



**MONTAJE Y PUESTA A PUNTO DE UN
DISPOSITIVO *TWIN IMPINGER* PARA LA
DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA EFICACIA
DE LA NEBULIZACIÓN**





TRABAJO FIN DE GRADO

Montaje y puesta a punto de un dispositivo *Twin Impinger* para la determinación *in vitro* de la eficacia de la nebulización

Alumno: **Sergio Piñar Corral**

Tutora: María Luisa González Rodríguez

Grado en Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Fecha de presentación: 4 de Julio de 2016

Lugar de presentación: Aula 2 de la Facultad de Farmacia

Trabajo de carácter experimental

INDICE

I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
1. ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS POR VÍA PULMONAR	3
2. FIBROSIS QUÍSTICA.....	6
3. LIPOSOMAS COMO SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS	8
4. EFICACIA DE NEBULIZACIÓN IN VITRO	9
III. OBJETIVOS	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN	10
2. MATERIALES Y REACTIVOS	10
3. MONTAJE DEL DISPOSITIVO <i>TWIN IMPINGER</i>	11
4. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	14
5. VARIABLES ENSAYADAS EN EL ESTUDIO	14
5. 1. pH y conductividad	15
5. 2. Contenido de principio activo (HPLC).....	15
5.3. Distribución de tamaños de partícula	16
5. 4. Carga superficial de las partículas	17
5. 5. Análisis morfológico de partículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	17
V. VALIDACIÓN DEL PROCESO	17
1. Linealidad.....	17
2. Precisión	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
1. FORMULACIONES DE SALBUTAMOL.....	19
1. 1. pH y conductividad	19
1. 2. Análisis dimensional y carga superficial.....	25
1. 3. Contenido de salbutamol en las cámaras de deposición.....	28
2. FORMULACIONES DE TEOFILINA Y CIPROFLOXACINO.....	31
1. pH y conductividad	31
2. Contenido de ciprofloxacino y teofilina en las cámaras de deposición	33
VII. CONCLUSIONES	34
VIII. BIBLIOGRAFA.....	35

I. RESUMEN

Introducción: Actualmente se está avanzando en el desarrollo de nuevos medicamentos para las enfermedades pulmonares. El motivo de esta evolución es el estudio de nuevas formulaciones administradas a las vías respiratorias utilizando los diferentes tipos de inhaladores existentes. Todo esto, gracias a nuevos dispositivos que se utilizan para estudiar el comportamiento de las formulaciones y como afectan a las vías respiratorias, como el *Twin Impinger*.

Objetivo: Evaluar el comportamiento de diferentes formulaciones en diferentes tipos de inhaladores, a través de nuestro dispositivo, *Twin Impinger*. Midiendo las propiedades fisicoquímicas de las muestras para ver qué dispositivo inhalador puede ser más factible para que el medicamento consiga poder alcanzar el pulmón.

Materiales y métodos: En este estudio utilizamos el dispositivo *Twin Impinger* que simula las vías respiratorias. Administrando a través de dos dispositivos de inhalación: MDI y el nebulizador, las correspondientes formulaciones; Salbutamol Sandoz®, Salbutamol nebulizado, ciprofloxacino y teofilina. Se evaluó diferentes propiedades fisicoquímicas como son; pH, conductividad, contenido de principio activo, distribución de tamaños de partícula y carga superficial de las partículas.

Resultados y discusión: Al realizar los ensayos utilizando el *Twin Impinger*, que simula las vías respiratorias y al medir las diferentes propiedades fisicoquímicas observamos que con el nebulizador los medicamentos consiguen alcanzar mejor la zona del pulmón que con los inhaladores presurizados de dosis medida.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron que con el nebulizador consiguen alcanzar mejor los medicamentos las vías aéreas inferiores. Por lo tanto, para futuros estudios sería preferible utilizar formulaciones que se administren a través del nebulizador.

Palabras clave: *Twin Impinger*, pulmón, nebulizador, MDI, inhalación.

II. INTRODUCCIÓN

1. ADMINISTRACIÓN DE MEDICAMENTOS POR VÍA PULMONAR

A la hora de administrar medicamentos por vía pulmonar, es importante conocer aspectos anatomofisiológicos de las vías aéreas (Figura 1), ya que ello contribuye considerablemente al proceso de liberación y acción del propio principio activo (O'Donnell y Smyth, 2011). La vía pulmonar posee una primera zona de entrada que comprende nariz, boca, faringe y laringe por donde, al inspirar el aire, se introduce el medicamento hasta el árbol respiratorio inferior (Seijo, 1997) dividiéndose éste fundamentalmente en zona de conducción y zona de intercambio gaseoso.

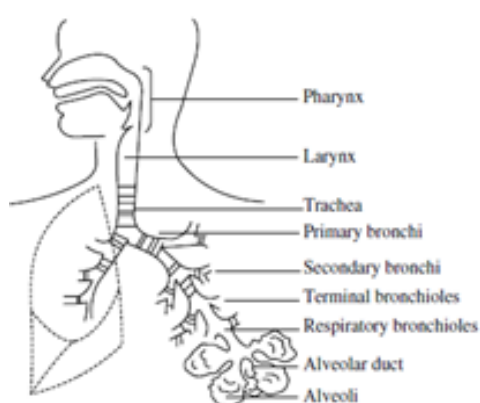


Figura 1. Estructura de las vía aéreas (Welling, 2007).

La zona de conducción antes nombrada, posee una región traqueobronquial, que incluye tráquea, bronquios y bronquiolos terminales (Seijo., 1997). Los componentes de la porción conductora presentan un esqueleto óseo y/o cartilaginoso que permite mantener su luz permeable al aire, constituido a su vez por un epitelio de revestimiento (García y cols., 2015), que al secretar mucus hidratan el epitelio. Tiene efecto protector al captar ciertas partículas inhaladas y no participa en el intercambio gaseoso, aunque cabe destacar que puede darse cierta absorción en los bronquiolos terminales, como es el caso del salbutamol (Fernández y Pere, 2012).

En cuanto a la zona de transición o la zona de intercambio gaseoso es correspondiente a bronquiolos respiratorios, el canal alveolar, los sacos alveolares y los alvéolos (Seijo, 1997) poseyendo un área de contacto de unos 100-140 m² que nos ofrecen en la administración del fármaco siendo una ruta no invasiva, una alta penetración de pulmón y la evitación de metabolismo de primer paso hepático (Mali y cols., 2014). Encontrándose recubiertos por una fina capa de surfactante con propiedades tensioactivas, para prevenir el colapso de la pared alveolar.

En esta zona de intercambios gaseoso se produce el intercambio entre O_2 y CO_2 entre alvéolos y capilares sanguíneos (Blanco y cols., 2005) para producir el intercambio de gases y la transcitosis de moléculas, como queda representado en la Figura 2.

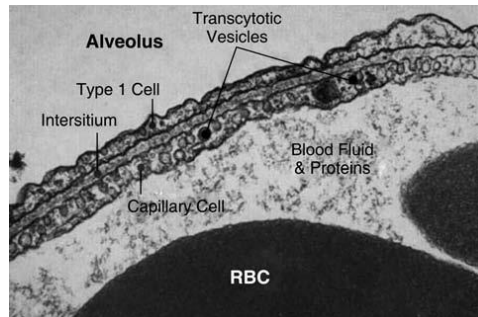


Figura 2. *Trancitosis de moléculas (Newhouse, 2007).*

Esta zona está compuesta tanto por una amplia capa de células ciliadas, cuya función es el aclaramiento, como de células no ciliadas que segregan moco, siendo la principal fuente surfactante pulmonar que cubre los neumocitos tipo I y tipo II, formada también por inhibidores de la proteasa, células lisas y mastocitos (O'Donnell, 2011).

Es importante comentar que a lo largo de las vías respiratorias las partículas de fármaco se depositan en su zona correspondiente (Figura 3), siendo la región donde se retienen las partículas produciéndose la acción del principio activo, ya que ésta depende de la dosis y la distribución que se efectúa en los pulmones (Landaeta y Morales, 2015).

Existen dos tipos de factores que influyen en la deposición de las partículas: intrínsecos del aerosol e inherentes al paciente, entre los que destacan: el tamaño, velocidad de ingreso de partícula, así como el flujo aéreo inspiratorio del paciente y las dimensiones de la vía aérea (Kofman, 2009).

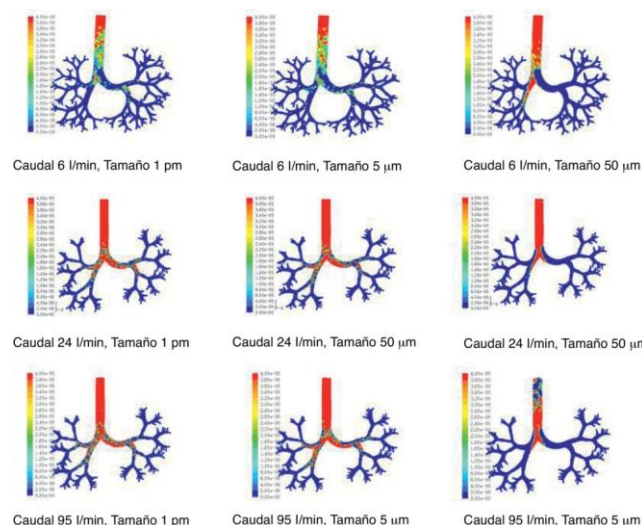


Figura 3. *Deposición según el tamaño de partícula y caudal en las vías aéreas (Fernández y Pere, 2012).*

En el pulmón ocurren diversos mecanismos de deposición de medicamentos, en función del tamaño de partícula y de la zona en la que se encuentre. El primero a destacar es el mecanismo de **deposición por gravedad** afectando a las partículas más pequeñas (2 μm), también a partículas mayores cuando las tasas de flujo inspiratorio son bajas.

La **deposición por inercia** es el principal mecanismo de depósito para las partículas mayores de 2 μm , dependiendo principalmente del flujo inspiratorio, a tasas altas de flujo inspiratorio.

Y por último, la **deposición Browniana o por difusión**, la cual afecta partículas de un tamaño tan pequeño que su movimiento es influido por movimiento browniano, teniendo como resultado unión entre partículas y choques en las vías aéreas (Bazán y cols., 2013).

Por otro lado tenemos que hablar de la importancia en el tema de **absorción** del principio activo inhalado. Ocurre a través de la mucosa que recubre las vías respiratorias, siendo a veces selectivo; sin embargo, cuando el efecto tiene lugar a nivel de los alvéolos, se produce una absorción rápida de primer orden y rápido inicio de acción farmacológica (Newhouse, 2007). A pesar de que se espera una acción local en la mayoría de los casos, cabe la posibilidad de una absorción sistémica por la elevada vascularización de la vía, por lo que eventualmente se recurre a esta administración con efecto sistémico (Seijo, 1997), por las ventajas que presenta, como eliminación de efecto de primer paso hepático y evitando degradación gastrointestinal y hepática, así como ser un método no invasivo de administración de medicamentos alcanzando directamente el tejido diana, por lo que requeriría menor dosis, disminuyendo los efectos secundarios (Newhouse, 2007).

Los neumocitos tipo II son los responsables de sintetizar y secretar el surfactante alveolar, una capa líquida que recubre el epitelio, formada por un 8-10% de proteínas y un 90% de lípidos, de los que cabe destacar la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) responsable de las propiedades tensioactivas del surfactante. El surfactante constituye una función de gran importancia, ya que reduce la tensión superficial mientras se comprime el alvéolo, empaquetándose DPPC (Figura 4), donde la tensión superficial de los alvéolos se ve reducida en presencia del surfactante, por lo que se necesita menos esfuerzo por parte de éstos en la extensión y compresión. Otra de las funciones es que mantiene la homeostasis pulmonar y que contribuye a la defensa del organismo frente a patógenos (Pérez, 2008).

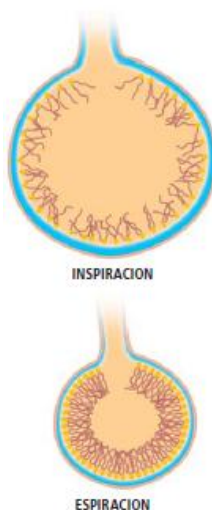


Figura 4. Reducción de la tensión superficial mientras se comprime el alveolo (Newhouse, 2007).

Para la administración de estos fármacos inhalados se usan aerosoles, consistentes en soluciones o suspensiones de pequeñas partículas sólidas en un gas. Los inhaladores generan aerosoles de partículas sólidas y los nebulizadores de gotículas. Actualmente se dispone de cuatro sistemas diferentes de inhaladores, como los **inhaladores dosificadores presurizados (MDI)**, por su fácil uso, buen depósito y menor riesgo de contaminación (Cortés y García, 2013).

Los MDI, pueden poseer una cámara espaciadora con o sin mascarilla, evitando la coordinación entre pulsación/inhalación aumentando así el depósito en un 20% y la deposición orofaríngea, siendo baratos y fácilmente transportables (Torregrosa, 2005). Otro tipo son los **inhaladores de polvo seco (DPI)**, que al igual que los anteriores, no precisan coordinación y cuya dosis liberada de medicamento es uniforme, siendo importante comentar que el depósito pulmonar es superior a los otros sistemas (25-35%). Por último, encontramos los **nebulizadores** que poseen la capacidad de administrar distintos medicamentos juntos y a altas dosis (Úbeda y cols., 2013).

2. FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica hereditaria de forma autosómica recesiva (Rubio y cols., 1999), siendo más frecuente en la raza blanca (Lerín y cols., 2014). Su prevalencia en los países de Europa occidental se da en 1 de cada 2.000 a 6.000 recién nacidos vivos (Barreiro y Marín, 2015) y se manifiesta principalmente por insuficiencia pancreática, enfermedad pulmonar crónica y un incremento de la concentración de electrolitos en el sudor (Rubio y cols, 1999).

La FQ es una enfermedad causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína CFTR, produciéndose una alteración del transporte de cloro y sodio en las células secretoras epiteliales (Figura 5), dando lugar a la aparición de manifestaciones clínicas multisistémicas, siendo más relevantes las del tracto respiratorio (afección pulmonar progresiva) con la disminución de la cantidad de surfactante y acumulación del moco, y del sistema digestivo (insuficiencia pancreática y hepatopatía), sin olvidar otras como la deshidratación por pérdida de iones por el sudor o la infertilidad masculina por atresia o ausencia de los conductos deferentes (Barrio y cols., 2009).

La enfermedad se caracteriza por una serie de manifestaciones clínicas pulmonares, como tos y respiración sibilante asociadas a infecciones pulmonares crónicas o recidivantes, pudiendo desarrollar una tos persistente al comienzo de la infección, por ejemplo por *Pseudomona aeruginosa*. También ocurren manifestaciones a nivel gastrointestinal, provocando malabsorción de macronutrientes, y a nivel genitourinario, donde los varones son estériles debido tanto a la ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes como a la atrofia de los mismos. En las mujeres, la deficiencia en la fertilidad está afectada por la presencia de un moco espeso en el tracto genital dando lugar a amenorrea e infertilidad (Barreiro, 2015).

Dependiendo de donde se localicen las manifestaciones, el paciente tendrá un tratamiento u otro. A nivel del aparato respiratorio, la fisioterapia respiratoria y el tratamiento antimicrobiano son claves en el tratamiento; al primer signo de afectación pulmonar, se inicia la fisioterapia respiratoria. Los antibióticos inhalados son los responsables en los últimos años de la supervivencia del paciente, mejorando la función pulmonar y disminuyendo el tiempo de estancia hospitalaria en el caso de infecciones por *Pseudomonas*. Los corticoides orales están indicados en los lactantes con bronquiolitis prolongada y en los pacientes con broncoespasmo rebelde, aspergilosis broncopulmonar alérgica y complicaciones inflamatorias, por ejemplo en artritis. En el caso del aparato digestivo, el tratamiento más generalizado es la administración de enzimas pancreáticas para la mejora de la absorción de los alimentos, suplementos alimentarios y complejos vitamínicos de aquellas vitaminas que puedan ser deficitarias, y en este caso, se recomienda buena hidratación permanente por vía oral para evitar la sequedad de las secreciones.

La terapia génica y la terapia con chaperonas tiene actualmente un papel innovador en el tratamiento de la FQ (Barreiro y Marín, 2015).

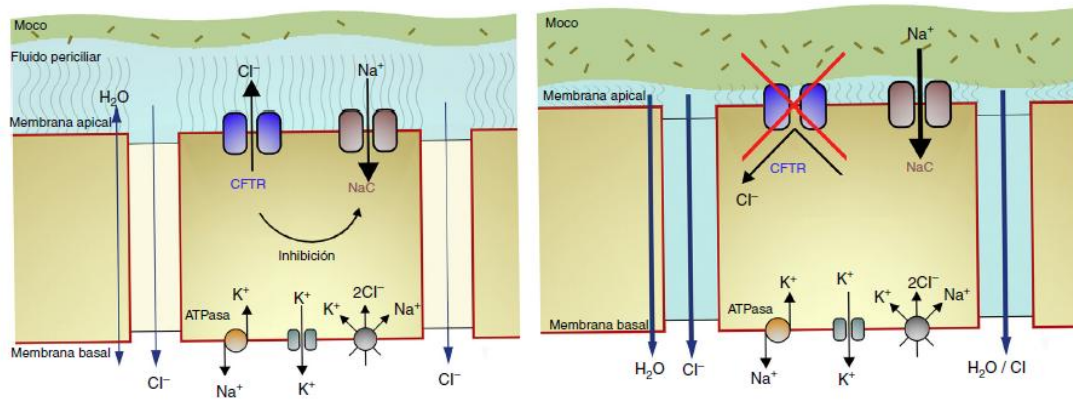


Figura 5. Esquema del canal CFTR en una persona sana (izquierda) y del defecto de la secreción de iones cloro con aumento de reabsorción de sodio y de agua en un paciente con FQ a la derecha (Barreiro, 2015).

3. LIPOSOMAS COMO SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los liposomas son estructuras vesiculares esféricas compuestas de una bicapa lipídica uni o multilamelar que rodea compartimentos internos acuosos, relativamente impermeable (Figura 6). Estos sistemas han adquirido una gran importancia como nanovehículos debido a su gran capacidad de carga relativa. Este grupo de vesículas lipídicas ha recibido una especial consideración como sistemas transportadores de compuestos terapéuticamente activos, debido a sus características únicas, tales como la capacidad para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, biocompatibilidad, baja toxicidad, no activación del sistema inmune y dirigir la liberación de compuestos bioactivos al sitio de acción (González y Rabasco, 2011).

El diseño de medicamentos para administración pulmonar supone un gran reto, y hoy día es un campo donde se han producido numerosos avances. Actualmente, la administración de antibióticos por vía pulmonar aumenta cada año. Por citar algún ejemplo, son numerosos los estudios realizados sobre la administración de sistemas de administración pulmonar con antibióticos y anticancerígenos encapsulados en sistemas nanotransportadores, como los liposomas

Entre los liposomas, los denominados liposomas ultradeformables, gracias a la combinación de los fosfolípidos con activadores del borde en su composición, presentan una bicapa que es capaz de fluctuar espontáneamente a temperatura ambiente. La similitud entre los componentes de estas formulaciones y el surfactante pulmonar, convierte a los liposomas en vesículas idóneas para la administración de fármacos por esta vía.

El éxito de estas formulaciones puede repercutir en la alteración de forma importante de la farmacocinética de la molécula activa, aumentando el tiempo de retención y reduciendo la toxicidad de la misma, prolongando su semivida biológica en el organismo. Por tanto, la

liberación conjunta de ciprofloxacino y teofilina supondría una mejora de la calidad de vida del paciente, gracias a una reducción del número de dosis diarias y, por consiguiente, del coste del tratamiento (Sweeney y cols., 2005).

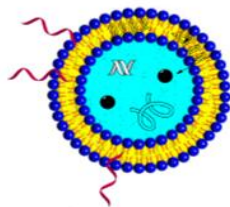


Figura 6. Estructura de un liposoma (Vartak y Sucheck, 2016).

4. EFICACIA DE NEBULIZACIÓN IN VITRO

El nebulizador nos aporta eficacia *in vitro* ya que este dispositivo no requiere coordinación ni pausa respiratoria, podemos hacerlo de manera continua, permitiendo administrar diferentes medicamentos juntos o por separado, así como modificar la concentración de éstos, dándonos diferentes variables que podemos utilizar en el laboratorio. Esta eficacia también es variable, según el nebulizador, y dependiente de la técnica y de factores del propio dispositivo utilizado, en nuestro caso *Twin impinger*, que más adelante hablaremos de él en el apartado IV.3. de metodología.

Para comprobar *in vitro* si las formulaciones elaboradas son capaces de alcanzar las vías respiratorias inferiores (el pulmón), se utilizan diferentes dispositivos de nebulización como son:

- Neumático o Jet, Constan de una fuente de gas (aire comprimido u oxígeno) y de una pipeta nebulizadora en la que, por efecto “Venturi”, se produce la aerosolización de partículas (Kofman, 2009).
- Ultrasónicos: Utilizan un cristal piezoeléctrico para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas de alta frecuencia que pasan a través de la solución generando un aerosol. Suministra partículas de 1 a 6 micras.
- De malla vibrante Energía eléctrica y pueden nebulizar suspensiones y soluciones. Entre sus ventajas destaca una mayor proporción con respecto a la cantidad de fármaco nebulizado (con un menor volumen restante de éste); aportan un mayor depósito pulmonar del aerosol, y son portátiles (López y cols., 2013).

III. OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes expuestos en el apartado anterior, el objetivo principal del trabajo es poner a punto un dispositivo denominado *Twin Impinger* en el laboratorio para determinar la eficacia de nebulización, utilizando como dispositivo de

referencia un nebulizador comercializado de salbutamol. Para ello, este objetivo se desglosa en los siguientes puntos:

- Llevar a cabo el montaje, la puesta a punto y la calibración del *Twin Impinger*.
- Administrar formulaciones nebulizadas de salbutamol por el sistema puesto a punto, utilizando técnicas de pH, conductividad, tamaños de partícula, potencial zeta e índice de polidispersión, comparando los resultados obtenidos con una formulación comercial de salbutamol (pDMI) y con el número de pulverizaciones.
- Extrapolar el estudio a formulaciones de teofilina y ciprofloxacino, fármacos seleccionados en el desarrollo de la nueva formulación nanoparticular en liposomas para el tratamiento de la FQ, evaluando en estas soluciones, la relación de la concentración de fármaco que accede a las cámaras de deposición en función del número de pulverizaciones.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

Los equipos utilizados para desarrollar el trabajo fueron los siguientes:

- Agitador magnético (*Ret Basic IKA*® - WERKE)
- Balanza analítica de precisión (*Explorer*® Pro)
- Bomba de vacío (*Millipore*)
- Centrífuga (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*)
- Conductivímetro (*Hanna*)
- HPLC (*Hitachi HPLC Elite Lachrom*)
- Nebulizador aerosol, "Coryneb Plus" (*Corysan*)
- pH-metro (*Crison pH-meter Basic 20+*)
- Zetasizer Nano ZS (*Malvern Zetasizer*)

2. MATERIALES Y REACTIVOS

- Ácido oleico. Fórmula molecular: C₁₈H₃₄O₂ y peso molecular: 282,4614 g/mol se obtuvo de Barcelona.
- Agua Milli-Q®. se obtuvo de Milli-Q® Advantage, Millipore.
- Agua destilada y agua de grifo.
- Ciprofloxacino HCl: Fórmula molecular: C₁₇H₁₈CLFN₃O₃XH₂O y peso molecular 367,8 g/mol. Fagron(Barcelona).

- Dihidrogenofosfato de potasio. Fórmula molecular: KH_2PO_4 y peso molecular 136.086 g/mol. Se encuentra disponible como cristales incoloros o granulos de polvo blanco. Calidad analítica (Panreac, Barcelona).
- Dihidrogenofosfato de sodio anhidro: Fórmula molecular: Na_2HPO_4 y peso molecular 141.96 g/mol. Se dispone como cristales incoloros o polvos (Panreac, Barcelona).
- Etanol, formula molecular $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y peso molecular: 46,06844 g/mo.l
- Salbutamol Sandoz [®], *Fórmula molecular*: $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ y peso molecular: 239.31074 g/mol.
- Salbutamol sulfato. Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ y peso molecular . Polvo cristalino blanco o casi blanco, soluble en agua.
- Teofilina (Barcelona) Fórmula Molecular: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$ Peso Molecular: 180,16 se obtuvo de Panreac (Barcelona).
- Twin Impinger.

3. MONTAJE DEL DISPOSITIVO TWIN IMPINGER

Es un dispositivo destinado a la evaluación *in vitro* de nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de polvo seco. Desarrollado inicialmente por los laboratorios GSK en Reino Unido, el *Twin Impinger* es relativamente fácil de montar, usar y muy simple (Copley Scientific., 2015).

La principal ventaja del dispositivo es que es fabricado a partir de vidrio, por lo tanto no es sensible a fenómenos de corrosión, a diferencia de otros impactadores metálicos convencionales. Con su diseño (Figura 7), se consigue diferenciar la dosis emitida de un fármaco desde el inhalador en cantidad de partículas que llegan a las vías respiratorias inferiores depositándose (pulmón) y cantidad de partículas que se depositan antes de alcanzar el pulmón. Tenemos dos etapas de diferencias; la primera es la cantidad de dosis que no consigue alcanzar el pulmón chocando en lo que se considera la parte posterior de la garganta de vidrio, que simula la zona de la orofaringe y posteriormente ingiriéndose y otra zona que es la cámara superior que simula las vías respiratorias superiores. La segunda etapa es la cantidad de dosis que consigue alcanzar los pulmones recorriéndose en la cámara inferior. La cámara de impactación superior está diseñada de tal manera que a un caudal de 60 L/min, las partículas que impactan presentan un tamaño de 6 micras o superior. En cambio, las partículas con dimensiones menores de tamaño pasan a la cámara inferior. En ambas cámaras se coloca un volumen determinado de un solvente que, habitualmente, es agua destilada, metanol o etanol (Figura 8). En nuestro caso, se colocaron 7 mL de agua destilada. El agua destilada posee un elevado porcentaje de retención de partículas y además no se evapora; a diferencia

de metanol y etanol. El *Twin Impinger* requiere un especial adaptador de boquilla, una bomba de vacío y un medidor de flujo para completar el sistema, como se aprecia en la Figura 9.

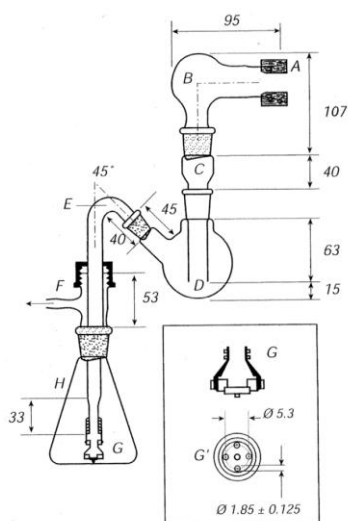


Figura 7. Esquema del *Twin Impinger* (Copley Scientific, 2015).

Table I. Impinger Test Results for First Stage

D_p (μm)	Solution	Amount (ml)	Flow rate (L/min)	Retention (%)
Twin impinger 1				
1.56	Methanol	7	60	0.30
4.33	Methanol	7	60	15.9
4.33	Methanol	5	60	16.0
4.33	Methanol	10	60	13.6
4.33	Methanol	7	54	12.7
4.33	Methanol	7	66	16.9
4.33	D.I. water	7	60	13.2
6.40	D.I. water	7	60	56.0
8.26	Methanol	7	60	91.6
8.26	Methanol	5	60	93.8
8.26	Methanol	10	60	90.8
8.26	Methanol	7	54	91.1
8.26	Methanol	7	66	90.7
8.26	D.I. water	7	60	91.2
10.0	Methanol	7	60	98.2
10.0	D.I. water	7	60	97.2
10.0	D.I. water	5	60	98.3
10.0	D.I. water	10	60	98.3

Figura 8. Diferentes disolventes y sus capacidades de retención (Miller y cols., 1992).



Figura 9. Estructura y componentes del *Twin Impinger*.

En una primera etapa, se cargó un volumen de 7 mL de agua miliQ en el compartimento inferior y 7 mL en el compartimento superior. En estos receptáculos es donde se van acumulando las partículas o las gotículas una vez administradas, según su tamaño.

A continuación se procede al montaje del dispositivo: cámara inferior que simula el aparato respiratorio inferior, cámara superior que simula el árbol respiratorio superior, tercer compartimento y tubo de cristal que simulan la zona de la orofaringe y colocación del inhalador presurizado o el nebulizador.

Finalmente se adapta la bomba de vacío bien atornillada al compartimento inferior para que simule el ejercicio de inspirar, como se aprecia en la Figura 9.

Una vez montado el *Twin Impinger*, se procede a administrar las formulaciones y caracterizarlas para evaluar la efectividad del dispositivo para determinar la eficacia de nebulización *in vitro* de dichas formulaciones.

En la Figura 10 se recoge, a modo de resumen, las variables evaluadas en el proceso.

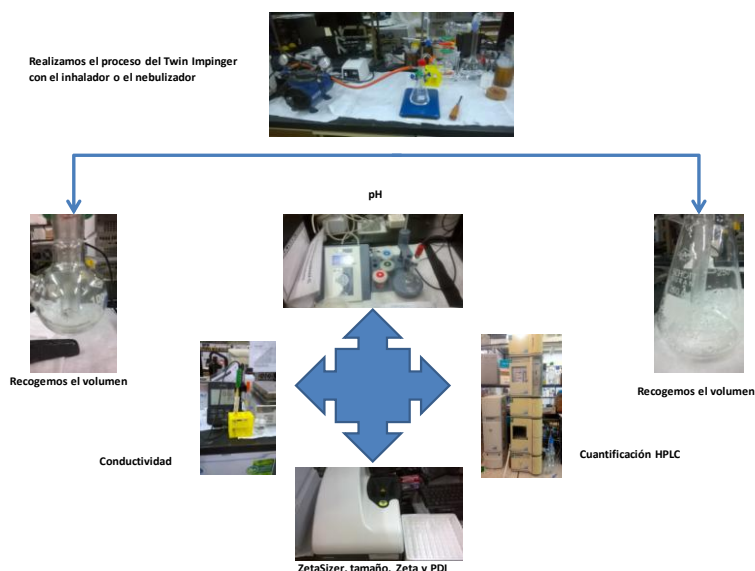


Figura 10. Fases de los procesos llevados a cabo en nuestro estudio.

El sistema nebulizador empleado en este estudio fue un nebulizador de alto flujo con un sistema compresor de pistón, tipo neumático o Jet (*Corysan*). Este tipo de dispositivos convierte un líquido en pequeñas gotas (atomización) como una niebla que normalmente está dentro del rango de las partículas respirables (1-5 μm) (López y cols., 2013) mediante la fuerza de un gas comprimido (aire u oxígeno) (Kofman, 2009). El tamaño de las partículas depende de la solución así como de la velocidad y el flujo del gas. Un aumento de la velocidad del gas disminuye el tamaño de las partículas (López y cols., 2013).

Algunas de las ventajas que presenta es su facilidad de inhalación, capacidad de administrar diferentes medicamentos juntos y a diferentes dosis, ser compatible con

oxigenoterapia y ventilación asistida y proporcionar humidificación de las vías aéreas. Sin embargo, también son importantes sus limitaciones, como que un 2-10% de la dosis se deposita en el pulmón, la duración del tratamiento cambia y puede ser prolongado (10-20 minutos por dosis), es complicado utilizarlo en casa y requiere una buena limpieza (Úbeda y cols., 2013).

Este inhalador, en el cual se introducirá la formulación, será adaptado al *Twin Impinger* y se realizará un estudio comparativo con un inhalador presurizado con la misma formulación que el anterior. Este tipo de inhalador presurizado contiene el fármaco disuelto o en suspensión en un propelente. Este, al ser expuesto a la presión atmosférica, se transforma de líquido en gas produciendo el aerosol y pudiendo ser inhalado por el paciente (López y cols., 2013).

Entre sus ventajas destaca su bajo coste, facilidad de uso, precisando un flujo inspiratorio bajo, permitiendo la percepción de la inhalación y además la dosis administrada es exacta, estéril y reproducible. Entre sus limitaciones cabe citar que cuando se utiliza sin cámara espaciadora disminuye en gran parte su eficacia, una mala técnica de utilización da lugar al fracaso terapéutico, el propelente puede causar broncoespasmo, la media de deposición en pulmón es 10 – 25% de la dosis total, el uso de cámaras espaciadoras es más engorroso y encarece el tratamiento (Úbeda y cols., 2013).

4. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Se partió de la formulación comercial Salbutamol Sandoz®. El principio activo es salbutamol que se presenta como sulfato. Una dosis fija contiene 100 microgramos de sulfato de salbutamol (AEMPS). Como excipientes de la formulación se emplearon: ácido oleico (0.0046 mg), etanol (0.72 mg) y norflurano (33.86 mg).

Los ensayos realizados con salbutamol se llevaron a cabo reproduciendo la formulación comercial, a excepción del gas (A.N.A.M.T., 2012). Esta formulación se administró utilizando el nebulizador *Coryneb Plus* y calculando la equivalencia entre número de pulverizaciones y volumen equivalente. De esta forma, se estableció que 20 pulverizaciones equivalían a 1 mL.

Las soluciones de ciprofloxacino se prepararon a una concentración de 2 mg/mL mientras que las soluciones de teofilina se ensayaron a una concentración de 1 mg/mL.

5. VARIABLES ENSAYADAS EN EL ESTUDIO

Se seleccionaron diferentes variables relacionadas con las muestras y se determinaron los valores obtenidos en las distintas formulaciones y en las cámaras inferior y superior del

dispositivo *Twin Impinger*. La idea fue seleccionar algunos parámetros cuantificables que fueran modificando sus valores conforme se incrementaba el número de pulverizaciones.

5. 1. pH y conductividad

El pH, o “potencial de hidrógeno”, es una medida de la concentración de iones de hidrógeno, una medida de la acidez o alcalinidad de una solución. Esta propiedad fisicoquímica fue medida en el pH-metro (*Crison pH-meter Basic 20*) tras administrar las formulaciones en el *Twin Impinger*. La muestra se midió introduciendo el electrodo del pHmetro hasta conseguir que se estabilizase la medida. El electrodo se lavó con agua miliQ entre medidas consecutivas.

La conductividad está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. Estos conductores *iónicos* se denominan **electrolitos**. Igualmente al pH, se midió la conductividad de los medios acuosos correspondientes a las cámaras, que se llevó a cabo en un conductivímetro (*Hanna*) La muestra se midió introduciendo la celda del conductímetro hasta el manguito correspondiente hasta conseguir que se establezca la medida y se anotó el valor numérico (mS/cm). Entre medida y medida se procedió a lavar la celda con agua miliQ.

5. 2. Contenido de principio activo (HPLC)

Para cuantificar de forma exacta y precisa los medicamentos empleados en este estudio, salbutamol, ciprofloxacino o teofilina, el método de elección fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La determinación se llevó a cabo por HPLC de fase reversa mediante un cromatógrafo (*Hitachi HPLC Elite Lachrom*) compuesto de: bomba isocrática L-2130, inyector automático de muestras L-2200, detector de diodo L-2455 y horno Elite LaChrom Hitachi L- 2350. El equipo se encuentra conectado a un ordenador, con el programa EZChrom para procesar los resultados.

La *linealidad* sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados linealmente proporcionales. Para el análisis cuantitativo por HPLC, la respuesta del detector debe estar relacionada con la cantidad de analito presente. El ensayo se realizó con el preparado comercial y la formulación en estudio, que se nebulizó en concentraciones crecientes (2; 2.5; 3; 3.5, 4 y 4.5 mg/mL).

Por otra parte, se prepararon soluciones de teofilina de distinta concentración (1; 2; 3 y 4 mg/mL), las cuales fueron nebulizadas. Con las soluciones de ciprofloxacino se procedió de la misma forma, por lo que se nebulizaron soluciones de 2, 4, 6 y 8 mg/mL, todas ellas concentraciones equivalentes a 20, 25, 30, 35, 40 y 45 pulverizaciones.

Una vez administradas, se procedió a la filtración de las muestras y posterior llenado en viales para inyección en el HPLC. A partir de las áreas de los picos se determinó la linealidad entre la concentración del principio activo y su respuesta. La determinación de la linealidad del método analítico se llevó a cabo mediante una recta de calibrado, utilizando el área de los picos que proporcionaron las diferentes concentraciones del fármaco utilizadas. La respuesta del analito “y”, se compara con las concentraciones correspondientes “x” (Snyder y cols., 2010).

Así, partiendo de una solución estándar de salbutamol (1 mg/mL) y anotando su área correspondiente, se puede calcular la cantidad teórica (mg) que llega de fármaco a la cámara inferior del *Twin Impinger* que simula a los pulmones, relacionándola con las áreas correspondientes según el número de pulverizaciones o volumen nebulizado. Y sabiendo la cantidad teórica y la cantidad real que debería llegar podemos calcular los rendimientos (%) correspondientes en función al número de pulverizaciones o volumen nebulizado.

La cuantificación de salbutamol en las distintas formulaciones se calculó por HPLC. El método utilizó las siguientes condiciones: columna ODS Agilent (150 mm x 4,6 mm, 5 micras). La fase móvil estaba compuesta de una solución dihidrogenofosfato de sodio 0,08 mol/L, pH ajustado valor a 3.10 ± 0.05 con ácido fosfórico y metanol (85:15 v/v). La temperatura durante el análisis se mantuvo a 40 °C, y la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 276 nm (Zhang y cols., 2014). El salbutamol presentó un tiempo de retención de 3.00 minutos (Sutariya y cols., 2006).

La teofilina y el ciprofloxacino fueron cuantificados en las distintas formulaciones mediante HPLC. El método presentó las siguientes condiciones: columna ZORBAX SB C-18 150 x 4.6 mm. Como fase móvil del método isocrático se utilizó metanol 25 mM y tampón fosfato 28/72 (v/v) ajustado a pH 3. El flujo fue de 1 mL/min. La señal fue detectada a 273 nm a temperatura ambiente de 25 °C. El ciprofloxacino presentó un tiempo de retención de 8 min y la teofilina presentó un tiempo de retención de 3,5 min.

5.3. Distribución de tamaños de partícula

El tamaño de las partículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica analiza la cantidad de luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, la cual está relacionada con el tamaño y la forma de las partículas.

El índice de polidispersión (IP) es un parámetro que hace referencia a la homogeneidad/heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población de partículas analizada y por tanto, más heterogéneas serán las partículas inhaladas.

El equipo utilizado fue un zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) que va a medir la distribución de los tamaños. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

5. 4. Carga superficial de las partículas

Las propiedades eléctricas de la superficie de las partículas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de las suspensiones o soluciones, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células.

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas.

Este parámetro resulta de especial interés en los preparados coloidales, ya que constituyen un importante indicador de la estabilidad física de la dispersión. Según la teoría DLVO, un sistema será estable en una solución electrolítica simple cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas sean mayores a sus fuerzas de atracción de Van der Waals.

El equipo utilizado fue un zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) que va a medir la distribución de cargas superficiales de las partículas. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

5. 5. Análisis morfológico de partículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, aportando información morfológica del material analizado.

El estudio de las características morfológicas de las distintas formulaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico Philips XL-30, que posee un detector de electrones secundarios mediante el cual fue posible observar la superficie de las muestras.

Las muestras analizadas se sometieron a deshidratación en presencia de vacío y posteriormente fueron recubiertas con oro (*sputtering*) utilizando una cámara Edwards, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

Las condiciones de trabajo y el procedimiento operativo seguido fue el utilizado para analizar muestras no conductoras, siendo el voltaje de aceleración de 15 kV.

V. VALIDACIÓN DEL PROCESO

1. Linealidad

Tradicionalmente, se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito seleccionado (rango de trabajo).

El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta. Habitualmente, los criterios de aceptación implican una prueba de la “bondad de ajuste” y con frecuencia, se utiliza como criterio de linealidad un coeficiente de correlación (r) igual o superior a 0,99. Sin embargo, este criterio no basta para demostrar la relación lineal, por lo que cabe considerar que se puede utilizar un método que no permita establecer un coeficiente de correlación tan alto como el 0,99 pero permita cumplir los fines previstos (ICH, 2005).

Con ello, se dice que la linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado (Snyder y cols., 2010). En la Figura 4 se recogen las recomendaciones oficiales en este sentido.

Example Minimum Recommended Ranges	
Type of Method	Recommended Minimum Range
Assay	80–120% of the target concentration
Impurities ^a	From the reporting level of each impurity, to 120% of the specification
Content uniformity	70–130% of the test or target concentration
Dissolution	±20% over the specified range of the dissolution test

^aFor toxic or more potent impurities, the range should reflect the concentrations at which these must be controlled.

Figura 11. Rangos de linealidad recomendados por tipo de ensayo (Snyder y cols., 2010).

En este ensayo, se utilizó como variable independiente el número creciente de pulsaciones o volumen nebulizado, según el dispositivo, y como variables dependientes la medida del pH, conductividad y contenido de fármaco.

2. Precisión

La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa (RSD) de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente. La precisión está desarrollada sobre tres mediciones: la repetibilidad, la precisión intermedia y reproducibilidad.

La **repetibilidad** es la capacidad del método de ensayo para generar los mismos resultados en un corto intervalo de tiempo bajo condiciones idénticas (precisión intra-ensayo). Debe determinarse a partir de un mínimo de nueve determinaciones. Su repetibilidad debe cubrir el rango especificado del procedimiento (es decir, tres concentraciones, tres repeticiones cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de ensayo. El criterio de aceptación es cuando el RSD es inferior al 2%.

La **precisión intermedia** se refiere a la concordancia entre los resultados de laboratorio dentro de las variaciones debidas a eventos aleatorios, que normalmente podrían ocurrir durante el uso de un método, tales como diferentes días, analistas o equipos. Para determinar

la precisión intermedia, se emplea un diseño experimental, de manera que los efectos de las variables individuales (si las hubiese) puedan ser monitorizados (Snyder y cols., 2010).

La **exactitud** consiste en la medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión (ICH, 2005).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. FORMULACIONES DE SALBUTAMOL

El primer estudio realizado se centró en analizar el comportamiento de un medicamento comercializado de salbutamol, en forma de aerosol (Salbutamol Sandoz®) con el fin de dilucidar el efecto que tenía la variación del número de pulverizaciones efectuadas en el *Twin Impinger* sobre las propiedades fisicoquímicas de los medios líquidos incluidos en las cámaras de deposición. A continuación, se realizó un análisis comparativo de dicho comportamiento con el que ofrece el nebulizador utilizado para administrar nuestra formulación, de composición similar a la aerosolizada a excepción del gas propelente.

El montaje y la preparación del Twin impinger se realizó siguiendo la metodología indicada en el apartado IV.3. de *Materiales y Métodos* del presente trabajo.

1. 1. pH y conductividad

La determinación de pH y conductividad (mS/cm) utilizados para la detección de muestra correspondiente a la cantidad de salbutamol atomizada (Salbutamol comercial) o nebulizada (nuestra formulación de salbutamol) se desarrolló siguiendo la metodología indicada en el apartado IV.5.1. de *Materiales y Métodos* del presente trabajo.

Se procedió realizando una batería de ensayos con números impares de pulverizaciones y seguidamente, con números pares de pulverizaciones. Los resultados correspondientes al inhalador comercial se recogen en las Figuras 12 y 13.

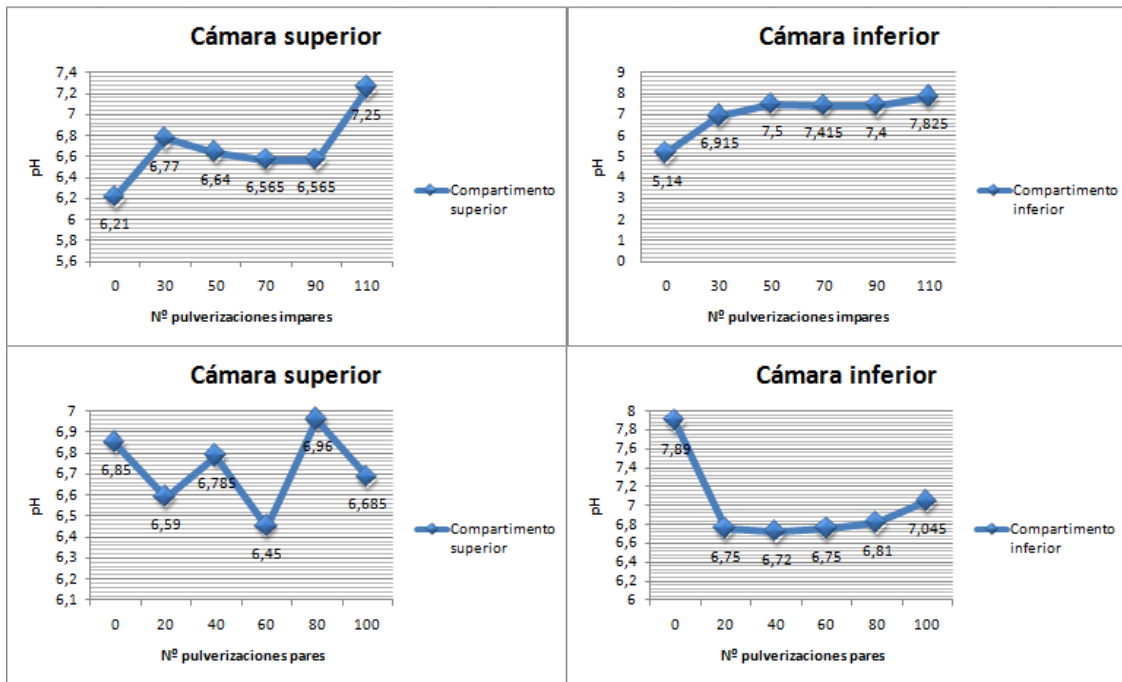


Figura 12. Resultados obtenidos de pH.

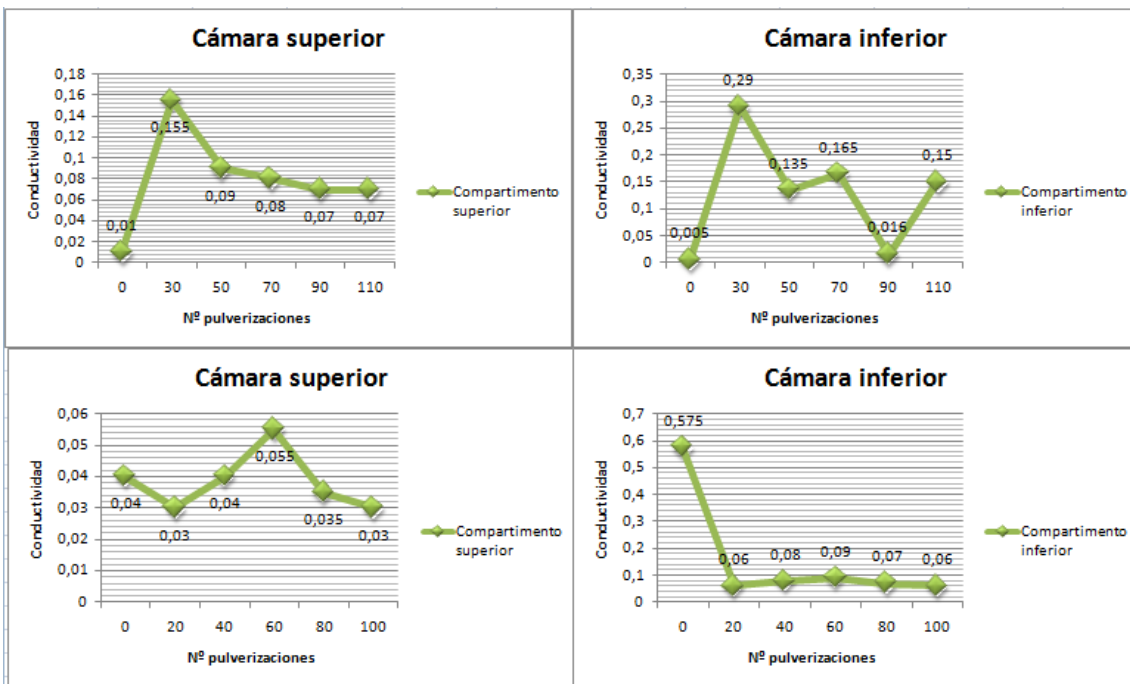


Figura 13. Resultados obtenidos de conductividad.

Respecto al pH y la conductividad, se esperaba un incremento de pH ($pK_a 1 = 9,3$; $pK_a 2 = 10,3$) y conductividad con el número de pulverizaciones (dosis). En cambio, se obtuvieron tramos de la gráfica inesperados.

Se procedió de la misma manera con la formulación incorporada en el nebulizador para comparar los resultados obtenidos usando ambos dispositivos aún a sabiendas de que esta comparación es meramente especulativa, ya que se trata de dos sistemas aerosoles que

basados en mecanismos de aerosolización diferentes. Sin embargo, el análisis nos permitirá sacar algunas conclusiones acerca del funcionamiento y efectividad del *Twin Impinger*.

Teniendo en cuenta la equivalencia entre el número de pulverizaciones y el volumen de formulación a nebulizar (Tabla 1), procedimos a realizar el mismo ensayo de determinación de pH y conductividad con el nebulizador.

SALBUTAMOL SANDOZ® (MDI)	SALBUTAMOL NEBULIZADO
NÚMERO PULVERIZACIONES	VOLUMEN NEBULIZADO (mL)
10	0.5
15	0.75
20	1
25	1.25
30	1.50
35	1.75
40	2
45	2.25

Tabla 1. Equivalencia en volumen (mL) del número de pulverizaciones efectuadas.

Los resultados de conductividad (mS/cm) obtenidos en la formulación comercial (Figura 14) siguen la misma tendencia que los llevados a cabo en los estudios preliminares, es decir, resultados muy dispares que en ciertos puntos de la gráfica disminuyen o aumentan conforme aumentamos el número de pulverizaciones y con unos valores numéricos demasiado pequeños.

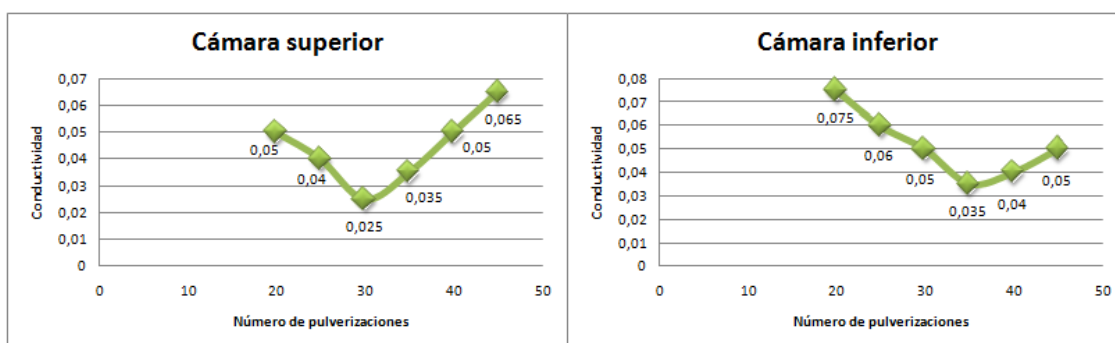


Figura 14. Resultados de conductividad en cámara de deposición superior e inferior de *Salbutamol Sandoz*®.

Los datos tan bajos de conductividad y las oscilaciones hicieron presuponer que el equipo no estaba midiendo correctamente la muestra. Se modificó el material de medición con el fin de introducir el electrodo íntegramente en el medio. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 15.

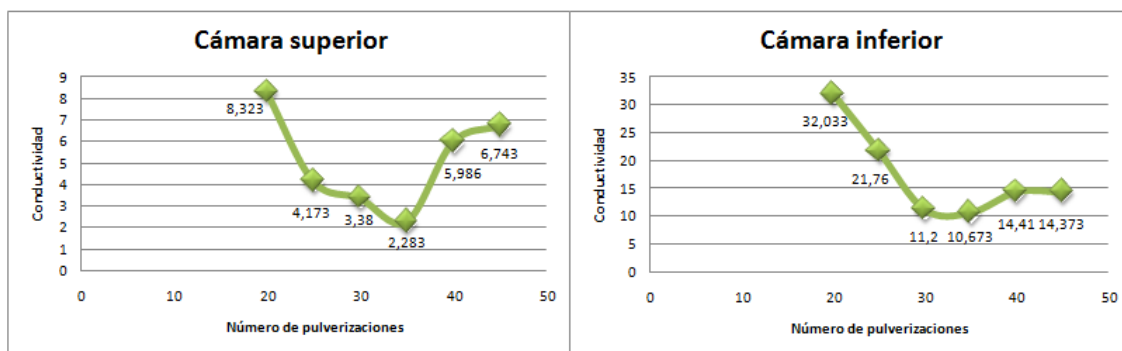


Figura 15. Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz® empleando tubo de ensayo.

El primer resultado que observamos es que los valores numéricos han aumentado. Por tanto, se seleccionará el tubo de ensayo para medir datos de conductividad como se recoge en la Figura 16.

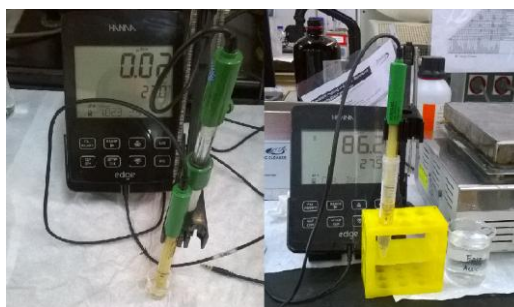


Figura 16. Medida de la conductividad del estudio.

Un resultado importante obtenido fue que a medida que se aumentó el número de pulverizaciones, los valores de conductividad disminuyeron en el aerosol presurizado comercial. Como se comentó en apartados anteriores, el rendimiento del *Twin Impinger* está relacionado con el tipo de aerosol utilizado. Una limitación que se presenta en los sistemas presurizados son los problemas asociados a la alta velocidad inicial de la pulverización de un MDI (Miller, 1992). A mayor número de pulverizaciones, mayor colmatación en las vías orofaríngeas, como podemos apreciar en la Figura 17. Ello se traduce en una disminución del rendimiento y de las respuestas que hemos seleccionado como dependientes, como el pH y la conductividad.



Figura 17. Fotografía del dispositivo Twin Impinger donde se aprecia cómo se va colmatando la pieza que simula la vía oro faríngea a medida que se aumenta el número de pulverizaciones (imagen de la derecha).

No obstante, el comportamiento del sistema no es lineal, como se aprecia en los perfiles de las gráficas, de forma que a partir de un número de pulverizaciones, los valores de conductividad se incrementan.

Con el fin de dilucidar la causa de este comportamiento, se planificaron ensayos aumentando el intervalo del número de pulverizaciones a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45. La repetición de tres veces cada ensayo arrojó los resultados recogidos en la Figura 18.

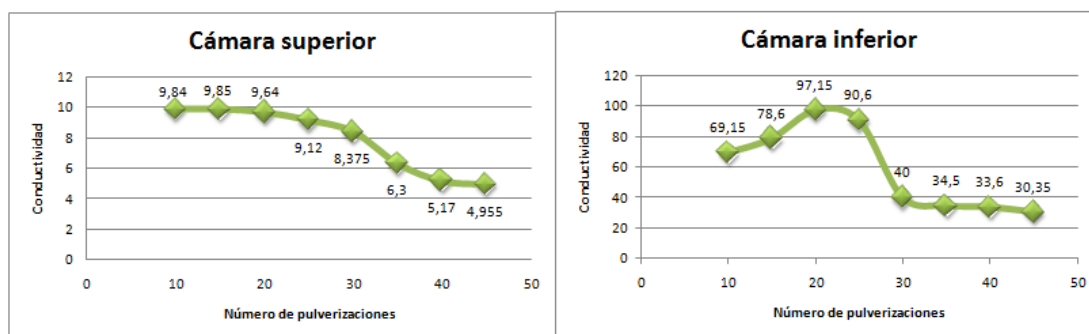


Figura 18. Resultados de conductividad obtenidos en cámara de deposición superior e inferior de Salbutamol Sandoz® ampliando intervalo del número de pulverizaciones.

Se observa que a medida que se incrementa el número de pulverizaciones, disminuye el valor de la conductividad en la cámara superior. En cambio, en el compartimento inferior (pulmones), se produce un aumento de la conductividad en las 5, 10 y 15 pulverizaciones, mientras que a partir de ahí, el valor disminuye, como consecuencia de la colmatación de las vías superiores.

Por tanto, la medida de la conductividad requiere el uso de material adecuado que asegure la introducción íntegra del electrodo de medida en la muestra, así como aspectos más generales como asegurar el lavado de dicho electrodo entre tomas de muestra consecutivas,

ya que de lo contrario, el electrodo se va ionizando, pudiendo contaminar las muestras posteriores y dar lugar a falsos positivos.

A continuación, en la Figura 19 se exponen los datos resultantes del estudio comparativo entre la formulación comercial, que acabamos de discutir, y la formulación de salbutamol en estudio (nebulizado).

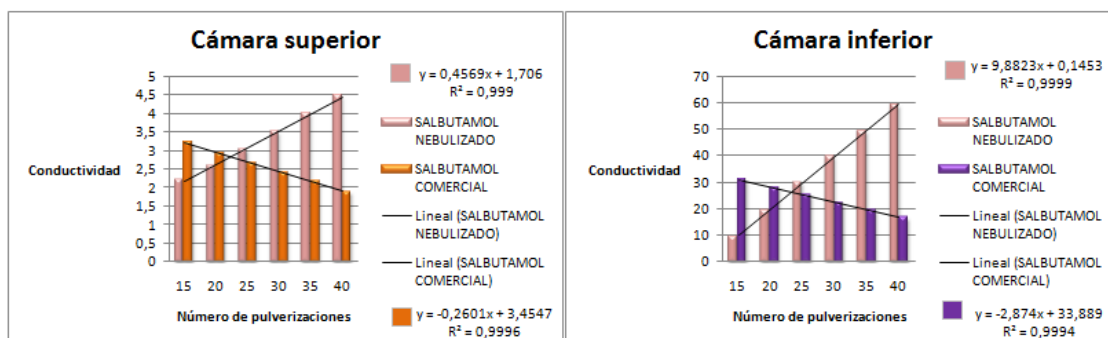


Figura 19. Resultados de conductividad entre los dos dispositivos de inhalación.

Partiendo del resultado esperado de Salbutamol Sandoz® (MDI), se obtuvo que con la formulación nebulizada, a medida que se aumentó el volumen nebulizado, los valores de conductividad se incrementaron. Asimismo, se apreció durante el transcurso de los ensayos, que el nebulizador no compactaba las vías aéreas superiores del *Twin Impinger*: a diferencia del MDI, el nebulizador no posee una alta velocidad de impacto en las vías aéreas superiores, lo que contribuye al transcurso más homogéneo a través del dispositivo.

Analizando los valores de pH, los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 20, arrojan las siguientes consideraciones. Las modificaciones en este parámetro son muy ligeras, aunque puede observarse una tendencia descendente en Salbutamol Sandoz® (MDI) con el número de pulverizaciones, mientras que lo contrario se obtiene con la formulación nebulizada. Este fenómeno ocurre tanto en la cámara superior como inferior del *Twin Impinger*. Los valores obtenidos de pH oscilaron entre 5-7.

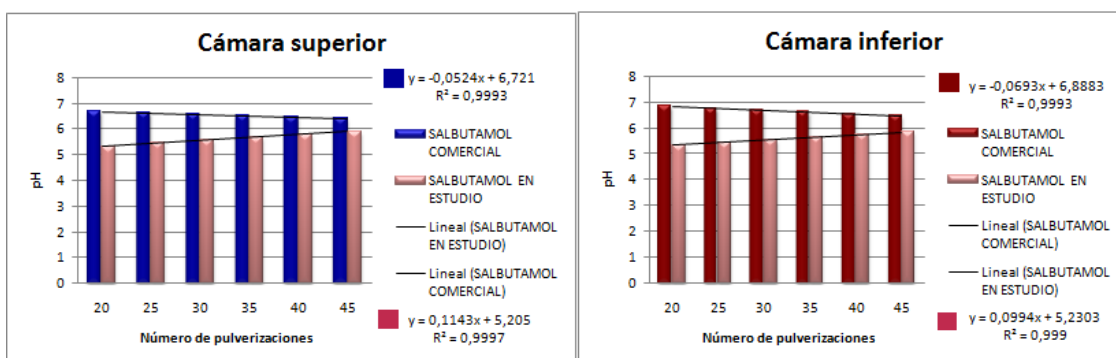


Figura 20. Resultados de pH entre los dos dispositivos de inhalación.

Estos resultados están en concordancia con lo discutido para la conductividad en cuanto al diferente comportamiento de los dispositivos utilizados.

1. 2. Análisis dimensional y carga superficial

En este ensayo, la idea fue analizar el comportamiento de las partículas que llegan a la cámara inferior o se quedan retenidas en la cámara superior del *Twin Impinger* una vez administrada la formulación mediante envase a presión o nebulizador.

En la Figura 21 se recogen dos imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido correspondientes a las formulaciones de Salbutamol Sandoz® (A) y salbutamol nebulizado (B).

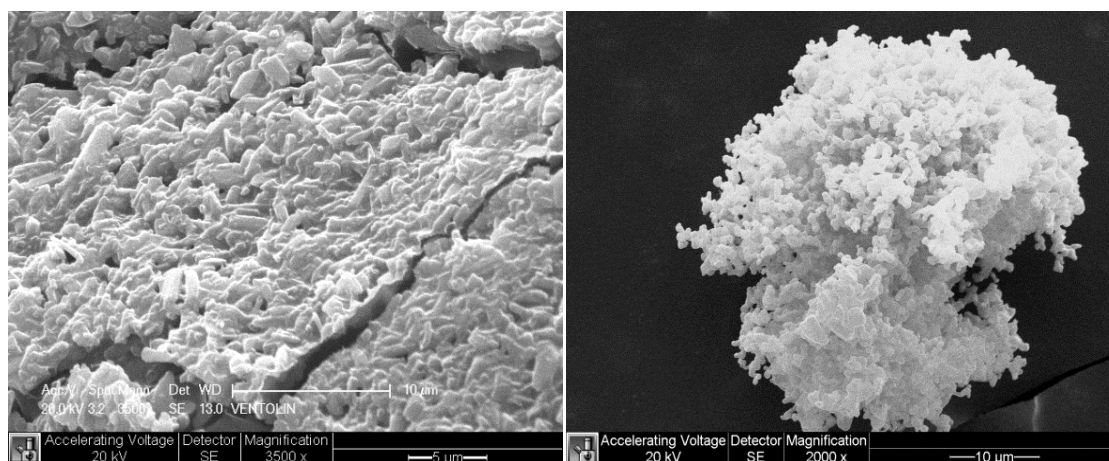


Figura 21. Microfotografías obtenidas por SEM de formulaciones de salbutamol. A) Salbutamol Sandoz® presurizado y B) Salbutamol nebulizado.

El tipo de dispositivo condiciona la deposición de las partículas en el portamuestras del microscopio. Se aprecian diferencias en cuanto a la morfología de las partículas así como en cuanto a su tipo de agregación.

En cuanto a los parámetros de tamaño y de carga superficial obtenidos en el Salbutamol Sandoz®, así como los valores medios de estos datos, se recogen en las Tabla 2 y Tabla 3.

Las conclusiones más interesantes de este estudio son las siguientes. Se ha apreciado que en la cámara superior del dispositivo, existen valores de tamaños de partícula muy superiores, que impactan y no consiguen pasar a la cámara inferior (se han señalado en color azul). Y por otra parte, existe otra fracción de la población de partículas que poseen tamaños muy pequeños (señalados en color naranja), que son posiblemente exhalados, como ya se comentó en el apartado de “Introducción” correspondiente a la deposición de partículas.

Nº	Tamaño(nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
	Cámara superior	Cámara inferior	Cámara superior	Cámara inferior	Cámara superior	Cámara inferior
20	78.18	198.9	0.477	0.844	-23.1	-46.1
	65.1	175.0	0.687	0.53	-20.6	-40.3
	84.75	175.2	0.681	0.417	-33.6	-48.9
25	52.48	264.2	0.27	0.688	-12.1	-46.2
	24.65	246.4	0.301	0.549	-19.5	-47.7
	33.92	247.5	0.322	0.55	-14.4	-45.5
30	57.77		0.355		-12.6	-36.2
	52.55		0.268		-14.4	-42.8
	36.52		0.351		-17.3	-44.9
35	702.6	357.3	1	0.476	-12.8	-23.7
	39.63	215	0.373	0.514	-14.6	-28
	137	180.3	0.501	0.464	-15.7	-26.9
40	1698	536.7	1	0.861	-28.5	-35.5
	63.1	135.8	0.569	0.838	-24.6	-35.4
	82.11	75.72	0.703	0.563	-36.4	-34.2
45	321.6	1067	0.672	0.791	-23.3	-39.7
	73.14	732.4	0.437	0.621	-19.8	-34.9
	22.42	235	0.283	0.564	-23.7	-32.6

Tabla 2. Valores de diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con Salbutamol Sandoz®.

Tamaño (nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
Media Cámara superior	Media Cámara inferior	Media Cámara superior	Media Cámara inferior	Media Cámara superior	Media Cámara inferior
Valores medios (nm)					
201,41	311,18	0,51	0,58	-10.19	-38.29
Desviación estándar (nm)					
407,03	249,42	0,23	0,16	7.14	7.56
Coficiente variación %)					
202,08	80,15	45,48	27,45	70.02	19.74

Tabla 3. Valores medios y medidas de error de los parámetros evaluados en Salbutamol Sandoz®.

Igualmente se obtuvieron los datos correspondientes al lote nebulizado (Tabla 4):

Nº	Tamaño(nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
	Cámara superior	Cámara inferior	Cámara superior	Cámara inferior	Cámara superior	Cámara inferior
20	438,8	376,7	0,868	0,768	-20	-39,5
	323,2	373,6	0,656	0,703	-17,5	-37,2
	290	366,8	0,625	0,685	-11,6	-37,9
25	386,9	298,2	0,775	0,549	-21	-38,6
	179,2	292,6	0,374	0,477	-26,1	-39,4
	167,4	274,1	0,359	0,455	-16,6	-36,8
30	314,9	289,7	0,636	0,528	-36,5	-30,2
	173,1	280,8	0,365	0,485	-14,6	-27,4
	112,5	269,1	0,543	0,427	-18,6	-37,4
35	167,4	193	0,446	0,396	-29,7	-49,9
	121,3	181,7	0,271	0,394	-14,4	-43,4
	126	174,2	0,281	0,391	-37,2	-45,9
40	148,3	202,1	0,481	0,353	-11,7	-41,3
	147,8	191,8	0,519	0,299	-9,33	-39
	182,7	185,6	0,507	0,29	-11,1	-39,9
45	253,1	283,8	0,548	0,54	-14,1	-30,3
	133,8	276,1	0,307	0,531	-33,6	-33,1
	250	269,1	0,309	0,48	-15	-30

Tabla 4. Valores de diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta en función del número de pulverizaciones con salbutamol nebulizado.

En estos resultados se puede observar que los tamaños de partícula que llegan a la cámara inferior son más similares y más homogéneos, mientras que los que se quedan en la cámara superior ofrecen una mayor heterogeneidad. Este hecho se visualiza mejor con los datos medios (Tabla 5) y su desviación estándar y coeficiente de variación.

Tamaño (nm)		PDI		Potencial Zeta (mV)	
Media Cámara superior	Media Cámara inferior	Media Cámara superior	Media Cámara inferior	Media Cámara superior	Media Cámara inferior
Valores medios (nm)					
215,58	265,5	0,49	0,49	-19,92	-37,62
Desviación estándar (nm)					
97,28	65,95	0,17	0,13	8,09	5,81
Coefficiente variación (%)					
44,71	24,84	39,96	27,45	44,86	15,44

Tabla 5. Valores de diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta en función del número de pulverizaciones.

En el método de nebulización, las partículas tienen una velocidad menos alta de salida y no chocan tan fuertemente con la cámara superior, llegando más cantidad de partículas y con ello menor variabilidad de tamaño. Ello queda reflejado en los coeficientes de variación de las muestras recuperadas con el aerosol a presión, mucho mayores a las correspondientes al nebulizador.

Asimismo, se obtienen mayores valores de este parámetro estadístico en la cámara superior, como consecuencia del impacto inicial en las regiones superiores.

1. 3. Contenido de salbutamol en las cámaras de deposición

En este ensayo, se llevó a cabo la detección y cuantificación de salbutamol a partir de las formulaciones ensayadas: Salbutamol Sandoz® (MDI) y salbutamol en estudio (nebulizador), con el fin de establecer su relación con el número de pulsaciones en los dos compartimentos del dispositivo. Se utilizó el HPLC cuya metodología se explicó en el apartado IV. 5.2. de la sección “Materiales y métodos” de la presente memoria.

Los resultados obtenidos del ensayo de cuantificación, partiendo de la cantidad teórica pulverizada se recogen en la Tabla 5 para Salbutamol comercial y en la Tabla 6 para salbutamol nebulizado.

NÚMERO DE PULVERIZACIONES	CANTIDAD DE (mg)	TEÓRICA		CANTIDAD REAL (mg)	
		CÁMARA SUPERIOR	E	CÁMARA SUPERIOR	CÁMARA INFERIOR
20	2			0.0186	3.118
25	2.5			0.0466	2.170
30	3			0.4297	2.165
35	3.5			0.206	1.395
40	4			0.3119	1.82
45	4.5			0.42928	1.43

Tabla 6. Salbutamol (mg) recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones en el aerosol presurizado.

NÚMERO DE PULVERIZACIONES	CANTIDAD DE (mg)	TEÓRICA		CANTIDAD REAL (mg)	
		CÁMARA SUPERIOR	E	CÁMARA SUPERIOR	CÁMARA INFERIOR
20	2			0.4986	1.01
25	2.5			0.53489	1.253
30	3			0.296	1.938
35	3.5			0.179	1.2489
40	4			1.4478	3.143
45	4.5			0.238	3.866

Tabla 7. Salbutamol (mg) recuperado en las dos cámaras de deposición en función del número de pulsaciones con el nebulizador.

Salbutamol Sandoz® (%)		Salbutamol nebulizado (%)	
Cámara superior	Cámara inferior	Cámara superior	Cámara inferior
Media (%)			
6,32	63,05	16,96	61,87
Desviación estándar (%)			
5,16	28,91	12,48	18,61
CV (%)			
81,74	45,74	73,58	30,08

Tabla 8. Valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de salbutamol a partir de los dos inhaladores empleados.

Se observa cómo los dos inhaladores siguen la misma tendencia, siendo el fármaco en un mayor porcentaje recuperado en la cámara inferior, como era de esperar, mientras que en el compartimento superior, el porcentaje fue de un 6 % y 16 % aproximadamente, en el comercial y el nebulizador, respectivamente. La justificación ya ha sido explicada previamente, como consecuencia de la presión ejercida por el aerosol y la saturación en la región orofaríngea.

Sin embargo, aunque los valores medios de recuperación son similares con ambos dispositivos en la cámara inferior, resultado satisfactorio, sobre todo teniendo en cuenta que el salbutamol comercial es utilizado en terapéutica y es eficaz, sin embargo, los datos de variabilidad son diferentes. Existe una mayor homogeneidad de resultados en el caso del nebulizador, en base a la desviación estándar y coeficiente de variación, lo cual hace pensar en una respuesta más reproducible.

En base a esto, se procedió a analizar la influencia del número de pulverizaciones o volumen inhalado sobre la variación en el porcentaje de recuperación, obteniéndose los resultados recogidos en la Figura 22.

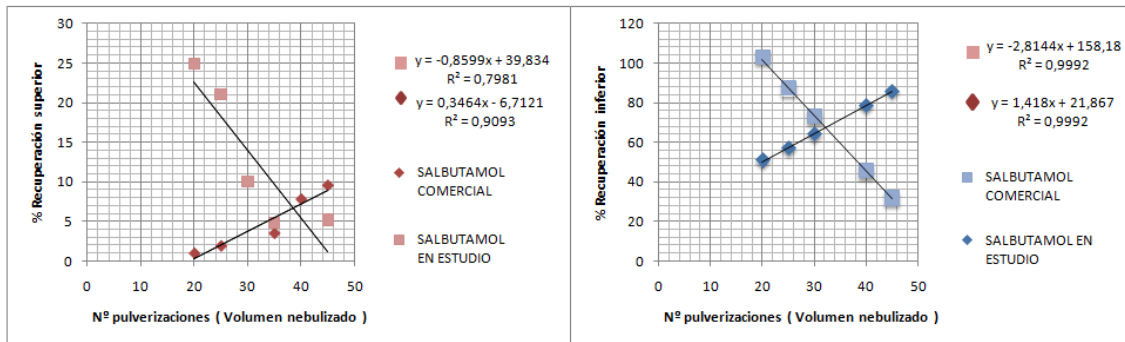


Figura 22. Influencia del número de pulsaciones o volumen inhalado de formulaciones de salbutamol sobre la recuperación (%) del fármaco en las dos cámaras del *Twin Impinger*.

Se aprecian diversos acontecimientos interesantes en estos resultados:

- Falta de linealidad en las muestras correspondientes a la cámara superior del *Twin Impinger*, lo que se traduce en una mayor heterogeneidad de fármaco recuperado en esta cámara; en cambio, en la cámara inferior sí existe linealidad en base a los r^2 obtenidos; por lo tanto hay homogeneidad en esta cámara.
- Tendencias opuestas en el aerosol comercial y el nebulizador, en cuanto a porcentaje recuperado respecto al número de pulsaciones, lo cual es achacable al mismo efecto de saturación expuesto anteriormente.

Como conclusión a esta sección de la Memoria, se podría confirmar la efectividad del dispositivo *Twin Impinger* como sistema para determinar in vitro la eficacia de nebulización de una formulación ya que, según se ha obtenido, ofrece resultados más repetitivos, homogéneos y con una tendencia lógica que hace pensar en la interferencia mínima de los elementos que lo componen sobre los parámetros evaluados.

Para finalizar el estudio, se procedió a analizar el comportamiento de dos soluciones compuestas de dos fármacos hidrosolubles: teofilina y ciprofloxacino, que se están empleando en el desarrollo de formulaciones de liposomas para administración pulmonar en el tratamiento de la fibrosis quística. Las conclusiones de este estudio serán útiles a la hora de diseñar las vesículas y evaluar in vitro su efectividad.

2. FORMULACIONES DE TEOFILINA Y CIPROFLOXACINO

1. pH y conductividad

Las formulaciones de ciprofloxacino y teofilina, preparadas según la metodología explicada en el apartado IV.4. la sección “Materiales y métodos” fueron nebulizadas con nuestro nebulizador “Coryneb Plus”.

El primer estudio que se abordó fue detectar las variaciones observadas en los parámetros que se seleccionaron para salbutamol, como pH y conductividad. Se nebulizaron 5 mL de cada formulación, obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 8.

TEOFILINA				CIPROFLOXACINO			
pH		Conductividad		pH		Conductividad	
Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
4.75	7.63	0.01	0.14	4.8	7.64	0.02	0.13

Tabla 9. Datos de pH y conductividad en las cámaras del Twin Impinger tras inhalar 5 mL de soluciones de teofilina y ciprofloxacino.

Estas variaciones producidas en los compartimentos del dispositivo nos demuestran que el método empleado sería válido para evaluar dichas soluciones con estos fármacos.

A continuación, se procedió a nebulizar volúmenes crecientes (1, 2, 3 y 4 mL) de soluciones de ciprofloxacino (2 mg/mL) y Teofilina (1 mg/mL), con la finalidad de detectar si el volumen nebulizado afecta a la recuperación de los fármacos.

Las medidas de pH y conductividad obtenidos se exponen en las Figuras 23 y 24 para el ciprofloxacino y la teofilina, respectivamente.

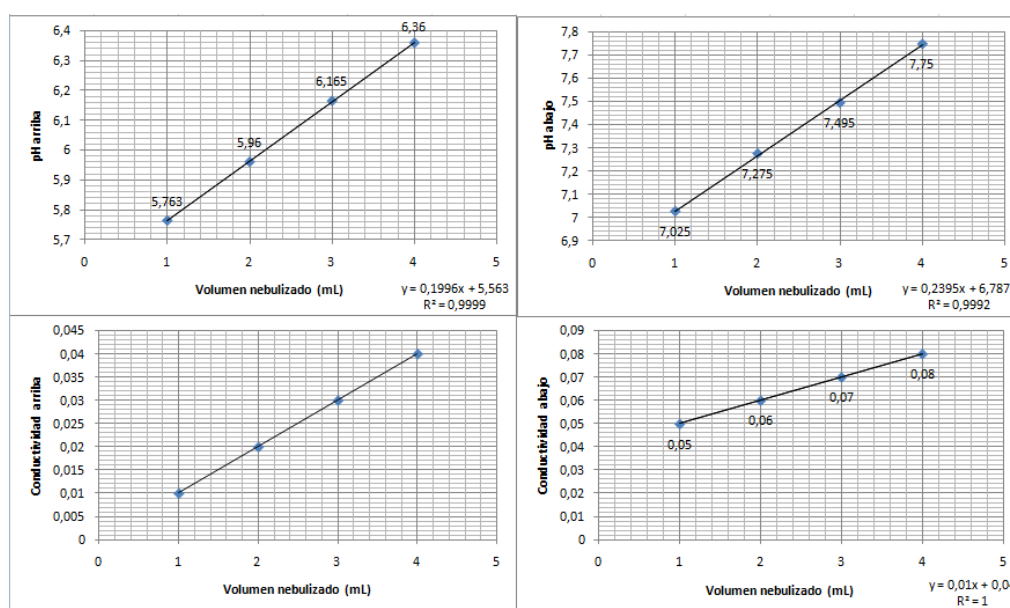


Figura 23. Valores de pH y conductividad de las cámaras superior e inferior del dispositivo una en función del volumen (mL) de solución de ciprofloxacino nebulizado.

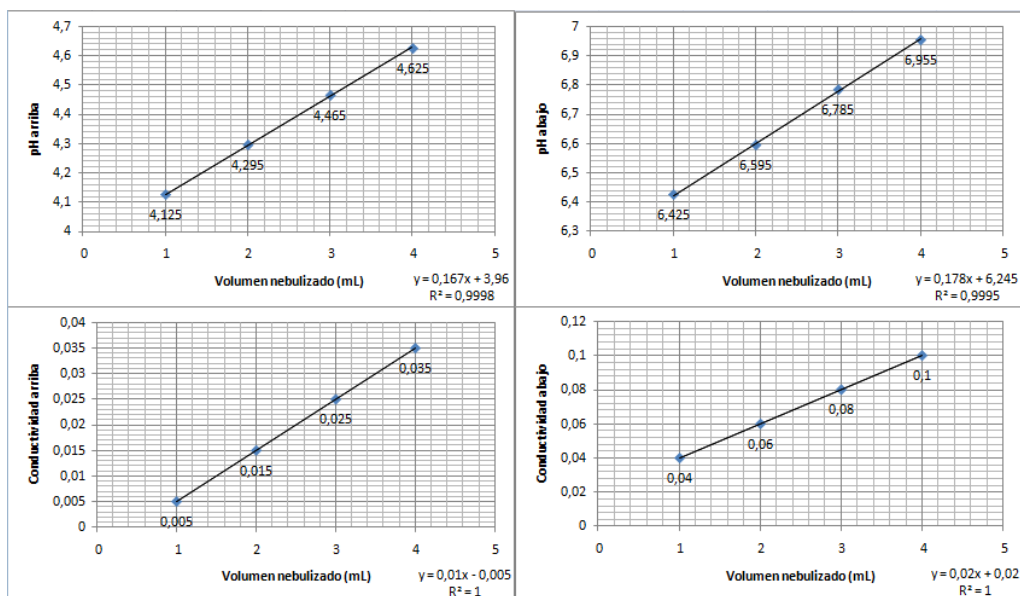


Figura 24. Valores de pH y conductividad de las cámaras superior e inferior del dispositivo una en función del volumen (mL) de solución de teofilina nebulizado.

Según los resultados obtenidos, aunque el rango de valores es pequeño, sin embargo, se aprecia una tendencia lineal en todos los casos, con unos valores de r^2 superiores a 0.995, lo cual es indicativo de la eficacia del *Twin Impinger* en la determinación de la eficacia de nebulización.

Con el fin de cuantificar la cantidad de fármaco recuperado en cada una de las cámaras, se procedió de la misma manera que con salbutamol.

2. Contenido de ciprofloxacino y teofilina en las cámaras de deposición

El método cromatográfico utilizado para cuantificar ciprofloxacino y teofilina se desarrolló siguiendo la metodología indicada en el apartado IV.5.2. la sección de “*Materiales y Métodos*” del presente trabajo.

El estudio consistió en analizar el porcentaje de recuperación de cada fármaco en cada uno de los compartimentos en función del volumen a inhalar. Los resultados mostrados en la Tabla 10 demuestran una mayor recuperación en la cámara inferior que en la superior, lo cual es indicativo de la efectividad del dispositivo en cuanto a recuperación y deposición de fármacos en niveles inferiores del tracto respiratorio.

Volumen pulverizado (mL)	Teofilina		Ciprofloxacino	
	Cámara superior (%)	Cámara inferior (%)	Cámara superior (%)	Cámara inferior (%)
1	2,04	13,36	1,38	6,76
2	6,91	38,46	10,66	38,49
3	6,75	41,36	14,05	51,47
4	5,22	47,25	18,07	64,19
5	18,02	84,13	7,45	62,34

Tabla 10. Porcentaje de recuperación de ciprofloxacino y teofilina en las cámaras de deposición en función del volumen administrado.

VII. CONCLUSIONES

1. Hemos realizado unos ensayos con nuestro dispositivo, llamado “Twin Impinger”, que se encarga de simular las vías respiratorias, ayudándonos a entender el comportamiento de nuestras formulaciones; Salbutamol Sandoz® (comercial), Salbutamol en estudio, ciprofloxacino y teofilina, cuando las administramos por vía pulmonar, con el consiguiente fin de intentar avanzar en la línea de investigación de las enfermedades pulmonares.
2. En cuanto a los ensayos realizados, hemos administrado nuestras formulaciones con el dispositivo inhalador correspondiente; inhalador presurizado de dosis medida o nebulizador, a través de nuestro dispositivo “Twin Impinger”, recogiendo las muestras al finalizar el proceso midiendo diferentes propiedades fisicoquímicas, para comprobar que dispositivo inhalador nos ofrece mayores ventajas.
3. Determinamos que en futuras investigaciones relacionadas con las enfermedades pulmonares, podemos seguir avanzando en la línea de administración pulmonar con el dispositivo inhalador más útil que es el nebulizador, dando resultados más interesantes que el inhalador presurizado de dosis medida.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs//p/70869/P_70869.pdf.
2. Barreiro-Martínez T, Marín-Soria JL. Fibrosis quística: detección bioquímica y diagnóstico molecular. Rev Lab Clin. 2015; 8(2): p.82-91.
3. Barrio-Gómez-de-Agüero MI, García-Hernández G, Gartner S. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. An Pediatr (Barc). 2009; 71(3): p.250-264.
4. Bazán-Riverón GE, Rodríguez-Martínez JI, Osorio-Guzmán M, Sandoval-Navarrete J. Election of the device for the inhaled medication in children. Rev Mex Pediatr. 2013; 80 (3): p.76-80.
5. Blanco O, Riverón Y, de Armas E, Sánchez J, Faure R, Fernández O. SURFACEN® inhibe el crecimiento de bacterias causantes de infecciones respiratorias. Biotecnología Aplicada. 2005; 22: p.279-281.
6. Copley Scientific. Quality Solutions for Inhaler Testing. Edición 2015 [en línea]. Reino Unido. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: http://www.copleyscientific.com/files/ww/brochures/Inhaler%20Testing%20Brochure%202015_Rev4_Low%20Res.pdf
7. Cortés-Télles A, García-Torrentera R. Aerosoles: Fármacos y los dispositivos para su administración. Neumol Cir Torax. 2013; 72(2): p.164-174.
8. Datos identificatorios característicos del Salbutamol Sandoz. MINISTERIOS DE SALUD SECRETARIA DE POLÍTICAS, REGULACIÓN E INSTITUTOS Buenos aires: A.N.A.M.T, 2012. Expediente Nº 1-0047-0000-002098-12-9.
9. Fernández-Tena A, Pere-Casan C. Depósito pulmonar de partículas inhaladas. Arch Bronconeumol. 2012; 48(7): p.240–246.
10. García-Basulto MJ, Marrero-González RM, Llanes-Mesa L. Influencia del hábito de fumar en la aparición de modificaciones histológicas del epitelio respiratorio. 16 de Abril. 2015; 54(259): p.38-47.
11. González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. Expert Opin Drug Deliv. 2011; 8(7): p.857-871.
12. Koman CD. Aerosolterapia. Rev Hosp Niños BAires. 2009; 51 (232): p.65-76.
13. Landaeta D, Morales-Jorquera S. Effectiveness of pressurized metered dose inhaler on lung deposition: a review. Reem. 2015; 2(2): p.15-22.

14. Lerín M, Prados C, Martínez MT, Maíz L, Girón R, Solé A et al. Fibrosis quística diagnosticada en edad adulta. *Rev Clin Esp.* 2014; 214: p.289-295.
15. López-Viña A, Clarà PC, Moral VP, Fernández-González MJ, Miró EL, Donaire JG et al. Consenso SEPAR-ALAT sobre terapia inhalada. *Archivos de Bronconeumología. Arch Bronconeumol.* 2013;49:2-14.
16. Mali AJ, Pawar AP, Purohit RN. Development of budesonide loaded biopolymer based dry powder inhaler: optimization, in vitro deposition and cytotoxicity study. *Int J Pharm.* 2014; 2014: p.1-12.
17. Miller NC, Marple VA, Schultz RK, Poon WS. Assessment of the twin impinger for size measurement of metered-dose inhaler sprays. *Pharm Res.* 1992; 9(9): p.1123-1127.
18. Newhouse MT. Drug Delivery: Pulmonary Delivery En: Swarbrick J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology.* 3ª ed. Nueva York: Informa Healthcare; 2007. p. 1279-1286.
19. O'Donnell K, Smyth PC. Macro- and microstructure of the airways for drug delivery. En: Smyth HDC y Hickey AJ eds. *Controlled Pulmonary Drug Delivery.* 1ª ed. Nueva York: Springer; 2011. p.1-19.
20. Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1778 (2008): p.1676-1695.
21. Rubio-González T, Amaro-Ivonet G, Martínez-Burguer G. Atención multidisciplinaria a pacientes con fibrosis quística. *Rev Cubana Pediatr.* 1999; 71(4): p.228-232.
22. Seijo B. Aerosoles farmacéuticos. En: Vila Jato JL, editor. *Tecnología Farmacéutica II: Formas farmacéuticas.* 1ª ed. Madrid: Síntesis; 1997. p.273-301.
23. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Biochemical and synthetic polymer separations. En: (Snyder L, Kirkland J, Dolan JW eds). *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 3ª ed. Hoboken (NJ): John Wiley and sons; 2010. p.569-663.
24. Sweeney LG, Wang Z, Loebenberg R, Wong JP, Lange CF, Finlay WH. Spray-freeze-dried liposomal ciprofloxacin powder for inhaled aerosol drug delivery. *Int J Pharm.* 2005; 305(2005): p.180–185.
25. Sutariya VB, Mashru RC, Sankalia MG, Sankalia JM. Liquid chromatographic determination and pharmacokinetics study of salbutamol sulphate in rabbit plasma.. *Ars Pharm;* 2006; 47 (2): p.185-197.
26. Torregrosa-Bertet MJ. Uso de los medicamentos inhalados: ¿son mejores los nebulizadores?. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2005; 7: p.79-95.

27. Úbeda Sansano MI, Cortés Rico O, Montón Álvarez JL, Lora Espinosa A, Praena Crespo M. Dispositivos de inhalación. El Pediatra de Atención Primaria y los dispositivos de inhalación. Documentos técnicos del GVR (publicación DT-GVR-X) [consultado Junio 2016]. Disponible en: <http://aepap.org/grupos/grupo-de-vias-respiratorias>.
28. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005
29. Vartak A, Sucheck SJ. Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines*. 2016; 4(12): p.1-18.
30. Welling PG. Absorption of Drugs. En: Swarbrick J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 3ª ed. Nueva York: Informa Healthcare; 2007. p.19-33.
31. Zhang X , Liu Q, Hu J, Xu L, Tan W. An aerosol formulation of R-salbutamol sulfate for pulmonary inhalation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014; 4(1): p.79–85.