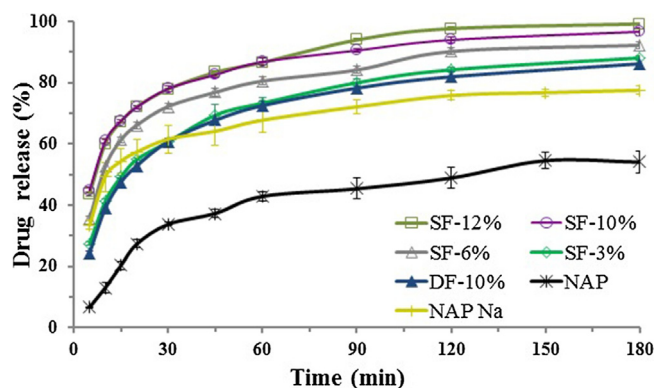


Fig. 5. *In vitro* dissolution profiles of naproxen raw material (NAP), naproxen sodium raw material (NAP Na), formulation with disintegrant (DF-10%) and formulations with different concentrations of surfactant (SF-3%, SF-6%, SF-10%, SF-12%). The length of the error bar indicates the standard deviation of measurements.

with an addition of around 10% SDS. Adding more surfactant does not improve the wetting of dispersed NAP particles in the dissolution medium. The increase in surface area and wettability, hydrophilicity and dissolution rate in the SF-10% formulation is the best route for obtaining improved plasma and brain concentrations at the start of the dissolution.

As shown in Fig. 5 NAP Na raw material presented at short times (30 min), an intermediate dissolution profile between formulations containing 6% and 10% SDS in the hydrophilic films (SF-6% and SF-10% respectively). The NAP Na microparticles exhibited much greater variability in drug dissolution percentages than SDS formulations. This *in vitro* great variability for NAP could be related to the inter-subjects high variability observed for T_{max} in different pharmacokinetic studies of NAP in humans (Choi et al., 2015). On the other hand, formulation SF-10% showed a fast dissolution rate. So, a significant difference ($P < 0.05$) was observed at 30 min between dissolved percentages of NAP Na and SF-10% ($61.54 \pm 4.59\%$ and $77.99 \pm 0.90\%$ respectively). The higher dissolution profiles of new SF-10% formulation and its less *in vitro* variability could be explained by the presence of HPMC-SDS polymeric interactions that avoid the hydrophobic agglomerations of NAP crystals. Therefore, the SF-10% formulation is a good candidate for rapid onset of the therapeutic effect with low variability, particularly important features in acute migraine attacks.

3.5. Pharmacokinetics of naproxen

High brain concentrations of naproxen must be achieved in the first 2 h after administration to ensure effective action against migraine. Different pharmacokinetic parameters have been studied in recent years during the first few hours after oral administration of the drug to evaluate fast action treatments for migraine attacks (Cleves and Tepper, 2008; Girotra and Singh, 2016). In this study, we therefore evaluate the AUC_{0-2h} and

different brain/plasma (B/P) ratios during the first 2 h after administration, in addition to C_{max} and T_{max} .

The plasma and brain concentration-time profiles of a fast-dissolving formulation (SF-10%) and a reference NAP suspension formulation are shown in Fig. 6A. and 6B. The main pharmacokinetic parameters of plasma naproxen are summarised in Table 2.

AUC_{0-7} values for plasma or brain are similar between both formulations (see Table 2). This may be attributed to the fact that in the gastrointestinal environment, the presence of endogenous surfactants (e.g. bile salts) and lecithins improves the wetting and solubilization of poorly soluble drugs such as naproxen (Fong et al., 2015). The presence of a relatively long absorption window for naproxen would explain the similar $AUC_{0-\infty}$ values with different dissolution rates (Figueroa and Bose, 2013). In treatments against migraine, brain AUC during the first 2 h post dose were used by different authors to evaluate the *in vivo* effect of fast-dissolving formulations (Cleves and Tepper, 2008). The AUC_{0-2h} were 30% (plasma) and 10% (brain) higher for SF-10%, showing an improvement in the absorption rate of SF-10% in comparison with the NAP suspension. Oral bioavailability during the first 2 h after administration for SF-10% was clearly increased. The improved drug solution induced by hydrophilic polymer-surfactant interactions (HPMC-SDS) was the driving force in improving dissolution rate and oral absorption. The highest absorption of poorly soluble drugs was increased by processes related to the rate of dissolution or solubility of the drug such surfactants (Tiong and Elkordy, 2009) and supersaturated systems (Kim et al., 2013).

Mean C_{max} plasma and brain values can be seen in Table 2. These C_{max} values are similar to those obtained in human plasma with low doses of naproxen (Yilmaz et al., 2014). For the SF-10% formulation, plasma and brain concentrations increased 1.38-fold and 1.41-fold. Therefore, the higher dissolution rate obtained with the hydrophilic HPMC-SDS interaction is related to the increase from oral *in vivo* uptake of naproxen during the initial stages. Similar increases in C_{max} (plasma) were observed by incorporating

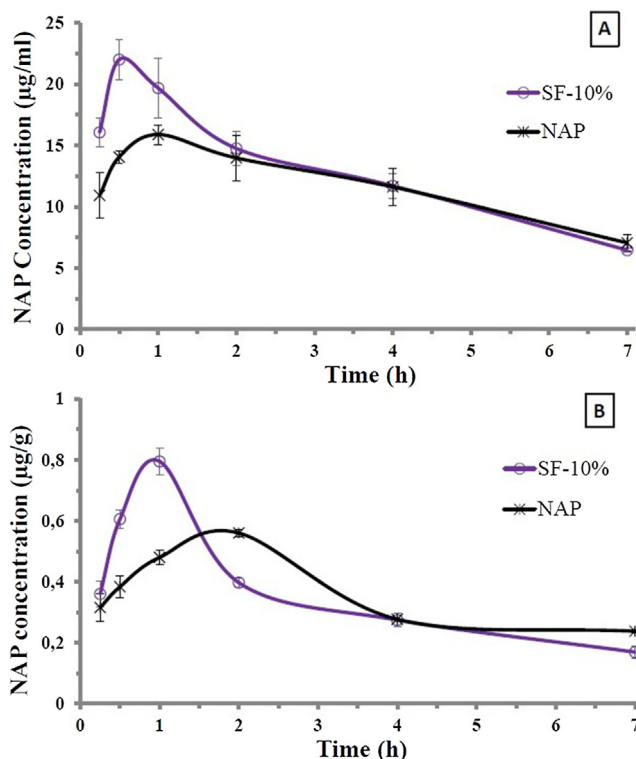


Fig. 6. *In vivo* results of naproxen raw material (NAP) and naproxen formulation with disintegrant (DF-10%). (A) Concentrations of naproxen in plasma. (B) Concentrations of naproxen in brain. The length of the error bar indicates the standard deviation of measurements.

Table 2Mean pharmacokinetic parameters \pm SD, median in brackets, obtained with oral naproxen treatment (10 mg/kg).

	NAP		SF-10%	
	Plasma	Brain	Plasma	Brain
AUC _{0–7h} (h* μ g/mL)	84606 \pm 4259.58	6424.34 \pm 137.66	94136.20 \pm 7103.00	6615.34 \pm 671.61
AUC _{0–2h} (h* μ g/mL)	31001.52 \pm 1560.81	2446.00 \pm 52.41	40424.86 \pm 3050.24	3081.77 \pm 312.87
C _{max} (μ g/mL)	15.89 \pm 0.80	1.40 \pm 0.03	22.00 \pm 1.66	1.97 \pm 0.20–
T _{max} (h)	1 h (0.5–4 h)	2 h (2 h)	0.75 h (0.5–1 h)	1 h (0.5–1 h)

hydrophilic polymer or surfactant into poorly-soluble drugs (Kim et al., 2013). B/P ratios are similar for both formulations (0.05 to 0.06). These ratios are similar to those obtained for the various poorly-soluble NSAIDs such as naproxen (Andersen et al., 2014). These results indicate that the presence of SDS in the SF-10% formulation does not favour the crossing of the blood-brain barrier.

The maximum B/P ratio (0.10) was obtained at 0.5 h in SF-10% and 1 h in the NAP suspension. Higher B/P ratios may be related to higher values of naproxen concentration (plasma), increasing the percentage of the plasma-free naproxen fraction available to cross the blood-brain barrier. Similar increased B/P ratios have been observed 2 h before administration in other antimigraine drug studies (Girotra and Singh, 2016). T_{max} was much shorter in SF-10% (0.75 h, and 1 h for plasma and brain respectively) than in the NAP suspension (1 h and 2 h for plasma and brain respectively). As expected, the maximum values in brain were delayed in comparison with the maximum plasma values for both formulations. T_{max} value for HPMC-SDS formulation (SF-10%) was shorter than the reference NAP suspension, correlating with different studies (Kim et al., 2013). The reason for the higher C_{max} and shorter T_{max} for SF-10% may be related to increased hydration in the gastrointestinal environment, increasing its dissolution profile, and enabling the drug to permeate the gastrointestinal hydration layer more easily when HPMC-SDS is included in the formulation. In this system, naproxen crystals have a low surface tension and could avoid saturation in the gastrointestinal environment (Reitz et al., 2013), while for the reference NAP suspension the presence of increased hydrophobicity between the naproxen crystals produces a slower drug-water interaction and slows gastrointestinal absorption. These differences in AUC_{0–2h}, C_{max}, and T_{max} (brain) may be considered critical to prevent or treat the first symptoms of a migraine attack. Future studies will be needed to adjust the dosages of these new fast-dissolving granules to obtain plasma and brain concentrations similar to those of the reference naproxen tablets.

4. Conclusions

A simple granulation process with HPMC-SDS improves the dissolution rate and *in vivo* bioavailability of the drug. XRPD studies show that the HPMC-SDS film is deposited on the anhydrous NAP surface. The interaction between HPMC-SDS and naproxen was confirmed by DSC studies. The main mechanism for increasing dissolution appears to be a decrease in the hydrophobic surface of NAP in the presence of disintegrant and HPMC-SDS polymer, creating a hydrophilic film on the surface of anhydrous NAP and promoting drug-water interaction. The potential synergism between HPMC and SDS enhances interfacial binding, leading to more contact on the surface of the drug crystal, which could strongly promote drug wettability by reducing the interactions between hydrophobic particles. Fast-dissolving granules of naproxen with HPMC-SDS prove to be an effective way to enhance the dissolution rate. *In vivo* studies with SF-10% in plasma and brain samples showed improved AUC_{0–2h}, C_{max}, and a faster T_{max} than in the reference. The faster T_{max} ratio for SF-10% may be related to

increased hydration in the gastrointestinal environment. The drug can permeate the gastrointestinal hydration layer more easily when HPMC-SDS is included in the formulation. Although future *in vivo* studies will be necessary to compare different surfactants and select the most appropriate surfactant concentration, SF-10% is a viable approach to enhance the initial concentrations of NAP at the onset of migraine attacks.

Acknowledgements

We would like to thank the CAIs of XRPD and SEM of the Complutense University of Madrid (Spain) for their support and assistance to perform this work. This study was partially supported by the Complutense University of Madrid (Research Group 910939).

References

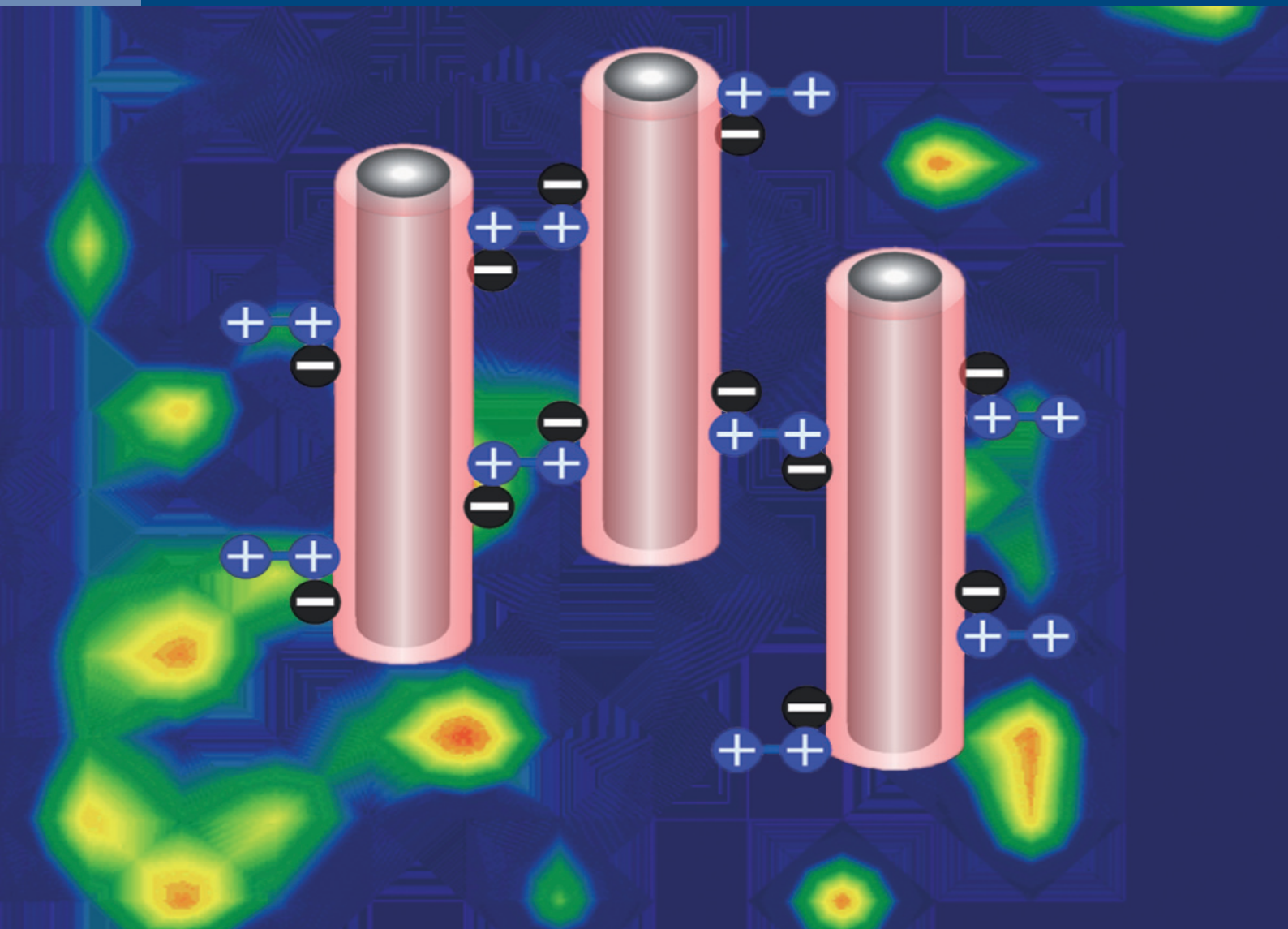
- Andersen, C.A., Perfetti, P., Nibbio, M., Bellini, M., Angelini, R., Fornasier, M., 2014. Brain penetration assessment *in vivo*: a reliable and simple method in anesthetized rats at steady state. *J. Neurosci. Methods* 232, 199–206.
- Bond, A.D., Cornett, C., Larsen, F.H., Qu, H., Rajjada, D., Rantanen, J., 2014. Structural basis for the transformation pathways of the sodium naproxen anhydrate-hydrate system. *IUCr J.* 20, 328–337.
- Bose, S., Schenck, D., Ghosh, I., Hollywood, A., Maulit, E., Ruegger, C., 2012. Application of spray granulation for conversion of a nanosuspension into a dry powder form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 35–43.
- Censi, R., Rascioni, R., Di Martino, P., 2015. Changes in the solid state of anhydrous and hydrated forms of sodium naproxen under different grinding and environmental conditions: evidence of the formation of new hydrated forms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 92, 192–203.
- Cheow, W.S., Kiew, T.Y., Yang, Y., Hadinoto, K., 2014. Amorphization strategy affects the stability and supersaturation profile of amorphous drug nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5, 1611–1620.
- Choi, H.G., Jeon, J.Y., Kwak, S.S., Kim, H., Jin, C., Im, Y.J., Kim, E.Y., Wang, H.M., Kim, Y., Lee, S.Y., Kim, M.G., 2015. Pharmacokinetic comparison study of a combination containing 500 mg of Naproxen and 20 mg of Esomeprazole: a randomized single-dose, 2-way crossover, open-label study in healthy Korean men. *Clin. Ther.* 1, 83–93.
- Cleves, C., Tepper, S.J., 2008. Sumatriptan/naproxen sodium combination for the treatment of migraine. *Expert. Rev. Neurother.* 8, 1289–1297.
- Della Rocca, G., Di Salvo, A., Cagnardi, P., Marchesi, M.C., Conti, M.B., 2014. Naproxen in the horse: pharmacokinetics and side effects in the elderly. *Res. Vet. Sci.* 96, 147–152.
- Douroumis, D., Bouropoulos, N., Fahr, A., 2007. Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 645–653.
- Figuerola, C.E., Bose, S., 2013. Spray granulation: importance of process parameters on *in vitro* and *in vivo* behavior of dried nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 1046–1055.
- Fong, S.Y., Ibsogly, A., Bauer-Brandl, A., 2015. Solubility enhancement of BCS Class II drug by solid phospholipid dispersions: spray drying versus freeze-drying. *Int. J. Pharm.* 496, 382–391.
- Girotra, P., Singh, S.K., 2016. A comparative study of orally delivered PBCA and ApoE coupled BSA nanoparticles for brain targeting of sumatriptan succinate in therapeutic management of migraine. *Pharm. Res.* 33, 1682–1695.
- Ha, E.S., Choo, G.H., Baek, I.H., Kim, J.S., Cho, W., Jung, Y.S., Jin, S.E., Hwang, S.J., Kim, M.S., 2015. Dissolution and bioavailability of lercanidipine-hydroxypropylmethyl cellulose nanoparticles with surfactant. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 218–222.
- Haberer, L.J., Walls, C.M., Lener, S.E., Taylor, D.R., McDonald, S.A., 2010. Distinct pharmacokinetic profile and safety of a fixed-dose tablet of sumatriptan and naproxen sodium for the acute treatment of migraine. *Headache* 50, 357–373.
- Kim, M.S., Kim, J.S., Cho, W., Cha, K.H., Park, H.J., Park, J., Hwang, S.J., 2013. Supersaturable formulations for the enhanced oral absorption of sirolimus. *Int. J. Pharm.* 445, 108–116.

- Kumar, S., Burgess, D.J., 2014. Wet milling induced physical and chemical instabilities of naproxen nano-crystalline suspensions. *Int. J. Pharm.* 466, 223–232.
- Li, H., Thompson, M.R., O'Donnell, K.P., 2015. Examining drug hydrophobicity in continuous wet granulation within a twin screw extruder. *Int. J. Pharm.* 496, 3–11.
- Li, M., Lopez, N., Bilgili, E., 2016. A study of the impact of polymer–surfactant in drug nanoparticle coated pharmitose composites on dissolution performance. *Adv. Powder. Technol.* 27, 1625–1636.
- Maggi, L., Bruni, G., Maietta, M., Canobbio, A., Cardini, A., Conte, U., 2013. II. Technological approaches to improve the dissolution behavior of nateglinide, a lipophilic insoluble drug: co milling. *Int. J. Pharm.* 454, 568–572.
- Maghsoodi, M., Taghizadeh, O., Martin, G.P., Nokhodchi, A., 2008. Particle design of naproxen-disintegrant agglomerates for direct compression by a crystallo-coagglomeration technique. *Int. J. Pharm.* 351, 45–54.
- Matji, A., Carvajal, L., Conde, F., Peña, M.A., Donato, N., Serrano, D.R., Torrado, J.J., 2017. Effect of the characteristics of raw material ibuprofen on roller compaction and dissolution. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 30, 1–8.
- Mishra, B., Sahoo, J., Dixit, P.K., 2015. Formulation and process optimization of naproxen nanosuspensions stabilized by hydroxy propyl methyl cellulose. *Carbohydr. Polym.* 127, 300–308.
- Mosquera-Giraldo, L.L., Trasi, N.S., Taylor, L.S., 2014. Impact of surfactants on the crystal growth of amorphous celecoxib. *Int. J. Pharm.* 461, 251–257.
- Reitz, E., Vervaet, C., Neubert, R.H., Thommes, M., 2013. Solid crystal suspensions containing griseofulvin –Preparation and bioavailability testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 193–202.
- Sheftell, F.D., Dahlöf, C.G., Brandes, J.L., Agosti, R., Jones, M.W., Barrett, P.S., 2005. Two replicate randomized, double-blind, placebo-controlled trials of the time to onset of pain relief in the acute treatment of migraine with a fast-disintegrating/rapid-release formulation of sumatriptan tablets. *Clin. Ther.* 27, 407–417.
- Sheha, M., 2012. Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. *Arch. Pharm. Res.* 35, 523–530.
- Sheshala, R., Khan, N., Darwis, Y., 2011. Formulation and optimization of orally disintegrating tablets of sumatriptan succinate. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 920–928.
- Silva, S., Antunes, F.E., Sousa, J., Valente, A., Pais, A., 2011. New insights on the interaction between hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulfate. *Carbohydr. Polym.* 86, 35–44.
- Stange, U., Führling, C., Gieseler, H., 2014. Formulation, preparation, and evaluation of novel orally disintegrating tablets containing taste-masked naproxen sodium granules and naratriptan hydrochloride. *J. Pharm. Sci.* 103, 1233–1245.
- Tian, F., Zhang, F., Sandler, N., Gordon, K.C., McGoverin, C.M., Strachan, C.J., Saville, D. J., Rades, T., 2007. Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 466–474.
- Tiong, N., Elkordy, A.A., 2009. Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 373–384.
- Yilmaz, B., Asci, A., Erdem, A.F., 2014. HPLC method for naproxen determination in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *J. Chromatogr. Sci.* 52, 584–589.
- Zerrouk, N., Mennini, N., Maestrelli, F., Chemtob, C., Mura, P., 2004. Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 93–99.

**X. ANEXO 2:
PUBLICACIÓN 2**

JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

9 | 19



Methods

Chromatography · Electroseparation

Applications

Biomedicine · Foods · Environment

www.jss-journal.com

WILEY-VCH

RESEARCH ARTICLE

Submicellar liquid chromatography with fluorescence detection improves the analysis of naproxen in plasma and brain tissue

Víctor García-Herrero¹ | Carlos Torrado-Salmerón¹ | Juan José García-Rodríguez² |
Guillermo Torrado³ | Santiago Torrado-Santiago^{1,4} 

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain

³Department of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, Alcala de Henares University, Madrid, Spain

⁴Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Complutense University, Madrid, Spain

Correspondence

Professor Santiago Torrado Durán, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal S/N, Madrid 28040, Spain.
Email: torrado2@ucm.es

Rapid, simple, and sensitive submicellar liquid chromatography with fluorescence detection was developed and validated to quantify naproxen in plasma and brain samples after oral administration of Naproxen formulations. The method used tramadol as an internal standard. Different submicellar mobile phases with organic phases ranging from 40 to 60% were studied to improve the native fluorescence of the Naproxen and decrease retention times. Separation was done in a Zorbax SB C8 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase containing acidic 0.007 M sodium dodecyl sulfate/acetonitrile (50:50, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. Detection was performed with an excitation wavelength of 280 nm and emission of 310 nm and 360 nm for internal standard and Naproxen, respectively. The method was validated by International Conference of Harmonization standards. The method is specific, accurate, and precise (relative standard deviation <3%). Limits of detection and quantification were 0.08 and 0.25 μg/mL, respectively, for biological samples. This method was applied to analyze brain/plasma ratios in mice that had received oral administrations of Naproxen micellar formulations containing 10% w/w of sodium dodecyl sulfate, Cremophor RH 40, or Tween 80. The sodium dodecyl sulfate micelles were faster and more widely distributed in the mouse brains.

KEYWORDS

Cremophor RH 40, Naproxen, sodium dodecyl sulfate, submicellar mobile phases, Tween 80

1 | INTRODUCTION

Naproxen (NAP; Figure 1) is an anti-inflammatory drug with poor solubility in an aqueous medium. The incorporation of surfactants into NAP formulations has succeeded in increasing plasma concentrations [1,2]. According to Biopharmaceutics Classification System (BCS), NAP is considered to be a

type II active molecule (poor solubility and good permeability). Therefore, the bioavailability of NAP is limited by its solubility. It is important to consider the low permeability of the brain to NAP. It is especially interesting to get high levels of NAP in the blood as soon as possible so that it can have an anti-migraine effect.

The native fluorescence of many raw materials is enhanced by the use of micelles of cationic, nonionic, and ionic surfactants [3].

These methods depend on surface active agents such as Tween 80 [4], Cremophor RH 40 [5,6], and SDS [3,7]. It is well known that micellar mobile phases in the absence of

Article Related Abbreviation: NAP, Naproxen; NAP:RH40, Naproxen:Cremophor RH 40 (90:10 w/w); NAP:SDS, Naproxen: Sodium dodecyl sulfate (90:10 w/w); NAP:T 80, Naproxen:Tween 80 (90:10 w/w); NAP-RM, Naproxen raw material; T 80, Tween 80.

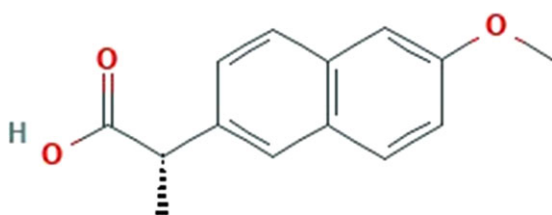


FIGURE 1 Chemical structure of NAP

organic solvent are weak and yield poor peak shape compared to conventional aqueous-organic mobile phases. The addition of organic solvent to the mobile phase avoids this problem. Organic solvent reduces the amount of surfactant adsorbed in the stationary phase, with an effect that depends on the surfactant/organic solvent ratio [8,9]. However, an increase in the organic solvent concentration leads to a progressive reduction in the aggregation number and to the emergence of the submicellar LC mode [10,11]. In submicellar LC, only surfactant monomers exist in the mobile phase, which are dissolved in the hydro-organic medium, producing the surfactant coating in the stationary phase [10]. It has been found that in the presence of $\geq 60\%$ acetonitrile, the partial surfactant adsorption does not occur [10,12]. Submicellar LC with acetonitrile proportions between 40 and 60% could have attractive advantages over other RP-LC modes in terms of efficiency, peak shape, selectivity, and analysis time [11]. It has been shown that the native fluorescence improved in the presence of micelles of surfactants. These micellar or submicellar systems are known to improve the intensity of compounds with weak fluorescence such as NAP.

The aim of this study was to develop a submicellar LC fluorescence method for the quantification of NAP brain samples validated by ICH guidelines, and to apply this analytical method to select a micellar system to obtain higher concentrations of cerebral NAP.

Micellar systems with nonionic surfactants such as Tween 80 (T 80) [4] or Cremophor RH 40 (RH 40) [5,6,13], and anionic surfactants such as SDS [1,5,22,23], improve the solubility of poorly soluble drugs.

Several methods have been reported to determine NAP in plasma samples [1,13–16] and brain tissue [2]. The native fluorescence of NAP can be used to quantify a low range of concentrations [17], which may be suitable for determining NAP in the brain. Submicellar LC with fluorescence detection could be a suitable method for the routine analysis of a large number of NAP samples. The addition of surfactants to the mobile phase could also increase the fluorescence intensity of the NAP [3]. The high selectivity and sensitivity of this submicellar LC fluorescence method allows the analysis of plasma and brain tissue without the previous extraction and concentration processes.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

NAP (98%), SDS (99%), Tween® 80 (T 80), Kolliphor® RH 40 (RH 40), were purchased from Sigma® (Munich, Germany). Acetic acid glacial for HPLC (purity $>99.8\%$) was purchased from Panreac® (Barcelona, Spain). HPLC-grade acetonitrile was obtained from Scharlau® (Barcelona, Spain), Milli-Q water purification system (Millipore®, Madrid, Spain) was used to obtain ultra-pure water.

2.2 | Calibration standards

Stock solutions of NAP were prepared by mixing an appropriate amount of NAP with methanol to a final concentration of 0.2 mg/mL. An eight-point nonzero calibration standard, ranging from 2.7 to 16.3 $\mu\text{L/mL}$ for plasma samples and 0.21 to 2.38 $\mu\text{g/g}$ for brain samples, was prepared by spiking the drug-free mouse plasma and brain samples with an appropriate amount of NAP.

The calibration standards were prepared by adding 100.0 μL of mixed standard working solutions to 450 μL of acetonitrile and 100.0 μL of blank mouse plasma and brain samples. The QC samples were prepared by adding 100.0 μL of mixed standard working solutions to 100.0 μL of blank biological samples at three different concentrations (low, medium, and high quality control for plasma and brain samples). The QC samples were mixed with 450 μL of acetonitrile to verify the integrity of the method.

2.3 | Solubility studies in submicellar mobile phases

Classical approaches for measuring solubility were based on the saturation shake-flask method. Excessive amounts of NAP were placed in 5 mL vials containing different submicellar mobile phases. The vials were sealed and stored at a constant temperature (25°C), and shaken for 24 h until equilibrium was evident. After centrifugation of the incubated suspensions at 15 000 rpm for 15 min, the concentrations of NAP in the supernatant solutions were determined after dilution with acetonitrile and determined by an HPLC procedure. Comparative statistical studies of NAP concentrations were performed by paired Student's *t*-test. *p*-Values < 0.05 were considered significant.

2.4 | Chromatographic conditions

An Agilent® 1100 liquid chromatographic system (Madrid, Spain) equipped with an Agilent® G1321A multi λ fluorescence detector was used for the HPLC analysis of brain samples. The fluorescence detector excitation wavelength was set at 280 nm and the emission wavelengths were set at 310 nm

(IS) and 360 nm (NAP), respectively. A 250 × 4.6 mm, 5 μm Zorbax® SB-C8 column (Agilent Technologies, Madrid, Spain) was used for the separation processes, after which a 12.5 × 4.6 mm guard column was filled with the same packing material (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The mobile phases of the hydro-organic mode consisted of three solutions of 2% acetic acid/acetonitrile (40:60, 50:50, and 60:40, v/v). The submicellar mode comprised nine submicellar mobile phases with 0.007 M SDS, 0.0008 M RH 40, and 0.0015 M T 80, which were obtained by weighing 0.2% (w/v) of each surfactant and dissolving in aqueous solution (2% acid acetic) with 40–60% acetonitrile. The analysis started with a flow rate of 1.0 mL/min for 10 min. Once the analysis was complete, the chromatographic system was rinsed using a linear gradient of 2% acetic acid/ACN.

2.5 | Method validation

2.5.1 | Specificity

The specificity of a bioanalytical method is generally defined as the lack of interfering peaks at the retention times of the assayed drug in the chromatograms. The specificity of the assay was investigated by processing and analysing blanks prepared from six independent batches of plasma and brain sample controls, according to ICH Q2 (R1) guidelines [18].

2.5.2 | Linearity, detection limit, and quantification limit

The linearity of an analytical procedure is its ability (within a given range) to obtain test results that are directly proportional to the concentration of analyte in the sample. The linearity of the bioanalytical assay for the test compounds was evaluated by an eight-point calibration curve with plasma or brain prepared and assayed on 3 consecutive days. Linear least-squares regression analysis with a weighting factor of $1/x^2$ was performed to assess linearity and generate the standard calibration equations. The lower LOD and the lower LOQ were determined by applying ICH Q2 (R1), which can be quantitatively determined with a precision of 15% [19].

2.5.3 | Accuracy and precision

Intra-batch accuracy and precision were determined by analysing six replicates of QC samples at three concentrations (9.23, 12.30, and 15.37 μL/mL for plasma samples, and 0.54, 0.72, and 0.90 μg/g for brain samples) on 3 consecutive days. Accuracy and precision were expressed by relative error and RSD, respectively [18].

2.5.4 | Recovery

Recovery was calculated by comparing the concentration obtained from an extracted sample (recovered %) with the concentration obtained after the direct injection of a solution

of the same drug concentration diluted in the mobile phase (100%). The percentage of recovery was determined by comparing the concentrations of three QC samples ($n = 6$, 9.23, 12.30, and 15.37 μL/mL for plasma samples and 0.54, 0.72, and 0.90 μg/g for brain samples) with unextracted reference standards containing the same amount of analyte.

2.6 | Surfactant formulations for “in vivo” studies

The surfactant formulations contain NAP/surfactant proportions 90:10 w/w (NAP:SDS, NAP:RH40, and NAP:T80). The surfactant solutions were made by mixing the corresponding amount of surfactants to an aqueous solution by stirring for 2 min. Wet granulation was achieved by mixing 750 mg of NAP with 75 mg of disintegrant, then, 600 μL of the surfactant solution was added. After mixing, the mixture was dried for 4 h at 60°C and passed through a 0.840 mm sieve. The granules were dried in an oven at 60°C for 48 h. The final product was sieved to isolate the 0.297–0.840 mm fraction [20].

2.7 | Plasma and brain preparation

Twenty-four adult male BALB/c mice (18–24 g body weight, 8 weeks of age) were purchased from Harlan, Barcelona, Spain. This animal experiment was approved by the Animal Ethics Committee at the Alcala University, Madrid, Spain (ES28005000 1165). An NAP raw material was used as a reference formulation (NAP-RM). Micellar systems with three different surfactants were studied: NAP:T 80, NAP:RH 40, and NAP:SDS. The amount of each surfactant was 10% w/w referred to NAP. All the formulations were administered orally via buccogastric tube. Each freshly prepared reconstituted formulation was administered to six mice at a dose of 5 mg/kg dissolved in 0.5% w/v of sodium carboxymethyl cellulose. Six mice per formulation were euthanized by 15% urethane solution at 1 h. Whole blood (approximately 1.5 mL) was collected by cardiac puncture into heparinized vials and centrifuged at 9000 rpm for 15 min to obtain plasma. For the brain samples, the brains were excised after the euthanasia of the mice, washed with 0.5 mL of saline, and homogenized for 1 min. The plasma and tissue homogenates were stored at $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ until extraction [20]. For quantification in plasma aliquots, 200 μL of plasma were thawed. Then, 50 μL of SDS solution (0.75% w/v) was added with Tramadol as IS and mixed with 450 μL of acetonitrile in a vortex mixer for 2 min, then centrifuged at 5000× *g* for 5 min. The supernatant phase was filtered through a 45 μm Millipore® HVLP filter (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and the NAP plasma samples were determined by the HPLC-fluorescence method. To quantify the brain samples, 200 μL of the homogenate tissue were prepared using the same procedure. The second and third extractions of the tissue were done in a similar way to the first

extraction. The sample from each extraction was concentrated at 50°C for 2 h and resuspended in 200 μ L of mobile phase. The NAP was determined by the HPLC-fluorescence method. The concentrations in the third extracts of NAP were always lower than the relevant LOQ. Comparative statistical studies of different formulations were done using paired Student's *t*-test. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Surfactant adsorption to the stationary phase

Surfactants are added to the hydro-organic mobile phases to improve NAP native fluorescence with a reduced retention time. Submicellar mobile phases have been studied with ACN ratios of 40–60%. [12]. Figure 2 shows the different fluorescence scans of NAP in the hydro-organic mobile phase (2% acetic acid/ACN [50:50] v/v), and NAP in the submicellar mobile phases with nonionic surfactants: T 80 or RH 40 and anionic surfactant (SDS). The hydro-organic mobile phase 2% acetic acid/ACN (50:50) v/v (Scan 1) presents a maximum peak at 360 nm corresponding to the native fluorescence of NAP. The submicellar mobile phase 0.0015 M T 80/ACN 50:50 v/v (Scan 2) shows a slight change in the NAP peak (335 nm) with an improvement in intensity values (4.3-fold). The nonionic surfactant T 80 probably produces submicellar structures with a slight increase in the fluorescence intensity of NAP [4]. The use of RH 40 in the mobile phase (0.0008 M RH 40/ACN (50:50) v/v (Scan 3) has a maximum peak at 325 nm, with a sharp increase in the fluorescence intensity of NAP (9.9-fold). Similar fluorescence increases with RH 40 compared to T 80 have been previously described with different drugs [6]. The mobile phase with 0.007 M SDS/ACN (50:50) v/v (Scan 4), produced a 10.8-fold increase in the maximum emission fluorescence (335 nm) compared to the same mobile phase without SDS.

A similar increase in the fluorescence signal by adding SDS to the mobile phase has been previously observed with other raw materials with native fluorescence [7].

Table 1 shows the solubility of the NAP in the hydro-organic and submicellar mobile phases (T 80/ACN, RH 40/ACN and SDS/ACN) containing different proportions of 2% acetic acid/ACN (40:60, 50:50, and 60:40). The mobile phases with high proportions of ACN (40:60) showed high solubility values, and no differences (*p* > 0.05) were observed between the hydro-organic mobile phase and the different submicellar systems. These results indicate that submicellar systems are interrupted at a concentration of 60% ACN v/v in the absence of submicellar systems in the mobile phases; increased NAP solubility is related to the high proportion of ACN in the hydro-organic phase. However, all intermediate

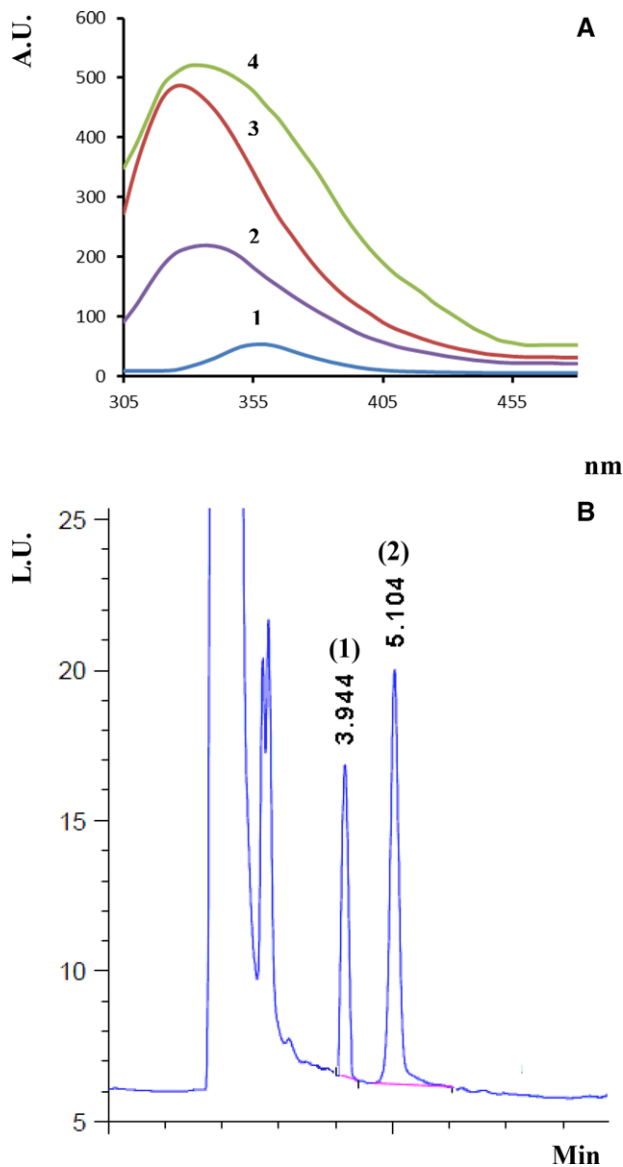


FIGURE 2 Fluorescence spectra and representative chromatogram of NAP samples. (A) Fluorescence spectra of NAP in different mobile phases: (1) hydro-organic phase (acetic acid/ACN 50:50 v/v), (2) submicellar mobile phase consisting of 0.0015 M T 80/ACN (50:50) v/v, (3) submicellar mobile phase with 0.0008 M RH 40/ACN (50:50) v/v and (4) submicellar mobile phase with 0.007 M SDS/ACN (50:50) v/v. (B) Brain sample chromatogram of 1 h after oral administration of 7.5 mg/kg of NAP in a submicellar mobile phase (0.007 M SDS/ACN 50:50 v/v). Compounds: (1) IS, (2) NAP

submicellar mobile phases (surfactant/ACN 50:50) showed an increased solubility of NAP (see Table 1) compared to the hydro-organic raw material (*p* < 0.05). These solubility results confirm the presence of submicellar structures in these hydro-organic mobile phases (50:50). Finally, the lower proportions of ACN in the mobile phase (60:40) allowed the formation of stable submicellar structures. Anionic surfactants in the submicellar mobile phase (0.007 M SDS/ACN 60:40) increased NAP solubility ($119.11 \pm 0.8.67 \mu\text{g/mL}$)

TABLE 1 Solubility of NAP ($\mu\text{g/mL}$) in three organic mobile phases with ranges 40–60% ACN and nine different submicellar mobile phases obtained by adding of surfactant: 0.007 M SDS, 0.0008 M RH 40 or 0.0015 M T 80 to the different hydro-organic mobile phases

Mobile phases	2% acetic acid/ACN 60 : 40	2% acetic acid/ACN 50:50	2% acetic acid/ACN 40 : 60
Without surfactant	80.77 \pm 4.65	299.75 \pm 6.08	475.74 \pm 5.19
SDS	121.71 \pm 4.47* ($p = 0.0003$)	345.61 \pm 8.22* ($p = 0.0021$)	473.29 \pm 7.94
RH 40	101.61 \pm 2.95* ($p = 0.0060$)	344.40 \pm 9.76* ($p = 0.0029$)	466.27 \pm 7.00
T 80	89.33 \pm 2.95	324.29 \pm 9.68* ($p = 0.0082$)	450.85 \pm 9.49

* Compared to mobile phase without surfactant ($p < 0.05$).

compared to nonionic surfactants such as 0.0015 M T 80/ACN 60:40 (85.24 \pm 10.01 $\mu\text{g/mL}$) or the hydro-organic mobile phase (80.77 \pm 4.65 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$). Probably, the low molar ratio (0.0015 M T 80) in this mobile phase probably produced a decrease in the submicellar structure, which reduced the solubility of NAP [4]. The increased solubility of NAP in mobile phases with surfactant solution/ACN ratios (50:50 and 60:40) was related to the formation of submicellar mobile phases [12]. Under these conditions, organic phases with 0.007 M SDS/ACN 50:50 v/v showed a submicellar structure with SDS similar to other studies [11].

Table 2 shows the retention times, theoretical plates, and width and peak symmetry in the submicellar mobile phases (2% acetic acid/ACN 50:50 v/v) with anionic (SDS) and nonionic surfactants (T 80 or RH 40). A decrease was observed in retention times in all submicellar mobile phases (SDS/ACN, RH 40/ACN, and T 80/ACN). SDS submicellar mobile phases showed the shortest retention times (5.10 min), while RH 40 and T 80 had intermediate retention times (6.86 and 6.98 min) compared to the mobile phase without surfactant (7.28 min). Differences were observed between the theoretical plate values and width peaks in the different submicellar mobile phases. Nonionic submicellar mobile phases (0.0008 M RH 40/ACN and 0.0015 M T 80/ACN) showed greater retention peaks (6.86 and 6.98, respectively) and large peak widths (0.197 and 0.187, respectively). These nonionic surfactants RH 40 and T 80 produced fewer interactions between the submicellar monomers with ionized silanols on the conventional silica-based stationary phase, leading to less efficiency. This could be due to the fact that a significant portion of the surfactant layer in the stationary phase reduces the masking effect on the silanol groups [12]. However, SDS monomers

reveal a greater desorption of the surfactant in the mobile phase (0.007 M SDS/ACN). Thus the SDS mobile phase had a lower retention peak (5.10 min) and peak width (0.137 min), but increased height (46.64 U.A.) and efficiency (values of 7693 N) compared to the other submicellar mobile phases. These results indicate that this mobile phase improves the penetration of the solutes and has a minor interaction with the silanol chains, which may be due to a greater association between the ionic monomer surfactant and the alkyl bonded to the silica stationary phase [11]. The surfactant monolayer was thus partially coated in the stationary phase, resulting in short retention times [12,21–23]. In these conditions, the submicellar mobile phase of SDS (0.007 M SDS/ACN 50:50 v/v) was selected to analyze low concentrations of NAP in tissues such as the brain.

3.2 | Specificity

The method used fluorescence detection due to its high sensitivity and specificity in plasma and brain tissue. From the fluorescence scans of IS (tramadol) and NAP, emission wavelengths of 310 nm (IS) and 360 nm (NAP) were selected for the same excitation wavelength of 280 nm.

Figure 2 shows the typical chromatograms of IS (3.94 min) and NAP (5.10 min) for brain samples using the submicellar mobile phase (0.007 M SDS/ACN (50:50) v/v). The selectivity of our method was evaluated by comparing the plasma and brain chromatograms in the control group with those prepared by spiking the standard solutions into the corresponding blank samples [18]. This submicellar mobile phase with fluorescence detection was selective for both plasma and brain methods. No interfering peaks were observed from endogenous

TABLE 2 Retention Time (RT), Height, Peak Symmetry (Symm) Width, Theoretical Plates (Plates) by USP methods, in hydro-organic mobile phase (50:50) and three different submicellar mobile phases: 0.007 M SDS/ACN(50:50), 0.0008 M RH 40/ACN (50:50) and 0.0015 M T 80/ACN (50:50)

	Acetic acid/ACN	SDS/ACN (50:50)	T 80/ACN(50:50)	RH 40/ACN(50:50)
TR (min)	7.283	5.101	6.980	6.859
Height (LU)	42.52	46.64	32.96	13.16
Symm	0.92	0.90	0.95	0.92
Width (min)	0.151	0.1368	0.1872	0.1421
Plates	12866	7693	7695	6735

plasma or brain components at or near the NAP retention time, indicating the high selectivity of this method (data not shown). This fluorescence detection technique by HPLC with the submicellar mobile phase increases the native fluorescence of NAP [16,17] and was selective in plasma and brain samples.

3.3 | Linearity, detection limit, and quantification limit

The parameters of the linear calibration curves were derived from the statistical analysis of three independently prepared eight-point calibration curves in plasma and brain samples. The mean regression equation was $y = 151.9x (\mu\text{g/g}) + 12.50$ for plasma and brain samples ($r^2 = 0.9975$).

The assays were linear between 0.25 and 2.5 $\mu\text{g/g}$. Although there are different methods for determining NAP in plasma samples [14], only a few studies have determined NAP in the brain [2,24]. The LOD of 0.08 $\mu\text{g/g}$ and the LOQ of 0.25 $\mu\text{g/g}$ were adequate to determine NAP concentrations in brain samples and their RSDs were always $>15\%$ [19].

3.4 | Precision and accuracy

To determine precision and accuracy, three replicate analyses were performed at each of the three concentrations. The methods of quantifying NAP with quality control samples in plasma and brain tissue are summarized in Table 3. The mean intra- and interday precision values for all plasma samples were within 0.74–2.96 and 0.24–3.05 RSD (%), respectively, (these values were similar to those obtained by other authors in plasma samples [1,25]). In brain samples, the mean intra- and interday precision values were between 0.17–2.26 and 0.80–2.75 RSD (%), respectively. These results agree with previously published data in the brain [2,25]. Both methods showed similar accuracy, with relative error % ranging from 0.40 to 2.86% in plasma and 0.80 to 2.75% in brain samples (see Table 3).

3.5 | Recovery

These values ranged from 93.33 to 96.64 and 95.06 to 96.25% for plasma and brain samples, respectively (Table 3). The RSD% obtained in brain samples was between 0.31 and 4.05% in all experiments. The recovery results in brain samples were similar to other studies [1,8]. These data suggest that this method has excellent accuracy and reproducibility and can be considered adequate to quantify NAP in plasma samples and brain tissues.

3.6 | Analysis of plasma and brain samples in mice

The submicellar LC fluorescence method validated in this study was successfully applied to determine plasma and brain

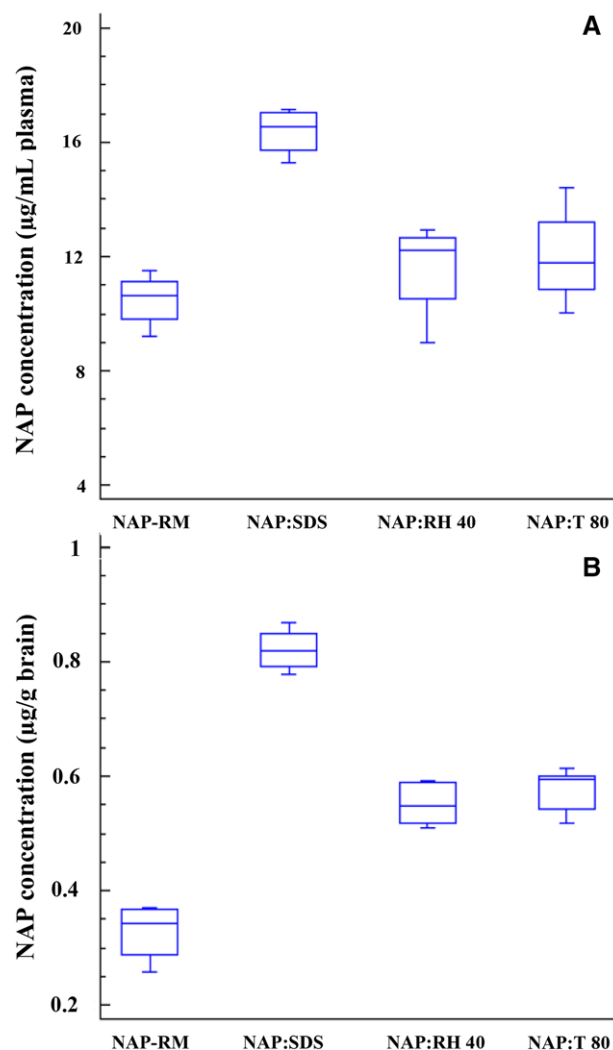


FIGURE 3 Concentrations of NAP in plasma (A) and brain (B) samples after oral administration (equivalent to 7.5 mg/kg of NAP) of the different formulations: NAP-RM, NAP:T 80, NAP:RH 40, and NAP:SDS. Data show boxplots indicating the upper/lower quartile and the median with whiskers from min to max values

levels of NAP for pharmacokinetic studies [20]. Plasma and brain analyses were performed 1 h after oral administration of NAP (7.5 mg/kg) under these conditions. Figure 3 shows the plasma and brain tissue concentrations after NAP-RM and in micellar systems with three different surfactants. Concentrations for the NAP-RM formulation were $10.49 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ and $0.33 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$ for plasma and brain tissue, respectively. These values were in agreement with the previously published values of T_{max} and C_{max} [1,2]. The correlation between brain/plasma ratios (B/P ratios) for NAP-RM showed a low value (0.031) [14]. The use of micellar systems with different surfactants produced an increase in NAP values in plasma and brain tissues compared to NAP-RM. The addition of surfactants in the micellar systems, therefore, increased the concentrations of NAP to 1 h in plasma and brain in the following order: NAP-RM $<$ NAP:RH 40 $<$ NAP:T

TABLE 3 Intra- and inter-day precision (RSD%), accuracy (RE%), and recovery of NAP determined by plasma and brain at three levels ($n = 6$)

	Concentration	Precision RSD ^a (%)		Accuracy RE ^b (%)		Recovery	
		Intraday	Interday	Intraday	Interday	Mean (%)	RSD ^a (%)
	($\mu\text{g/mL}$)						
Plasma	0.93	2.96	1.46	1.75	0.70	95.09	0.56
	1.23	1.45	3.05	-1.00	2.86	93.33	1.83
	1.54	0.74	0.24	-1.67	0.40	96.64	0.48
	($\mu\text{g/g}$)						
Brain	0.54	1.64	2.75	2.75	-2.09	95.06	4.05
	0.72	2.26	2.38	2.38	1.79	95.55	2.81
	0.90	0.17	0.80	0.80	-1.84	96.25	0.31

^aRSD, relative standard deviation.

^bRE, relative error.

80 < NAP:SDS. The presence of nonionic surfactants (RH 40 and T 80) showed a B/P ratio of 0.047 for both formulations. The highest concentrations were obtained with NAP:SDS compared to NAP-RM. One hour after administration, the plasma and brain concentrations of NAP:SDS compared with NAP-RM were 1.45 and 2.52 times, respectively. In this case, the correlation between the B/P ratios for NAP:SDS presented the highest value in comparison with the other surfactants (B/P ratio of 0.055). A recent study reports that surfactants such as T 80 were rapidly transferred from the plasma circulation to other tissues, rather than to the brain [26]. However, the intestinal absorption of SDS micelles was related to a greater accumulation in the brain [27]. However, further studies will be required to determine how the different proportions of SDS in micellar systems could modify the B/P ratio.

4 | CONCLUDING REMARKS

A quantitative submicellar LC fluorescence method was developed and validated to determine NAP levels in mouse plasma and brain samples. This method was sensitive, robust, and suitable for routine clinical analysis involving a large number of samples. It was used to investigate the brain/plasma distribution of NAP for formulations containing three different surfactants. All micellar systems had higher concentrations of NAP in plasma and brain tissue compared to NAP raw material. SDS micelles showed a higher brain distribution in mice than RH 40 or T 80 micelles. The information obtained from this study allows us to improve the plasma and brain concentrations in NAP formulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the CAI of Chemical and Microbiological Analysis (CAGYM) of the University of Alcalá (Alcalá de Henares (Spain)) for their support and assistance to perform

in this work. This study was partially supported by the Complutense University of Madrid (Research Group 910939).

ORCID

Santiago Torrado-Santiago 
<https://orcid.org/0000-0002-3273-2615>

REFERENCES

1. Yilmaz, B., Asci, A., Erdem, A. F., HPLC method for naproxen determination in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. *J. Chromatogr. Sci.* 2014, 52, 584–589.
2. Sheha, M., Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery. *Arch. Pharm. Res.* 2012, 35, 523–530.
3. Silva, R. A., Wang, C. C., Fernández, L. P., Masi, A. N., Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Talanta* 2008, 76, 166–171.
4. Mohamed, A. I., Omar, M. A., Hammad, M. A., Mohamed, A. A., Development and validation of highly sensitive stability indicating spectrofluorimetric method for determination of Amlodipine in pharmaceutical preparations and human plasma. *J. Fluoresc.* 2016, 26, 2141–2149.
5. Zidan, D. W., Elmasry, M. S., Hassan, W. S., Shalaby, A. A. Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Luminescence* 2018, 33, 232–242.
6. Zidan, D. W., Elmasry, M. S., Hassan, W. S., Shalaby, A. A. Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Luminescence* 2018, 33, 326–335.
7. Mostafa, A. M., Rageh, A.H., Ali, M. F. B., Mohamed, F. A., Micelle and inclusion complex enhanced spectrofluorimetric methods for determination of Retugabine: Application in pharmaceutical and biological analysis. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019, 15, 251–261.
8. Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J. R., García-Alvarez-Coque, M. C., Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2009, 1216, 1798–1814.
9. Belal, F., Ibrahim, F., Sheribah, Z. A., Alaa, H. Micellar HPLC-UV method for the simultaneous determination of levodopa, car-

- bidopa and entacapone in pharmaceuticals and human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2018, 1091:36–45.
10. Ruiz-Ángel, M. J., Torres-Lapasió, J. R., Carda-Broch, S., García-Álvarez-Coque, M. C., Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2010, 1217, 7090–7099.
11. Hadjmohammadi, M. R., Nazari, S. J. S. S., Separation optimization of aniline and seven 4-substituted anilines in high-submicellar liquid chromatography using empirical retention modeling and Derrienger's desirability function. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 3667–3672.
12. Ortiz-Bolsico, C., Ruiz-Ángel, M. J., García-Álvarez-Coque, M. C., Adsorption of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate on a C18 column under micellar and high submicellar conditions in reversed-phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2015 38, 550–555.
13. Tiong, N., Elkordy, A. A., Effects of liquisolid formulations on dissolution of naproxen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 73, 373–384.
14. Della Rocca, G., Di Salvo, A., Cagnardi, P., Marchesi, M. C., Conti, M. B., Naproxen in the horse: pharmacokinetics and side effects in the elderly. *Res. Vet. Sci.* 2014, 96, 147–152.
15. Sakaguchi, Y., Yoshida, H., Hayama, T., Yoshitake, M., Itoyama, M., Todoroki, K., Yamaguchi, M., Nohta, H., Fluorous derivatization and fluorous-phase separation for fluorometric determination of naproxen and felbinac in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55, 176–180.
16. Rezk, M. R., Michael, A. M., Lotfy, H. M., El-Kadi, A. O., Shehata, M. A., A rapid and sensitive HPLC assay of some concomitant anti-migraine drugs. *J. Chromatogr. Sci.* 2014, 52, 704–706.
17. Gallo, P., Fabbrocino, S., Dowling, G., Salini, M., Fiori, M., Perretta, G., Serpe, L., Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 2010, 1217, 2832–2839.
18. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 (R1), Geneva, 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
19. Martins, S. M., Wendling, T., Gonçalves, V. M., Sarmiento, B., Ferreira, D. C., Development and validation of a simple reversed-phase HPLC method for the determination of camptothecin in animal organs following administration in solid lipid nanoparticles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012, 880, 100–107.
20. García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, J. J., López-Sánchez, A., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 2017, 529, 381–390.
21. Richardson, A. E., McPherson, S. D., Fasciano, J. M., Pauls, R. E., Danielson, N. D., Corrigendum to “Micellar liquid chromatography of terephthalic acid impurities”. *J. Chromatogr. A.* 2017, 1491, 67–74.
22. Eid, M., El-Shabrawy, Y., El-Shaheny, R., Green micellar_HPLC analysis of three angiotensin-converting enzyme inhibitors in their mixtures with hydrochlorothiazide and modeling of their retention behavior by fitting to Foley's model. *J. Sep. Sci.* 2017, 40, 3646–3654.
23. Petr, J., Rapid determination of the critical micelle concentration by Taylor dispersion analysis in capillaries using both direct and indirect detection. *J. Sep. Sci.* 2017, 40, 1421–1426.
24. Andersen, C. A., Perfetti, P., Nibbio, M., Bellini, M., Angelini, R., Fornasier, M., Andersen., Brain penetration assessment in vivo: a reliable and simple method in anesthetized rats at steady state. *J. Neurosci. Methods.* 2017, 232, 199–206.
25. Yehia, A. M., Essam, H. M., Development and validation of a generic high-performance liquid chromatography for the simultaneous separation and determination of six cough ingredients: robustness study on core-shell particles. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 3357–3367.
26. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Harigae, T., Onuma, R., Kimura, F., Fujii, T., Miyazawa, T., Distribution of β -carotene-encapsulated polysorbate 80-coated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in rodent tissues following intravenous administration. *Int. J. Nanomedicine.* 2015, 10, 7223–7230.
27. Wang, G., Wang, J. J., Li, F., To, S. S., Development and evaluation of a novel drug delivery: pluronics/SDS mixed micelle loaded with myricetin in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105, 1535–1543.

How to cite this article: García-Herrero V, Torrado-Salmerón C, García-Rodríguez JJ, Torrado G, Torrado-Santiago S. Submicellar liquid chromatography with fluorescence detection improves the analysis of naproxen in plasma and brain tissue. *J Sep Sci* 2019;42:1702–1709. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801250>