

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE  
FLUNARIZINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA

TESIS DOCTORAL DE:

**VIRGINIA SANDOVAL CHACÓN**

DIRIGIDA POR:

**EMILIA MARÍA BARCIA HERNÁNDEZ  
MARÍA SOFÍA ELISA NEGRO ÁLVAREZ**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**



**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN  
CONTROLADA DE FLUNARIZINA PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA MIGRAÑA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**VIRGINIA SANDOVAL CHACÓN**

Bajo la dirección de las doctoras:

Emilia M<sup>a</sup> Barcia Hernández  
M<sup>a</sup> Sofía Elisa Negro Álvarez

Madrid, 2013





**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

Memoria presentada por Virginia Sandoval Chacón para  
optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad  
Complutense de Madrid.

Fdo.: Virginia Sandoval Chacón

VºBº

Los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dra. Emilia M<sup>a</sup> Barcia Hernández  
Prof. Titular del Dpto. de Farmacia  
y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia U.C.M.

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Sofía Elisa Negro Álvarez  
Prof. Titular del Dpto. de Farmacia  
y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia U.C.M.

Madrid, 2013



## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.*

*Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han prestado su apoyo, tanto profesional como personalmente, durante el difícil camino recorrido para finalizar esta tesis doctoral.*

*Particularmente quiero agradecer a mis directoras de la tesis, las Dras. Emilia M<sup>a</sup> Barcia Hernández y M<sup>a</sup> Sofía Elisa Negro Álvarez por acogerme en su grupo de investigación, y quienes me han acompañado en el trabajo duro día a día y han sabido encaminar mis pasos con gran dedicación e intuición, juntos hemos compartido muchos buenos momentos, gracias Dras.*

*También mi más cordial agradecimiento a la profesora Ana M<sup>a</sup> Fernández Carballido por su apoyo y quién no ha dejado de confiar en mi trabajo.*

*Durante la tesis he disfrutado de la amistad de muchos doctorandos y profesores, a los cuales quiero agradecerles también, pero de modo especial a Atika, gracias por tus mimos y apoyo, a María por estar siempre ahí, a los compañeros de la sección de Biofarmacia (Marta, Vanesa, Beatriz, María, Esther, Marcos y Alicia), en general a todos los compañeros del departamento por su apoyo y amistad, sin los cuales este camino hubiese sido más difícil.*

*Y finalmente dar las gracias a mi familia, en especial a mi marido y mis niños a quienes les dedico esta tesis doctoral, por su cariño, ternura, y ante todo por su paciencia, generosidad, y haber estado siempre a mi lado.*

*¡A todos, mil gracias!*



# ÍNDICE

<b>I. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. MIGRAÑA .....</b>	<b>5</b>
1. Introducción .....	7
2. Etiopatogenia.....	8
3. Teorías fisiopatológicas de la migraña .....	9
3.1. Teoría vascular .....	9
3.2. Teoría neorógena.....	9
3.3. Teoría unificadora: Teoría neurovascular .....	10
4. Teorías fisiopatológicas actuales: .....	12
4.1. Los pródromos.....	13
4.2. El aura .....	13
4.3. El dolor .....	15
5. Migraña y sueño .....	16
6. Migraña y cambios hormonales.....	17
7. Migraña y epilepsia.....	17
8. Tipos de migraña .....	18
9. Tratamiento.....	24
9.1. Tratamiento farmacológico.....	24
9.1.1. Tratamiento sintomático de la crisis de la migraña .....	24
9.1.2. Tratamiento farmacológico profiláctico de la migraña .....	26
Bibliografía .....	28
<b>III CLORHIDRATO DE FLUNARIZIANA .....</b>	<b>35</b>
1. Introducción .....	37
2. Características físico-químicas .....	37
3. Mecanismo de acción.....	38
4. Almacenamiento .....	38
5. Características biofarmacéuticas y farmacocinéticas .....	39
6. Aplicaciones clínicas .....	40
7. Posología.....	41

Bibliografía .....	43
<b>IV. MICROENCAPSULACIÓN .....</b>	<b>45</b>
1. Introducción .....	47
2. Polímero .....	48
3. Método de microencapsulación .....	50
3.1. Extracción-evaporación del disolvente .....	51
3.2. Recubrimiento en lecho fluido .....	54
Bibliografía .....	55
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
1. Aparatos .....	65
2. Reactivos .....	66
3. Determinación analítica del clorhidrato de flunarizina .....	67
3.1. Espectrofotometría de primera derivada .....	67
3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	69
3.3. Resultados obtenidos en la validación de la técnica espectrofotométrica de primera derivada .....	71
3.4. Resultados obtenidos en la optimización y validación de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	79
Bibliografía .....	86
<b>VI. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>87</b>
1. Introducción .....	89
2. Condiciones experimentales de los ensayos realizados en cultivos celulares .....	92
2.1. Puesta a punto y estabilización de las líneas celulares .....	92
2.2. Viabilidad celular y producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en las líneas celulares mediante citometría de flujo .....	93
3. Resultados obtenidos en cultivos celulares .....	94
3.1. Estudios de viabilidad celular en las líneas celulares. Citometría de flujo .....	94
Bibliografía .....	110
<b>VII. ENSAYOS PREVIOS .....</b>	<b>113</b>
1. Introducción .....	115

2. Selección del polímero .....	115
3. Preparación y caracterización de microesferas de clorhidrato de flunarizina con polímero de PLGA 502 .....	117
3.1. Preparación .....	117
3.2. Rendimiento del proceso y de encapsulación .....	120
3.3. Ensayos de cesión .....	123
4. Preparación y caracterización de microesferas de clorhidrato de flunarizina con polímero PLGA 502.....	126
4.1. Rendimiento del proceso y de encapsulación .....	126
4.2. Ensayos de cesión .....	127
5. Preparación y caracterización de microesferas de clorhidrato de flunarizina con una mezcla de PLGA 502 y 502H .....	129
5.1. Rendimiento del proceso y de encapsulación .....	129
5.2 Ensayos de cesión .....	130
6. Preparación y caracterización de microesferas de clorhidrato de flunarizina con distintas proporciones de principio activo y de polímero.....	133
6.1. Rendimientos del proceso y de encapsulación.....	134
6.2. Ensayos de cesión .....	135
7. Difractometría de rayos X.....	137
8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	140
Bibliografía .....	143

## **VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL .....145**

1. Introducción .....	147
2. Análisis estadístico .....	150
3. Resultados.....	150
Bibliografía .....	177

## **IX. FORMULACIÓN SELECCIONADA.....179**

Bibliografía .....	190
--------------------	-----

## **X. ESTERILIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA POR RADIACIÓN GAMMA .....191**

1. Introducción .....	193
-----------------------	-----

2. Esterilización de la formulación.....	195
3. Resultados.....	196
Bibliografía .....	209

## **XI. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN**

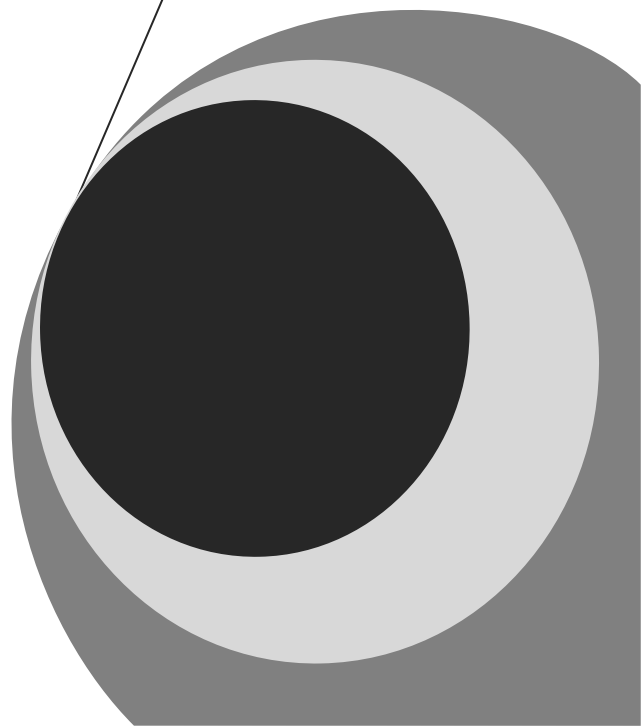
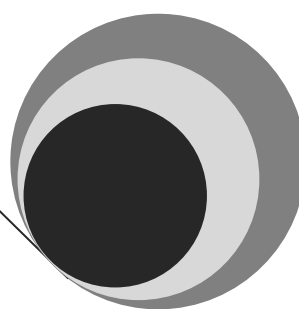
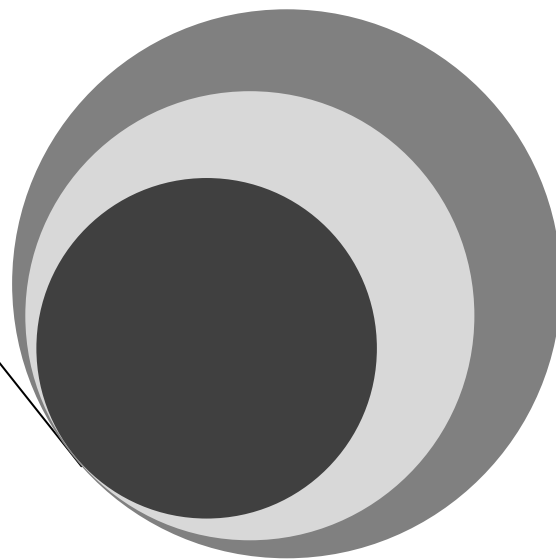
### **SELECCIONADA.....211**

1. Introducción .....	213
2. Condiciones de almacenamiento de la formulación.....	214
3. Resultados.....	216
Bibliografía .....	230

### **XII. CONCLUSIONES.....233**

### **XIII. SUMMARY.....235**

**I. OBJETIVO Y  
PLANTEAMIENTO**





## **OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO**

La migraña es un trastorno neurológico crónico que produce ataques episódicos caracterizados por dolor, síntomas asociados y, a menudo, discapacidad temporal. Desde el punto de vista económico, esta enfermedad puede considerarse en nuestros días un importante problema de salud; en primer lugar, por su alta prevalencia, y en segundo, porque provoca una carga importante para los pacientes, la familia y la sociedad.

La flunarizina es un fármaco con acción bloqueante de los canales de calcio, con cierta acción antagonista de los receptores de dopamina tipo 2. Por su efecto calcio antagonista se utiliza con éxito en el tratamiento profiláctico de la migraña. Pertenece al grupo de las difenilpiperazinas y actúa inhibiendo preferentemente el proceso contráctil de la musculatura lisa vascular, lo que se traduce en una vasodilatación arteriolar con una reducción de la resistencia periférica (postcarga). Además tiene un cierto efecto antihistamínico con acción sobre los receptores H1. Es también un agente antiemético y antivertiginoso.

La investigación y desarrollo de sistemas de liberación controlada dentro del campo de la Industria Farmacéutica surge con el objetivo principal de obtener un sistema que, al controlar los perfiles de liberación del principio activo contenido en él, proporcione una respuesta terapéutica continua y uniforme durante el tiempo deseado, reduciendo el número de administraciones y disminuyendo los efectos secundarios. De esta forma, los sistemas de liberación controlada permiten el uso más racional de los medicamentos, constituyendo grandes alternativas para la optimización de la terapia medicamentosa.

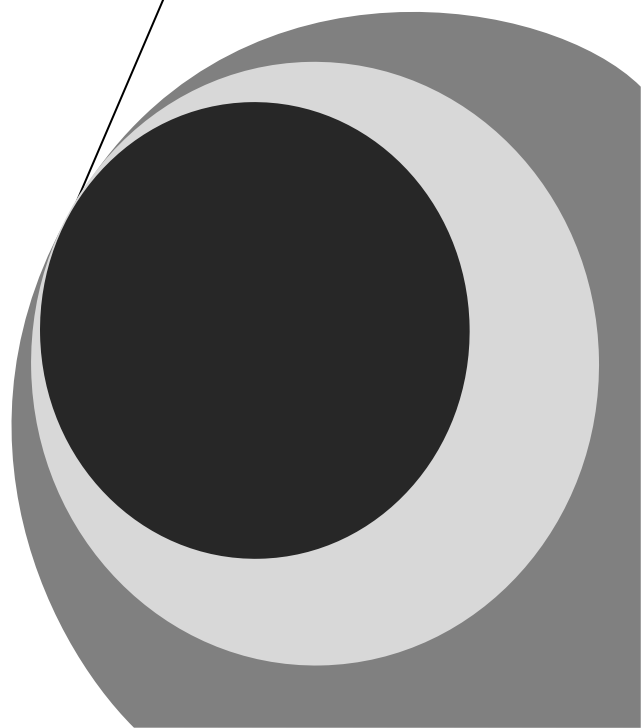
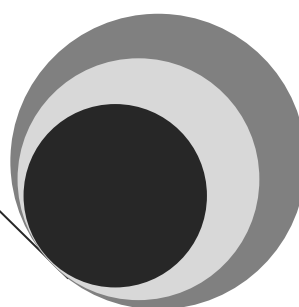
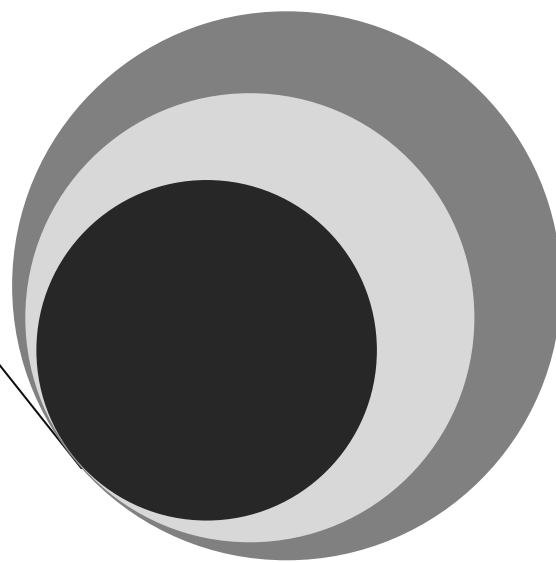
Por todo ello, en la presente memoria experimental y bibliográfica se desarrolla y optimiza una nueva formulación para el tratamiento de la migraña, que consiste en microesferas biodegradables de flunarizina, enfocada a conseguir la liberación del principio activo a una velocidad suficiente para

mantener niveles terapéuticos durante el mayor tiempo posible, tras la administración de la mínima cantidad de microesferas.

De acuerdo a lo anteriormente indicado, los objetivos parciales planteados en la presente memoria son los siguientes:

1. Ensayos preliminares en cuatro líneas celulares (PC3, SKN-AS, T47 y A-498).
2. Desarrollo y validación de técnicas analíticas de detección y cuantificación de flunarizina: espectrofotometría de primera derivada y cromatografía líquida de alta resolución.
3. Desarrollo, caracterización y evaluación in vitro de microesferas elaboradas a partir del copolímero láctico-glicólico (50:50), conteniendo clorhidrato de flunarizina como principio activo.
4. Optimización de la formulación de microesferas de flunarizina, mediante la aplicación de un diseño experimental, con el fin de lograr la liberación del principio activo a una velocidad suficiente para el tratamiento preventivo de la migraña.
5. Caracterización y evaluación in vitro de la formulación seleccionada de microesferas de flunarizina.
6. Esterilización de la formulación seleccionada mediante radiación gamma. Caracterización de la misma después del proceso de esterilización.
7. Estudios de estabilidad de la formulación seleccionada.

## II. MIGRAÑA





# MIGRAÑA

## 1. INTRODUCCIÓN

La migraña es un trastorno neurológico crónico que produce ataques episódicos caracterizados por dolor, síntomas asociados y, a menudo, discapacidad temporal. Desde el punto de vista económico, la migraña constituye una importante carga social, ya que incide tanto en la persona que la padece, como en sus familiares más cercanos, causando tanto absentismo escolar de los niños afectados, como absentismo laboral en los adultos, así como un elevado consumo de medicamentos para su tratamiento.

Esta enfermedad puede considerarse en nuestros días un importante problema de salud; en primer lugar, por su alta prevalencia, y en segundo, porque provoca una carga importante para los pacientes, la familia y la sociedad (*www.ihs-headache.org*).

Su prevalencia dentro de la población general es del 6% en varones y más elevada en mujeres, donde oscila entre el 15% y 18% (*Edmeads y col., 1993; Linet y col., 1989*), lo que resulta en una relación hombre/mujer de 1:2-3 (*Mathew, 1997; Solomon y col., 1994*). No se han observado diferencias en cuanto al nivel social o cultural. Tampoco hay diferencias en la raza, aunque su incidencia sí depende de la localización geográfica, siendo su prevalencia mayor en Norteamérica y Europa.

La edad de inicio es muy variable, pudiendo aparecer desde la infancia hasta por encima de la séptima década, siendo más frecuente el inicio entre la adolescencia y los 30 años (80-85%), de manera que su prevalencia aumenta hasta los 40 años y va descendiendo conforme envejece la población (*Rufo-Campos, 2001*). Se estima que al menos una de cada tres personas experimenta algún tipo de cefalea severa en alguna etapa de su vida. Por otra

parte, la migraña con aura se inicia a edades más tardías que la migraña sin aura.

Su incidencia aumenta en aquellos pacientes con antecedentes de primer grado (70% de los casos diagnosticados), si bien no se ha podido establecer un claro patrón genético, incluso cuando se realizan estudios con gemelos homocigotos (*Haan y col., 1997*).

La frecuencia de las migrañas es variable no sólo entre los pacientes sino también para un mismo paciente en diferentes épocas de su vida, aunque se puede considerar que, en general, una persona que padece de migrañas suele tener entre una y cuatro crisis al mes, lo que da una idea de la importancia que tiene este trastorno neurológico (*Bounes y Edlow, 2011*).

## **2. ETIOPATOGENIA**

La etiología de la migraña es desconocida, si bien se han descrito múltiples desencadenantes de las crisis de cefalea, como el consumo de ciertos alimentos, tales como el queso (rico en tiramina), chocolate (rico en feniletilamina), tomates, cebollas, naranjas, comida de los restaurantes chinos (rica en glutamato monosódico) y alcohol (*Leira y Rodríguez, 1996; Sun-Edelsteín y Mauskop, 2009*). Otros desencadenantes son los cambios de presión atmosférica, exposición a luces intensas, exceso o falta de sueño y períodos de tensión premenstrual, especulándose sobre la existencia de un mecanismo hormonal basado en los cambios de las concentraciones plasmáticas de hormonas sexuales, en especial de los estrógenos (*Brandes, 2006; Martin y Behbehani, 2006a; Martin y Behbehani, 2006b*).

### **3. TEORIAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA MIGRAÑA**

Las teorías fisiopatológicas que tienen más fuerza en la actualidad son la teoría clásica vascular y la teoría neurógena del sistema trigémino-vascular.

#### **3.1. Teoría vascular**

Es quizás la más antigua, pues data del año 1660, cuando Thomas Willis expuso la idea de que la migraña podría estar ocasionada por la vasodilatación dolorosa de los vasos de la cabeza (*Isler y Willis, 1986*). Se considera que la vasoconstricción de los vasos intracraneales sería la responsable de los síntomas deficitarios que ocurren durante el aura, mientras que el dolor estaría generado por la vasodilatación, que provocaría una activación de las fibras nociceptivas de las arterias intracraneales en unión de alteraciones de la neurotransmisión. Esta teoría, en una primera etapa, se vio reforzada con los estudios realizados por Maier y Tzanck, que observaron que la ergotamina era capaz de eliminar, mediante un efecto vasoconstrictor, los ataques de migraña (*Peer y col., 2011*). Posteriormente, estudios experimentales han sugerido que el aura se debe a procesos isquémicos cerebrales, mientras que la cefalea se origina como consecuencia de una vasodilatación de las arterias extracraneales, proceso que resulta reversible con la vasoconstricción inducida por fármacos ergotamínicos. Por último, se ha postulado que la migraña se produce al abrirse las uniones arteriovenosas que tomarían sangre de los lechos capilares (*Rufo-Campos, 2001*).

#### **3.2. Teoría neurógena**

Aunque en 1941 el neuropsicólogo de Harvard, Lashley, pensó en la posibilidad de que la migraña se desencadenara como consecuencia de la existencia de ondas de excitación que se propagan a lo largo de la corteza

---

visual a 3 mm por segundo (*Lashley, 1941*), fue el fisiólogo brasileño Leão quién en 1944 observa éste fenómeno en animales de experimentación y lo llama “depresión propagada”, como posible fundamento del aura en la migraña; con ello, esta entidad tendría un origen neurogénico a nivel de la corteza cerebral (*Leão, 1944*). El fenómeno consistiría en depresión de la actividad cortical cerebral liberadora de potasio, precedida de una onda de actividad metabólica incrementada (se multiplica la concentración extracelular de potasio, y aumenta el calcio, el cloro y el sodio intracelular), proceso que se desencadenaría por estímulos experimentales. Trabajos posteriores (*Olesen y col., 1990; Lauritzen, 1987*) estudiando el flujo sanguíneo cerebral regional, demuestran que se puede producir una disminución del mismo en humanos como consecuencia de una depresión propagada, ya que la velocidad de propagación es aproximadamente la misma. Del mismo modo, se pudo observar que esta depresión se acompaña de un aumento extracelular del ácido araquidónico, y de una liberación de glutamato.

Esta teoría neurogénica sólo puede explicar la existencia de una migraña con aura, ya que en la migraña sin aura no se han demostrado alteraciones del flujo sanguíneo cerebral regional. Cuando se inicia un ataque de migraña con aura, se registra un hipoperfusión cortical en la zona occipital, consistente en una disminución del 20-30% del flujo sanguíneo cerebral en zona. A la media hora del inicio, esta onda de hipoperfusión, que avanza a unos 2-3 mm por minuto, alcanza la corteza sensitivo-motora, recorriendo los surcos corticales y persistiendo por un espacio de 4-6 horas hasta que alcanza el lóbulo frontal (*Villalón y col., 2003*).

### **3.3. Teoría unificadora: teoría neurovascular**

Surge tras la constatación de que los mecanismos anteriores no justifican todos los fenómenos de las crisis de migraña. En esta teoría el desencadenante

---

inicial sería de origen neuronal, aunque el proceso doloroso migrañoso tendría origen en los vasos sanguíneos extracerebrales, especialmente los meníngeos (*Blau, 1992*).

En el ataque agudo de migraña con aura, y coincidiendo con la misma, se produciría en primer lugar un hipometabolismo-hipoperfusión del hemisferio homolateral al dolor, que generalmente se inicia en las partes posteriores del mismo. Es posible que existan algunos factores externos, que pudieran inducir la activación de los centros neuronales del troncoencéfalo, como son el locus ceruleus (donde se origina la inervación serotoninérgica encefálica) y los núcleos del rafe (lugar en el que se origina la inervación serotoninérgica encefálica), lo que provocaría la activación de las terminaciones sensitivas vasculares trigeminales. Tras la activación de estas terminales, se produce la liberación de algunos neuropéptidos vasoactivos, como la sustancia P, mediante un reflejo axo-axonal. Estas sustancias liberadas pueden dar lugar a la denominada inflamación neurógena, induciendo vasodilatación y posterior extravasación de proteínas plasmáticas. En este momento, el paciente aprecia el típico dolor pulsátil, independientemente del estado del flujo hemisférico. Las fibras del trigémino activadas de forma patológica transmiten la información nociceptiva a través del núcleo caudado hacia los núcleos superiores, provocando por un lado el proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos extracerebrales, mediante la percepción consciente del dolor y, por otro, el desencadenamiento del resto de la sintomatología migrañosa, mediante la activación del centro del vómito y otros centros vegetativos (*Pascual, 1993; Moskowitz, 1992; Bonvento y col., 1991; Goadsby y col., 2002*).

La presencia de serotonina, no sólo en el tracto gastrointestinal, sino en las plaquetas y en el sistema nervioso central, juega un importante papel en la fisiopatología de la migraña. Su acción en el desencadenamiento del dolor migrañoso se ha puesto de manifiesto al observar las alteraciones que se producen en los niveles de serotonina durante los ataques de migraña. Durante

la crisis disminuye la concentración de serotonina en plaquetas (*Sjaastad, 1975*), y aumenta la concentración de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en orina (*Panconesi, 2008*). Se ha demostrado además, que la administración de serotonina intravenosa alivia las crisis de migraña, mientras que la administración de reserpina induce su aparición (*Monteith y Goadsby, 2011*).

Todas estas teorías han supuesto una base fundamental para la comprensión del proceso, aunque todavía hay numerosas preguntas a las cuales no han podido dar respuesta.

#### **4. TEORIAS FISIOPATOLÓGICAS ACTUALES: LOS PRÓDROMOS, EL AURA Y EL DOLOR**

En un intento por aclarar lo que realmente ocurre durante un ataque de migraña, actualmente se está intentando separar cada uno de sus componentes (pródromos, aura y cefalea o dolor), explicando con detalle la fisiopatología de los mismos. Esta forma de actuar ha llevado incluso a considerar que la migraña con aura y la migraña sin aura podrían constituir una única entidad fisiopatológica. La explicación a la existencia de la migraña sin aura sería la de ser sólo una expresión clínica incompleta de la migraña con aura.

Mediante técnicas de Doppler transcraneal se ha evidenciado que el cerebro de las personas con migraña muestra una importante hiperexcitabilidad, una reactividad exagerada al CO<sub>2</sub>, un aumento de la perfusión cerebral y una reactividad cerebrovascular anormal (*Harer y Von Kummer, 1991*). El estudio de la inestabilidad de las membranas celulares mediante la técnica de resonancia magnética espectroscópica ha demostrado la existencia de niveles reducidos de fosfocreatina, con una baja relación de fosforilización PCr/Pi (fosfocreatina/fosfato), sobre todo en pacientes que padecen de migrañas con auras persistentes (*Schulz y col, 2007*).

#### 4.1. Los pródromos

Hay que diferenciarlos claramente del aura, y consisten en una variedad de síntomas neurológicos (depresión, euforia, rigidez de cuello, irritabilidad, disfunción cognitiva, etc.), signos sistémicos (anorexia, bulimia, fatiga) o síntomas autonómicos (bostezos, sed, poliuria, sensación de frío, diaforesis, diarrea, etc.) que aparecen en el 25-30% de los pacientes. Los pródromos se clasifican como no evolutivos, cuando acontecen dentro de las 6 a 48 horas antes de que se desencadene el ataque doloroso de migraña, o evolutivos; cuando aparecen hasta 6 horas antes del episodio doloroso. Estos síntomas parece que pueden tener origen en una disfunción hipotalámica (*Blau, 1992*).

#### 4.2. El aura

Pasada la anterior fase prodrómica, se inicia el aura. Hay que recordar que la International Headache Society (IHS) ([www.ihs-headache.org](http://www.ihs-headache.org)) delimita el concepto de aura a aquellos signos reversibles (corticales o del troncoencéfalo), que se inician de forma gradual durante más de 4 minutos, que duran menos de 1 hora, y que son seguidos por un episodio de cefalea en un tiempo inferior a 1 hora. En más del 90% de los casos el aura suele ser visual, especialmente expresado como un escotoma paracentral de bordes festoneados que se va expandiendo con posterioridad en forma de media luna y que se desplaza a una velocidad aproximada de unos 2-3 mm por minutos. A veces, se acompaña de trastornos sensitivos o motores, o incluso del lenguaje (*Lauritzen, 1994*).

El aura puede clasificarse como típica y atípica:

**a) Aura típica.** Se manifiesta con trastorno visual, parestesia unilateral, debilidad unilateral, afasia o dificultad para el lenguaje. Estos signos pueden ocurrir de forma secuencial; se inician con el fenómeno visual, continúan con parestesia y/o debilidad, y terminan con el trastorno del

lenguaje, aunque también cabe la posibilidad de que se inicie en un lado y posteriormente se extienda al otro lado.

**b) Aura atípica** Es el aura que no responde a un patrón característico como el descrito anteriormente, por ejemplo: fenómeno visual positivo persistente, migraña con aura prolongada.

Al estudiar el aura en personas afectadas de migraña mediante técnicas especiales, como magnetoencefalografía, neuroimagen funcional o retinotopía con estimulación visual, se ha podido observar que existe una estrecha relación entre el ciclo de la depresión cortical propagada y el aura. En un principio se produciría una hiperemia de una duración aproximada de 3 minutos, seguida de una hipoperfusión que se mantiene durante unas 2 horas, con supresión de la actividad visual, y propagación de esta disminución del flujo a una velocidad aproximada de unos 3 mm por minuto, que se detiene al alcanzar el surco parieto-occipital. Las primeras áreas activadas en el aura son las primeras en recuperarse (*Olesen y col., 1990*).

Entre los posibles agentes desencadenantes de aura se encuentran:

1. **Disminución de los niveles de magnesio.** Las personas afectadas de migraña presentan niveles bajos de magnesio en suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), células sanguíneas y saliva. La disminución de los niveles de magnesio puede producir una inadecuada apertura de los canales de calcio, facilitando la liberación de compuestos excitadores al aumentar el calcio intracelular. Así, el posible aumento del potasio extracelular puede facilitar la aparición de la depresión cortical propagada (*Mauskop A y col., 1995; Ramadan y col., 1989*).
2. **Mutación del ADN mitocondrial.** Se ha establecido una relación entre la migraña y una mutación en la región del ADN mitocondrial que codifica la subunidad ND4 del complejo I de la cadena respiratoria. Además, se ha demostrado que al administrar vitamina B<sub>12</sub> en individuos

con migraña se reduce la sintomatología migrañosa en al menos un 50% de los pacientes (*Schoenen J., 1998*).

- 3. Liberación de óxido nítrico.** La cefalea migrañosa puede ser aliviada mediante el empleo de agentes que disminuyen la liberación de óxido nítrico (triptanes, metisergida, ciproheptadina), o bien mediante la utilización de compuestos que disminuyen la actividad del enzima que sintetiza el óxido nítrico (algunos bloqueantes de los canales del calcio) (*Ashina y col., 2000*). Así, se ha observado que pacientes que presentan mutaciones cromosómicas que codifican regiones de los canales de calcio sensibles al voltaje, responden a los agentes bloqueantes inespecíficos de los canales de calcio, cuando se administran de forma profiláctica antes de la aparición de los accesos migrañosos (*Yakhnitsa y col., 1996; Felix, 2000*). En una alteración genética de los canales de calcio, se incrementa la síntesis de óxido nítrico, y se induce la hiperexcitabilidad cortical y el aura. Además, se eleva el potasio extracelular al desestabilizarse las membranas neurogliales, con lo que se inicia la depresión cortical propagada; efecto que se contrarrestaría con la utilización de agentes bloqueantes inespecíficos de los canales de calcio (*Schofield, 2001*).

#### **4.3. El dolor**

El dolor en la migraña tiene una evolución remitente-recurrente, debido a una secuencia de alteraciones anatomofisiológicas (*Radta, 2000; Bousser, 2000; Annequin y col., 2000*) en primer lugar, y mediado por el óxido nítrico, se produciría una activación del rafe dorsal del tronco cerebral o del núcleo caudal del trigémino, en el lado contrario al dolor.

Posteriormente se produce vasodilatación meníngea, como consecuencia de una estimulación antidrómica del sistema trigémino-vascular, que por un

lado produce una activación de las terminaciones nerviosas sensoriales trigeminales, que van a transmitir los impulsos nociceptivos al núcleo caudal del tronco cerebral, y por otra, se liberan péptidos vasoactivos produciendo vasodilatación e inflamación neurogénica. Cuando el estímulo nervioso llega al complejo trigémino-cervical, se intensifica el dolor y aumenta la sensibilidad hacia los estímulos extracraneales. Desde el núcleo del trigémino se envían las señales dolorosas hacia el tálamo, la corteza cerebral y los núcleos adyacentes del tronco, iniciándose entonces todos los fenómenos disautonómicos, náuseas y vómitos. El proceso se encuentra modulado por receptores serotoninérgicos de varios tipos: receptores vasoconstrictores del músculo liso de los vasos meníngeos, receptores inhibidores trigeminales y receptores inhibitorios trigeminales.

Recientemente ha cobrado interés la teoría de la inflamación neurógena secundaria a la activación del sistema trigémino-vascular, que es activado durante la migraña produciendo vasodilatación e inflamación de las meninges, lo que conduce al dolor migrañoso. Este proceso origina una activación plaquetaria, que modifica los niveles de serotonina en plaquetas, así como una liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC), que parece ser un marcador de la activación trigémina y por tanto, un marcador de la migraña (*Weiller y col., 1995*).

## **5. MIGRAÑA Y SUEÑO**

La relación de la migraña con el sueño es un hecho establecido aunque desconocido en su fisiopatología. Muchas personas que padecen migrañas tienen cefalea durante el sueño, pero también a la mayoría se les alivia la cefalea de comienzo diurno si consiguen dormir. Así, es habitual que se produzca migraña tanto si duermen menos como más de lo acostumbrado (*Rains y Poceta, 2010*).

## 6. MIGRAÑA Y CAMBIOS HORMONALES

La relación de la migraña con los ciclos hormonales femeninos es muy importante. La cefalea menstrual aparece en la mayoría de las mujeres y una gran parte de las migrañas tienen crisis perimenstruales. Por el contrario, las pacientes permanecen asintomáticas durante el embarazo, presentando crisis más intensas de lo normal en el puerperio, y algunas comienzan a sufrir las migrañas después de tener a su primer hijo. El tratamiento con anticonceptivos orales tiende a incrementar tanto la frecuencia como la intensidad de las crisis, y la terapia hormonal sustitutiva puede agravar la migraña en algunas pacientes. De hecho, algunas mujeres comienzan a padecer migrañas tras iniciar un tratamiento con anticonceptivos. La menarquia y menopausia suelen ser períodos muy sintomáticos. Con la edad se produce una disminución paulatina en la frecuencia de las jaquecas, pudiendo desaparecer después de la menopausia (*MacGregor, 2004*).

## 7. MIGRAÑA Y EPILEPSIA

La prevalencia de la epilepsia es más alta entre los pacientes con migraña y, a la inversa, la prevalencia de migraña entre los epilépticos llega al 24% (*Bigal y col., 2003*).

La relación clínica y fisiopatológica entre estos dos trastornos paroxísticos del cerebro es compleja (*Wang y col., 2010; Kossoff y Andermann, 2010*):

- 1) Las alteraciones en los canales de calcio iónicos (*canalopatías*) que se supone subyacen en la fisiopatología de la migraña y de la epilepsia pueden coexistir en la misma persona.
- 2) Los dos síntomas pueden ser expresión de la misma lesión orgánica cerebral (fístula arteriovenosa, meningioma o enfermedad de Sturge-Weber).

- 3) Una misma base patológica (citopatías mitocondriales) produce cefaleas migrañosas y crisis epilépticas.
- 4) La cefalea es un síntoma de la crisis epiléptica, sobre todo después de crisis focales de comienzo parietooccipital con aura sensitiva o visual. No es frecuente que la cefalea sea parte de los síntomas de una crisis epiléptica de comienzo focal; cuando esto es así, los pacientes nunca tienen sólo cefalea sino también otros síntomas asociados, como disminución en el nivel de consciencia, automatismo, etc.
- 5) El aura migrañosa desemboca en una crisis convulsiva. Esta posibilidad poco frecuente es posible que ocurra en pacientes con un "umbral convulsivo" bajo, en los cuales los fenómenos de oligoemia cortical del aura migrañosa desencadenan el ataque.

## **8. TIPOS DE MIGRAÑA**

Según la International Headache Society (IHS) ([www.ihs-headache.org](http://www.ihs-headache.org)) la migraña se pueden clasificar en:

1. Migraña sin aura (migraña común)
  2. Migraña con aura (migraña clásica):
    - 2.1. Migraña con aura típica
    - 2.2. Migraña con aura prolongada
    - 2.3. Migraña hemipléjica familiar
    - 2.4. Migraña basilar
    - 2.5. Aura migrañosa sin cefalea
    - 2.6. Migraña con aura de inicio agudo
-

3. Migraña oftalmopléjica
4. Migraña retiniana
5. Síndromes periódicos en la infancia que pueden ser precursores o estar asociados a migraña:
  - 5.1. Vértigo paroxístico benignos de la infancia
  - 5.2. Hemiplejia alternante de la infancia
  - 5.3. Vómitos cíclicos del lactante
6. Complicaciones de la migraña:
  - 6.1. Estado de mal migrañoso
  - 6.2. Infarto migrañoso
7. Trastorno migrañoso que no cumple los criterios antes mencionados
8. Migraña transformada:
  - 8.1. Migraña transformada con abuso de analgésicos
  - 8.2. Migraña transformada sin abuso de analgésicos

### **8.1. Migraña sin aura**

La migraña sin aura o migraña común corresponde a una cefalea recurrente de localización eminentemente unilateral (70% de los casos), de carácter pulsátil, intensidad moderada severa, que empeora con el ejercicio y que está asociada a náuseas, vómitos, fotofobia y sonofobia. En la clínica de un episodio de migraña sin aura, de acuerdo con Blau (*Blau, 1992*) se pueden distinguirse 4 fases:

- 1) **Síntomas premonitorios:** estos síntomas pueden manifestarse hasta dos días antes de la crisis. Se manifiestan con hipo o hiperactividad física o mental, depresión, ansias de algún alimento especial, bostezos, retención de fluidos, aumento de la percepción, hipersensibilidad a la luz o al ruido, sed y poliuria. En ocasiones predominan los síntomas inhibitorios tales como: lentitud mental, cansancio, dificultad para expresarse, debilidad muscular, frío, cansancio, anorexia, estreñimiento y molestias abdominales.
- 2) **Cefalea y síntomas asociados:** la mayoría de los pacientes desarrollan un dolor hemicraneano y pulsátil que empeora con la actividad física o al mover la cabeza. La crisis dolorosa puede ir acompañada o precedida de náuseas, vómitos, diarrea, fotofobia, fonofobia, vértigo, dolor abdominal o falta de concentración la mayoría de las veces.
- 3) **Resolución:** en la mayoría de los pacientes el dolor desaparece lentamente, en algunos después de varias horas de sueño y en otros después de vomitar.
- 4) **Recuperación:** después de la crisis el paciente puede presentar intolerancia a las comidas, cansancio, aumento de la diuresis y alteraciones del estado de ánimo durante un período de tiempo de hasta dos días.

## 8.2. Migraña con aura

La migraña con aura es la migraña clásica. En este caso las crisis de cefalea se acompañan de síntomas neurológicos corticales o troncoencefálicos que preceden o acompañan a la cefalea, que se instauran gradualmente y que no suelen durar más de 60 minutos. A los síntomas de aura neurológica le

siguen náuseas y fotofobia, y en ocasiones cefalea que puede durar entre 4 y 72 horas.

Las auras pueden ser visuales, sensoriales, motoras, de lenguaje u otras menos típicas, pero las más frecuentes son los escotomas visuales. Exceptuando este fenómeno del aura, el resto del desarrollo de la crisis es muy similar al anteriormente descrito para la migraña sin aura.

Existen varios subtipos de migraña con aura:

### **8.2.1. Migraña con aura típica**

La migraña con aura típica es la más frecuente de las migrañas con aura. Sus síntomas más habituales son alteraciones visuales homónimas temporales/nasales y superiores/inferiores (alucinaciones visuales simples). Otras auras se manifiestan con alteraciones sensoriales o debilidad localizadas en un hemisferio e incluso fenómenos disfásicos.

### **8.2.2. Migraña con aura prolongada**

Es una migraña con uno o más síntomas de aura que duran más de 60 minutos, y que puede llegar a tener una duración de 7 días.

### **8.2.3. Migraña hemipléjica familiar**

En este tipo de migraña el aura incluye una hemiparesia. Tiene un origen genético y parece que se desencadena como consecuencia de una mutación del cromosoma 19 en los exones que codifican la subunidad  $\alpha 1$  del canal del calcio P/Q (*Ophoff y col., 1996*).

La migraña hemipléjica familiar suele comenzar en la infancia y las crisis suelen ser similares y afectan al mismo lado. Los pacientes que sufren este tipo de migraña, al igual que aquellos que padecen migrañas con aura hemipléjica que no tienen un carácter familiar, poseen un mayor riesgo de sufrir infarto cerebral (*Titus Albareda, 1990*).

#### **8.2.4. Migraña vertebrobasilar**

También llamada migraña de Bickerstaff (*Bickerstaff, 1961*), o migraña sincopal. Los síntomas del aura se circunscriben fundamentalmente al territorio vascular del sistema de circulación posterior, troncoencéfalo y lóbulos occipitales, seguidos de una cefalea de localización típicamente occipital. Se trata de un cuadro difícil de diagnosticar y en el que en algunos casos los pacientes pueden presentar complicaciones como estado de coma, que pueden llegar a necesitar de ventilación mecánica del paciente, crisis epilépticas e infarto migrañoso.

#### **8.2.5. Aura migrañosa sin cefalea**

El aura migrañosa sin cefalea se caracteriza por la ausencia de cefalea, y sus criterios de diagnóstico son los siguientes:

- A. Tener dos o más cefaleas precedidas de aura.
- B. El aura ha de cumplir al menos tres de las siguientes características:
  - Uno o más síntomas completamente reversibles que indican disfunción cortical cerebral focal, de tronco cerebral o de ambos.
  - Instauración gradual durante más de 4 minutos.
  - Duración no superior a 60 minutos.

- La cefalea se manifiesta después del aura transcurridos al menos 60 minutos.

Suele afectar a ancianos con antecedentes de migraña con o sin aura.

### **8.2.6. Migraña con aura de inicio agudo**

Como su nombre indica, se trata de una migraña con aura cuyos síntomas se inician y desarrollan por completo en menos de 5 minutos.

### **8.3. Migraña oftalmopléjica**

Este tipo concreto de migraña suele iniciarse en la infancia y cursa con cefaleas unilaterales recurrentes acompañadas de parálisis de los músculos oculares extrínsecos e incluso intrínsecos. El par oculomotor más frecuente implicado es el III par con o sin afectación parasimpática (midriasis y ptosis) y más raramente el VI y IV par. La paresia suele persistir una vez finalizada la cefalea durante días o semanas, pudiendo quedar secuelas permanentes de paresia ocular extrínseca o intrínseca. Tiene una incidencia anual de 0,7 casos por millón (*Bharucha y col., 2007; Doran y Larner, 2004*). La mayoría de los casos se presenta antes de los 10 años de edad (*Woody y Blaw, 1986*).

### **8.4. MIGRAÑA RETINIANA**

En este tipo de migraña la crisis de cefalea va acompañada de pérdida de visión monocular en forma de escotoma o amaurosis que duran menos de 1 hora. En la exploración del fondo de ojo pueden apreciarse atenuación arteriolar y hemorragias peripapilares.

## **9. TRATAMIENTO**

Todas las migrañas están asociadas con dolor, difieren en su severidad y su frecuencia, por ello, el tratamiento será individualizado de acuerdo a los síntomas predominantes y a la comorbilidad del paciente.

El tratamiento se realiza a dos niveles:

1) Tratamiento farmacológico, que consta de tratamiento de la crisis de migraña así como de tratamiento profiláctico.

2) Tratamiento no farmacológico, que casi siempre es de carácter profiláctico.

### **9.1. Tratamiento farmacológico**

El tratamiento farmacológico de la migraña puede ser sintomático (tratamiento de las crisis agudas) y/o preventivo o profiláctico, encaminado a evitar la aparición de las crisis agudas de dolor. Los pacientes con crisis frecuentes precisan ambos tipos de tratamiento. El tratamiento agudo intenta abordar la crisis de migraña cuando ésta ya ha comenzado (revirtiéndola o impidiendo la progresión de los síntomas). Está indicado para tratar la mayoría de las crisis agudas, independientemente de que el enfermo tome tratamiento profiláctico. En contraposición, el tratamiento preventivo se usa independientemente de la crisis aguda para reducir su intensidad y frecuencia y por tanto, debe utilizarse de una forma más selectiva.

#### **9.1.1. Tratamiento sintomático de la crisis de la migraña**

Se debe iniciar el tratamiento con el fármaco que menos contraindicaciones tenga para el enfermo, según las características de cada paciente y la forma de presentación de la crisis. Se recomiendan especialidades

---

farmacéuticas que contengan un solo fármaco, administrados al inicio de la crisis y utilizando desde el principio la dosis necesaria para obtener la máxima eficacia. Se ha publicado el "US Headache Consortium Guidelines" donde han participado varias organizaciones para desarrollar una aproximación unificada, basada en la evidencia, en el tratamiento de la migraña (*Lipton y Silberstein, 2001*).

El tratamiento de la crisis de migraña, dependiendo de la intensidad de la misma y de los síntomas acompañantes, se puede dividir en:

1. Tratamiento de crisis leves-moderadas. Los fármacos analgésicos más apropiados son: paracetamol, ácido acetilsalicílico, naproxeno sódico, ibuprofeno, ketorolaco, dexketofeno y diclofenaco sódico. Para el tratamiento de los síntomas vegetativos asociados se recomienda la utilización de domperidona o metoclopramida.

El mal uso o abuso de medicación analgésica, en especial ácido acetil salicílico, paracetamol, metamizol magnésico, codeína, meperidina o la combinación de ellos, desencadena con frecuencia la cronificación de la cefalea en forma de migraña transformada con abuso de analgésicos.

2. Tratamiento de crisis de migraña moderadas-intensas. Se utilizan los derivados ergotamínicos y los agonistas de los receptores 1B de la serotonina. Se sabe que la estimulación de los receptores 5-HT 1B/1D y 5-HT 1A es útil en la fase aguda de la migraña, mientras que si se actúa sobre los receptores 5-HT2 y 5-HT 1C se consigue un efecto profiláctico.

Los agentes antagonistas 5-HT 1B/D 1D de los vasos intracraneales y terminaciones nerviosas craneales son el grupo de los denominados triptanes. Son efectivos tanto como analgésicos como para eliminar el componente vegetativo. Ejercen su acción en cualquier momento de la crisis de cefalea. No deben administrarse durante el aura sino al inicio de la cefalea. Entre los

triptanes que más se utilizan se encuentran sumatriptán, zolmitriptán, naratriptán y rizatriptán.

La ergotamina también actúa sobre los receptores 5-HT. Es muy eficaz en el tratamiento de la crisis de migraña aunque esta cada vez más en desuso debido a que su utilización provoca dependencia y efecto rebote.

### 9.1.2. Tratamiento farmacológico profiláctico de la migraña

El tratamiento profiláctico de la migraña está indicado en pacientes con migrañas que interfieren en su vida cotidiana de manera importante o que les resulta incapacitante, bien por su intensidad bien por su frecuencia. Se suele recomendar a pacientes con más de 2 crisis mensuales de migraña. El tratamiento profiláctico suele tardar entre 2 y 6 semanas en ejercer su acción, y se debe mantener de 3 a 6 meses. Los fármacos más utilizados son los siguientes:

- **Betabloqueantes.** Están particularmente indicados para el tratamiento de la migraña que cursa con ansiedad o estrés, en pacientes hipertensos y en los que además se presentan temblor o hipertiroidismo. Entre los betabloqueantes más utilizados se encuentran propranolol, atenolol, nadolol y metoprolol, de los que hay alguna evidencia en estudios clínicos (*Tfelt-Hansen y col., 1984; Silberstein, 2000*).
- **Antagonistas de los canales de calcio.** Representan, junto con los betabloqueantes, la principal opción del tratamiento preventivo. Dentro de este grupo el clorhidrato de flunarizina es el más empleado y el más eficaz. Además, se pueden utilizar también nicardipino, nimodipino, verapamilo y diltiazem.
- **Antidepresivos tricíclicos.** Son un grupo de fármacos de segunda línea. Están especialmente indicados en pacientes con componente

ansioso-depresivo asociado. Los más empleados son amitriptilina e imipramina.

- **Antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.** La fluoxetina tiene escasa evidencia que sustente su uso en pacientes con migraña sin depresión asociada. En algunos estudios se ha evidenciado nueva aparición o exacerbación de cefalea preexistente y efectos similares a placebo después de dos meses de terapia. Es útil en pacientes con depresión asociada y que son intolerantes al tratamiento con amitriptilina (*Krymchantowski y col., 2002*).
- **Antiserotoninérgicos.** Son fármacos de tercera línea debido a sus efectos secundarios. Entre ellos se encuentran metisergida, pizotifeno y ciproheptadina.
- **Ácido valproico.** Es un fármaco de segunda línea pero muy utilizado. Es más efectivo en el tratamiento de la migraña intensa, siendo poco eficaz en los casos leves-moderados. Es teratogénico por lo que está completamente prohibido su uso durante el embarazo. Contraindicado en pacientes con pancreatitis, hepatitis, trombocitopenia, pancitopenia y trastornos hemorrágicos (*Mulleners y col., 2008*).
- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).** Son útiles tanto en el tratamiento sintomático como profiláctico. Son fármacos de primera elección en las crisis de migraña moderada y con utilidad en el tratamiento del estatus migrañoso y también en las migrañas de intensidad severa. Dentro de este grupo se utilizan el ácido acetilsalicílico, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco sódico, ketorolaco y dexketoprofeno.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Annequin D., Dumas C., Toumiaire B., Massiou H.** Migraine and chronic headache in children., *Rev. Neurol.*, 156: 4S68-4S74; 2000.

**Ashina M., Lassen L.H., Bendtsen L., Jensen R.A., Olesen J.** Inhibition of nitric oxide synthase has an analgesic effect in chronic pain., *Ugeskr Laeger.*, 162: 171-173; 2000.

**Bickerstaff ER.** Impairment of consciousness in migraine., *Lancet.*, 2: 1057-1059; 1961.

**Blau J.N.** Migraine: theories of pathogenesis., *Lancet.*, 339: 1202-1207; 1992.

**Bigal M.E., Lipton R.B., Cohen J., Silberstein S.D.** Epilepsy and migraine. *Epilepsy Behav.*, 4: S13-24; 2003.

**Bharucha D.X., Campbell T.B., Valencia I., Hardison H.H., Kothare S.V.** MRI findings in pediatric ophthalmoplegic migraine: A case report and literature review., *Pediatr. Neurol.*, 37:59-63; 2007.

**Bonvento G., Lacombe P., Mackenzie E.T., Fage D., Benavides J., Rouquier L., Scatton B.** Evidence for differing origins of the serotonergic innervations of major cerebral arteries and small pial vessels in the rat., *J. Neurochem.*, 56: 681-689; 1991.

**Brandes J.L.** The influence of estrogen on migraine: a systematic review. *JAMA*, 295: 1824–1830; 2006.

**Bounes V., Edlow J.A.** Diagnosis and pharmacologic treatment in emergency department., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 15: 215-221; 2011.

**Bousser M.G.** Migraine, ten years of progress., *Ann. Pharm.*, 58: 363-372; 2000.

**Doran M., Larner A.J.** MRI findings in ophthalmoplegic migraine: Nosological implications., *J. Neurol.*, 251: 100-101; 2004.

**Edmeads J., Findlay H., Tugwell P., Phillips W., Nelson R.F., Murray T.J.** Impact of migraine and tension type headache on life-style, consulting behaviour, and medication use: a Canadian population survey., *Can. J. Neurol. Sci.* 20: 131-137; 1993.

**Felix R.** Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders., *J. Med. Genet.*, 37: 729-740; 2000.

**Goadsby P.J., Lipton R.B., Ferrari M.D.** Migraine. Current understanding and Treatment., *N. Engl. J. Med.*, 346: 257-270; 2002.

**Haan J., Terwindt G.M., Ferrari M.D.** Genetics of migraine. *Neurol. Clin.*, 15: 43-60; 1997.

**Harer C., Von Kummer R.** Cerebrovascular CO<sub>2</sub> reactivity in migraine: assessment by transcranial Doppler ultrasound., *J. Neurol.*, 238: 23-26; 1991.

**Isler H. Willis T.** Two chapters on Headache of 1672: A first attempt to apply the "New Science" to this Topic., *J. Head Face Pain.*, 26: 95-98; 1986.

**Krymchantowski A.V., Silva M.T., Barbosa J.S., Alves L.A.** Amitriptyline versus amitriptyline combined with fluoxetine in the preventative treatment of transformed migraine: a double-blind study., *Headache.*, 42: 510-4; 2002.

**Kossoff E.H., Andermann F.** Migraine and epilepsy., *Semin. Pediatr. Neurol.* 17: 117-122; 2010.

**Lashley K.S.** Patterns of cerebral integration indicated by scotomas of migraine. *Arch. Neurol. Psych.*, 46: 331-339; 1941.

**Lauritzen M.** Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory., *Brain.*, 117: 199-210; 1994.

**Leño A.A.P.** Spreading depression of activity in the cerebral cortex., *J. Neurophysiol.*, 7: 359-390; 1944.

**Leira R., Rodriguez R.** Diet and migraine., *Rev. Neurol.*, 24: 534-538; 1996.

**Linnet M.S., Stewart W.F., Celentano D.D.** An epidemiologic study of headache among adolescents and young adults., *JAMA.*, 261: 2211; 1989.

**MacGregor E.A.** Oestrogen and attacks of migraine with and without aura. *Lancet Neurol.*, 3: 354–361; 2004.

**Lipton R, Silberstein S.** The role of headache-related disability in migraine management: Implications for headache treatment guidelines., *Neurology.*, 56: S35-S42; 2001.

**Martin V.T., Behbehani M.** Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis Part I., *Headache.*, 46: 3–23; 2006a.

**Martin V.T., Behbehani M.** Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis- Part 2. *Headache.*, 46: 365–386; 2006b.

**Mathew N.T.** Progresos en el diagnóstico y tratamiento de las cefaleas. *Clínicas Neurológicas de Norteamérica vol I.*, Mc. Graw – Hill Interamericana. 1997.

**Mauskop A. Altura B.T. Cracco R.Q., Altura B.M.** Intravenous magnesium sulphate relieves migraine attacks in patients with low serum ionized magnesium levels: a pilot study., *Clin. Sci.*, 89: 633-636; 1995.

**Monteith T.S., Goadsby P.J.** Acute migraine therapy: new drugs and new approaches., *Curr. Treat. Options. Neurol.*, 13: 1–14; 2011.

**Moskowitz M.A.** Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptam and ergot alkaloids in migraine., *Trends. Pharmacol. Sci.*, 13: 307-11; 1992.

**Mulleners W.M., Chronicle E. P.** Anticonvulsants in migraine prophylaxis: a Cochrane review., *Cephalalgia.*, 28 :585-97; 2008.

**Olesen J., Friberg L., Olsen T.S., Iversen H.K., Lassen N.A., Andersen A.R., Karle A.** Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks., *Ann. Neurol.*, 28: 791-798; 1990.

**Ophoff R.A., Terwindt G.M., Vergouwe M.N., van Eijk R., Oefner P.J., Hoffman S.M., Lamerdin J.E., Mohrenweiser H.W., Bulman D.E., Ferrari M., Haan J., Lindhout D., van Ommen G.J., Hofker M.H., Ferrari M.D., Frants R.R.** Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4., *Cell.*, 87: 543-52; 1996.

**Panconesi A.** Serotonin and migraine: a reconsideration of the central theory., *J. Headache. Pain.*, 9: 267–276; 2008.

**Pascual J.** Migraña, serotonina y receptores serotoninérgicos., *Neurol.*, 8: 180-183; 1993.

**Peer C., Tfelt-Hansen M.D., Koehler P.J.** One hundred years of migraine research: Major and Scientific observations from 1910 to 2010., *Headache.*, 51: 752-778; 2011.

**Radta F.** Psychopathology and headache., *Rev. Neurol.*, 156: 4S62-4S67; 2000.

**Rains J.C., Poceta J.S.** Sleep and headache. *Curr. Treat. Options.*, *Neurol.*, 12: 1-15; 2010.

**Ramadan N.M, Halvorson H., Vande-Linde A., Levine, S.R., Helpert, J.A., Welch K.M.** Low brain magnesium in migraine., *Headache.*, 29: 590-593, 1989.

**Rufo-Campos M.** The pathophysiology of migraine., *Rev. Neurol. Clin.*, 2: 263-271; 2001.

**Schoenen J., Jacquy J., Lenaerts M.** Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial., *Neurol.*, 50: 466-470; 1998.

**Schofield P.R.** Genetics, an alternative way to discover, characterize and understand ion channels., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28: 84-88; 2001.

**Schulz U.G., Blamire A.M., Corkill R.G., Davies P., Styles P., Rothwell P.M.** Association between cortical metabolite levels and clinical manifestations of migrainous aura: an MR-spectroscopy study., *Brain.*, 130: 3102-3110; 2007.

**Silberstein SD.** Practice parameter—evidence-based guidelines for migraine headache (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology for the United States Headache Consortium., *Neurology.*, 55: 754–62; 2000.

**Sjaastad O.** The significance of blood serotonin levels in migraine. A critical review., *Acta. Neurol. Scand.*, 51: 200-10; 1975.

**Solomon G.D., Skobieranda F.G., Gragg L.A.** Does quality of life differ among headache diagnoses. Analysis using the medical outcomes study instrument., *Headache*, 34: 143-7; 1994.

**Sun-Edelsteín C., Mauskop A.** Foods and supplements in the management of migraine headaches., *Clin. J. Pain.*, 25: 446-452; 2009.

**Tfelt-Hansen P., Standnes B., Kangasniemi P., Hakkarainen H., Olesen J.** Timolol vs propranolol vs placebo in common migraine prophylaxis: a double-blind multicenter trial., *Acta. Neurol. Scand.*, 69: 1–8; 1984.

**Titus Albareda F.** Migraine and infarction., *Neurol.*, 5: 303-305; 1990.

**Villalón C.M., Centurión D., Valdivia L.F., de Vries P., Saxena P.R.** Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends., *Curr. Vas. Pharm.*, 1: 71-84; 2003.

**Wang S.J., Chen P.K., Fuh J.L.** Comorbidities of migraine., *Front. Neurol.*, 23:16; 2010.

**Weiller C., May A., Limmroth V.** Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks., *Nat. Med.*, 1: 658-660; 1995.

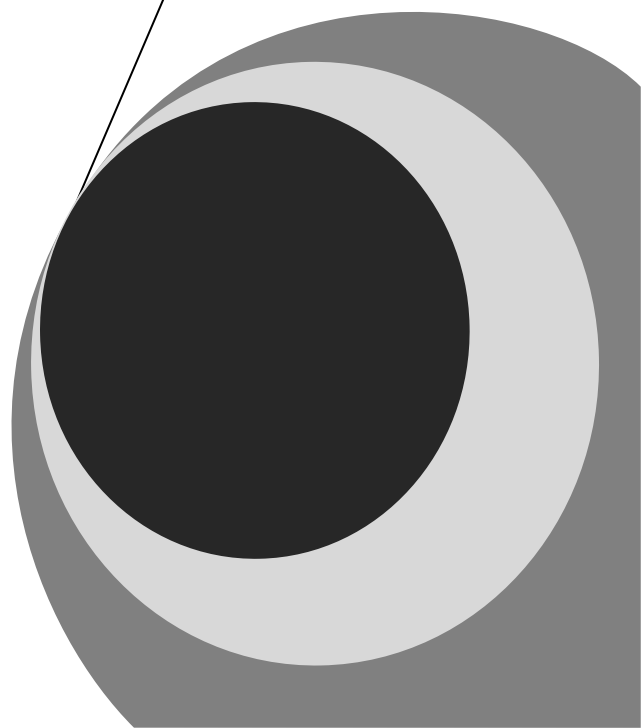
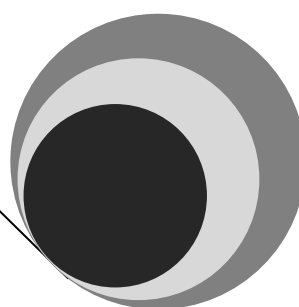
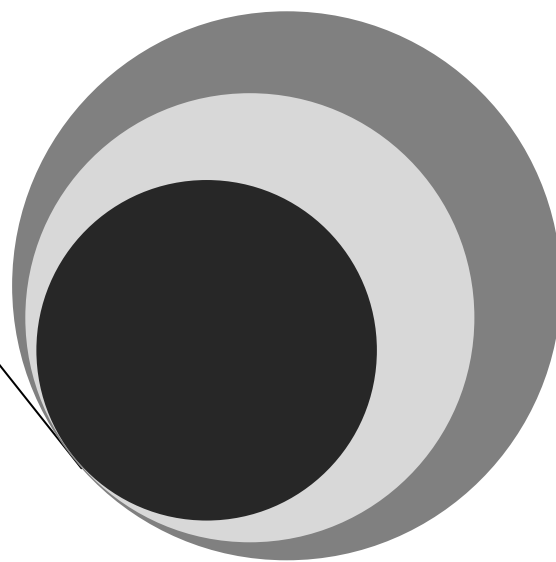
**Woody R.C., Blaw M.E.** Ophthalmoplegic migraine in infancy., *Clin. Pediatr.*, 25:82-84; 1986.

**www.ihs-headache.org.** Último acceso, abril 2012.

**Yakhnitsa V.A., Pilyavskii A.I., Limansky Y.P., Bulgakova N.V.** Modulation of the activity of midbrain central grey substance neurons by calcium channel agonists and antagonists in vitro., *Neuroscience.*, 70: 159-167; 1996.



**III. CLORHIDRATO  
DE FLUNARIZINA**





## CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA

### 1. INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de flunarizina es un fármaco con acción bloqueante de los canales de calcio, con cierta acción antagonista de los receptores de dopamina tipo 2. Por su efecto calcio antagonista ha sido utilizada con éxito en el tratamiento profiláctico de la migraña.

El clorhidrato de flunarizina corresponde al 1 [bis (4-fluoruro fenil) metil] – 4 - diclorhidrato de la piperazina (3-fenil-2-propil), con fórmula química  $C_{26}H_{26}F_2N_2 \cdot 2HCl$ .

La estructura química del clorhidrato de flunarizina se muestra en la figura 1.

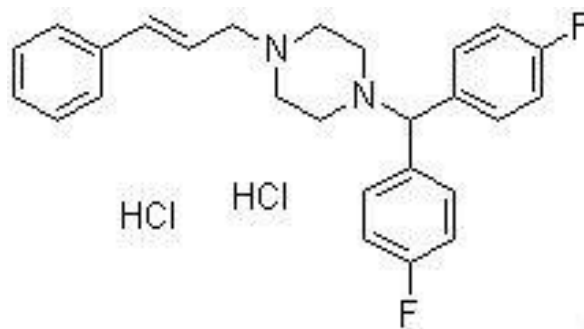


Figura 1. Estructura química del clorhidrato de flunarizina.

### 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El clorhidrato de flunarizina se presenta como un polvo blanco o casi blanco e higroscópico. Es un compuesto poco soluble en agua, bastante soluble en metanol, poco soluble en etanol de 96% y en cloruro de metileno. Para

---

mejorar sus características de solubilidad en agua se utiliza en forma de dihidrocloruro. El clorhidrato de flunarizina presenta un punto de fusión de aproximadamente 208°C.

### **3. MECANISMO DE ACCIÓN**

El clorhidrato de flunarizina es un bloqueante de los canales lentos de calcio, (canales de los tipos L, T y N) (*Akaike y col., 1989; Tytgat y col., 1988; Tygat y col., 1991*), que permite la entrada de calcio en las células mediante un mecanismo voltaje dependiente (*Kaminski Schierle y col., 1999*).

El clorhidrato de flunarizina pertenece al grupo de las difenilpiperazinas. Actúa inhibiendo preferentemente el proceso contráctil de la musculatura lisa vascular, lo que se traduce en una vasodilatación arteriolar con una reducción de la resistencia periférica (postcarga). Además tiene un cierto efecto antihistamínico con acción sobre los receptores H1. Es también un agente antiemético y antivertiginoso.

Dentro del grupo de los agentes bloqueantes de los canales de calcio, el clorhidrato de flunarizina presenta una estructura química y un perfil farmacológico similares a la cinarizina, ya que se trata de un derivado diflurado de la misma. Sin embargo, es de 2,5 a 15 veces más potente que la cinarizina (*Negrotti y Calzetti, 1997*).

### **4. ALMACENAMIENTO**

El clorhidrato de flunarizina debe almacenarse en lugar fresco y seco a temperatura inferior a 30°C, y protegida de la luz. (*www.facmed.unam.mx*).

## 5. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS

Tras su administración por vía oral, el clorhidrato de flunarizina se absorbe bien y presenta una biodisponibilidad del 85%. Se absorbe rápidamente alcanzándose el t<sub>max</sub> entre las 2 y 4 horas después de la administración (*Anderson y Vinge, 1990*).

En un estudio farmacocinético realizado en humanos, las concentraciones plasmáticas aumentaron gradualmente durante la administración crónica de 10 mg/día de clorhidrato de flunarizina, alcanzándose el estado de equilibrio dinámico después de transcurridas de 5 a 6 semanas de la administración del fármaco. Los niveles plasmáticos en estado de equilibrio dinámico oscilaron entre 39 y 115 ng/ml, lo que indica que existe una gran variabilidad interindividual en los mismos (*www.ahckids.org/flunarizine*).

El clorhidrato de flunarizina se distribuye ampliamente en tejidos, especialmente adiposo y músculo esquelético, donde puede alcanzar niveles muy superiores a los plasmáticos. Consecuencia de esta distribución es el elevado volumen aparente de distribución del compuesto, con un valor medio de 43,2 l/Kg, y que oscila entre 26,7 - 79,9 l/Kg.

En su proceso de distribución por el organismo, presenta un porcentaje de unión del 99,1%, del cual un 90% circula unida a proteínas plasmáticas, un 9% se distribuye a células sanguíneas y, solamente un 1% aproximadamente se encuentra libre en circulación. Es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el sistema nervioso central (*Leone y col., 1991*).

El clorhidrato de flunarizina se metaboliza principalmente mediante N-oxidación e hidroxilación aromática, siendo eliminado mayoritariamente en orina en forma de metabolitos. Su semivida plasmática de eliminación es de 7 a 10 días.

## 6. APLICACIONES CLÍNICAS

La flunarizina es un agente ampliamente utilizado en la profilaxis de la migraña. En general los resultados encontrados en la bibliografía describen una eficacia significativa sobre el placebo después de un período de intervención superior a 2-4 meses. (*Montastruc y Senard, 1992; Amery y col., 1985*).

Es un bloqueante de los canales de calcio que ha sido estudiado en varios ensayos clínicos, demostrado su eficacia en las siguientes patologías:

- Tratamiento profiláctico de la migraña con y sin aura, tanto en adultos, como en niños, y en aquellos que no responden a otros tratamientos. El clorhidrato de flunarizina es particularmente interesante en la disminución de la frecuencia de los ataques (*Sorensen y col., 1986*).
- Tratamiento de las convulsiones parciales, parciales complejas y generalizadas.
- Tratamiento de los ataques agudos de migraña.
- Tratamiento de la migraña hemipléjica de la infancia (*Thomas y col., 1991; Sorge y col., 1988*).
- Vértigo vestibular: tratamiento sintomático del vértigo vestibular debido a alteraciones funcionales diagnosticadas del sistema vestibular.
- Tratamientos de las úlceras y síndromes postflebítico (leve eficacia en disminución de los síntomas).

Además, también ha demostrado eficacia en el control de la presión intraocular (*Wang y Gagliuso, 2008*).

Estudios recientes, basados en la capacidad que tiene la flunarizina de bloquear receptores D2 de dopamina, han puesto de manifiesto que dicho

compuesto puede ser interesante como antipsicótico oral. En un estudio clínico realizado en 72 pacientes, la administración oral de clorhidrato de flunarizina durante 12 semanas condujo a una mejora significativa de la sintomatología. Este hecho, junto con la baja incidencia de efectos extrapiramidales ocasionados por dicho agente, convierte al compuesto en un potencial agente antipsicótico (*Bisol y col., 2008*).

Por lo que se refiere a los efectos adversos de la flunarizina son, en general, pocos frecuentes, aunque moderadamente importantes. El perfil toxicológico de este fármaco es similar al de la cinarizina. Los efectos adversos más característicos son:

- Ocasionalmente (1-9%): somnolencia y astenia generalmente transitorias, y aumento de peso.
- Raramente (<1%): alteraciones digestivas (hiperacidez gástrica, náuseas, gastralgia), insomnio, ansiedad, sequedad de boca, galactorrea, mialgias, erupciones exantemáticas; en tratamientos prolongados puede aparecer depresión y sintomatología extrapiramidal, como parkinsonismo, diskinesia, acatisia y temblor.

El tratamiento debe ser suspendido inmediatamente en el caso de que el paciente experimente algún episodio de depresión, astenia grave o algún síntoma extrapiramidal.

## **7. POSOLOGÍA**

El clorhidrato de flunarizina se administra por vía oral de acuerdo a los siguientes regímenes posológicos:

- Profilaxis de la migraña: inicialmente se establece un régimen de dosificación de 10 mg/24 h. En el caso de que exista depresión, reacciones extrapiramidales

u otras reacciones adversas, o si no se observa mejoría al cabo de 2 meses, se debe suspender el tratamiento. La dosis de mantenimiento será la dosis inicial en ciclos semanales de 5 y 2 días de descanso. El tratamiento se debe discontinuar después de 6 meses, reiniciándolo sólo en caso de recaída.

- Vértigo: 10 mg/24 h, hasta el control de síntomas. El tratamiento se debe suspender si no se observa mejoría después de 1 ó 2 meses en casos de vértigo crónico o recurrente, respectivamente.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Anderson K.E., Vinge E.**  $\beta$ -Adrenoreceptors blockers and calcium antagonists in the prophylaxis and treatment of migraine., *Drugs.*, 39: 355-373; 1990.

**Akaike N., Kostyuk P.G., Osipchuk Y.V.** Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones., *J. Physiol.*, 412: 181-195; 1989.

**Amery W.K., Caers L.I., Aerts T.J.** Flunarizine a calcium entry blocker in migraine prophylaxis., *Headache.*, 25: 249-254; 1985.

**Bisol L.W., Brunstein M.G., Ottoni G.L., Ramos F.L., Borba D.L., Daltio C.S., de Oliveira R.V., Paz G.E., de Souza S.E., Bressan R.A., Lara D.R.** Is flunarizine a long-acting oral atypical antipsychotic? A randomized clinical trial versus haloperidol for the treatment of schizophrenia., *J. Clin. Psychiatry.*, 69: 1572-1579; 2008.

**Kaminski Schierle G.S., Hansson O., Brundin P.** Flunarizine improves the survival of grafted dopaminergic neurons., *Neuroscience.*, 94: 17-20; 1999.

**Leone M., Grazi L., La Mantia L., Bussone G.** Flunarizine in migraine: a minireview., *Headache.*, 31: 388-391; 1991.

**Montastruc J.L., Senard J.M.** Medicaments anticalciques et prophylaxie de la migraine., *Path. Biol.*, 40: 381-388; 1992.

**Negrotti A., Calzetti S.** A long-term follow-up study of cinnarizine and flunarizine-induced parkinsonism., *Mov. Disord.*, 12: 107-110; 1997.

**Sorensen P.S., Hansen K., Olesen J.** A placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of flunarizine in common migraine., *Cephalalgia.*, 6: 7-14; 1986.

**Sorge F., De Simone R., Marano E., Nolano M., Orefice G., Carrieri P.**

Flunarizine in prophylaxis of childhood migraine. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study., *Cephalalgia.*, 8: 1-6; 1988.

**Thomas M., Behari M., Ahuja G.K.** Flunarizine in migraine prophylaxis: an

indian trial., *Headache.*, 31: 613-615; 1991.

**Tytgat J., Pauwels P.J., Vereecke J., Carmeliet E.** Flunarizine inhibits a

high-threshold inactivating calcium channel (-N-type), in isolated hippocampal neurons., *Brain. Res.*, 549: 112-117; 1991.

**Tytgat J., Vereecke J., Carmeliet E.** Differential effects of verapamil and

flunarizine on cardiac L-type and T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Naunyn-Schmiedeberg's., Arch. Pharmac.*, 337: 690-692; 1988.

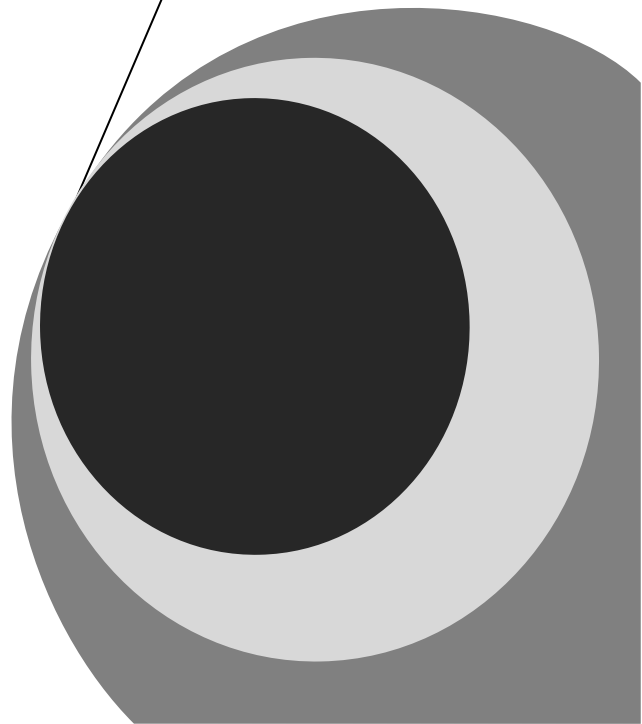
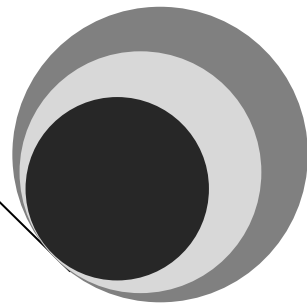
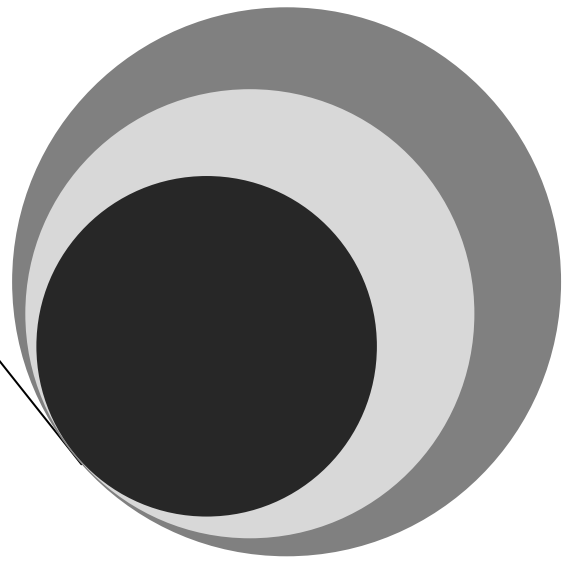
**Wang R.F., Gagliuso D.J., Podos S.M.** Effect of flunarizine, a calcium

channel blocker, on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in monkeys., *J. Glaucoma.*, 17: 73-78; 2008.

**[www.facmed.unam.mx](http://www.facmed.unam.mx)**. Último acceso octubre, 2012.

**[www.ahckids.org/flunarizine](http://www.ahckids.org/flunarizine)**. Último acceso noviembre, 2012.

## **IV. MICROENCAPSULACIÓN**





# MICROENCAPSULACIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación de fármacos es un proceso de recubrimiento de sustancias sólidas o líquidas, bajo la forma de partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Estos sistemas microparticulados presentan como característica común su tamaño de partícula, el cual está comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ , aunque algunos autores han fijado los límites entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ . La encapsulación o atrapamiento de fármacos en partículas de tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  da lugar a las denominadas nanoesferas, nanopartículas, o nanocápsulas (*García-Encina y col., 1993*).

Las micropartículas según su morfología y estructura interna reciben la denominación de microcápsulas o microesferas. Las microcápsulas están formadas por una cubierta externa que rodea al núcleo líquido o sólido, mientras que las microesferas presentan una estructura matricial polimérica en la que se aloja la sustancia activa en forma de dispersión molecular o suspensión (*Maulding, 1987; Tice y col., 1989*).

Las micropartículas habitualmente se administran bajo la forma de suspensiones, cápsulas o comprimidos; y se pueden administrar por vía oral, intramuscular, subcutánea, pulmonar, ocular, etc. (*Barratt, 2000; Kang y col., 2009; Martínez-Sancho y col., 2003*).

Mediante la microencapsulación es posible:

- Estabilizar moléculas inestables, tales como las vitaminas.
- Transformar principios activos líquidos en formas sólidas fácilmente manipulables.

- Incluir principios activos incompatibles en la misma forma farmacéutica.
- Reducir el efecto directo irritante causado por algunos principios activos en la mucosa gástrica.
- Enmascarar características organolépticas desagradables de los fármacos.
- Modular la liberación del principio activo en el tiempo. De esta manera se consigue modificar la pauta posológica, lo que mejora el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes.
- Dirigir el fármaco a las células o tejido diana de modo selectivo, evitando así los efectos secundarios derivados de una distribución inespecífica.
- Mejorar la penetración intracelular permite aumentar la eficacia de tratamientos, que mediante formas convencionales no alcanzan concentraciones adecuadas a este nivel (*Allémann y col., 1993*).
- Aumentar la inmunogenicidad de antígenos encapsulados (*Couvreur y Puisieux, 1993*).

## **2. POLÍMEROS**

Las micropartículas para su elaboración requieren polímeros biocompatibles y si se administran por vía parenteral, además, deben ser biodegradables. Biocompatible implica que el material es fisiológicamente tolerado por el organismo, sin causar una respuesta local o sistémica adversa después de su administración (*Li y col., 2008*). Biodegradable significa que los componentes son transformados en componentes no tóxicos que pueden ser metabolizados y/o excretados.

Los materiales utilizados en la preparación de las micropartículas se clasifican en naturales, semisintéticos y sintéticos.

---

Entre los naturales y semisintéticos se encuentran los polisacáridos, tales como son los derivados de la celulosa, ácido hialurónico, condriotín sulfato, quitosano, dextrano, goma arábica, así como los polipéptidos como gelatina, albumina y colágeno (*Chitambara-Thanoo y col., 1992; Dilova y Shishova, 1993; Deshpande y Shirolkar, 1998*).

Los polímeros de síntesis pueden ser clasificados en no biodegradables y biodegradables. Dentro de los polímeros sintéticos no biodegradables se encuentran el alcohol polivinílico, poli(acrilamida), ácido poli(acrílico), siliconas, entre otros.

Dentro de los polímeros biodegradables más empleados en la preparación de microesferas, se encuentran materiales sintéticos como polialquilcianoacrilatos, poliésteres (copolímeros del ácido láctico y glicólico, poli E-caprolactona), los derivados de macromoléculas naturales de tipo proteico (gelatina, albumina y colágeno), y los polisacáridos (ácidos hialurónico, ácido algínico y quitosano).

Los poliésteres alifáticos están formados por una sucesión de unidades monoméricas de ácido láctico (PLA), unidades monoméricas de ácido glicólico (PGA) o bien dímeros láctico-co-glicólico (PLGA) (*Menei y col., 2005*). El PLGA es ampliamente utilizado en la encapsulación de fármacos por vía parenteral (*Puebla y col., 2005; Fernández-Carballido y col., 2008; Naha y col., 2009; Han y col., 2010; Wang y col., 2011; Formiga y col., 2010; Barcia y col., 2011; Fernandez y col., 2011; Fernandez y col., 2012*) debido a su gran versatilidad, velocidad de degradación controlable, disponibilidad comercial, así como estar aprobado por la FDA para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos, como la fabricación de suturas biodegradables (*Jain, 2000; Thomas y col., 2004*). El copolímero láctico-glicólico se hidroliza en ácidos láctico y glicólico, metabolitos biocompatibles y carentes de toxicidad (*Menei y col., 1993; Sansdrap y Moës, 1997*). En función de sus características físico-químicas, tales como masa molecular, estereoquímica y relación láctico-

---

glicólico principalmente, se puede controlar el tiempo y la velocidad de degradación del PLGA.

### 3. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN

Durante las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas para la formación de micropartículas. Su fabricación ha evolucionado principalmente en tres aspectos:

- Búsqueda de componentes menos tóxicos.
- Simplificación del proceso para fabricación a nivel industrial.
- Optimización de las técnicas en cuanto a rendimiento y eficacia de encapsulación.

La selección del método de microencapsulación depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y del polímero, de las características finales de las micropartículas a preparar (granulometría, estructura interna, concentración del principio activo, perfil de liberación, humectabilidad, etc.) y de la vía de administración.

Los procedimientos de fabricación de micropartículas se pueden clasificar en tres grupos: químicos, mecánicos y físico-químicos. Dentro de los procesos químicos se encontraría la técnica de policondensación interfacial (*Makino y col., 1985*). Entre los métodos mecánicos destacan las técnicas siguientes: atomización (*Silva-Junior y col., 2009*), atomización-congelación (*Yin y Yates, 2009*), y la suspensión en el aire o recubrimiento en lecho fluido (*Schwenderm y col., 1998*). Finalmente, entre los métodos físico-químicos se encuentran la técnica de coacervación (*Villamizar y Martínez, 2008, Nack, 1970, Madani y Chaumeil, 2008*) y la extracción-evaporación del solvente (*Aberturas y col,*

2002, Martínez-Sancho y col, 2003, Gupte y Ciftci, 2004, Sehra y Dhake, 2005, Fernández-Carballido y col., 2008, Montejo y col, 2010).

Los métodos de preparación más utilizados son el de evaporación-extracción del disolvente y el de recubrimiento en lecho fluido.

### **3.1. Extracción-evaporación del disolvente.**

Este método se basa en el procedimiento patentado por Vanderhoff y colaboradores (*Vanderhoff y col., 1979*), y es el método más utilizado en la obtención de micropartículas a partir de poliésteres. En él están incluidos todos los métodos en los que tiene lugar un proceso de eliminación del solvente, en que se encuentra disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de éste. En todos los casos se requiere la formación de una emulsión, que dependerá de las características del principio activo y del polímero (*Fong, 1988, Whateley, 1993; Wu, 1995*).

Básicamente, las etapas del proceso son las siguientes:

1. Disolución o dispersión del fármaco en una solución del polímero formador de la micropartícula.
2. Emulsificación de la mezcla en una fase inmiscible que constituirá a su vez, la fase continua de la emulsión. La emulsificación tiene lugar mediante agitación por cizalladura para reducir el tamaño de las gotículas de la emulsión (directamente relacionada con el tamaño final de las micropartículas).
3. Formación de las micropartículas sólidas tras la evaporación del disolvente volátil del polímero; proceso que puede realizarse a temperatura ambiente o con aplicación de calor, a presión atmosférica o

en condiciones de vacío, así como a distintos tipos e intensidades de agitación.

4. Conseguida la formación de las microesferas y, por consiguiente, la encapsulación del principio activo, se produce el aislamiento por filtración o por centrifugación y lavado de las mismas. Por último, las microesferas se someten a un proceso de secado (*Görner y col., 1999*).

La técnica convencional de extracción-evaporación del disolvente se refiere a la obtención de micropartículas a partir de una emulsión O/A, si bien otras variantes aluden a emulsiones A/O, O/O y A/O/A, entre otras (*Freitas y col., 2005; Li y col., 2008; Yang y col., 2009*).

Mediante las diferentes variantes del método de extracción-evaporación del disolvente se puede conseguir la encapsulación de una amplia gama de fármacos. Así, la emulsión O/A suele emplearse para la encapsulación de principios activos hidrófobos (*Pisan y col., 2006*), la emulsión O/O para la encapsulación de principios activos solubles en agua (*Sánchez y col., 1995; Jeong y col., 2009; André-Abrant y Taverdt, 2001*) y finalmente, el método de doble emulsión (A/O/A), para encapsular principio activos muy lipofílicos o solubles en disolventes polares (*Hasan y col., 2007*).

La mayoría de disolventes empleados en la técnica de extracción-evaporación del solvente son organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, facilidad de emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. Sin embargo, las desventajas que presentan estos disolventes son su toxicidad (clase 2 en las guías ICH para disolvente residuales) (*ICH, 1996*), y los problemas ecológicos que derivan de su eliminación (*Jalil y Nixon, 1990; Thies y Bissery, 1984*).

Los agentes emulsificantes proporcionan una lámina fina protectora alrededor de las gotículas de aceite, polímero y principio activo, y de esta forma se disminuye la coalescencia. Los emulsificantes más empleados en el proceso

de evaporación//extracción del solvente son los coloides poliméricos hidrofílicos y los surfactantes aniónicos o no iónicos, entre los que se encuentran: el alcohol polivinílico (*Beck y col., 1979; Hermann y Bodmeier, 1993*), la polivinilpirrolidona, los alginatos (*Arshady, 1990*), la gelatina, (*Wakiyama y col., 1982*), la metilcelulosa (*Spenlehauer y col., 1986*), la hidroxialquilcelulosa, el polisorbato (*Bodmeier y McGinity, 1987*), el span y la lecitina (*Bodmeier y col., 1987*), etc.

La concentración requerida y la efectividad de cada emulsificante es diferente, y el mejor emulsificante para una aplicación en particular es determinado experimentalmente.

Las propiedades físico-químicas, las propiedades estructurales y la concentración del emulsificante influyen en las características de las microesferas (*Spenlehauer y col., 1986; Juliane y col., 1992*). De manera que, para un emulsificante dado, en general a mayor concentración se obtienen microesferas más pequeñas. Sin embargo, han aparecido concentraciones limitantes, por encima de las cuales el emulsificante no aumenta su efecto. Esto se debe probablemente a que se haya alcanzado la concentración óptima de empaquetamiento de la emulsión.

Entre los factores que pueden modificar las características de las microesferas obtenidas por la técnica de extracción-evaporación del solvente se encuentran:

- Características del disolvente orgánico.
- Naturaleza y cantidad del agente tensioactivo.
- Naturaleza y solubilidad del principio activo.
- Temperatura de evaporación del disolvente.
- Relación de volumen de las fases orgánica y acuosa.

- Relación principio activo y polímero.
- Tipo y velocidad de agitación.

### **3.2. Recubrimiento en lecho fluido**

Es un método de microencapsulación en el que las partículas de la sustancia que se desean recubrir se mantienen en suspensión gracias a la circulación de una corriente de aire en sentido ascendente, mientras una solución del material de cubierta se atomiza sobre las partículas, lo que da lugar a estructuras tipo reservorio. El principio de recubrimiento de todos los sistemas de lecho fluido es el mismo, de modo que estos sistemas difieren en la colocación del atomizador de la solución de recubrimiento (superior, inferior o lateral), tipo de atomizador, trayectoria de flujo de las partículas, etc.

Este sistema permite el recubrimiento de cualquier tipo de compuesto sin que exista ninguna restricción en cuanto a las propiedades físico-químicas del mismo, y presenta gran versatilidad en lo que se refiere al tipo de materiales de recubrimiento utilizables, pudiendo emplearse polímeros hidrofílicos, hidrofóbicos y grasas.

La limitación más importante del recubrimiento en lecho fluido se refiere a la irregularidad de las partículas recubiertas en lo relativo a formas y a tamaños. Además, en general, si se quiere asegurar el recubrimiento de todas las partículas, se han de realizar varios ciclos de recubrimiento, lo que implica el consumo de una cantidad importante de material de recubrimiento (*Vila Jato, 1997*).

**BIBLIOGRAFÍA**

**Aberturas M.R., Molpeceres J., Guzman M., Garcia F.** Development of a new cyclosporine formulation based on poly(caprolactone) microspheres., *J. Microencapsul.*, 19: 61-72; 2002.

**Allémann E., Gurny R., Doelker E.** Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting., *J. Pharm. Biopharm.*, 39: 173-191; 1993.

**André-Abrant A., Taverdet J.** Microencapsulation par évaporation de solvant. *Eur. Polym.*, 37: 955-967; 2001.

**Arshady R.** Biodegradable microcapsular drug delivery systems: Manufacturing methodology, release control and targeting prospect. *J. Bioact. Compatible Polym.*, 5: 315-334; 1990.

**Barcia E., Salama A., Fernández-Carballido A., Negro S.** Protective effects of clioquinol on human neuronal-like cells: a new formulation of clioquinol-loaded PLGA microspheres for Alzheimer's disease., *J. Drug.Target.*, 19: 637-646; 2011.

**Barrat G.** Therapeutic applications of colloidal drug carriers., *Pharm. Sci. Tech. Today.*, 3: 163-171; 2000.

**Beck L., Cowsar D., Lewis D., Cosgrove R.** A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone., *Fertil. Steril.*, 31: 545-551; 1979.

**Bodmeier R., McGinity JW.** Poly (lactid acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by solvent evaporation technique. II. Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres., *J. Microencapsul.*, 4: 289-297; 1987.

**Chitambara-Thanoo B., Sunny M.C., Jayakrishnan A.** Cross-linked chitosan microspheres: Preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals., *J. Pharm. Pharmacol.*, 44: 283-286; 1992.

**Couvreur P., Puisieux F.** Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 10: 141-162; 1993.

**Deshpande S.G., Shirolkar S.** Sustained release ophthalmic formulations of pilocarpine., *J. Pharm. Pharmacol.*, 41: 197-200; 1998.

**Dilova V., Shishova V.** Albumin microspheres as a drug delivery system for dexamethasone: pharmaceutical and pharmacokinetic aspects., *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 987-989; 1993.

**Fernández-Carballido A., Pastoriza P., Barcia E., Montejo C., Negro S.** PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: characterization and cell viability studies., *Int. J. Pharm.*, 352: 50-57; 2008.

**Fernández M., Negro S., Slowing K., Fernández-Carballido A., Barcia E.** An effective novel delivery strategy of rasagiline for Parkinson's disease., *Int. J. Pharm.*, 419: 271-280; 2011.

**Fernández M., Barcia E., Fernández-Carballido A., Garcia L., Slowing K., Negro S.** Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease., *Int. J. Pharm.*, 438: 266-278; 2012.

**Fong J.W.** Microencapsulation by solvent evaporation and organic phase separation processes. En: Hsieh D, ed. *Controlled Release Systems: Fabrication Technology.*, CRC Press. Boca Raton., 1: 81-108; 1988.

**Formiga F.R., Pelacho B., Garbayo E., Abizanda G., Gavira J.J., Simón-Yarza T., Mazo M., Tamayo E., Jauquicoa C., Ortíz-de-Solorzano C.,**

**Prósper F., Blanco-Prieto M.J.** Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model., *J. Control. Release.*, 147: 30-37; 2010.

**Freitas S., Merkle H.P., Gander B.** Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of art of microsphere preparation process technology., *J. Control. Release.*, 102: 313-332; 2005.

**García-Encina G., Seijo B., Vila-Jato J.L., Torres D.** Microcápsulas en Tecnología Farmacéutica., *Ind. Farm.*, 3: 33-42; 1993.

**Görner T., Gref R., Michenot D., Sommer F., Tran M.N., Dellacheire E.** Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix., *J. Control. Release.*, 57: 259-258; 1999.

**Gupte A., Cifci K.** Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel+ 5-FU microspheres., *Int. J. Pharm.*, 276: 93-106; 2004.

**Han B., Wang H.T., Liu H.Y., Hong H., Lu W., Shang Z.H.** Preparation of pinyangmycin PLGA microspheres and related in vitro/in vivo studies., *Int. J. Pharm.*, 398:130-136; 2010.

**Hasan A.S., Socha M., Lamprecht A., El Ghazouani F., Sapin A., Hoffman M., Maincent P., Ubrich N.** Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release., *Int. J. Pharm.*, 344: 53-61; 2007.

**Hermann J., Bodmeier R.** Peptide-containing biodegradable microspheres prepared by modified solvent evaporation methods., *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 20: 258-259; 1993.

**ICH** guidelines for residual solvents., pp 67377-67388; 1996.

**Jain R.A.** The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glicolide) (PLGA) devices., *Biomaterials.*, 21: 2475-2490; 2000.

**Jalil R., Nixon J.R.** Microencapsulation using poly (L-lactic acid). IV. Release properties of microcapsule containing phenobarbitone., *J. Microencapsul.*, 7: 53-56; 1990.

**Jeong Y.I., Na H.S., Nah J.W., Lee H.C.** Preparation of ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres and its antibacterial activity., *J. Pharm. Sci.*, 98: 3659-3665; 2009.

**Juliane M.C., Alonso M.J., Gómez Amoz J.L., Benoit J.P.** Preparation of poly (DL-lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: Application of experimental designs., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 18:1063-1077; 1992.

**Kang M.L., Cho C.S., Yoo H.S.** Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines., *Biotechnol. Adv.*, 27: 857-865; 2009.

**Li M., Rouaud O., Poncelet D.** Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches., *Int. J. Pharm.*, 363: 26-39; 2008.

**Madani F., Chaumeil J.C.** Coating of indomethacin-loaded embolic microspheres for a successful embolization therapy., *J. Microencapsul.*, 25: 121-133, 2008.

**Makino K., Arakawa M., Kondo T.** Preparation and in vitro degradation properties of poly (lactide) microspheres., *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 1195-1201; 1985.

**Martínez-Sancho C., Herrero-Vanrell R., Negro S.** Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives., *J. Microencapsul.*, 6: 799-810; 2003.

**Maulding H.V.** Prolonged delivery of peptides by microcapsules., *J. Control. Release.*, 6: 167-176; 1987.

**Menei P., Daniel V., Montero-Menei C., Brouillard M., Populard-Barthelaix A., Benoit J.P.** Biodegradation and brain tissue reaction to poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres., *Biomaterials.*, 14: 470-478; 1993.

**Menei P., Montero-Menei C., Venier M.C., Benoit J.P.** Drug delivery into the brain using poly(lactide-co-glycolide) microspheres., *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, 2: 363-376; 2005.

**Montejo C., Barcia E., Negro S., Fernández-Carballido A.** Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: development of a new controlled release system., *Int. J. Pharm.*, 387: 223-229; 2010.

**Nack H.** Microencapsulation technique. Application and problems., *J. Soc. Cosmetic Chemist.*, 21: 85-98; 1970.

**Naha P.C., Kanchan V., Panda A.K.** Evaluation of parenteral depot insulin formulation using PLGA and PLA microspheres., *J. Biomater. Appl.*, 24: 309-325; 2009.

**Pisan E., Tsapis N., Paris J., Nicolas V., Cattel L., Fatal E.** Polymeric Nano/microencapsulates of lipid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization., *Langmuir.*, 22: 4397-4402; 2006.

**Puebla P., Pastoriza P., Barcia E., Fernández-Carballido A.** PEG-derivative effectively modifies the characteristics of indomethacin-PLGA microspheres destined to intra-articular administration., *J. Microencapsul.*, 22: 793-808; 2005.

**Sánchez B.A., Tobio B.M., Alonso M.J.** Los copolímeros del ácido láctico y glicólico. Características y aplicaciones en la liberación de macromoléculas., *Ind. Farm.*, 1: 69-76; 1995.

**Sansdrap P., Moës A.J.** In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres., *J. Control. Release.*, 43: 47-58; 1997.

**Schwendeman S.P., Tobio M., Joworowicz M., Alonso M.J., Langer R.** New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. *J. Microencapsul.*, 15: 229-318; 1998.

**Sehra S., Dhake A.S.** Formulation and evaluation of sustained release microspheres of poly-lactide-co-glycolide containing tamoxifen citrate., *J. Microencapsul.*, 22: 521-528; 2005.

**Silva-Junior A.A., Matos J.R., Formariz T.P., Rossanezi G., Sacarpa M.V., Tabosa do Egito E.S., Gomes de Oliveira A.** Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone., *Int. J. Pharm.*, 368: 45-55, 2009.

**Spenlehauer G., Benoit J.P., Veillard M.** Formation and characterization of poly (DL-lactide) microspheres for chemoembolization., *J. Pharm. Sci.*, 75: 750-755; 1986.

**Thies C., Bissery C.** Biodegradable microspheres for parenteral administration. En: Lim, F., ed. *Biomedical Applications of Microencapsulation.*, CRC Press, Boca Raton; 1984.

**Tice T.R., Mason D.W., Gilley R.M.** Clinical use and future of parenteral microsphere delivery system. En: Prescott, L.F. y Nimmo, W.S. eds. *Novel Drug Delivery and its Therapeutic Application.* Wiley, Chichester, 1989.

**Thomas C.B., Bur K.J.L.** Tissue engineering systems. In: *Absorbable and Biodegradable Polymers* (eds WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press, Boca Raton; 2004.

**Vanderhoff J.W., El-Aasser M.S., Ugelstad J.** Polymer Emulsification Process, U.S. Patent 4,177,177, December 4; 1979.

**Vila Jato J.L.** Tecnología Farmaceutica. Vol II: Formas Farmacéuticas. Síntesis, Madrid; 1997.

**Villamizar L.F., Martínez F.** Determinación de las condiciones de microencapsulación de un bacuvirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100. *Vital.*, 15: 123-131; 2008.

**Wakiyama N., Juni K. Nakano M.** Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine., *Chem. Pharm. Bull.*, 30: 3719-3727; 1982.

**Wang F., Ni B., Zhu Z., Liu F., Zhu Y.Z., Liu J.** Intra-discal vancomycin-loaded PLGA microsphere injection for MRSA discitis: an experimental study., *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 131: 111-119; 2011.

**Whateley T.L.** Biodegradable microspheres for controlled delivery, En: Whaterley TL, ed. *Encapsulation and Controlled Release*, Harwood Acad. Publ. U.K., 57; 1993.

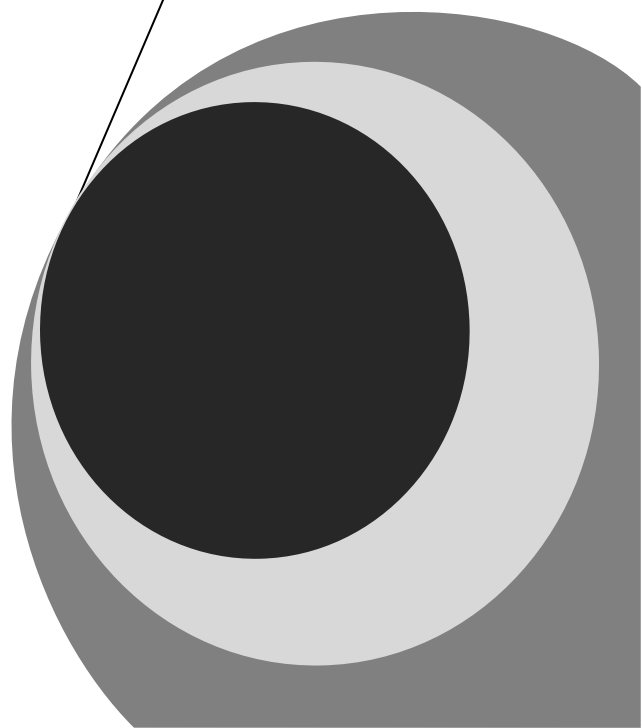
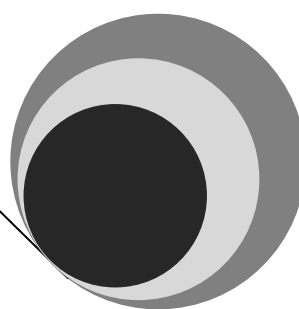
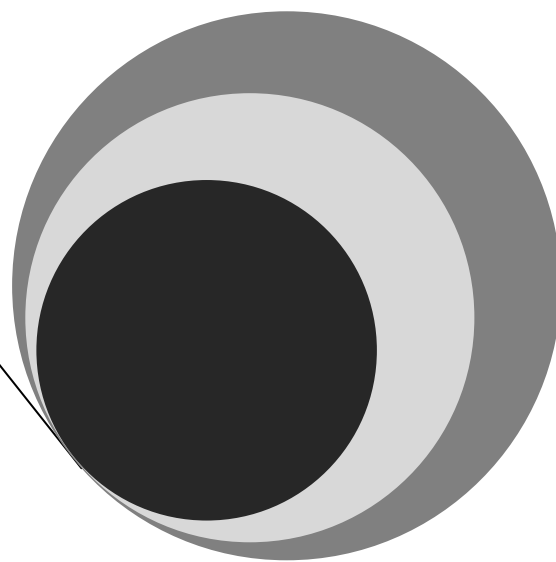
**Wu X.S.** Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. En: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER, eds. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Marcel Dekker: New York., 1151-1160; 1995.

**Yang H.J., Park I.S., Na,K.** Biocompatible microspheres based on acetylated polysaccharide prepared from water-in oil-in water ( $W_1/O/W_2$ ) double-emulsion method for delivery of type II diabetic drug (exenatide). *Colloid Surf. A Physicochem., Eng. Asp.*, 340: 115-120; 2009.

**Yin W., Yates M.Z.** Encapsulation and sustained release from biodegradable microcapsules made by emulsification drying and spray/freeze drying., *J. Colloid Interface Sci.*, 336: 155-161; 2009.



**V. MATERIALES  
Y MÉTODOS**





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. APARATOS

- ✓ Agitador en serie: Ika- WERK. Janke & Kinkel.
- ✓ Balanza de precisión: Mettler AT 200.
- ✓ Baño de agitación: Clifton (NE 5-28D).
- ✓ Baño de ultrasonidos: Elma. Modelo transsonic 460.
- ✓ Centrífuga: Hucoa-Erlöss. Selecta.
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta resolución Marca Waters equipado con: Bomba de distribución Waters modelo 510, inyector automático Waters modelo 717, detector UV-Visible de longitud de onda variable Waters modelo 490 E y un procesador de datos Windows XP.
- ✓ Difractómetro de Rayos X Philips X Pert MPD.
- ✓ Difractómetro de Rayos Láser, Microtrac 35000 Particle Size Analyser (Microtrac, USA).
- ✓ Espectrofotómetro: Beckman DU-7.
- ✓ Estufa: Memmert, Universal.
- ✓ Liofilizador: Flexi-dry, M.P FTS Systems.
- ✓ Microscopio electrónico: JSM 6400 Scanning microscope.
- ✓ Microscopio óptico: Olympus CH40.
- ✓ pH metro: CRISON GLP 22.
- ✓ Polytrón: RECO. Kinematica GMBH PT 3000.

- ✓ Ultrasonidos: Heat System XI.

## 2. REACTIVOS

- ✓ Acido clorhídrico 30%, para análisis. Pancreac.
- ✓ Acido poli-(láctico-co-glicólico) (Resomer® RG 502). Sigma – Aldrich.
- ✓ Acido poli-(láctico-co-glicólico) (Resomer® RG 502H). Sigma – Aldrich.
- ✓ Alcohol polivinílico PM= 72000 Da. Merck.
- ✓ Clorhidrato de flunarizina Sigma - Aldrich Química.
- ✓ Diclorometano estabilizado con  $\approx$  20 ppm of amilano (UV-IR, HPLC, GPC). Pancreac.
- ✓ Etanol absoluto (HPLC). Pancreac.
- ✓ Fosfato disódico dodecahidratado. Merck.
- ✓ Fosfato potásico. Pancreac.
- ✓ Lauril sulfato sódico. Pancreac.
- ✓ Metanol (UV-IR-HPLC-HPLC isocrático). Pancreac.
- ✓ Trietilamina para análisis. Pancreac.

### 3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA

Para la determinación analítica del clorhidrato de flunarizina se han puesto a punto y validado dos técnicas de cuantificación:

- Espectrofotometría de primera derivada.
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

#### 3.1. Espectrofotometría de primera derivada

De acuerdo con las Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea, "La validación es la obtención de pruebas con arreglo a las Normas de Correcta Fabricación de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, actividad o sistema, produce el resultado previsto" (*Normas de Correcta Fabricación, medicamentos de uso humano y veterinario. 2002*).

Se ha elegido el método de espectrofotometría derivativa aplicando la técnica de la primera derivada, a una longitud de onda de 268 nm, para la cuantificación del clorhidrato de flunarizina, en el cálculo del rendimiento de encapsulación del principio activo en las microesferas (esterilizadas y no esterilizadas), en la cuantificación del clorhidrato de flunarizina en los estudios de estabilidad, así como en los estudios de cesión del clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas.

Para todas las soluciones se obtuvo la primera derivada del espectro en un rango de 200 – 400 nm, leídos frente al solvente, y los datos espectrales fueron procesados por el software del espectrofotómetro.

La validación del método analítico se ha desarrollado de acuerdo con los criterios de linealidad, exactitud, precisión, robustez y especificidad (*Busaranon y col., 2006; Caporal-Gautier y col. 1992a; 1992b; ICH, 1996*).

Para evaluar la linealidad y exactitud del método empleado se han preparado diferentes muestras en metanol o tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico (LSS) al 1%. Las concentraciones de clorhidrato de flunarizina preparadas fueron de: 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 y 45  $\mu\text{g/ml}$ .

El estudio de precisión de la técnica analítica se ha realizado analizando concentraciones repetidas de clorhidrato de flunarizina en tres días consecutivos. Concretamente se han analizado seis series de concentraciones teóricas de 2,5; 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , en ambos medios de disolución: metanol o tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1%.

Todas las soluciones anteriormente indicadas se prepararon a partir de pesadas iniciales de 20 mg de clorhidrato de flunarizina.

La sensibilidad del método se determinó mediante el cálculo del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). Los LD y LC se han determinado a partir de la desviación estándar de la respuesta (DE) y de la pendiente, a partir de la recta de calibrado.

Límite de detección (LD) =  $3,3 \cdot \text{DE/pendiente}$

Límite de cuantificación (LC) =  $10 \cdot \text{DE/pendiente}$

Para determinar la selectividad respecto a los excipientes se ha valorado una solución de PLGA, preparada por triplicado, en concentración superior a la que se encontraría en los ensayos realizados. Asimismo, se ha realizado este ensayo con microesferas blanco.

Para la determinación de la robustez del método se prepararon tres soluciones de clorhidrato de flunarizina a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Estas muestras fueron analizadas recién preparadas (0 horas), y a las 8 y 24 horas después de la preparación.

### 3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

A partir del método descrito por Wahbi y colaboradores (*Wahbi y col., 1995*), hemos realizado una optimización y validación del mismo para la detección y cuantificación de clorhidrato de flunarizina, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Para la optimización de la técnica de cromatografía se han considerado: los tiempos de retención ( $t_r$ ), el factor de asimetría (T), y el número de platos teóricos (N).

Los tiempos de retención ( $t_r$ ) son características de cada compuesto, para unas condiciones de análisis determinadas. En la puesta a punto de un método de cuantificación por HPLC, como es el caso se desea que el tiempo de retención sea suficientemente corto para analizar un número elevado de muestras al día, pero al mismo tiempo que tenga buena resolución.

El factor de asimetría (T) es una medida de la simetría del pico. Se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$T = (W_{0,05}/2f)$$

donde:

f es la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico.

$W_{0,05}$  es la anchura de pico al 5% de la altura del pico.

Un valor de asimetría igual a 1 indica que el pico es perfectamente simétrico, y a medida que la asimetría se va pronunciando, el valor de T va en aumento. La asimetría de un pico está relacionada con la precisión del método para poder integrar las áreas, de modo que con la optimización se busca

mejorar la simetría de los picos, tratando de conseguir un valor lo más próximo a 1.

Finalmente, el número de platos teóricos (N) es una medida de la eficacia de la columna. Para picos Gaussianos se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$N = 16 [t_r/w]^2$$

donde:

$t_r$  es el tiempo de retención de la sustancia a estudiar.

$W$  es la anchura de pico en su base.

Una columna con un alto número de platos teóricos presentará un pico más estrecho a un determinado tiempo de retención que una columna con un menor valor de (N). Así, cuanto mayor sea el valor de (N), mayor será la eficiencia de la columna.

Para realizar estos estudios se empleó una solución de flunarizina (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Las variables estudiadas para optimizar el método fueron las siguientes:

- Composición de la fase móvil en función de la relación (% v/v) de metanol/agua. Los porcentajes variaron desde 90%/10% hasta 75%/25%.
- Velocidad del flujo: desde 1 ml/min hasta 1,5 ml/min.

Para evaluar la linealidad y exactitud del método se han preparado tres series de muestras, con las siguientes concentraciones de clorhidrato de flunarizina en fase móvil: 0,25; 0,5; 1; 3; 5; 10; 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

El estudio de precisión de la técnica analítica se ha llevado a cabo evaluando concentraciones repetidas de clorhidrato de flunarizina en días consecutivos. Concretamente, se han analizado seis series de concentraciones teóricas de 1; 10 y 20 µg/ml.

Para la determinación de la robustez del método se prepararon tres soluciones de clorhidrato de flunarizina a una concentración de 20 µg/ml. Estas muestras fueron analizadas recién preparadas (0 horas), y a las 8 y 24 horas después de la preparación.

Para determinar la selectividad respecto a los excipientes se han valorado soluciones de PLGA (Resomer® 502 y Resomer® 502H), preparadas por triplicado, en concentración superior a la que se encontraría en los ensayos de cuantificación del clorhidrato de flunarizina. Asimismo, se ha realizado este ensayo con microesferas blanco.

A fin de detectar productos de degradación, se han preparado muestras de clorhidrato de flunarizina que fueron sometidas a una temperatura de 30°C durante 24 horas.

Esta técnica de HPLC se ha utilizado para la cuantificación del principio activo en las muestras obtenidas en los estudios de estabilidad, para el establecimiento de la aparición de posibles productos de degradación debido a la irradiación de las microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina, y para la comprobación de la no interferencia de los componentes de la formulación en la cuantificación, cuando éstas se analizan por espectrofotometría de primera derivada.

### 3.3. Resultados obtenidos en la validación de la técnica espectrofotométrica de primera derivada

En las tablas 1 y 2 se recogen los resultados del estudio de linealidad obtenidos para los distintos medios ensayados.

<b>ANÁLISIS DE REGRESIÓN</b>					
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Estadístico T</b>	<b>P-valor</b>	
<b>Ordenada</b>	8,93E-04	3,76E-04	-2,37	0,00245	
<b>Pendiente</b>	2,30E-03	1,41E-05	163,67	0,0000	
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Coficiente-F</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Modelo</b>	3,11E-02	1	3,11E-02	26789,13	0,0000
<b>residuo</b>	3,25E-05	28	1,16E-06		
<b>Falta de ajuste</b>	1,23E-05	8	1,54E-06	1,52	0,2135
<b>Error puro</b>	2,03E-05	20	1,01E-06		
<b>Total (Corr.)</b>	3,12E-02	29			
<b>Coficiente de correlación</b>				0,9994	
<b>R-cuadrado</b>				0,9989	
<b>R-cuadrado ajustado</b>				0,9989	
<b>Error estándar</b>				0,0011	

Tabla 1. Resultados obtenidos en el estudio de linealidad cuando se utiliza metanol como medio de disolución.

<b>ANÁLISIS DE REGRESIÓN</b>					
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Estadístico T</b>	<b>P-valor</b>	
<b>Ordenada</b>	-1,24E-03	2,75E-04	-4,52	0,0001	
<b>Pendiente</b>	2,08E-03	1,03E-05	202,46	0,0000	
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Coficiente-F</b>	<b>P-Valor</b>
<b>Modelo</b>	2,54E-02	1	2,54E-02	40989,93	0,0000
<b>Residuo</b>	1,74E-05	28	6,21E-07		
<b>Falta de ajuste</b>	7,92E-06	8	9,89E-07	2,09	0,0861
<b>Error puro</b>	9,45E-06	20	4,73E-07		
<b>Total (Corr.)</b>	2,55E-02	29			
<b>Coficiente de correlación</b>			0,9996		
<b>R-cuadrado</b>			0,9993		
<b>R-cuadrado ajustado</b>			0,9993		
<b>Error estándar</b>			0,0008		

Tabla 2. Resultados obtenidos en el estudio de linealidad cuando se utiliza tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1% como medio de disolución.

Para los dos medios empleados, el método resultó ser lineal, dentro del intervalo de concentraciones ensayadas. Además, ambos métodos fueron proporcionales, ya que en ningún caso la ordenada en el origen fue significativamente distinta de cero.

Una vez comprobada la linealidad de los métodos, se evaluó la exactitud de los mismos, mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%) de los porcentajes obtenidos.

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados del estudio de exactitud para los dos medios ensayados.

Concentración teórica (µg/ml)	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar	CV (%)
2,5	99,13	4,02	3,96
2,5	106,08		
2,5	99,13		
5	98,26	3,14	3,08
5	102,61		
5	104,35		
10	100,43	1,96	1,95
10	102,61		
10	98,69		
15	97,39	0,73	0,75
15	98,26		
15	96,81		
20	99,35	1,12	1,13
20	97,17		
20	98,69		
25	101,91	1,74	1,71
25	103,65		
25	100,17		
30	98,26	1,81	1,81
30	100,14		
30	101,88		
35	100,37	0,76	0,75
35	101,36		
35	101,86		
40	97,61	2,69	2,68
40	100,98		
40	102,93		
45	99,32	0,29	0,29
45	99,13		
45	99,71		

Tabla 3. Resultados obtenidos en el estudio de exactitud cuando se utiliza metanol como medio de disolución.

Concentración teórica (µg/ml)	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar	CV (%)
2,5	104,76	1,09	1,04
2,5	106,66		
2,5	106,66		
5	103,81	1,65	1,62
5	100,95		
5	100,95		
10	101,43	1,80	1,79
10	98,09		
10	100,95		
15	98,09	0,36	0,37
15	97,46		
15	98,09		
20	97,38	0,27	0,28
20	96,91		
20	97,38		
25	100,19	1,66	1,68
25	99,24		
25	96,95		
30	100,32	1,66	1,66
30	101,91		
30	98,57		
35	99,18	0,49	0,49
35	98,23		
35	98,50		
40	99,88	1,44	1,46
40	99,88		
40	97,38		
45	99,05	1,07	1,07
45	100,42		
45	101,16		

Tabla 4. Resultados obtenidos en el estudio de exactitud cuando se utiliza tampón fosfato PBS a PH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1% como medio de disolución.

Los resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método dan lugar a porcentajes de recuperación de clorhidrato de flunarizina que oscilan entre 96,81% y 106,09% con metanol y 96,95% y 106,66%, cuando se utiliza tampón fosfato PBS a pH 7,4 (con LSS al 1%) como medios de disolución, respectivamente. En ambos casos los coeficientes de variación resultantes fueron inferiores al 4%, lo que demuestra la exactitud de ambos métodos (tablas 3 y 4).

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados del estudio de precisión para los medios ensayados.

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración real (µg/ml)	Recuperación (%)	CV % (n=3)
2,5	2,55	102,02	0,91
2,5	2,58	103,47	
2,5	2,54	101,73	
20	20,23	101,15	0,92
20	19,86	99,31	
20	20,03	100,14	
40	40,07	100,18	0,82
40	39,42	98,57	
40	39,68	99,20	

Tabla 5. Resultados obtenidos en el estudio de precisión cuando se utiliza metanol como medio de disolución.

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración real (µg/ml)	Recuperación (%)	CV % (n=3)
2,5	2,63	105,20	1,18
2,5	2,59	103,60	
2,5	2,57	102,80	
<hr/>			
20	19,87	99,35	0,68
20	20,02	100,10	
20	20,14	100,70	
<hr/>			
40	39,51	98,78	0,67
40	39,03	97,58	
40	39,08	97,70	

Tabla 6. Resultados obtenidos en el estudio de precisión cuando se utiliza tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1% como medio de disolución.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los estudios de precisión nos muestra que existe homogeneidad de varianzas entre los distintos grupos considerados, para ambos medios de disolución. Asimismo, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron próximos al 100%: 98,57% - 103,47% para metanol y 97,58% - 105,20% para tampón fosfato PBS a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1%, con coeficientes de variación inferiores al 2% en ambos casos (tablas 5 y 6).

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas, y se expresa mediante la medida de la repetibilidad y la reproducibilidad (tablas 7 y 8).

Concentración (µg/ml)	CV intradía (%)			CV interdía (%) <sup>(b)</sup>
	Día 1 <sup>(a)</sup>	Día 2 <sup>(a)</sup>	Día 3 <sup>(a)</sup>	
2,5	3,28	3,48	3,71	3,61
20	3,36	1,53	2,27	1,13
40	3,95	0,91	2,01	2,68

<sup>(a)</sup> Analizados en el mismo día (n=3)  
<sup>(b)</sup> Analizados en tres días consecutivos ( n=9)

Tabla 7. Resultados obtenidos en el estudio de precisión cuando se utiliza metanol como medio de disolución.

Concentración (µg/ml)	CV intradía (%)			CV interdía (%) <sup>(b)</sup>
	Día 1 <sup>(a)</sup>	Día 2 <sup>(a)</sup>	Día 3 <sup>(a)</sup>	
2,5	2,19	1,92	3,51	1,84
20	2,41	3,69	2,91	0,98
40	1,05	1,39	1,47	1,46

<sup>(a)</sup> Analizados en el mismo día (n=3)  
<sup>(b)</sup> Analizados en tres días consecutivos ( n=9)

Tabla 8. Resultados obtenidos en el estudio de precisión cuando se utiliza tampón fosfato PB S a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1% como medio de disolución.

Los coeficientes de variación para la repetibilidad (intradía) obtenidos y para la reproductibilidad (interdía) fueron inferiores del 4%, para los dos medios de disolución empleados, lo que permite considerar el método analítico como preciso.

Los resultados obtenidos en los ensayos de robustez indicaron que no existen diferencias significativas en los valores obtenidos a tiempo 0 con respecto a los obtenidos después de 8 ó 24 horas, por lo que se confirma la robustez del método.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos son 0,54 µg/ml y 1,63 µg/ml, cuando los estudios se realizaron utilizando como medio para preparar las diluciones metanol, y 0,43 µg/ml y 1,31 µg/ml, respectivamente, cuando se utilizó tampón fosfato a pH 7,4 con lauril sulfato sódico al 1%.

Al evaluar los resultados de la especificidad con respecto a los excipientes, se verificó que no existe ninguna interferencia con otros componentes de la formulación. Este hecho fue comprobado posteriormente mediante HPLC.

### **3.4 Resultados obtenidos en la optimización y validación de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Para la valoración del clorhidrato de flunarizina por HPLC hemos seguido el método descrito por Wahbi y colaboradores (*Wahbi y col., 1995*). Dicho método utiliza una fase móvil compuesta por metanol: fase acuosa (75%:25%, v/v). La fase acuosa está compuesta de 0,5% de cloruro sódico y 0,2% de trietilamina, ajustada con ácido clorhídrico a pH 6,6 y se utiliza a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La optimización del método se ha realizado variando la relación metanol/fase acuosa en la fase móvil y la velocidad de flujo.

Los resultados obtenidos al estudiar las distintas variables se muestran en la tabla 9.

Velocidad de flujo (ml/min)	Fase móvil (metanol/agua) (% v/v)	Tiempo de retención (min)	Presión (psi)
1	75:25	37,13	29000
1	85:15	10,08	24000
1,3	85:15	8,68	29000
1,5	85:15	5,77	33000
1	90:10	4,39	20000
1,3	90:10	3,19	25000

Tabla 9. *Influencia de la composición de la fase móvil y el flujo en la optimización del método analítico de cuantificación de clorhidrato de flunarizina por HPLC.*

Al aumentar las proporciones de metanol en la fase móvil disminuye el tiempo de retención, pero aumenta la asimetría. Los mejores resultados se obtuvieron para la fase móvil metanol:agua (85:15, v/v), utilizando un flujo de 1,3 ml min.

A modo de resumen, se citan a continuación las características principales del método analítico finalmente utilizado para la cuantificación del clorhidrato de flunarizina por HPLC:

- Longitud de onda ( $\lambda$ ) del análisis: cuando el clorhidrato de flunarizina está completamente disuelto, su espectro presenta un máximo de absorción a 254 nm, con lo que se midió la absorbancia a esta longitud de onda.
- Fase estacionaria: se ha elegido como fase estacionaria una columna de fase reversa C18 (Kromasil 100), con partículas de relleno de 5  $\mu$ m de diámetro y dimensiones de 25 mm x 4 mm, mantenida a temperatura ambiente.
- Volumen de inyección: se ha empleado un volumen de inyección de 20  $\mu$ l.

- Fase móvil: se ha utilizado una fase móvil consistente en una mezcla de metanol:agua (85%:15%, v/v); 0,5% de cloruro sódico (p/v) y 0,2% de trietilamina (v/v), ajustando el pH a 6,6 con ácido clorhídrico al 30%. La fase móvil antes de ser empleada se hace pasar por filtros de membrana de nylon de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  y se desgasifica.
- Flujo: la fase móvil se ha impulsado con flujo constante de 1,3 ml/min.
- Sensibilidad: se ha ajustado a 0,05.

En la figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos en la cuantificación del clorhidrato de flunarizina por HPLC

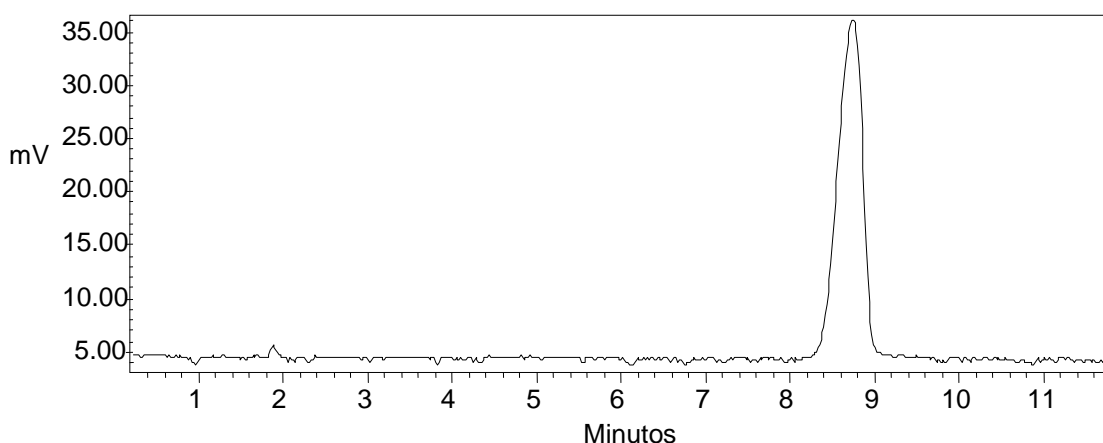


Figura 2. *Cromatograma de clorhidrato de flunarizina correspondiente a una concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$ .*

En estas condiciones se procedió a continuación a realizar la validación del método.

A partir de los datos obtenidos se han calculado los parámetros estadísticos mediante el programa informático Statgraphics plus 5,0 y, se ha ajustado la ecuación mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados.

En la tabla 10 se recogen los resultados del estudio de linealidad.

<b>ANÁLISIS DE LA REGRESIÓN SIMPLE</b>					
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>p-valor</b>	
<b>Ordenada</b>	-10106,0	3239,37	-3,12	0,0050	
<b>Pendiente</b>	69702,0	332,28	209,76	0,0000	
<b>ANOVA</b>					
<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente-F</b>	<b>p-Valor</b>
<b>modelo</b>	5,62E-12	1	5,62E-12	44001,84	0,0000
<b>Residuo</b>	2,81E-09	22	1,27E-08		
<b>Total</b>	5,62E-12	23			
<b>Coefficiente de correlación</b>			0,9996		
<b>R-cuadrado</b>			0,9995		
<b>R-cuadrado ajustado</b>			0,9994		
<b>Error estándar</b>			11301,8		

Tabla 10. Resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método de HPLC.

A continuación se evaluó la exactitud del método, comprobándose que existe homogeneidad de varianzas entre los distintos grupos, por lo que se determinan las recuperaciones medias y sus intervalos de confianza (95%) (tabla 11).

Concentración teórica ( $\mu\text{g/ml}$ )	Porcentaje recuperación (%)	CV (%)
0,25	109,08	3,48
0,25	113,07	
0,25	105,48	
0,5	107,23	2,53
0,5	104,28	
0,5	109,69	
1	95,28	1,70
1	97,81	
1	94,74	
3	96,74	0,75
3	98,21	
3	97,31	
5	98,76	0,90
5	100,47	
5	99,15	
10	98,47	1,85
10	100,87	
10	97,27	
15	101,87	1,89
15	98,49	
15	101,69	
20	99,89	1,05
20	98,63	
20	100,71	

Tabla 11. Resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método de HPLC.

Los resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método dan lugar a porcentajes de recuperación de clorhidrato de flunarizina que oscilan entre 94,74% y 113,07%, con un coeficiente de variación inferior al 3,5%, lo que demuestra la exactitud del método (tabla 11).

Los resultados de precisión se muestran en las tablas 12, 13.

<b>Concentración teórica (µg/ml)</b>	<b>Concentración real (µg/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>CV (%) (n=3)</b>
1	0,96	97,02	3,61
1	1,03	103,22	
1	0,97	97	
<hr/>			
10	10,69	106,92	2,51
10	10,73	107,3	
10	10,25	102,52	
<hr/>			
20	20,15	100,77	2,02
20	20,58	102,93	
20	19,77	98,85	

Tabla 12. *Resultados obtenidos en el estudio de precisión del método de HPLC.*

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de precisión muestra que existe homogeneidad de varianzas entre los distintos grupos considerados, con un coeficiente de variación inferior al 4%, lo que permite considerar el método analítico como preciso (tabla 12).

Concentración (µg/ml)	CV intradía (%)			CV interdía (%) <sup>(b)</sup>
	Día 1 <sup>(a)</sup>	Día 2 <sup>(a)</sup>	Día 3 <sup>(a)</sup>	
1	1,28	3,23	1,65	3,56
10	2,97	2,81	2,81	2,37
20	2,72	2,72	1,44	1,99

<sup>(a)</sup> Analizados en el mismo día (n=3).  
<sup>(b)</sup> Analizados en tres días consecutivos (n=9).

Tabla 13. Resultados obtenidos en el estudio de precisión del método de HPLC.

Al evaluar los resultados obtenidos en el análisis de la selectividad respecto a los excipientes, se comprobó que no existe ninguna señal correspondiente a los excipientes que interfiera, cuando se analizan por HPLC muestras de microesferas blanco y de PLGA (Resomer® 502 y Resomer® 502H).

La FDA (*FDA. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994*), recomienda utilizar columnas con  $N \geq 2000$  platos teóricos. En nuestras condiciones experimentales, el valor de N obtenido fué de 3350.

Los resultados obtenidos en los ensayos de robustez indican que no hay cambios marcados en los parámetros cromatográficos transcurridas 24 horas desde la preparación de las muestras, lo que demuestra la robustez del método desarrollado.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos son 0,15 µg/ml y 0,46 µg/ml, respectivamente.

Al exponer muestras preparadas con una concentración del clorhidrato de flunarizina de 15 µg/ml a temperaturas de 30°C durante 24 h, no aparecen en los cromatogramas picos correspondientes a productos de degradación.

## BIBLIOGRAFIA

### **AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios).**

Normas de correcta fabricación: Medicamentos de uso humano y medicamentos de uso veterinario., Ministerio de Sanidad y Consumo; 2002.

**Busaranon K., Suntornsuk W., Suntornsuk L.** Comparison of UV spectrophotometric method and high performance liquid chromatography for the analysis of funarizine and its application for the dissolution test., J. Pharm. Biomed. Anal., 41: 158-164; 2006.

**Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Russoto R., Guilloteau M., Histe, M., lallier M., N`Guyen-Huu. J.J.** Guide de validation analytique. Rapport d`une comisión S.F.S.T.P. I. Méthodologie., STP Pharma. Pratiques., 4: 205-226; 1992a.

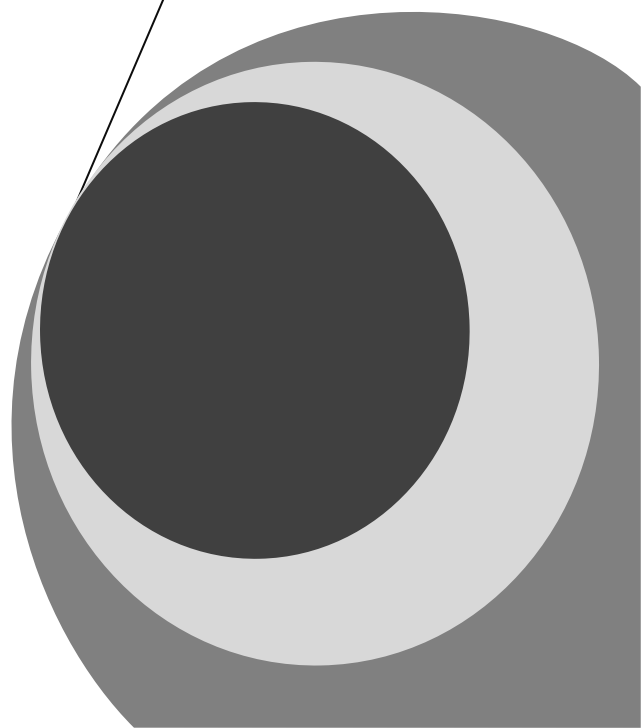
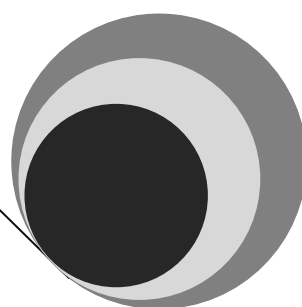
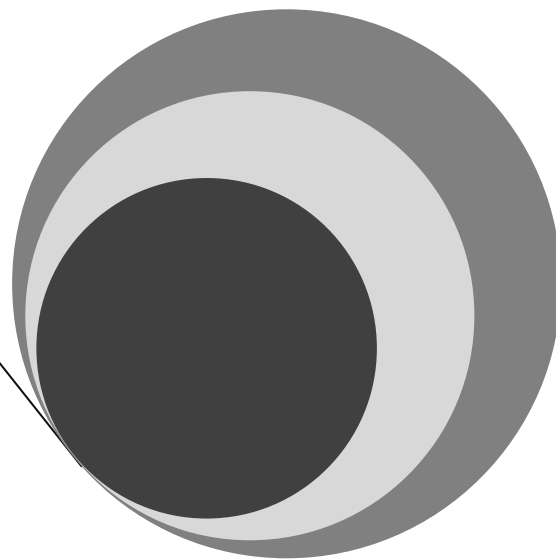
**Carporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Russoto R., Guilloteau M., Histe M., Lallier M. N`Guyen-Huu J.J.** Guide de validation analytique. Rapport d`une commision S.F.S.T.P. II. Exemples d`application. STP Pharma Pratiques, 4: 227-239; 1992b.

**FDA.** Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Washington DC: Food and Drug Administration; (1994).

**International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2B:** Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, London; 1996.

**Wahbi A.A., el-Walily A.F., Hassan E.M., Saliman F.G., el-Gendi A.** Liquid chromatographic determination of flunarizine dihydrochloride in the presence of its degradation product., J. Pharm. Biomed. Anal., 13: 777-784; 1995.

**VI. ESTUDIOS  
EN CULTIVOS  
CELULARES**





## ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

### 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células "in vitro", conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Constituyen una herramienta básica de aplicación fundamental en el diagnóstico viral, en el campo médico o en el veterinario, en la investigación y en la industria farmacéutica.

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células de origen animal o humano, procedentes de diferentes órganos, que en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, mantienen todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped. Se clasifican de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y si han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión. En general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido obtenidas de un tejido extraído de un órgano de un animal recién sacrificado, se denomina Cultivo Primario. Cuando el cultivo es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular.

Los Cultivos Primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ( $2n$ ), su

crecimiento "in vitro" es limitado y se produce inhibición por contacto. El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural.

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo se caracteriza por no tener inhibición por contacto y por crecer de manera indefinida, aumentando notablemente la masa celular del mismo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, y la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquéllos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

En la actualidad las líneas celulares continuas son las más empleadas, fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas que presentan en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras.

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así, solo formarán el cultivo aquéllas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato, y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma iniciarán la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo de proliferación de la mayor parte de las células.

El crecimiento en suspensión es propio de células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es el que se manifiesta en las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y en células procedentes de tumores (*Lehr, 2002; Freshney, 2006; Merten, 2006*).

En el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos, tales como la formulación de microesferas de flunarizina objeto de esta memoria, las técnicas de cultivos celulares constituyen hoy en día una de las herramientas más utilizadas para la evaluación de la actividad de los fármacos. Estas técnicas permiten someter a las células a concentraciones definidas de principio activo, asegurando su acceso directo a las mismas.

Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a especies reactivas de oxígeno provenientes de radiaciones, fármacos o contaminación, habiéndose demostrado el papel del oxígeno en la respuesta a la estimulación de los factores de crecimiento involucrados en la regulación proliferativa. Sin embargo, si los niveles de moléculas oxidantes aumentan por encima de la capacidad de los sistemas enzimáticos antioxidantes, la célula se encuentra sometida a lo que se ha denominado estrés oxidativo, que puede conducir a modificaciones en proteínas, lípidos y ADN (*Sayre y col., 1997; Filiz y col., 2008*).

El incremento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) es originado por una disfunción metabólica mediada por la inhibición irreversible del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (NADH-Coenzima Q oxidorreductasa) que conduce a una caída en los niveles de ATP, pérdida del potencial mitocondrial, alteración de la homeostasis del calcio y formación de ROS, lo que desemboca en la muerte celular (*Cleeter y col., 1992; Woodgate y col., 1999*). La presencia de ROS y el daño oxidativo juegan un papel importante en diversos procesos patológicos (*Halliwell y Whitemen, 2004*).

Se ha demostrado que cambios en la concentración de calcio intracelular puede desembocar en apoptosis (*Rizzuto y col., 2003*). La flunarizina es un antagonista específico de los canales T del calcio ( $\text{CACN}_{\alpha 1\text{G}}$  y  $\text{CACN}_{\alpha 1\text{I}}$ ) que permite la entrada de calcio en el interior de las células. Diversos estudios han demostrado que la flunarizina, dependiendo del modelo celular analizado, puede producir un efecto citoprotector o bien un efecto citotóxico (*So y col., 2006, Conrad y col., 2010*). Por este motivo, en este trabajo hemos estudiado el efecto de diferentes concentraciones de flunarizina sobre 4 líneas celulares:

- PC3: línea celular procedente de adenocarcinoma de próstata.
- T47: línea celular procedente de carcinoma de mama.
- A-498: línea celular procedente de carcinoma de riñón.
- SKN-AS: línea celular procedente de neuroblastoma.

## **2. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN CULTIVOS CELULARES**

A continuación pasamos a describir los ensayos llevados a cabo en esta memoria experimental y que han sido realizados en la Unidad de Cultivos de Células Animales de la Universidad de Alcalá (Madrid).

### **2.1. Puesta a punto y estabilización de las líneas celulares**

El crecimiento de las células (PC3, T47, A-498, SKN-AS) se realiza a 37°C en presencia de una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y un 95% de aire, en un medio de crecimiento DMEM enriquecido con glucosa (4500 mg/ml), suero fetal bovino (5%), suero equino (10%) y un 1% de una mezcla de penicilina-

---

estreptomycin. Después de la incubación se retira el medio de cultivo y se procede a la separación de las células mediante una espátula y posterior centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm. A continuación se siembran placas de 24 pocillos con 300.000 células/ pocillo que se incuban durante 48 horas.

## **2.2 Viabilidad celular y producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en las líneas celulares mediante citometría de flujo**

La viabilidad celular se evaluó por citometría de flujo midiendo el aumento de la fluorescencia del marcador DCFH-DA (acetato de diclorodihidrofluorescencia), debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas en las mitocondrias. Se trata de una de las técnicas más utilizadas para medir el estado Redox de las células (*Eruslanov y Kusmartsev, 2010*).

Las esterasas intracelulares se unen al DCFH-DA en los dos enlaces éster dando lugar a un compuesto relativamente polar H<sub>2</sub> DCF, que no presenta fluorescencia pero que, tras acumularse intracelularmente, sufre oxidación, dando lugar a un compuesto con elevada fluorescencia (DCF). El estado Redox de las células se puede determinar por tanto, mediante el incremento de la fluorescencia, que es proporcional a la concentración de ROS en las células (*Royall e Ischiropoulos, 1993; Eruslanov y Kusmartsev, 2010*).

La técnica de citometría de flujo se basa en hacer pasar las células de forma individual por un haz de luz generado por un láser. La interacción producida da lugar a la transmisión, dispersión y emisión de dicha luz, que es recogida por un detector y gracias a ello es posible diferenciar distintas poblaciones celulares inducidas en las muestras.

La incubación de las células se ha realizado con distintas concentraciones de flunarizina (80, 120, 180, 240 y 300  $\mu\text{M}$ ) durante 24 y 48 h.

Una vez incubadas las células (placas de 6 pocillos con 300.000 células/pocillo), se tripsinizan, se retira el sobrenadante que se resuspende en 300  $\mu\text{l}$  de DCFH-DA, a excepción de las muestras destinadas a la determinación de autofluorescencia que se realiza utilizando 300  $\mu\text{l}$  de PBS. Posteriormente, las células se incuban durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente, se mide la fluorescencia mediante la utilización de una sonda FL1 (530/30) y utilizando como longitud de onda de excitación 488 nm.

Para descartar células muertas se realiza la contratinción con yoduro de propidio, midiendo la fluorescencia mediante una sonda FL3 con detección 650/LP, para la misma longitud de onda de excitación.

Los resultados obtenidos se expresan como viabilidad celular, en porcentaje de células vivas, y como intensidad de fluorescencia. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

### **3. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS CELULARES**

#### **3.1. Estudio de viabilidad celular en las líneas celulares. Citometría de flujo**

Los resultados de viabilidad celular, expresados en porcentaje medio de células vivas, y obtenidos al ensayar distintas concentraciones de flunarizina en las 4 líneas celulares: PC3, T47, A-498 Y SKN-AS, se muestran en las figuras 3 a 6, respectivamente. Los resultados correspondientes a la producción de ROS, expresados como intensidad media de fluorescencia, se recogen en las figuras 7 a 10.

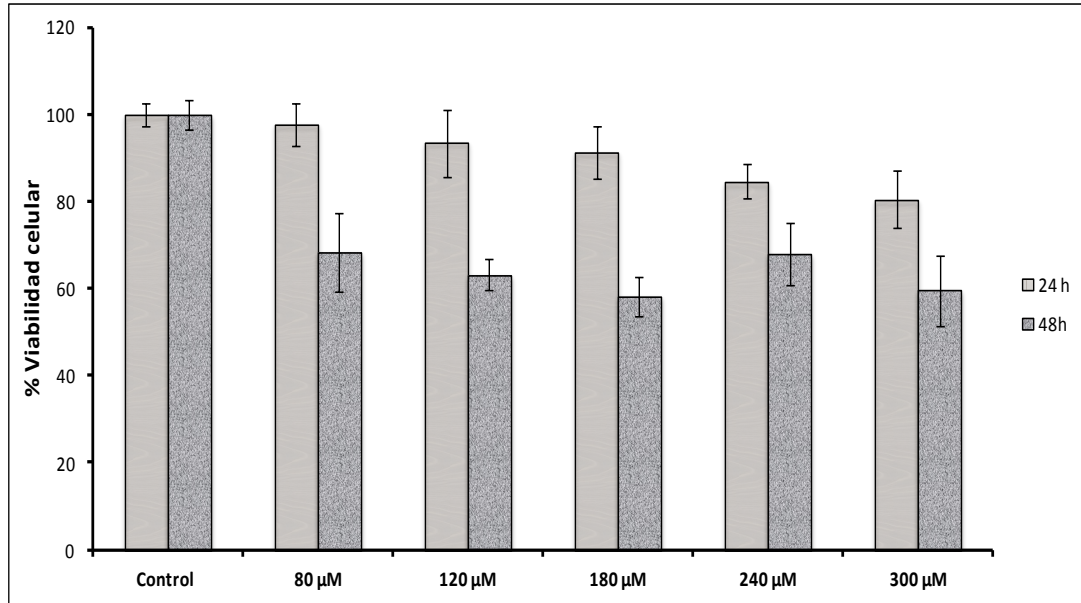


Figura 3. Valores medios de viabilidad celular (%) ( $\pm$ D.E.) obtenidos en la línea celular PC3 para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ).

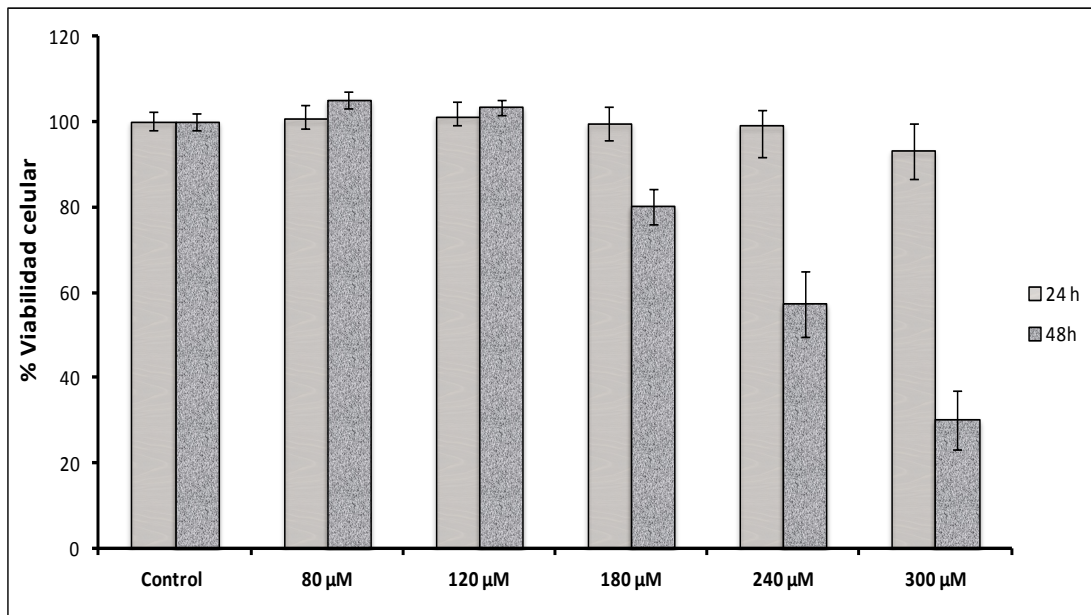


Figura 4. Valores medios de viabilidad celular (%) ( $\pm$ D.E.) obtenidos en la línea celular T47 para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ).

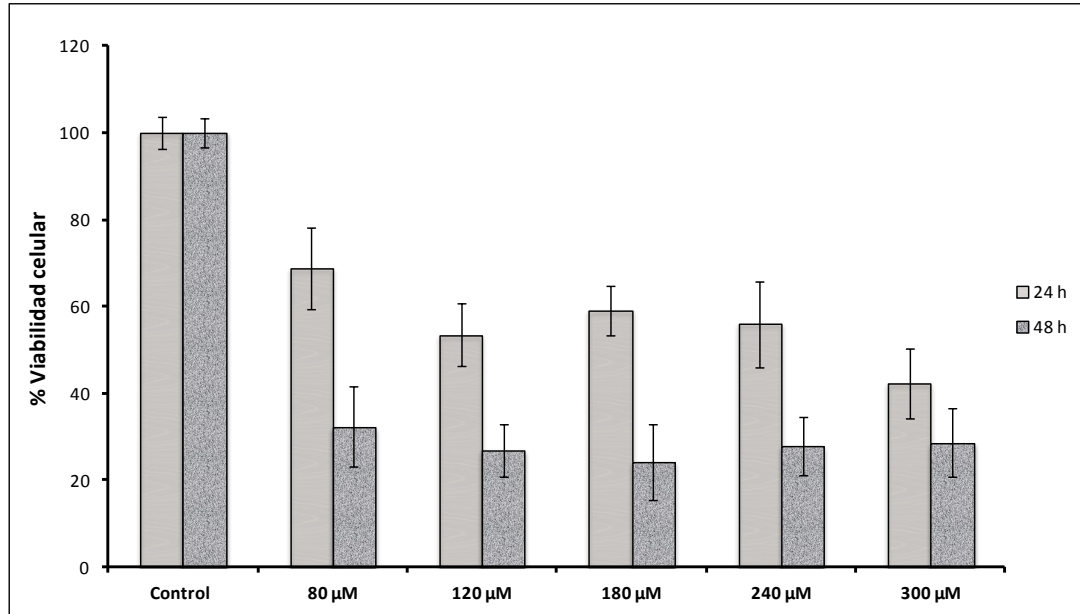


Figura 5. Valores medios de viabilidad celular (%) ( $\pm D.E.$ ) obtenidos en la línea celular A-498 para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ).

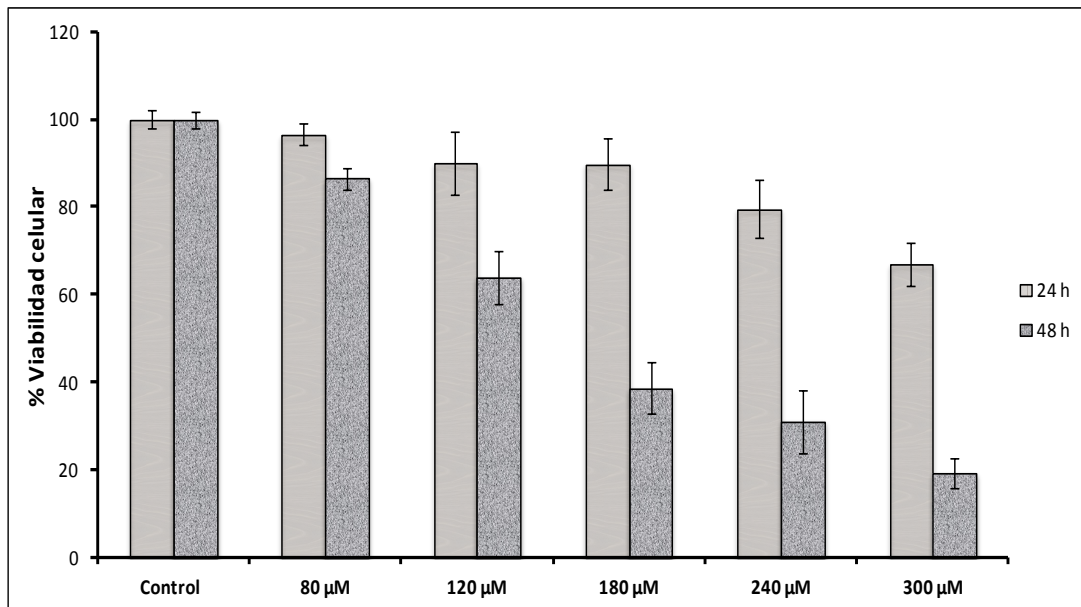


Figura 6. Valores medios de viabilidad celular (%) ( $\pm D.E.$ ) obtenidos en la línea celular SKN-AS para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ).

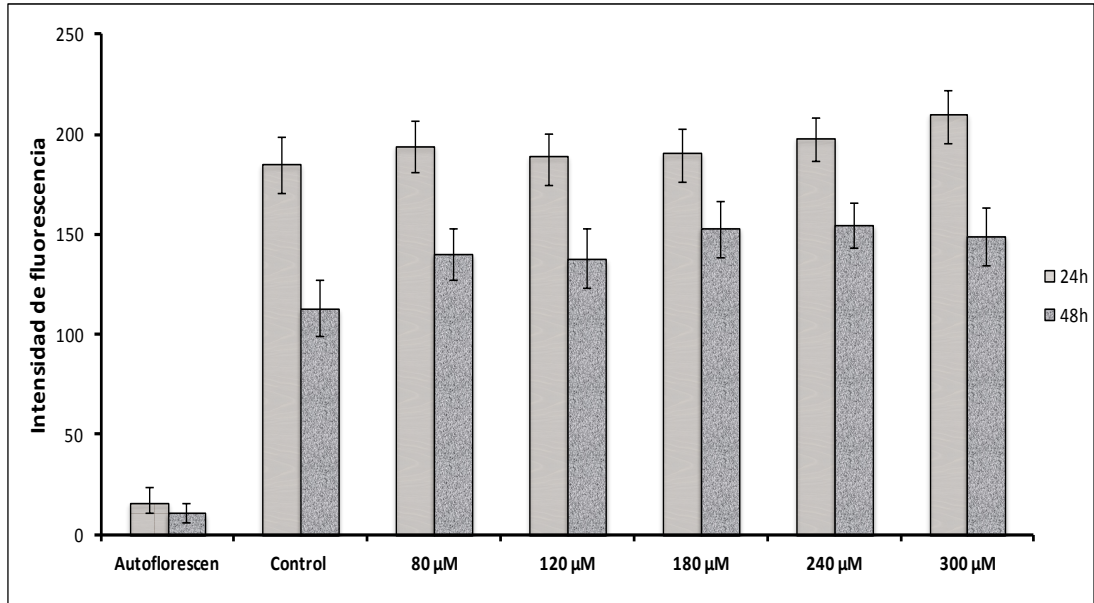


Figura 7. Valores medios de intensidad de fluorescencia ( $\pm D.E$ ) obtenidos para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ) en la línea celular PC3.

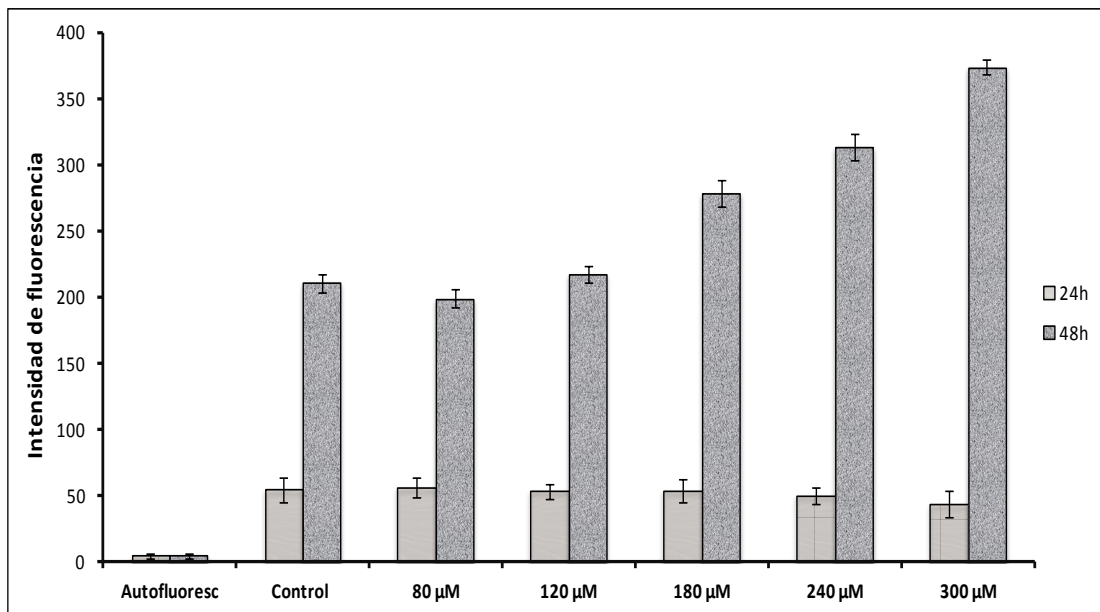


Figura 8. Valores medios de intensidad de fluorescencia ( $\pm D.E$ ) obtenidos para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ) en la línea celular T47.

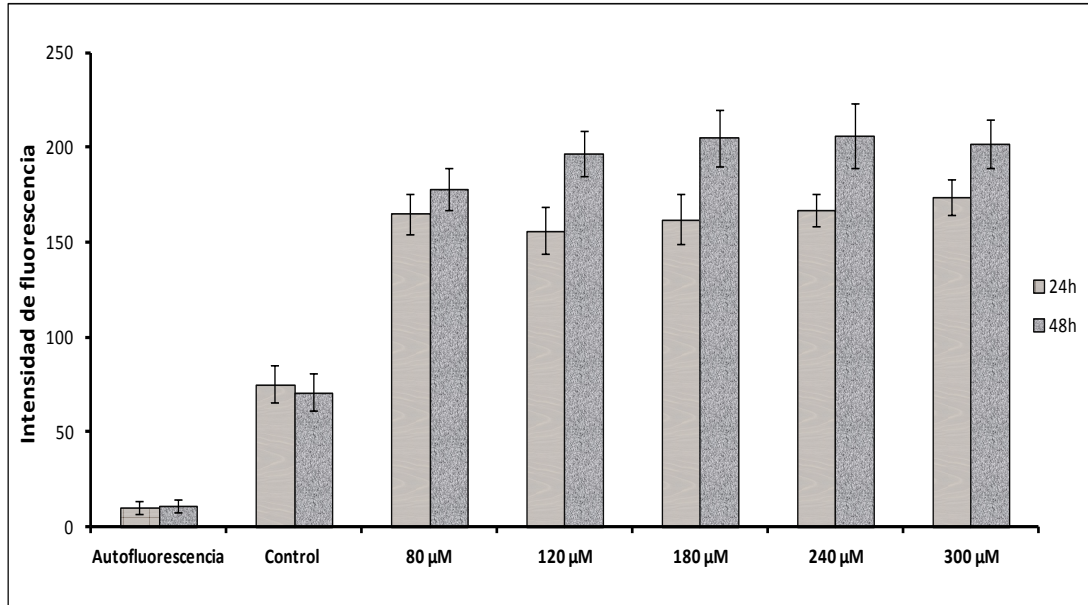


Figura 9. Valores medios de intensidad de fluorescencia ( $\pm D.E$ ) obtenidos para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ) en la línea celular A-498.

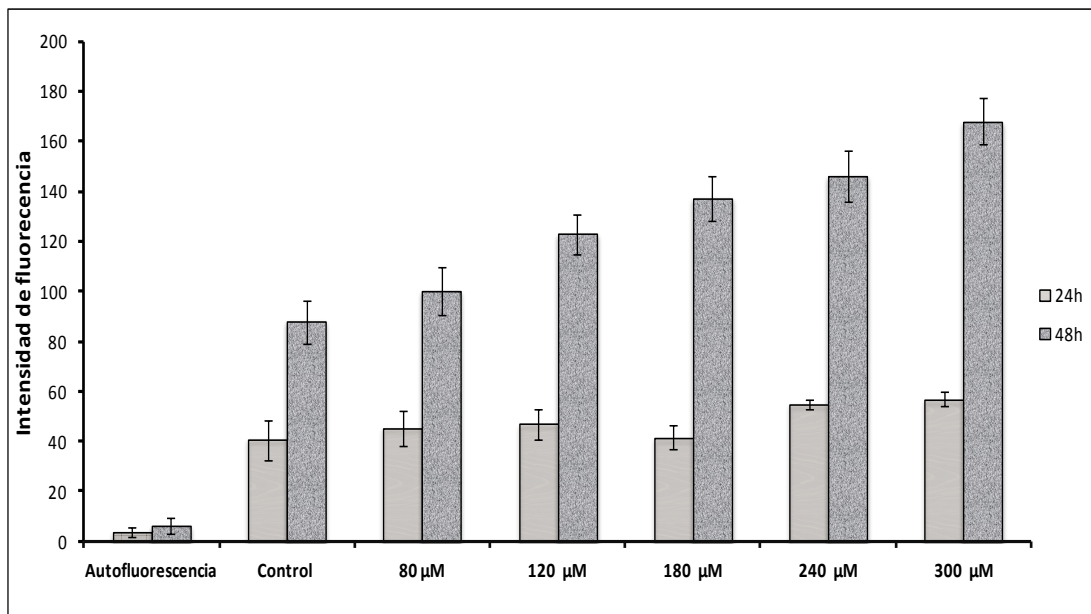


Figura 10. Valores medios de intensidad de fluorescencia ( $\pm D.E$ ) obtenidos para el control y las distintas concentraciones de flunarizina (FZ) en la línea celular SKN-AS.

Como se puede observar en la figura 3, la exposición de las células PC3 durante 48 horas, a todas las concentraciones de flunarizina ensayadas, produce una disminución significativa en la viabilidad celular, y que resultó ser superior al 30% en todos los casos. Sin embargo, este efecto es mucho menos acusado después de 24 horas de exposición, tiempo al cual la muerte celular es inferior al 20%, en todas las concentraciones ensayadas de flunarizina. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en la determinación, mediante esta técnica, de especies reactivas de oxígeno (ROS) a las 24 y 48 horas (figura 7).

Para la línea celular T47 (figura 4) sólo se produce una disminución significativa de la supervivencia celular después de 48 horas de exposición y a las concentraciones más elevadas de flunarizina (180 a 300  $\mu\text{M}$ ). A las 24 horas los porcentajes de supervivencia celular son superiores al 93% para todas las concentraciones ensayadas. En la figura 8 se recoge la producción de ROS a las 24 y 48 horas, expresada como intensidad de fluorescencia, y en la que se observa la correlación entre muerte celular e incremento de especies reactivas de oxígeno.

En el caso de las células A-498 (figura 5), en todo el rango de concentraciones de flunarizina ensayadas, se producen disminuciones estadísticamente significativas en la supervivencia celular, que son superiores al 30% y 65% después de 24 y 48 horas de exposición, respectivamente. En la figura 9 se presenta la producción de especies reactivas de oxígeno, observándose que a todas las concentraciones estudiadas el incremento de la intensidad de fluorescencia resultó ser unas 2 y 2,5 veces superior al control a las 24 y 48 horas, respectivamente.

En la línea celular SKN-AS, después de 24 horas de exposición sólo se manifiesta una reducción significativa de la viabilidad celular para las dos concentraciones más elevadas (240 y 300  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo tras 48 de

exposición, a partir de una concentración de flunarizina de 120  $\mu\text{M}$  se producen disminuciones superiores al 35% en la viabilidad celular (figura 6). Estos resultados se correlacionan con los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos.

En las figuras 11 a 18 se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía invertida de contraste de fases en las 4 líneas celulares: PC3, T47, A-498 Y SKN-AS, control y, tras su incubación con las distintas concentraciones de flunarizina (80  $\mu\text{M}$  - 300  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h y 48 h.

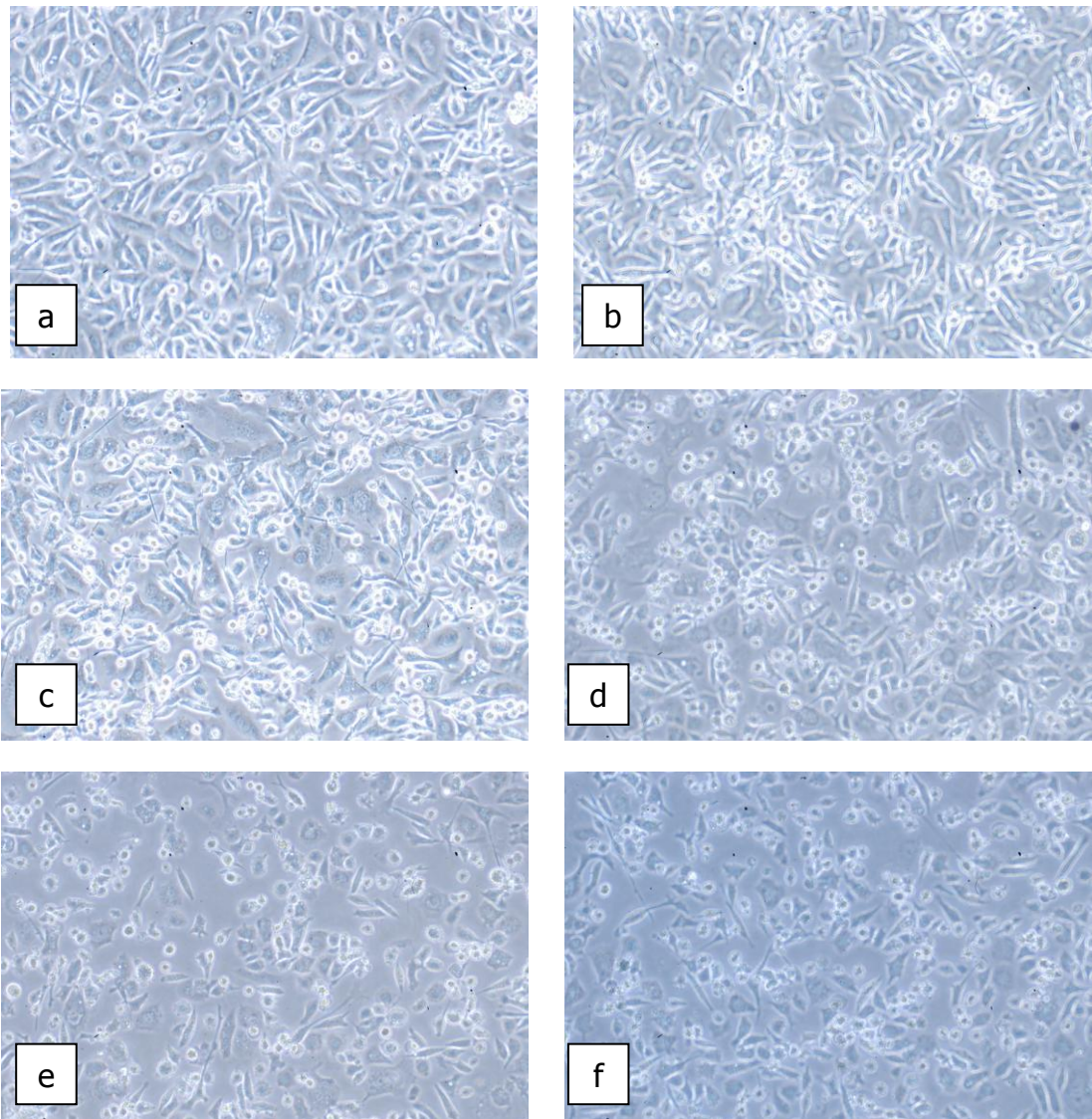


Figura 11. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células PC3 control (a), e incubadas durante 24 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu$ M (b), 120  $\mu$ M (c), 180  $\mu$ M (d), 240 (e) y 300  $\mu$ M (20x).*

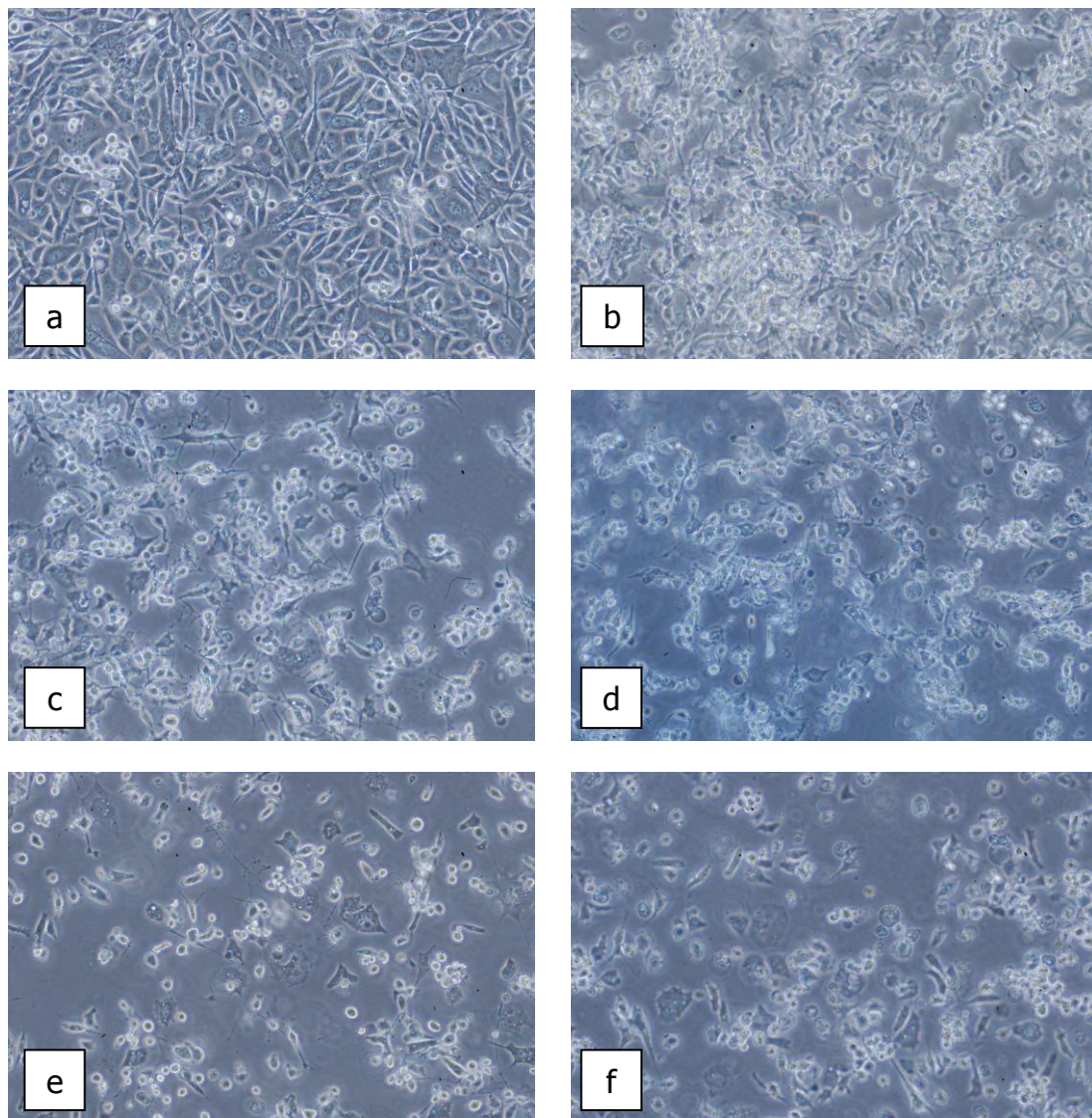


Figura 12. Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células PC3 control (a), e incubadas durante 48 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu\text{M}$  (b), 120  $\mu\text{M}$  (c), 180  $\mu\text{M}$  (d), 240 (e) y 300  $\mu\text{M}$  (20x).

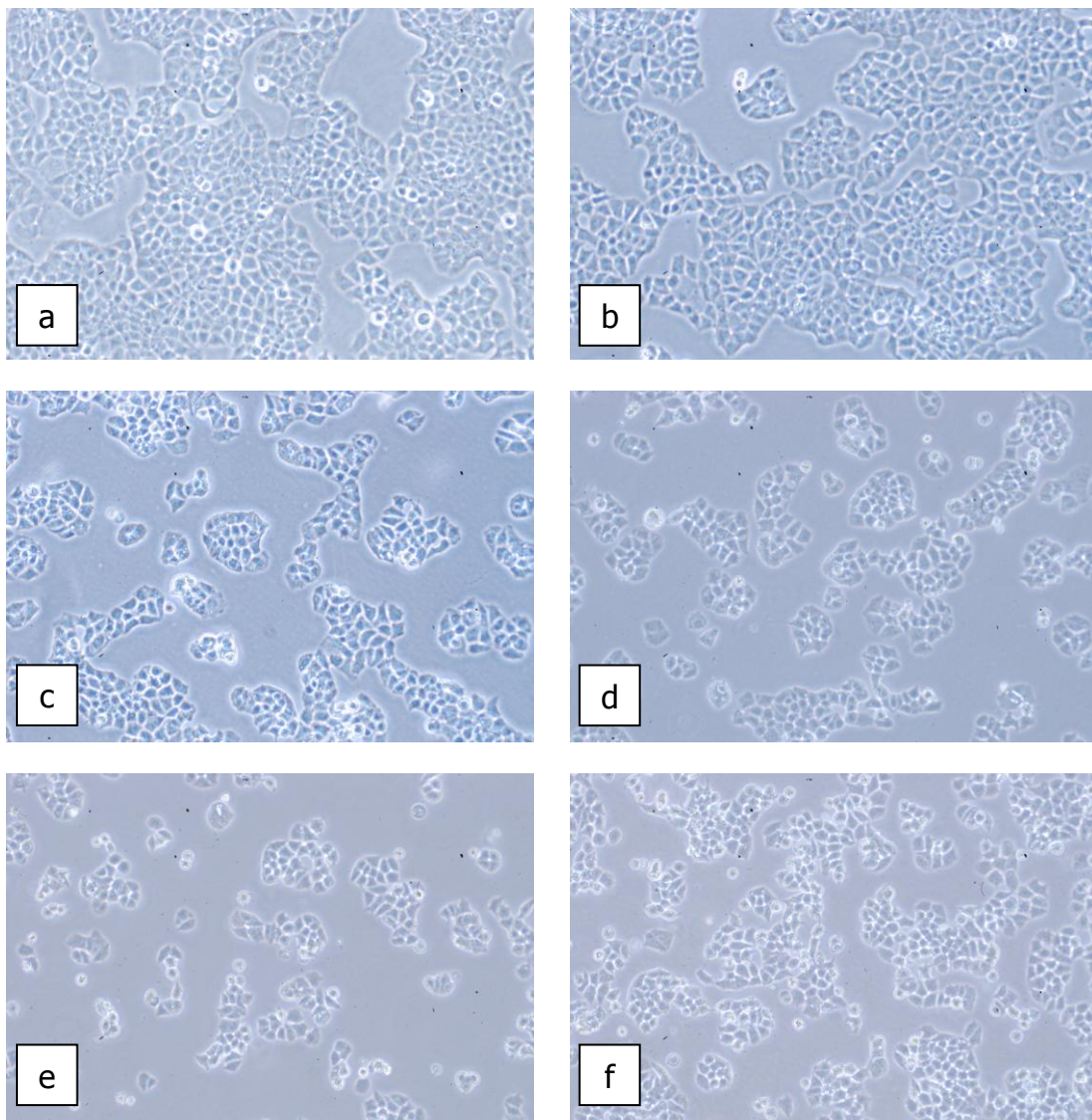


Figura 13. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células T47 control (a), e incubadas durante 24 h con concentraciones de flunarizina de 80 µM (b), 120 µM (c), 180 µM (d), 240 (e) y 300 µM (20x).*

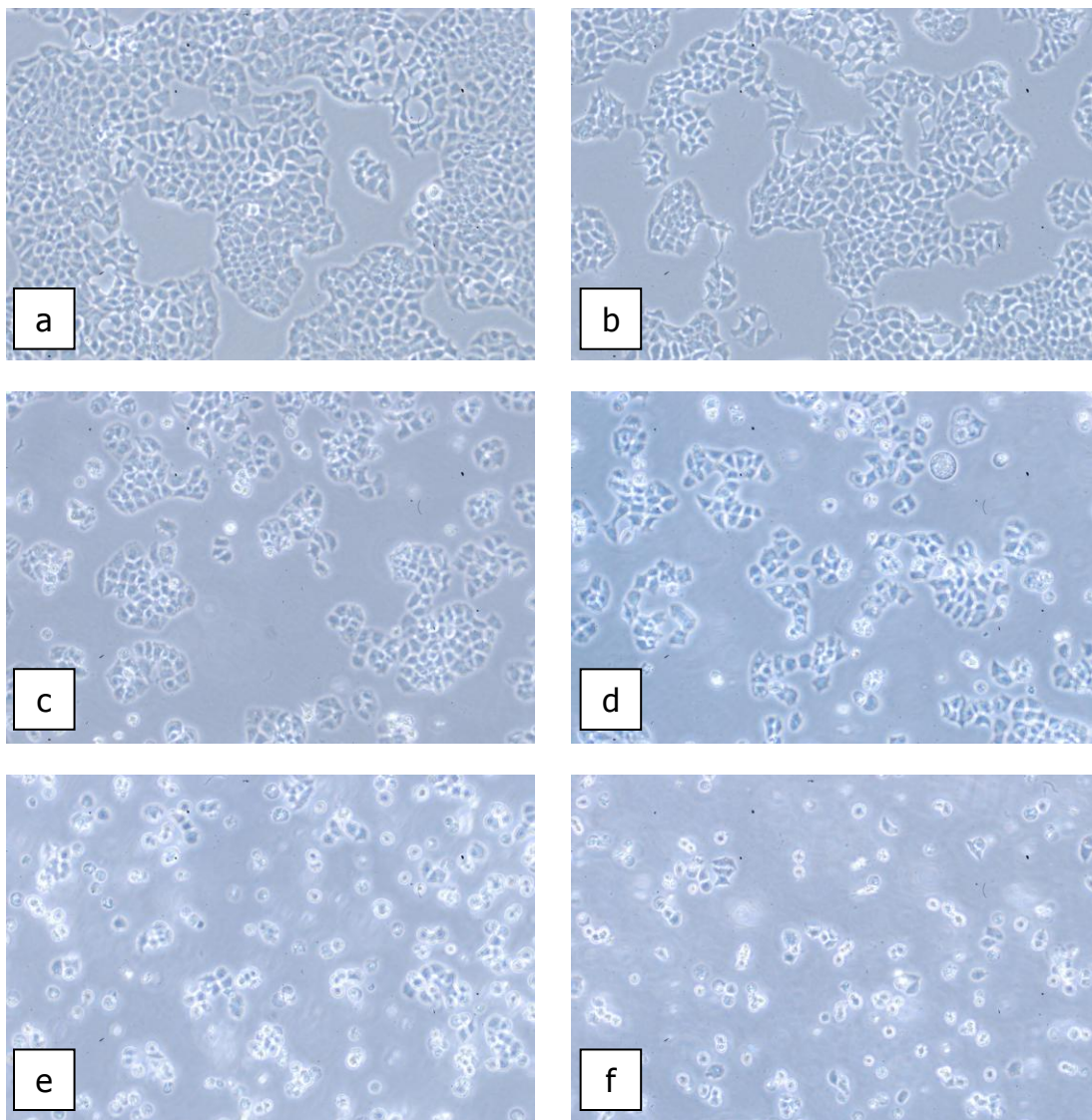


Figura 14. Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células T47 control (a), e incubadas durante 48 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu\text{M}$  (b), 120  $\mu\text{M}$  (c), 180  $\mu\text{M}$  (d), 240 (e) y 300  $\mu\text{M}$  (20x).

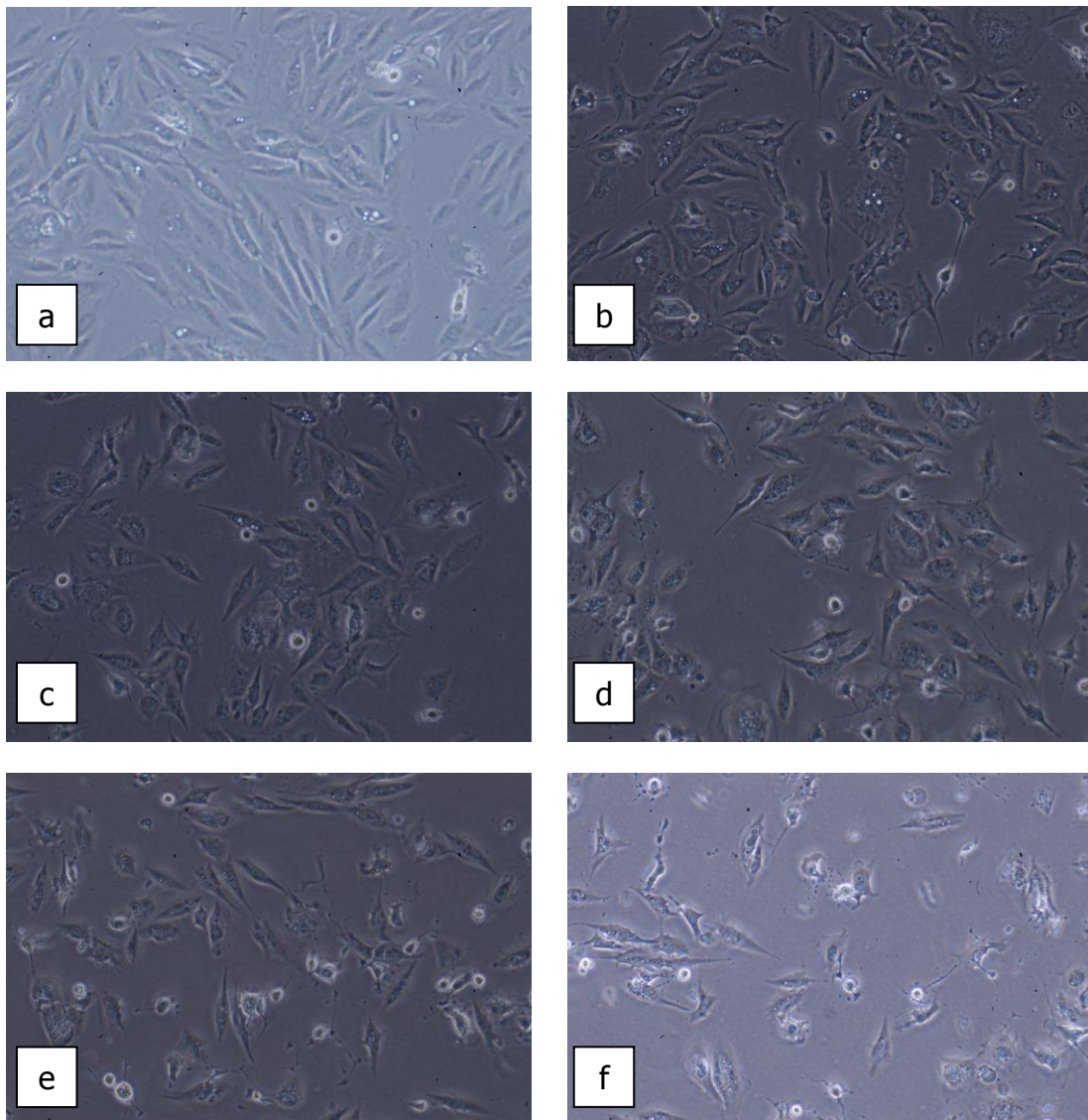


Figura 15. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células A-498 control (a), e incubadas durante 24 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu\text{M}$  (b), 120  $\mu\text{M}$  (c), 180  $\mu\text{M}$  (d), 240 (e) y 300  $\mu\text{M}$  (20x).*

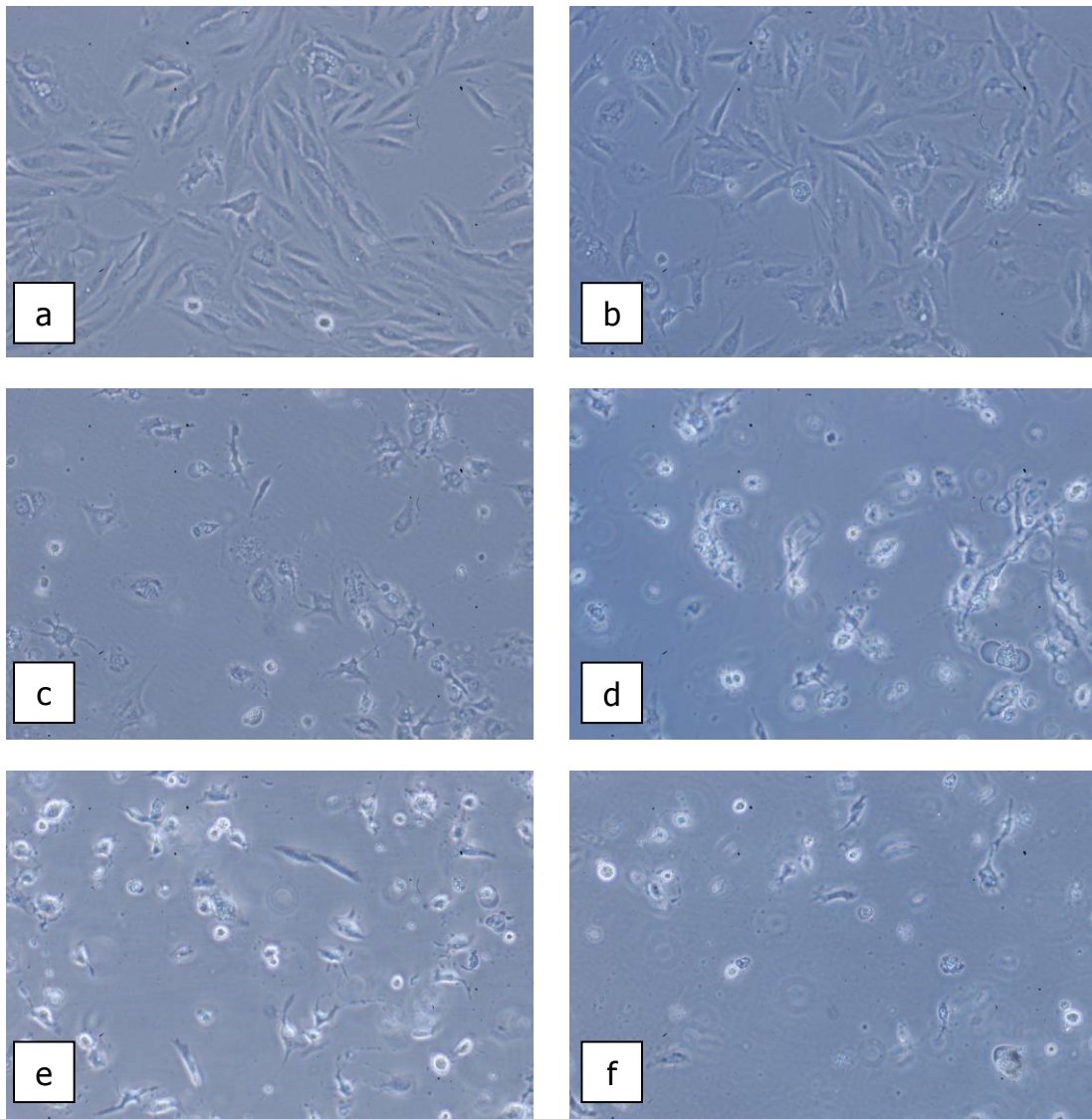


Figura 16. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células A-498 control (a), e incubadas durante 48 h con concentraciones de flunarizina de 80 μM (b), 120 μM (c), 180 μM (d), 240 (e) y 300 μM (20x).*

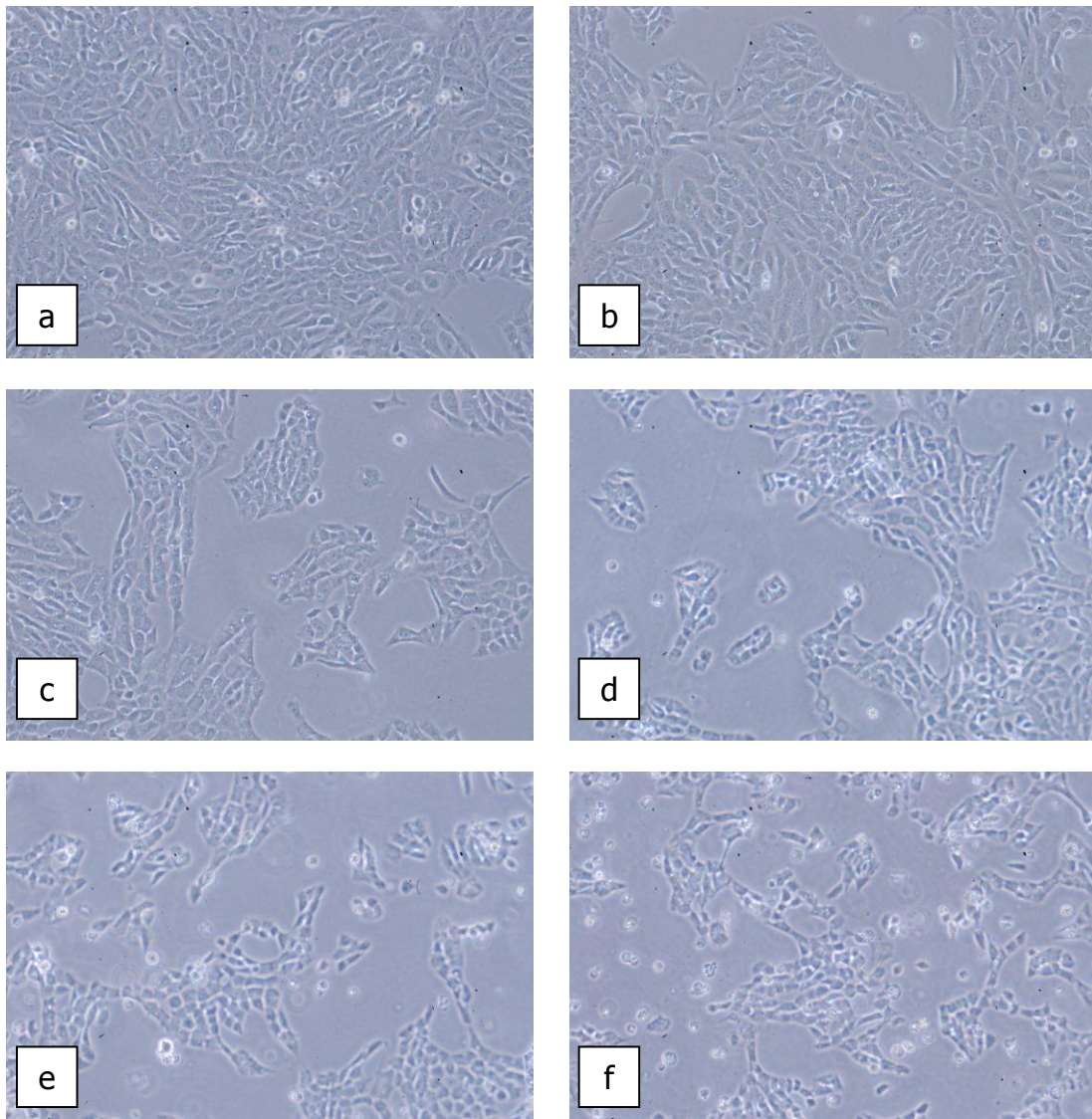


Figura 17. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS control (a), e incubadas durante 24 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu$ M (b), 120  $\mu$ M (c), 180  $\mu$ M (d), 240 (e) y 300  $\mu$ M (20x).*

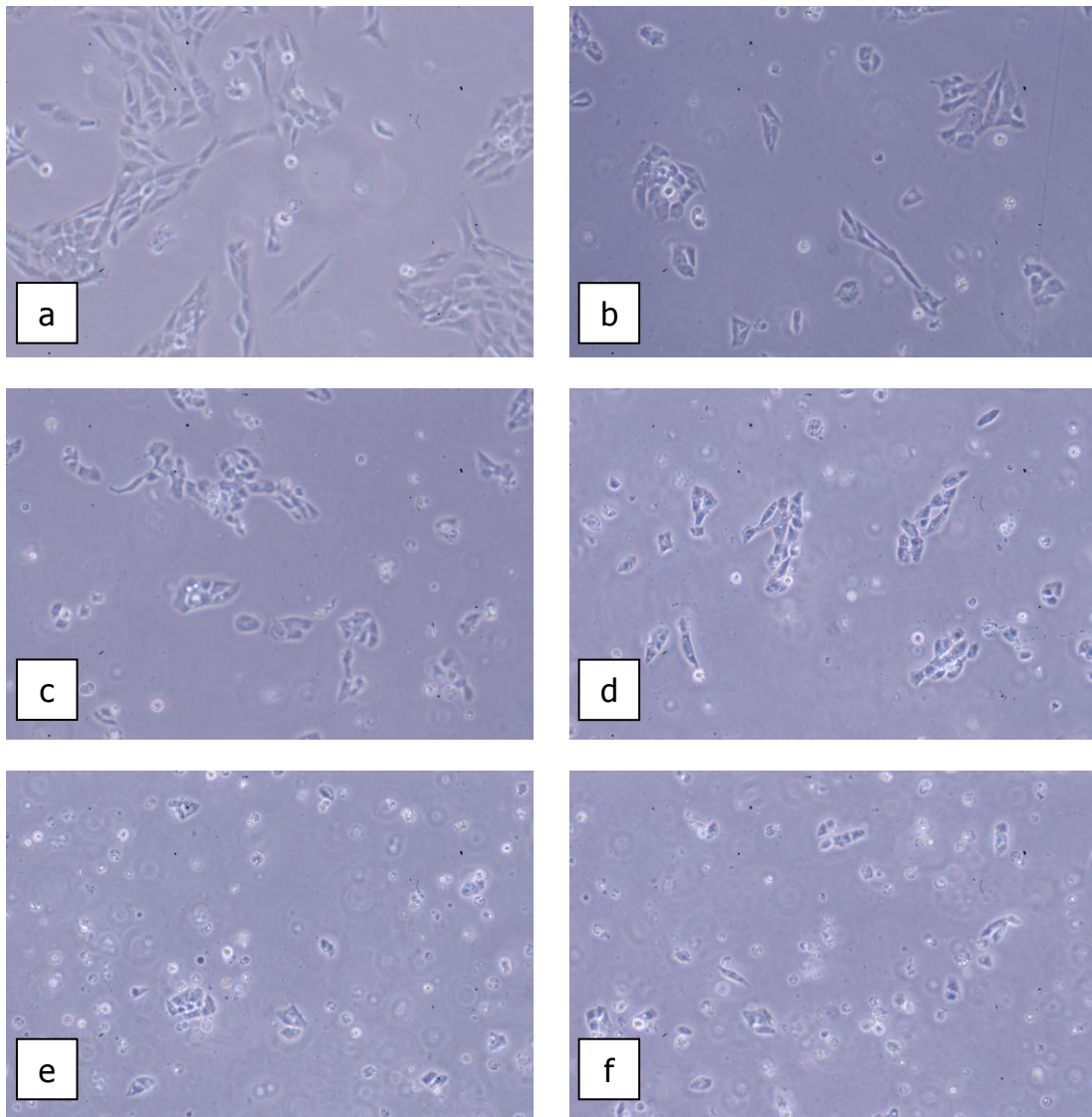


Figura 18. *Imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS control (a), e incubadas durante 48 h con concentraciones de flunarizina de 80  $\mu$ M (b), 120  $\mu$ M (c), 180  $\mu$ M (d), 240 (e) y 300  $\mu$ M (20x).*

En general se pone de manifiesto una correlación entre los resultados obtenidos de viabilidad para las distintas líneas celulares y las imágenes obtenidas por microscopía invertida de contraste de fases, de manera que para concentraciones de flunarizina que implican una modificación significativa en la

viabilidad celular, se observa que las células correspondientes van perdiendo su forma característica alargada y van apareciendo cada vez más estructuras redondeadas, que en ocasiones aparecen como agregados.

**BIBLIOGRAFIA**

**Cleeter M.W., Cooper J.M. Schapira A.H.** Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement, *J. Neurochem.*, 58: 786-789; 1992.

**Conrad D.M., Furlong S.J., Doucette C.D., West K.A. Hoskin D.W.** The Ca(2+) channel blocker flunarizine induces caspase-10-dependent apoptosis in Jurkat T-leukemia cells., *Apoptosis.*, 15:597-607; 2010.

**Eruslanov E. Kusmartsev S.** Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. En: D. Armstrong, ed. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, New Jersey, 2010.

**Filiz G., Caragounis A, Bica L., Du T., Masters C.L., Crouch P.J., White A.R.** Clioquinol inhibits peroxide-mediated toxicity through up-regulation of phosphoinositol-3-kinase and inhibition of p53 activity., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40: 1030-1042; 2008.

**Freshney R.I.** Basic principles of cell culture. En: Vunjak-Novakovic, G. y Freshney, R.I., eds. *Culture of Cells for Tissue Engineering*. John Wiley & Sons, Inc, New York; 2006.

**Halliwell B. Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br. J. Pharmacol.*, 142 :231-255; 2004.

**Lehr C.M.** *Cell Culture Models of Biological Barriers: In Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery*. Taylor and Francis, London; 2002.

**Merten O.W.** Introduction to animal cell culture technology—past, present and future., *Cytotechnology*, 50: 1–7; 2006.

**Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D., Chami M., Szabadkai G., Magalhaes P.J., Di Virgilio F., Pozzan T.** Calcium and apoptosis; facts and hypotheses. *Oncogene*, 22: 8619-8627; 2003.

**Royall J.A., Ischiropoulos H.** Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 302: 348–355; 1993.

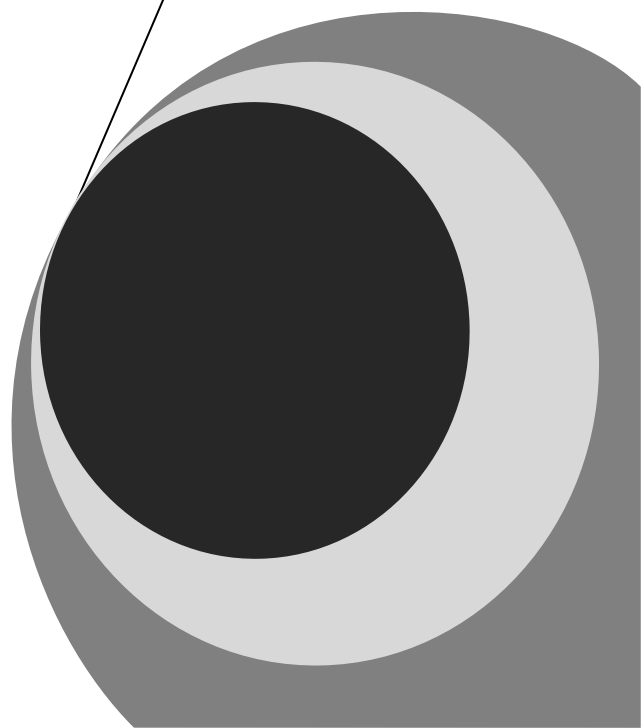
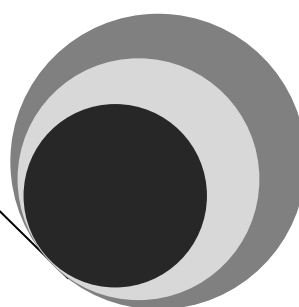
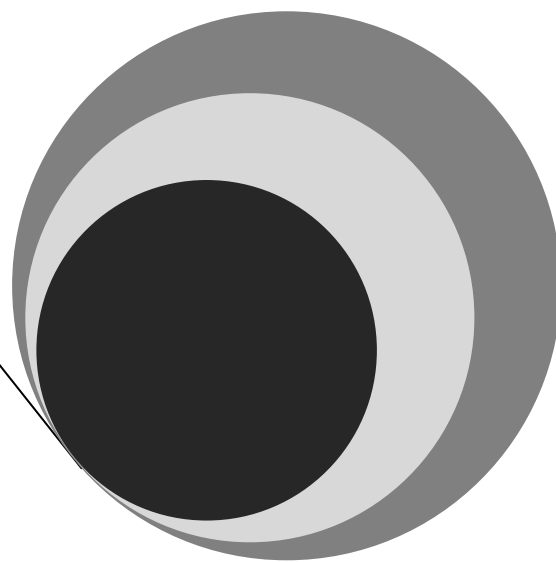
**Sayre L. M., Zelasko D.A., Harris P.L., Perry G., Salomon R.G., Smith M.A.** 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 68: 2092–2097; 1997.

**So H.S., Kim H.J., Lee J.H., Lee J.H., Park S.Y., Park C., Kim Y.H., Kim J.K., Lee K.M., Kim K.S., Chung S.Y., Jang W.C., Moon S.K., Chung H.T. Park R.K.** Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ*, 3: 1763-1775; 2006.

**Woodgate A., Macgibbon G., Walton M. Dragunow M.** The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. *Mol. Brain Res.*, 69: 84-92; 1999.



**VII. ENSAYOS  
PREVIOS**





## **ENSAYOS PREVIOS EN LA ELABORACION DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA**

### **1. INTRODUCCIÓN**

En esta parte de la memoria experimental indicamos, de forma resumida, la serie de ensayos previos que se han realizado, con el fin de seleccionar el polímero formador de la cubierta de las microesferas de clorhidrato de flunarizina, así como las condiciones idóneas de realización de los ensayos de cesión del clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas.

### **2. SELECCIÓN DEL POLÍMERO**

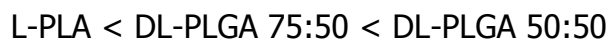
Al plantearse en esta memoria experimental el desarrollo de un nuevo sistema de liberación controlada de clorhidrato de flunarizina destinado a su administración parenteral, es necesario que el polímero formador del sistema sea biocompatible y biodegradable. La ventaja de utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables es que una vez administrada la formulación, el fármaco es liberado, y el polímero se degrada paulatinamente en productos biológicos de fácil eliminación por las vías naturales de excreción del organismo. A tal efecto, resulta particularmente interesante la utilización de copolímeros derivados de los ácidos láctico y glicólico (PLGA) (*Edlund y Albertsson, 2002*).

El término biodegradable para estos polímeros se refiere a la hidrólisis de sus enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. La reacción del copolímero láctico-glicólico produce una hidrólisis en ácido láctico y glicólico, metabolitos biocompatibles y carentes de toxicidad (*Sansdrap y Moës, 1997*), los cuales son metabolizados en el ciclo de Krebs hasta formar agua y CO<sub>2</sub> (*Tamber y col., 2005*). Al ser empleados como matrices en la obtención de microesferas, su degradación ocurre en dos etapas. La primera

comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster, propiamente llamada degradación, y en la cual se generan oligómeros y monómeros con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa, llamada erosión, ocurre la pérdida de masa de la matriz, y la velocidad de escisión de los enlaces puede aumentar debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida (*Vert y col., 1994*). Precisamente, el hecho de que estos polímeros no sean solubles en agua pero puedan ser degradados por ella, los hace de extraordinaria utilidad en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

El ácido poliglicólico es cristalino, quebradizo y presenta un proceso de degradación muy rápido, mientras que el ácido poliláctico es resistente y poco elástico con un bajo grado de permeabilidad, lo que prolonga su hidrólisis durante meses.

El grado de cristalinidad del polímero depende de la proporción de los dos monómeros que lo componen. Así, a medida que aumenta el porcentaje de ácido glicólico, el polímero es más amorfo, con un límite del 70% (*Gilding y Reed, 1979*). A partir de este punto el proceso es inverso, ya que la cristalinidad del copolímero aumenta. La duración del proceso de degradación del polímero es variable (*Freiberg y Zhu, 2004*), viéndose modificado en función de su composición. Así, la velocidad de degradación del polímero se ve incrementada en el siguiente orden (*Witschi y Doelker, 1998*):



También el peso molecular final del copolímero es fundamental, de manera que dentro de un mismo grupo, aquéllos de menor peso molecular presentan una semivida más corta que los de mayor peso molecular, lo que condiciona la

velocidad de cesión del fármaco incorporado en las microesferas (*Jalil y Nixon, 1990; Park, 1994; Chulia y col., 1994*).

Dentro de los distintos copolímeros de los ácidos lácticos y glicólico hemos seleccionado inicialmente el PLGA 50:50 Resomer® RG 502, con el cual hemos preparado y caracterizado microesferas de clorhidrato de flunarizina.

### **3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA CON POLÍMERO PLGA 502.**

#### **3.1. Preparación**

La preparación de microesferas se lleva a cabo mediante la técnica de extracción-evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A, que comprende cuatro pasos fundamentales:

- 1) Disolución o dispersión del principio activo en un solvente orgánico volátil, inmiscible en agua, que contiene el polímero disuelto.
- 2) Emulsificación por agitación de esta fase orgánica en la fase continua (generalmente acuosa, que contiene un surfactante) inmiscible con la primera (solvente orgánico) con la consiguiente formación de pequeñas gotículas.
- 3) Eliminación del solvente orgánico de la fase dispersa por dos mecanismos:
  - a. Extracción del solvente orgánico de la fase dispersa mediante su difusión a través de la fase continua, y
  - b. Evaporación del solvente en la interfaz líquido/aire. Conforme tiene lugar la evaporación del solvente orgánico, las microesferas "maduran",

y se forma una estructura de tipo matricial constituida por el polímero, en la que queda "atrapado" el principio activo.

- 4) Aislamiento mediante filtración, y lavado de la microesferas para eliminar las posibles sustancias que hayan podido quedar adheridas a su superficie (emulgente, fármaco no encapsulado). La adición de agua destilada, además del lavado, favorece la eliminación del solvente orgánico residual de las microesferas (*Sinha y col., 2004*). Por último, el proceso de secado elimina los restos de fase continua y líquido de lavado adsorbidos en la superficie de las microesferas (*Freitas y col., 2005*).

El disolvente orgánico más utilizado en la técnica de microencapsulación por evaporación del solvente basada en la formación de emulsiones O/A es el diclorometano, por su elevada volatilidad (punto de ebullición a presión atmosférica de 38,5°C) que facilita su eliminación por evaporación (*Watts y col., 1990*), por su limitada solubilidad en agua, y por presentar muy buenas propiedades como disolvente de muchos polímeros. Como fase externa se emplea una disolución acuosa de alcohol polivinílico. La función del emulsificante en la producción de las microesferas por evaporación del solvente es la estabilización de las gotículas de la fase interna de la emulsión.

Para dicha elaboración de microesferas, se pesan 400 mg de polímero PLGA 50:50 Resomer® RG 502, que se disuelven en 1 ml de diclorometano, bajo agitación durante 2-3 minutos. A esta solución se incorporan 40 mg de clorhidrato de flunarizina, bajo agitación durante 2-3 minutos. Una vez formada la dispersión, se añade sobre 10 ml de alcohol polivinílico (PVA) al 0,1%, agitándose con ayuda de una polytrón a una velocidad de 3000 rpm durante 3 minutos, consiguiendo así la formación de la emulsión. La emulsión O/A formada se incorpora en un volumen de 100 ml de agua destilada y se

mantiene bajo agitación durante 3 horas a temperatura ambiente, hasta que la mayor parte del solvente orgánico se haya evaporado. Las microesferas maduras se filtran a vacío a través de filtros orgánicos de 0,45  $\mu\text{m}$ , y luego se lavan 3 veces con agua destilada. Por último, se procede a su congelación durante 15 minutos, para su posterior liofilización durante tres horas, con el fin de eliminar los posibles restos de humedad (figura 19). De esta manera se han preparado dos lotes de microesferas.

Una vez preparadas las microesferas se calculan los rendimientos del proceso y de encapsulación.

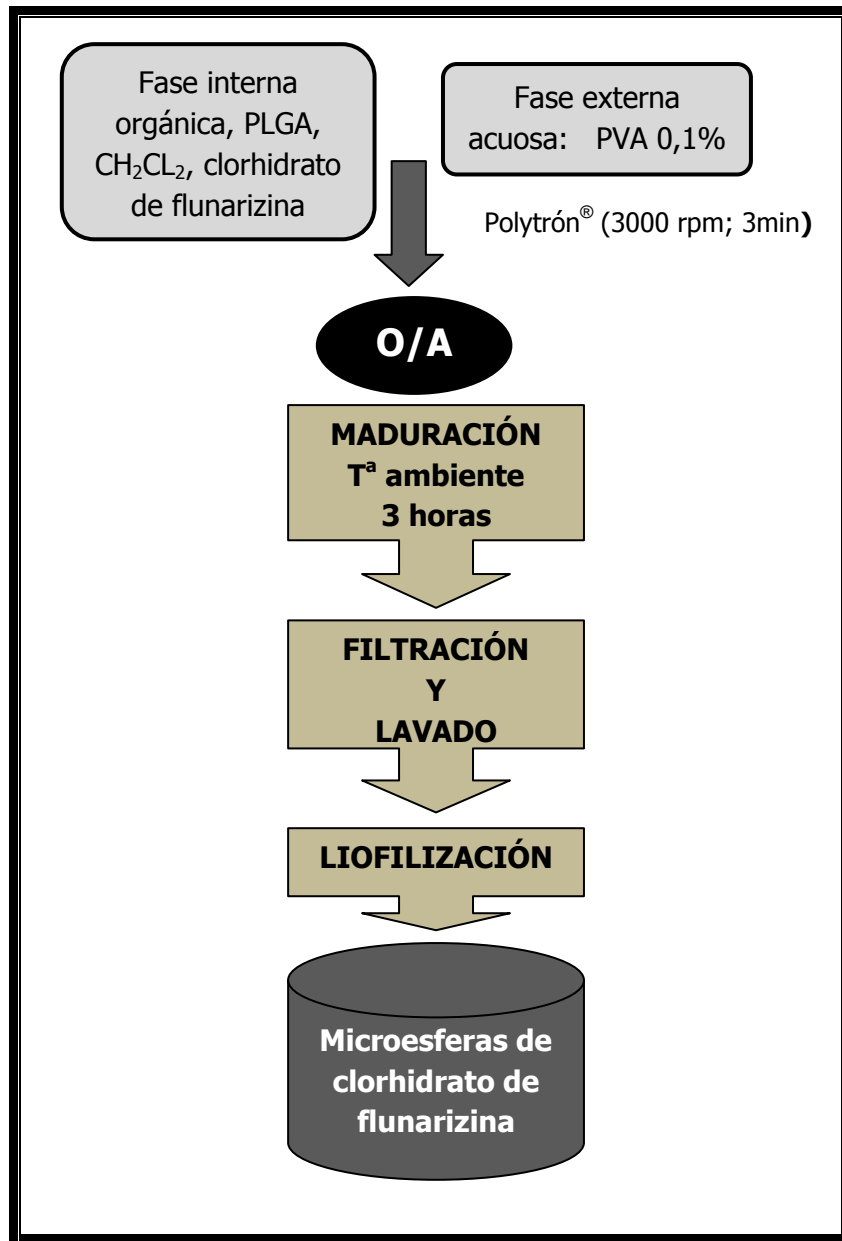


Figura 19. Esquema de preparación de las formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina mediante el método de evaporación/extracción del solvente a partir de una emulsión O/A.

### 3.2. Rendimientos del proceso y de encapsulación

Para la determinación del rendimiento de producción y una vez separadas las microesferas, éstas se pesan y se determina la cantidad de microesferas obtenidas por el método de preparación.

El rendimiento de producción refleja el porcentaje de microesferas obtenidas con respecto a la cantidad total de material empleado: principio activo (p.a.) y polímero. El rendimiento del proceso se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{mg microesferas obtenidas}}{(\text{mg p.a.} + \text{mg polímero})} \times 100$$

En cuanto al rendimiento de encapsulación o contenido en principio activo, hace referencia a la cantidad de sustancia activa encapsulada en las microesferas.

La eficacia o rendimiento de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el principio activo que realmente ha sido encapsulado y aquel en disposición de ser encapsulado, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{p.a. / polímero}_{\text{experimental}}}{\text{p.a. / polímero}_{\text{teórico}}} \times 100$$

El rendimiento de encapsulación también se puede expresar como mg de principio activo (p.a.)/100 mg de microesferas.

Es importante, que tanto el principio activo como la eficacia de encapsulación sean lo más elevados posibles. Es decir, es importante incorporar la mayor cantidad posible de principio activo en las microesferas, con el objeto de que la cantidad de microesferas a administrar sea la menor posible. Además,

desde un punto de vista económico conviene que prácticamente todo el principio activo utilizado en el proceso sea encapsulado, para evitar pérdidas.

Para determinar la cantidad de clorhidrato de flunarizina incorporada a las microesferas, se procede de la siguiente manera: se pesa una cantidad establecida de microesferas (10 mg) que se disuelven en diclorometano (1 ml), con el fin de romper las micropartículas. A continuación se añaden 18 ml de metanol, para facilitar la precipitación del polímero. Posteriormente se centrifuga la muestra a 5500 rpm durante 4 minutos, se toma una alícuota del sobrenadante y se hace pasar a través de un filtro orgánico de tamaño de 0,45  $\mu\text{m}$ . La cuantificación del principio activo se realiza por espectrofotometría de primera derivada, tras comprobar que los resultados obtenidos por dicha técnica no difieren de los obtenidos por HPLC.

Se ha seleccionado un volumen de 18 ml de metanol para proceder a precipitar el polímero, debido a que previamente se han ensayado volúmenes de metanol que oscilaron entre 8 y 30 ml. En estos ensayos iniciales se comprobó que la incorporación de 18 ml de metanol es suficiente para llevar a cabo la precipitación total del polímero.

Los resultados individuales y medios obtenidos en la determinación de los rendimientos del proceso y de encapsulación se recogen en la tabla 14.

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Media</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>Rendimiento del proceso (%)</b>	45,56	42,93	44,25	1,86
<b>Eficacia de encapsulación (%)</b>	74,62	77,03	75,83	1,70

Tabla 14. *Resultados medios del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación, obtenidos en la preparación de microesferas de clorhidrato de flunarizina con PLGA 502.*

El rendimiento medio del proceso fue de  $44,25\% \pm 1,86$  y la eficacia de encapsulación media fue de  $75,83\% \pm 1,70$ .

Como se puede comprobar, en todos los lotes preparados de microesferas, el rendimiento medio del proceso de elaboración fue bajo con valores inferiores al 50%, sin embargo, el rendimiento medio de encapsulación obtenido ha sido superior al 74%, en todos los lotes.

### **3.3 Ensayos de cesión**

El estudio de cesión "in vitro" del clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas se lleva a cabo de la forma siguiente: se pesan 10 mg de microesferas que, a fin de mantener condiciones "sink", se suspenden en un volumen de 6 ml de tampón fosfato Sörensen 0,01M a pH 7,4 conteniendo un 1% de lauril sulfato sódico (LSS). Las muestras se introducen en un baño termostaticado a 37°C, manteniéndose con un movimiento constante de 100 agitaciones por minuto, durante el tiempo de duración del ensayo. La toma de muestras se realiza a intervalos de tiempo pre-establecidos, mediante la extracción cuidadosa de todo el volumen de tampón contenido en la muestra y reposición posterior con 6 ml de tampón fosfato pH 7,4 con lauril sulfato sódico (LSS) al 1% recién preparado. Una vez filtradas las muestras, se procede a la cuantificación del principio activo por espectrofotometría de primera derivada a 268 nm, tras comprobar que para dicho método los resultados no difieren significativamente de los obtenidos por HPLC. En todos los casos los ensayos se realizan por duplicado.

En la tabla 15 se muestran los resultados del estudio de cesión. Asimismo, en la figura 20 se muestran los perfiles de cesión medios de las microesferas de clorhidrato de flunarizina.

Tiempo (días)	Cantidad cedida acumulada lote 1 ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad cedida acumulada lote 2 ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje cedido acumulado lote 1 (%)	Porcentaje cedido acumulado lote 2 (%)	Porcentaje cedido acumulado medio (%)	( $\pm$ D.E.)
1	34,76	29,49	2,56	2,10	2,33	0,33
4	51,09	46,03	3,76	3,28	3,52	0,34
8	76,70	66,70	5,61	4,76	5,19	0,60
11	261,29	350,42	19,25	25,01	22,13	4,07
15	925,23	1057,01	68,19	75,43	71,81	5,12
18	1128,57	1265,34	83,17	90,29	86,73	5,03
22	1181,73	1297,21	87,05	92,57	89,81	3,90
25	1191,60	1305,66	87,82	93,17	90,50	3,78
29	1194,67	1308,59	88,04	93,38	90,71	3,78
32	1196,99	1310,40	88,21	93,51	90,86	3,75
36	1198,52	1312,93	88,32	93,69	91,01	3,80
39	1201,00	1314,59	88,51	93,81	91,16	3,75
43	1206,40	1317,89	88,75	94,05	91,40	3,75

Tabla 15. *Cantidades y porcentajes cedidos acumulados ( $\pm$  D.E.) de clorhidrato de flunarizina en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato PBS a pH 7,4 con LSS al 1% a partir de microesferas preparadas con PLGA 502.*

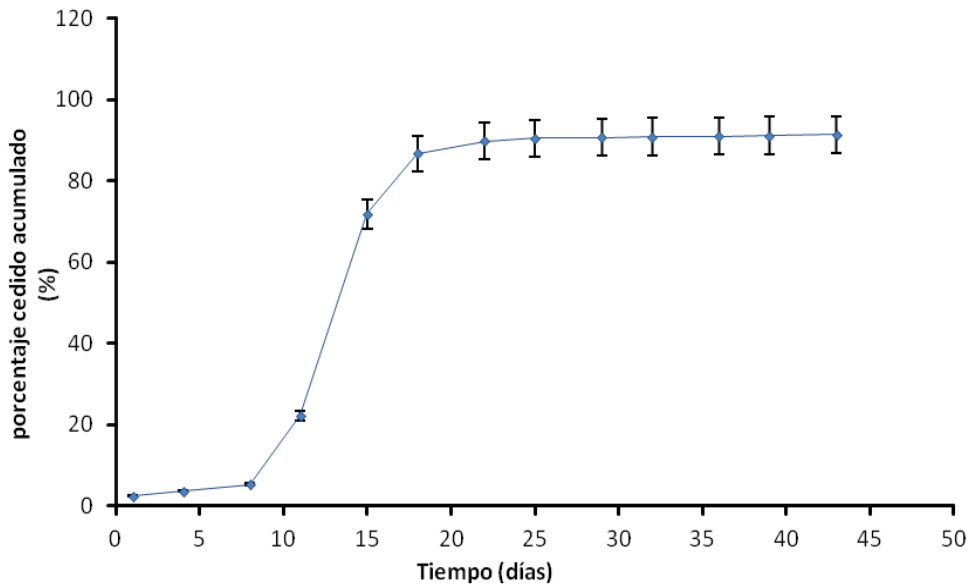


Figura 20. *Porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados en PBS a pH 7,4 con LSS al 1%, a partir de las microesferas preparadas con PLGA 502.*

En este caso se pudo observar un pequeño efecto *burst* (cesión inicial del fármaco a las 24 horas) que resultó ser inferior al 2,6% del contenido en clorhidrato de flunarizina (figura 20). Los perfiles de cesión de clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas manifiestan un comportamiento trifásico. Durante la primera fase (8 primeros días) la velocidad de cesión fue baja, con porcentajes máximos liberados del 5,6%. A partir de ese momento se produce un incremento muy acusado en la cesión, de manera que a los 22 días se ha cedido un porcentaje medio de 89,81%  $\pm$  3,90%. Desde el día 22 hasta el final del ensayo (43 días), la liberación del fármaco remanente fue muy lenta; por este motivo nos planteamos utilizar un polímero más hidrófilo, tal como el PLGA 502H, en la preparación de las microesferas de clorhidrato de flunarizina.

#### 4. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA CON POLÍMERO PLGA 502H.

El método de preparación y caracterización de las microesferas de clorhidrato de flunarizina con polímero PLGA 502H es similar al descrito anteriormente para el PLGA 502 (apartados 3.1 y 3.2 de este capítulo).

##### 4.1 Rendimientos del proceso y de encapsulación.

En la tabla 16 se muestran los resultados individuales y medios del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación obtenidos para los dos lotes de microesferas de clorhidrato de flunarizina preparado con polímero PLGA 502H.

	Lote 1	Lote 2	Media	(±D.E.)
<b>Rendimiento del proceso (%)</b>	65,74	61,65	63,70	2,89
<b>Eficacia de encapsulación (%)</b>	86,05	88,85	87,45	1,98

Tabla 16. *Resultados medios del rendimiento del proceso y de eficacia de encapsulación, obtenidos en la preparación de microesferas de clorhidrato de flunarizina con PLGA 502H.*

Se puede observar que el rendimiento medio del proceso es del 63,70% ± 2,89% y la eficacia de encapsulación media es del 87,45% ± 1,98%, valores superiores a los obtenidos en la preparación de microesferas de clorhidrato de flunarizina con polímero PLGA 502.

## 4.2 Ensayos de cesión

Las condiciones experimentales de los ensayos de cesión de las microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con PLGA 502H son similares a los descritos anteriormente (apartado 3.3 de este capítulo). Se han realizado ensayos de cesión de dos lotes de microesferas de clorhidrato de flunarizina, y los resultados se encuentran recogidos en la tabla 17. Se ha realizado también la representación gráfica de los perfiles de cesión medios de clorhidrato de flunarizina, que se muestra en la figura 21.

Tiempo (días)	Cantidad cedida acumulada lote 1 (µg)	Cantidad cedida acumulada lote 2 (µg)	Porcentaje cedido acumulado lote 1 (%)	Porcentaje cedido acumulado lote 2 (%)	Porcentaje cedido acumulado medio (%)	(±D.E.)
1	95,10	93,75	6,46	5,96	6,21	0,35
2	200,70	191,85	13,62	12,62	13,12	0,71
4	413,40	398,55	28,06	26,65	27,35	1,00
7	705,45	706,80	47,89	47,57	47,73	0,22
9	995,70	979,05	67,59	66,05	66,82	1,09
11	1305,30	1280,25	88,61	86,50	87,55	1,49
14	1494,90	1475,25	101,48	99,73	100,61	1,23
16	1536,30	1524,30	104,29	103,06	103,68	0,86
18	1543,35	1532,40	104,74	103,61	104,18	0,80
21	1545,75	1535,25	104,91	103,81	104,36	0,78
24	1546,65	15360	104,97	103,85	104,41	0,79

Tabla 17. *Cantidades y porcentajes cedidos acumulados (± D.E.) de clorhidrato de flunarizina en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato PBS a pH 7,4 con LSS al 1% a partir de microesferas preparadas con PLGA 502H.*

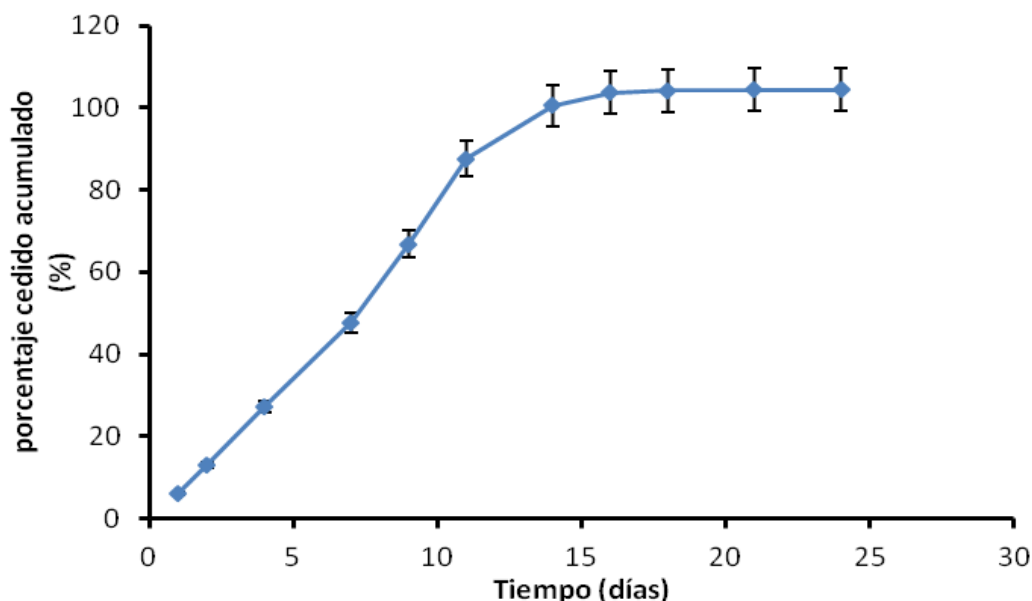


Figura 21. *Porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados en PBS a pH 7,4 con LSS al 1%, a partir de los dos lotes de microesferas preparadas con PLGA 502H.*

En este caso también se observó un efecto burst con una cesión de aproximadamente un 5% del contenido en clorhidrato de flunarizina durante las primeras 24 horas. A partir de ese momento se produce un incremento muy acusado en la cesión, de manera que a los 14 días se ha cedido el 100% del principio activo. Este incremento rápido tal y como se puede observar en la figura 5, puede ser debido a que el polímero es muy hidrófilo.

Comparando los resultados que hemos obtenido en los ensayos de cesión de clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas preparadas con los dos polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H), se pueden observar diferencias significativas en ambos perfiles (figura 22). La obtención de una cinética tan rápida de cesión del principio activo, como ocurre con las microesferas preparadas con PLGA 502H, supondría la administración de microesferas a intervalos de tiempos demasiados cortos. Por ello, nos planteamos elaborar microesferas con mezcla de ambos, PLGA 502 y 502H.

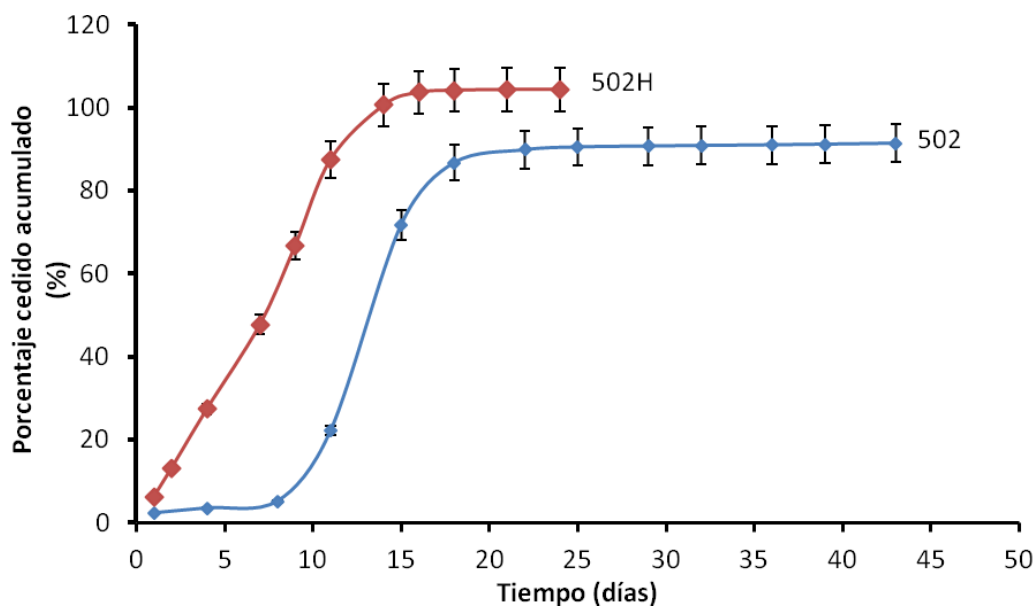


Figura 22. Comparación de los porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados en PBS a pH 7,4 con LSS al 1%, a partir de los lotes de microesferas preparadas con PLGA 502 y 502H.

## 5. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA CON UNA MEZCLA DE PLGA 502 Y 502H.

En una primera etapa se prepararon microesferas utilizando una mezcla de ambos polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H) (50:50, p/p). El método de preparación de las microesferas es similar al descrito anteriormente para el PLGA 502 (apartado 3.1 de este capítulo).

### 5.1. Rendimientos del proceso y de encapsulación.

En la tabla 18 se muestran los resultados individuales y medios del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación obtenidos en los dos lotes de microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con la mezcla de PLGA 502 y PLGA 502H (50:50, p/p).

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Media</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>Rendimiento del proceso (%)</b>	61,01	57,31	59,16	2,62
<b>Eficacia de encapsulación (%)</b>	80,85	79,76	80,305	0,77

Tabla 18. *Resultados medios del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación obtenidos en la preparación de microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con mezcla de PLGA 502 y PLGA 502H (50:50, p/p).*

## **5.2. Ensayos de cesión**

Las condiciones experimentales de los ensayos de cesión de las microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con una mezcla de PLGA 502 y 502H son similares a los descritos anteriormente (apartado 3.3 de este capítulo). En la tabla 19 se muestran la media y desviación estándar de los resultados obtenidos para los dos lotes de microesferas. Se ha realizado también la representación de los perfiles de cesión medios de flunarizina, que se encuentra en la figura 23.

Tiempo (días)	Cantidad cedida acumulada lote 1 ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad cedida acumulada lote 2 ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje cedido acumulado lote 1 (%)	Porcentaje cedido acumulado lote 2 (%)	Porcentaje cedido acumulado medio (%)	( $\pm$ D.E.)
1	99,60	95,85	6,89	6,63	6,76	0,18
2	116,40	111,15	8,06	7,69	7,87	0,26
5	255,15	246,30	17,66	17,05	17,35	0,43
7	489,75	448,20	33,90	32,02	32,96	1,33
9	816,00	766,80	50,79	53,07	51,93	1,62
12	1089,00	1021,80	75,37	72,72	74,05	1,87
14	1332,75	1259,55	92,25	87,18	89,71	3,58
16	1474,50	1398,30	102,06	96,78	99,42	3,73
19	1497,90	1426,80	103,68	98,75	101,22	3,48
21	1501,20	1433,70	103,90	99,23	101,57	3,30
24	1501,35	1433,70	103,91	99,23	101,57	3,31
28	1501,35	1433,70	103,91	99,23	101,57	3,31

Tabla 19. *Cantidades y porcentajes cedidos acumulados ( $\pm$  D.E.) de clorhidrato de flunarizina en los ensayos de cesión realizados en tampón fosfato PBS a pH 7,4 con LSS al 1% a partir de microesferas preparadas con mezcla de PLGA 502 y PLGA 502H (50:50, p/p).*

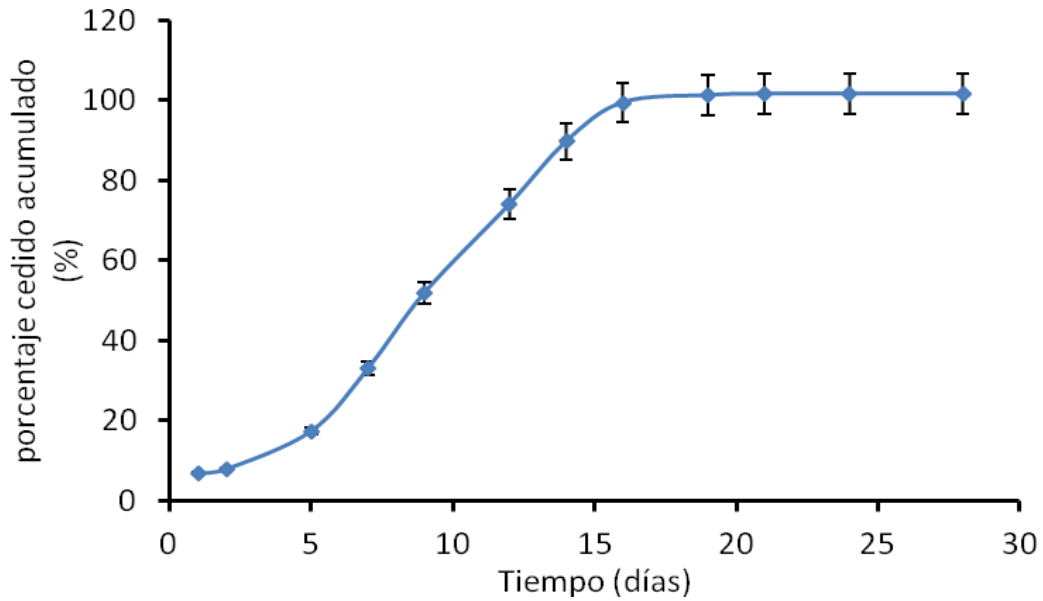


Figura 23. *Porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados en PBS a pH 7,4 con LSS al 1%, a partir de los lotes de microesferas preparadas con mezcla de PLGA 502 y 502H(50:50, p/p).*

En este caso también se observó un efecto burst o cesión inferior al 7% del contenido en clorhidrato de flunarizina durante las primeras 24 horas. A partir de ese momento se produce una liberación acusada del principio activo, de manera que aproximadamente a los 18 días se ha cedido el 100%, tal y como se puede observar en la figura 23.

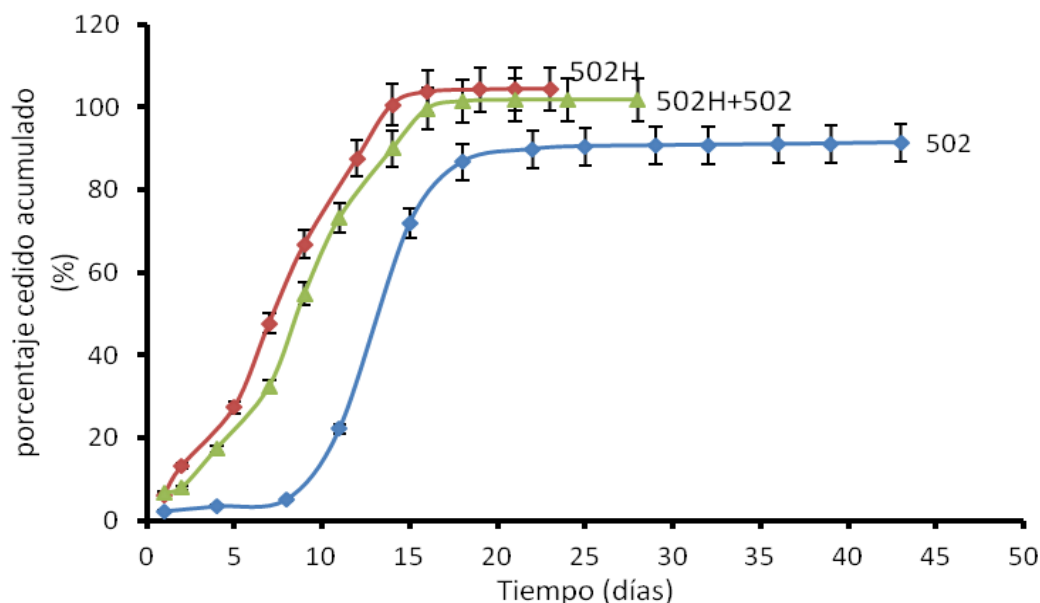


Figura 24. Comparación de porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados en PBS a pH 7,4 con LSS al 1%, a partir de los lotes de microesferas preparadas con PLGA 502 y 502H y su mezcla (50:50, p/p).

Comparando los resultados que hemos obtenido en los ensayos de cesión de clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas preparadas con la mezcla de polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H), y con cada uno de ellos, por separado, se pueden observar resultados interesantes en los perfiles de cesión (figura 23), lo que nos llevó a desarrollar microesferas con distintas proporciones de polímeros.

## 6. PREPARACION Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA CON DISTINTAS PROPORCIONES DE PRINCIPIO ACTIVO Y DE POLÍMERO.

Todas las formulaciones de microesferas elaboradas se prepararon mediante el procedimiento descrito anteriormente (apartados 3.1 y 3.2 de este capítulo). Se elaboraron microesferas con distintas proporciones de polímeros con la

finalidad de lograr una liberación del principio activo lo más constante y duradera posible.

Las proporciones iniciales de principio activo y polímero fueron de:

- 100% 502H + 40 mg clorhidrato de flunarizina
- 50% 502H : 50% 502 + 40 mg clorhidrato de flunarizina
- 25% 502H : 75% 502 + 40 mg clorhidrato de flunarizina
- 10% 502H : 90% 502 + 40 mg clorhidrato de flunarizina
- 100% 502 + 40 mg clorhidrato de flunarizina

### 6.1. Rendimientos del proceso y de encapsulación

En la tabla 20 se muestran los resultados medios del rendimiento del proceso y de la eficacia de encapsulación, de cada uno de las formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina.

Formulación	Rendimiento del proceso (%) (media $\pm$ DE; n=3)	Eficacia de encapsulación (%) (media $\pm$ DE; n=3)
100% 502H	60,66 $\pm$ 1,53	86,62 $\pm$ 2,20
50%502H:50%502	63,33 $\pm$ 1,53	87,58 $\pm$ 1,76
25%502H:75%502	64,66 $\pm$ 2,08	84,30 $\pm$ 2,64
10%502H:90%502	67,33 $\pm$ 0,58	86,52 $\pm$ 3,70
100%502	62,33 $\pm$ 2,08	83,65 $\pm$ 2,56

Tabla 20. *Resultados medios del rendimiento del proceso y de eficacia de encapsulación de las formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con distintas proporciones de polímeros (PLGA 502 y/o 502H).*

En todas las formulaciones, el rendimiento del proceso fue superior al 60%, y la eficacia de encapsulación superior al 83%, valores muy similares a los obtenidos con las anteriores formulaciones. Como se puede observar, la proporción del polímero no afecta el proceso de elaboración ni a la eficacia de encapsulación.

## **6.2. Ensayos de cesión**

Las condiciones experimentales de los ensayos de cesión de todas las formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina son similares a los descritos anteriormente (partado 3.3 de este capítulo). En la tabla 21 se muestran la media y desviación estándar de los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones de microesferas. En todos los casos se ha realizado la representación gráfica de los perfiles de cesión medios de clorhidrato de flunarizina obtenidos en estos ensayos, que se recoge en la figura 25.

<b>Formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina (porcentaje cedido acumulado, media <math>\pm</math> DE; n=3)</b>					
<b>Tiempo (días)</b>	<b>502H (100%)</b>	<b>502H:502 (50%:50%)</b>	<b>502H:502 (25%:75%)</b>	<b>502H:502 (10%:90%)</b>	<b>502 (100%)</b>
1	6,54 $\pm$ 0,07	6,76 $\pm$ 0,18	4,16 $\pm$ 0,05	2,75 $\pm$ 0,05	1,46 $\pm$ 0,10
2	8,14 $\pm$ 0,10	7,87 $\pm$ 0,26	4,64 $\pm$ 0,04	2,88 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,11
4	21,63 $\pm$ 0,19	17,35 $\pm$ 0,43	7,81 $\pm$ 0,02	3,44 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,11
7	40,03 $\pm$ 1,69	32,46 $\pm$ 2,03	18,30 $\pm$ 0,08	4,31 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,08
9	61,07 $\pm$ 0,37	54,78 $\pm$ 2,41	30,38 $\pm$ 0,05	11,75 $\pm$ 1,92	2,54 $\pm$ 0,05
11	79,12 $\pm$ 2,25	73,26 $\pm$ 3,58	44,87 $\pm$ 0,26	26,48 $\pm$ 1,92	11,08 $\pm$ 0,85
14	97,07 $\pm$ 0,08	90,96 $\pm$ 3,88	64,15 $\pm$ 2,19	65,67 $\pm$ 3,39	56,72 $\pm$ 2,58
16	102,30 $\pm$ 0,54	100,67 $\pm$ 4,02	80,14 $\pm$ 0,68	87,85 $\pm$ 3,51	76,35 $\pm$ 3,97
18	103,35 $\pm$ 0,65	102,46 $\pm$ 3,77	91,14 $\pm$ 0,14	93,25 $\pm$ 3,11	82,29 $\pm$ 3,76
21	103,58 $\pm$ 0,60	102,81 $\pm$ 3,60	99,25 $\pm$ 0,68	94,52 $\pm$ 2,75	83,19 $\pm$ 3,70
24	103,61 $\pm$ 0,58	102,81 $\pm$ 3,60	101,53 $\pm$ 1,29	94,63 $\pm$ 2,70	83,24 $\pm$ 3,65
28	103,61 $\pm$ 0,58	102,82 $\pm$ 3,60	102,35 $\pm$ 1,20	95,38 $\pm$ 2,69	83,25 $\pm$ 3,66

Tabla 21. *Resultados medios de los ensayos de cesión de las formulaciones de microesferas de clorhidrato de flunarizina preparadas con distintas proporciones de polímero.*

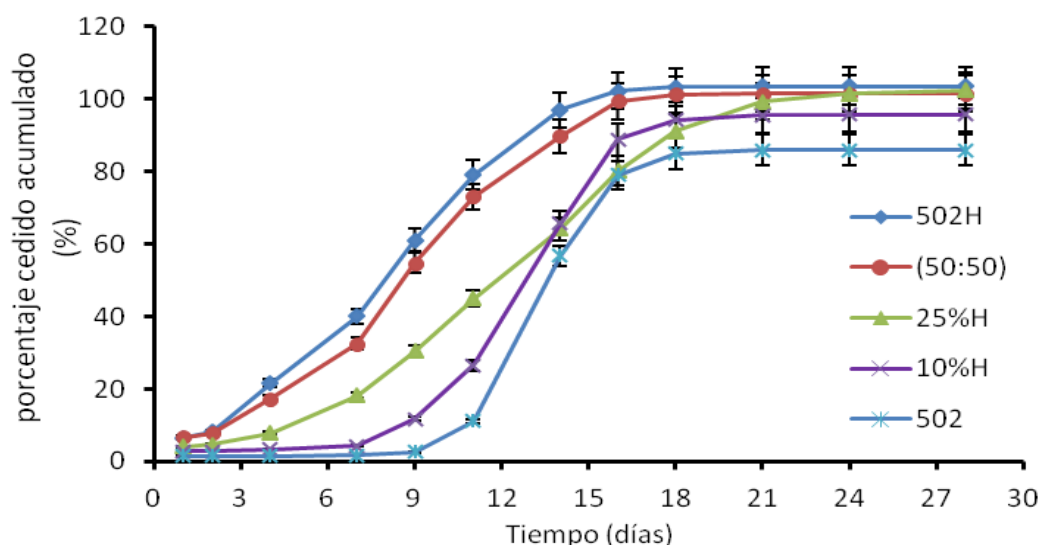


Figura 25. *Porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) en los ensayos realizados con las distintas proporciones de polímeros.*

En todas las formulaciones se observó un pequeño efecto burst que fue inferior al 7% del contenido en clorhidrato de flunarizina cedido durante las primeras 24 horas, tal y como se puede observar en la tabla 21 y en la figura 25. Cabe destacar que a mayor proporción de polímero 502H la cesión es mucho más rápida, con una liberación del 100% a los 16 días. En cambio, con el polímero 502 sólo llega a liberarse el 83% del contenido del principio activo tras 30 días de cesión. Sin embargo al realizar la mezcla de los dos polímeros, se observaron resultados interesantes con las proporciones (25%502H - 75%502), alcanzando una liberación del principio activo del 100% a los 24 días.

Por último, hemos completado estos estudios previos con análisis de difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

## 7. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X

Para realizar los análisis de difracción de rayos X (DRX) se ha utilizado un difractómetro de polvo Philips® XPert, de geometría de Bragg-Bretano, con monocromador de grafito y detector de centelleo, usando radiación Cu Ka (1,54052) y filtro de níquel. Las muestras correspondientes se colocaron sobre un portamuestras, utilizando la técnica de ángulo de incidencia superficial (<<detector scan>>), con una configuración de intervalo de  $2\theta$ . Los difractogramas han sido registrados entre  $5^\circ$  y  $50^\circ$ , usando tamaño de paso de  $0,04^\circ$  y un tiempo de paso de 1 segundo. Los difractogramas obtenidos nos permiten evaluar la cristalinidad de los componentes de nuestras muestras.

Mediante este procedimiento se han analizado muestras de PLGA 502, PLGA 502H, clorhidrato de flunarizina, microesferas blanco preparadas con ambos polímeros y, microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina preparadas con ambos polímeros. En las figuras 26, 27 y 28 se muestran los difractogramas obtenidos.

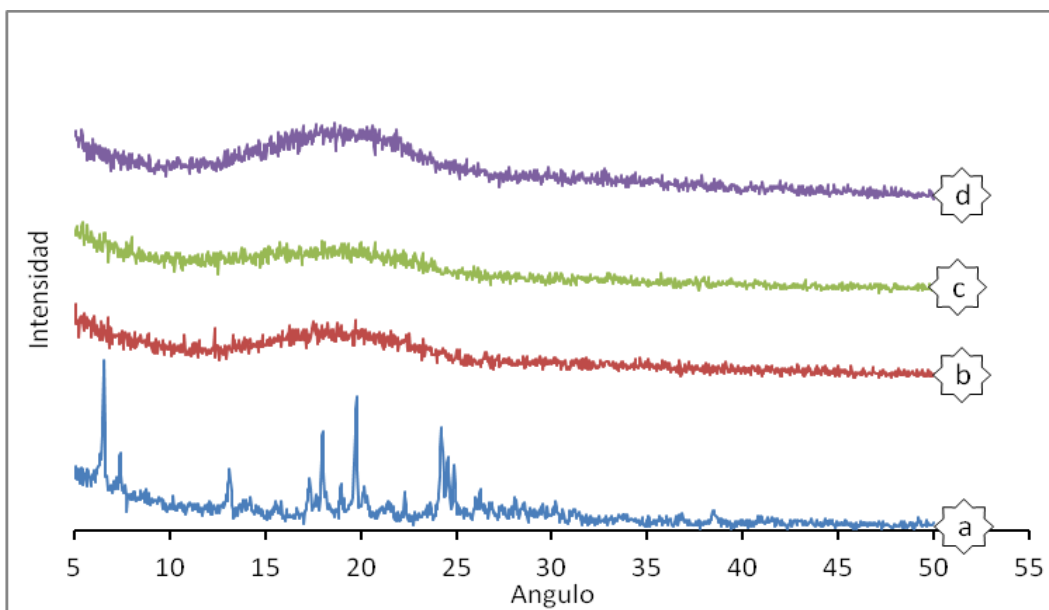


Figura 26. Diffractogramas de rayos X obtenidos para el clorhidrato de flunarizina (a), polímero PLGA 502 (b), microesferas blanco preparadas con PLGA 502 (c) y microesferas de PLGA 502 cargadas con clorhidrato de flunarizina (d).

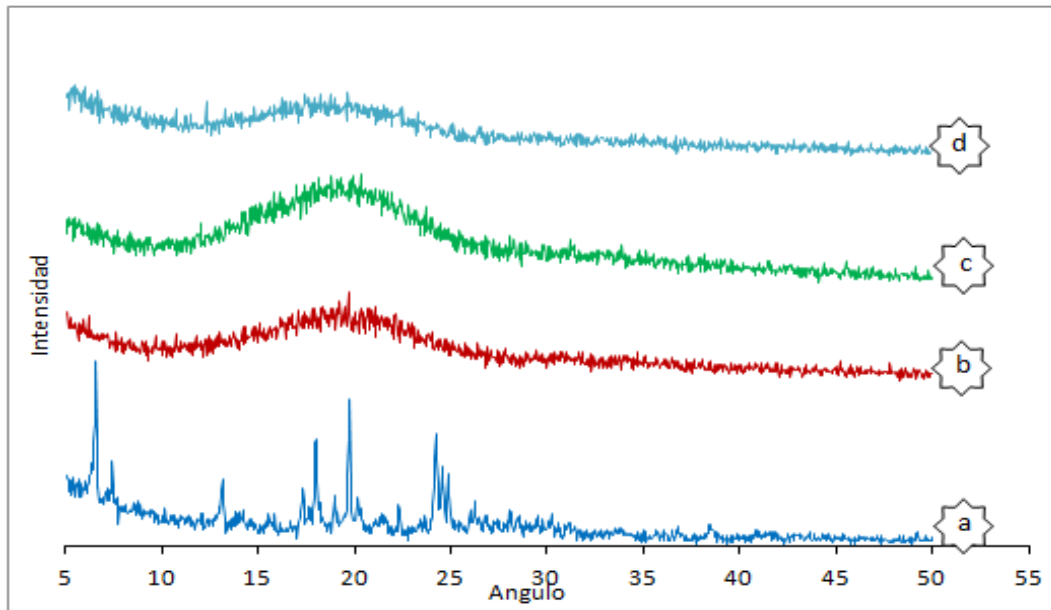


Figura 27. Difractogramas de rayos X obtenidos para el clorhidrato de flunarizina (a), polímero PLGA 502H (b), microesferas blanco preparadas con PLGA 502H (c) y microesferas de PLGA 502H cargadas con clorhidrato de flunarizina (d).

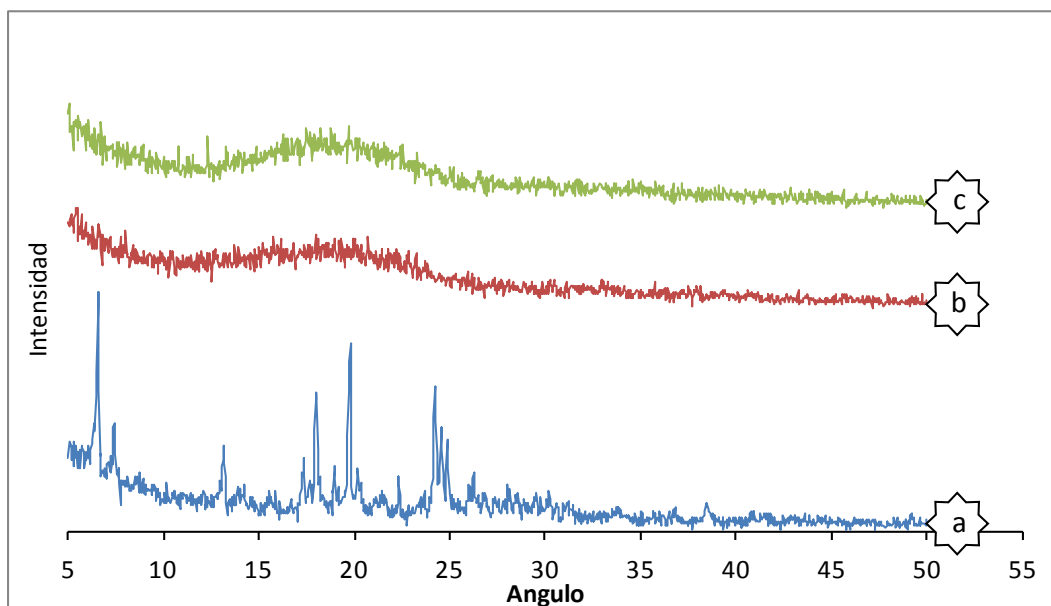


Figura 28. Difractogramas de rayos X obtenidos para el clorhidrato de flunarizina (a), microesferas blanco preparadas con PLGA 502:502H (b) y microesferas preparadas con PLGA 502:502H, (75%:25%) cargadas con clorhidrato de flunarizina (c).

El análisis de difracción de rayos X del clorhidrato de flunarizina dio lugar a un difractograma con los máximos de difracción más intensos a  $6,54^\circ$ ;  $6,58^\circ$ ;  $7,42^\circ$ ;  $13,18^\circ$ ;  $17,98^\circ$ ;  $18,02^\circ$ ;  $19,78^\circ$  y  $24,22^\circ$  (figuras 26, 27 y 28), característicos de dicho compuesto. Por el contrario en los difractogramas obtenidos para ambos polímeros no se aprecian máximos debido a su estado amorfo. La técnica de microencapsulación no modifica las características de los polímeros, como se puede observar en los difractogramas obtenidos para las microesferas blanco. Los perfiles correspondientes a las microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina no presentan los máximos correspondientes al principio activo superpuestos al trazado correspondiente a los polímeros empleados, lo que nos indicaría que el clorhidrato de flunarizina se encuentra al menos parcialmente disuelto en la matriz polimérica.

## **8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

Esta técnica permite evaluar la superficie, morfología y tamaño de todas las formulaciones de microesferas. Para ello se utiliza un microscopio Joel-SM-600 (Japón). Previamente es necesario preparar las muestras de la siguiente manera: en primer lugar, se deposita una pequeña cantidad de microesferas sobre una cinta adhesiva de grafito en un soporte de aluminio, luego se someten a un recubrimiento con oro de aproximadamente 15 nm (Emitech K550X, Emitech Ltd., Reino Unido) durante 4 minutos. Una vez preparadas las muestras, se introducen en el microscopio electrónico de barrido, se observan diferentes campos a distintos aumentos y se toman las fotografías.

Mediante este procedimiento se han analizado muestras de microesferas blanco y microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina, y preparadas en ambos casos, con los polímeros (PLGA 502 y PLGA 502H), (figuras 29, 30 y 31).

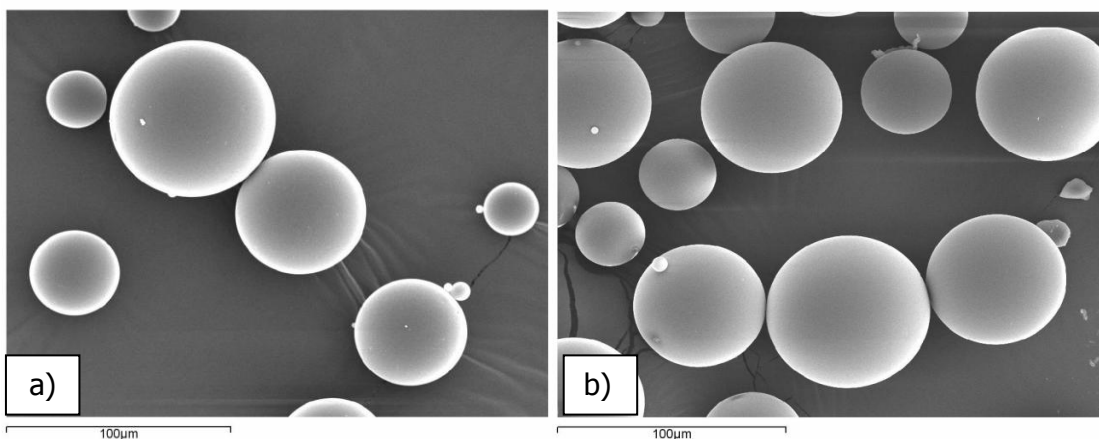


Figura 29. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas blanco preparadas con PLGA 502 (a), y microesferas blanco preparadas con PLGA 502H (b).

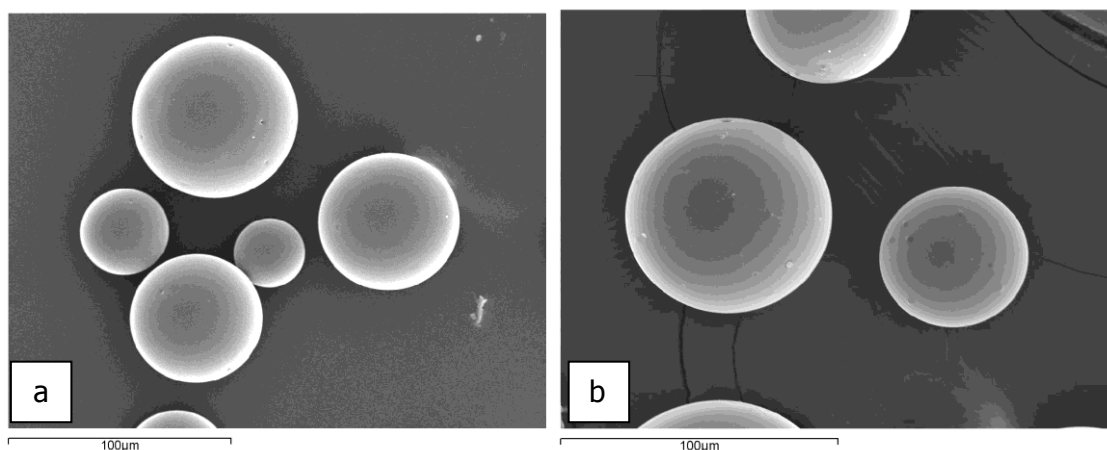


Figura 30. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina y preparadas con PLGA 502 (a), y microesferas preparadas con PLGA 502H (b).

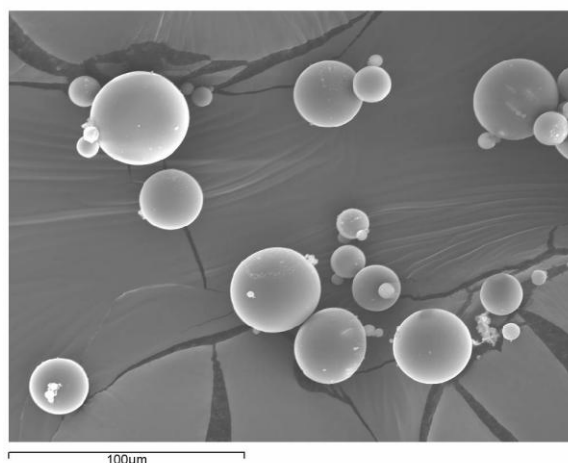


Figura 31. *Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina y preparadas con mezcla de PLGA 502:502H (75%:25%).*

Como se puede observar, en todos los casos las microesferas son esféricas y con superficies lisas, con independencia del polímero utilizado en la preparación de las mismas y de que estén o no cargadas de principio activo.

El tamaño de partícula es una característica importante de las microesferas, ya que influye en las propiedades biofarmacéuticas de las mismas. En todos los casos, el tamaño medio de las microesferas obtenidas con los dos polímeros fue inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, cuando se preparan con distintas proporciones de polímeros (502H-502), éstas son ligeramente más pequeñas, inferiores a 60  $\mu\text{m}$  (figura 31).

**BIBLIOGRAFÍA**

**Chulia D., Deleuil M., Pourcelot Y.** Powder Technology and Pharmaceutical Processes. Elsevier, Amsterdam; 1994.

**Edlund U., Albertsson A.C.** Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery., Adv. Polym. Sci., 157: 67-112; 2002.

**Freiberg S., Zhu X-X.** Polymer microspheres for controlled drug release., Int J. Pharm., 258: 1-18; 2004.

**Freitas S., Merkle H.P., Gander B.** Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology., J. Control. Release., 102: 313-332; 2005.

**Jalil R., Nixon J.R.** Microencapsulation using poly (DL lactic acid) III: effect of polymer molecular weight on the release kinetics., J. Microencapsul., 7: 357-374; 1990.

**Gilding D.K., Reed A.M.** Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly (lactic acid) homo- and copolymers: 1. Polymer., 20: 1459-1464; 1979.

**Park T.G.** Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight., J. Control. Release., 30: 161-173; 1994.

**Sansdrap P., Moes A.J.** In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres., J. Control. Release., 43: 47-58; 1997.

**Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A.** Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview., Int. J. Pharm., 278: 1-23; 2004.

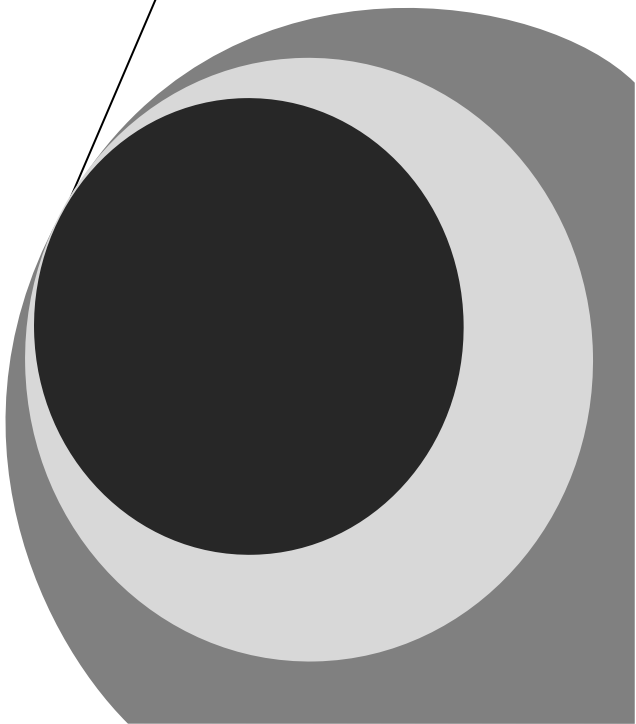
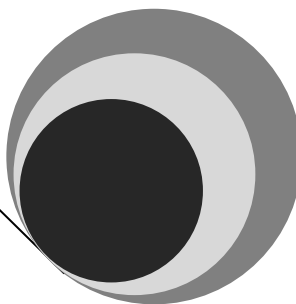
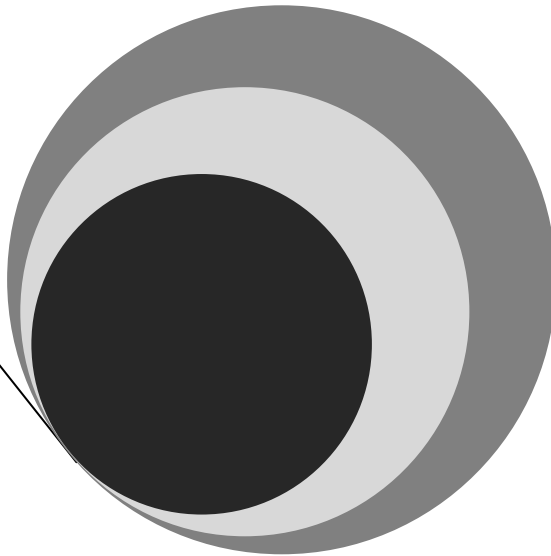
**Tamber H., Johansen P., Merkle H.P., Gander B.** Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 357-376; 2005.

**Vert M., Mauduit J., Li S.** Biodegradation of PLA/PGA polymers: increasing complexity., *Biomaterials.*, 15: 1209-1213; 1994.

**Watts P.J., Davies M.C., Melina C.D.** Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 7: 235-259; 1990.

**Witschi C., Doelker E.** Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing., *J. Control. Release*, 51: 327-341; 1998.

**VIII. DISEÑO  
EXPERIMENTAL**





## DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1. INTRODUCCIÓN

El diseño experimental tiene sus orígenes en los trabajos de Ronald Fisher (1890-1962) desarrollados en la Estación Agrícola Experimental de Rothamsted, en el Reino Unido, donde introdujo el concepto de aleatorización y el análisis de varianza. A lo largo de varias décadas, la teoría del diseño de experimentos y sus aplicaciones se consolidaron y expandieron y, en años recientes, recibieron un fuerte impulso por las contribuciones de Gen'ichi Taguchi, estadístico Japonés ampliamente conocido en Occidente (*Taguchi y col., 1989*).

El diseño experimental estudia procesos. Puede considerarse a un proceso como una caja negra en la que ingresan diversas variables que interactúan para producir un resultado. Las variables que ingresan al proceso se denominan variables de entrada y el resultado, variable de salida. El nivel de las variables de salida depende de los niveles que adopten las variables de entrada, y los gerentes y técnicos se benefician al saber qué combinación de variables de entrada produce la variable de salida óptima.

La busca de combinaciones óptimas de las variables de entrada da lugar al diseño experimental, que es una prueba o un conjunto de pruebas, durante la cual se realizan cambios sistemáticos y controlados a las variables de entrada para medir el efecto sobre la variable de salida. El diseño experimental utiliza técnicas como la regresión múltiple, la respuesta superficial y varias extensiones de análisis de varianza (*www.cema.edu.ar*).

Una vez realizados los ensayos previos descritos en el capítulo anterior, se procede al planteamiento de un diseño experimental, con el fin de seleccionar la formulación que presente las mejores características de liberación del

principio activo, de acuerdo a los objetivos planteados. El diseño experimental utilizado en este estudio ha sido un diseño central compuesto rotacional con dos variables. Las variables seleccionadas han sido:

- ✓ Cantidad de clorhidrato de flunarizina utilizada en la preparación de las microesferas (mg).
- ✓ Relación entre los porcentajes de polímeros (PLGA 50:50 Resomer® 502/502H) (%/%).

A cada variable se le asignaron cinco niveles de variación. En la tabla 22 se recogen los niveles codificados y reales de las variables utilizadas en el diseño experimental.

La cantidad de clorhidrato de flunarizina ensayada varió entre 40 y 280 mg y las proporciones de los polímeros, entre 25% 502H/75%502 y 100%502H. En todos los casos la cantidad total de los polímeros fue de 400 mg y la velocidad de agitación se mantuvo constante a 3000 rpm.

<b>Niveles de variación</b>	<b>Clorhidrato de flunarizina (mg)</b>	<b>Relación de porcentajes de polímeros (502H/502)</b>
-1,414	40	25% 502H / 75% 502
-1	75	37% 502H / 63% 502
0	160	63% 502H / 37% 502
1	245	89% 502H / 11% 502
1,414	280	100% 502H

Tabla 22. *Niveles codificados y reales de las variables incluidas en el diseño.*

En la preparación de las distintas formulaciones del diseño, se siguió el método descrito anteriormente en el capítulo de Ensayos Previos (apartado 3.1), adaptado a las condiciones del diseño experimental. Cada formulación se preparó por duplicado (tabla 23).

Para evaluar la apariencia, morfología y tamaño de las microesferas de las diferentes formulaciones del diseño, hemos usado la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) descrita en el capítulo de Ensayos Previos (apartado 8). Además, las distintas formulaciones fueron también analizadas por difracción de rayos X.

La determinación del rendimiento del proceso y la eficacia de encapsulación de las diferentes formulaciones del diseño se realizó de acuerdo a los métodos descritos en el capítulo correspondiente a Ensayos Previos (apartado 3.2) de la presente memoria.

Finalmente, las distintas formulaciones elaboradas fueron sometidas a un ensayo de cesión, de acuerdo al protocolo indicado en el apartado de Ensayos Previos (apartado 3.3) de esta memoria.

De acuerdo a lo anteriormente indicado, las respuestas estudiadas a partir del diseño experimental fueron las siguientes:

- 1) Rendimiento del proceso de microencapsulación (%) ( $Y_1$ ).
- 2) Eficacia de encapsulación (%) ( $Y_2$ ).
- 3) Constante de velocidad de liberación de orden cero (0) ( $\mu\text{g}$  de clorhidrato de flunarizina/10 mg de microesferas/día) ( $Y_3$ ).
- 4) Duración de la cinética de liberación de orden 0 (días) ( $Y_4$ ).

## 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó buscando la función de conveniencia. Durante la optimización de un proceso multivariable, las respuestas son combinadas para obtener una formulación con las características deseadas, y para ello se ha utilizado el software Statgraphics Plus 4.0<sup>®</sup>.

## 3. RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

El análisis morfológico realizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) revela que las formulaciones del diseño experimental presentan una forma y superficie similares de apariencia esférica, superficie no rugosa y rígida, sin presentar deformaciones, no apareciendo en ningún caso partículas rotas, como se puede observar en la figura 32.

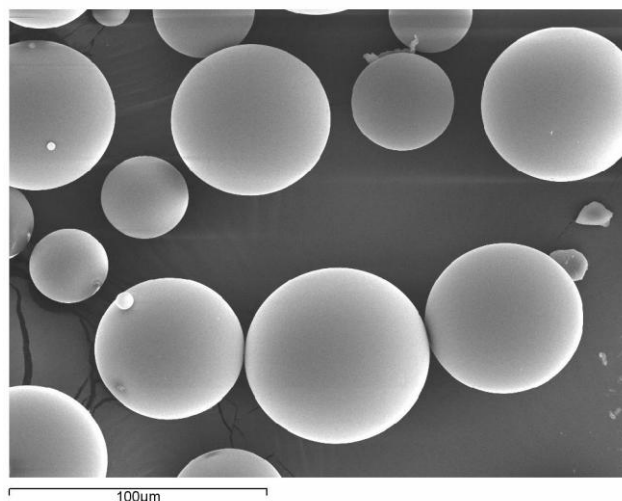


Figura 32. *Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina (formulación 9).*

Otra propiedad importante de las microesferas destinadas a administración parenteral, es el tamaño de las partículas, que en todos los casos son inferiores a 100  $\mu\text{m}$ , lo que significa que no influye la cantidad de principio activo, ni las proporciones de polímeros utilizados.

El análisis por difracción de rayos X permitió determinar los máximos característicos del clorhidrato de flunarizina, la confirmación de una estructura amorfa del polímero, y la conservación de estas características del polímero en todas las formulaciones del diseño. También se puede observar que en todas las formulaciones obtenidas en el diseño experimental, los análisis de difracción de rayos X, son muy similares a la del polímero, lo que nos indicaría que la flunarizina incorporada se encuentra al menos parcialmente disuelta en la matriz polimérica, en todas las formulaciones, (figura 33).

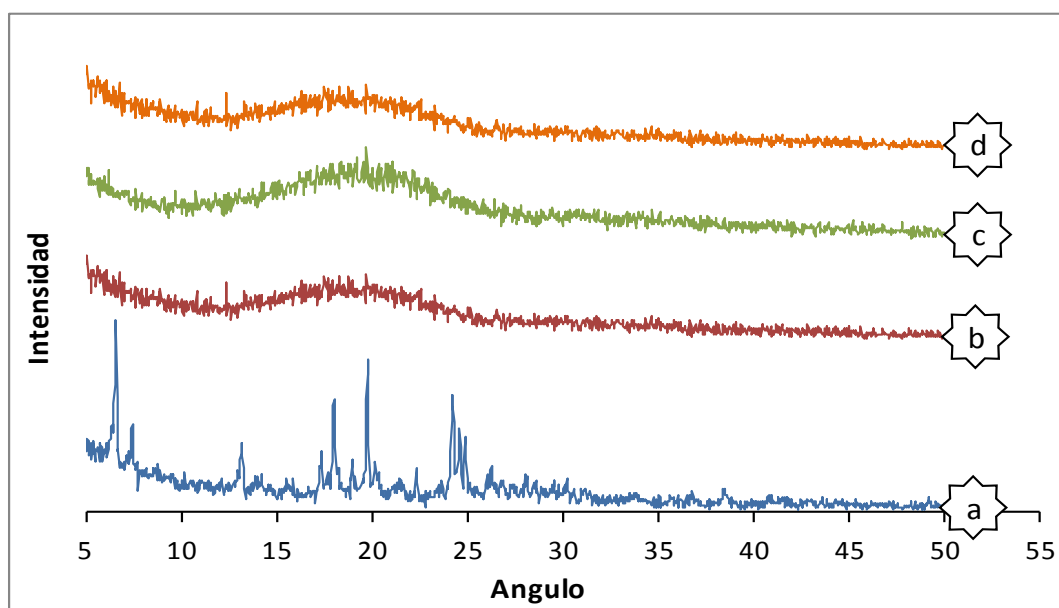


Figura 33. Diffractogramas de rayos X obtenidos para el clorhidrato de flunarizina (a), polímero PLGA 502 (b), polímero PLGA 502H (c) y, microesferas preparadas con PLGA (75%502:25%502H) cargadas con clorhidrato de flunarizina(d).

Una vez comprobadas las propiedades generales de las microesferas, el siguiente paso consistió en evaluar los parámetros seleccionados para la optimización. Como podemos observar en la tabla 23, el rendimiento del proceso de obtención de las microesferas osciló entre el  $75,5\% \pm 2,3\%$  y  $94,1 \pm 0,7\%$ .

FORMULACIÓN	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
1 (1,1)	90,5±3,1	96,9±2,9	303,1	7
2 (0;0)	88,0±1,0	95,4±2,8	203,2	11
3 (0;-1,41)	91,5±1,5	93,1±3,8	52,2	11
4 (-1,41; 0)	78,1±2,0	104,8±3,5	98,7	7
5 (-1,-1)	79,0±2,8	97,8±1,2	120,9	11
6 (0; 1,4)	92,5±0,8	98,1±1,9	177,6	9
7 (-1; 1)	75,5±2,3	95,6±1,7	153,9	9
8 (1,41; 0)	92,5±0,3	96,9±0,4	194,6	10
9 (1;-1)	94,1±0,7	92,2±1,7	178,4	14
10 (0;0)	92,0±1,9	93,7±2,7	192,7	9

Tabla 23. *Valores medios y desviaciones estándar de las respuestas evaluadas en el diseño experimental.*

Los valores de eficacia de encapsulación (EE) de las formulaciones de micropartículas de clorhidrato de flunarizina oscilaron entre  $92,2\% \pm 1,70\%$  y  $104,8\% \pm 3,5\%$  (tabla 23). No existen diferencias significativas en las eficacias de encapsulación de la flunarizana al incrementar el contenido de principio activo (figura 34).

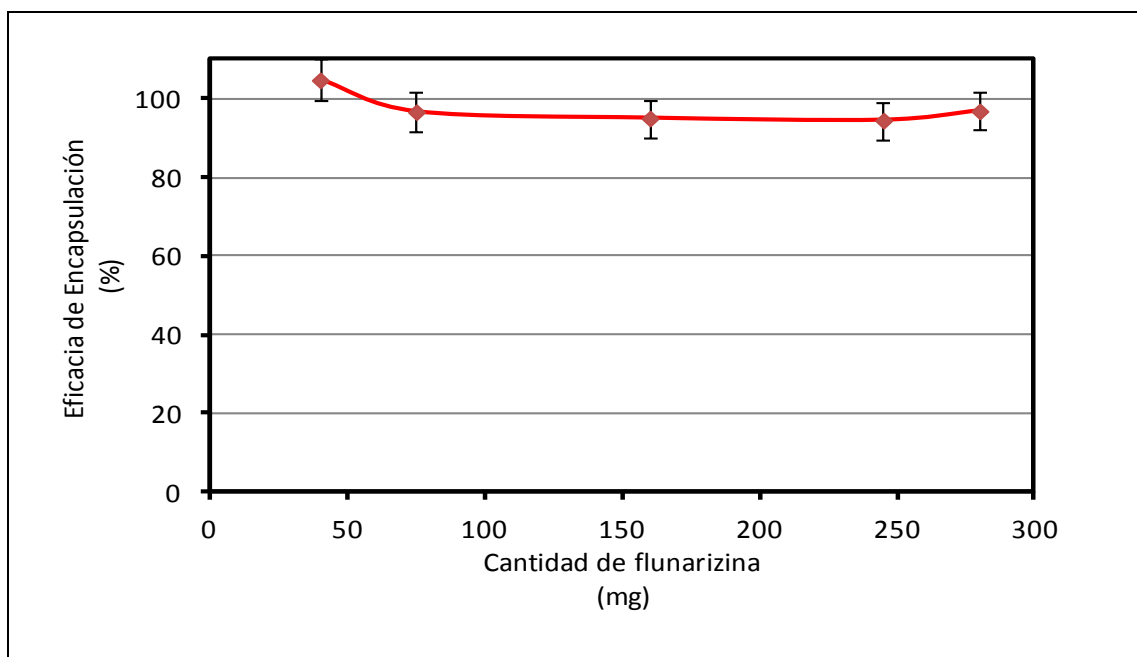


Figura 34. Eficacia de encapsulación del clorhidrato de flunarizina en las formulaciones obtenidas a partir del diseño experimental frente a la cantidad de clorhidrato de flunarizina.

Una vez comprobadas las características generales de las microesferas, el siguiente paso consistió en evaluar el comportamiento de las microesferas de flunarizina como sistemas de liberación controlada, mediante estudios de cesión "in vitro". En el estudio analizaremos como respuestas las cantidades de fármaco cedidas en distintos estadios del ensayo, la velocidad de liberación de orden 0, y el tiempo que dura esta cinética, con el fin de determinar si las formulaciones serían capaces de ceder el fármaco a una velocidad adecuada

como para lograr concentraciones eficaces durante tiempos prolongados, que permitan su utilización para el tratamiento de la migraña.

En las tablas 24-33, se muestran los resultados individuales obtenidos en los ensayos de cesión para cada formulación del diseño experimental junto con sus desviaciones estándar.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (µg)</b>	<b>(±D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
<b>1</b>	360,29	9,59	10,62	0,29
<b>2</b>	786,29	23,92	23,17	0,71
<b>4</b>	1397,00	42,08	41,17	1,26
<b>7</b>	2144,86	77,47	63,20	2,30
<b>9</b>	2580,71	109,97	76,05	3,27
<b>11</b>	2856,71	99,40	84,18	2,93
<b>14</b>	3200,64	69,35	94,31	1,99
<b>17</b>	3337,07	58,24	98,33	1,67
<b>21</b>	3416,50	66,11	100,67	1,84
<b>24</b>	3435,79	65,44	101,30	1,82
<b>28</b>	3442,21	64,17	101,46	1,79
<b>31</b>	3446,07	63,92	101,56	1,78
<b>35</b>	3448,79	64,04	102,49	1,78

Tabla 24. *Valores medios de cantidades (±D.E.) y porcentajes cedidos (±D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 1.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	217,29	9,71	7,83	0,35
<b>2</b>	488,71	28,58	17,61	1,03
<b>4</b>	1021,00	101,84	36,78	3,67
<b>7</b>	1631,71	127,30	58,79	4,59
<b>9</b>	2012,43	130,00	72,50	4,68
<b>11</b>	2355,29	149,51	84,86	5,39
<b>14</b>	2721,29	97,27	98,04	3,50
<b>17</b>	2783,21	82,47	100,27	2,97
<b>21</b>	2802,14	89,22	100,95	3,21
<b>24</b>	2810,00	83,96	101,24	3,02
<b>28</b>	2817,79	82,75	101,52	2,98

Tabla 25. Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 2.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	106,57	7,73	4,01	0,29
<b>2</b>	152,00	16,29	5,71	0,59
<b>4</b>	230,36	33,44	8,66	1,24
<b>7</b>	285,50	29,65	10,73	1,14
<b>9</b>	385,79	44,63	14,51	1,79
<b>11</b>	660,79	47,61	24,83	1,59
<b>14</b>	2078,64	25,68	78,14	1,25
<b>17</b>	2459,64	37,71	92,45	1,52
<b>21</b>	2638,50	11,55	99,18	1,02
<b>24</b>	2661,93	7,41	100,06	1,00
<b>28</b>	2668,50	6,98	100,31	1,02
<b>31</b>	2674,00	6,49	100,52	1,13

Tabla 26. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 3.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	62,29	3,84	6,76	0,49
<b>2</b>	103,21	8,85	11,21	1,02
<b>4</b>	271,50	12,23	29,48	1,51
<b>7</b>	592,50	30,19	64,32	3,39
<b>9</b>	786,86	36,76	85,42	4,14
<b>11</b>	879,71	40,27	95,49	4,37
<b>14</b>	930,43	38,20	100,99	3,85
<b>17</b>	939,93	37,90	102,02	3,79
<b>21</b>	944,79	37,26	102,55	3,69
<b>24</b>	948,07	37,11	102,91	3,67

Tabla 27. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 4.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	86,89	7,53	5,92	0,35
<b>2</b>	181,82	16,93	12,39	0,78
<b>4</b>	511,60	55,56	34,87	2,80
<b>7</b>	806,46	64,48	54,96	2,97
<b>9</b>	1061,47	76,22	72,34	3,53
<b>11</b>	1274,25	70,69	86,85	3,57
<b>14</b>	1458,42	78,70	99,41	3,96
<b>17</b>	1486,34	76,87	101,31	3,88
<b>21</b>	1493,35	75,66	101,79	3,83
<b>24</b>	1495	75,66	101,93	3,82

Tabla 28. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 5.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (µg)</b>	<b>(±D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
<b>1</b>	380,00	18,78	13,14	0,63
<b>2</b>	878,64	23,75	30,39	0,81
<b>4</b>	1444,64	38,97	49,96	1,33
<b>7</b>	1943,57	27,70	67,22	0,84
<b>9</b>	2257,50	36,30	78,07	0,76
<b>11</b>	2479,07	48,85	85,73	1,09
<b>14</b>	2760,21	37,24	95,46	0,74
<b>17</b>	2872,07	33,48	99,33	0,52
<b>21</b>	2918,14	10,80	100,93	0,76
<b>24</b>	2922,86	10,28	101,09	0,82
<b>28</b>	2929,43	7,16	101,32	0,70
<b>31</b>	2934,50	8,13	101,50	0,81

Tabla 29. Valores medios de cantidades (±D.E.) y porcentajes cedidos (±D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 6.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	124,87	12,27	8,70	0,63
<b>2</b>	269,25	12,44	18,76	0,65
<b>4</b>	656,09	36,32	45,72	1,93
<b>7</b>	1027	48,28	71,64	2,63
<b>9</b>	1253,14	54,51	87,34	2,99
<b>11</b>	1390,39	30,34	96,90	1,68
<b>14</b>	1451,62	40,15	101,16	1,96
<b>17</b>	1467,37	54,99	102,26	2,71
<b>21</b>	1471,82	57,05	102,57	2,81
<b>24</b>	1473,90	57,18	102,71	2,82

Tabla 30. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 7.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	314,35	19,35	7,87	0,37
<b>2</b>	666,64	17,20	16,70	0,20
<b>4</b>	1285,07	13,15	32,20	0,19
<b>7</b>	1945,50	77,23	48,74	1,75
<b>9</b>	2386,93	83,69	59,79	1,73
<b>11</b>	2756,35	56,26	69,06	1,35
<b>14</b>	3231,43	71,69	80,96	1,70
<b>17</b>	3689,35	73,42	92,44	2,21
<b>21</b>	3911,50	43,14	98,02	2,45
<b>24</b>	4041,78	65,23	101,29	3,05
<b>28</b>	4061,64	67,98	101,79	3,13
<b>31</b>	4067,85	69,76	101,94	3,18
<b>35</b>	4070,78	70,02	102,02	3,19

Tabla 31. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 8.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	177,00	15,84	5,41	0,44
<b>2</b>	376,43	31,97	11,51	0,90
<b>4</b>	738,14	70,88	22,57	2,06
<b>7</b>	1283,86	108,16	39,25	3,16
<b>9</b>	1705,57	116,95	52,15	3,39
<b>11</b>	2028,71	99,56	62,03	2,74
<b>14</b>	2502,93	104,26	76,55	3,27
<b>17</b>	2779,93	137,97	85,32	4,94
<b>21</b>	3080,79	77,69	94,43	2,93
<b>24</b>	3340,21	39,05	102,15	1,62
<b>28</b>	3361,14	25,20	102,79	0,96
<b>31</b>	3365,17	24,87	102,91	0,92
<b>35</b>	3367,96	24,75	103,00	0,92

Tabla 32. *Valores medios de cantidades ( $\pm$ D.E.) y porcentajes cedidos ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 9.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (µg)</b>	<b>(±D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
<b>1</b>	264,43	7,92	9,92	0,51
<b>2</b>	581,71	18,33	21,82	1,17
<b>4</b>	1165,64	29,56	43,73	2,04
<b>7</b>	1779,21	52,01	66,71	2,26
<b>9</b>	2118,50	47,95	79,43	1,86
<b>11</b>	2420,64	63,49	90,74	1,79
<b>14</b>	2607,64	70,74	97,75	1,53
<b>17</b>	2700,86	78,13	101,23	1,36
<b>21</b>	2725,86	80,56	102,17	1,25
<b>24</b>	2730,71	79,80	102,35	1,24
<b>28</b>	2741,29	87,14	102,74	1,39
<b>31</b>	2744,29	87,07	102,86	1,38

Tabla 33. *Valores medios de cantidades (±D.E.) y porcentajes cedidos (±D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de la formulación 10.*

Los perfiles de cesión del clorhidrato de flunarizina a partir de cada una de las formulaciones del diseño experimental, expresados en cantidad y porcentajes de clorhidrato de flunarizina cedidos, aparecen representados en las figuras 35-54.

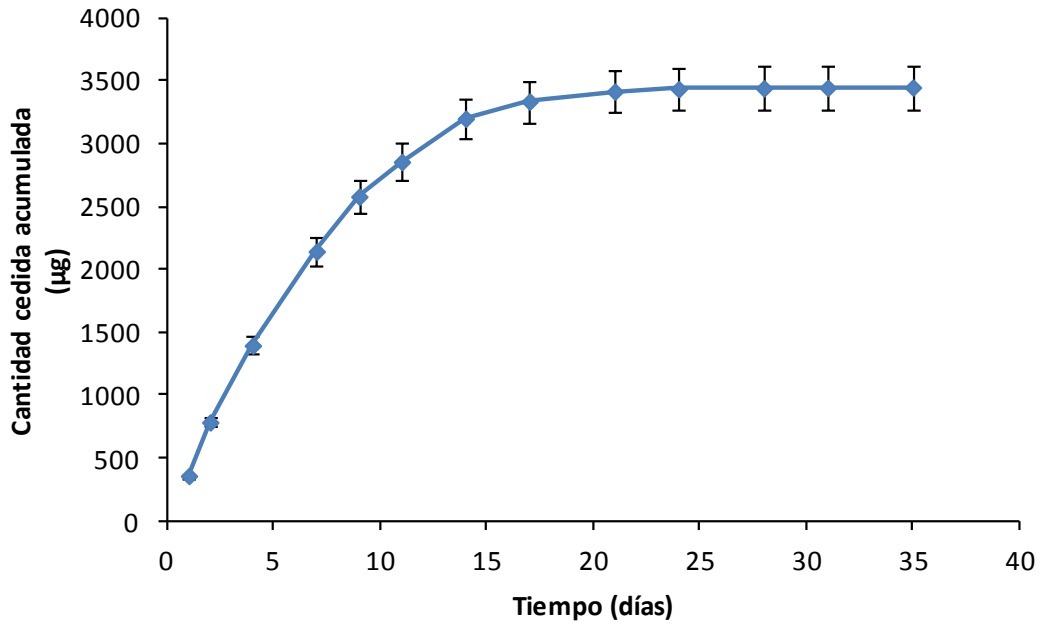


Figura 35. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 1 del diseño experimental.

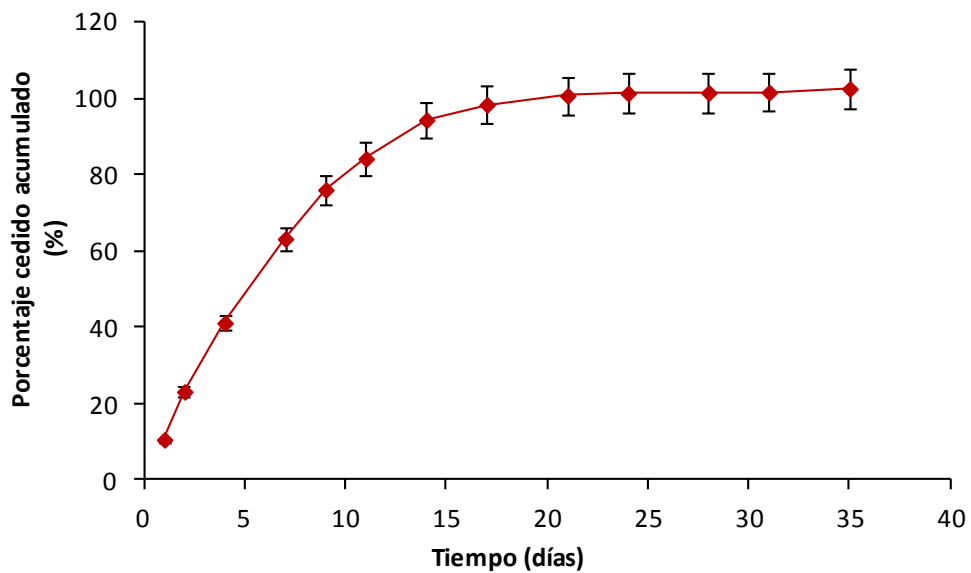


Figura 36. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 1 del diseño experimental.

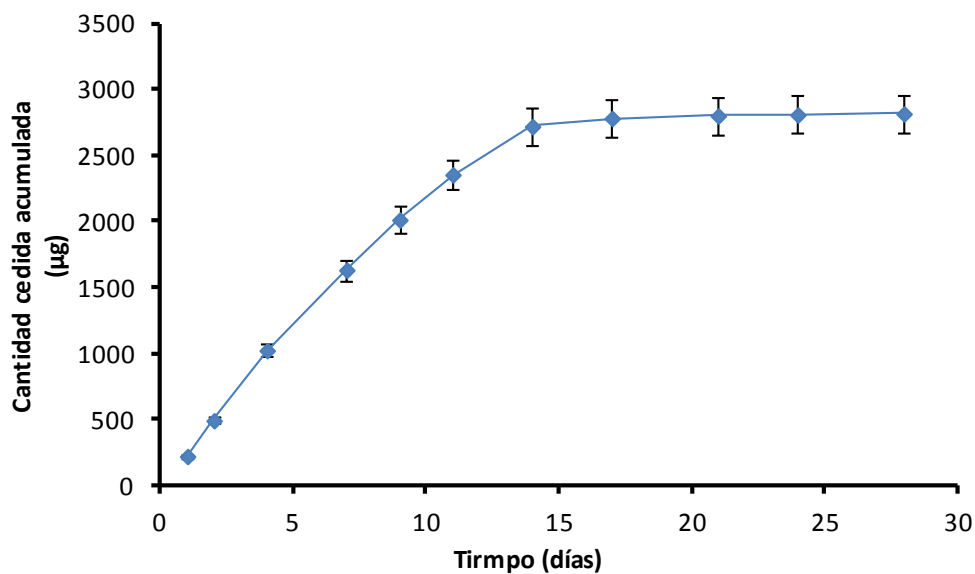


Figura 37. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 2 del diseño experimental.

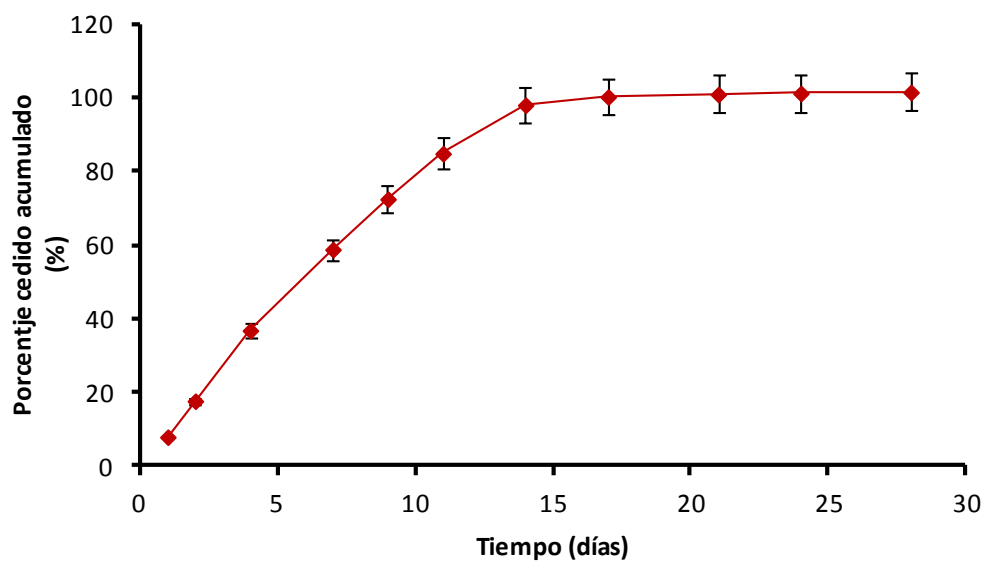


Figura 38. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 2 del diseño experimental.

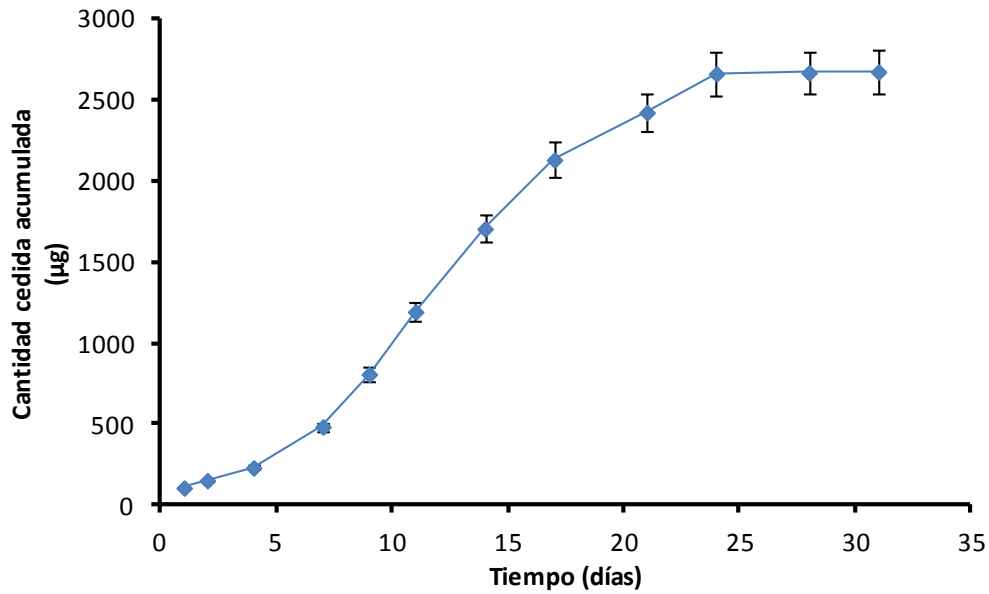


Figura 39. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 3 del diseño experimental.

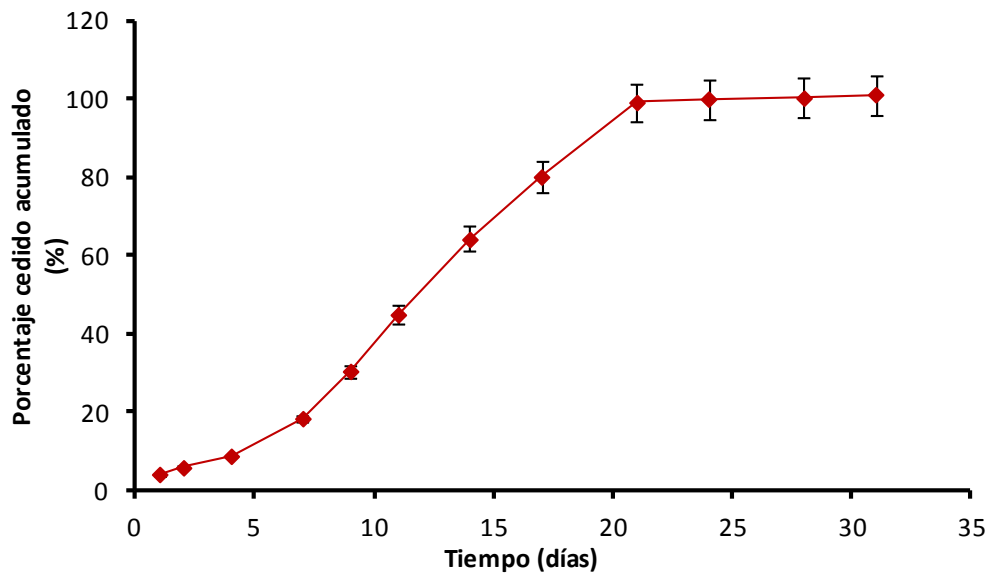


Figura 40. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 3 del diseño experimental.

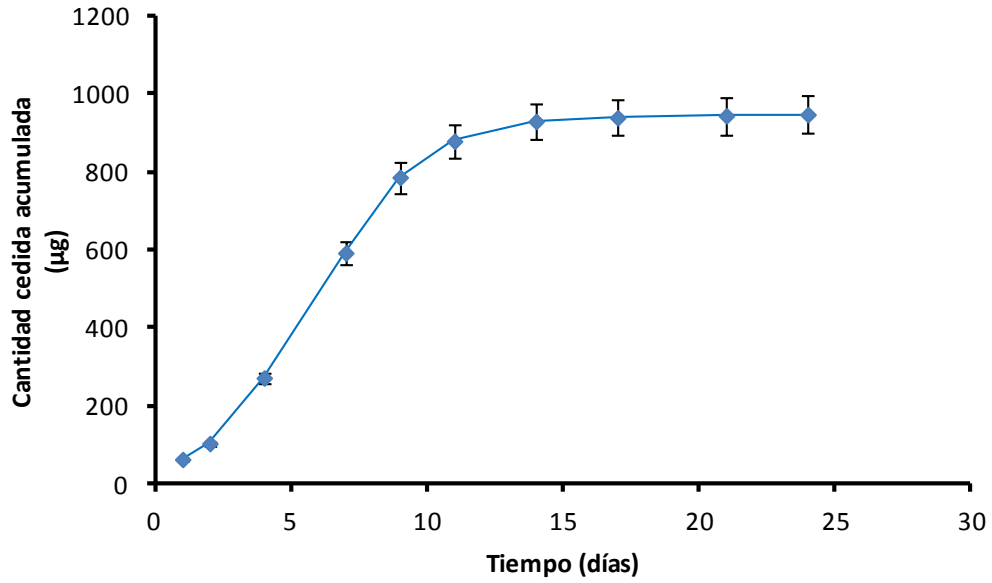


Figura 41. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 4 del diseño experimental.

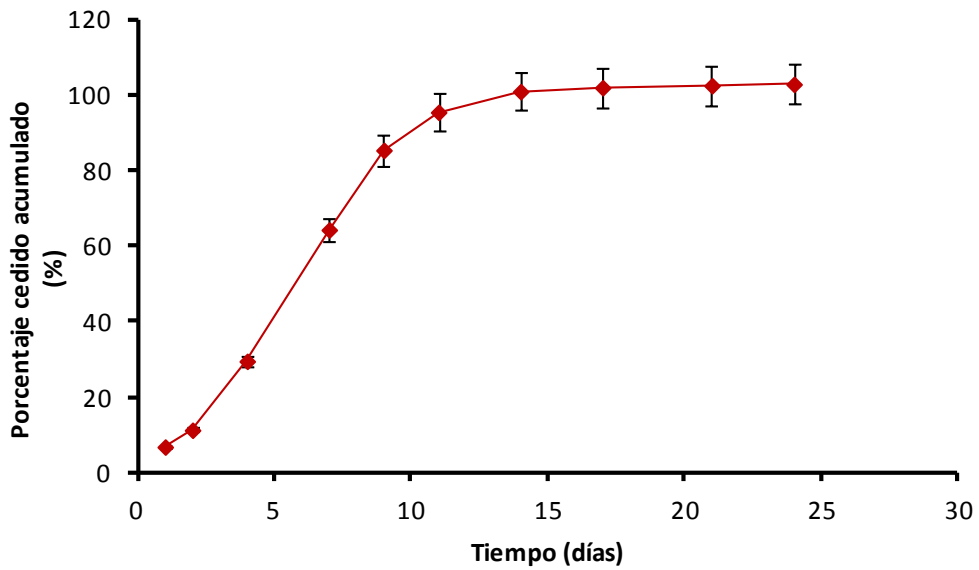


Figura 42. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 4 del diseño experimental.

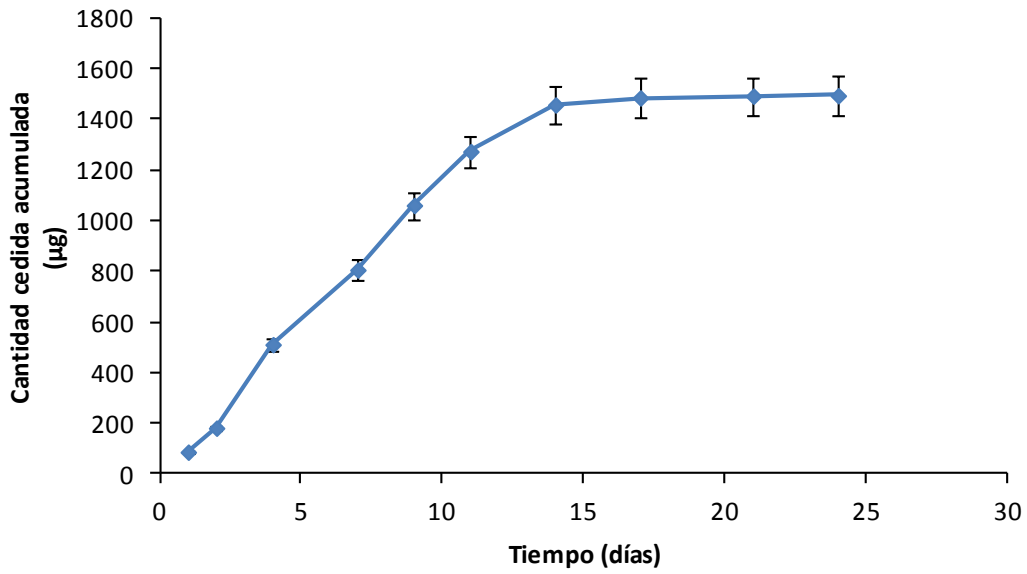


Figura 43. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 5 del diseño experimental.

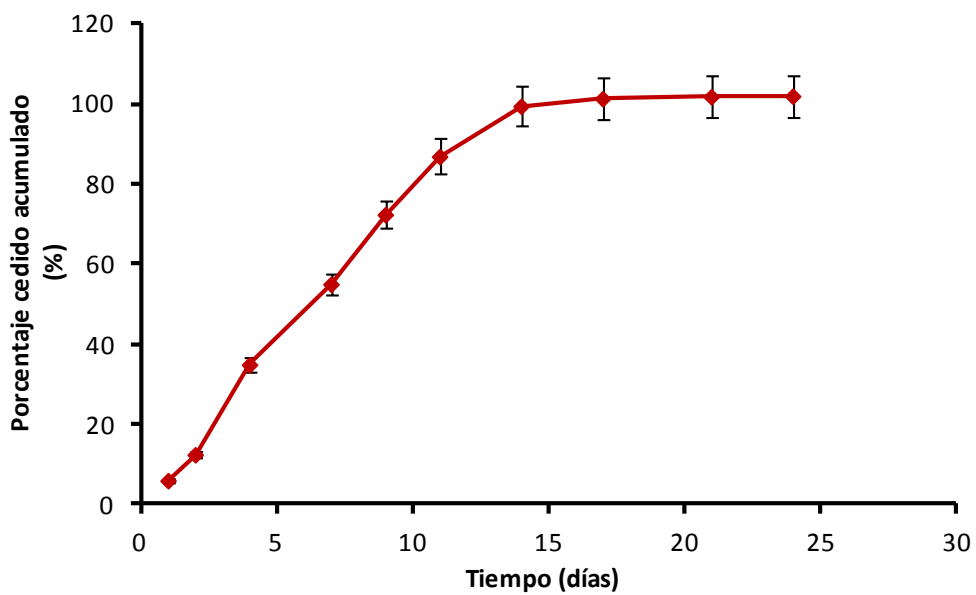


Figura 44. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 5 del diseño experimental.

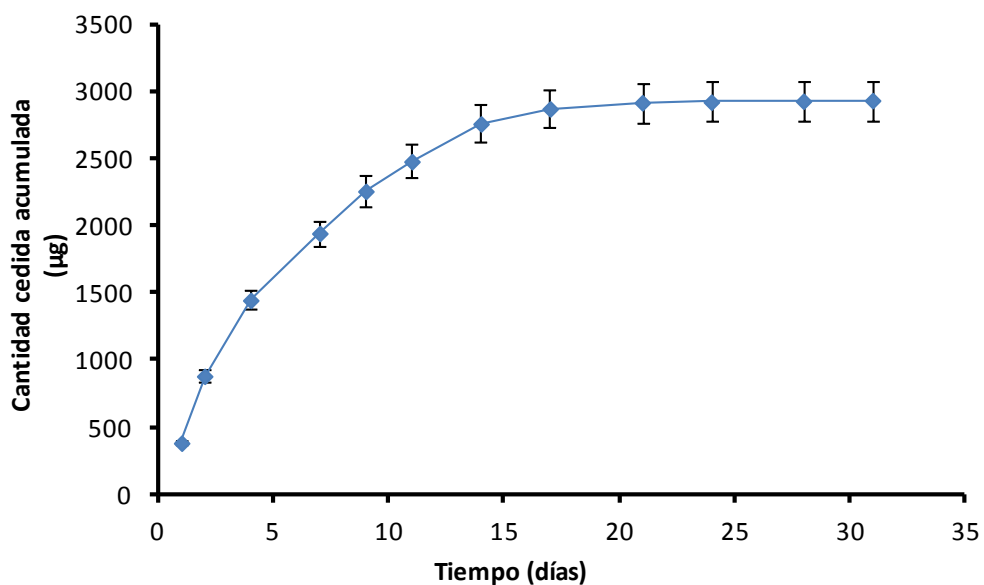


Figura 45. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 6 del diseño experimental.

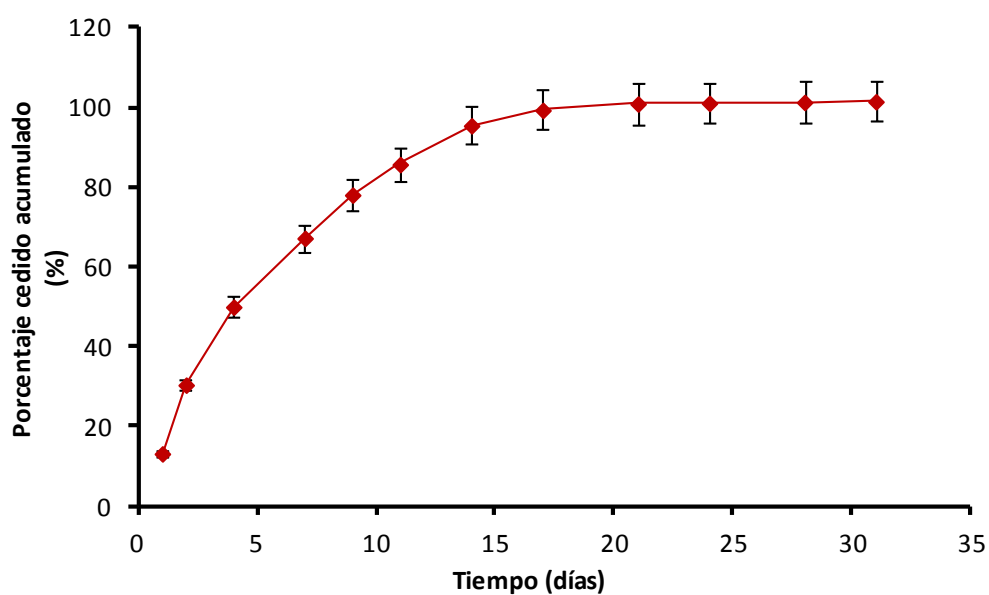


Figura 46. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 6 del diseño experimental.

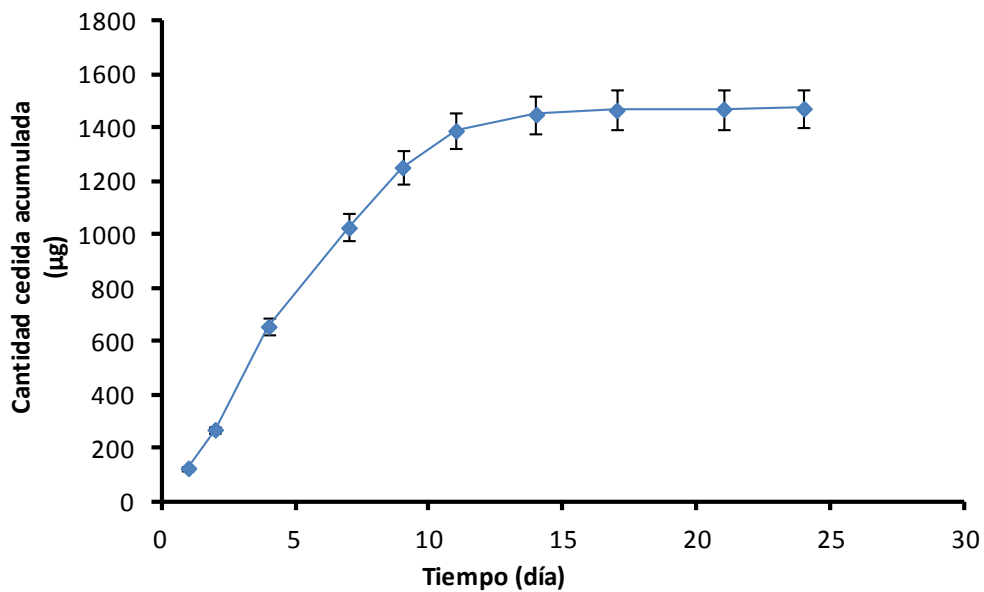


Figura 47. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 7 del diseño experimental.

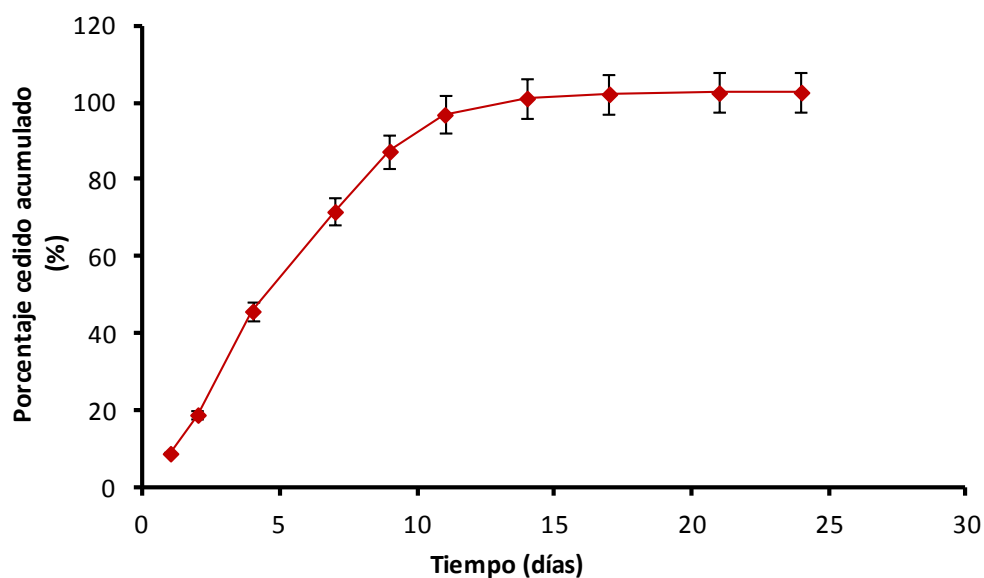


Figura 48. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 7 del diseño experimental.

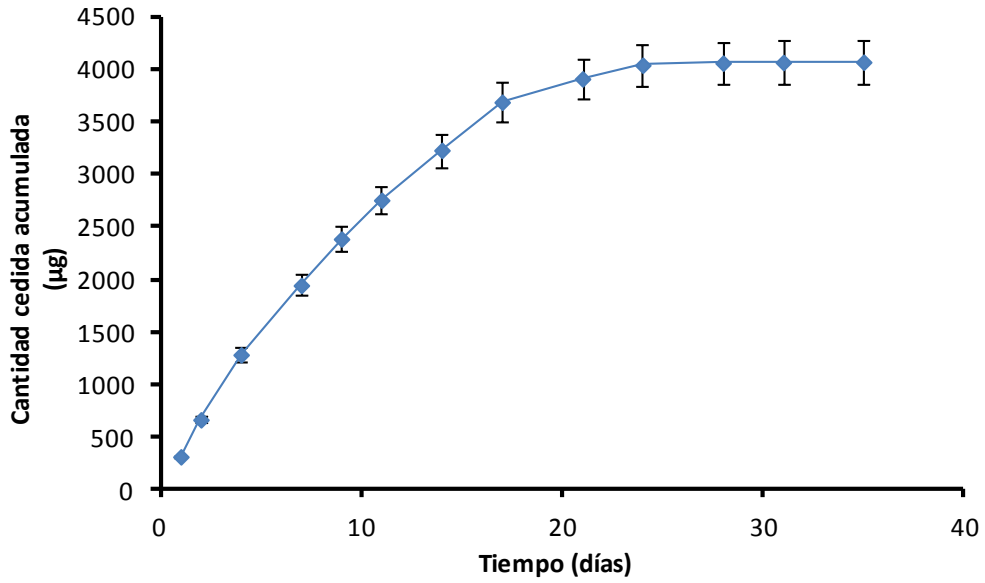


Figura 49. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 8 del diseño experimental.

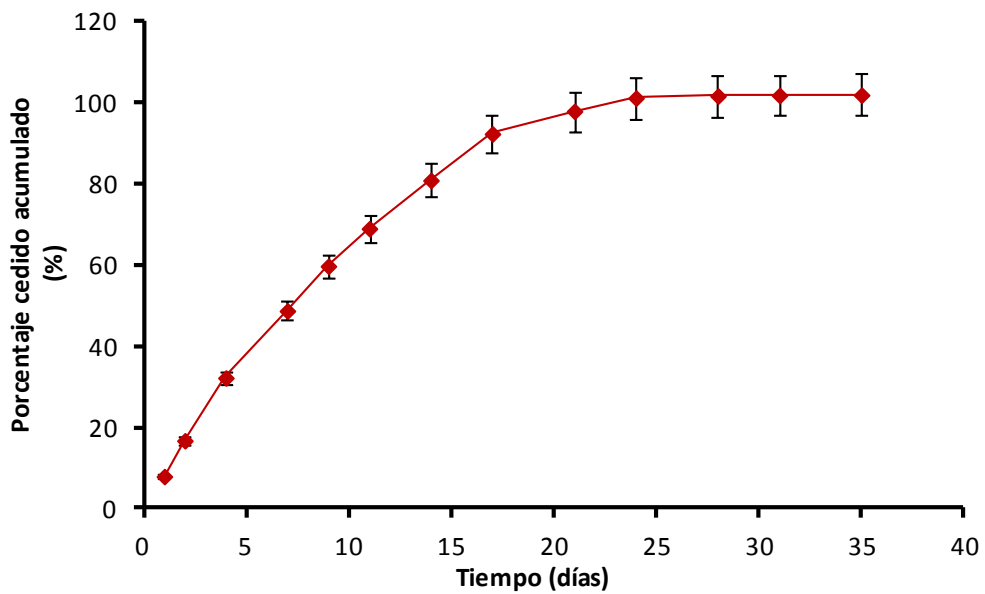


Figura 50. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 8 del diseño experimental.

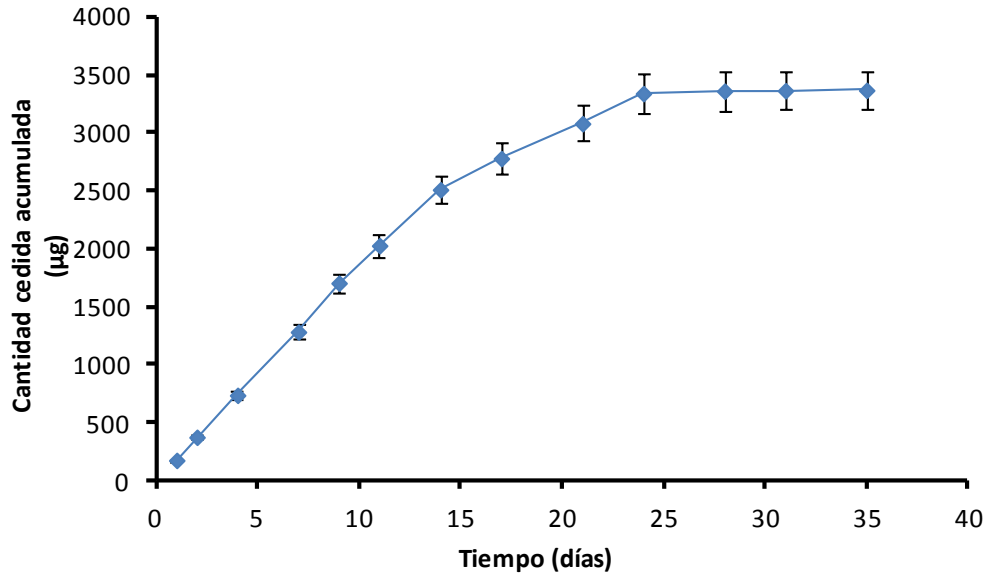


Figura 51. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 9 del diseño experimental.

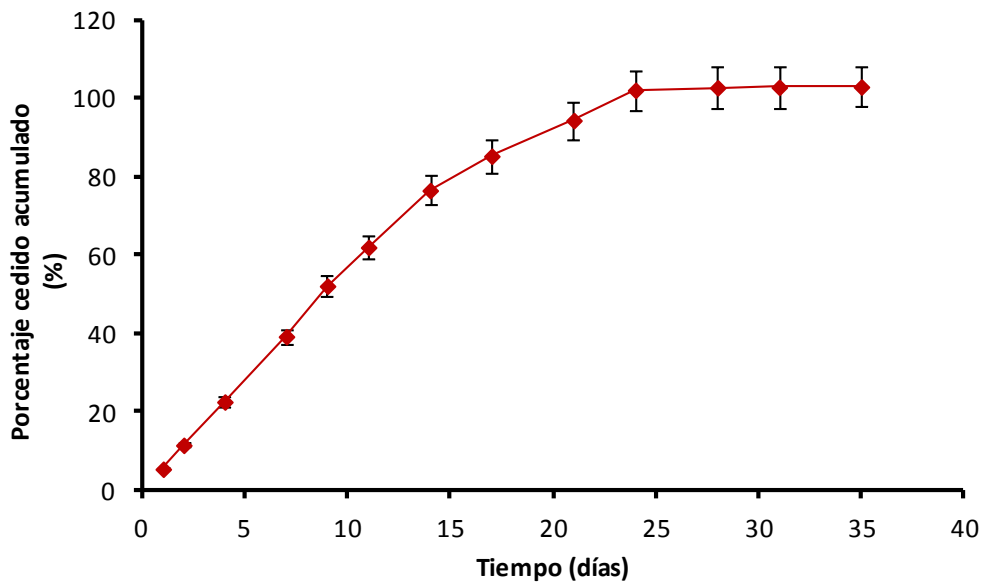


Figura 52. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 9 del diseño experimental.

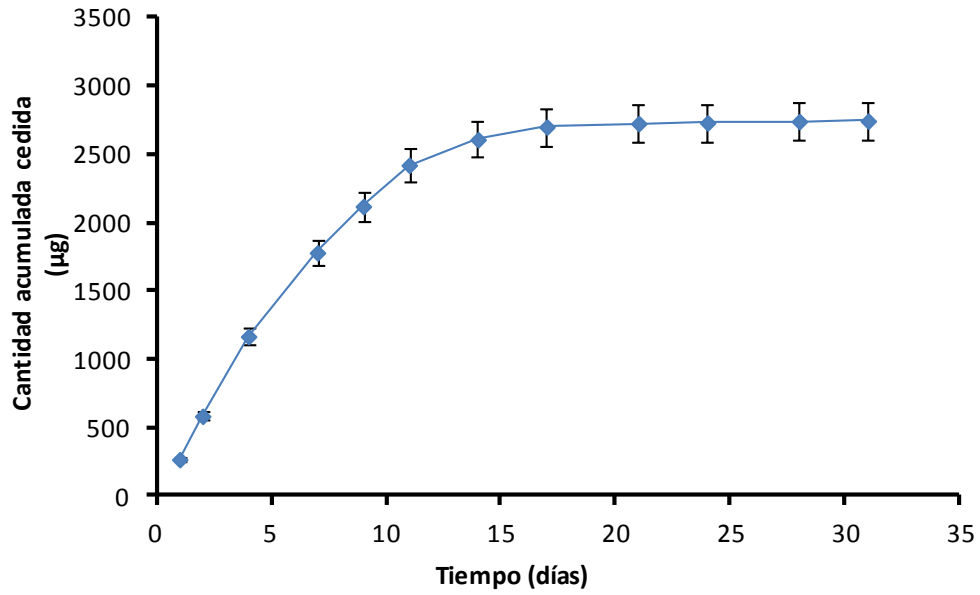


Figura 53. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en cantidad ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 10 del diseño experimental.

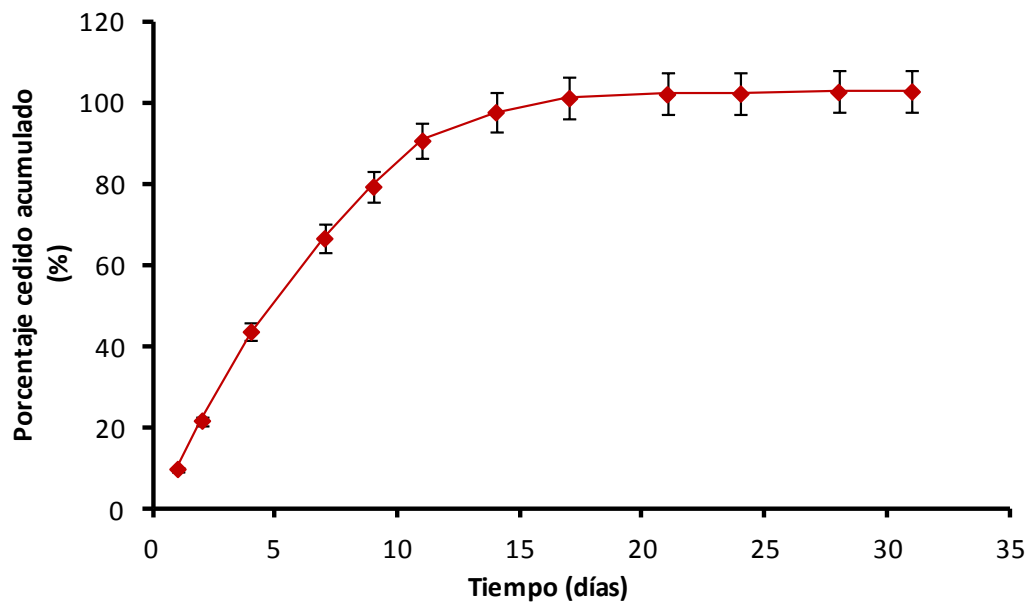


Figura 54. Perfil medio de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresado en porcentaje ( $\pm D.E.$ ), correspondiente a la formulación 10 del diseño experimental.

En la figura 55 se recogen de forma conjunta, la media de los perfiles de liberación in vitro de clorhidrato de flunarizina para todas las formulaciones ensayadas en el diseño experimental. La liberación inicial (burst) a las 24 horas osciló entre 62,28 µg/10 mg de microesferas a 380 µg/10 mg de microesferas, dependiendo de la formulación ensayada.

Esta respuesta fue significativa ( $p < 0,05$ ) y está positivamente influenciada por cantidad del clorhidrato de flunarizina y relación entre los polímeros (502/502H). Cuando se realiza un ajuste conjunto de todas las variables, esto podría explicarse por el hecho de que la flunarizina es un fármaco poco soluble en agua y que, además, presenta una menor solubilidad en la matriz polimérica a medida que aumenta la relación de los polímeros (502/502H), lo que implicaría que la liberación del fármaco a partir de las microesferas estaría condicionada por la difusión del principio activo. En el caso de las microesferas con mayor proporción de principio activo y una mayor proporción de polímero más hidrosoluble (PLGA 502H), se favorecería la liberación del clorhidrato de flunarizina en comparación con las microesferas que incorporan menos cantidad de fármaco y/o que tiene una menor proporción del polímero más hidrófilo.

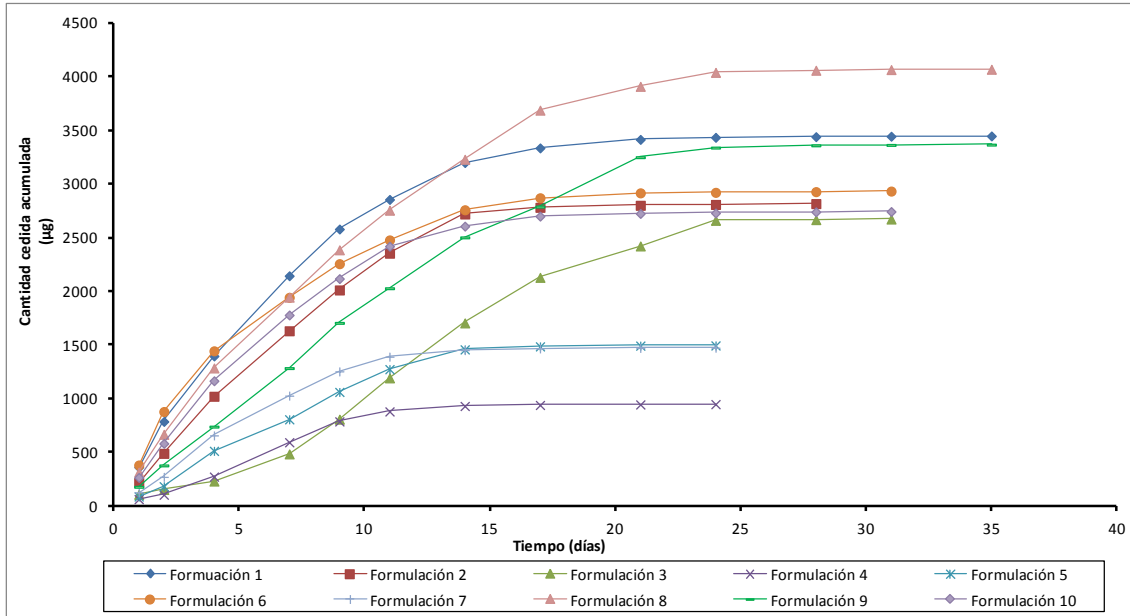


Figura 55. *Perfiles medios de cesión del clorhidrato de flunarizina, expresados en cantidades, correspondientes a las formulaciones del diseño experimental.*

Para determinar la formulación que mejor se adopta a los objetivos planteados, los datos experimentales fueron analizados por la ecuación experimental propuesta por Ritger y Peppas (1987), que describe el comportamiento general de la liberación de principios activos de partículas esféricas y que se muestra a continuación:

$$\frac{M_t}{M^\infty} = K t^n$$

Donde:

$M_t / M^\infty$  es la fracción de dosis cedida a tiempo  $t$

$K$  es la constante de velocidad

$n$  es el exponente difusional

Para las distintas formulaciones del diseño experimental, el valor de  $n$  osciló entre 0,79 y 1,59. El valor más próximo a 1 se obtuvo para la formulación 9 ( $n= 0,96$ ), preparada con 245 mg de clorhidrato de flunarizina y proporciones de polímero 37% 502H/63% 502. Con esta formulación se obtiene una cesión de orden cero durante 14 días, con un valor de constante de velocidad de 178  $\mu\text{g}/\text{día}/10\text{ mg}$  de microesferas.

La optimización conjunta de las respuestas anteriormente indicadas nos permitió establecer como formulación óptima aquella preparada con 244 mg de clorhidrato de flunarizina y una relación de polímeros de 46,25% de PLGA 502H y 53,75% de PLGA 502.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Taguchi G., Elsayed E.A., Hsiang T.C.** Quality engineering production systems., McGraw-Hill, Inc., New York; 1989.

**www.cema.edu.ar.** Último acceso Enero 2012.



The image features three stylized eyes arranged vertically. Each eye is composed of a dark grey outer ring, a light grey middle ring, and a solid black pupil. The eyes are positioned at the top, middle, and bottom right of the page. Two thin, dark grey diagonal lines cross the page from the top left towards the bottom right, framing the eyes. The text 'IX. FORMULACIÓN SELECCIONADA' is centered on the left side of the page.

**IX. FORMULACIÓN  
SELECCIONADA**



## FORMULACIÓN SELECCIONADA

Se han preparado tres lotes de la formulación seleccionada como óptima a partir del diseño experimental, utilizando 244 mg de clorhidrato de flunarizina y 185 mg de PLGA 502H y 215 mg de PLGA 502, y a una velocidad de agitación de 3000 rpm.

La determinación de la eficacia media de encapsulación, a partir de los tres lotes de microesferas preparadas, resultó ser de 97,07 %  $\pm$  1,74%, lo que es similar al resultado obtenido en la optimización del diseño experimental.

En la tabla 34 se muestran la media y desviación estándar obtenida para los tres lotes de microesferas de la formulación seleccionada, y en las figuras 56 y 57 se muestran los perfiles de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresados en cantidad y porcentaje, respectivamente.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (µg)</b>	<b>(±D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
<b>1</b>	184,34	6,03	4,97	0,26
<b>2</b>	433,16	7,23	11,68	0,44
<b>4</b>	945,49	33,02	24,13	1,31
<b>7</b>	1591,90	23,92	42,97	0,83
<b>9</b>	1979,00	13,14	53,36	1,39
<b>11</b>	2329,81	39,79	62,96	2,30
<b>14</b>	2849,58	28,15	76,84	2,32
<b>17</b>	3254,90	45,85	87,77	3,21
<b>21</b>	3604,47	51,69	97,19	3,11
<b>24</b>	3726,85	45,34	100,48	2,42
<b>28</b>	3756,84	45,58	101,28	2,08
<b>31</b>	3762,05	45,68	101,42	2,06
<b>35</b>	3765,09	46,07	101,50	2,07

Tabla 34. *Cantidades medias cedidas de clorhidrato de flunarizina (±D.E.) y sus correspondientes porcentajes (±D.E.) a partir de la formulación seleccionada.*

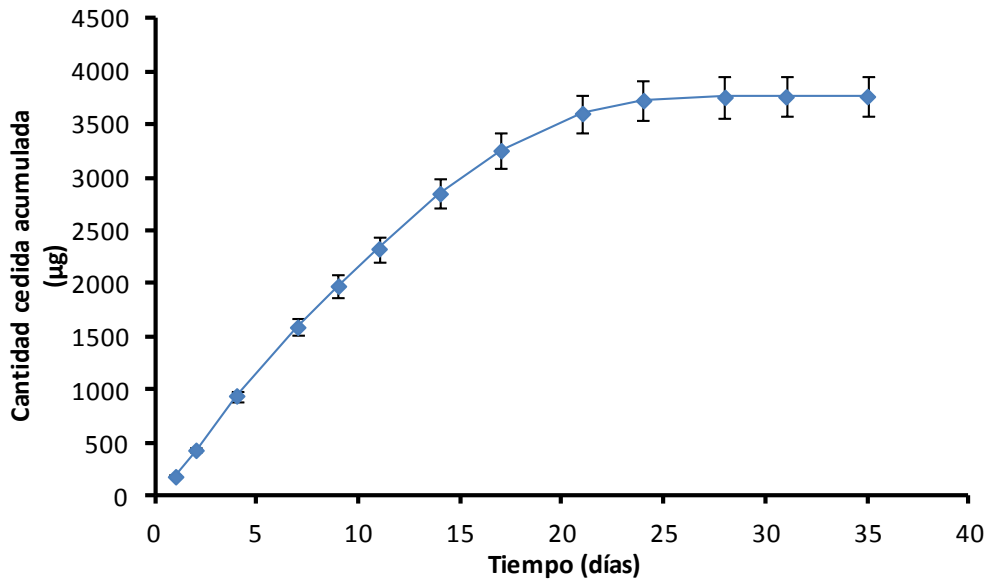


Figura 56. Cantidad media cedida acumulada de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) a partir de la formulación seleccionada.

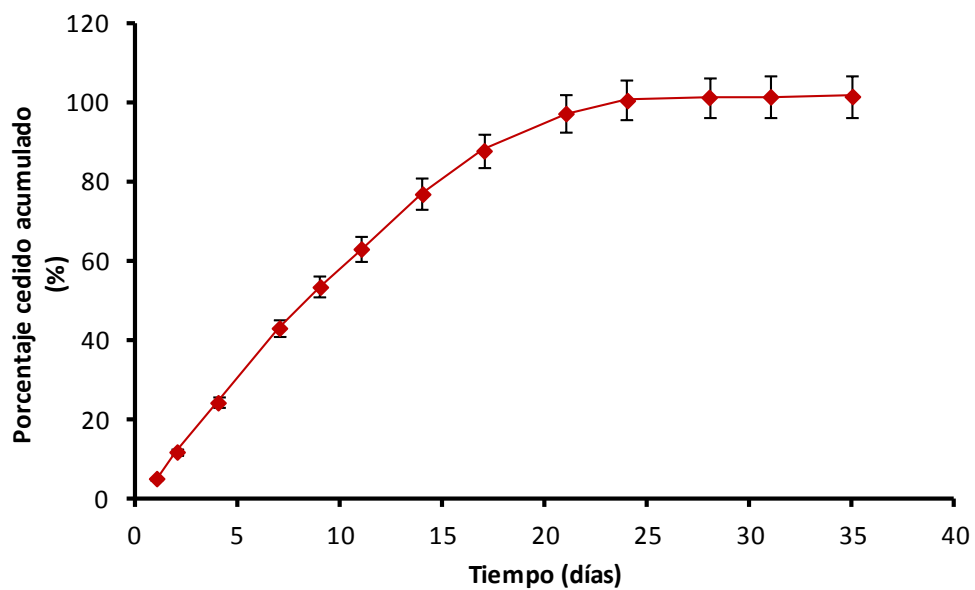


Figura 57. Porcentaje medio cedido acumulado de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) a partir de la formulación seleccionada.

A partir de los resultados de los ensayos de cesión obtenidos se ha calculado la constante de velocidad de cesión del clorhidrato de flunarizina tras el ajuste a una cinética de orden cero, que resultó ser de 168,98  $\mu\text{g}/\text{día}/10\text{ mg}$  de microesferas durante los 14 primeros días de cesión.

Con el fin de observar la apariencia y cambios originados en las microesferas a lo largo de los ensayos de cesión, se procedió al análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de muestras de microesferas tomadas a distintos tiempos durante los ensayos de cesión (figuras 58 a 63).

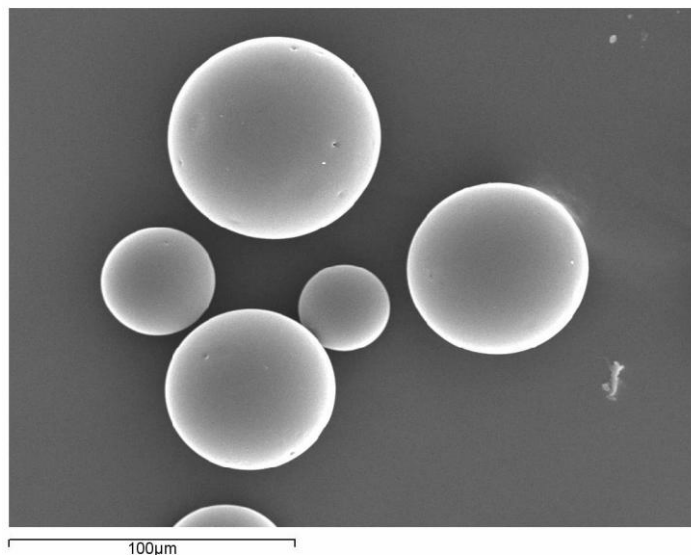


Figura 58. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina de la formulación seleccionada (tiempo 0).*

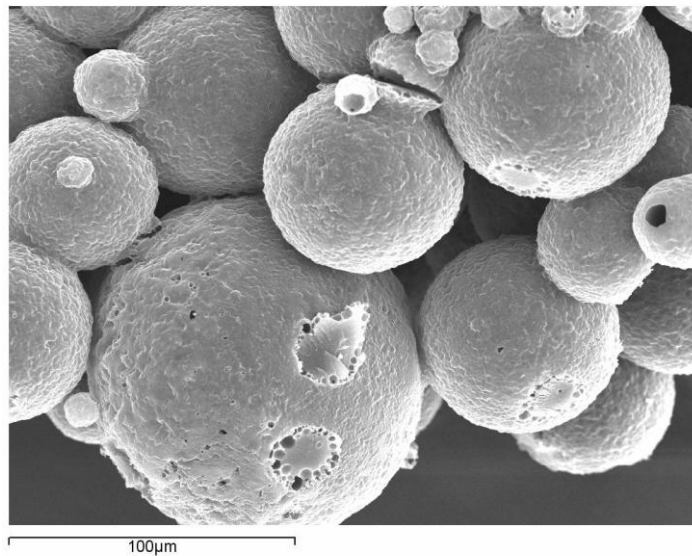


Figura 59. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de 2 días de cesión.*

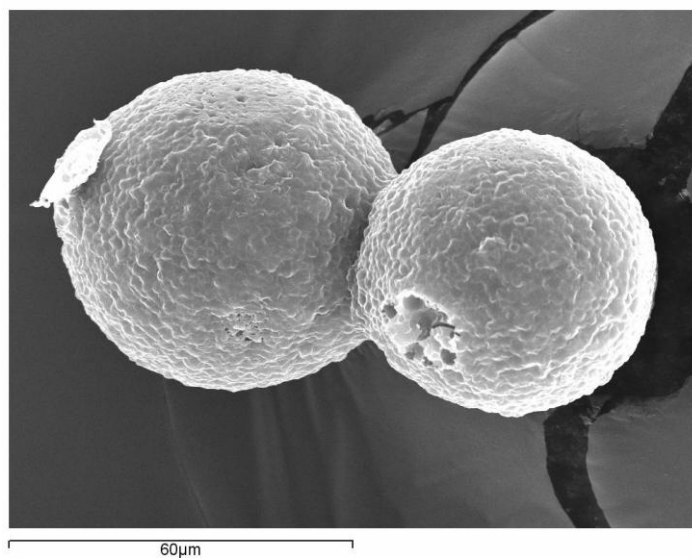


Figura 60. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de 4 días de cesión.*

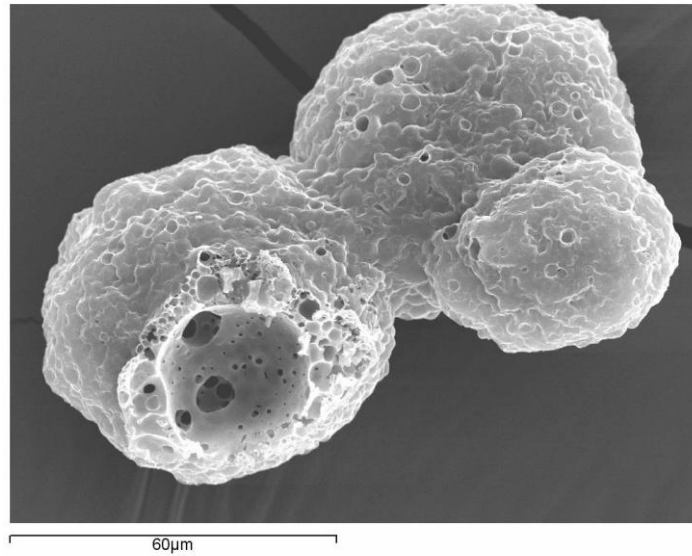


Figura 61. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de 7 días de cesión.*

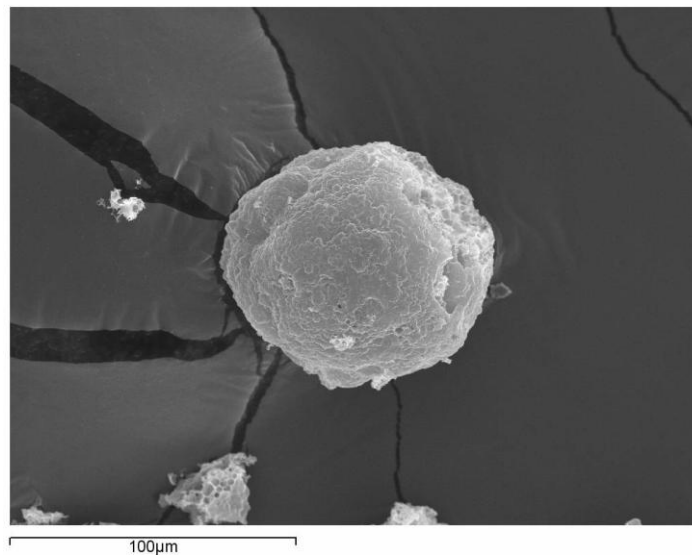


Figura 62. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de 14 días de cesión.*

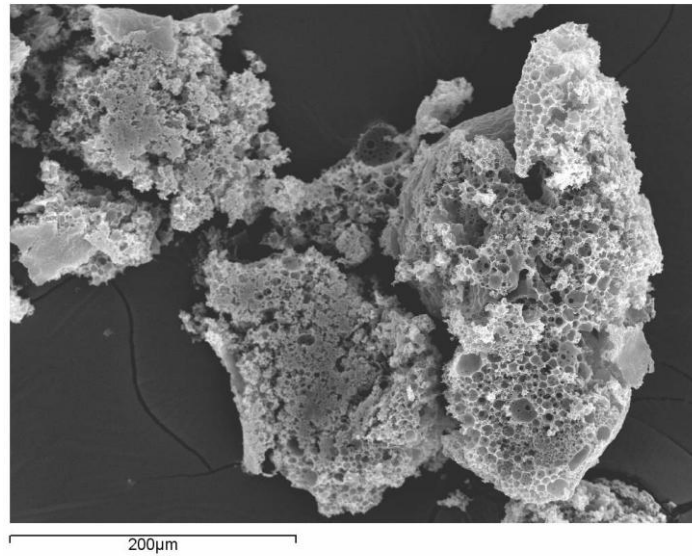


Figura 63. *Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de 21 días de cesión.*

Como se puede observar, las microesferas de la formulación seleccionada presentan forma esférica con superficie lisa al inicio del estudio. A partir de entonces se va produciendo una progresiva erosión de las microesferas, que van perdiendo su forma esférica manifestándose una estructura muy porosa y erosionada, que justificaría la rápida liberación del clorhidrato de flunarizina en los primeros 14 días del ensayo. A los 21 días las microesferas han perdido totalmente su forma, observándose agregados irregulares.

El tamaño de las microesferas es un parámetro importante cuando se desea su administración por vía parenteral, recomendándose que no exceda de 180  $\mu\text{m}$ . Además debe lograrse que este parámetro sea reproducible entre los diferentes lotes, ya que puede influir en el perfil de liberación y en otras características, tales como la eficacia de encapsulación. Entre los factores que condicionan el tamaño final de las microesferas se encuentran el tipo de polímero y su masa molecular (*Alonso y col., 1994; Haznedar y Dortunc.,*

---

2004), la relación polímero:fármaco (Haznedar y Dortunc., 2004; Sun y col., 2003), la concentración del polímero en la fase orgánica (Cheng y col., 1998; Péan y col., 1998), la concentración del agente tensioactivo en la fase acuosa externa (Sun y col., 2003; Cheng y col., 1998; Kempen y col., 2004) y la velocidad de agitación al formar las partículas (Dinarvand y col., 2003; Mateovic y col., 2002)..

En nuestro caso se ha determinado la distribución de tamaños en volumen de la formulación seleccionada mediante difracción de rayos láser, utilizando el equipo Microtrac® S35000 Particle Size Analyzer (Microtac®, USA). Para ello se preparó una suspensión de la formulación seleccionada de microesferas en agua destilada, agitándose en vórtex para facilitar la dispersión de las mismas. A continuación, se añadieron unas gotas de la suspensión recién preparada en la celda del equipo, semillena con agua destilada, y se procedió a su análisis.

En la figura 64 se recoge la distribución del tamaño de partícula de la formulación seleccionada, donde se puede observar una distribución monomodal.

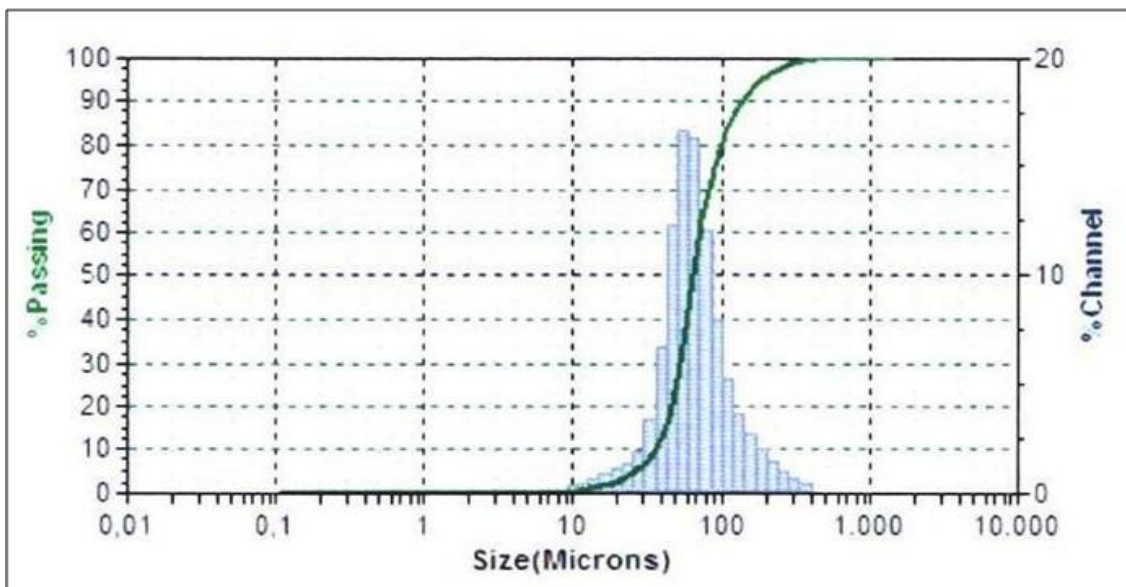


Figura 64. Distribución del tamaño de partícula de la formulación seleccionada.

El tamaño promedio de la formulación seleccionada es de  $64,29 \mu\text{m} \pm 3,88 \mu\text{m}$  (Figura 64), valor adecuado para administración parenteral.

Por último, en la figura 65 se recogen los difractogramas de rayos X obtenidos con la formulación seleccionada.

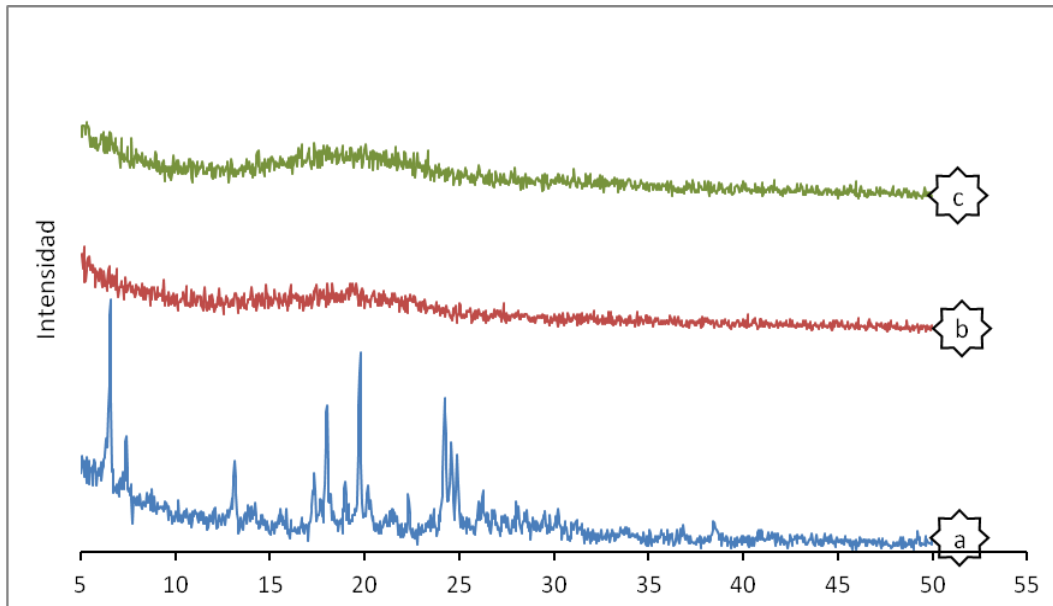


Figura 65. Difractograma de rayos X obtenidos para el clorhidrato de flunarizina (a), microesferas blanco preparadas con PLGA 502H:502 (46,25%:53,75%) (b), y microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina correspondientes a la formulación seleccionada (c).

Como podemos observar, el perfil de la formulación seleccionada, no presenta los máximos correspondientes al principio activo lo que nos permite indicar que el clorhidrato de flunarizina se encuentre al menos parcialmente disuelto en la matriz polimérica.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Alonso M.J., Gupta R.K., Min C., Siber G.R., Langer R.** Biodegradable microspheres controlled-release tetanus toxoid delivery systems., *Vaccine.*, 12: 299-306; 1994.

**Cheng Y.H., Illum L., Davis S.S.** A poly(d,l-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol., *J. Control. Release.*, 55: 203-212; 1998.

**Dinarvand R., Moghadam S.H., Mohammadyari-Fard L., Atyabi F.** Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone., *AAPS. Pharm. Sci. Tech.*, 4: E34; 2003.

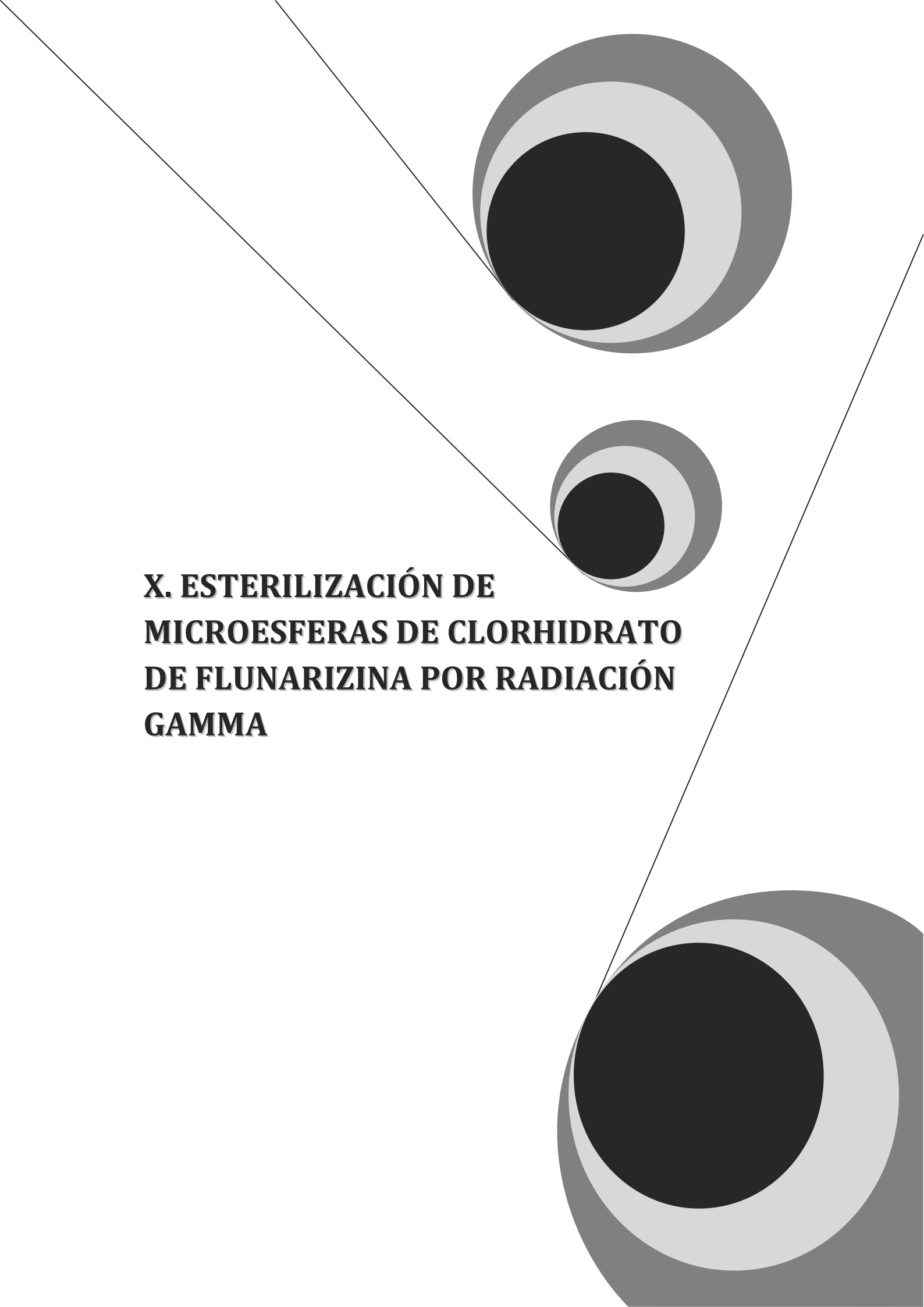
**Haznedar S., Dortunc B.** Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide., *Int. J. Pharm.*, 269: 131-140; 2004.

**Kempen D.H., Lu L., Zhu X., Kim C., Jabbari E., Dhert W.J., Currier B.L., Yaszemski M.J.** Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. I. Preparation and characterization., *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 70: 283-292; 2004.

**Mateovic T., Kriznar B., Bogataj M., Mrhar A.** The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres., *J. Microencapsul.*, 19: 29-36; 2002.

**Péan J.M., Venier-Julienne M.C., Filmon R., Sergent M., Phan-Tan-Luu R., Benoit J.P.** Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles., *Int. J. Pharm.*, 166: 105-115; 1998.

**Sun S.W., Jeong Y.I., Jung S.W., Kim S.H.** Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics., *J. Microencapsul.*, 20: 479-488; 2003.



**X. ESTERILIZACIÓN DE  
MICROESFERAS DE CLORHIDRATO  
DE FLUNARIZINA POR RADIACIÓN  
GAMMA**



# ESTERILIZACIÓN DE MICROESFERAS DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA POR RADIACIÓN GAMMA

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las características más sobresalientes del organismo humano es que, gracias a su compleja pero estructurada organización, tiene la capacidad de identificar, rechazar o admitir cualquier cuerpo extraño introducido en él. Así, toda sustancia de origen natural o sintético, que se introduce en el organismo humano, es considerada por éste como una sustancia extraña, y sus interacciones con el medio fisiológico determinan el periodo necesario para su reconocimiento y la intensidad de la reacción del organismo para rechazar o asimilar el cuerpo extraño introducido y restablecer el equilibrio interno. De ahí la necesidad de esterilizar el material que pueda estar en contacto con el organismo (*Sastre R. y col., 2004*).

El proceso de esterilización tiene por finalidad la completa destrucción o eliminación de todas las formas de vida y formas esporuladas así como la inactivación de los virus (*Tabata Y., 1999*).

Si se tiene en cuenta que las técnicas de esterilización generales, como son la esterilización por vapor o calor seco, no pueden utilizarse para esterilizar polímeros como PLGA, ya que producen alteraciones de las características físicas y químicas de los mismos, y que además, la esterilización con óxido de etileno origina serios problemas toxicológicos, debido a la concentración residual de dicho compuesto tras la esterilización (*Athanasiou y col., 1996*), hemos seleccionado como método de esterilización de nuestra formulación la esterilización por radiación gamma, mediante irradiación con una fuente de cobalto-60 a una dosis de 25 kGy.

La esterilidad es un factor crítico para los sistemas de administración parenteral, prefiriéndose un proceso de esterilización final del producto a la fabricación en condiciones asépticas. La adecuada selección de un método de esterilización es fundamental para garantizar la estabilidad del producto. Hace algunos años aparecieron los primeros trabajos referentes a la utilización del método basado en la radiación ionizante con rayos gamma, para la esterilización de microesferas preparadas a partir de polímeros derivados (*Sintzel y col., 1997*). Los rayos gamma tienen una alta capacidad de penetración, y la dosis necesaria para lograr la esterilización se encuentra comprendida entre 25 y 40 kGy. Una gran cantidad de materiales son compatibles con la esterilización por radiaciones gamma, por lo que es ampliamente aceptado como método de esterilización para materiales poliméricos, dentro de los que se incluyen polietileno, poliésteres, poliestirenos, polisulfóxidos y policarbonatos (*Davis J.R., 2003*).

Este tipo de esterilización es el método utilizado habitualmente para productos sanitarios termolábiles, y el más idóneo para este tipo de formulaciones que contienen polímeros, principalmente por su alto poder de penetración, baja reactividad química, bajos niveles de residuos, pequeños cambios de temperatura en la muestra y las pocas variables a controlar. Sin embargo, se ha comprobado que en algunos polímeros, como los derivados de los ácidos láctico y glicólico, la dosis que garantiza la esterilidad de un producto farmacéutico (25 kGy), según la (*Real Farmacopea Española, 2011*), y la USP (*USP 33, 2010*) genera una disminución significativa de su peso molecular y por tanto, puede afectar a las propiedades del producto final. El PLGA es un polímero sensible a la humedad y al calor. Por tanto, la inestabilidad química de los sistemas matriciales preparados con PLGA, así como la de determinados principios activos en ellos incluidos, limita la obtención de productos estériles cuando se utiliza el polímero.

Este problema parece haber sido solventado mediante la utilización de bajas temperaturas durante el tiempo de exposición de las formulaciones preparadas a partir del ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) a la radiación gamma, con resultados óptimos para formulaciones de microesferas (*Fernández Carballido y col., 2004; Martínez-Sancho y col., 2004*).

## **2. ESTERILIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN SELECCIONADA**

Con el objeto de comprobar el efecto de la radiación gamma sobre las microesferas de clorhidrato de flunarizina y sus perfiles de cesión, se realiza la esterilización final de la formulación seleccionada. Entre los métodos empleados para la esterilización de preparados farmacéuticos se ha elegido la radiación gamma, también utilizada, habitualmente, en la esterilización de productos sanitarios (*Sintzel y col., 1997*), y polímeros (*USP 33, 2010*). Los criterios utilizados para su selección fueron evitar tanto el uso de temperaturas elevadas que pudieran dañar la estructura del material, como los posibles residuos derivados de la exposición al óxido de etileno.

Se ha llevado a cabo el tratamiento siguiente de esterilización: el acondicionamiento de las muestras se realiza de acuerdo al procedimiento descrito por Hausberger y colaboradores (*Hausberger y col., 1995*), y que consiste en introducir una cantidad determinada ( $\pm 100$  mg) de la muestra correspondiente en viales de vidrio que fueron sellados con tapón de goma y cápsula de aluminio, los cuales se mantienen en contacto con hielo seco, a fin de evitar la influencia que tiene la temperatura en la aceleración del proceso hidrolítico de degradación. En estas condiciones las muestras se enviaron a la Unidad de Esterilización por Rayos Gamma, de Aragogama, S.A., (Barcelona), donde se sometieron a radiación gamma generada por fuentes de isótopos radioactivos de cobalto-60, empleando una dosis de radiación de 25 kGy.

A continuación se evalúan los efectos del tratamiento de irradiación sobre las microesferas de clorhidrato de flunarizina en lo relativo a la:

- ✓ Eficacia de encapsulación
- ✓ Microscopía electrónica
- ✓ Rayos X
- ✓ Perfiles de cesión

En estos estudios las microesferas se prepararon utilizando 185 mg de PLGA 502H y 215 mg de PLGA 502 y 244 mg de clorhidrato de flunarizina. Para llevar a cabo el ensayo de cesión se han empleado doce lotes diferentes de microesferas de clorhidrato de flunarizina, y posteriormente, se han comparado los perfiles obtenidos con los correspondientes a las microesferas no esterilizadas, a fin de comprobar si la técnica de esterilización seleccionada es la adecuada.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Eficacia de encapsulación**

Los resultados de la eficacia de encapsulación obtenidos antes y después de la esterilización se muestran en la tabla 36.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN (%) (<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>CANTIDAD DE CLORHIDRATO DE FLUNARIZINA (<math>\mu</math>g) (<math>\pm</math>D.E.)</b>
Sin radiación	92,69 $\pm$ 2,79	3511,79 $\pm$ 105,75
Radiación gamma	91,39 $\pm$ 2,37	3462,77 $\pm$ 89,98

Tabla 35. *Eficacia media de encapsulación y cantidad de clorhidrato de flunarizina incorporada ( $\mu$ g/10 mg de microesferas), antes y después de su esterilización por radiación gamma.*

Como se puede comprobar por los resultados recogidos en la tabla 35, no existen diferencias significativas en la eficacia de encapsulación tras la esterilización por radiación gamma de la formulación.

### **3.2. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las microesferas presentaron una forma esférica con una superficie lisa. Además, las microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina no presentaron cristales en el exterior, lo que indica que el principio activo se encuentra en el interior de la matriz polimérica, siendo el tamaño medio de las microesferas < 100  $\mu$ m, tamaño que no se modificó tras la esterilización (figura 66).

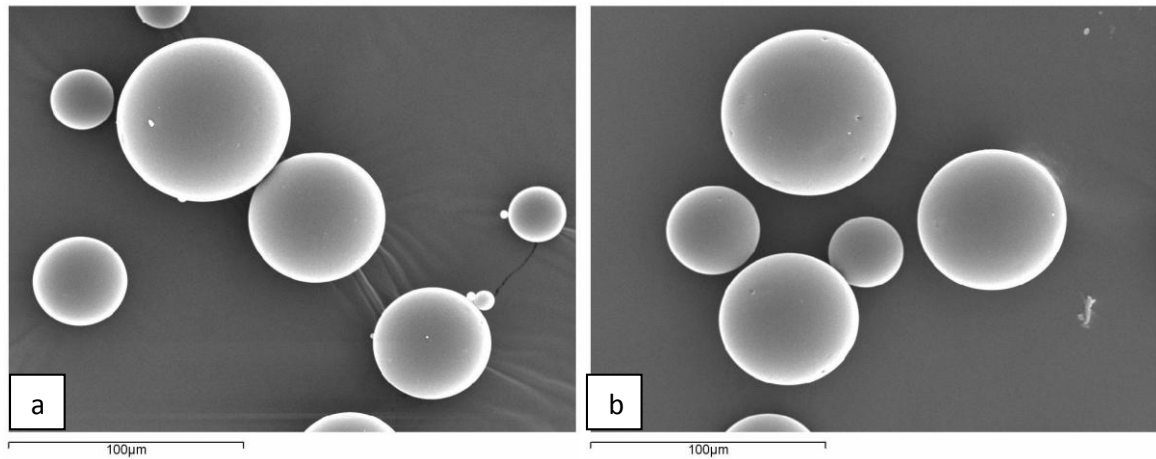


Figura 66. Fotografía obtenida por SEM de microesferas de clorhidrato de flunarizina antes (a), y después (b) del proceso de esterilización.

### 3.3. Análisis de difracción de Rayos X

En la figura 67 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de difracción de rayos X. Los resultados correspondientes a las microesferas muestran un espectro propio de una sustancia amorfa con el principio activo disuelto en la matriz polimérica. Tras el proceso de esterilización no se observan modificaciones en el espectro de rayos X en las formulaciones.

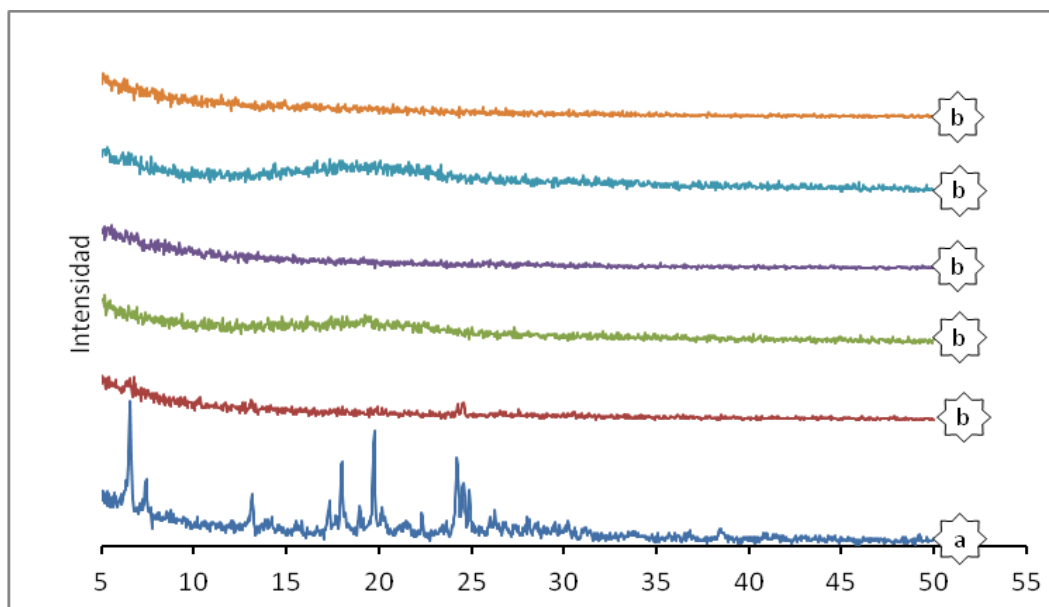


Figura 67. *Difractogramas de Rayos X. Clorhidrato de flunarizina (a), Clorhidrato de flunarizina esterilizada (b), polímero sin esterilizar (c) polímero esterilizado (d), microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina no esterilizadas (e), y microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina esterilizadas (f).*

### 3.4. Ensayos de cesión

Los ensayos de cesión se realizaron en las mismas condiciones experimentales a las indicadas anteriormente (apartado 3.3 de los Ensayos Previos) de esta memoria. En la tabla 36 se muestran los resultados obtenidos para los 12 lotes de microesferas antes de la exposición por radiación gamma y, en la tabla 37, para los 12 lotes de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de la exposición de las mismas a radiación gamma.

En la tabla 38 se recogen los porcentajes de clorhidrato de flunarizina cedidos a partir de los 12 lotes de microesferas antes de la exposición por radiación gamma, y en las tablas 39 se muestran los correspondientes a los 12 lotes de microesferas de clorhidrato de flunarizina después de la exposición de la formulación seleccionada a radiación gamma.

<b>Cantidad cedidas acumuladas (<math>\mu\text{g}</math>)</b>														
<b>Tiempo (días)</b>	<b>lote 1</b>	<b>lote 2</b>	<b>lote 3</b>	<b>lote 4</b>	<b>lote 5</b>	<b>lote 6</b>	<b>lote 7</b>	<b>lote 8</b>	<b>lote 9</b>	<b>lote 10</b>	<b>lote 11</b>	<b>lote 12</b>	<b>Media</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	194,86	177,14	190,86	220,57	200,00	211,43	199,43	198,29	196,00	180,57	194,86	198,29	196,86	11,65
<b>2</b>	400,00	389,14	409,71	424,00	419,43	414,86	402,86	411,43	396,00	382,29	414,29	409,14	406,10	12,42
<b>4</b>	818,29	712,57	760,57	822,86	749,71	769,14	750,29	816,00	814,29	840,57	760,57	776,00	782,57	38,85
<b>7</b>	1430,86	1119,43	1194,86	1273,14	1131,43	1213,71	1143,43	1333,71	1351,43	1313,71	1233,71	1209,14	1245,71	96,83
<b>9</b>	1789,71	1469,14	1500,00	1604,57	1482,29	1572,57	1634,86	1681,14	1710,29	1668,00	1561,71	1586,29	1605,05	97,08
<b>11</b>	2080,00	1841,71	1849,71	1950,86	2001,14	1971,43	2007,43	2001,14	2120,57	2038,29	2077,14	1916,57	1988,00	87,65
<b>14</b>	2525,71	2351,43	2349,14	2472,00	2525,71	2569,14	2502,29	2488,00	2585,71	2454,29	2581,14	2323,43	2477,33	91,90
<b>17</b>	2925,71	2832,57	2828,00	2859,43	2949,71	2930,29	2964,00	2902,86	2998,29	2852,00	3087,43	2833,14	2913,62	79,13
<b>21</b>	3329,14	3222,86	3244,57	3297,71	3304,57	3311,43	3265,14	3316,57	3407,43	3259,43	3468,57	3286,29	3309,48	68,91
<b>24</b>	3574,29	3469,14	3489,71	3518,29	3493,71	3504,00	3506,86	3549,14	3685,71	3541,71	3640,57	3525,71	3541,57	64,20
<b>28</b>	3644,57	3590,29	3618,29	3585,71	3587,14	3587,14	3622,86	3621,71	3794,57	3669,14	3720,57	3642,00	3640,33	62,79
<b>31</b>	3654,86	3638,57	3663,14	3604,86	3626,86	3604,00	3686,57	3635,71	3817,14	3706,57	3741,43	3677,14	3671,40	61,27
<b>35</b>	3658,86	3648,29	3692,57	3610,57	3646,00	3610,57	3695,14	3640,29	3826,57	3726,86	3750,00	3698,86	3683,71	62,51

Tabla 36. *Cantidades cedidas individuales y medias ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de los lotes de microesferas no esterilizadas.*

<b>Cantidad cedidas acumuladas (<math>\mu\text{g}</math>)</b>														
<b>Tiempo (días)</b>	<b>lote 1</b>	<b>lote 2</b>	<b>lote 3</b>	<b>lote 4</b>	<b>lote 5</b>	<b>lote 6</b>	<b>lote 7</b>	<b>lote 8</b>	<b>lote 9</b>	<b>lote 10</b>	<b>lote 11</b>	<b>lote 12</b>	<b>Media</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	272,00	257,14	238,29	246,29	240,00	293,71	272,57	249,14	218,86	208,00	236,57	250,86	248,62	23,55
<b>2</b>	548,00	559,43	502,86	511,43	519,43	589,14	568,00	527,43	513,71	469,14	569,71	572,57	537,57	35,68
<b>4</b>	1005,14	1044,00	1058,29	1022,29	1033,71	1039,43	1043,43	1060,00	997,14	1040,57	1142,29	1150,86	1053,10	47,54
<b>7</b>	1493,14	1642,86	1629,71	1567,43	1577,71	1609,71	1588,57	1607,43	1546,86	1496,57	1614,29	1643,43	1584,81	51,18
<b>9</b>	1709,14	1847,43	1977,14	1877,14	1881,71	1949,14	1939,43	1926,29	1865,71	1741,14	1887,43	1958,86	1880,05	83,07
<b>11</b>	1993,71	2197,14	2353,14	2244,00	2231,43	2311,43	2321,14	2287,43	2244,00	2076,00	2253,14	2336,00	2237,38	106,83
<b>14</b>	2495,43	2666,86	2817,14	2734,29	2684,00	2735,43	2850,29	2768,57	2694,29	2528,57	2752,57	2785,14	2709,38	106,61
<b>17</b>	2895,43	3040,57	3235,43	3133,14	3069,14	3130,86	3226,29	3145,71	3094,29	2921,71	3159,43	3139,43	3099,29	105,17
<b>21</b>	3220,57	3302,86	3526,29	3472,00	3405,71	3468,57	3525,71	3458,29	3408,57	3264,00	3456,00	3396,00	3408,71	98,86
<b>24</b>	3322,86	3365,71	3598,86	3588,00	3477,71	3605,14	3653,14	3578,29	3530,29	3387,43	3506,86	3468,00	3506,86	105,38
<b>28</b>	3336,86	3377,14	3610,00	3606,29	3490,86	3622,57	3669,43	3597,43	3555,14	3407,14	3517,14	3479,14	3522,43	106,50
<b>31</b>	3342,57	3382,57	3615,71	3612,29	3496,57	3629,14	3674,86	3604,86	3563,43	3413,14	3522,86	3484,00	3528,50	106,78
<b>35</b>	3346,29	3386,29	3618,51	3616,29	3500,29	3633,14	3680,86	3609,71	3568,00	3417,14	3526,86	3487,71	3532,59	107,12

Tabla 37. *Cantidades cedidas individuales y medias ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de los lotes de microesferas esterilizadas.*

Porcentajes cedidos (%)														
Tiempo (días)	lote 1	lote 2	lote 3	lote 4	lote 5	lote 6	lote 7	lote 8	lote 9	lote 10	lote 11	lote 12	Media	(±D.E.)
1	5,36	4,94	5,22	6,16	5,57	5,91	5,50	5,49	5,18	4,93	5,25	5,38	5,41	0,36
2	11,01	10,85	11,20	11,84	11,69	11,60	11,10	11,39	10,47	10,44	11,16	11,09	11,15	0,44
4	22,52	19,87	20,79	22,99	20,89	21,51	20,68	22,59	21,54	22,96	20,48	21,04	21,49	1,05
7	39,38	31,21	32,66	35,56	31,53	33,94	31,52	36,93	35,74	35,88	33,23	32,79	34,20	2,52
9	49,26	40,96	41,01	44,82	41,31	43,97	45,06	46,55	45,23	45,56	42,06	43,01	44,07	2,52
11	57,25	51,35	50,57	54,50	55,77	55,12	55,33	55,41	56,08	55,67	55,94	51,97	54,58	2,11
14	69,52	65,56	64,22	69,05	70,38	71,84	68,97	68,89	68,39	67,04	69,51	63,00	68,03	2,60
17	80,53	78,98	77,31	79,88	82,20	81,93	81,70	80,37	79,30	77,90	83,15	76,82	80,01	2,03
21	91,63	89,86	88,70	92,12	92,09	92,59	90,00	91,83	90,12	89,03	93,41	89,11	90,87	1,58
24	98,38	96,73	95,40	98,28	97,36	97,97	96,66	98,27	97,48	96,74	98,05	95,60	97,24	1,03
28	100,31	100,10	98,91	100,16	99,96	100,30	99,86	100,28	100,36	100,22	100,20	98,75	99,95	0,54
31	100,60	101,45	100,14	100,70	101,07	100,77	101,62	100,66	100,96	101,24	100,76	99,71	100,81	0,53
35	100,71	101,72	100,95	100,86	101,60	100,95	101,85	100,79	101,21	101,80	100,99	100,29	101,14	0,50

Tabla 38. Porcentajes cedidos individuales, y medios (±D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de los lotes de microesferas no esterilizadas.

Porcentajes cedidos														
Tiempo (días)	lote 1	lote 2	lote 3	lote 4	lote 5	lote 6	lote 7	lote 8	lote 9	lote 10	lote 11	lote 12	Media	(±D.E.)
1	8,15	7,60	6,59	6,83	6,87	8,11	7,43	6,98	6,16	6,01	6,72	7,16	7,05	0,68
2	16,42	16,54	13,91	14,18	14,86	16,26	15,48	14,78	14,45	13,55	16,19	16,33	15,25	1,09
4	30,12	30,87	29,28	28,35	29,57	28,69	28,43	29,69	28,06	30,06	32,47	32,83	29,87	1,54
7	44,74	48,58	45,09	43,47	45,13	44,44	43,29	45,03	43,52	43,23	45,88	46,88	44,94	1,60
9	51,22	54,63	54,70	52,06	53,83	53,81	52,85	53,96	52,49	50,30	53,64	55,88	53,28	1,57
11	59,74	64,97	65,10	62,23	63,83	63,81	63,25	64,08	63,14	59,97	64,04	66,63	63,40	1,99
14	74,78	78,85	77,93	75,83	76,78	75,51	77,67	77,56	75,81	73,05	78,23	79,45	76,79	1,85
17	86,76	89,90	89,51	86,89	87,79	86,43	87,92	88,12	87,06	84,40	89,80	89,55	87,84	1,66
21	96,51	97,66	97,55	96,29	97,42	95,75	96,08	96,88	95,90	94,29	98,23	96,87	96,62	1,06
24	99,57	99,52	99,56	99,50	99,48	99,52	99,55	100,24	99,33	97,86	99,67	98,93	99,39	0,57
28	99,99	99,86	99,87	100,01	99,86	100,00	100,00	100,78	100,03	98,43	99,96	99,24	99,83	0,55
31	100,16	100,02	100,03	100,18	100,02	100,18	100,14	100,98	100,26	98,60	100,13	99,38	100,01	0,56
35	100,27	100,13	100,10	100,29	100,13	100,29	100,31	101,12	100,39	98,72	100,24	99,49	100,12	0,57

Tabla 39. Porcentajes cedidos individuales y medios ( $\pm$ D.E.) de clorhidrato de flunarizina a partir de los lotes de microesferas esterilizadas.

A partir de los datos recogidos en las tablas 36 a 39 se puede comprobar que no existen diferencias significativas en las cantidades y porcentajes cedidos de clorhidrato de flunarizina antes y después de someter las muestras al proceso de esterilización mediante radiación gamma. Las desviaciones estándar obtenidas son bajas.

De forma más visual, en las figuras 68 y 69, se representan los perfiles de cesión expresados en cantidad, de los 12 lotes de microesferas antes y después de ser sometidos al proceso de esterilización mediante radiación gamma, y en las figuras 70 y 71, los porcentajes cedidos correspondientes a los 12 lotes de microesferas antes y después de ser sometidas las muestras al proceso de esterilización.

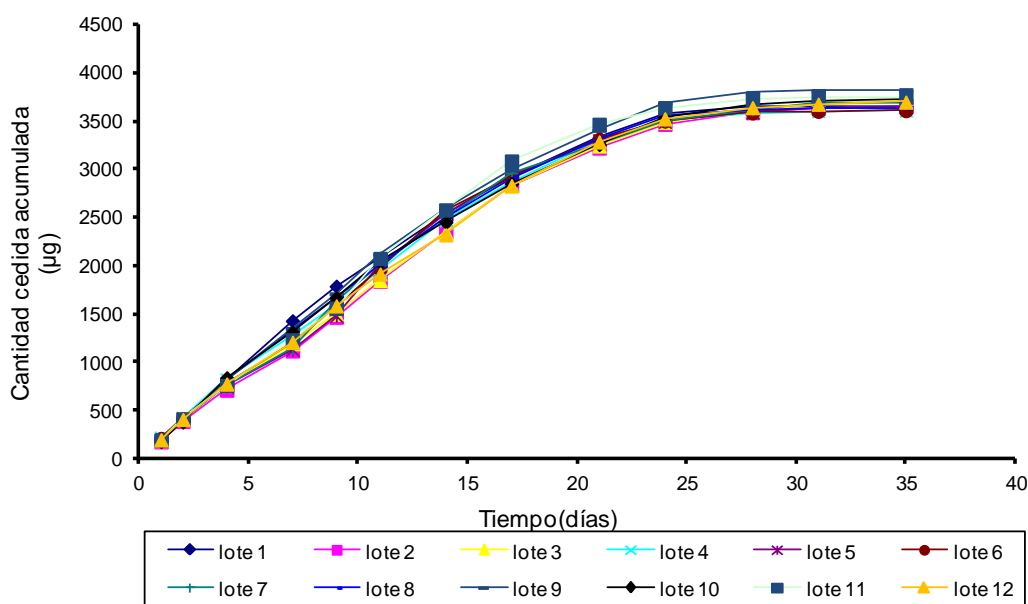


Figura 68. *Perfiles medios de cesión de clorhidrato de flunarizina en cantidad (µg)/10 mg de microesferas, a partir de los 12 lotes de microesferas no esterilizadas.*

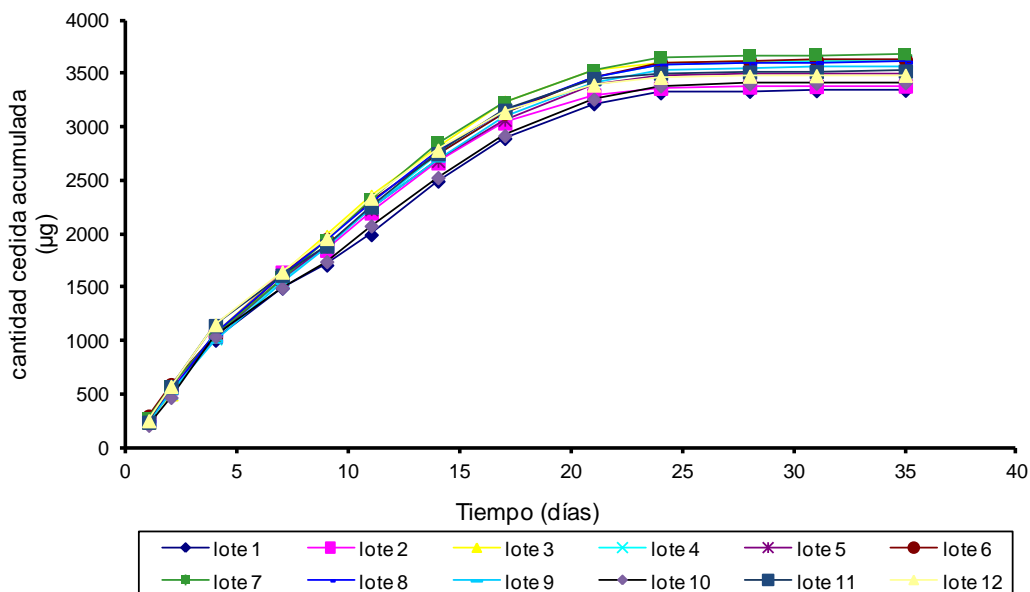


Figura 69. Perfiles de cesión de clorhidrato de flunarizina en cantidad ( $\mu\text{g}$ )/10 mg de microesferas, a partir de los 12 lotes de microesferas esterilizadas.

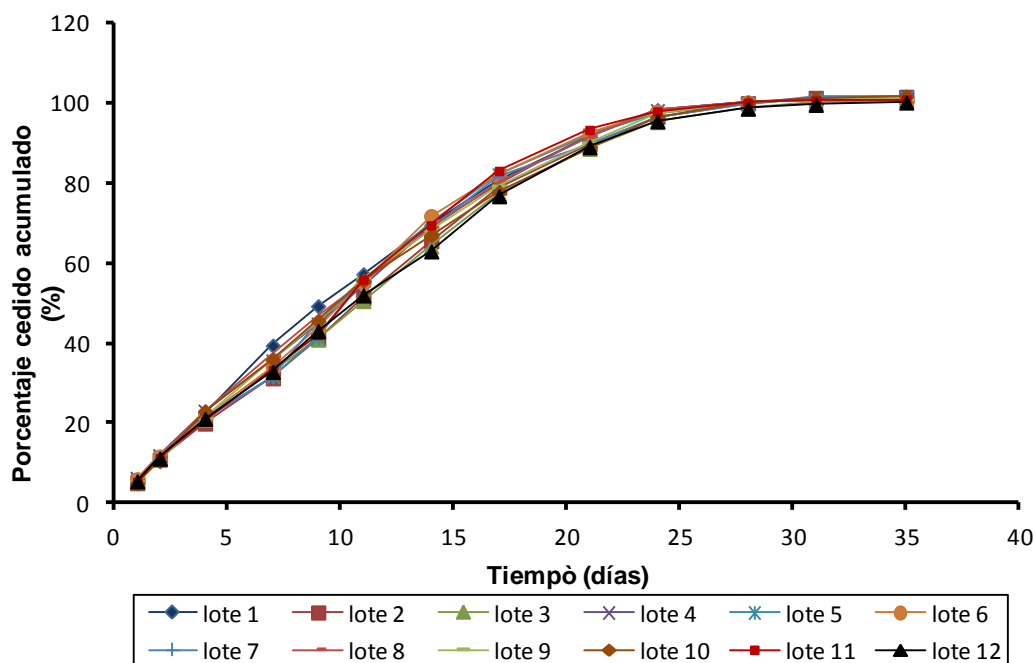


Figura 70. Perfiles de cesión de clorhidrato de flunarizina en porcentajes (%) a partir de los 12 lotes de microesferas no esterilizadas.

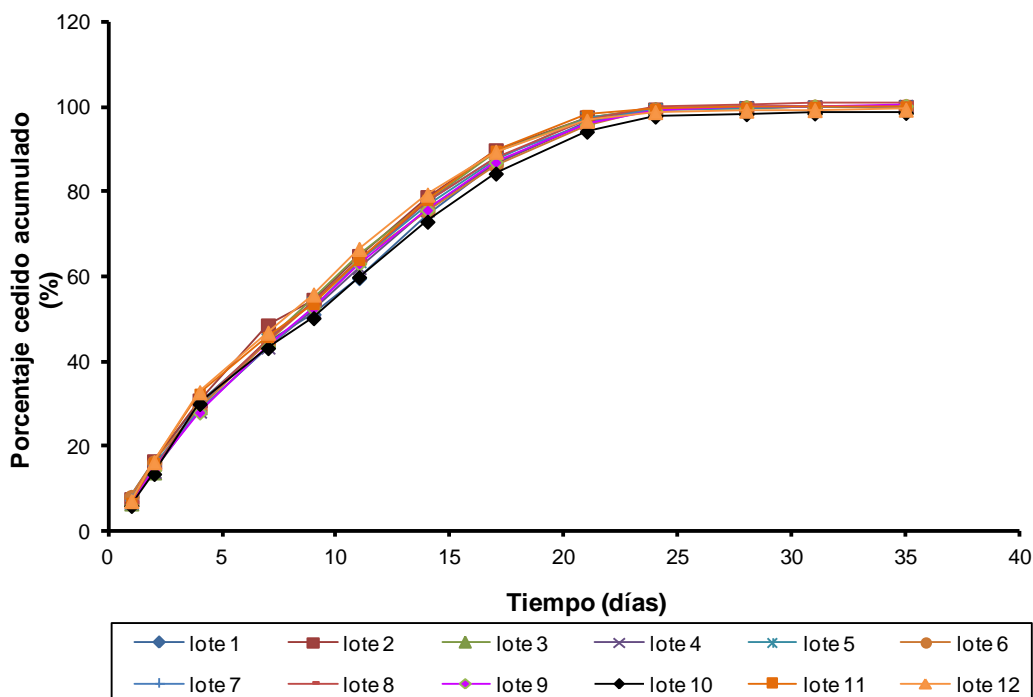


Figura 71. Perfiles de cesión de clorhidrato de flunarizina en porcentaje (%) a partir de los 12 lotes de microesferas esterilizadas.

Por último, y a modo de comparación, en las figuras 72 y 73, se muestra la diferencia entre el comportamiento medio de las microesferas de clorhidrato de flunarizina antes y después de ser sometidas al tratamiento de esterilización por radiación gamma en lo relativo a cantidades cedidas ( $\mu\text{g}/10 \text{ mg}$  microesferas) y porcentajes cedidos, respectivamente. En estas figuras se representan también las desviaciones estándar.

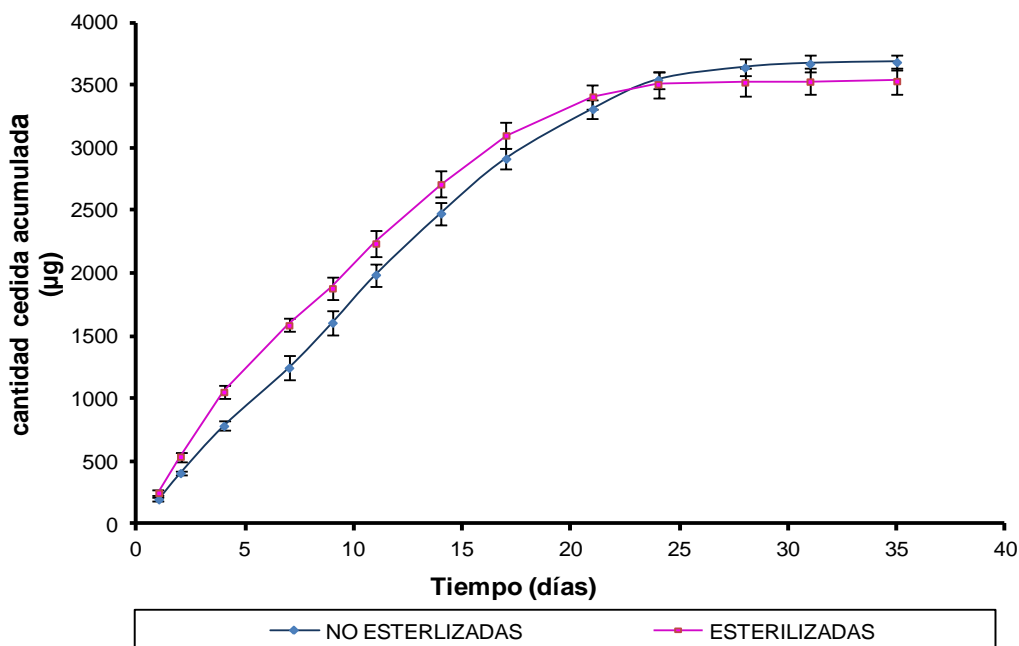


Figura 72. Perfiles medios de cesión de clorhidrato de flunarizina expresados en cantidad ( $\mu\text{g}$ )/10 mg de microesferas a partir de microesferas no esterilizadas y esterilizadas.

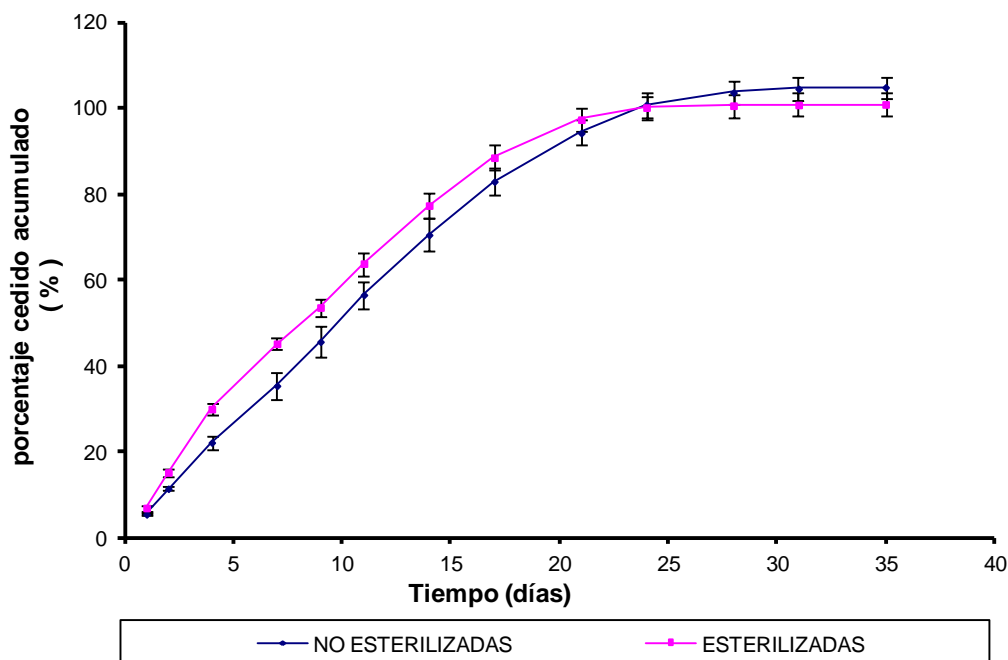


Figura 73. Perfiles medios de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresados en porcentaje (%), a partir de las microesferas no esterilizadas y esterilizadas.

Como se puede comprobar en las figuras 72 y 73, los perfiles medios de cesión de clorhidrato de flunarizina, expresados en cantidad y en porcentaje, son prácticamente superponibles para las microesferas no esterilizadas y las esterilizadas, lo que indicaría que la técnica de esterilización empleada no modifica la cesión del principio activo a partir de este sistema microparticulado preparado con la mezcla de polímeros (PLGA 502H y PLGA 502).

Además se ha procedido a realizar el cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ) como parámetro modelo independiente, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

donde:

$R_t$  = % disuelto promedio del producto a cada tiempo de muestreo antes del proceso (esterilización).

$T_t$  = % disuelto promedio del producto a cada tiempo de muestreo después del proceso (esterilización).

Un valor de 100 para  $f_2$  indica que las dos curvas son iguales. Desde el punto de vista práctico esto no es posible. Por lo tanto, un valor comprendido entre 50 y 100 para  $f_2$  es considerado aceptable.

En nuestro caso, al realizar el cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ) se obtiene un valor de 62, lo que corrobora la similitud de los perfiles y la no influencia de la técnica de esterilización empleada en la cesión del clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Athanasίου K.A., Niederauer G.G. y Agrawal C.M.** Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic/poliglycolic acid copolymers., *Biomaterials.*, 17: 93-102; 1996.

**Davis J.R. (editor).** Handbook of Materials for Medical Devices. ASM International; 2003.

**Fernández Carballido A., Herrero-Vanrell R., Molina-Martínez I.T., Pastoriza P.** Sterilised ibuprofen-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intra-articular administration: Effect of gamma-irradiation and storage., *J. Microencapsul.*, 21: 653-665; 2004.

**Hausberger A.G., Kenley R.A., Deluca P.P.** Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles., *Pharm. Res.*, 12: 851-856; 1995.

**Martínez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S.** Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactico-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration., *J. Control Release.*, 99: 41-52; 2004.

**Real Farmacopea Española. 4º edición.** Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, p 450; 2011.

**Sastre R., De Aza S., Román J.S.** Biomateriales., Primera edición, Faenza, Italia; 2004.

**Sintzel M.B., Merkli A., Tabatabay C., y Gurny R.,** Influence of irradiation sterilization on polymers used as a drug carriers: a review., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 23: 857-879; 1997.

**Tabata Y.** CRC Handbook of Radiation Chemistry Crc Press: Boca Raton, 743; 1999.

**United States Pharmacopeia 33/NF 28.** The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD., 511-520; 2010.

The image features a minimalist, abstract design. Three stylized circular shapes, resembling eyes or lenses, are arranged vertically. Each shape consists of a dark grey outer ring, a light grey inner ring, and a solid black center. Two thin, dark grey diagonal lines intersect at the top left and extend towards the right, framing the central text and shapes. The background is plain white.

**XI. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD  
DE LA FORMULACIÓN  
SELECCIONADA**



## **ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA FORMULACIÓN SELECCIONADA**

### **1. Introducción**

La estabilidad determina la capacidad que tiene un principio activo o un producto de mantener durante un determinado tiempo sus propiedades originales, es decir; su calidad y eficacia. Los estudios de estabilidad tienen como objetivo proporcionar evidencias sobre la variación de la calidad de un compuesto con el tiempo, bajo la influencia de diferentes factores medioambientales: temperatura, humedad y la luz, y establecer el periodo de validez y las condiciones de almacenamiento recomendadas (*ICH, Q1F; 2003; Torres-Suarez y Gil-Alegre, 2005*).

Las diferentes condiciones ambientales pueden ocasionar modificaciones en las características de los polímeros. Así, cuando éstos se almacenan en una atmosfera húmeda, los polímeros absorben agua dependiendo de su estructura y morfología. El agua absorbida por el polímero puede reaccionar con los enlaces biodegradables de las cadenas poliméricas, iniciando el proceso de degradación del material y, por tanto, produciendo un cambio de sus propiedades físico-químicas (*Merkli y col., 1996*), lo que puede afectar a su rendimiento in vivo. Además, la estabilidad de los polímeros está muy afectada por el número y accesibilidad de los grupos polares del mismo. Por tanto, los polímeros capaces de hidrolizarse en presencia de humedad, deben almacenarse en condiciones anhidras (almacenamiento a vacío o en solución orgánica) (*Aso y col., 1993 y Alexis F., 2005*).

En estudios realizados con poliolefinas se produjo una acusada degradación tras ser sometidos a almacenamiento prolongado en ambiente seco, lo que da idea del corto tiempo de validez de estos polímeros en

condiciones ambientales normales (*Engelberg y Kohn, 1991; Zignani y col., 1998*).

En el caso de polianhídridos, su almacenamiento a temperaturas de 5°C y 22°C condujo a modificaciones de las características físico-químicas y a una reducción en el peso molecular (*Edlund y col., 2000*). La reducción en el peso molecular se ha observado también cuando este tipo de polímeros se almacena en condiciones anhidras (vacío o solución orgánica), lo que sugiere que la reacción de hidrólisis no es el único mecanismo responsable de la degradación de los polianhídridos durante su almacenamiento (*Domb y Langer, 1989*).

Otros factores importantes que pueden condicionar la estabilidad de los materiales poliméricos son la incorporación de fármacos en la matriz, su grado de cristalización, así como la pureza del sistema (*Merkli y col., 1996*). Así, por ejemplo, el polímero poli-L-láctico de elevado peso molecular es estable en condiciones normales de humedad ambiental, siempre y cuando esté libre de contaminantes, ya que sus regiones cristalinas actúan como barrera eficaz a la difusión del vapor de agua (*Vert y col., 1995*). Estudios realizados con microesferas de poli L-láctico y poli D, L-láctico han puesto de manifiesto que tras un almacenamiento prolongado, se pueden inducir reacciones de cristalización al aumentar la humedad relativa (*Aso y col., 1993; Lemaire V, 2003*).

Teniendo en cuenta la inestabilidad de los polímeros, unido al hecho de que la incorporación del principio activo pueda afectar a dicha estabilidad, hemos considerado conveniente realizar un estudio de estabilidad de la formulación seleccionada de microesferas de clorhidrato de flunarizina, a fin establecer las condiciones óptimas de almacenamiento.

## 2. Condiciones de almacenamiento de la formulación seleccionada

El estudio de estabilidad se ha llevado a cabo con la formulación de microesferas seleccionada y esterilizadas con radiación gamma, que se prepararon utilizando 185 mg de PLGA 502H y 215 mg de PLGA 502 y un carga de 244 mg de clorhidrato de flunarizina. El protocolo del estudio de estabilidad fue diseñado según las directrices ICH (*ICH, Q1A; 2003; ICH Q1F, 2003; ICH Q1E, 2003*) con ciertas modificaciones (tabla 45). Para la estabilidad a largo plazo de la formulación seleccionada, la formulación fue almacenada en nevera ( $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) y a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/65\%\pm 5\%$  de humedad relativa según las directrices ICH (*ICH Q1F, 2003; ICH Q1A; 2003*), y para el estudio de estabilidad acelerada las condiciones de almacenamiento son de  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\pm 5\%$ , recomendadas por las guías de ICH (*ICH Q1E, 2003*).

El acondicionamiento de las muestras se realiza de la forma siguiente: se pesan alrededor de 100 mg de microesferas de clorhidrato de flunarizina, que se introducen en viales de vidrio que fueron sellados con tapón de goma y cápsula de aluminio, y protegidos de la luz. Las muestras se colocaron en desecadores acondicionados a las humedades relativas seleccionadas y estos a su vez, a temperatura controlada en estufas. La toma de muestras se realiza a tiempo 0, 1, 3, 6 y 18 meses. A cada uno de los tiempos indicados se determina la eficacia de encapsulación y se realiza el ensayo de cesión, de acuerdo a las condiciones experimentales indicadas en esta memoria (apartado 3.3 de los ensayos previos de esta memoria experimental). En todos los casos se utilizaron dos lotes, y las muestras se analizaron por duplicado.

Estudios realizados por De y Robinson (*De y Robinson 2004*), han puesto de manifiesto que microesferas elaboradas con PLGA forman agregados a temperaturas elevadas. Nosotros también encontramos este fenómeno cuando las microesferas se almacenaron a  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\pm 5\%$  de humedad relativa durante un mes, en las que la agregación resultó ser irreversible que ha sido atribuido a la disolución parcial del polímero sobre las capas superficiales que

conducen a la agregación. En vista de este comportamiento, no fue posible realizar el estudio de estabilidad en las condiciones aceleradas, por lo que se han realizado solamente estudios de estabilidad a largo plazo para las microesferas de clorhidrato de flunarizina.

Con el objeto de conocer si el clorhidrato de flunarizina ha sufrido algún proceso de degradación durante el periodo de almacenamiento de la formulación, se procede a la determinación de los rendimientos de encapsulación, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo al método descrito en el capítulo de "Materiales y Métodos" de esta memoria experimental.

En la tabla 40 se muestran de forma más detallada las condiciones del estudio de estabilidad realizado.

<b>Estudio de Estabilidad</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>	<b>Formulación</b>	<b>Tiempo de toma de muestras</b>
<b>Acelerado</b>	40°C ± 2°C/75% HR ± 5% HR	Seleccionada	0, 1 (meses)
<b>A largo plazo</b>	5°C ± 3°C (Refrigeración) 30°C ± 2°C/65% HR ± 5% HR	Seleccionada	0, 1, 3, 6 y 18 (meses)

Tabla 40. *Esquema del planteamiento del estudio de estabilidad.*

### **3. Resultados**

Los resultados obtenidos de los rendimientos de encapsulación durante los estudios de estabilidad a las distintas condiciones de almacenamiento se muestran en las tablas 41 y 42.

<b>Temperatura(5°C ± 3°C)</b>		
<b>Tiempo de muestreo</b>	<b>Eficacia media de encapsulación (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
0 (inicial)	90,64	1,61
1 meses	92,10	3,00
3 meses	88,90	3,58
6 meses	92,32	1,06
18 meses	88,01	3,27

Tabla 41. *Eficacias medias de encapsulación de clorhidrato de flunarizina (±D.E.) en las microesferas almacenadas a 5°C.*

<b>Temperatura (30°C ± 2°C) Humedad relativa (65% HR ± 5% HR)</b>		
<b>Tiempo de muestreo</b>	<b>Eficacia media de encapsulación (%)</b>	<b>(±D.E.)</b>
0 (inicial)	94,67	1,38
1 meses	94,60	1,98
3 meses	93,45	1,44
6 meses	94,61	0,99
18 meses	muestra alterada	

Tabla 42. *Eficacias medias de encapsulación de clorhidrato de flunarizina (±D.E.) en las microesferas almacenadas a 30°C±2°C y 65%±5% de HR.*

No ha sido posible llevar a cabo los ensayos a temperatura de 40°C±2°C y humedad relativa de 75%±5%, porque tal como se ha indicado previamente, las muestras se aglomeraron y cristalizaron a la semana de estar en estas condiciones.

En la tabla 43 se muestran los resultados de cesión del clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas, determinadas por HPLC, correspondientes a los ensayos realizados a tiempo cero.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cantidad media cedida acumulada (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>	<b>Porcentaje medio cedido acumulado (%)</b>	<b>(<math>\pm</math>D.E.)</b>
<b>1</b>	257,90	8,82	7,35	0,16
<b>2</b>	538,38	9,07	15,34	0,23
<b>4</b>	1033,81	13,27	29,47	0,14
<b>7</b>	1586,76	43,03	45,22	0,81
<b>9</b>	1854,57	31,35	52,82	0,72
<b>11</b>	2202,76	62,32	62,73	1,70
<b>14</b>	2669,81	57,61	76,05	1,73
<b>17</b>	3065,05	55,21	87,32	2,01
<b>21</b>	3380,29	41,51	96,30	1,89
<b>24</b>	3474,00	10,34	98,96	1,77
<b>28</b>	3488,24	7,62	99,36	1,72
<b>31</b>	3494,10	7,40	99,53	1,72
<b>35</b>	3498,10	7,73	99,64	1,73

Tabla 43. *Cantidades medias cedidas de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) y sus correspondientes porcentajes ( $\pm$ D.E.) a tiempo cero.*

En las tablas 44–47 se muestran los resultados de los ensayos de cesión de clorhidrato de flunarizina a partir de las microesferas, tras su almacenamiento en las distintas condiciones experimentales.

Tiempo (días)	1 MES		3 MESES		6 MESES		18 MESES	
	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)
<b>1</b>	235,14	23,48	224,09	3,13	266,43	3,13	263,14	19,93
<b>2</b>	531,14	112,81	466,78	15,18	579,57	8,46	625,66	42,06
<b>4</b>	955,32	168,81	880,85	16,01	989,00	66,49	1112,71	54,13
<b>7</b>	1420,19	67,39	1438,41	29,48	1530,33	48,57	1543,14	57,76
<b>9</b>	1779,84	38,77	1788,85	45,89	1914,33	30,55	1822,80	54,77
<b>11</b>	2138,10	118,10	2125,02	52,39	2290,52	79,04	2103,66	46,22
<b>14</b>	2566,27	89,88	2510,33	53,69	2805,95	145,08	2449,06	44,15
<b>17</b>	2924,53	26,70	2855,11	48,66	3177,57	144,47	2828,01	62,97
<b>21</b>	3125,23	82,06	3081,02	31,47	3422,52	105,11	3092,71	62,38
<b>24</b>	3179,53	124,37	3130,78	29,43	3490,05	95,91	3260,32	41,25
<b>28</b>	3185,10	128,24	3136,59	29,11	3500,48	93,94	3277,45	40,75
<b>31</b>	3185,80	128,94	3137,43	29,19	3504,76	93,79	3279,45	40,57
<b>35</b>	3186,01	129,12	3140,22	27,32	3508,33	94,28	3280,14	40,95

Tabla 44. *Cantidades acumuladas cedidas de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 5°C.*

Tiempo (días)	1 MES		3 MESES		6 MESES		18 MESES	
	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)
<b>1</b>	6,38	0,82	6,83	0,35	7,70	0,14	7,40	0,35
<b>2</b>	13,58	3,69	13,82	0,14	16,52	0,09	17,60	0,88
<b>4</b>	24,89	5,65	26,37	0,57	27,33	1,67	31,34	2,17
<b>7</b>	40,44	3,21	42,99	1,28	43,18	0,99	43,45	2,09
<b>9</b>	51,58	2,75	53,15	1,45	54,99	0,66	51,31	1,82
<b>11</b>	60,66	5,29	63,21	2,08	66,81	2,50	59,22	2,04
<b>14</b>	73,27	4,88	75,11	2,92	82,66	4,51	68,94	1,54
<b>17</b>	83,87	3,36	86,20	3,76	93,29	4,53	79,60	1,78
<b>21</b>	89,48	1,78	93,20	3,05	99,75	3,45	87,05	2,11
<b>24</b>	90,35	1,96	94,51	2,91	101,56	3,21	91,78	2,32
<b>28</b>	90,59	2,02	94,65	2,91	101,82	3,15	92,27	2,57
<b>31</b>	90,62	2,03	94,68	2,91	101,95	3,15	92,32	2,62
<b>35</b>	90,63	2,04	94,78	2,97	102,06	3,16	92,34	2,62

Tabla 45. *Porcentajes medios cedidos de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 5°C.*

Tiempo (días)	1 MES		3 MESES		6 MESES	
	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)	Cantidad media cedida ( $\mu\text{g}$ )	( $\pm$ D.E.)
<b>1</b>	275,62	10,66	266,78	17,13	484,57	94,15
<b>2</b>	584,05	30,77	587,48	61,48	1050,07	84,75
<b>4</b>	963,18	63,12	1050,65	55,84	1647,71	78,99
<b>7</b>	1386,31	98,60	1647,52	68,43	2244,29	104,05
<b>9</b>	1734,66	122,63	1987,52	68,90	2668,29	49,09
<b>11</b>	2023,36	135,72	2275,00	75,05	2988,00	12,73
<b>14</b>	2426,14	134,48	2655,70	78,50	3308,29	11,11
<b>17</b>	2831,36	145,10	2982,30	66,61	3519,71	43,03
<b>21</b>	3159,36	90,09	3228,70	28,03	3564,93	36,47
<b>24</b>	3285,88	46,73	3281,43	22,46	3588,64	53,64
<b>28</b>	3317,05	41,81	3293,17	30,47	3593,76	54,21
<b>31</b>	3329,40	45,65	3296,87	34,76	3600,69	59,16
<b>35</b>	3341,92	46,85	3302,39	43,05	3604,41	59,97

Tabla 46. *Cantidades acumuladas medias cedidas de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 30°C y 65% HR.*

Tiempo (días)	1 MES		3 MESES		6 MESES	
	Porcentaje medio cedido (%)	( $\pm$ D.E.)	Porcentaje medio cedido (%)	( $\pm$ D.E.)	Porcentaje medio cedido (%)	( $\pm$ D.E.)
<b>1</b>	7,69	0,35	7,28	0,50	13,51	2,49
<b>2</b>	16,30	1,01	15,67	1,81	29,28	2,06
<b>4</b>	26,89	2,00	28,75	1,65	45,96	1,72
<b>7</b>	38,70	2,99	45,63	2,11	62,60	2,25
<b>9</b>	48,42	3,79	55,43	1,83	74,44	0,59
<b>11</b>	56,48	4,12	63,86	1,82	83,36	1,22
<b>14</b>	67,72	4,15	74,71	1,78	92,30	0,65
<b>17</b>	79,01	4,12	83,94	1,30	98,20	2,22
<b>21</b>	88,17	2,69	91,51	1,35	99,46	2,05
<b>24</b>	91,70	1,74	93,57	1,76	100,13	2,54
<b>28</b>	92,56	1,42	93,91	1,98	100,27	2,56
<b>31</b>	92,91	1,31	93,95	2,06	100,46	2,70
<b>35</b>	93,25	1,13	93,97	2,22	100,57	2,72

Tabla 47. *Porcentajes medios cedidos de clorhidrato de flunarizinal ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 30°C, y 65% HR.*

En las muestras almacenadas a 30°C y 65% HR se ha observado que a partir de los 6 meses las microesferas se encuentran totalmente compactadas, por lo que no ha sido posible continuar el estudio en esta condición de almacenamiento.

En las figuras 74 a 77 se muestra el comportamiento de las microesferas durante el ensayo de cesión en las distintas condiciones de almacenamiento.

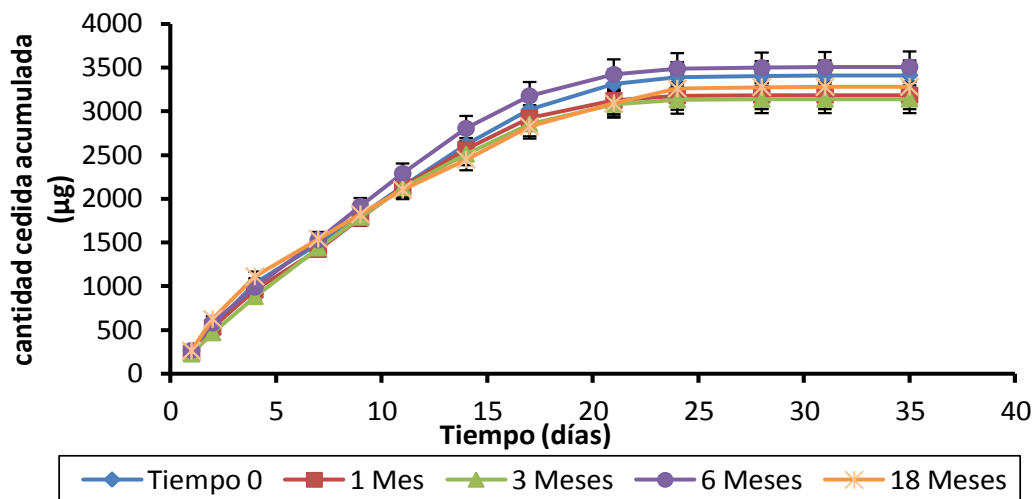


Figura 74. Cantidades medias cedidas acumuladas de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) a partir de las microesferas almacenadas a 5°C.

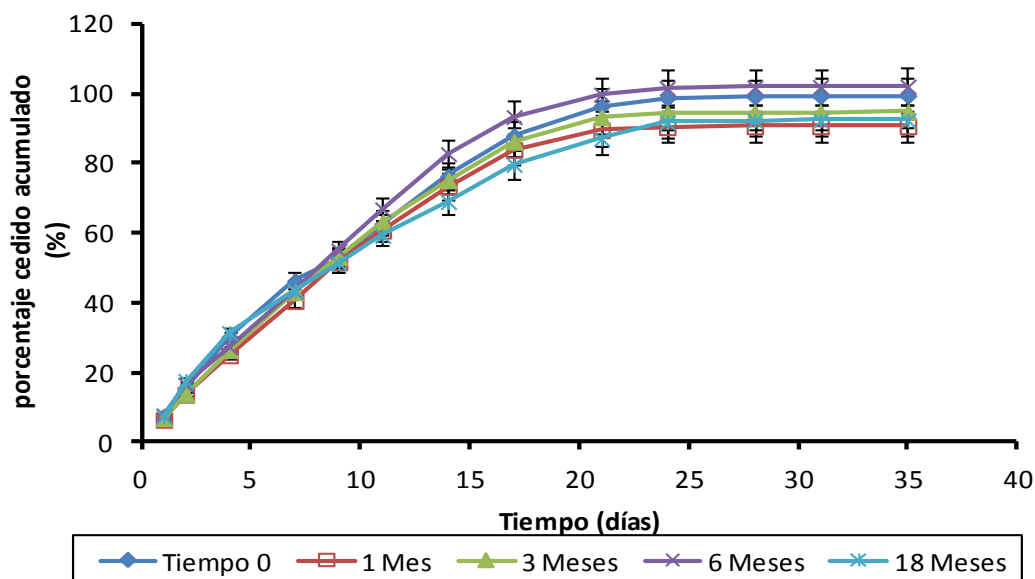


Figura 75. Porcentajes medios cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm D.E.$ ) a partir de las microesferas almacenadas a 5°C.

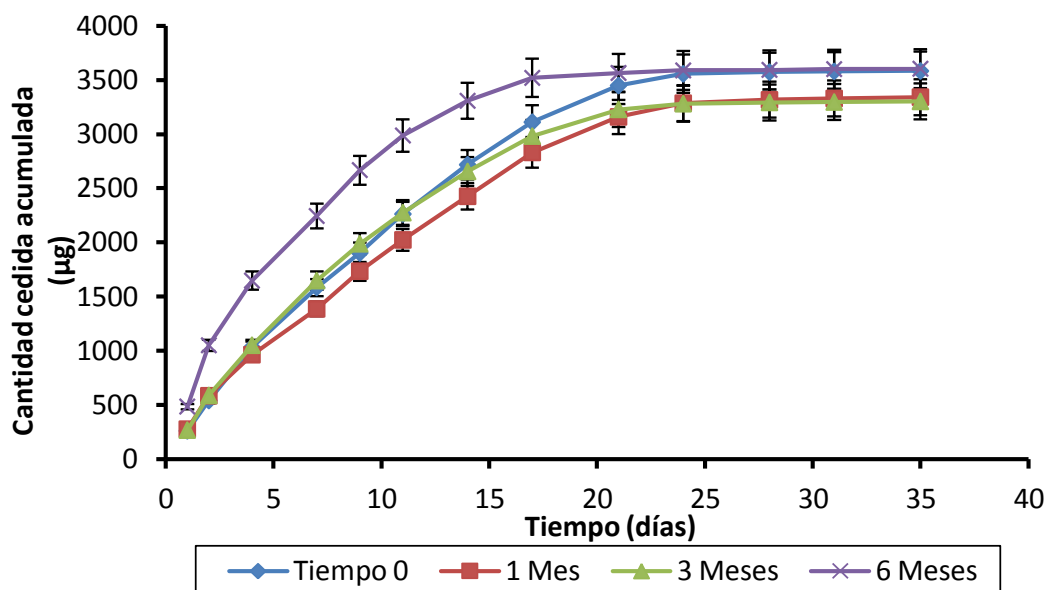


Figura 76. Cantidades medias cedidas acumuladas de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 30°C y 65% HR.

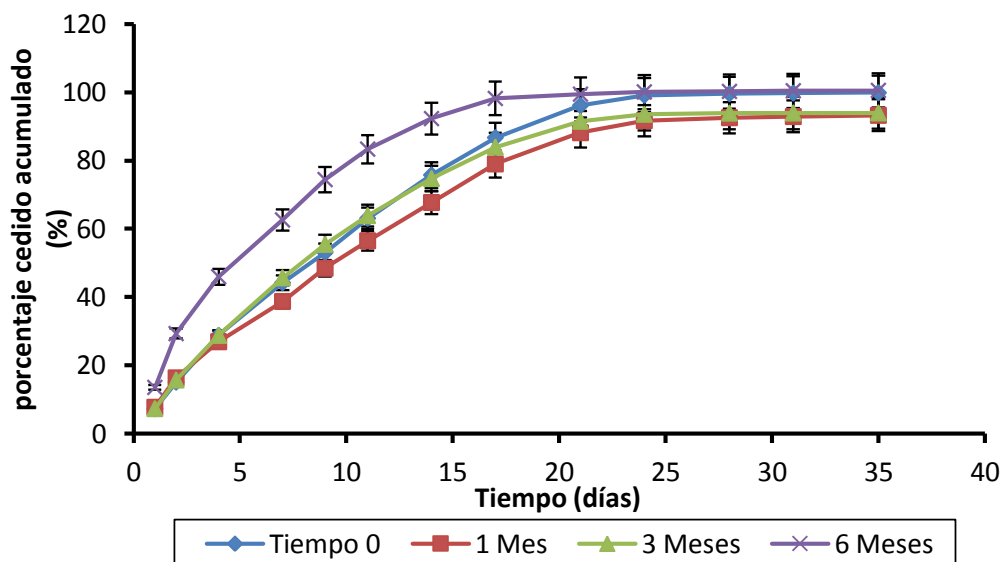


Figura 77. Porcentajes medias cedidos acumulados de clorhidrato de flunarizina ( $\pm$ D.E.) a partir de las microesferas almacenadas a 30°C y 65% HR.

Después del almacenamiento de las microesferas a 5°C y en las condiciones de temperatura y humedad relativa de 30°C y 65% HR, no se observaron cambios significativos en la eficacia de encapsulación, a los distintos tiempos de muestreo.

Por lo que se refiere a los ensayos de cesión realizados en las dos condiciones estudiadas, tras el almacenamiento de las microesferas durante el primer mes, vemos que los perfiles de cesión del fármaco a partir de las microesferas almacenadas tanto a temperaturas de 5°C como a 30°C con 65% HR, son similares sin apreciarse modificaciones en su comportamiento de cesión, alcanzándose una cesión superior al 90% después de haber transcurrido 21 días de iniciarse el ensayo.

El mismo comportamiento se observa cuando se almacenan las microesferas a 5°C durante 1, 3, 6 y 18 meses. Además, los valores del factor de similitud ( $f_2$ ) obtenidos en los estudios de cesión fueron superiores a 50, lo que confirma la similitud de dichos perfiles. Este hecho, unido a que la eficacia media de encapsulación obtenida tras el almacenamiento de la microesferas a 5°C durante 18 meses, difiere en menos de un 5% del valor obtenido a tiempo cero, nos permite indicar que la formulación podría conservarse a 5°C durante al menos 18 meses, sin que haya modificaciones significativas en su comportamiento.

Por lo que se refiere a los estudios de cesión realizados con las microesferas tras su almacenamiento durante 1 y 3 meses a 30°C y 65% HR, no se observa una modificación en su comportamiento con respecto a tiempo cero. Sin embargo, las microesferas almacenadas a 30°C y 65% HR durante 6 meses, muestran distinto comportamiento con una liberación de clorhidrato de flunarizina mucho más rápida, como se puede observar en las figuras 76 y 77. Este comportamiento puede deberse a que el PLGA a temperaturas altas forma agregados.

En las figuras 78 y 79 se muestran fotografías de microesferas de clorhidrato de flunarizina obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) después de su almacenamiento durante 1, 3, 6 y 18 meses a 5°C. Como se puede observar no se producen cambios significativos en el aspecto, forma, superficie y tamaño de las microesferas, lo que concuerda con los resultados de los estudios de cesión indicados anteriormente.

En la figura 80 se recogen fotografías obtenidas por SEM tras el almacenamiento a 30°C y 65% HR durante 1, 3 y 6 meses de las microesferas de clorhidrato de flunarizina. Como podemos observar, tras 1 y 3 meses de almacenamiento se mantiene el aspecto, forma, superficie y tamaño de las microesferas, mientras que tras 6 meses de almacenamiento ocurre que las microesferas forman aglomerados entre sí perdiéndose en los mismos la forma inicial de las partículas. Este hecho explicaría el comportamiento obtenido en los estudios de ensayos de cesión.

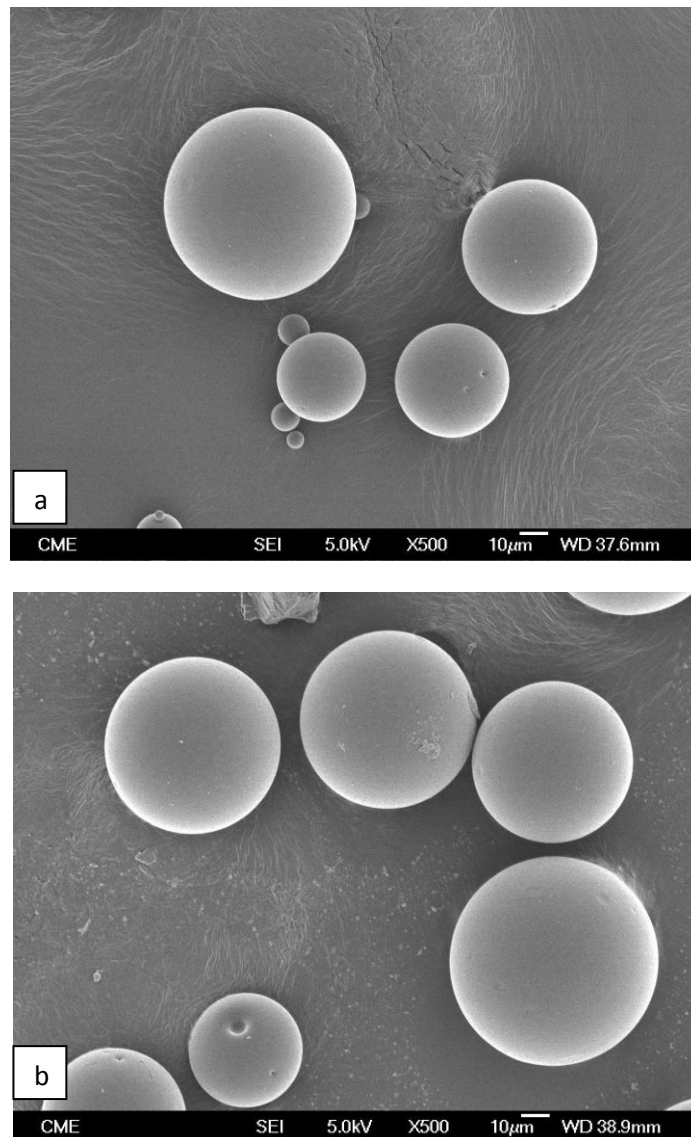


Figura 78. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina a los distintos tiempos de almacenamiento: 1 mes (a) y 3 meses (b), a 5°C.

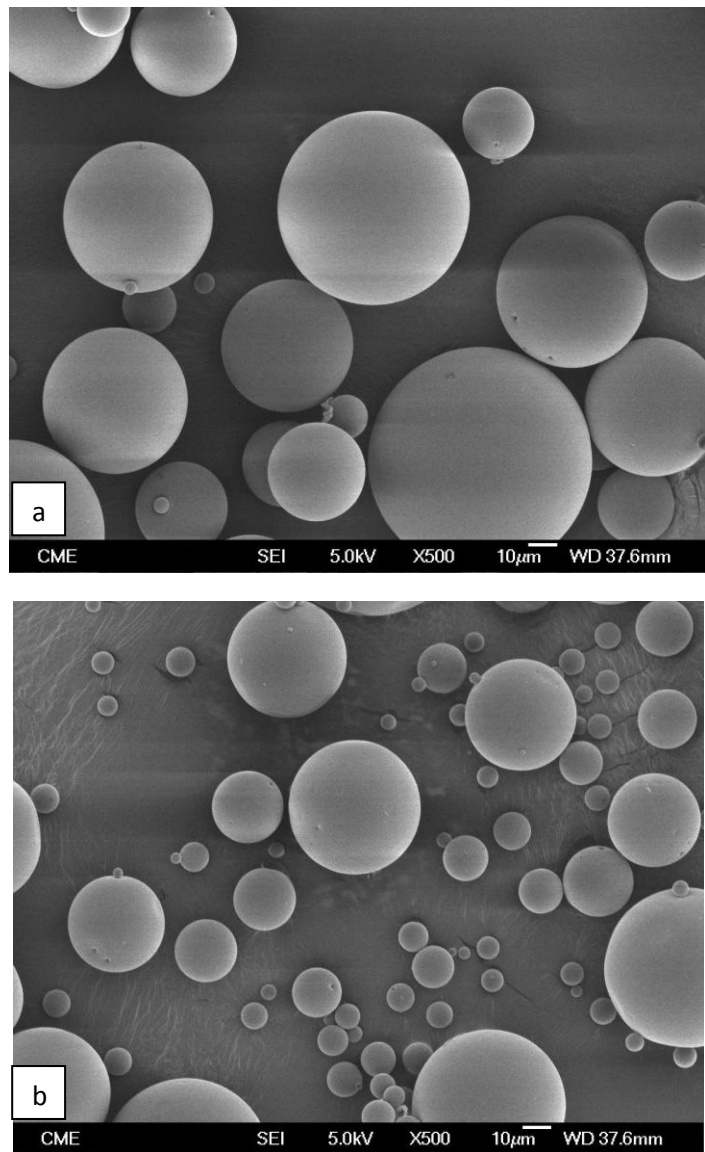


Figura 79. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina a los distintos tiempos de almacenamiento: 6 meses (a) y 18 meses (b), a 5°C.

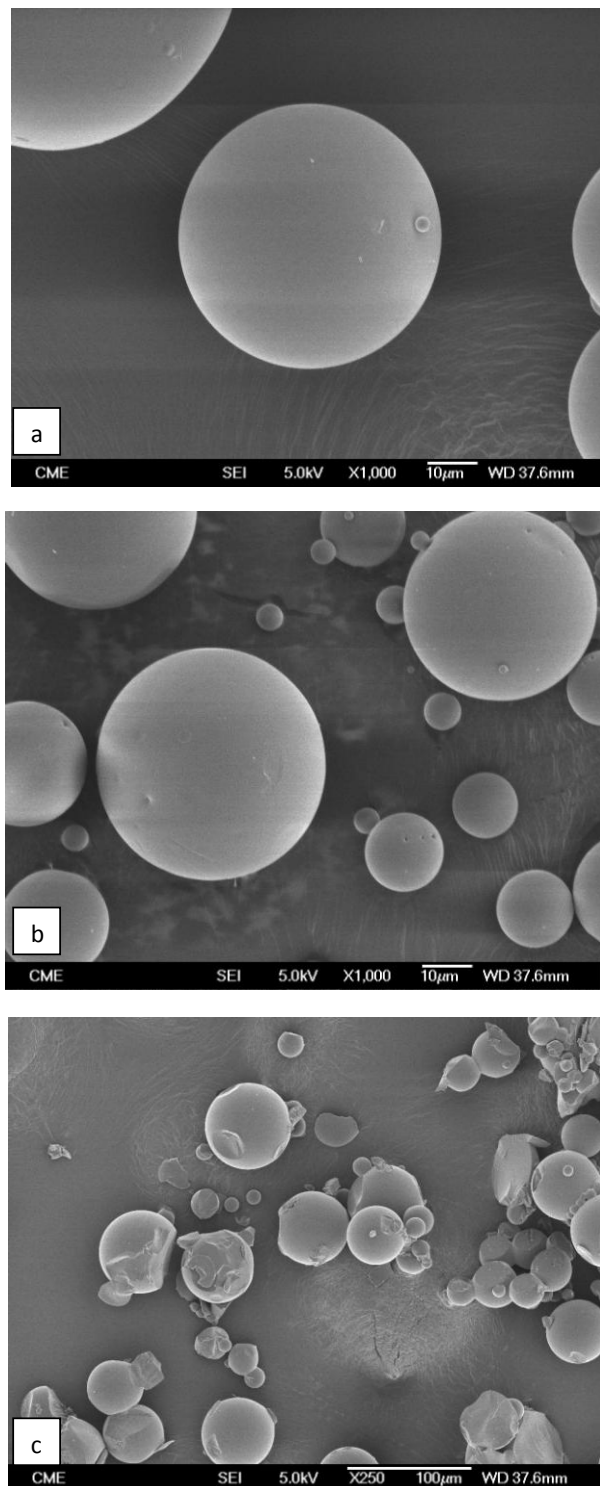


Figura 80. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas cargadas con clorhidrato de flunarizina a los distintos tiempos de almacenamiento: 1mes (a), 3 meses (b) y 6 meses (c) a 30°C y 65 % HR.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Alexis F.** Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly (lactic acid)-co-(glycolic acid)., *Polym Int.*, 54: 36–46; 2005.

**Aso, Y., Yoshioka S., Terao T.** Effects of storage on the physicochemical properties and release characteristics of progesterone-loaded poly (L-lactide) microspheres., *Int. J. Pharm.*, 93: 153-159; 1993.

**Domb A., Langer R.** Solid-state and solution stability of poly (anhydrides) and poly(esters)., *Macromolecules.*, 22: 2117-2122; 1989.

**De S., Robinson D.H.** Particle size and temperatura effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing Bodipy., *AAPS Pharm Sci. Tech.*, 5: 18-24; 2004.

**Edlund U., Albertsson A.C., Singh S.K., Fogelberg I., Lundgren B.O.** Sterilization, storage stability and in vivo biocompatibility of poly (trimethylene carbonate)/poly (adipic anhydride) blends., *Biomaterials.*, 21: 945-955; 2000.

**ICH.** Topic Q1A (R2), Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products. CPMP/ICH/2736/99; 2003.

**ICH.** Topic Q1E (R2), Evaluation of Stability Data, Note for Guidance on Evaluation of Stability Date. CPMP/ICH/420/02; 2003.

**ICH.** Topic Q1F Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV. CPMP/ICH/421/02; 2003.

**Engelberg I., Kohn J.** Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study., *Biomaterials.*, 12: 292-304; 1991.

**Lemaire V., Belair J., Hildgen P.** Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process., *Int. J. Pharm.*, 258:95–107; 2003.

**Merkli A., Heller J., Tabatabay C., Gurny R.** Purity and stability assessment of a semi-solid poly(ortho ester) used in drug delivery systems, *Biomaterials.*, 17: 897-902; 1996.

**Torres-Suárez A.I., Gil-Alegre M.E.** Globalización de los requisitos para la comercialización de medicamentos: importancia de la humedad ambiental en el diseño de los estudios de estabilidad., *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 71: 111-126; 2005.

**Vert M., Schwarch G., Coudane J.** Degradable polymers, recycling, and plastics waste management. Present and future of PLA polymers. *Macromol., Sci. Pur. Appl. Chem.*, 195-207; 1995.

**Zignani M., Bernatchez S.F., Le Minh T., Tabatabay C., Anderson J.M., Gurny R.** Subconjunctival biocompatibility of a viscous biodegradable poly(ortho ester)., *J. Biomed. Mat. Res.*, 39: 277-285; 1998.

The image features a minimalist, abstract design. Three stylized eyes are arranged vertically, each composed of a dark grey outer ring, a light grey middle ring, and a solid black pupil. Two thin, dark grey diagonal lines intersect to form a large 'V' shape that frames the eyes. The text 'XII. CONCLUSIONES' is centered in the middle of the page.

## **XII. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Se han optimizado y validado dos métodos de detección y cuantificación del clorhidrato de flunarizina mediante espectrofotometría de primera derivada y cromatografía líquida de alta resolución a partir de microesferas biodegradables de PLGA. Ambos métodos resultaron ser lineales, exactos, precisos, sensibles, robustos y selectivos para las condiciones experimentales.
2. Los estudios de viabilidad celular realizados en cuatro líneas celulares (PC3, T47, A-498 y SKN-AS) tras exposición de las mismas durante 24 y 48 horas a concentraciones crecientes de clorhidrato de flunarizina (80 a 300  $\mu\text{M}$ ), han puesto de manifiesto que todas las líneas celulares, en mayor o menor medida, son sensibles al efecto de concentraciones crecientes del fármaco.
3. Se ha desarrollado un método de evaporación-extracción del solvente para la microencapsulación del clorhidrato de flunarizina a partir de una emulsión O/A, utilizando como polímeros PLGA 502 y PLGA 502H. Las microesferas preparadas con PLGA 502 ceden menos de un 6% de principio activo durante la primera semana aproximadamente, obteniéndose un 90% de cesión al cabo de tres semanas. Cuando se utiliza PLGA 502H en la elaboración de las microesferas se produce el 100% de cesión a las dos semanas. La elaboración de microesferas de clorhidrato de flunarizina utilizando mezclas de ambos polímeros, a partir de un diseño experimental, resultó adecuada para el control de la liberación del principio activo.
4. La optimización de la formulación de microesferas de flunarizina, a partir de un diseño experimental, nos permitió establecer como formulación óptima aquella preparada con 244 mg de clorhidrato de flunarizina y 185 mg de PLGA 502H y 215 mg de PLGA 502. Para esta formulación, la eficacia de encapsulación fue superior al 95%, con una velocidad de cesión del principio

activo, de acuerdo a una cinética de orden cero de 169 µg/día/10 mg de microesferas durante las primeras dos semanas.

5. El método de evaporación del solvente, a partir de una emulsión simple de fase externa acuosa, utilizando una mezcla de PLGA 502H y PLGA 502, resulta adecuado para la microencapsulación del clorhidrato de flunarizina.

6. La esterilización de las microsferas de flunarizina, mediante su exposición a una dosis de radiación gamma de 25 KGy, en las condiciones descritas en la presente memoria, no producen cambios significativos en sus características iniciales.

7. Los estudios de estabilidad realizados con las microesferas de flunarizina nos permiten asegurar la estabilidad de las mismas durante al menos 18 meses, si se conservan a 5 °C.

The image features a minimalist, abstract design. Three stylized eyes are arranged vertically, each composed of a dark grey outer ring, a light grey middle ring, and a solid black pupil. Two thin, black diagonal lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the eyes. The text 'XIII. SUMMARY' is centered in the middle of the page.

**XIII. SUMMARY**



## SUMMARY

### INTRODUCTION:

Flunarizine is a non-selective calcium antagonist. A highly lipophilic, poorly water-soluble substance, which distributes preferentially in adipose tissue and binds tightly to plasma and tissue proteins. The compound is easily absorbed in the gastrointestinal tract. Because it is lipophilic, flunarizine passes the blood-brain barrier and reaches the brain in significant quantities. For its elimination the drug suffers metabolic degradation occurring principally via aromatic hydroxylation and oxidative dealkylation.

Flunarizine can be used for the prophylaxis and treatment of migraine attacks. It is effective in reducing attack in all forms of migraine but is particularly effective in migraine with severe and disabling neurological symptoms (for instance, migraine with aura or one-sided weakness) with dizziness or vertigo.

### OBJECTIVE

The main objective of this doctoral thesis is the development of a new dosage form for the treatment of migraine, consisting of biodegradable microspheres of flunarizine and destined to achieve a controlled release of the drug for as long as possible.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

- Preliminary tests in cell cultures (PC3, T-47, A-498, SKN-AS) are performed in order to evaluate cell viability and ROS (reactive oxygen species) production after exposure to increasing concentrations of flunarizine HCl.
- Development and validation of two analytical techniques for the quantification of flunarizine HCl: first derivative spectrophotometry and HPLC.
- Development and characterization of biodegradable microspheres of flunarizine HCl using PLGA 502 and PLGA 502H.

- Optimization of the formulation by means of an experimental design.
- Sterilization of the optimized formulation by gamma irradiation and its characterization.
- Stability studies of the optimized formulation of flunarizine HCl microspheres.

## **RESULTS AND CONCLUSIONS**

- Cell viability studies performed after exposure for 24 h and 48 h of PC3, T-47, A-498 and SKN-AS cells to increasing concentrations of flunarizine HCl (80 to 300  $\mu$ M) showed that all cell lines were sensible to the drug.
- Two analytical techniques for the quantification of flunarizine HCl encapsulated in biodegradable microspheres (first derivative spectrophotometry and HPLC) have been developed and validated. Both methods comply with the validation requirements showing linearity, accuracy, precision, selectivity and sensibility.
- A new microencapsulation method for flunarizine HCl has been developed based on the extraction-evaporation technique from an O/W emulsion. The polymers employed are PLGA 502 and PLGA 502H. The microparticles prepared with PLGA 502 release less than 5% of the drug during the first 7 days and 90% at the end of the second week of the in vitro test. Microparticles prepared with PLGA 502H release 100% of the drug during the first two weeks of the in vitro assay.
- Elaboration of flunarizine HCl microparticles with mixtures of both PLGA 502 and PLGA 502H polymers, from an experimental design, was adequate to control the in vitro release of the drug.
- Optimization of the formulation resulted in microspheres prepared with 244 mg flunarizine HCl, 185 mg PLGA 502H and 215 mg PLGA 502. For this formulation encapsulation efficiency was 95% with an in vitro zero order release constant of 169  $\mu$ g/day/10 mg microspheres kept for two weeks.

- Sterilization of the optimized formulation by gamma irradiation (irradiation dose 25 KGy) did not significantly modify the initial characteristics of the microparticles.
- Stability studies performed with the optimized formulation showed that flunarizine microparticles can be stored for at least 18 months at 5°C without significant modification of their initial characteristics.