



FORMULACIÓN DE INSERTOS DE LEVODOPA PARA SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Constanza Aretio Medina

Curso 2018/2019



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**FORMULACIÓN DE INSERTOS DE LEVODOPA PARA SU ADMINISTRACIÓN
INTRANASAL**

ALUMNA: Constanza Aretio Medina

TUTORA: Profa. María Luisa González Rodríguez

TIPO DE PROYECTO: Experimental

PRESENTACIÓN: Facultad de Farmacia

Fecha: julio de 2019

RESUMEN

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa debilitante que afecta a las células del Sistema Nervioso Central que controlan el movimiento. Se caracteriza por un déficit de dopamina en el organismo, el cual es provocado por una pérdida de las neuronas dopaminérgicas situadas en la sustancia negra del cerebro.

El principal tratamiento para esta enfermedad es Levodopa, precursor de la dopamina, de administración oral fundamentalmente. Sin embargo, debido a los problemas que presenta este fármaco en cuanto a su degradación a nivel periférico, el objetivo de este trabajo está enfocado en proponer una formulación en forma de inserto en film, para su posterior administración por vía intranasal.

Para ello, se buscó la composición polimérica más adecuada para elaborar un gel que servirá de soporte para obtener el film. Finalmente, se establecieron diferentes mezclas de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y Pluronic F127, sobre los cuales se añadieron Propilenglicol y Chitosano. Se realizaron ensayos de morfología, uniformidad de peso, uniformidad de espesor, hinchamiento y mucoadhesividad. Tras seleccionar la formulación óptima, se incorporó al gel una formulación de liposomas, ya estudiado previamente. Finalmente, se llevaron a cabo estudios de liberación y permeación in vitro con el fin de dilucidar el comportamiento de estos sistemas.

Los estudios revelaron que la mejor proporción de los componentes en la mezcla para obtener insertos con características adecuadas para administración intranasal fue de 8 g de HPMC al 4% p/p, 2 g de Pluronic F127 al 17% p/p, 2,2 g de Chitosano de alta viscosidad al 2% p/v y 0,8 g de Propilenglicol. En cuanto a la incorporación de los liposomas de Levodopa en los insertos, se concluyó, en base al perfil obtenido, que el sistema proporciona una liberación prolongada del fármaco, por lo que podría ser una estrategia a seguir profundizando en ella como alternativa en el tratamiento del Parkinson.

PALABRAS CLAVE:

Parkinson, Levodopa, insertos, intranasal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. ENFERMEDAD DEL PARKINSON	4
1.2. DOPAMINA: FUNCIÓN Y SÍNTESIS	5
1.3. TRATAMIENTO	7
1.3.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO.....	8
1.3.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.....	8
1.3.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	8
1.4. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LEVODOPA	12
1.4.1. VÍA ORAL	12
1.4.2. VÍA INTRAVENOSA	13
1.4.3. VÍA INTRANASAL	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. METODOLOGÍA.....	15
3.1. COMPOSICIÓN DEL GEL.....	15
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DEL GEL.....	17
3.2.1. ENSAYOS	19
3.3. PREPARACIÓN DE INSERTOS CON LEVODOPA.....	20
3.3.1. <i>ENCAPSULACIÓN DE LEVODOPA EN LIPOSOMAS E</i> <i>INCORPORACIÓN EN EL GEL 1</i>	21
3.3.2. <i>INCORPORACIÓN DE LEVODOPA EN LOS GELES 2 Y 3</i>	22
3.4. CUANTIFICACIÓN DE LEVODOPA EN INSERTOS MEDIANTE HPLC	22
3.5. ESTUDIO DE PERMEACIÓN IN VITRO	23
4. RESULTADOS	23
4.1. SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL GEL.....	23
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS INSERTOS.....	27
4.2.1. <i>CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA</i>	27
4.2.2. <i>ENSAYO DE UNIFORMIDAD DE PESO.....</i>	28
4.2.3. <i>ENSAYO DE ESPESOR</i>	28
4.2.4. <i>ENSAYO DE HINCHAMIENTO</i>	29
4.2.5. <i>ENSAYO DE MUCOADHESIVIDAD.....</i>	32
4.3. INCORPORACIÓN DE LEVODOPA EN INSERTOS	33
4.4. ENSAYO DE PERMEACIÓN IN VITRO.....	34
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DEL PARKINSON

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa debilitante que afecta a las células del Sistema Nervioso Central que controlan el movimiento. Actualmente, constituye el trastorno neurológico de mayor crecimiento en el mundo. Se caracteriza por un déficit de dopamina en el organismo, el cual es provocado por una pérdida de las neuronas dopaminérgicas situadas en la sustancia negra del cerebro. Está establecido que la neurodegeneración está producida por la acumulación de proteínas llamada α -sinucleínas en el citoplasma de las neuronas, las cuales se agregan conformando los conocidos cuerpos de Lewy (Kim et al., 2018; Richter et al., 2019)

No se conoce con certeza la etiología de esta enfermedad, aunque se sugiere que su causa puede ser multifactorial, donde se combinan factores genéticos, medioambientales y el envejecimiento del organismo. La incidencia de la enfermedad aumenta a partir de los 60 años, llegando a afectar al 1% de la población de más de 65 años. Así mismo, se trata de una enfermedad más común en hombres que en mujeres.

Se caracteriza principalmente por síntomas motores como bradicinesia, temblor, rigidez muscular, inestabilidad de la marcha o problemas de equilibrio y coordinación, entre otros (Richter et al., 2019). Estos síntomas motores aparecen cuando ya se han perdido aproximadamente un 60% de neuronas dopaminérgicas y la cantidad de dopamina se ve reducida un 80% (Morales-Briceño et al., 2011). Sin embargo, esta enfermedad también conlleva síntomas no motores como son el deterioro cognitivo, la disfunción autonómica, los trastornos del sueño, la depresión y la hiposmia (Kim et al., 2018).

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, éste es fundamentalmente clínico, ya que se basa en un examen físico para identificar los síntomas característicos y en la historia del paciente (McKenzie et al., 2018). En cuanto a los síntomas, se tiene que presentar la combinación de bradicinesia con, al menos, un síntoma más (temblor en reposo, rigidez o inestabilidad postural).

El Parkinson es una enfermedad progresiva, variable en función de la persona. A lo largo del transcurso de la enfermedad, se suceden diferentes fases, que van desde la afectación de un solo lado del cuerpo o una parte del mismo, donde el paciente aún es independiente, hasta llegar a una afectación severa de todo el organismo, convirtiéndose en una persona dependiente. Actualmente, aun no existe cura para esta enfermedad.

1.2. DOPAMINA: FUNCIÓN Y SÍNTESIS

La dopamina o (4-(2-aminoetil)benceno-1,2-diol) es el neurotransmisor principal encargado de transmitir la información entre células del sistema nervioso. Pertenece al grupo de las catecolaminas, las cuales son un conjunto de moléculas constituidas por un núcleo de catecol y una cadena de etilamina o derivados (Bahema-Trujillo et al., 2000).

Esta molécula se sintetiza principalmente a partir del aminoácido L-tirosina mediante una ruta metabólica que se desarrolla en dos etapas sucesivas en el citosol de la neurona presináptica (Figura 1). La primera etapa de la ruta comienza con la L-tirosina sobre la que actúa la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la cual se considera el principal regulador de la síntesis de dopamina (Jamal et al., 2019), produciendo una hidroxilación sobre el carbono 3. Como resultado de esta primera etapa se obtiene levodopa (L-dopa). Los cofactores necesarios para que esta reacción se lleve a cabo son tetrahidropterina, oxígeno (O_2) y hierro (Fe^{2+}). La segunda etapa comienza con la L-dopa sobre la que actúa la dopa descarboxilasa (DDC) produciéndose finalmente dopamina. Para que se desarrolle esta etapa es necesaria la presencia como cofactor del fosfato de piridoxal. Una vez se ha sintetizado la dopamina, ésta se almacena en vesículas cuyo interior es ácido, a través del transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2), hasta que se produzca su liberación al espacio sináptico el cual generalmente, se produce por excitación debido a cambios en el potencial de membrana de la neurona. Esta liberación es dependiente de Ca^{2+} y actividad eléctrica (Klein et al., 2019).

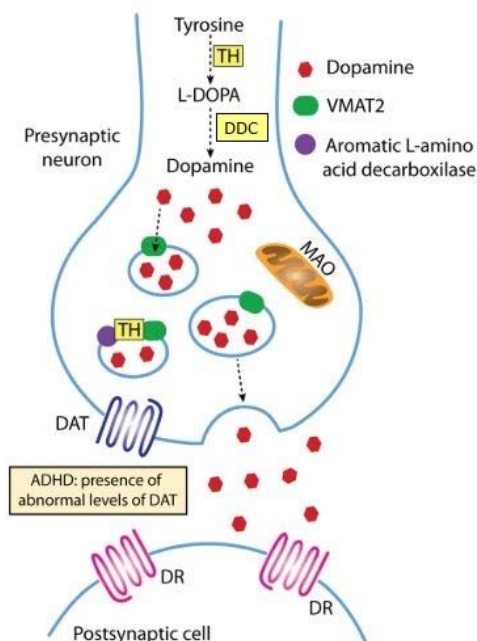


Figura 1. Síntesis de dopamina en la neurona presináptica (modificado de Klein et al., 2019)

Este almacenamiento en vesículas protege a la dopamina de ser metabolizada por enzimas como la monoamino oxidasa-B (MAO-B) o catecol O-metiltransferasa (COMT).

En la hendidura sináptica, los niveles de dopamina se encuentran regulados por dos mecanismos: transmisión fásica y tónica (Figura 2). La transmisión fásica se caracteriza por la liberación de dopamina regulada por potenciales de acción de la neurona presináptica. La transmisión tónica consiste en la liberación de dopamina, la cual no depende de potenciales de acción, sino que está regulada por la actividad de otras neuronas, de manera que, mediante este mecanismo la liberación es más leve en comparación con la liberación fásica (Klein et al., 2019).

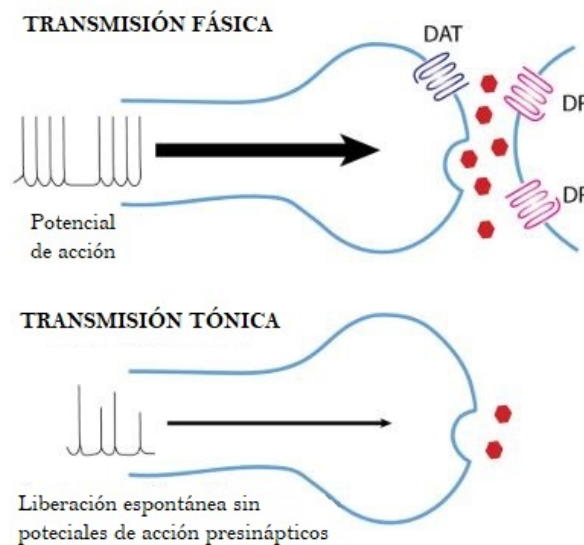


Figura 2. Mecanismos de transmisión de la dopamina en la neurona presináptica (modificado de Klein et al., 2019)

Una vez que la dopamina se encuentra en la hendidura sináptica se puede unir tanto a los receptores del terminal presináptico como postsináptico. Cuando se une al terminal presináptico, la dopamina es recaptada a través del transportador de dopamina. Esto constituye el principal mecanismo de terminación de la actividad de la dopamina en el espacio sináptico, siendo degradada por las enzimas MAO y COMT. En cambio, cuando se une al terminal postsináptico, la dopamina interacciona con receptores de dopamina. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, de los cuales existen 5 tipos que se dividen en dos grupos: D₁, donde se encuentran los subtipos D₁ y D₅, y D₂, donde se encuentran los subtipos D₂, D₃ y D₄. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos por el SNC, así como en vasos sanguíneos, riñones, corazón, retina y glándulas suprarrenales. Entre los dos grupos, existen diferencias en cuanto a la afinidad de dopamina por ellos, siendo los del grupo D₁ menos afines que los del grupo D₂. Estos receptores están implicados en una

gran cantidad de funciones como son actividad locomotora, cognición, ingesta de alimento y regulación endocrina, entre otras (Missale et al., 2017). Así mismo, también existen diferencias en cuanto a su actividad. Los del grupo D1 se acoplan activamente a la adenilato ciclasa, por lo que tienen una acción activadora de la formación de AMPc, mientras que los del grupo D2 se acoplan negativamente a la adenilato ciclasa, teniendo una acción inhibitoria (Rangel-Barajas et al., 2015; Klein et al., 2019).

La neurodegeneración, y, por tanto, la pérdida de dopamina, es debida a la formación de los cuerpos de Lewy, como se aprecia en la Figura 3. Estos se forman debido a la mutación y posterior acumulación de la proteína α -sinucleína en la neurona presináptica. Se trata de una proteína cerebral que se encuentra de manera abundante en las neuronas (Shastry, 2001; Wider and Wszolek, 2008). Sin embargo, tras diversos estudios, no se conoce con certeza cómo los cuerpos de Lewy están relacionados con los bajos niveles de dopamina, así como de otros transmisores neuronales como la acetilcolina.

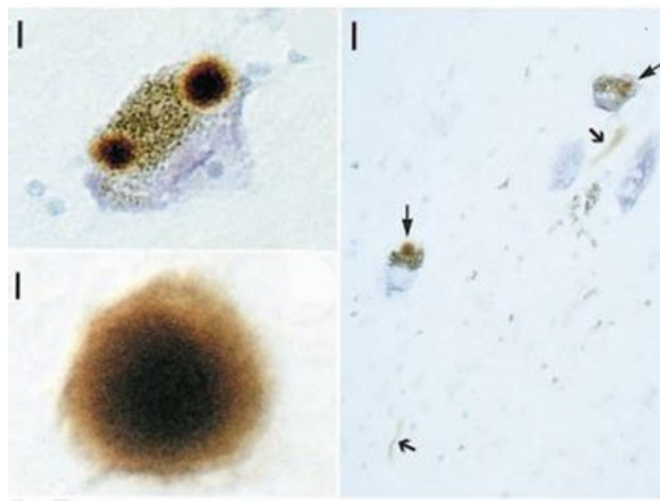


Figura 3. Cuerpos de Lewy (Osterhaus et al., 1997)

1.3. TRATAMIENTO

Como ya se comentó anteriormente, el Parkinson es una enfermedad que actualmente no tiene cura. Por ello, los tratamientos que se utilizan tienen como objetivo mejorar la sintomatología de la enfermedad. Así, se aconseja empezar el tratamiento tan pronto como la enfermedad sea detectada, ajustándolo a la pérdida de dopamina sufrida, con el fin de tratar los síntomas de la manera más temprana posible.

1.3.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO

El tratamiento no farmacológico se basa en terapias de rehabilitación como son fisioterapia, logopedia, psicología, musicoterapia, hidroterapia, entre otras. Estas están encaminadas a facilitar el día a día del paciente, mejorando su autonomía. Diversos estudios demostraron que la realización de ejercicio físico ejerce una función de mejora importante en la función física (Gázquez et al., 2018).

Como es de esperar, este tipo de tratamientos son útiles utilizándose de forma complementaria a los tratamientos farmacológicos o quirúrgicos, ya que por sí solos no mejoran la sintomatología del paciente. (García y Cruz, 2007)

1.3.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

El tratamiento quirúrgico se basa principalmente en la estimulación cerebral profunda. Se trata de una opción muy útil para mejorar la sintomatología motora de los pacientes de Parkinson. Este tipo de tratamiento está siendo utilizado cada vez más en el manejo de los pacientes con Parkinson, estando indicado cuando el paciente ha sido sometido a un tratamiento farmacológico y los síntomas motores no han respondido bien. Sin embargo, no todos los pacientes pueden ser sometidos a este tipo de tratamiento ya que tienen que cumplir una serie de criterios, entre ellos el tener una respuesta adecuada a la levodopa con una mejoría mínima del 30% en la escala motora entre los estados “off” (sin efecto del medicamento) y “on” (con efecto del medicamento) (Amin and Alfonso, 2014).

El tratamiento consiste en colocar unos electrodos en diversas zonas conocidas como blancos terapéuticos. Los blancos terapéuticos más habituales son el núcleo subtalámico, globo pálido interno y núcleo ventrolateral del tálamo. El núcleo subtalámico es considerado el principal blanco terapéutico ya que al estimularlo se obtienen beneficios en la función motora, así como una reducción de tratamiento farmacológico con antiparkinsonianos postoperatorios. La estimulación del núcleo ventrolateral del tálamo supone una mejora de los efectos discinéticos mientras que la estimulación del globo pálido interno supone una reducción del temblor (Guridi et al., 2014).

1.3.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento farmacológico es el más importante para tratar la enfermedad del Parkinson. El principal objetivo se centra en aumentar los niveles de dopamina intentando reestablecer sus niveles normales en el cerebro. Este tipo de tratamiento se debe iniciar una vez que el paciente experimente algún tipo de deterioro en sus funciones. La dopamina no se puede administrar

directamente, ya que no es capaz de atravesar la BHE debido a su elevada hidrofilia. Además, no existe ningún transportador específico en dicha barrera capaz de facilitar el paso de dopamina. Es por ello que se han venido desarrollando fármacos alternativos a la administración de dopamina.

A la hora de seleccionar el tratamiento inicial se deben tener en cuenta factores como los síntomas, la edad o trastornos asociados, con el fin de seleccionar el tratamiento más eficaz. En muchas ocasiones, se utilizan combinaciones de fármacos para tener así un mayor control sobre los síntomas.

Actualmente existe una amplia variedad de fármacos utilizados en el Parkinson. Estos son:

- **Levodopa (L-dopa):** se trata del fármaco más eficaz y mejor tolerado para el tratamiento de esta enfermedad, el cual supuso una revolución hace más de 50 años. Es especialmente eficaz para el tratamiento de los síntomas motores, como son bradicinesia y rigidez. Se trata de un precursor de la dopamina (Figura 4), que se forma por oxidación enzimática a partir de tirosina. Se administra como tal y no directamente dopamina porque, como se ha referido anteriormente, la dopamina no es capaz de atravesar la BHE, a diferencia de la L-dopa. Una vez en el cerebro, L-dopa se convertirá en dopamina por descarboxilación por la L-aminoácido descarboxilasa periférica (AADC), en este caso, la L-dopa descarboxilasa.

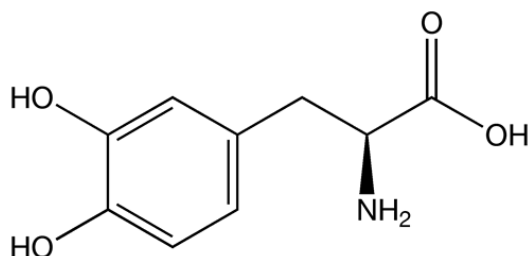


Figura 4. Estructura química de la Levodopa (Drugbank)

Sin embargo, uno de los inconvenientes de L-dopa es su corta semivida biológica. Por ello, las preparaciones actuales incluyen inhibidores de la L-dopa descarboxilasa, como son Carbidopa o Benserazida, para prevenir el metabolismo periférico de la dopamina y mejorar su biodisponibilidad (Kim et al., 2018). A pesar de ser muy utilizado, se trata de un fármaco con una gran cantidad de reacciones adversas. Las más leves que produce son náuseas, vómitos e hipotensión, reduciéndose de forma importante con la combinación Levodopa/Carbidopa.

Cuando se lleva a cabo un uso crónico de L-dopa, empiezan a aparecer fluctuaciones en la respuesta motriz debido a una disminución a la respuesta del fármaco en el organismo. Es entonces cuando empiezan a aparecer una serie de fenómenos característicos como son el fenómeno “on-off”, “wearing off” y acinesia al despertar. El fenómeno “on-off” es la fluctuación más frecuente y consiste en que el paciente experimenta periodos “on” donde el fármaco esté ejerciendo su acción, y, por tanto, el paciente presenta una función motora normal, y periodos “off”, los cuales aparecen antes de la siguiente dosis de L-dopa; en éstos el paciente sí que experimenta síntomas parkinsonianos (Lewitt, 2015). El fenómeno “wearing-off”, también conocido como deterioro de la dosis o efecto de debilitamiento, consiste en una reducción paulatina del efecto de cada dosis de L-dopa, es decir, que los síntomas parkinsonianos aparecen antes de que la siguiente dosis sea administrada. Por último, el fenómeno de acinesia al despertar consiste en la incapacidad o dificultad de realizar un movimiento preciso cuando el paciente se despierta. Por tanto, aunque L-dopa produzca una rápida mejoría de los síntomas del Parkinson, estas complicaciones secundarias al tratamiento se deben seguir de cerca para intentar en la medida de lo posible que no afecten al paciente (Pålhagen et al., 2016).

- **Inhibidores de la monoamino oxidasa-B (IMAO):** la enzima monoamino oxidasa-B (MAO-B) se encarga de la desaminación oxidativa de neurotransmisores monoaminas tales como dopamina, serotonina y noradrenalina. La oxidación a través de esta enzima, junto con la recaptación por parte de las neuronas presinápticas suponen uno de los principales mecanismos de eliminación de la dopamina (Kim et al., 2018). Al inhibir a esta enzima, lo que se consigue es que los niveles de dopamina en el espacio sináptico aumenten también. Se trata de una inhibición reversible (Youdim et al., 2006). Diversos estudios han demostrado que la utilización de estos fármacos en etapas tempranas del Parkinson retrasa la necesidad del tratamiento con L-dopa hasta un año. También se pueden administrar conjuntamente con L-dopa, aumentando y prologando la respuesta de ésta y disminuyendo sus efectos secundarios, como son náuseas, hipotensión ortostática e insomnio. En este grupo se encuentran fármacos como Selegilina, Rasagilina y Safinamida (Riederer et al., 2004).
- **Inhibidores de la Catecol O-metiltransferasa (ICOMT):** al igual que el grupo comentado anteriormente, los inhibidores de la Catecol O-metiltransferasa también inhiben la degradación de monoaminas como son la dopamina, serotonina y noradrenalina. El efecto es el mismo que el anterior, aumentar los niveles de dopamina. Este grupo de fármacos tiene como objetivo principal el incremento de la duración del efecto de la

dosis de L-dopa, y por tanto, reducir el periodo “off” de los pacientes (Deane et al., 2009). Por ello, se trata de terapias coadyuvantes al tratamiento con L-dopa, previniendo así su metabolismo y mejorar su biodisponibilidad. Aquí se engloban fármacos como Entacapona, Tolcapona y Opicapona.

- Agonistas de la dopamina:** se trata de fármacos que van a actuar sobre los receptores de la dopamina, principalmente sobre los D2, ejerciendo una acción similar a la de la dopamina. Este grupo se puede dividir en dos: los derivados ergóticos y los no ergóticos. Los derivados ergóticos actualmente ya no se utilizan tanto debido a que estos producen una serie de reacciones adversas tales como fibrosis pleuropulmonar y fibrosis valvular cardiaca. Entre ellos cabe destacar algunos ejemplos como Cabergolina y Bromocriptina. En el grupo de los no ergóticos se incluyen una serie de compuestos los cuales han sido desprovistos de estas reacciones adversas, por lo que son fármacos más seguros. Algunos de ellos son Apomorfina, Rotigotina, Pramipexol, Ropinirol y Piribedil. Estos fármacos se pueden administrar solos o en combinación con L-dopa, reduciendo así sus efectos secundarios. Una gran ventaja de este grupo de fármacos es que tienen una vida media más larga que L-dopa, lo que les convierte en un gran candidato como tratamiento complementario en pacientes con fluctuaciones motoras (Kim et al., 2018). Sus reacciones adversas más comunes son respuestas psicóticas, discinesias, náuseas y vómitos.

En la Figura 5 se recoge a modo de esquema, el nivel al que actúan los diferentes grupos farmacológicos empleados en el tratamiento de esta patología.

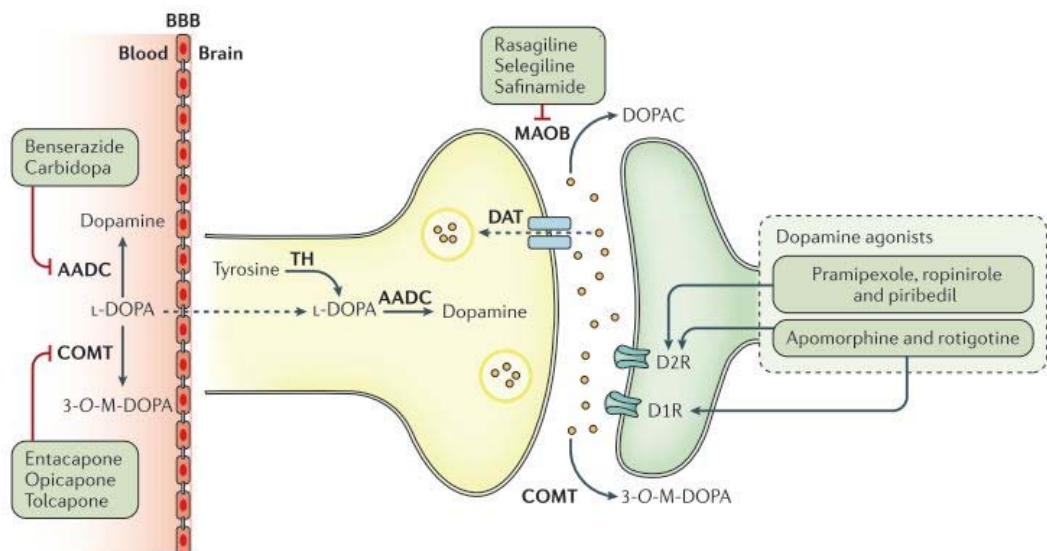


Figura 5. Dianas farmacológicas dopaminérgicas (Kim et al., 2018)

- **Anticolinérgicos:** este grupo de fármacos eran el principal tratamiento de la enfermedad del Parkinson hasta la introducción de L-dopa. Se trata de fármacos antagonistas del receptor muscarínico. La degeneración de sustancia negra en el cerebro provoca una disminución de la cantidad de dopamina, y esto a su vez conlleva un desequilibrio entre las vías colinérgicas y dopaminérgicas (Brocks, 1999). Estos fármacos lo que hacen es intentar controlar las vías colinérgicas. Sus efectos antiparkinsonianos son débiles, ayudan sobre todo a controlar el temblor y la rigidez, siendo sus principales efectos secundarios la sequedad de boca, estreñimiento, retención urinaria, visión borrosa, etc.
- **Amantadina:** se trata de un fármaco antiviral que se utiliza en el tratamiento sintomático del virus de la influenza (virus de la gripe), especialmente en pacientes de alto riesgo donde la vacunación no está indicada. Su mecanismo antiparkinsoniano es confuso. Los posibles mecanismos incluyen tanto las vías colinérgicas como las vías dopaminérgicas, aumentando la síntesis y la liberación o inhibiendo la recaptación de dopamina (Brocks, 1999). Se trata de un principio activo controvertido, ya que tiene facilidad de ajuste de dosis y sus reacciones adversas son escasas (manchas en la piel, visión borrosa, edema). Sin embargo, después de varios meses la eficacia de la amantadina desaparece. Actualmente, es el único tratamiento disponible para la disquinesia producida por la L-dopa (Kim et al., 2018).

1.4. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LEVODOPA

1.4.1. VÍA ORAL

Tradicionalmente la L-dopa se administra por vía oral. Sin embargo, este fármaco presenta un metabolismo presistémico importante debido a la acción de la L-aminoácido descarboxilasa, consiguiendo que tan sólo un 30% de la dosis administrada alcance la circulación sistémica. Esto supone un problema importante ya que la biodisponibilidad de la L-dopa es de por sí baja.

Como solución, los preparados orales de L-dopa se administran junto con inhibidores de la L-aminoácido descarboxilasa con lo que se consigue una biodisponibilidad oral tres veces mayor y además, se consigue reducir la dosis efectiva y la gravedad de los efectos secundarios (Contin and Martinelli, 2010).

Las fluctuaciones motoras que se producen como consecuencia del uso de L-dopa se deben principalmente a que es administrada por vía oral y es administrada a elevadas dosis. Para conseguir la reversión de los síntomas del Parkinson es necesario alcanzar unas determinadas

concentraciones en sangre (Lewitt, 2015). Por ello, se están investigando nuevas formas de administración.

1.4.2. VÍA INTRAVENOSA

Aunque la administración oral de L-dopa sigue siendo de elección, la vía intravenosa posee una serie de ventajas. Mediante este tipo de administración, es posible conocer con mayor exactitud la concentración que alcanza L-dopa en sangre ya que los medicamentos administrados por vía oral tienen características de absorción diferentes y variables en función del paciente. Además, esta vía también permite mantener constantes las concentraciones en el cerebro, lo que es útil para determinados estudios (Siddiqi et al., 2016). Además, al mantener concentraciones más constantes que por vía oral, también se está disminuyendo el fenómeno "on-off". Sin embargo, se trata de una vía menos cómoda para el paciente a la hora de administrar la medicación.

1.4.3. VÍA INTRANASAL

La vía intranasal es la forma más simple y directa de administrar fármacos cuyo punto final es el cerebro. Se trata de una vía de fácil administración, de acción rápida, segura, no invasiva, observándose concentraciones y efectos elevados en el SNC en tiempos pocos mayores de una hora. Su elevada efectividad se debe a que es una zona altamente vascularizada con una gran superficie de absorción, en la cual se produce un transporte directo de fármacos a la circulación sanguínea, evitando así el metabolismo de primer paso hepático, y por tanto, mejorando su biodisponibilidad (Battaglia et al., 2018; Miller and Borgman, 1985). Mediante esta vía se pueden administrar de manera efectiva desde macromoléculas hasta moléculas de bajo peso molecular, las cuales son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica por diferentes mecanismos.

En comparación con otras vías, esta presenta una serie de ventajas. Entre ellas se encuentran: el agente terapéutico no tiene que sufrir ninguna modificación para ser administrado hacia el cerebro; mejora el cumplimiento por parte del paciente ya que permite la automedicación al ser una vía sencilla; se trata de una alternativa a la vía parentera, especialmente para la administración de proteínas, péptidos, o incluso células madre (Pardeshi and Belgamwar, 2013).

Sin embargo, también presenta inconvenientes. Se trata de una vía en la que existe una gran variabilidad en la concentración alcanzable en las diferentes regiones del cerebro y se puede producir aclaramiento mucociliar. Además, un uso continuado de esta vía puede ocasionar daños en la mucosa, provocando una variabilidad en la absorción. Situaciones patológicas como la congestión nasal puede interferir en la administración de medicamentos.

En cuanto a las formulaciones empleadas en esta vía, existe una gran variedad. Todas ellas deben compartir las características de la mucosa nasal; por tanto, deben ser isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5.5 a 6.5. Tradicionalmente, esta vía se ha empleado con fines locales, empleándose para ello sprays, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, gotas, polvos, entre otras. Algunos ejemplos de fármacos administrados por esta vía para ejercer un efecto local son descongestivos y opioides (Paredes Mogollo, 2015).

Sin embargo, actualmente, se busca el efecto sistémico en la administración de fármacos por esta vía. La principal estrategia para conseguir este efecto son las nanopartículas. Éstas encapsulan al fármaco, protegiéndolo de la degradación tanto biológica como química que pueda sufrir en su transporte hacia el cerebro. Con esto se consigue una mejora de la biodisponibilidad en el cerebro del fármaco administrado. Además, debido a su pequeño tamaño, el área superficial es mayor, lo que implica una liberación y un transporte más rápido (Mistry et al., 2009). Estos sistemas pueden ser nano o microemulsiones, nanotransportadores micelares, nanopartículas lipídicas sólidas, chitosano, superficie de lecitina, ciclodextrinas, polietilenglicol, entre otras. En la Tabla 1 se exponen algunos ejemplos de fármacos y su sistema nanoparticular empleados en esta vía.

SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN	FÁRMACO	PATOLOGÍA	REFERENCIA
Nanopartículas lipídicas sólidas	Risperidona	Esquizofrenia/Trastorno bipolar	(Patel et al., 2011)
Nanoemulsión	Olanzapina	Esquizofrenia/Trastorno bipolar	(Kumar et al., 2008)
Ciclodextrinas	Estradiol	Alzheimer	(Wang et al., 2006)
Chitosano	Ropinirol	Parkinson	(Khan et al., 2010)
Nanotransportadores micelares	Zolmitriptán	Migraña	(Jain et al., 2010)

Tabla 1. Fármacos y sistemas de administración empleados en la vía intranasal con efectos sistémicos.

2. OBJETIVOS

La administración de Levodopa sigue siendo el principal tratamiento de la enfermedad del Parkinson. En base a las limitaciones que presenta este fármaco para su administración sistémica, ya expuestas anteriormente, se plantea direccionar la investigación hacia la vía intranasal. Por esta vía, mediante aplicación local, se consigue un efecto sistémico del fármaco, actuando de forma rápida, eficaz y sin sufrir degradaciones hasta llegar al cerebro.

Basándose en los antecedentes expuestos en la sección anterior, el primer objetivo planteado en el presente trabajo está encaminado a buscar la formulación más adecuada para la elaboración de insertos intranasales capaces de liberar el fármaco de manera prolongada, seleccionándose aquella con la que se consigan insertos con propiedades adecuadas en aspectos de hinchamiento y potencial adherencia a la mucosa nasal. También se valorarán aspectos como la morfología, el espesor y la uniformidad de peso.

Una vez seleccionada la composición del inserto, se plantea como segundo objetivo valorar la capacidad de liberación de Levodopa de los insertos mediante tres formas distintas de incorporar el fármaco en la formulación. Se estudiará la incorporación del fármaco en liposomas, con el fin de protegerlo y proporcionar una liberación prolongada, o incorporarla directamente a la formulación. Además, también se valora la influencia de la adición al fármaco de HP- β ciclodextrina, formando complejos, con el fin de determinar este efecto sobre la estabilidad.

3. METODOLOGÍA

3.1. COMPOSICIÓN DEL GEL

Basándose en estudios previos, la selección que se hizo finalmente de los componentes del gel fueron HPMC, Chitosano y Pluronic F127. Tanto Chitosano como Pluronic poseen capacidad mucoadhesiva, lo cual es una ventaja para la vía intranasal. El HPMC se incluyó, principalmente, como agente gelificante para aumentar la consistencia de los insertos, aunque también tiene cierta capacidad mucoadhesiva.

La selección de la proporción de los geles en la muestra se inició con distintas mezclas de HPMC y Pluronic recogidas en la Tabla 2 debido a que son los dos geles más viscosos de la mezcla. Se buscaba determinar la mejor proporción a la cual estos geles se interpusieran perfectamente y no se produjera una separación. Para ello, se elaboraron HPMC 5% p/p y Pluronic 17% p/p, ambos en agua destilada.

HPMC (%)	PLURONIC (%)
20	80
30	70
40	60
50	50
60	40
70	30
80	20

Tabla 2. Proporciones de HPMC y Pluronic estudiadas para la elaboración del gel.

Las mezclas de HPMC/Pluronic tuvieron un peso final de 10 gramos. Una vez elaboradas, se agitaron durante tres horas y posteriormente se secaron en la estufa a 38 °C durante 24-48 horas.

Sin embargo, tras observar que los films resultantes eran demasiados rígidos, se procedió a incluir en la formulación un plastificante con el fin de que aportara al inserto una mayor flexibilidad. Se probaron dos plastificantes diferentes, Glicerina y Propilenglicol. Basándonos en estudios anteriores, se añadieron en exceso a la formulación previamente preparada en cantidades de 0,8 y 1 g. Finalmente, se decidió que el plastificante que se iba a emplear era la Glicerina en una cantidad de 0,8 g.

Una vez obtenidos los resultados de estos estudios, la mezclas que se obtuvieron no tenían unos resultados adecuados, por lo que se procedió a bajar la concentración del HPMC. En este caso se probaron concentraciones de HPMC de 4 y 4,5% p/p con diferentes proporciones de mezcla reflejadas en las tablas 3 y 4.

HPMC (%)	PLURONIC (%)	GLICERINA (g)
80	20	0,8
70	30	0,8
60	40	0,8

Tabla 3. Proporciones de la mezcla con HPMC al 4,5% p/p

HPMC (%)	PLURONIC (%)	GLICERINA (g)
80	20	0,8
70	30	0,8
60	40	0,8

Tabla 4. Proporciones de la mezcla con HPMC al 4% p/p

Para garantizar la mucoadhesividad de los insertos se añadió Chitosano a diferentes concentraciones, concretamente 1 y 2% p/v. Sin embargo, para la disolución de este compuesto es necesaria la presencia ácido acético, por lo que la cantidad de éste en la composición total del inserto debe ser mínima. Tras estudios previos, se determinó que la cantidad de Chitosano que se añadió al gel sería de 2,2 g (en exceso).

Como resumen, la cantidad total de gel será de 8 g de HPMC, 2 g de Pluronic, 0,8 g de Propilenglicol y 2,2 g Pluronic, siendo el total de 13 gramos (Figura 6).

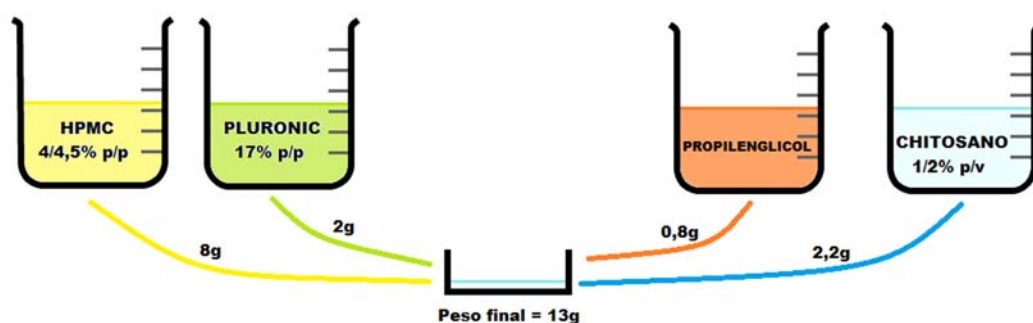


Figura 6. Composición final del gel

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DEL GEL

Una vez seleccionada la proporción de los componentes, se planteaban una serie de variables en la composición del gel las cuales influirían en sus características finales. Para estudiar estas variables, se aplicó un diseño experimental al estudio de la composición del gel, estudiando la influencia de las distintas variables en ciertas características de la formulación, con el fin de obtener aquella con las mejores características para una posterior administración intranasal.

Para ello, se realizó una fase de cribado, en la cual se pretende discriminar entre un número determinado de variables y niveles, aquellos que ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas en evaluación. En concreto, se estudia el efecto que tiene el cambio en los niveles de cada variable sobre cada respuesta considerada. En el presente trabajo se ha desarrollado un estudio en el que se intenta poner de manifiesto la influencia que ejercen variables sobre las características de la formulación.

Para la etapa de cribado, se seleccionó una matriz ortogonal L_{16} de Taguchi que correspondía a un diseño factorial $2^{(5-1)}$. Para este estudio, los factores y los niveles quedan recogidos en la Tabla 5.

VARIABLES	NIVEL INFERIOR	NIVEL SUPERIOR
Variable 1: Concentración de HPMC	4% p/p	4,5% p/p
Variable 2: Tipo de Chitosano	Media viscosidad	Alta viscosidad
Variable 3: Concentración de Chitosano	1% p/v	2% p/v
Variable 4: Adición del Chitosano	Junto con el HPMC	Al final
Variable 5: Tipo de plastificante	Glicerina	Propilenglicol

Tabla 5. Variables seleccionadas en el estudio y sus niveles.

El resultado tras combinar las variables seleccionadas en dos niveles diferentes fueron dieciséis experimentos, los cuales quedan recogidos en la Tabla 6. Todos los experimentos se realizaron por duplicado con el fin de estimar la variabilidad de los datos y, por lo tanto, los valores de error.

Run	Concentración de HPMC (%p/p)	Tipo de Chitosano	Concentración de Chitosano (%p/v)	Adición del Chitosano	Tipo de Plastificante
1	4	HV	1	B	GL
2	4	HV	1	A	PG
3	4	HV	2	B	PG
4	4	HV	2	A	GL
5	4	MV	1	B	PG
6	4	MV	1	A	GL
7	4	MV	2	B	GL
8	4	MV	2	A	PG
9	4.5	HV	1	B	PG
10	4.5	HV	1	A	GL
11	4.5	HV	2	B	GL
12	4.5	HV	2	A	PG
13	4.5	MV	1	B	GL
14	4.5	MV	1	A	PG
15	4.5	MV	2	B	PG
16	4.5	MV	2	A	GL

Tabla 6. Matriz ortogonal de Taguchi L₁₆ utilizada en este estudio. (HV: alta viscosidad. MV: media viscosidad. A: al final. B: junto con el HPMC. GL: glicerina. PG: propilenglicol)

Para evaluar los resultados obtenidos, las muestras resultantes se sometieron a ensayos de uniformidad de espesor, hinchamiento y mucoadhesividad, así como una caracterización morfológica. En la evaluación de estos resultados se emplearon el análisis de la varianza (ANOVA) y el análisis de las medias (ANOM) para determinar qué factores ejercían una influencia estadísticamente significativa sobre las respuestas en evaluación.

Para llevar a cabo la optimización de las distintas respuestas, se estableció como criterio el deseo de maximizar o minimizar cada una de ellas (Tabla 7).

RESPUESTA	OBJETIVO
Espesor	Minimizar
Hinchamiento	Minimizar
Mucoadhesividad	Maximizar

Tabla 7. Objetivo para cada respuesta estudiada.

Tras el estudio de las variables, se determinaron aquellas que tenían una mayor influencia en la formulación. Con este estudio, se determinaron las características óptimas que debía tener la formulación.

3.2.1. ENSAYOS

Tras la obtención de los insertos con diferentes composiciones, se procedió a realizar diversos ensayos con el fin de seleccionar la formulación que presentará mejores características. Para ello, los 16 lotes se cortaron en insertos de 1 cm². Los ensayos que se realizaron fueron los que se explican a continuación.

- **Ensayo de uniformidad de peso:** se realizó pesando individualmente 6 insertos de cada lote. Se calculó la desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD).
- **Ensayo de espesor:** se realizó midiendo el espesor de 6 insertos de cada lote. Se calculó la media, desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD).
- **Ensayo de hinchamiento:** se realizó pesando un inserto en un pesamuestras al que se le añade 1 mL de fluido nasal artificial (SNF), el cual está compuesto por 5mg/mL NaCl, 0,32 mg/mL CaCl₂·2H₂O y 1,29 mg/mL KCl ajustado a pH 6,2 (Paul et al., 2018). Cada media hora y durante 6 horas se retira el exceso de medio y se pesa el inserto. El ensayo se realizó por triplicado. Con los datos obtenidos se calculó la ratio de hinchamiento (SR). De acuerdo con Grimaudo et al., 2018 (Figura 6).

$$SR = \frac{Pt - Pi}{Pi} \times 100$$

Figura 6. Ecuación del ratio de hinchamiento (Pt: peso final del inserto; Pi: peso inicial del inserto)

- **Ensayo de mucoadhesividad:** para la realización de este ensayo se elaboró, en primer lugar, una solución caliente de agar/mucina al 1 y 2% p/p respectivamente en buffer fosfato pH 6, de la cual se depositaron 15,9 g en placas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro. Se dejaron que gelificaran a 4-8 °C durante 3 horas. Una vez gelificadas, se dejan equilibrar en condiciones de 22 °C y 79% de humedad relativa. Para ello, se utiliza una solución de cloruro de amonio saturada en una cámara (Bertram and Bodmeier, 2006).

Este ensayo se llevó a cabo uniendo la placa de Petri al aparato de disgregación de comprimidos (JP XII), de forma vertical, de manera que la placa experimente un movimiento ascendente y descendente, sumergiéndose en buffer fosfato ajustado a pH 7,4 cuando desciende. El inserto se colocó en la parte superior de la placa de manera que cada vez que desciende la placa se humedece con el buffer fosfato (Nakamura et al., 1996) (Figura 7). Así, el inserto por gravedad se va a ir desplazando por la placa. Se midió el desplazamiento del inserto por la placa en intervalos de 1 hora durante 4 horas. El potencial de adhesión es inversamente proporcional al desplazamiento del inserto.

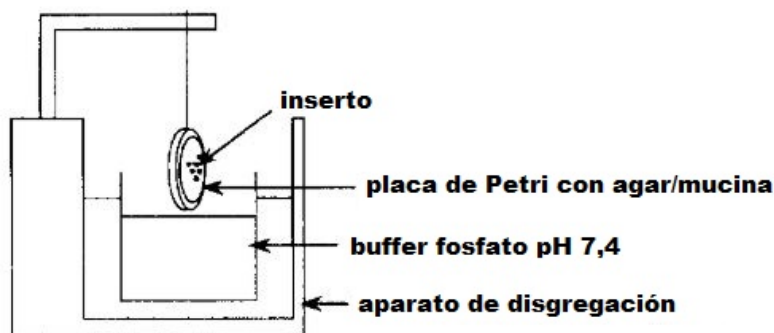


Figura 7. Equipo para la elaboración del ensayo de mucoadhesividad (modificado de Nakamura et al., 1996).

3.3. PREPARACIÓN DE INSERTOS CON LEVODOPA

Una vez seleccionado el inserto, según su composición, para los siguientes ensayos se añadió el fármaco. Como se refirió anteriormente, se incorporó L-dopa, la cual se adicionó junto con ácido ascórbico como antioxidante, ya que estudios anteriores han demostrado que L-dopa aumenta

mucho la estabilidad en su presencia. De la misma forma, y con el mismo fin se añadió HP β ciclodextrina.

Para ello, se prepararon 3 lotes de geles cuya composición se refleja en la Tabla 10. En los siguientes puntos se explica cómo se elaboraron dichos geles.

Gel 1	Lotes L1 y L2 formados por liposomas que contienen L-dopa, AA y HPBCD
Gel 2	Lote L3 formado por L-dopa, AA y HPBCD
Gel 3	Lote L4 formado por L-dopa y AA

Tabla 10. Composición de los geles

3.3.1. ENCAPSULACIÓN DE LEVODOPA EN LIPOSOMAS E INCORPORACIÓN EN EL GEL 1

En primer lugar, se procedió a elaborar los liposomas, cuya composición ha sido previamente optimizada. Para la elaboración de la película, fueron necesarios 3,7 mg de DPPC, 1,53 mg de CHEMS y 0,25 mg de DCP. Todo ello se pesó en un matraz de fondo redondo y se disolvió en 8 mL de cloroformo, evaporándose el solvente en un rotavapor (Büchi R-210) con baño termostático a 42 °C (Büchi B-491) y vacío. Una vez formada la película, se dejó en el desecador durante 24 horas. El ensayo se realizó por duplicado.

Posteriormente, se preparó la fase acuosa. Esta estaba compuesta por 0,045 mmoles de levodopa, $3,41 \times 10^{-3}$ mmoles de ácido ascórbico y 0,045 mmoles de HPBCD los cuales se disolvieron en 3 mL de Hepes ajustado a pH 6,2. Se realizaron dos fases acuosas iguales.

Una vez que se prepararon las dos etapas anteriores, se procedió a la formación de los liposomas, que consistió en introducir la fase acuosa (3 mL) en el matraz de fondo redondo y someterlo a 5 ciclos sucesivos que consistieron en 1 minuto de vortex seguido de 5 minutos dentro de un baño termostático a 42 °C. Así se obtuvieron los dos lotes iguales de liposomas, L1 y L2.

A continuación, se introdujeron los lotes L1 y L2 en la centrífuga durante media hora a 10.000 rpm a 4 °C. Concluido este tiempo, se procedió a desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 500 μ L de Hepes pH 6,2.

Los dos volúmenes que se obtuvieron respectivamente de cada lote se unificaron y este volumen se incorporó al gel mediante agitación con el fin que se interpusieran perfectamente los liposomas en los componentes del mismo. De esta forma se obtuvo el gel 1.

El gel se extendió sobre una placa de Petri y se secó en la estufa durante 24-48 horas a 38 °C. Finalizado el proceso, se cortaron en insertos de 1 cm².

3.3.2. INCORPORACIÓN DE LEVODOPA EN LOS GELES 2 y 3

La incorporación en el gel 2 se llevó a cabo de la siguiente manera. Se pesaron en un eppendorf 0,045 mmoles de levodopa, $3,41 \times 10^{-3}$ mmoles de ácido ascórbico y 0,045 mmoles de HPBCD los cuales se disolvieron en 500 µL de Hepes pH 6,2. Una vez disueltos, se incorporaron al gel mediante agitación.

Para la incorporación en el gel 3 se pesaron en un eppendorf 0,045 mmoles de levodopa y $3,41 \times 10^{-3}$ mmoles de ácido ascórbico. A continuación, se disolvieron en 500 µL de Hepes pH 6,2. Estos, se incorporaron al gel mediante agitación.

Una vez incorporada la levodopa en ambos geles, estos se extendieron en placas de Petri de vidrio individuales y se secaron en la estufa a 38 °C durante 24-48 horas. Por último, una vez secos los geles, se cortaron en insertos individuales de 1 cm².

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LEVODOPA EN INSERTOS MEDIANTE HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí, además de permitir realizar una identificación cualitativa (tiempo de retención) y una identificación cuantitativa (áreas de los picos) de las especies separadas (Femenía-Font et al., 2005).

La cuantificación de L-dopa mediante HPLC (Lachrom Hitachi HPLC System Manager) se realizó utilizando una columna C₁₈ (ZORBAX SB-C18 150mm × 4,6 mm, 3,5 µm) con una longitud de onda de 280 nm. La fase móvil estuvo constituida por tampón fosfato y metanol en proporción 50:50. El tampón fosfato estaba constituido por potasio dihidrógeno ortofosfato 10 mM ajustado a pH 2,5. La velocidad de flujo se fijó en 1 mL/min y la temperatura a 25 °C. El volumen de inyección fue de 20 µL.

Se realizó el estudio colocando los insertos anteriormente obtenidos en un vial con 10 mL de fase móvil, con el fin de destruir el inserto y cuantificar la cantidad de L-dopa por inserto. Para ello, fue necesario agitación con el vortex y el baño de ultrasonido. Esta etapa fue realizada por duplicado.

Una vez disueltos los insertos en la fase móvil, se filtraron con filtros de 0,45 µm y se prepararon en viales para su cuantificación.

Además, se elaboraron dos estándares. El primero de ellos (estándar 1) estaba compuesto por 0,050 mmoles de L-dopa, 0,011 mmoles de ácido ascórbico y 0,15 moles d HPBCD disueltos en 10 mL de fase móvil. El segundo (estándar 2) estaba formado por 0,050 mmoles de L-dopa, 0,011 y mmoles de ácido ascórbico disueltos en 10 mL de fase móvil.

3.5. ESTUDIO DE PERMEACIÓN IN VITRO

El estudio de permeación se llevó a cabo en celdas de Franz depositando un inserto de cada gel en membranas de celulosa. Además, se colocaron dos estándares, uno de ello compuesto por 0,045 mmoles de levodopa, $3,41 \times 10^{-3}$ mmoles de ácido ascórbico y 0,045 mmoles de HPBCD disueltos en 3 mL de Hepes pH 6,2, y el otro compuesto por 0,045 mmoles de levodopa y $3,41 \times 10^{-3}$ mmoles de ácido ascórbico disueltos en 3 mL de Hepes pH 6,2. Además, también se elaboró una muestra que contenía los liposomas anteriormente elaborados.

El compartimento receptor estaba compuesto por una solución de tampón Hepes pH 6,2 para simular el medio fisiológico de la cavidad nasal. El ensayo se realizó a una temperatura de 36-37 °C. el ensayo tuvo una duración de 24 horas, durante las cuales se extrajeron muestras de 500 µL en los minutos 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 24 horas. Una vez extraídas las muestras, el volumen extraído se reemplazaba con 500 µL de Hepes pH 6,2 con el fin de mantener constante el volumen inicial. Además, en el compartimento donador se fueron inyectando 500 µL de SNF tras cada toma de muestra para mantener la humectación del inserto durante todo el ensayo. Las pruebas se realizaron por duplicado. El contenido de levodopa de las muestras extraídas se cuantificó por HPLC.

4. RESULTADOS

4.1. SELECCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL GEL

Como se describió anteriormente, se comenzó con la selección de la proporción de HPMC:Pluronic. El HPMC se trata de un polímero que ha sido ampliamente utilizado en la elaboración de insertos debido a su capacidad para aumentar la consistencia de estos, así como por su capacidad bioadhesiva. El Pluronic es otro polímero que ha sido elegido como componente del gel debido a su capacidad de gelificación a temperaturas fisiológicas y su capacidad mucoadhesiva (Schmolka, 1991).

Una vez elaborados los geles de HPMC y Pluronic al 5% y 17% p/p respectivamente, se procedió a mezclarlos en diferentes proporciones anteriormente explicadas en la Tabla 2. Se estudió cada una de estas combinaciones fue estudiada con el fin de determinar cuál era la que ofrecía mejores propiedades. Las placas que se obtuvieron tras extender los diferentes geles se muestran en la Figura 8.

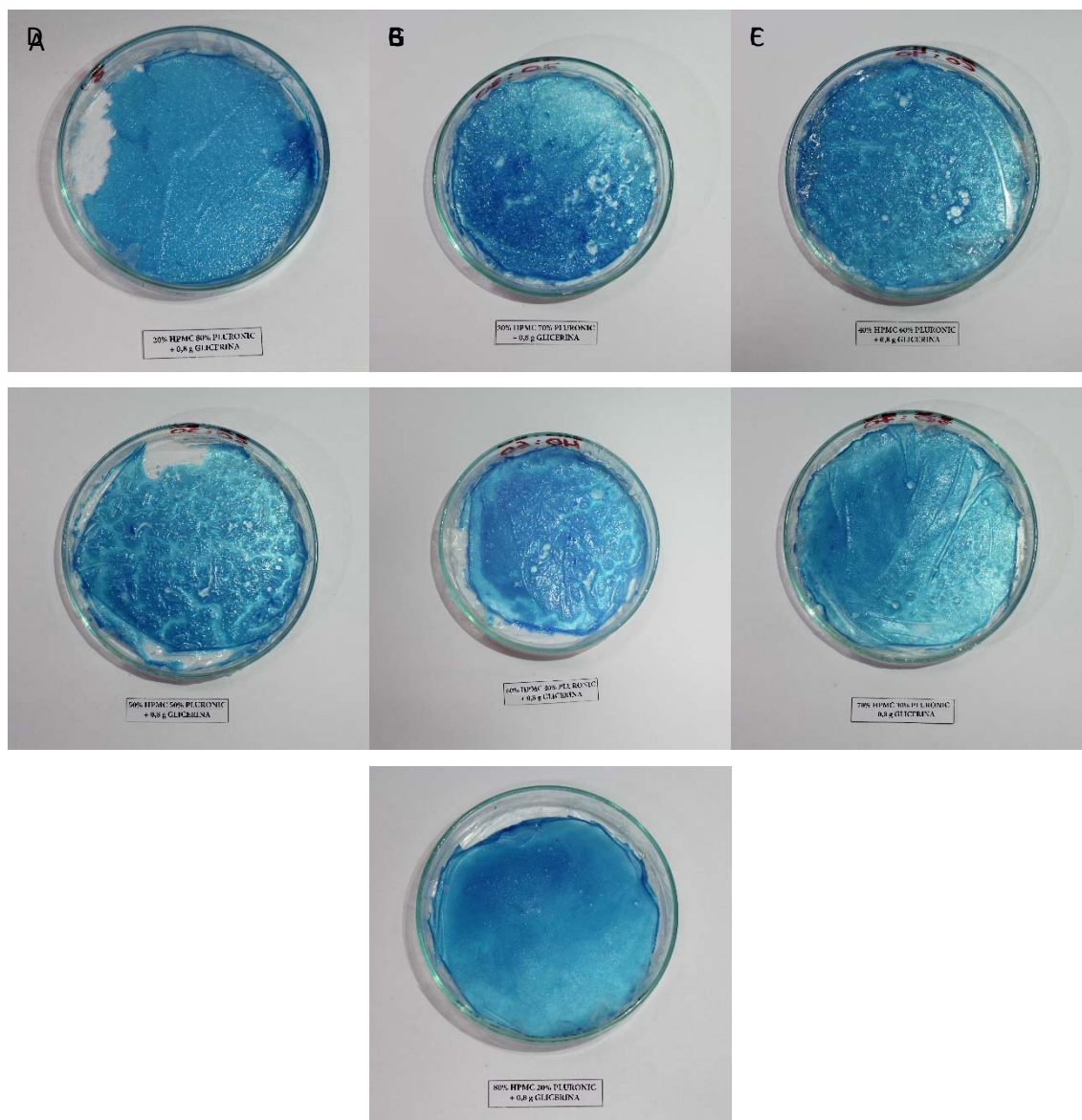
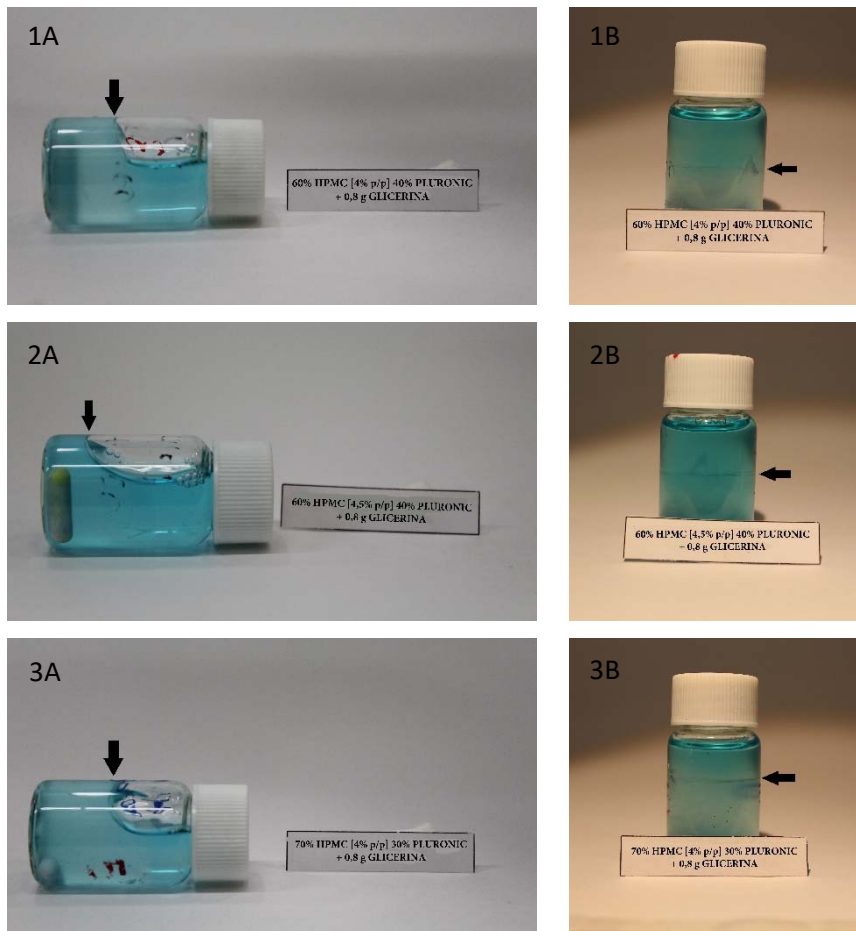


Figura 8. Imágenes obtenidas tras la mezcla de las distintas proporciones de geles. A) 20% HPMC, 80% Pluronic + 0,8 g Glicerina; B) 30% HPMC, 70% Pluronic + 0,8 g Glicerina; C) 40% HPMC, 60% Pluronic + 0,8 g Glicerina; D) 50% HPMC, 50% Pluronic + 0,8 g Glicerina; E) 60% HPMC, 40% Pluronic + 0,8 g Glicerina; F) 70% HPMC, 30% Pluronic + 0,8 g Glicerina; G) 80% HPMC, 20% Pluronic + 0,8 g Glicerina

Se observó que bajas concentraciones de HPMC no dan una consistencia adecuada al gel. Cuanto mayor sea la proporción de HPMC en la mezcla, mejor consistencia tiene el gel, y, por tanto, mejores características para el inserto intranasal. Siguiendo estos resultados, las mezclas con una proporción menor al 60% de HPMC fueron descartadas.

Sin embargo, una concentración del 5% p/p de HPMC hace que sea un gel muy denso, lo que provoca que cuando los geles se dejaban en reposo tras la agitación e interposición de los componentes, estos se separaban. Como solución a esto se propuso disminuir la concentración del gel de HPMC de un 5% p/p. Se probaron dos concentraciones diferentes que fueron 4% y 4,5% p/p. Con estas dos concentraciones nuevas se elaboraron las mezclas 60:40, 70:30 y 80:20 (HPMC:Pluronic) las cuales contenían 0,8 g de Glicerina.

Como se puede observar en la Figura 9, las mezclas con proporciones inferiores a 80% de HPMC, al dejarlas reposar se produce la segregación del HPMC y Pluronic, lo cual supone que los geles son inestables. La única mezcla en la que los componentes no sufren separación es la mezcla 80:20 (HPMC:Pluronic). Por tanto, se determinó que los geles deben llevar una proporción de HPMC:Pluronic correspondiente a 80:20 p/p.



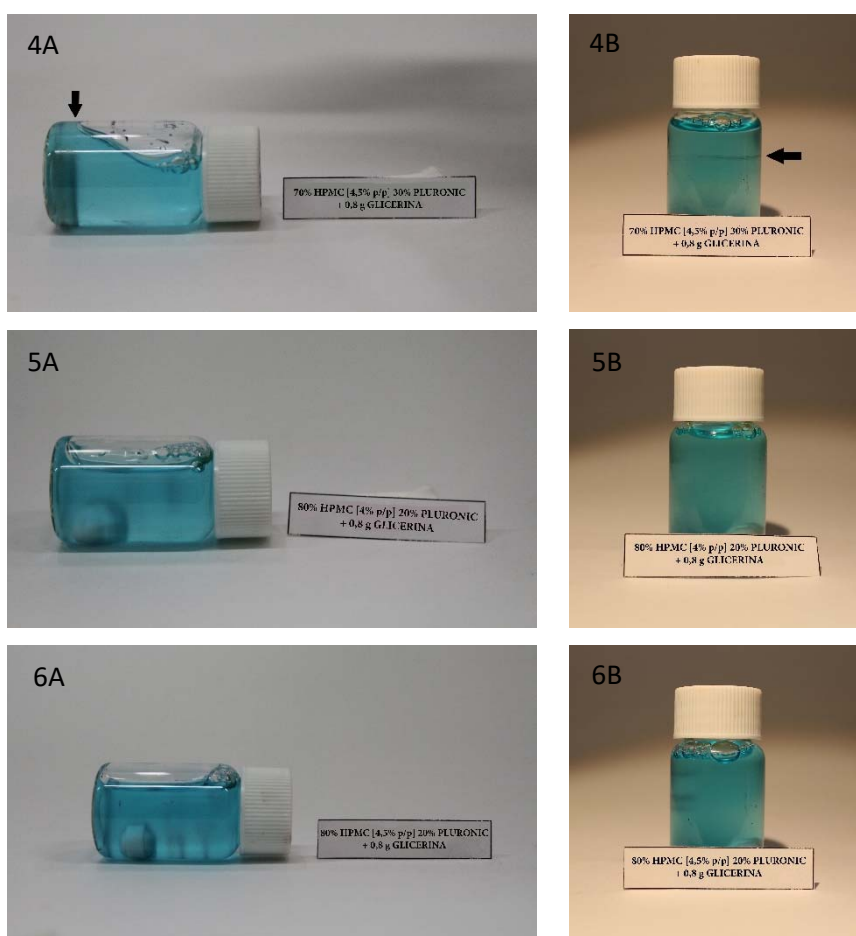
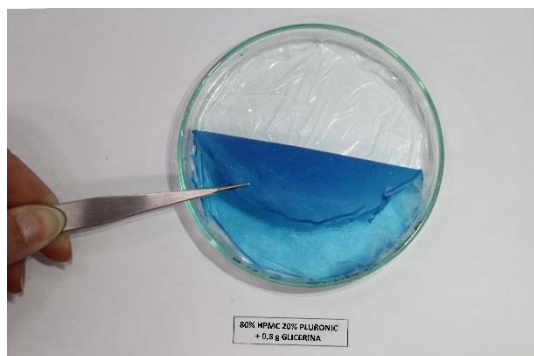


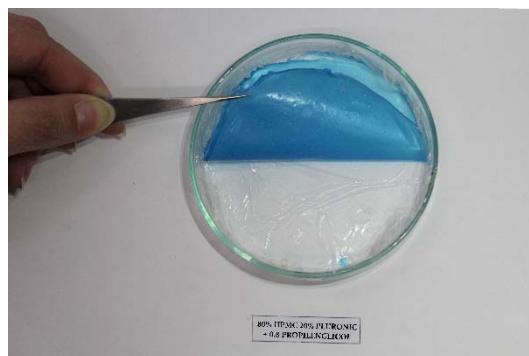
Figura 9. Imágenes de los geles con concentraciones de HPMC de 4% y 4,5% p/p. 1) 60% HPMC [4% p/p] 40% Pluronic + 0,8 g Glicerina; 2) 60% HPMC [4,5% p/p] 40% Pluronic + 0,8 g Glicerina 3) 70% HPMC [4% p/p] 30% Pluronic + 0,8 g Glicerina; 4) 70% HPMC [4,5% p/p] 30% Pluronic + 0,8 g Glicerina; 5) 80% HPMC [4% p/p] 20% Pluronic + 0,8 g Glicerina; 6) 80% HPMC [4,5% p/p] 20% Pluronic + 0,8 g Glicerina.

Una vez se decidió que la proporción de HPMC:Pluronic en el gel debía ser de 80:20, se probaron los dos tipos de plastificantes. Como se explicó anteriormente, los plastificantes seleccionados, según estudios anteriores fueron Glicerina y Propilenglicol.

Como se puede apreciar en las Figuras 10 y 11, al añadir plastificante a la formulación hace que sea mucho más flexible, pudiéndose plegar sin fracturarse. Sin embargo, no se aprecian diferencias, a priori, sobre la utilización de un plastificante u otro. Por tanto, será una cuestión que se resolverá más adelante, al realizarse diversos estudios.



**Figura 10. Gel formulado con 80% HPMC
20% Pluronic + 0,8 g de Glicerina**



**Figura 11. Gel formulado con 80% HPMC
20% Pluronic + 0,8 g de Propilenglicol**

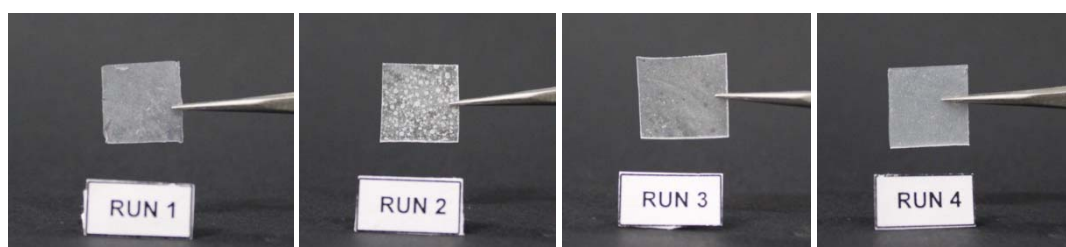
Por último, se decidió incluir Chitosano en la formulación debido a sus propiedades bioadhesivas, su naturaleza viscosa y capacidad de aumentar el tiempo de adherencia del inserto a la mucosa nasal. La elección del Chitosano se debe que numerosos estudios han demostrado que en combinación con el Pluronic proporciona un buen sistema para la administración intranasal de fármacos ya que permiten controlar la liberación del fármaco y aumentan el tiempo de residencia de la formulación en la cavidad nasal (Luppi et al., 2009).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS INSERTOS

Con los resultados obtenidos tras el estudio de los 16 lotes de insertos, cada uno de ellos con una composición diferente, se buscaba encontrar cuál de todos era el que mejor respondía a los diferentes ensayos a los que fueron sometidos, con el fin de encontrar la composición más apropiada.

4.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Tras la elaboración de los insertos, se analizó la morfología de cada uno de manera visual. Se vio que había insertos donde los componentes no se habían interpuesto, de manera que aparecen pequeños gránulos en los insertos (Figura 12).



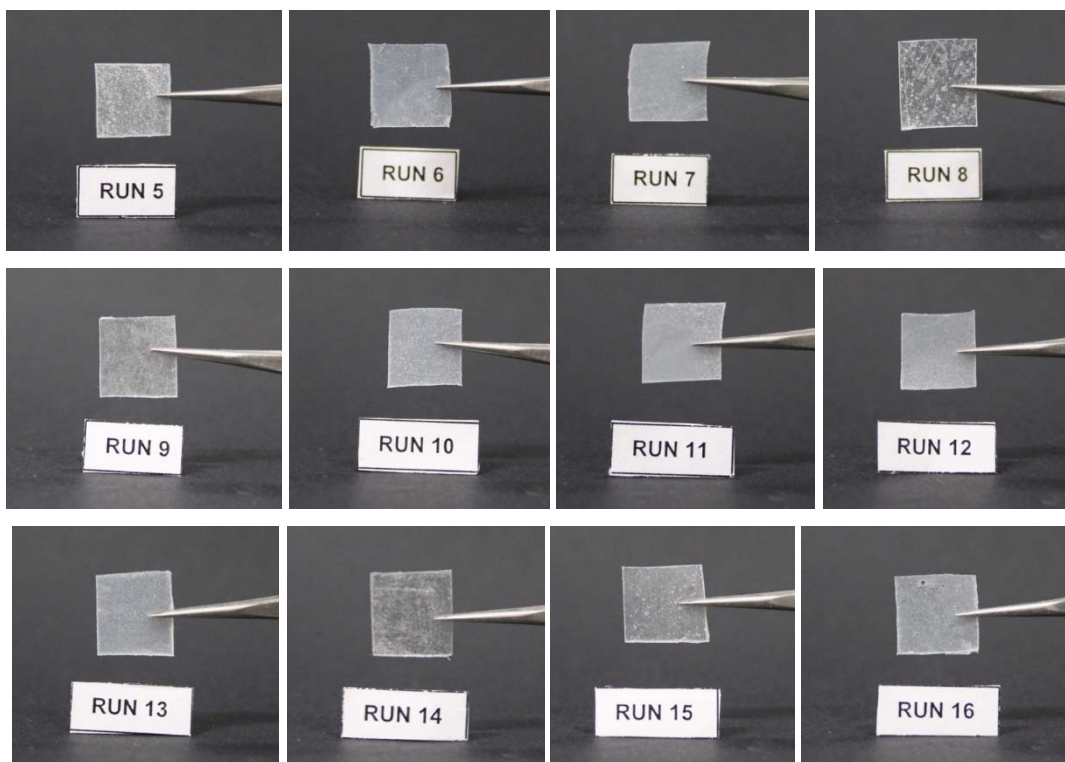


Figura 12. Imágenes de los insertos.

La no interposición de los componentes implica que posteriormente, cuando se le adicione fármaco, este va a estar repartido de manera desigual. Por tanto, lotes como el 2, 5, 8, 14 y 15 quedaron descartados.

4.2.2. ENSAYO DE UNIFORMIDAD DE PESO

Según la Real Farmacopea Española 5ª ed., el ensayo de uniformidad de masa de preparaciones unidosis se realiza pesando individualmente 20 unidades tomadas al azar y determinar la masa media. El ensayo será correcto si no más de 2 masas individuales se desvían de la masa media en un porcentaje más elevado de 10 y ninguna se desvía más del doble de ese porcentaje.

Sin embargo, en la Real Farmacopea Española, no se reconoce a inserto como una forma farmacéutica. Por tanto, teniendo en cuenta que es una forma sólida y que su peso es menor a 80 mg, se estableció que su porcentaje máximo de desviación sería de 10.

Se aplicó este procedimiento a los 16 insertos, de los cuales, todos lo cumplían excepto los lotes 6 y 13, de manera que estos se rechazaron como formulación final.

4.2.3. ENSAYO DE ESPESOR

En este ensayo se buscaba encontrar los factores que contribuyeran a que el espesor del inserto fuera mínimo. De las cinco variables que se estudiaron, explicadas anteriormente, se determinó

que el único que afectaba al espesor era el tipo de plastificante, con una contribución de un 62,2% y un I-hat de 0,06937. Los resultados concluyeron que el plastificante que debía usarse era Glicerina.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 13, los espesores más pequeños se consiguen en insertos cuyo plastificante empleado es el Propilenglicol. Estos insertos quedan representados en la gráfica de color rojo. Esto se debe a que el programa empleado para el tratamiento de los datos, Doepack, analiza cómo interfieren cada una de las variables en cada uno de los ensayos realizados de manera conjunta. Además, el espesor no es un factor decisivo en el inserto, ya que otros factores como la mucoadhesividad o al hinchamiento, influyen de manera más decisiva en el inserto final.

Por tanto, como se corroborará más adelante, se determinó que el Propilenglicol debía ser el plastificante utilizado.

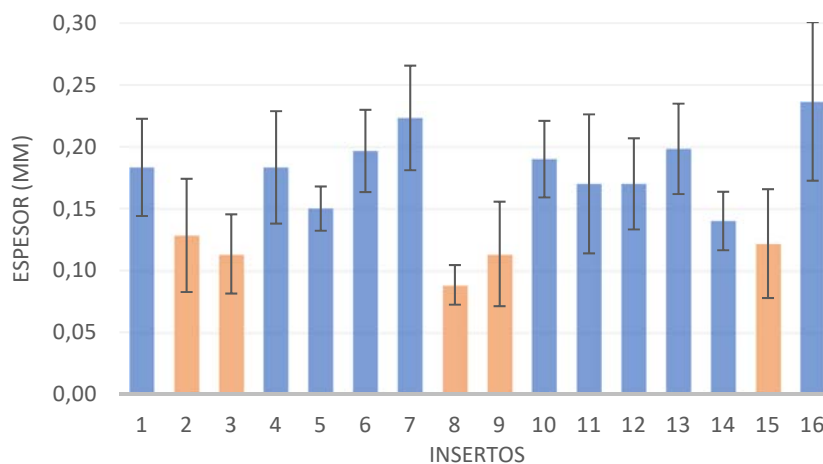


Figura 13. Gráfica que representa los espesores (mm) de cada uno de los insertos.

4.2.4. ENSAYO DE HINCHAMIENTO

Con los insertos se procedió a medir su capacidad de hinchamiento o captación de agua, la cual, es un parámetro que influirá en la capacidad adhesiva del inserto, de manera que, a mayor hinchamiento, menor capacidad adhesiva del inserto (Hermans et al., 2014). Por tanto, se buscó que el hinchamiento del inserto fuera mínimo.

Además, también se aprecia que hay insertos que al humedecerse vuelven a su estado de gel. Un ejemplo de ello es el inserto 14. Como podemos ver en la Figura 14, éste alcanza su máximo de hinchamiento a la hora y media de empezar el ensayo. Sin embargo, sufre una fuerte erosión que es debida a que en cada toma de muestra se pierde parte del inserto por su transformación

de nuevo en gel. También siguen esta tendencia los insertos 9 y 6, por lo que fueron descartados junto con el 14.

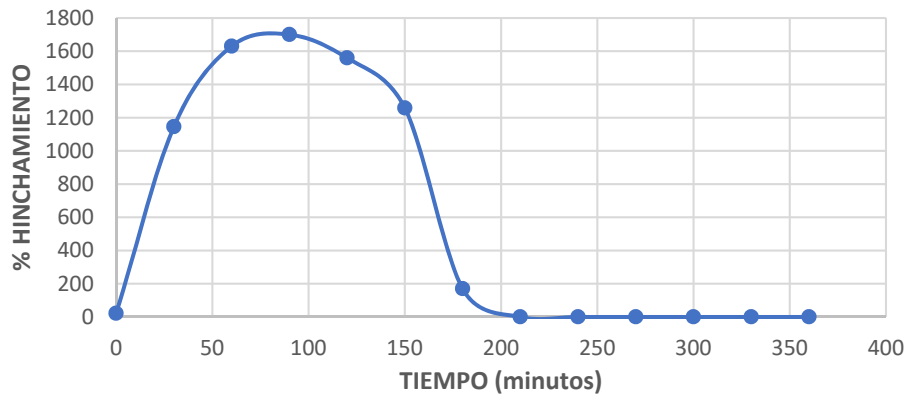


Figura 14. Grafica representando el porcentaje de hinchamiento (peso) con respecto al tiempo del inserto 14.

Como se dijo anteriormente, se buscaba que el hinchamiento fuera mínimo con el fin de aumentar la adherencia la mucosa nasal. Se valoraron los resultados obtenidos y se determinó que hinchamientos superiores a 1300 serían descartados, debido a que el inserto no mantiene su forma, es decir, se expande, pudiendo llegar a ser molesto en el caso de ser introducido en la mucosa nasal. Además, cuanto mayor es el hinchamiento, menor es la consistencia del inserto (Hermans et al., 2014). Esto hace que los insertos sean frágiles y se rompan con mucha facilidad.

Se observó que otros insertos, con ciertas variables, siguen una misma tendencia. Una vez que alcanzan su máximo de hinchamiento, se van erosionando perdiendo peso de manera prácticamente lineal. El hecho de que los insertos vayan perdiendo masa a medida que pasa el tiempo es un factor no deseado. Por tanto, para ver cuánto se erosionaban los insertos una vez alcanzados su máximo de hinchamiento, se calculó la ecuación de la recta que forman los puntos desde que se alcanza el máximo de hinchamiento hasta el último. De esta manera, cuanto mayor sea la pendiente de la recta, mayor es el grado de erosión del inserto, y, por tanto, más masa pierde con el tiempo. Un ejemplo de un inserto cuyo grado de hinchamiento y de erosión es alto es el inserto número 15 (Figura 15).

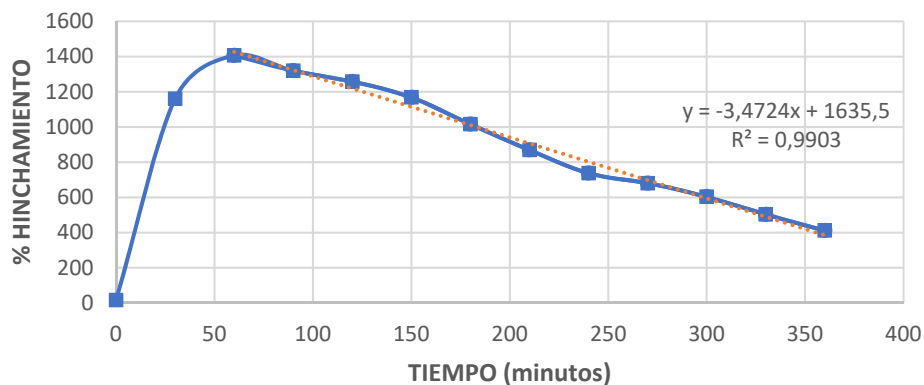


Figura 15. Gráfica que representa el porcentaje de hinchamiento (peso) con respecto al tiempo del inserto 15.

La tendencia del inserto número 15 también la siguen el inserto 7 y el 12. Por tanto, estos fueron descartados.

Un ejemplo de inserto cuyo hinchamiento cumple las condiciones anteriormente explicadas es el inserto 4 (Figura 16). Esta tendencia también la siguen los insertos 1, 10, 11, 13 y 16.

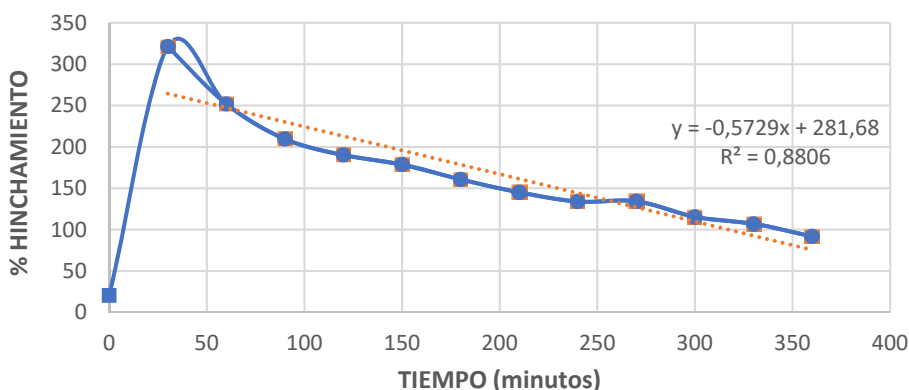


Figura 16. Gráfica representando el porcentaje de hinchamiento (peso) con respecto al tiempo del inserto 4.

Una vez se analizaron todos los resultados obtenidos, se determinó que las dos variables que afectaban al hinchamiento son la concentración de Chitosano y el tipo de plastificante, con una contribución de un 19,6% y 15,9%, y un I-hat de 224,3 y -202 respectivamente, de forma que para que el hinchamiento en el inserto sea mínimo, la concentración de Chitosano debe ser 1% p/v y el plastificante debe ser Propilenglicol.

La capacidad de hinchamiento de los geles se debe a que todos incluyen en su formulación HPMC, el cual supone la inclusión de grupos hidrófilos, favoreciendo la captación de agua, y haciendo que los geles alcancen su máximo de hinchamiento antes de la primera hora y media

del ensayo (Mughal et al., 2011). Además, el Chitosano también contiene una gran cantidad de grupos hidrófilos, por lo que a mayor concentración de Chitosano en el gel, mayor será su capacidad de captación de agua (Bigucci et al., 2008).

4.2.5. ENSAYO DE MUCOADHESIVIDAD

Para determinar la capacidad adhesiva de los insertos en la mucosa nasal, se realizó un estudio de la fuerza mucoadhesiva de cada uno de los insertos.

Para este ensayo, se consideró que un desplazamiento de 5 cm supone que el inserto no se adhiere al medio de agar/mucina preparado así por sus propiedades mucoadhesivas, por lo que no posee propiedades de mucoadhesividad.

Aunque no de forma muy aparente, en la Figura 17 se observan los desplazamientos de los insertos con respecto al tiempo. De los 16 insertos estudiados, solo tres son capaces de adherirse al agar/mucina sin desplazarse, que fueron los insertos 3, 11 y 16.

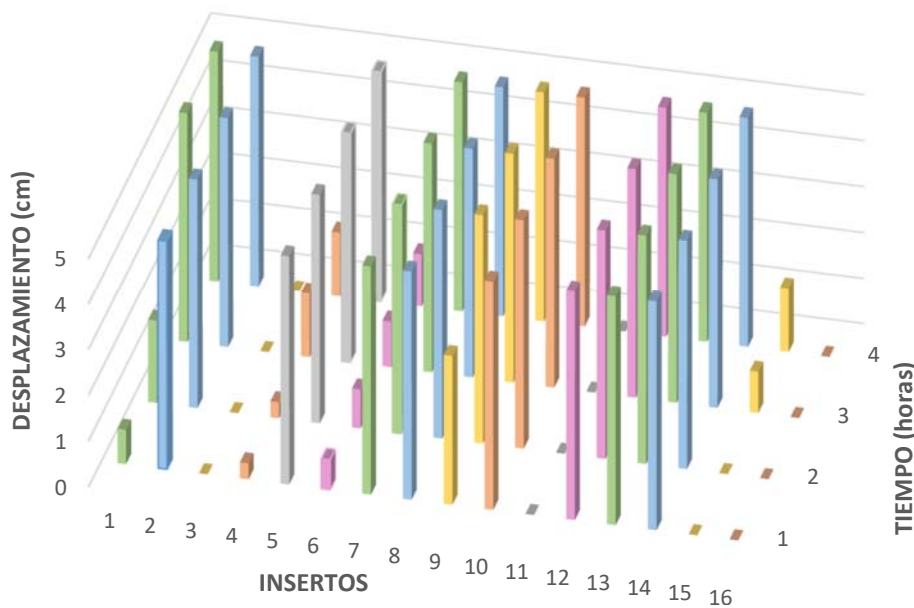


Figura 17. Gráfica de insertos representando los desplazamientos con respecto al tiempo.

En este caso se busca que la mucoadhesividad del inserto sea máxima, por tanto, se pretende minimizar el desplazamiento del inserto por la placa de agar/mucina. Según los resultados obtenidos por el DOEpack, en el desplazamiento del inserto por el agar/mucina influyen dos variables que son la concentración de Chitosano y el tipo de plastificante. La concentración de Chitosano tuvo una contribución de 27,2% y un I-hat de 46,81, mientras que el tipo de plastificante tuvo una contribución de 7,6% y un I-hat de -24,69. Para que el desplazamiento sea

mínimo la concentración de Chitosano debe ser del 2% p/v y el plastificante debe ser Propilenglicol.

Son muchos los estudios que demuestran la capacidad mucoadhesiva del Chitosano (Bigucci et al., 2008; Luppi et al., 2009). Por tanto, cuanto mayor sea la concentración de Chitosano en el gel, mayor será su capacidad adhesiva. Se considera al Chitosano como un polímero interesante para este estudio ya que posee cargas positivas que van a interacción con grupos de carga negativa de la mucosa nasal.

Como resumen de los estudios realizados a los insertos, los resultados de los ensayos revelaban que ni la concentración de HPMC, ni el tipo de Chitosano ni en qué momento de la elaboración se adicione al gel, influyen en las características del inserto. Se determinó, pues, que la concentración de HPMC en la mezcla sería del 4% p/p ya que de esta manera se ahorrarían costes en la materia prima. En cuanto al Chitosano, se seleccionó el de alta viscosidad, con el fin darle más consistencia al inserto. Por último, en cuanto al momento de la adición del Chitosano, se determinó que se adicionaría en el momento que al investigador le fuera más sencillo.

Como se puede comprobar, algunos de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se contradicen. Por tanto, para seleccionar cual van a ser los niveles de las variables finales, se estableció que establecer un orden de prioridad de las variables.

Así, se determinó que la variable más prioritaria para la elaboración del inserto era la mucoadhesividad, seguida del hinchamiento y por último el espesor. Esto quiere decir que el espesor del inserto no aporta en este estudio una ventaja decisiva, frente a tener buenas propiedades de mucoadhesividad.

Por tanto, se llegó a la conclusión de que la composición del gel debía de ser 8 g de HPMC al 4% p/p, 2 g de Pluronic al 17% p/p, 2'2 g de Chitosano de alta viscosidad al 2% p/v y 0'8 g de Propilenglicol. Esta formulación coincide con la composición del inserto número 3.

4.3. INCORPORACIÓN DE LEVODOPA EN INSERTOS

La cuantificación de L-dopa en los insertos se llevó a cabo destruyendo los insertos en fase móvil del HPLC y cuantificar la cantidad de fármaco. Se determinó así que los insertos en los que se incorporaba directamente la levodopa tenían una cantidad de 0,2318 mg de L-dopa por inserto.

Además, se comprobó que la incorporación de ciclodextrinas conjuntamente con la l-dopa la estabilizaba, evitando su oxidación, así como la protege del medio externo. El inserto 3, el cual

no contenía ciclodextrinas, tomaba una tonalidad oscura, mientras que los otros se mantenían en su color blanquecino, lo cual corroboraba el efecto estabilizador de las ciclodextrinas (Figura 18)

Respecto a las formulaciones que contenían los liposomas, se observó también un efecto positivo en los insertos, de forma que se mantenían de color blanco y con aspecto flexible.

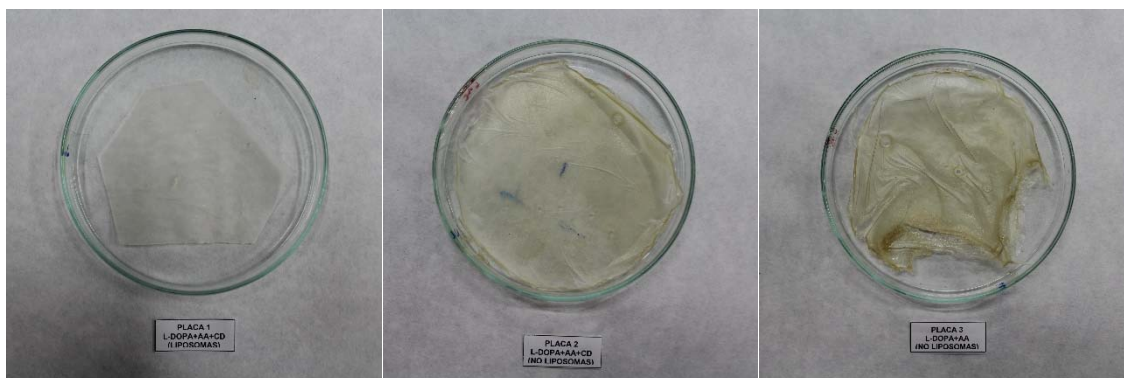


Figura 18. Insertos con Levodopa. 1) L-dopa + AA + HPBCD en liposomas 2) L-dopa + AA + HPBCD sin liposomas 3) L-dopa + AA sin liposomas

4.4. ENSAYO DE PERMEACIÓN IN VITRO

Los estudios de permeación se realizaron con el fin de determinar la cantidad de L-dopa liberada del inserto y permeada a través de una membrana artificial, en función de su composición. La composición de los geles seleccionados para este estudio son los explicados en la Tabla 10, de manera que de cada gel obtuvimos los insertos 1, 2 y 3 respectivamente.

Para obtener los perfiles de permeación, se representó el porcentaje de permeación de L-dopa frente al tiempo, incluyendo como control una solución estándar de L-dopa y una dispersión de liposomas.

Como cabría esperar, se observan dos comportamientos claramente diferenciados. El primero, el perfil correspondiente a la solución estándar de L-dopa, que libera el fármaco rápidamente, alcanzándose su máximo de liberación pasada una hora de ensayo (casi un 67%), y el segundo correspondiente a la dispersión de liposomas, que alcanza su máximo a los 240 minutos, consiguiéndose una liberación del 100%.

En cuanto a los insertos, se observa que el inserto que incorpora L-dopa en liposomas proporciona una permeación más prolongada de fármaco, ya que a las 3 horas del ensayo es cuando se alcanzó su máximo de liberación. Sin embargo, el porcentaje de permeación del

fármaco en liposomas con respecto a la cantidad encapsulada tuvo un máximo de aproximadamente 27%. Esto se puede observar en la Figura 19.

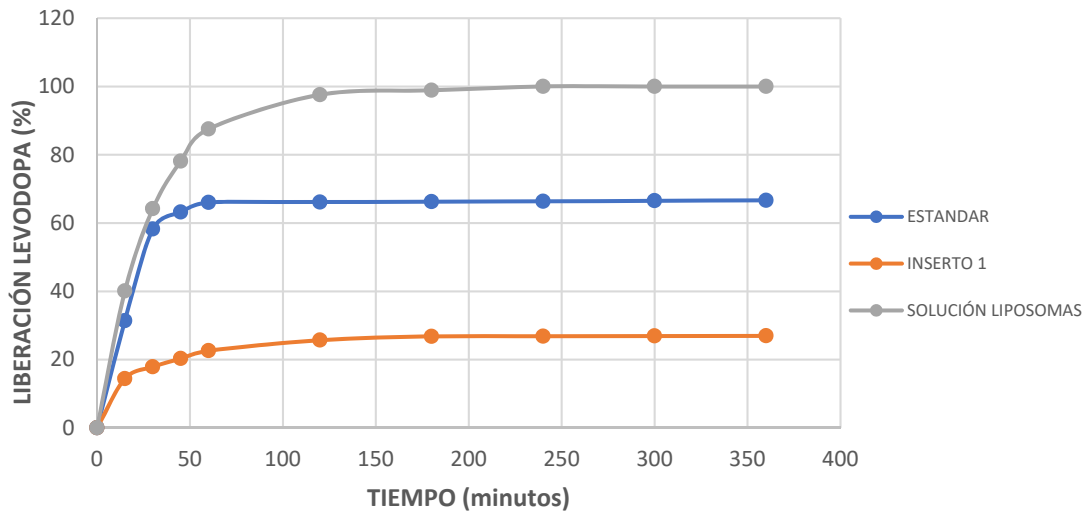


Figura 19. Gráfica que representa el porcentaje de liberado de L-dopa con respecto al tiempo del inserto 1.

En contraposición, los insertos 2 y 3, que incorporaban directamente la L-dopa, obtuvieron máximos de liberación a los 60 minutos de comenzar el ensayo, con unos porcentajes de aproximadamente 30% y 35% respectivamente (Figuras 20 y 21).

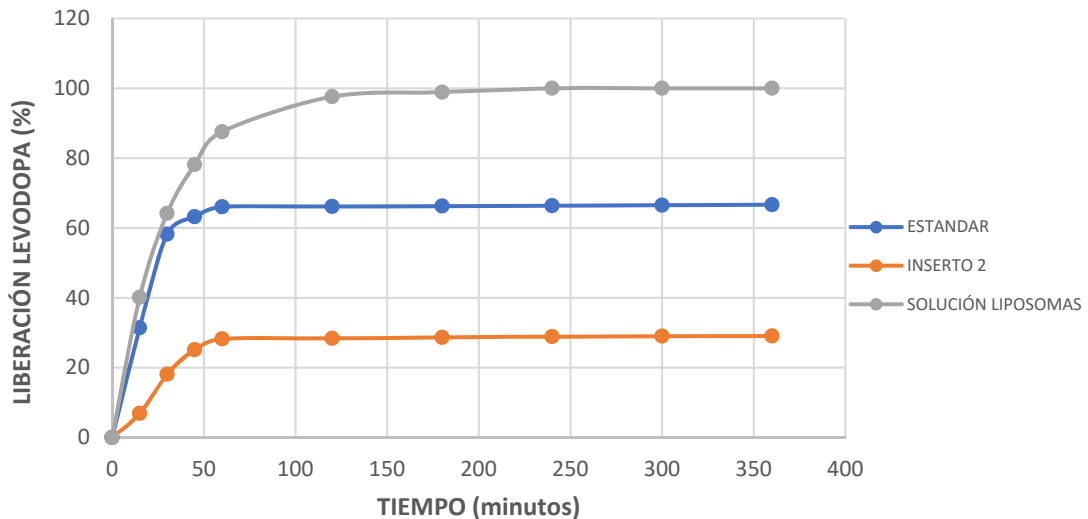


Figura 20. Gráfica que representa el porcentaje de liberado de L-dopa con respecto al tiempo del inserto 2.

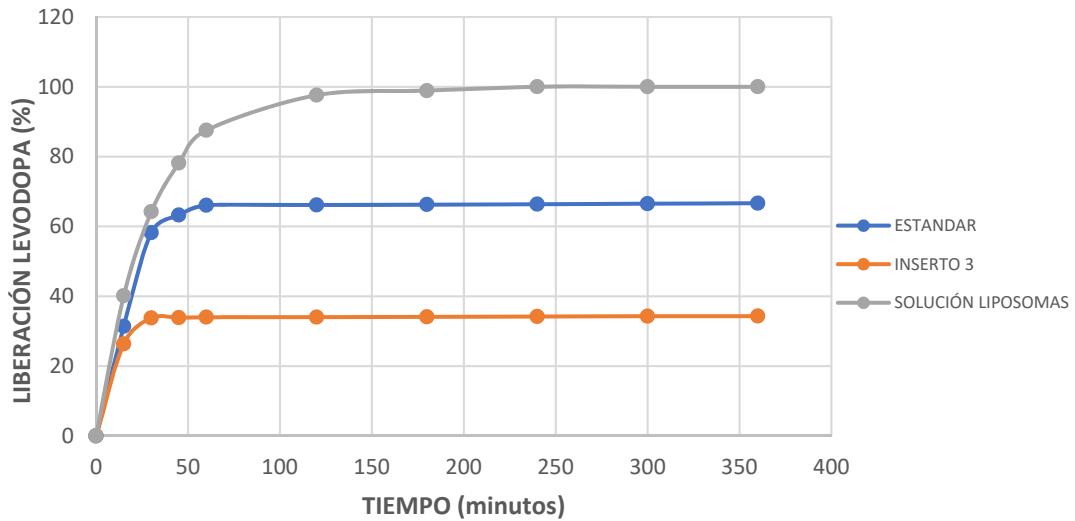


Figura 21. Gráfica que representa el porcentaje de liberado de L-dopa con respecto al tiempo del inserto 3.

Por tanto, aunque la encapsulación de fármaco en los liposomas deba mejorarse, el perfil de liberación es el más adecuado para nuestro inserto objetivo, pudiendo compararse los perfiles de los tres insertos en la Figura 22.

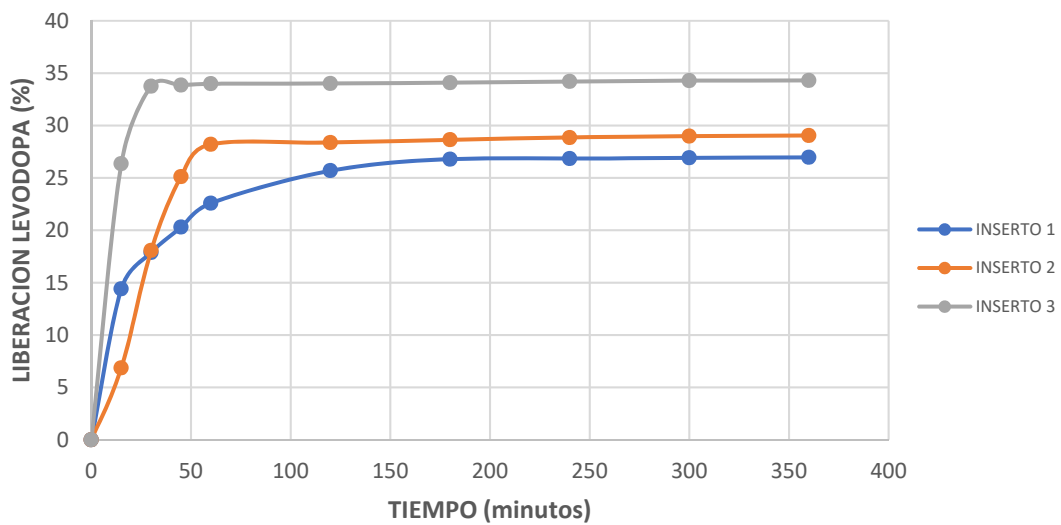


Figura 22. Comparación de los perfiles de liberación de los tres insertos estudiados.

5. CONCLUSIONES

1. La proporción de HPMC:Pluronic en la mezcla debe ser de 80:20, ya que una proporción menor de HPMC en la mezcla daba lugar a geles frágiles y poco consistentes para la administración intranasal

2. Concentraciones mayores a 4,5% p/p de HPMC daban lugares a geles muy densos, muy difíciles de interponer adecuadamente con el Pluronic.
3. Se determinó que la composición del inserto estaba compuesta por 8 g de HPMC al 4% p/p, 2 g de Pluronic al 17% p/p, 2,2 g de Chitosano de alta viscosidad al 2% p/v y 0,8 de Propilenglicol.
4. Al emplear componentes mucoadhesivos en el gel, esto favorecía la permanencia del gel en la cavidad nasal, de forma que tanto la liberación se ve favorecida como la permeación del fármaco se ven favorecidas.
5. La mejor forma para incorporar la L-dopa con el objetivo de prolongar la liberación de fármaco fueron los liposomas, aunque la técnica empleada para la encapsulación debe mejorarse debido a que los resultados obtenidos no fueron óptimos.
6. Los insertos intranasales desarrollado permiten administrar la L-dopa por vía intranasal, de manera que el fármaco pueda acceder directamente desde la cavidad nasal hacia el cerebro mediante una técnica no invasiva.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Amin C, Alfonso A. Papel Del Equipo Multidisciplinario 2014;15:157–62.
2. Asociación Parkinson Aragon. Centro de Reabilitacion integral [en línea]. [Consultado en Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.parkinsonaragon.com/la-enfermedad-de-parkinson/tratamiento/>
3. Bahema-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. Rev Biomédica 2000;11:39–60. doi:10.1016/j.taap.2007.02.002.
4. Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, et al. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. Expert Opin Drug Deliv 2018;15:369–78. doi:10.1080/17425247.2018.1429401.
5. Bertram U, Bodmeier R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. Eur J Pharm Sci 2006;27:62–71. doi:10.1016/j.ejps.2005.08.005.
6. Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, et al. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. Eur J Pharm Sci 2008;35:435–41. doi:10.1016/j.ejps.2008.09.004.
7. Brocks DR. Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. J Pharm Pharm Sci 1999;2:39–46.

8. Contin M, Martinelli P. Pharmacokinetics of levodopa. *J Neurol* 2010;257. doi:10.1007/s00415-010-5728-8.
9. Deane K, Spieker S, Clarke C. Catechol-O-methyltransferase inhibitors for levodopa- induced complications in Parkinson's disease. *Heal* (San Fr 2009). doi:10.1002/14651858.CD004554.pub2.www.cochranelibrary.com.
10. Federacion Española del Parkinson. [en línea]. [Consultado en Abril 2019]. Disponible en: <http://www.esparkinson.es/>
11. Femenía-Font A, Balaguer-Fernández C, Merino V, Rodilla V, López-Castellano A. Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;61:50–5. doi:10.1016/j.ejpb.2005.02.014.
12. Food and Drug Administration. DrugBank [en línea]. [Consultado en Abril 2019]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01235>
13. García, E. Cruz N. Calidad de vida en pacientes con enfermedad de Huntington Enfoque social. *Resúmenes Investig* 2007;1:16–8.
14. Gázquez JJ, Molero M del M, Perez-fuentes M del C, Barragán AB, Simón M del M, Martos Á. Salud y cuidados durante el desarrollo Volumen II M^a del Mar Simón África Martos. 2018.
15. Grimaudo MA, Nicoli S, Santi P, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Cyclosporine-loaded cross-linked inserts of sodium hyaluronan and hydroxypropyl- β -cyclodextrin for ocular administration. *Carbohydr Polym* 2018;201:308–16. doi:10.1016/j.carbpol.2018.08.073.
16. Guridi J, Rodríguez-Oroz MC, Manrique M. Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Parkinson. *Neurocirugia* 2014;15:5–16. doi:10.1016/s1130-1473(04)70498-4.
17. Hermans K, Van Den Plas D, Kerimova S, Carleer R, Adriaensens P, Weyenberg W, et al. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm* 2014;472:10–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.06.017.
18. Jain R, Nabar S, Dandekar P, Vandana P. Micellar nanocarriers: Potential nose-to-brain delivery of zolmitriptan as novel migraine therapy. *Pharm Res* 2010;27:655–64. doi:10.1007/s11095-009-0041-x.
19. Jamal M, Tsukamoto I, Takata M, Ito A, Tanaka N, Miki T, et al. COA-Cl induces dopamine release and tyrosine hydroxylase phosphorylation: In vivo reverse microdialysis and in vitro analysis. *Brain Res* 2019;1706:68–74. doi:10.1016/J.BRAINRES.2018.10.026.
20. Khan S, Patil K, Bobade N, Yeole P, Gaikwad R. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. *J Drug Target* 2010;18:223–34. doi:10.3109/10611860903386938.
21. Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC. Parkinson disease. *Handb Clin Neurol* 2018;159:173–93. doi:10.1016/B978-0-444-63916-5.00011-2.

22. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 2019;39:31–59. doi:10.1007/s10571-018-0632-3.
23. Kumar M, Misra A, Mishra AK, Mishra PP, Pathak K. Mucoadhesive nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of olanzapine for brain targeting. *J Drug Target* 2008;16:806–14. doi:10.1080/10611860802476504.
24. Lewitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mov Disord* 2015;30:64–72. doi:10.1002/mds.26082.
25. Luppi B, Bigucci F, Mercolini L, Musenga A, Sorrenti M, Catenacci L, et al. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:151–7. doi:10.1211/jpp/61.02.0003.
26. McKenzie AT, Wang M, Hauberg ME, Fullard JF, Kozlenkov A, Keenan A, et al. Science in medicine Diagnosis and treatment of Parkinson disease : molecules to medicine. *Sci Rep* 2018;8:8868. doi:10.1172/JCI29178.1744.
27. Miller SM, Borgman LE. Spectral-type simulation of spatially correlated fracture set properties. *J Int Assoc Math Geol* 1985;17:41–52. doi:10.1007/BF01030366.
28. Missale C, Nash SR, Robinson S, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 2017;78:189–225. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189.
29. Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm* 2009;379:146–57. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.06.019.
30. Morales-Briceño H, Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M. Diagnostico premotor de la enfermedad de Parkinson. *Gac Med Mex* 2011;147:22–32.
31. Mughal MA, Iqbal Z, Neau SH. Guar Gum, Xanthan Gum, and HPMC Can Define Release Mechanisms and Sustain Release of Propranolol Hydrochloride. *AAPS PharmSciTech* 2011;12:77–87. doi:10.1208/s12249-010-9570-1.
32. Nakamura F, Ohta R, Machida Y, Nagai T. In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers. *Int J Pharm* 1996;134:173–81. doi:10.1016/0378-5173(95)04416-7.
33. Osterhaus A, Groen J, Bildt M Van De, Martina B, Vos J, Egmond H Van. alfa-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839–40.
34. Pålhagen SE, Sydow O, Johansson A, Nyholm D, Holmberg B, Widner H, et al. Levodopa-carbidopa intestinal gel (LCIG) treatment in routine care of patients with advanced Parkinson's disease: An open-label prospective observational study of effectiveness, tolerability and healthcare costs. *Park Relat Disord* 2016;29:17–23. doi:10.1016/j.parkreldis.2016.06.002.

35. Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood–brain barrier: an excellent platform for brain targeting . *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10:957–72. doi:10.1517/17425247.2013.790887.
36. Paredes Mogollo A. Importancia de la vía nasal para la administración de opioides. *Med Paliativa* 2015;22:33–45. doi:10.1016/S1134-248X(15)30007-0.
37. Patel S, Chavhan S, Soni H, Babbar AK, Mathur R, Mishra AK, et al. Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route. *J Drug Target* 2011;19:468–74. doi:10.3109/1061186X.2010.523787.
38. Paul A, .Fathima K., Nair SC. Intra Nasal In situ Gelling System of Lamotrigine Using Ion Activated Mucoadhesive Polymer. *Open Med Chem J* 2018;11:222–44. doi:10.2174/1874104501711010222.
39. Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis* 2015;6:349. doi:10.14336/ad.2015.0330.
40. Richter D, Bartig D, Muhlack S, Hartelt E, Scherbaum R, Katsanos A, et al. Dynamics of Parkinson’s Disease Multimodal Complex Treatment in Germany from 2010–2016: Patient Characteristics, Access to Treatment, and Formation of Regional Centers. *Cells* 2019;8:151. doi:10.3390/cells8020151.
41. Riederer P, Danielczyk W, Grünblatt E. Monoamine Oxidase-B Inhibition in Alzheimer’s Disease. *Neurotoxicology* 2004;25:271–7. doi:10.1016/S0161-813X(03)00106-2.
42. Schmolka IR. Surfactants & Detergents A Comparison of Block Copolymer Surfactant Gels 1. *J Am Oil Chem Soc* 1991;68:206–9.
43. Shastry BS. Parkinson disease: Etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci Res* 2001;41:5–12. doi:10.1016/S0168-0102(01)00254-1.
44. Siddiqi SH, Abraham NK, Geiger CL, Karimi M, Perlmutter JS, Black KJ. The human experience with intravenous levodopa. *Front Pharmacol* 2016;6. doi:10.3389/fphar.2015.00307.
45. Wang X, He H, Leng W, Tang X. Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method. *Int J Pharm* 2006;317:40–6. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.02.055.
46. Wider C, Wszolek ZK. Etiology and pathophysiology of frontotemporal dementia, Parkinson disease and Alzheimer disease: Lessons from genetic studies. *Neurodegener Dis* 2008;5:122–5. doi:10.1159/000113680.
47. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:295–309. doi:10.1038/nrn1883.