

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DESARROLLO QUÍMICO Y GALÉNICO DE LA
TALIDOMIDA COMO MEDICAMENTO HUÉRFANO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Elena González Infante

Bajo la dirección de los Doctores:

José Luis Lastres García
Pedro Enrique Granda Vega
Santiago Torrado Durán

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2012-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



*DESARROLLO QUÍMICO Y GALÉNICO
DE LA TALIDOMIDA
COMO MEDICAMENTO HUÉRFANO*

TESIS DOCTORAL

ELENA GONZÁLEZ INFANTE

2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

DESARROLLO QUÍMICO Y GALÉNICO

DE LA TALIDOMIDA

COMO MEDICAMENTO HUÉRFANO

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para optar

al Grado de Doctora por

D^a ELENA GONZÁLEZ INFANTE

Directores:

Prof. Dr. D. José Luis Lastres García

Prof. Dr. D. Enrique Granda Vega

Prof. Dr. D. Santiago Torrado Durán

***D. JOSÉ LUIS LASTRES GARCÍA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD
DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID***

CERTIFICA:

*Que el trabajo de investigación titulado “**Desarrollo químico y galénico de la Talidomida como medicamento huérfano**”; ha sido desarrollado por D^a Elena González Infante, bajo mi dirección y la del Prof.Dr.D. Enrique Granda Vega y del Prof.Dr.D.Santiago Torrado Durán y constituye su memoria para optar al Grado de Doctora en Farmacia.*

Por ello, concluido el trabajo experimental y bibliográfico, se autoriza su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid, a 27 de abril de 2001

Fdo.: Prof.Dr.D.José Luis Lastres García

AGRADECIMIENTOS

Como es de bien nacidos el ser agradecidos, aprovecho este espacio para decirles a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de esta memoria: MUCHAS GRACIAS .

He de señalar que quisiera nombrar a todos a la vez, por ello en ningún caso el orden de las personas mencionadas significa el que haya recibido una menor ayuda por su parte.

De forma especial, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores, los profesores Dr.D.Enrique Granda Vega, Dr.D.José Luis Lastres y Dr.D.Santiago Torrado Durán, por haber aceptado la dirección de este trabajo y por la buena colaboración encontrada en todos ellos.

Al Prof.Dr.D. Enrique Granda Vega, quiero agradecerle sobremanera todo cuanto me ha enseñado en ésta y en otras muchas materias, pues ha sido un verdadero maestro, transmitiéndome saberes que no se aprenden en los libros y que sólo un hombre conocedor como él, puede llegar a hacer con tanta elegancia. Pero sobre todo, querido Enrique, quiero agradecerte tu amistad.

Al Prof.Dr.D.José Luis Lastres García, le expreso mi agradecimiento por la dirección de este trabajo y , sobre todo, por permitirme el realizarlo en el Departamento que está a su cargo, en donde he contado en todo momento con su disposición y ayuda.

Al Prof.Dr.D.Santiago Torrado Durán, le agradezco su gran colaboración, paciencia, ayuda, ánimo y disposición que siempre he recibido de él y que tan vitales han resultado en la realización de esta memoria.

Al Prof.Dr.D.Miguel Fernández Braña, por permitirme trabajar en la cátedra de Química Orgánica de la Universidad San Pablo CEU contando con su apoyo, y a todo su equipo y a los compañeros de ese Departamento, por su ayuda y simpatía que tanto me han servido en este trabajo.

Al resto de profesores y compañeros del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, mi agradecimiento por su ayuda deseándoles a todos mucho éxito en sus proyectos.

A mi marido mi más sincero agradecimiento por tantas horas, de día y de noche, que ha trabajado ayudándome en la realización de esta memoria, por ser víctima directa de mis nervios, por su comprensión, por su estímulo... en fin, gracias Alberto por tu amor.

Por último, mi más profundo agradecimiento a mi madre, por su gran ayuda y colaboración en todo cuanto emprendo, por la preocupación que siempre ha manifestado con mis proyectos, por su entrega desinteresada, gracias por ser como eres y porque quieres ser así con nosotros.

A mi hija Elena

*Aunque nunca pueda Señor, agradecerte
suficiente todo cuanto de Ti recibí a través de mi hija,
acepta el esfuerzo de este trabajo como ofrenda mía.*

ABREVIATURAS:

<i>ABC:</i>	<i>ecuación de la recta por HPLC</i>
<i>AcN:</i>	<i>acetonitrilo</i>
<i>AINE:</i>	<i>Antiinflamatorios no esteroídicos</i>
<i>Am:</i>	<i>absorbancia de la muestra</i>
<i>ANOVA:</i>	<i>análisis de varianza</i>
<i>Ap:</i>	<i>Absorbancia del patrón</i>
<i>AUC:</i>	<i>área bajo la curva</i>
<i>BP:</i>	<i>Farmacopea Británica</i>
<i>C:</i>	<i>concentración</i>
<i>CD:</i>	<i>ciclodextrina</i>
<i>Cl:</i>	<i>aclaramiento corporal</i>
<i>ClH:</i>	<i>ácido clorhídrico</i>
<i>Cl R:</i>	<i>aclaramiento renal</i>
<i>C máx:</i>	<i>pico máximo de concentración plasmática después de una dosis única</i>
<i>C_m:</i>	<i>cesión del medicamento</i>
<i>CNF:</i>	<i>Centro Nacional de Farmacobiología</i>
<i>DCI:</i>	<i>Denominación Común Internacional</i>
<i>DSC:</i>	<i>Calorimetría diferencial de barrido</i>
<i>DIMEB:</i>	<i>heptakis (2,6 diorto metil) β ciclodextrina</i>
<i>DMF:</i>	<i>dimetilformamida</i>
<i>DMSO:</i>	<i>dimetil sulfóxido</i>
<i>DMSO d:</i>	<i>dimetilsulfóxido deuterado</i>
<i>DURG:</i>	<i>Drug Utilization Research Group</i>
<i>EE:</i>	<i>exceso enantiomérico</i>
<i>FDA:</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FMC:</i>	<i>farmacocinética</i>
<i>GVHD:</i>	<i>enfermedad injerto contra huesped</i>
<i>HPBCD:</i>	<i>Hidroxipropil beta ciclodextrina</i>
<i>HPLC:</i>	<i>cromatografía líquida de alta resolución</i>
<i>K:</i>	<i>constante de primer orden</i>
<i>K':</i>	<i>factor de capacidad</i>
<i>K_a:</i>	<i>constante de absorción</i>
<i>LD:</i>	<i>dosis letal</i>
<i>LSD:</i>	<i>contraste de Fisher de las diferencias menos significativas</i>
<i>LSNa:</i>	<i>lauril sulfato sódico</i>
<i>M:</i>	<i>molar</i>
<i>M_m:</i>	<i>masa de la muestra</i>
<i>METOXI CD:</i>	<i>metoxi ciclodextrina</i>
<i>M_p:</i>	<i>masa del patrón</i>
<i>OMS:</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>PA:</i>	<i>para análisis. Reactivos con especificaciones de pureza y límites máximos de impurezas dentro de lo prescrito en las normas internacionales</i>
<i>PA : Alb:</i>	<i>relación principio activo : albúmina</i>
<i>PA: Crosp:</i>	<i>relación principio activo: crospovidona</i>
<i>PA:CD:</i>	<i>relación principio activo: ciclodextrina</i>
<i>PA:HPBCD</i>	<i>relación principio activo:hidroxipropil beta ciclodextrina</i>
<i>PH:</i>	<i>potencial de hidrogeniones</i>
<i>Ph Eur.:</i>	<i>Farmacopea Europea</i>
<i>P_m:</i>	<i>peso medio de dos comprimidos</i>
<i>P/p :</i>	<i>relación peso / peso</i>
<i>PO₄H₂ K</i>	<i>Fosfato ácido de potasio</i>

<i>PRS:</i>	<i>purísimo. Producto de pureza apta como auxiliar en análisis químico</i>
<i>(p/v):</i>	<i>relación peso / volumen</i>
<i>RAMEB:</i>	<i>β ciclodextrina metilada</i>
<i>RAS:</i>	<i>aftas recurrentes severas</i>
<i>RBI:</i>	<i>Research Biochemicals International</i>
<i>RD:</i>	<i>Real Decreto</i>
<i>RPM:</i>	<i>revoluciones por minuto</i>
<i>RX:</i>	<i>rayos X</i>
<i>SEM:</i>	<i>microscopía electrónica de barrido</i>
<i>T:</i>	<i>tiempo</i>
<i>Tal: Alb:</i>	<i>relación Talidomida: albúmina</i>
<i>Tal: cosp:</i>	<i>relación Talidomida: crosprovidona</i>
<i>Tal: cd</i>	<i>relación Talidomida: ciclodextrina</i>
<i>Tal: HPBCD</i>	<i>relación Talidomida: hidroxipropil beta ciclodextrina</i>
<i>TLC:</i>	<i>cromatografía en capa fina</i>
<i>T max:</i>	<i>tiempo en alcanzarse el pico máximo de concentración</i>
<i>T ½ a:</i>	<i>semivida de absorción</i>
<i>T ½ e:</i>	<i>semivida de eliminación</i>
<i>TL:</i>	<i>tiempo de latencia</i>
<i>TNF:</i>	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
<i>UA:</i>	<i>unidades de absorbancia</i>
<i>UA:</i>	<i>Ecuación de la recta por espectrofotometría</i>
<i>UE:</i>	<i>Unión Europea</i>
<i>USP:</i>	<i>Farmacopea de los Estados Unidos</i>
<i>UV:</i>	<i>ultravioleta</i>
<i>Vd:</i>	<i>velocidad de disolución</i>
<i>Vv:</i>	<i>velocidad de disolución del vehículo</i>

ESTADÍSTICAS

<i>a:</i>	<i>ordenada en el origen</i>
<i>b:</i>	<i>pendiente</i>
<i>CV:</i>	<i>coeficiente de variación</i>
<i>F:</i>	<i>estadístico de Snedecor</i>
<i>n:</i>	<i>grados de libertad</i>
<i>p:</i>	<i>probabilidad</i>
<i>r:</i>	<i>coeficiente de correlación</i>
<i>r²:</i>	<i>coeficiente de determinación</i>
<i>Sa:</i>	<i>desviación estándar a la ordenada en el origen</i>
<i>Sa²:</i>	<i>varianza de la ordenada en el origen</i>
<i>Sa rel %:</i>	<i>desviación estándar relativa de la ordenada en el origen</i>
<i>Sb:</i>	<i>desviación estándar de la pendiente</i>
<i>Sb²:</i>	<i>varianza de la pendiente</i>
<i>Sb rel %:</i>	<i>desviación estándar relativa de la pendiente</i>
<i>SD:</i>	<i>desviación estándar</i>
<i>t:</i>	<i>estadístico de Student</i>

SÍMBOLOS:

<i>λ:</i>	<i>longitud de onda</i>
<i>o:</i>	<i>orto</i>
<i>γCD:</i>	<i>gamma ciclodextrina</i>
<i>®:</i>	<i>marca registrada</i>
<i>% 5 min:</i>	<i>porcentaje disuelto a los cinco minutos</i>
<i>TD 80%:</i>	<i>tiempo de disolución del 80%</i>
<i>I:</i>	<i>Talidomida</i>
<i>II:</i>	<i>ácido 4 ftalimido glutarámico</i>
<i>III:</i>	<i>ácido 2 ftalimido glutarámico</i>
<i>IV:</i>	<i>α orto carboxibenzamida glutarimida</i>
<i>V:</i>	<i>ácido 2 ftamido glutárico</i>
<i>VI:</i>	<i>ácido 4 orto carboxibenzamido</i>
<i>VII:</i>	<i>ácido 2 orto carboxibenzamido glutarámico</i>
<i>VIII:</i>	<i>ácido 2 orto carboxibenzamido glutárico</i>
<i>IX:</i>	<i>ácido ftálico</i>
<i>X:</i>	<i>α amino glutarimida</i>
<i>XI:</i>	<i>isoglutamina</i>
<i>XII:</i>	<i>glutamina</i>
<i>XIII:</i>	<i>ácido glutámico</i>

UNIDADES

ABSORBANCIA:

U.A. : *unidad de absorbancia*

CONCENTRACIÓN:

%: *porcentaje*
mg/ml: *miligramo por mililitro*
 $\mu\text{g/ml}$: *microgramo por mililitro*

FLUJO:

ml/min : *mililitro por minuto*

FUERZA

N: *newton*

LONGITUD:

mm: *milímetro*

MASA:

Kg: *kilogramo*
g: *gramo*
mg: *miligramo*
 μg : *microgramo*

PRESIÓN:

mb: *milibar*

TEMPERATURA

$^{\circ}\text{C}$: *grados Celsius*

TIEMPO

h: *hora*
min: *minutos*
sg: *segundos*

VOLUMEN

l: *litro*
ml: *mililitro*

ÍNDICE

1	<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1	<i>TALIDOMIDA: PUNTO DE PARTIDA EN LA LEGISLACIÓN SANITARIA</i>	3
1.2	<i>BREVE RESEÑA HISTORICA DE LA TALIDOMIDA</i>	3
1.3	<i>MEDICAMENTOS HUÉRFANOS. REGULACIÓN ACTUAL DE LA TALIDOMIDA EN ESPAÑA</i>	4

2	<i>OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO</i>	7
----------	---	----------

PARTE GENERAL

3	<i>FARMACOLOGÍA</i>	11
3.1	<i>MECANISMO DE ACCIÓN</i>	13
3.2	<i>PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS</i>	15
3.3	<i>APLICACIONES TERAPÉUTICAS</i>	20
3.3.A.	<i>ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS</i>	22
3.3.B.	<i>ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS Y REUMATOLÓGICAS</i>	28
3.3.C.	<i>ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS Y ONCOLÓGICAS</i>	31
3.3.D.	<i>ENFERMEDADES INFECCIOSAS</i>	35
3.3.E.	<i>ALTERACIONES OCULARES</i>	39
3.3.F.	<i>ENFERMEDADES GENÉTICAS</i>	40
3.3.G.	<i>OTRAS ENFERMEDADES HUÉRFANAS</i>	40
3.4	<i>SITUACIÓN LEGAL EN ESPAÑA Y EN OTROS PAÍSES</i>	42
3.5	<i>CONTRAINDICACIONES</i>	48
3.6	<i>PRECAUCIONES</i>	48
3.7	<i>REACCIONES ADVERSAS Y SECUNDARIAS</i>	49
3.8	<i>INTERACCIONES</i>	54
3.9	<i>SOBREDOSIFICACIÓN</i>	54
4	<i>QUÍMICA – FARMACÉUTICA</i>	55
4.1	<i>Nº CAS Y PATENTE</i>	57
4.2	<i>DESCRIPCIÓN QUÍMICA</i>	57
4.3	<i>PROPIEDADES ESTRUCTURALES</i>	59
4.4	<i>MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN</i>	60
4.4.1.	<i>INFRARROJO</i>	60
4.4.2.	<i>ULTRAVIOLETA</i>	60

4.5	MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	61
4.5.1.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	61
4.5.2.	ELECTROFORESIS CAPILAR	61
4.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS IN VITRO	62
4.6.1.	ENSAYOS DE TALIDOMIDA IN VITRO	62
4.6.2.	VALORACIÓN DE TALIDOMIDA IN VITRO	62
4.6.2. A.	HPLC DE TALIDOMIDA PARA DETERMINACIONES IN VITRO	62
4.6.2. B.	RMN DE TALIDOMIDA PARA DETERMINACIONES IN VITRO	63
4.6.2. C.	ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA PARA ENSAYOS IN VITRO	64
4.6.2. D.	POTENCIOMETRÍA PARA LA TALIDOMIDA	64
4.6.2. E.	DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS	64
4.6.2. F.	DETERMINACIÓN EN FORMAS SÓLIDAS Y MATERIA PRIMA	64
4.7	TÉCNICAS ANALÍTICAS IN VIVO	65
4.7.1.	ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA PARA DETERMINACIÓN IN VIVO	65
4.7.2.	CROMATOGRAFÍA GASEOSA PARA DETERMINACIONES IN VIVO	65
4.7.3.	HPLC DE TALIDOMIDA PARA DETERMINACIONES IN VIVO	65
4.8	ESTABILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO	67
4.8.1.	PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA	67
4.8.2.	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA	69
4.8.2. A.	ESPECTROFOTOMETRÍA PARA PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA	70
4.8.2. B.	CROMATOGRAFÍA EN PAPEL PARA PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	72
4.8.2. C.	HPLC PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA	73
4.8.2. D.	ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	78
4.8.3.	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	78
4.8.3. A.	ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	78
4.8.3. B.	CROMATOGRAFÍA EN PAPEL PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	79
4.8.4.	CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA	80
4.9	COMPRIMIDOS COMERCIALES	82
5	NUEVAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE ADMINISTRACIÓN	85
5.1	PROBLEMAS FARMACOTÉCNICOS DE LA TALIDOMIDA	87
5.1.1.	CONFIGURACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA TALIDOMIDA	87
5.1.2	RACEMIZACIÓN DE LA TALIDOMIDA	91
5.1.3.	MÉTODOS ANALÍTICOS DE SEPARACIÓN DE ENANTIOMEROS DE TALIDOMIDA	93
5.1.3. A.	HPLC DE SEPARACIÓN DE ENANTIOMEROS DE TALIDOMIDA	93
5.1.3. B.	ELECTROFORESIS DE SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS DE TALIDOMIDA	95
5.1.4.	SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA	95

5.2	<i>DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	99
5.2.1.	<i>FUNDAMENTO TEÓRICO DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS.USOS Y APLICACIONES</i>	99
5.2.2.	<i>VENTAJAS DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	99
5.2.3.	<i>CLASES DE DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	100
5.2.4.	<i>MÉTODOS DE OBTENCION DE DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	101
5.2.5.	<i>ESTABILIDAD DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	104
5.2.6.	<i>MECANISMOS QUE EXPLICAN EL AUMENTO EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN</i>	105
5.2.7.	<i>FORMULACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	107
5.2.8.	<i>VEHÍCULOS UTILIZADOS EN LA OBTENCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS</i>	107
5.2.9.	<i>DISPERSIONES SÓLIDAS CON ALBÚMINA</i>	107
5.2.10.	<i>DISPERSIONES SÓLIDAS CON CROSPVIDONA</i>	111
5.3	<i>COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS</i>	112
5.3.1.	<i>FORMULACIONES LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS</i>	116
5.3.2.	<i>FORMULACIONES SÓLIDAS CON CICLODEXTRINAS</i>	118
5.3.3.	<i>FORMULACIONES DÉRMICAS CON CICLODEXTRINAS</i>	119
5.3.4.	<i>FORMULACIONES RECTALES Y VAGINALES CON CICLODEXTRINAS</i>	119
5.3.5.	<i>FORMULACIONES OFTÁLMICAS Y NASALES CON CICLODEXTRINAS</i>	120
5.3.6.	<i>OTRAS FORMULACIONES CON CICLODEXTRINAS</i>	120
5.3.7.	<i>FORMULACIONES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA CON CICLODEXTRINAS</i>	121
5.3.8.	<i>TIPOS DE CICLODEXTRINAS EMPLEADAS EN ESTA MEMORIA</i>	121

PARTE EXPERIMENTAL

6	<i>MATERIAL</i>	123
6.1	<i>REACTIVOS</i>	125
6.2	<i>INSTRUMENTAL</i>	127
7	<i>MÉTODOS CLÍNICOS</i>	129
7.1	<i>ESTUDIO DE CAMPO DE LA UTILIZACIÓN CLÍNICA DE DE LA TALIDOMIDA</i>	131
7.2	<i>ENCUESTAS</i>	132
7.3	<i>RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS</i>	134

8	<i>MÉTODOS QUÍMICO-FARMACÉUTICOS DE SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA</i>	139
8.1	<i>SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA</i>	141
8.2	<i>CARACTERIZACIÓN PRODUCTO INTERMEDIO Y PRODUCTO FINAL</i>	146
8.3	<i>IDENTIFICACIÓN PRODUCTO INTERMEDIO Y PRODUCTO FINAL</i>	148
8.4	<i>RIQUEZA PRODUCTO FINAL</i>	153
8.5	<i>RENDIMIENTO OBTENCIÓN PRODUCTO INTERMEDIO Y FINAL DE LA SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA</i>	153
8.6	<i>CONSERVACIÓN PRODUCTO FINAL</i>	154
8.7	<i>ANÁLISIS PRODUCTO FINAL</i>	154
8.8	<i>COSTE SÍNTESIS TALIDOMIDA</i>	154
9	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	153
9.1	<i>SOLUCIÓN PATRÓN DE TALIDOMIDA</i>	155
9.2	<i>SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN</i>	157
9.3	<i>CONDICIONES PREVIAS AL ENSAYO DE ESTABILIDAD</i>	157
9.4	<i>ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA</i>	158
9.5	<i>ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN</i>	158
9.6	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA TALIDOMIDA</i>	159
9.6.1	<i>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)</i>	159
9.6.2	<i>ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE</i>	162
9.7	<i>MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN</i>	174
9.7.1	<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</i>	174
9.7.2	<i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X</i>	174
9.7.3	<i>RMN-H⁺</i>	174
9.8	<i>MÉTODOS DE FARMACOTECNIA</i>	176
9.8.1	<i>ENSAYO DE DISOLUCIÓN PARA FORMAS ORALES SÓLIDAS</i>	176
9.8.2	<i>ENSAYO DE DISGREGACIÓN DE COMPRIMIDOS</i>	177
9.8.3	<i>RESISTENCIA DE LOS COMPRIMIDOS A LA ROTURA</i>	178
9.8.4	<i>DETERMINACIÓN DEL PESO</i>	179
9.8.5	<i>DETERMINACIÓN DE ALTURA Y DIÁMETRO DE LOS COMPRIMIDOS</i>	179
9.9	<i>MÉTODOS ESTADÍSTICOS</i>	180
9.10	<i>MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA HUMEDAD</i>	181
9.11	<i>SOLUCIONES DE TALIDOMIDA</i>	182
9.12	<i>MEZCLAS FÍSICAS</i>	182
9.13	<i>TALIDOMIDA RECRISTALIZADA</i>	183
9.14	<i>SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS</i>	184

9.15	ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS	186
9.16	COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS	187
9.17	ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON ALBÚMINA	188
9.18	DISPERSIONES SÓLIDAS CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA	189

RESULTADOS

10	TALIDOMIDA MATERIA PRIMA	191
10.1	ANÁLISIS DE LA TALIDOMIDA	193
10.2	SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN	196
10.3	CONDICIONES PREVIAS AL ENSAYO DE ESTABILIDAD	198
10.4	ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN	201
10.5	VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA	203
10.6	HIGROSCOPICIDAD DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA	207
10.7	ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA	209
10.8	DISCUSIÓN PARCIAL	210
11	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIONES	213
11.1	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN TALIDOMIDA A pH ALCALINOS	215
11.2	CINÉTICA DE DEGRADACIÓN TALIDOMIDA A pH ENTRE 5 Y 6	217
11.3	DISCUSIÓN PARCIAL	223
12	POLIMORFOS DE TALIDOMIDA	225
12.1	MÉTODO LIOFILIZACIÓN DE LA TALIDOMIDA	227
12.2	CARACTERIZACIÓN TALIDOMIDA RECRISTALIZADA	228
12.3	VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN TALIDOMIDA RECRISTALIZADA Y NO RECRISTALIZADA	231
12.4	ESTABILIDAD QUÍMICA Y FÍSICA DE TALIDOMIDA RECRISTALIZADA Y NO RECRISTALIZADA	233
12.5	DISCUSIÓN PARCIAL	237
13	COMPLEJOS DE INCLUSIÓN POR INCORPORACIÓN DE CICLODEXTRINAS	239
13.1	FORMAS LÍQUIDAS DE TALIDOMIDA CON CICLODEXTRINAS	241
13.2	SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA A DISTINTOS PORCENTAJES DE	242

	<i>CICLODEXTRINAS</i>	
13.3	<i>SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN DISTINTOS MEDIOS DE DISOLUCIÓN</i>	246
13.4	<i>ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS</i>	249
13.5	<i>COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE LA TALIDOMIDA CON CICLODEXTRINAS</i>	251
13.6	<i>CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE TALIDOMIDA</i>	252
13.7	<i>DISOLUCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN RECRISTALIZADOS DE LA TALIDOMIDA CON HPBCD</i>	254
13.8	<i>DISCUSIÓN PARCIAL</i>	259
14	<i>PREPARADOS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CON CROSPVIDONA</i>	261
14.1	<i>FORMAS LÍQUIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA</i>	263
14.2	<i>ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON ALBÚMINA</i>	263
14.3	<i>DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA</i>	266
14.4	<i>CARACTERIZACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA</i>	267
14.5	<i>DISOLUCIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA</i>	276
14.6	<i>ESTABILIDAD FÍSICA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA</i>	286
14.7	<i>ESTABILIDAD QUÍMICA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA</i>	289
14.8	<i>DISCUSIÓN PARCIAL</i>	291
15	<i>PROPUESTA GALÉNICA PARA LA TALIDOMIDA</i>	293
15.1	<i>COMPRIMIDOS COMERCIALES DE TALIDOMIDA</i>	295
15.2	<i>PROPUESTA GALÉNICA PARA LA TALIDOMIDA</i>	296
15.3	<i>COMPRIMIDOS DE EXCIPIENTES</i>	297
15.4	<i>ESTABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS DE EXCIPIENTES</i>	298
15.5	<i>COMPRIMIDOS DE TALIDOMIDA MATERIA PRIMA</i>	299
15.6	<i>ESTABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS DE TALIDOMIDA MATERIA PRIMA</i>	301
15.7	<i>COMPRIMIDOS DE LA DISPERSIÓN SÓLIDA DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA EN PROPORCIÓN (p/p) 1:2</i>	303
15.8	<i>ESTABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS DE LA DISPERSIÓN SÓLIDA DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA EN PROPORCIÓN (p/p) 1:2</i>	306
15.9	<i>DISCUSIÓN PARCIAL</i>	310

<i>16</i>	<i>DISCUSIÓN FINAL</i>	<i>311</i>
<i>17</i>	<i>CONCLUSIONES FINALES</i>	<i>321</i>
<i>18</i>	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>325</i>

1

INTRODUCCIÓN

1.1 TALIDOMIDA: PUNTO DE PARTIDA EN LA LEGISLACIÓN SANITARIA

La Talidomida se podría considerar como el medicamento más importante del siglo XX por haber movilizadado la legislación sanitaria a nivel mundial. Este medicamento es el punto de partida del concepto actual de “seguridad” en la aplicación de los fármacos y de la obligada necesidad de la Farmacovigilancia.

Los efectos adversos ocasionados por la falta de estudios de teratogenia hizo dar un vuelco a todos los conceptos de seguridad y propició un cambio en la legislación de todos los países a partir de su comercialización en los años sesenta.

1.2 BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA TALIDOMIDA

*La Talidomida es un derivado del **ácido glutámico**: químicamente es la N-ftalimido glutarimida. Pertenece este medicamento al grupo de los hipnóticos no barbitúricos, aunque presenta acción sedante y analgésica, muy similar a la de los barbitúricos y además posee semejanza estructural con éstos.*

*Originalmente fue sintetizada por **Ciba** en la década de los cincuenta, pero fue **Chemie-Grunenthal** quién la explotó como hipnótico sedante para el control de las náuseas y vómitos durante el embarazo.*

*En 1957 se registra primero en Alemania y posteriormente en otros países, excluyendo Francia, EEUU y España, donde nunca ha estado registrada. La relación causa-efecto entre este medicamento y el incremento en la frecuencia de **malformaciones neonatales** de las extremidades se detecta primero en Australia y unos meses después en Alemania.*

En 1961 el medicamento se retira del Mercado mundial, ya que es responsable de una catástrofe sin precedentes. Casi 12.000 niños nacieron con malformaciones, siendo el defecto más frecuente el de la focomelia, aunque también se detectaron otras malformaciones graves que incluían la sordera, parestesias faciales y oculomotoras, estenosis anal, malformaciones de cabeza y defectos vaginales y uterinos. Se cree que la acción teratógena de la Talidomida puede ser debida a alguno de sus metabolitos.

En 1965 la Talidomida comienza de nuevo a usarse cuando se descubre que es efectiva en el tratamiento del eritema nodoso de lepra. Esto ha sido confirmado en posteriores ensayos clínicos y hoy en día constituye el tratamiento de elección para esta enfermedad.

El mecanismo de acción de la Talidomida no está del todo esclarecido; pero se han descrito acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras que han conducido a este medicamento a investigaciones en una amplia variedad de enfermedades, que incluyen, entre otros, el lupus eritematoso, síndrome de Behcet, la enfermedad injerto contra huésped, la estomatitis aftosa, la artritis reumatoide, el prurigo nodular, el SIDA etc.

1.3 MEDICAMENTOS HUÉRFANOS. REGULACIÓN ACTUAL DE LA TALIDOMIDA EN ESPAÑA.

*Una consecuencia directa de los sistemas de evaluación de medicamentos en los países más desarrollados y de los elevados costes de investigación es la aparición de **enfermedades huérfanas y pacientes huérfanos**, que requieren para su tratamiento medicamentos cuyos costes de desarrollo no podrían recuperarse nunca por las empresas.*

*Se entiende por “**huérfano**” aquel medicamento, producto sanitario o alimento medicamento, que es imprescindible en el tratamiento de una enfermedad o situación clínica de baja incidencia. Por esta razón ninguna compañía los quiere fabricar o comercializar, por lo que no están normalmente a disposición de los médicos.*

Así se llega al concepto de “enfermedad huérfana”, que es aquella que no tiene tratamiento eficaz; de igual forma existen pacientes desatendidos, no porque la ciencia no pueda ofrecerles soluciones, sino porque estas soluciones no han sido comercializadas.

En la lista de medicamentos huérfanos publicada por la FDA, se encuentra la Talidomida; es por tanto, un medicamento huérfano destinado a las enfermedades anteriormente descritas, que por ser de baja incidencia se pueden considerar también como huérfanas.

Diversos países han incluido en sus leyes de medicamentos enmiendas para facilitar el desarrollo de medicamentos para enfermedades raras o de baja incidencia. Así, por ejemplo, Estados Unidos ha introducido diversas enmiendas en la Ley de Medicamentos y Alimentos de 1983, 1984 y 1985, definiendo un procedimiento de designación de medicamentos huérfanos, incentivos a su desarrollo y establecimiento

de un programa permanente de detección de enfermedades de baja incidencia y medicamentos que podrían ser útiles para tratarlas.

Por otra parte la UE ha publicado la directiva CEE 141 / 2000 del 16/12/99 relativa a medicamentos huérfanos y España cuenta con el RD 561 / 93 de 16 de abril, en donde se define el uso compasivo en los art,s. 23 y 34 y en la Ley del Medicamento en los art,s. 34 y 38.

El fondo del problema es fundamentalmente económico. El desarrollo de una nueva sustancia exige enormes gastos de investigación, que sólo se programan en función de expectativas razonables de mercado. El mayor rigor en la determinación de la eficacia y seguridad de los medicamentos lleva a los mercados a que se concentren en las dolencias de mayor incidencia, por lo que resulta necesario promover por las autoridades sanitarias el desarrollo de medicamentos que en principio no presenten ningún interés comercial. (Granda, 1988)

No obstante, cada vez más, las grandes compañías farmacéuticas participan en programas de desarrollo de medicamentos huérfanos subvencionados o no por sus gobiernos, como medio de promoción, mejora de imagen o por motivos altruistas y humanitarios

En España están comercializados la mayor parte de los medicamentos huérfanos y los que no lo están, como es el caso de la Talidomida, se importan individualmente por el Servicio de Medicamentos Extranjeros del Ministerio de Sanidad bajo estrictas normas de autorización.

Es preciso tener una sensibilidad especial hacia este tipo de problemas, lo que caracterizará una actuación profesional elevada. El crecimiento de este fenómeno, forzado por optimizaciones industriales y de comercialización, hace que deba replantearse en muchos casos la función sanitaria y social del estamento farmacéutico, tomando conciencia del sufrimiento individual de enfermos, cuya desgracia estriba además en carecer de interés comercial. (Granda, 1988)

Es preciso continuar el buen ejemplo dado por ciertas empresas y gobiernos, manteniendo un adecuado grado de sensibilidad hacia los medicamentos huérfanos, como es el caso de la Talidomida, las enfermedades huérfanas y los pacientes huérfanos.

De esta forma el trabajo planteado, dirigido a encontrar formas farmacéuticas que permitan una administración de la Talidomida más eficaz y segura, está plenamente justificado.

2

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el desarrollo galénico orientado inicialmente a estudios de preformulación, especialmente del principio activo, y a labores de formulación aplicadas sobre todo a la optimización de nuevas formas farmacéuticas útiles para las actuales aplicaciones clínicas de la Talidomida.

PLANTEAMIENTO: *consta de varias fases:*

1. *Envío a hospitales españoles, tanto públicos y privados, de una documentación clínica actualizada de la Talidomida, así como un modelo de encuesta donde se recojan las diferentes aplicaciones farmacológicas que se estaban empleando, y sobre todo para conocer el grado de resultado en las mismas pudiéndose, de esta forma, hacer una comparación con los datos bibliográficos.*
2. *Síntesis química-farmacéutica de la molécula de Talidomida.*
3. *Validación analítica de la técnica de espectrofotometría ultravioleta y de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de la Talidomida.*
4. *Caracterización química y farmacotécnica de la Talidomida*
 - 4.1. *Caracterización e identificación de la molécula de Talidomida por método de RMN- H^+ , por microscopía electrónica y por difracción de rayos X*
 - 4.2. *Estudio de la solubilidad de la Talidomida en la solución que proponemos como patrón y ensayo de velocidad de disolución, en condiciones determinadas por nosotros, puesto que este principio activo no se encuentra recogido en farmacopeas de uso habitual.*
 - 4.3. *Determinación de la estabilidad de la Talidomida materia prima y de la solución patrón en diferentes soluciones amortiguadoras del pH.*
5. *Puesta a punto de la técnica de liofilización, como proceso de obtención de formas recristalizadas, que nos permitan encontrar estructuras con cambios en la cristalinidad que mejoren la solubilidad de la Talidomida.*
6. *Obtención de formas recristalizadas de Talidomida que presenten mejor solubilidad que la materia prima, tanto en magnitud como en velocidad.*
7. *Preparación de complejos de inclusión de Talidomida con CDs con el objetivo de encontrar mejoras en la solubilidad de nuestro principio activo.*
8. *Elaboración de dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina y con crospovidona que presenten mejores valores de solubilidad para la Talidomida.*
9. *Formulación oral para la Talidomida en comprimidos que presenten ventajas farmacotécnicas respecto a los comerciales.*

3

FARMACOLOGÍA

3.1 MECANISMO DE ACCIÓN

Los hipnóticos no barbitúricos del tipo PIPERIDINDIONAS son sustancias que tienen como núcleo químico a la piperidina y que además guardan cierta semejanza estructural con los barbitúricos. Fueron introducidos en clínica como hipnóticos y sedantes en los años 1954-5. Pertenece a este grupo la Talidomida, que es una ftalimido-glutarimida con acciones sedantes y analgésicas que recuerdan mucho a la de los barbitúricos.

El modo de acción de la Talidomida no está del todo esclarecido (Scolari, 1982), pero se ha demostrado que este fármaco presenta una actividad inmunomoduladora (Moncada, 1985) y en parte también presenta una acción directa sobre los mediadores de respuesta inflamatoria (Koch, 1985), aunque es probable que tanto la Talidomida como sus productos de catabolismo tengan más de un modo de acción como proponen Barnhill y McDougall (1982).

Las investigaciones actuales indican que la Talidomida reduce la producción del factor de necrosis tumoral ($TNF\ \alpha$), por acelerar la degradación del RNA mensajero (Calabresse, 2000 ; Ribeiro, 2000; Gori, 2000), produciendo un efecto analgésico (Ching, 1998; Hashimoto, 1998; Haslett, 1998; Ribeiro, 2000), lo que indica la necesidad de investigar el uso de este fármaco en el tratamiento de dolores que no respondan a los analgésicos no narcóticos clásicos (Ribeiro, 2000; Calabresse, 2000).

Además se ha demostrado que un aumento en la producción del $TNF\ \alpha$ favorece la multiplicación de virus, como por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia; por ello para enfermedades como el SIDA son muy ventajosos fármacos que, como la Talidomida, son inhibidores específicos de la biosíntesis del $TNF\ \alpha$ (Calabresse, 2000; Ribeiro, 2000) y estimulan las células T (Hastings, 1973; Waters, 1991; Sampaio, 1991; Fazal, 1992; Davidsen, 1995; Mc Hugh, 1995; Klausner, 1996; López-Talavera, 1996; Tavares, 1997; Zhu, 1997; Ching, 1998; Hashimoto, 1998; Haslett, 1998), ya que, en definitiva, son inhibidores de la biosíntesis de patógenos oportunistas. Así se ha demostrado que la Talidomida está ofreciendo buenos resultados en los enfermos de SIDA con úlcera aftosa oral, diarrea, sarcoma de Kaposi (Calabresse, 2000).

La acción inmunosupresora que presenta la Talidomida no sólo es beneficiosa en los casos de SIDA, sino que también resulta muy ventajosa en otras muchas enfermedades autoinmunes (Zwingenberger, 1995; Kanbayshi, 1996; Pharm-Huy, 1997; Knabe, 1998).

En EEUU se ha aprobado el uso de la Talidomida en el tratamiento del eritema nodoso de lepra (Teo, 1999), ya que se ha demostrado la efectividad de este fármaco en la reacción leprótica con una disminución de los niveles de IgM (Shanon, 1981), por afectar las funciones de los polimorfonucleares, impidiendo su quimiotaxia y disminuyendo la fagocitosis monocitaria en las zonas de la inflamación (Faure, 1980; Barnhill, 1984; Lo, 1989) y en la generación de sustancias mediadoras de la lisis de las paredes celulares de los vasos sanguíneos. Estos datos indican que la Talidomida ejerce su efecto en procesos no inflamatorios mediados por polimorfonucleares neutrófilos, reduciendo la generación de intermedios de oxígeno (superóxido y radicales hidroxilo) (Miyachi, 1985b; López-Talavera, 1996) y protegiendo a los tejidos de un aumento de oxidación (Avalos-Díaz, 1985; Miyachi, 1985b).

También se ha utilizado la Talidomida en otras enfermedades dermatológicas, como son la estomatitis aftosa, síndrome de Behcet, lupus eritematoso sistémico cutáneo crónico y la enfermedad injerto contra huésped, con muy buenos resultados por presentar una acción antiprurítica (Daly, 2000).

Además, parece ser que la Talidomida también presenta un efecto antitumoral, resultando ser un buen inhibidor de la angiogénesis (Ching, 1998; D'Amato, 1998).

Después de haber estado retirada casi tres décadas del mercado farmacéutico, la Talidomida vuelve hoy en día a suscitar un enorme interés (Suye, 1996) por presentar una acción antiinflamatoria (Barnhill, 1982, 1984; Koch, 1985) con propiedades inmunomoduladoras (Moncada, 1985), presentando un claro beneficio en el tratamiento de enfermedades inmunitarias, ya que los estudios "in vivo" ponen de manifiesto que la Talidomida estimula la respuesta humoral y celular (Karrow, 2000). Además, se ha demostrado que la Talidomida presenta una disminución del número de inmunoblastos, lo que hace pensar en un posible efecto inmunosupresor (Bore, 1966; Hasper, 1982; Keenan, 1991).

3.2 PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS

Los datos de farmacocinética de la Talidomida se han extraído de un amplio trabajo de Tian-Ling (1989), donde se describe un perfil completo farmacocinético en humanos.

La concentración plasmática de Talidomida respecto al tiempo para cada sujeto se ajustó a un modelo monocompartimental, donde se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$C = \frac{D ka}{Vd (ka - k)} [e^{-k(t-t_l)} - e^{-ka(t-t_l)}]$$

Para aquellos casos donde t_l era inferior a 1 minuto, las ecuaciones quedaban de la forma:

$$C = \frac{D ka}{Vd (ka - k)} [e^{-kt} - e^{-kat}]$$

o lo que es lo mismo:

$$C = \frac{D ka}{Vd} (t - t_l) e^{-k(t-t_l)}$$

Puede asumirse que la biodisponibilidad completa de la Talidomida, después de una administración oral y los parámetros secundarios AUC, $t_{1/2}$, $t_{1/2\alpha}$, $t_{\text{máx}}$ y $C_{\text{máx}}$, se derivan de estimadores de parámetros primarios. La fracción de eliminación total debida a la excreción renal puede ser estimada como:

$$Fe = Ae (0 - 24 \text{ horas}) / D$$

donde $Ae (0-24 \text{ horas})$ representa la cantidad de fármaco inalterado excretado en orina

Los aclaramientos corporal (*Cl*) y renal (*CLR*) se calculan a partir de la relación siguiente:

$$Cl = D / AUC$$

$$CLR = Ae (0- 24 horas) / AUC (0- 24 horas)$$

Donde:

AUC (0-24 horas) calculado por la integral definida de la concentración plasmática respecto al tiempo desde 0 a 24 horas de la administración de la Talidomida.

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA TALIDOMIDA

Absorción:

La administración oral de 100-200 mg de Talidomida produce una concentración máxima sanguínea de 0,9 –1,5 mg/l, con un valor de tiempo máximo de 4 a 6 horas (Chen, 1989; Heney, 1991), por lo que se deduce que la Talidomida es absorbida lentamente después de una administración oral y lo hace a partir del tracto gastrointestinal.

El valor de tiempo de latencia, entre la administración de Talidomida y el comienzo de la absorción, muestra una lenta desintegración y disolución de los comprimidos de Talidomida.

La Talidomida es bien conocida por su extremada insolubilidad acuosa. No se han encontrado trabajos en su biodisponibilidad absoluta después de su administración oral en humanos porque no hay ninguna formulación parenteral disponible. El estudio de biodisponibilidad de la Talidomida encontrado en la bibliografía es el llevado a cabo por Schumacher (1989) utilizando modelos en animales. Se calculó el *AUC* oral y el *AUC* iv por el método de los trapecios y se encontró un valor de biodisponibilidad de 0,93 en ratas y de 0,67 en conejos. De este modo, se estimaron los valores calculados de *Vd* y *Cl* en este estudio y se asumió su biodisponibilidad completa.

Distribución:

Debido a que la Talidomida es un agente no polar, se presume que su unión a proteínas plasmáticas es alta (Chen, 1989; Gunzler, 1992) por ello, la hidrólisis que sufre en plasma es más lenta que “ in vitro “ a valor de pH 7,4 (Schumacher, 1965) ya que las proteínas podrían proteger a este fármaco de fenómenos hidrolíticos.

Utilizando modelos monocompartimentales y asumiendo una biodisponibilidad completa para la Talidomida, se ha calculado el volumen aparente de distribución de la Talidomida que es aproximadamente de $120,64 \pm 45,36$ litros (Chen, 1989 ;Gunzler, 1992) y el aclaramiento corporal total que es aproximadamente de $10,41 \pm 2,04$ l/h.

Estudios en animales de experimentación muestran altas concentraciones de Talidomida en tracto gastrointestinal, hígado y riñón y menor concentración en músculo, cerebro y tejido adiposo. En hembras preñadas, la Talidomida es capaz de atravesar la membrana placentaria (Beckman, 1962; Fabro, 1967).

Metabolismo:

Los resultados de estudios “ in vitro “ sugieren que los efectos farmacológicos de la Talidomida podrían ser secundarios a la formación de metabolitos vía hepática, probablemente con acción enzimática del citocromo P 450 (Braun, 1986; Wood, 1990 ;Teo, 2000) y los metabolitos han sido analizados en estudios con animales (Aronson, 1984; Czejka, 1987). Sin embargo, no se han encontrado en los estudios de FMC metabolitos del fármaco, ni en muestras de plasma ni de orina, de sujetos varones sanos después de una dosis única oral (Chen, 1989).

La principal ruta metabólica de la Talidomida en humanos y en animales es la hidrólisis espontánea, formando mayoritariamente 2 o-carboxibenzamida glutarimida, aunque también son detectables otros productos de hidrólisis (Clarke´s isolation and identification of drugs).

Excreción:

Después de dosis únicas orales de Talidomida, sólo el $0,6 \pm 0,22$ % de la dosis se excreta inalterada en orina de 24 horas. No se identificaron metabolitos urinarios ni plasmáticos. Estos datos sugieren que la mayor ruta de excreción de la Talidomida no es renal. (Chen, 1989).

El aclaramiento total corporal y renal de la Talidomida es aproximadamente de $10,41 \pm 2,04$ l/h y de $0,08 \pm 0,03$ l/h, respectivamente (Chen, 1989; Gunzler, 1992).

La Talidomida se absorbe a partir del tracto gastrointestinal y se hidroliza en el organismo formando principalmente 2-o- carboxibezamido glutarimida, aunque también son detectables otros productos de hidrólisis (Clarke's isolation and identification of Drugs).

Semivida:

La semivida de absorción y de eliminación de la Talidomida es de $1,70 \pm 1,05$ h y de $8,7 \pm 4,11$ h respectivamente (unas tres veces más que en animales según Schumacher (1968, 1970), con un tiempo de latencia de $0,41 \pm 0,17$ h (Chen, 1989; Gunzler, 1992).

Utilizando los parámetros estimados farmacocinéticos de la Talidomida, se pueden predecir los niveles plasmáticos del fármaco para las diversas dosificaciones clínicas; así, se alcanza una concentración máxima de $3,6 \mu\text{g/ml}$ cuando se administra una dosis de 200 mg de Talidomida cada 6 horas.

FARMACOCINÉTICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TALIDOMIDA

Tras una administración oral de los enantiómeros separados o del racémico de Talidomida en hombres sanos voluntarios se obtiene una farmacocinética caracterizada por dos modelos monocompartmentales conectados por las constantes de inversión quiral.

Las constantes de inversión en pruebas " in vivo " fueron de $0,17 \text{ h}^{-1}$ (R a S) y de $0,12 \text{ h}^{-1}$ (S a R) y para la eliminación de $0,079 \text{ h}^{-1}$ (R) y de $0,24 \text{ h}^{-1}$ (S) (Eriksson, 1995).

Por otro lado, Eriksson (1998) utiliza un método de HPLC esteroespecífico para determinar la distribución y las reacciones de los enantiómeros de la Talidomida y el principal lugar de biotransformación " in vivo ", señalando que los enantiómeros de la Talidomida se unen a las proteínas plasmáticas en un 55% y 66%, para las formas R(+) y S(-) respectivamente.

Por otra parte, el grado de concentración en plasma de R (+) Talidomida fue de 0,86 y para S(-) de 0,95 (el valor del hematocrito fue de 0,37, la distribución en plasma para R (+) Talidomida de 0,58 y para S (-) Talidomida de 0,87).

Los grados de inversión y de hidrólisis de los enantiómeros aumentaron por encima de valores de pH de 7-7,5.

HSA catalizó la inversión quiral, pero no la degradación de R (+) y de S(-) Talidomida, gracias a la adición de ácido cáprico o a la preincubación de HSA con ácido acetil salicílico o fisostignina.

La inversión quiral “ in vivo “ tiene lugar principalmente en la circulación sanguínea y en los espacios extravasculares ricos en albúmina, mientras que la hidrólisis de la Talidomida ocurre de forma más uniforme en el organismo. Aparentemente la inversión quiral y la hidrólisis de la Talidomida ocurren por mecanismos diferentes tal y como lo expresa Eriksson (1998).

3.3 APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA TALIDOMIDA

Las principales indicaciones de uso de la Talidomida están descritas en los siguientes grupos y son de tipo dermatológico, inmunológico, hematológico, oncológico e infeccioso.

A. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS

- *LEPRA*
- *SÍNDROME DE BEHCET*
- *PRÚRIGO NODULAR DE HYDE*
- *PRÚRIGO ACTÍNICO*
- *PIODERMA GANGRENOSO*
- *SARCOIDOSIS*
- *VASCULITIS COMPLEJA INMUNE*
- *LEISHMANIOSIS CUTÁNEA*
- *HISTIOCISTOSIS*

B. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS Y REUMATOLÓGICAS

- *LUPUS ERITEMATOSO*
- *ARTRITIS*
- *ERITEMA MULTIFORME*

C. TALIDOMIDA EN ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS Y ONCOLÓGICAS

- *ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED (GVHD)*
- *ANGIOGÉNESIS*

D. TALIDOMIDA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

- *SIDA*
- *TUBERCULOSIS*
- *MIASTENIA GRAVIS*
- *SÍNDROME WASTING*
- *ÚLCERAS AFTOSAS*
- *ÚLCERAS OROGENITALES*
- *MICROSPORIDIOSIS*

E. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES OCULARES

- *CEGUERA*

F. TALIDOMIDA EN ENFERMEDADES GENÉTICAS

- *LEUCODISTROFIAS*

G. TALIDOMIDA EN OTRAS ENFERMEDADES HUÉRFANAS

- *ENFERMEDAD DE WEBER-CHRISTIAN*
- *ENFERMEDAD DE JESSNER KANOF*
- *ENFERMEDAD DE HAILEY*
- *HISTIOCISTOSIS*

3.3.A. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS

Debido a sus propiedades inmunosupresora, la Talidomida se ha investigado en una variedad de trastornos dermatológicos, en estudios abiertos con pacientes que no respondían a la terapia convencional obteniéndose notables beneficios (Hunziker, 1983; Soto de Delas, 1988; Proenca ,1989; Guimaraes, 1990 y 1995). La Talidomida ha sido también eficaz en la fotodermatosis (Peyron, 1986; Efsteyn, 1986).

La eficacia del fármaco se ha observado en terapia inflamatoria dérmica (Grosshans, 1984; Ochonisky, 1994), ya que se ha demostrado que es un agente antiprurítico que resulta de un efecto depresor central (Daly, 2000).

ENFERMEDAD DE HANSEN O LEPROSA

Esta enfermedad tiene el carácter de infecciosa granulomatosa crónica y es causada por Mycobacterium leprae, bacilo del género mycobacterium, morfología de bastoncillos, gram +, ácido-alcohol resistentes, de 1,5-6 micras, con coloración por Ziehl-Neelsen, de carácter aerobio y agrupados en paquetes llamados “globi” en el citoplasma de células mononucleares. Se localiza en piel, membranas mucosas y nervios periféricos siendo la transmisión por contacto, sobre todo interhumano con periodo de incubación muy largo, de meses a años.

La lepra presenta dos estados reaccionales (Dean, 1991):

Tipo 1: es el eritema mediano y el edema de lesiones cutáneas no faciales, que suelen responder a fármacos antiinflamatorios no esteroídicos como la aspirina, la cloroquina ... (Levis, 1984; Pfalzgraff, 1989). El tipo 1 severo, abarca a la cara, neuropatía o neuritis, lesiones cutáneas dolorosas, ulceración, edema en las manos, cara o pies y responde a los corticoides mientras que el tipo 1 crónico responde a la clofazimina.

Tipo 2: es el fenómeno de Lucio, que es una vasculitis cutánea observado en pacientes intratados o en aquellos que no recibían medicación por un tiempo prolongado y el tratamiento es con rifampicina. También a este tipo 2 pertenece el eritema nodoso de lepra, cuyo tratamiento se lleva a cabo con Talidomida por considerarse el agente de elección .

En 1965 Sheskin publica que la Talidomida había sido utilizada en pacientes masculinos que presentaban reacción leprotica con remisión del cuadro reaccional a las 48 a 72 h de su administración .

Sampaio (1966) decide reproducir el ensayo de Sheskin y tras el éxito obtenido se aprobó su uso en 20 países para pacientes reaccionales, ya que se observaron notables mejoras en las lesiones cutáneas, fiebre y neuritis después de 48 h de iniciarse el tratamiento en pacientes con eritema nodoso de lepra (Languillon, 1971; De las Aguas, 1971; Levis, 1984). Se ha presentado a la Talidomida como el fármaco más efectivo en el tratamiento de la reacción leprótica (Vargas, 1971; Bourdillon,1988; Jadhav,1990; Jakeman,1994) con acciones beneficiosas como publica el Boletín de Organización Mundial de la Salud (1971) .

La Talidomida puede ser administrada sola, en los casos leves, y en los casos moderados a graves puede combinarse con corticosteroides, de los que la prednisona o prednisolona es la más frecuentemente utilizada (Barhill, 1982; Levis, 1984; Parikh, 1986; Pfaltzgraff, 1989).

Por tanto, se puede considerar a la Talidomida como un potente agente antileprótico (Waters, 1991), que además ofrece ventajas en el tratamiento de la reacción crónica y recurrente del tipo 2 de lepra, ya que permite minimizar la dependencia de los esteroides (Levis, 1984; Parikh, 1986; Pfaltzgraff, 1989) y hoy en día se encuentra aprobado en EEUU para el tratamiento de ENL (Teo, 1999).

Dosificación:

En un estudio doble ciego donde se comparó la eficacia de la Talidomida con la de otros agentes terapéuticos similares, se concluyó que la dosificación de 100 mg de Talidomida cuatro veces al día era más eficaz que 400 mg de aspirina cuatro veces al día en el tratamiento del eritema nodoso de lepra en hombres leprosos (Cazort, 1966; Pearson, 1969; Sheskin, 1969; Hastings, 1970; Languillon, 1971; De las Aguas, 1971; Sheskin, 1971; Waters, 1971 y 1991).

El régimen de 400 mg / 4 veces al día fue repetido por un periodo de 7 días en los pacientes que no respondían al tratamiento. En los pacientes que respondían se discontinuó la medicación y se readministró por otros 7 días hasta aparición de una nueva reacción (Sheskin, 1969).

Otros autores recomiendan dosis orales de 100 mg de 3 a 4 veces al día, inicialmente con reducciones subsiguientes transcurrido un periodo de tiempo de 2 semanas, administrándose dosis de mantenimiento de 50 a 100 mg diarios (Levis, 1984).

Quimioterapia:

La quimioterapia antileprosa debería normalmente continuarse a pesar de la manifestación de la reacción de lepra y también la reducción de la dosis de dapsona o de otros agentes que no resulten de mejoría inmediata en el episodio reactivo. Hay evidencia que la suspensión de la quimioterapia durante las reacciones

contribuyó a la aparición de sulfonas resistentes de *Mycobacterium leprae*. No obstante, algunos investigadores sugieren el uso de clofazimina sola durante los periodos reactivos, particularmente en los casos donde el daño neural es inminente (Pfaltzgraff, 1989).

Recaídas:

Las recaídas han sido frecuentes después de una suspensión de la Talidomida (Waters, 1971; Jew, 1990) y se requiere una terapia continuada para el control del eritema nodoso de lepra recurrente (Jew, 1990). No obstante, se necesitan establecer periodos de descanso del fármaco, ya que un empleo repetido puede desarrollar síntomas recurrentes .

SÍNDROME DE BEHCET

El síndrome de Behcet es un desorden multisistemático que se caracteriza por ulceraciones recurrentes orales y genitales , artritis, tromboflebitis, uveítis y vasculitis retinaria.

Normalmente afecta a jóvenes adultos entre los 20 y los 40 años de edad y sin predilección sexual pronunciada.

En 1979 Mascaró presenta sus primeros resultados favorables con Talidomida en el tratamiento de las lesiones orales en el síndrome de Behcet. Saurat (1982) confirma los anteriores resultados igual que lo hiciera Saylan (1982); Torras (1982); Eisenbud (1987); Larsson (1990) y Postema (1996) .

La Talidomida oral ha sido efectiva en el tratamiento de estomatitis aftosas recurrentes severas (Revuz,1990; Grosshans, 1984) y aftosis oral/genital recurrentes o refractarias y en lesiones cutáneas en pacientes con síndrome de Behcet (Saylan, 1982;Grosshans, 1984; Jorizzo, 1985; Eisenbud, 1987). La eficacia se ha observado en pacientes con pioderma gangrenosa asociada al síndrome de Behcet (Munro, 1988; Rustin, 1990) y en colitis severas, en pacientes con síndrome de Behcet, evitando la colectomía (Larsson, 1990). La uveítis en el síndrome de Behcet también ha tenido respuesta a la terapia (Grosshans, 1984), aunque el fármaco parece inefectivo para las complicaciones asociadas al tromboembolismo venoso, fiebre o artritis (Grosshans, 1984; Rustin, 1990).

El tratamiento de la enfermedad de Behcet es esencialmente sintomático y depende de la severidad de las manifestaciones. Se utilizan inmunomoduladores, AINE, esteroides e inmunosupresores (Wechsler, 1988).

La Talidomida parece ser efectiva en el tratamiento del neurobehcet (Ramselaar, 1986) y en el enterobehcet (Sánchez-Burson, 1994).

Dosificación:

Se han utilizado dosis orales de Talidomida de 100 - 400 mg diarios en el síndrome de Behcet (Eisenbud,1987; Grosshans,1984; Munro,1988; Jorizzo,1985; Ramselaar, 1986; Larsson,1990).

PRÚRIGO NODULAR DE HYDE

En 1972 se presentaron unos resultados sorprendentes con remisión completa de las lesiones nodulares en pacientes de prúrigo nodular de Hyde que habían sido tratados con 200-300 mg diarios de Talidomida (Sheskin, 1975; Hoyer, 1983; Winkemann, 1984).

Son necesarias dosis de 50-300 mg diarias para obtener un significativo descenso en el tamaño y en el número de las lesiones cutáneas después de 1 a 2 meses de tratamiento con Talidomida. A pesar de los posibles efectos secundarios, se debería considerar el tratamiento con este fármaco en la mayoría de los casos severos de prúrigo nodular de Hyde (Van den Broek, 1980; Johnke, 1993; Young Gon Baik, 1993; Berger, 1995).

PRÚRIGO ACTÍNICO

El prúrigo actínico es una enfermedad relativamente común a toda la región andina, Argentina y Méjico cuyo tratamiento responde bastante bien con la Talidomida. (Lovell, 1983).

Londono (1973) publicó la primera investigación aportando resultados excelentes en el tratamiento del prúrigo actínico con el uso de 300 mg diarios de Talidomida, señalando una mejoría en más de un 90% de los pacientes de un ensayo abierto.

Grosshans (1984) publica notables mejoras con la Talidomida en el tratamiento de la dermatosis inflamatoria en los casos tratados con prúrigo actínico efecto corroborado por Carmichael (1992).

Bernal (1992) apunta un efecto inmunomodulador de la Talidomida en el tratamiento del prúrigo actínico.

PIODERMA GANGRENOSO

Venencie (1982) muestra la acción favorable de la Talidomida en pacientes con pioderma gangrenoso (Grosshans, 1984; Rustin, 1990; Olmos, 1998) y en casos pediátricos ha tenido una acción positiva.

La Talidomida ha sido reintroducida en EEUU para el tratamiento de enfermedades inmunomoduladoras como es el pioderma gangrenoso (Federman, 2000).

SARCOIDOSIS

La sarcoidosis, linfogranulomatosis benigna o enfermedad de Besnier, Boeck y Schaumann está considerada como una alteración granulomatosa multiorgánica, de causa desconocida, en el que se produce un incremento en los procesos inmunes celulares de los órganos afectados, que suele evolucionar hacia una resolución espontánea, o bien en la mayoría de los casos suele responder favorablemente al tratamiento esteroideo.

Dado que la sarcoidosis es una enfermedad multisistémica, se pueden producir lesiones en casi cualquier órgano y en general se distinguen dos formas de presentación de la enfermedad: aguda y crónica.

- *aguda: suele darse en individuos jóvenes, y se caracteriza por su naturaleza benigna que se resuelve de modo espontáneo y sin necesidad de tratamiento.*
- *crónica: se observa en individuos de edad más avanzada, y por norma general suele afectar a varios órganos simultáneamente.*

La Talidomida resulta beneficiosa en el tratamiento de la sarcoidosis (Barriere, 1983; Prigent, 1983), siendo beneficiosa tanto para el tratamiento de la sarcoidosis pulmonar (Larlesimo,1995) como para la sarcoidosis cutánea (Larlesimo,1995; Grasland, 1998; Lee, 1998) y además no son necesarias grandes dosis de este fármaco para este tratamiento (Rousseau, 1998).

VASCULITIS COMPLEJA INMUNE

La vasculitis se define como un proceso clínico y patológico causado por inflamación de los vasos sanguíneos, lo que determina obstrucción y posteriormente isquemia del territorio al cual están irrigando y formación de aneurismas.

La Talidomida es útil en los casos de vasculitis compleja inmune (Naafs, 1985).

LEISHMANIOSIS CUTANEA

Es una enfermedad cuyo agente causal es un protozoo de la familia Trypanosomatidae y género Leishmania cuya especie pertenece al complejo Leishmania Trópica,

Podemos destacar a dos cursos de la enfermedad dependiendo del tiempo de infestación:

- *curso agudo: edad inferior a 3 años y los síntomas aparecen entre 2 semanas y 2 meses postinfección*
- *curso crónico: edad superior a 3 años y los síntomas aparecen a partir de 2 meses postinfección*

El tratamiento para la leishmaniosis se basa en los antimoniales, pentamidinas e hipouricemiantes y para los casos de leishmaniosis cutánea se obtiene buenos resultados con el tratamiento con Talidomida (Grosshans, 1984).

HISTIOCISTOSIS DE LANGERHANS

La histiocitosis es un conjunto de trastornos en los que proliferan células depuradoras anormales (histiocitos) y otro tipo de células del sistema inmune llamadas eosinófilos, especialmente en el hueso y el pulmón, a menudo causando la formación de cicatrices.

La Talidomida induce mejoras de las lesiones cutáneas en los pacientes de histiocitosis de Langerhans, lo que pone de manifiesto que este medicamento es eficaz en enfermedades sistémicas como es ésta. (Missery, 1993; Thomas, 1993; Lair, 1998; Herrmann, 1998).

3.3.B. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS Y REUMATOLÓGICAS

LUPUS ERITEMATOSO DISCOIDEO

En 1975 Barba-Rubio publica los primeros resultados exitosos para el tratamiento de lupus eritematoso discoideo con Talidomida, al igual que Knop (1981) para el lupus eritematoso profundo .

El lupus eritematoso cutáneo subagudo también fue objeto de tratamiento por parte de Naafs (1982), presentando los pacientes que recibían Talidomida remisión completa de los síntomas al cabo de 3 semanas de iniciarse la terapia .

Hasper (1983) señala buenos resultados y Knop (1983) obtiene un 90% de éxito en el tratamiento del lupus eritematoso discoideo crónico con Talidomida y también en aquellos casos resistentes a los agentes antimaláricos (Lo, 1989).

Burrows (1991) obtiene buena respuesta de la Talidomida en los casos tratados de lupus eritematoso profundo con deficiencia parcial de C4 y también la Talidomida responde al tratamiento del lupus eritematoso crónico (Burrows, 1991; Holm, 1993).

Bessis (1992) y Hawkins (1992) concluyen que probablemente la Talidomida tenga una acción inmunomoduladora en el tratamiento del lupus eritematosos sistémico, por los buenos resultados obtenidos en el tratamiento del lupus eritematoso discoideo crónico, lupus resistente a los antimaláricos, lupus cutáneo subagudo y lupus profundo.

Atra (1993) obtienen un 90% de éxito con la completa remisión de las lesiones cutáneas en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico con Talidomida y además se redujo considerablemente la dosis media de prednisona requerida en el tratamiento, por lo que la Talidomida parece ser efectiva en el tratamiento de las lesiones cutáneas del lupus que no respondan a la terapia clásica. (Burrows, 1991).

Los trabajos de Cherovati (1996) logran un éxito con la Talidomida para el tratamiento del lupus eritematoso, tanto en la variedad recurrente como en la continua, ocupando un lugar en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como son el lupus eritematoso (Stevens, 1996; Godfrey, 1998; Georgala, 1998), presentando remisión de las manifestaciones cutáneas (Stevens, 1997; Doutre, 2000).

Diversos ensayos clínicos abiertos han demostrado que la Talidomida es efectiva en el tratamiento del Lupus Eritematoso discoide (LED) con dosis medias de 100 mg/ día, como alternativa eficaz en los casos resistentes a la terapia clásica (Kyriakis, 2000). Probablemente pueda ser considerada para el tratamiento de LED en pacientes resistentes a los agentes antimaláricos (Knop, 1983; Burrows, 1991) y a los corticosteroides (Grosshans, 1984; Naafs, 1985; Lo, 1989).

Dosificación:

En estudios abiertos con Talidomida dosis orales de 100 a 400 mg diarios, han demostrado ser efectivas en el tratamiento del lupus eritematoso discoideo (Kyriakis, 2000), produciendo mejoría en un porcentaje superior al 90% de los pacientes. Las recaídas habían sido comunes después de suspender la terapia (más de un 70% de los pacientes en un año) (Lo, 1989), y el mantenimiento de las dosis con 25 a 50 mg diarios había sido defendido (Grosshans, 1984).

Dosis de 25 a 200 mg diarios estuvieron relacionados con mejoras de los síntomas cutáneos y articulares y la terapia combinada con los esteroides permite la reducción de dosis de estos últimos (Bessis, 1992).

Dosis orales de 200 mg diarios, dos veces al día, fueron prescritas en casos de pacientes con lupus eritematoso profundo, observándose después de 2 meses una notable reducción de las lesiones inflamatorias. (Burrows, 1991) .

ARTRITIS

El uso de la Talidomida en dosis de 6,9 a 15 mg / Kg / día en pacientes con artritis reumatoide clásica o definida produjo mejoras clínicas con normalización en la velocidad de sedimentación eritrocitaria y con marcado descenso en la titulación del factor reumatoide (Rodríguez, 1984), por lo que la Talidomida podría ser un tratamiento eficaz en la artritis (Miyachi, 1985), tanto para los casos de artritis reumatoide (Gutiérrez – Rodríguez, 1984) como para los casos de artritis reumatoide refractaria (Gutiérrez – Rodríguez, 1989).

El tratamiento de la artritis reumatoide puede ser con Talidomida, sola o bien en combinación con antiinflamatorios (Andrulis, 1995), o bien en combinación con pentoxifilina, obteniéndose en todos los casos muy buenos resultados (Huizinga, 1996).

ERITEMA MULTIFORME

Los pacientes que presentan episodios aislados de eritema multiforme en general no representan problema terapéutico pudiendo remitir espontáneamente, pero los casos de eritema recidivantes son de difícil control con los corticoides y el tratamiento con 200 mg diarios de Talidomida, seguido de dosis reducidas de 100 mg, hacen remitir las lesiones en pocos días (Moisson, 1992).

ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn es una enfermedad intestinal de causa desconocida aunque se cree que puede ser originada por agentes víricos y microorganismos como las Pseudomonas, Clostridium y Yersinia o bien iniciado por un fallo en la actividad supresora de los linfocitos intraepiteliales o un fallo de la actividad estimuladora sobre los plasmocitos.

Esta enfermedad presenta diferentes formas:

- *aguda apendicular: afecta a niños y jóvenes simulando en el 20% de los casos una apendicitis, que se acompaña de dolor de la fosa ilíaca derecha, diarrea, náuseas, vómitos y fiebre.*
- *aguda oclusiva: suele diagnosticarse tras intervención quirúrgica por obstrucción intestinal.*
- *diarreica o clásica: es la forma más frecuente y características por presentar de 3 a 4 deposiciones al día, con dolor abdominal y fiebre poco elevada.*
- *forma tumoral: se caracteriza por el hallazgo de una masa alargada que no se desplaza y es dolorosa*
- *forma febril: debida a complicaciones locales en forma abscesos o fistulas.*

La enfermedad de Crohn, al igual que la colitis ulcerosa, puede presentar una serie de manifestaciones extraintestinales y complicaciones.

El objetivo del tratamiento para la enfermedad de Crohn es evitar los nuevos brotes y reducir el tiempo de duración de los que surgen. Este se basa en la utilización de:

- *reposo*
- *tratamiento dietético y quirúrgico*
- *tratamiento farmacológico como los glucocorticoides y con el empleo de Talidomida se están obteniendo muy buenos resultados (Fishman,2000; Katz, 2000) .*

3.3.C. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS Y ONCOLÓGICAS

ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED (GVHD)

Esta enfermedad es la mayor causa de morbilidad y mortalidad después de un trasplante de médula, presentando sólo una supervivencia del 40% de los pacientes a los 100 días del trasplante. Si no se trata el GVHD crónico, menos del 20% se recuperan totalmente (Vogelsang, 1992).

Esta enfermedad se inicia cuando los linfocitos T inmunológicamente competentes, localizados en la médula del donante, identifican al huésped como extraño y empiezan a atacar a los tejidos del huésped. La GVHD aguda comienza a los tres meses del trasplante de médula y puede afectar a la piel, tracto gastrointestinal y/o hígado. Incluso con terapia profiláctica, la GVHD aguda ocurre en un 25-70% de los pacientes. La GVHD crónica generalmente aparece después de los tres meses del trasplante y puede afectar a la piel, tracto gastrointestinal, hígado, ojos presentándose en un 30 a 60% de los pacientes.

Hay tres síntomas de GVHD crónica que parecen ser predictivos a la muerte: enfermedad progresiva (GVHD crónica evolucionado de la forma aguda activa GVHD), piel lichenoide o cambios en las membranas de las mucosas y disfunción hepática. (Vogelsang, 1992).

La terapia profiláctica convencional consiste en inmunosupresores como corticosteroides, metotrexato y ciclosporinas. La combinación entre ellos parece ser más efectiva que la monoterapia, pero la Talidomida ha presentado mejoras tanto en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped como en la profilaxis (Schwinghammer, 1991).

Desde el año 1964 se está investigando sobre la acción beneficiosa de la Talidomida en las enfermedades injerto contra huésped y así Playfair (1964) y Bore (1966) presentan un trabajo donde se manifiesta la acción protectora que ejercía la Talidomida en los casos de injertos.

La Talidomida presenta propiedades inmunosupresoras confirmadas en modelos en animales en GVHD crónico y agudo. Fue necesario un nivel de Talidomida plasmático de 5 µg/ml para producir una respuesta máxima (Vogelsang, 1992). Los resultados obtenidos en animales fueron lo suficientemente capaces para introducir el fármaco en Clínica como agente para el tratamiento y profilaxis de GVHD (Vogelsang, 1986) y GVHD crónica (Heney, 1991; Chao, 1996) así como para el tratamiento pediátrico de GVHD (Heney, 1988 y 1990).

La Talidomida ha demostrado eficacia en el tratamiento de la enfermedad GVHD seguida de trasplante de médula incluyendo pacientes refractarios a la terapia convencional (p.e. prednisona, azatioprina,

prednisona con ciclosporina) (Vogelsang, 1985,1987,1988,1992; Heney, 1988,1990, 1991; López, 1993; McCarthy, 1988,1989; Wood, 1990; Randall, 1990; Saurat, 1988; Ringden, 1988; Lopez Gil, 1992).

En GVHD la mejora clínica tuvo lugar al mes o a los dos meses después de iniciarse el tratamiento con Talidomida (Heney, 1990, 1991; McCarthy, 1989).

En pacientes con GVHD la resolución de la hiperbilirrubinemia, síndrome de sicca, cambios dérmicos esclerodermatosos, síntomas gastrointestinales, úlceras orales y disfunción pulmonar es indicativo de la respuesta terapéutica de la Talidomida (Vogelsang, 1992).

El mecanismo por el que actúa la Talidomida en el tratamiento de GVHD parece ser similar al de la ciclosporina y parece ser que permiten el desarrollo de células supresoras del antígeno específico e inhiben el desarrollo de células citotóxicas precursoras (Vogelsang, 1988).

Los estudios clínicos de Wood (1990) parecen indicar que los metabolitos de la Talidomida actúan en un primer paso en la activación del reconocimiento del antígeno mediante los linfocitos T y en un segundo paso regulando la actuación normal linfocitaria. Este efecto parece que tiene efectos beneficiosos tanto en GVHD agudo como crónico (Altomonte, 1993; López, 1993; Parker, 1995).

Dosificación:

En un ensayo largo las dosis efectivas de Talidomida en GVHD fueron de 200 mg, cuatro veces al día, seguidas de un ajuste de dosis para alcanzar los niveles mínimos plasmáticos (2 horas después de la dosis) de 5 µg/ml y también dosis desde 800 a 1600 mg/día durante 2 a 700 días (termino medio de 240 días). En pacientes que responden de forma completa el tratamiento se continuó por un periodo de 3 meses con reducciones en la dosis de un 25% cada 2 semanas. Los pacientes que respondían de forma parcial fueron tratados por un periodo de 6 meses después de que se alcanzase la respuesta máxima (Vogelsang,1992).

No obstante, en otros estudios, dosis inferiores (100 a 600 mg/día) han sido efectivas para el GVHD crónico (McCarthy,1989; Heney,1991; López,1993).

En casos de pediatría, se han utilizado dosis orales de 100 a 500 mg diarios en niños con GVHD de edades entre 4 a 15 años. (Heney, 1988, 1990; McCarthy,1989; mientras que en otros casos se requerían dosis de 100 a 200 mg/día han sido continuadas por un periodo de 2 años (Heney,1990). Otros investigadores han utilizado dosis de 3 mg/Kg, cuatro veces al día, en niños con GVHD con ajustes de dosis subsiguientes para alcanzar niveles plasmáticos (2 horas después de la dosis) o de al menos 5 mg/ml (Vogelsang, 1992).

ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes que favorecen el desarrollo de los tumores, como sucede en algunas patologías como por ejemplo el cáncer.

Bach (1963) indica que la Talidomida posiblemente tenga un efecto antineoplásico y De y Pal (1975) apuntan la idea de que la Talidomida pudiera ser un agente antineoplásico contra el carcinoma de Ehrlich en ratón albino suizo y por ello, actualmente se está ensayando el posible efecto antiangiogénico que pudiera presentar este fármaco frente al cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cerebro y sarcoma de Kaposi (enfermedad relacionada con el SIDA) (D´Amato, 1994; Phillips, 1996; Little,2000).

Por ello, aunque en un primer momento la Talidomida no fue sintetizada como agente antiangiogénico, hoy en día se incluye como tal igual que le sucede a otros fármacos, tales como al interferón α (Kerbel,2000).

La Talidomida en combinación con quimioterapia está resultando efectiva en el tratamiento del cáncer de pecho (Nguyen, 1997), además de tener efecto en las metástasis y en los tumores experimentales (Minchinton, 1996; Zomas, 2000).

La Talidomida puede bloquear los procesos de angiogénesis, es decir, la formación de vasos sanguíneos del tumor resultando ser un potente antiangiogénico “ in vivo“ así la administración oral de este fármaco inhibe la neovascularización inducida por el factor de crecimiento fibroblasto en la córnea de conejos (D´Amato, 1994 ;Kruse, 1998; Kerbel, 2000; Patt, 2000) así como se inhibe el crecimiento vascular en ratas (Jakkula, 2000).

La acción anticancerosa de la Talidomida podría estar basada en su acción antiangiogénica que resulta de su intercalación específica en el DNA con posible formación de radicales hidroxilo (Saurer, 2000). La especificidad tisular de este fármaco y su efecto sólo en ciertas neoplasias podría estar explicado en el hecho de que los tejidos de desarrollo y neoplasias dependen de varios procesos de angiogénesis o vasculogénesis y la Talidomida sólo podría ser sensible a algunos de ellos (Stephens, 2000).

La Talidomida inhibe el factor de necrosis tumoral α y el factor de crecimiento endotelial vascular, lo que hace que se contine estudiando el uso de este fármaco en pacientes con melanoma avanzado, cánceres de ovario, pecho y renal (Eisen, 2000).

El hecho de que la Talidomida pueda tener acciones antiangiogénicas abre una esperanza a enfermedades mortales, como son el cáncer. Además, muchas de las alteraciones oculares están originadas por procesos de neovascularización .

La Talidomida es efectiva en el tratamiento de los gliomas, que son tumores vasculares o angiogénicos, por inhibir el proceso de la angiogénesis; así, dosis iniciales de 800 mg/día con aumentos de 200 mg/día cada 2 semanas hasta una dosificación final de 1.200 mg/día fueron necesarios para el tratamiento de los mielomas (Fine, 2000), en los que la Talidomida podría inducir remisiones en los casos refractarios (Zomas, 2000; Juliusson, 2000) y en los resistentes a quimioterapia (Kneller, 2000).

3.3.D. TALIDOMIDA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La Talidomida inhibe el factor de necrosis tumoral α y estimula las células T, aumentando la producción de interleukina 2, lo que hace que se aumente la respuesta inmunitaria resultando muy beneficioso en enfermedades infecciosas como el SIDA o la tuberculosis (Bekker, 2000; Shannon, 2000) .

SIDA

La Talidomida podría resultar eficaz en la lucha contra el SIDA, ya que al inhibir la biosíntesis del TNF α se inhibe la citoquina que posiblemente sea la activadora de la replicación del virus de la inmunodeficiencia (Scrip 1994; Ravot, 1999).

La Talidomida ha sido efectiva en ulceraciones orofaríngeas y aftas resistentes a la terapia convencional (corticoides, aciclovir, antibióticos) en pacientes con SIDA (Youle, 1989; Georghiou, 1990; Gunzler, 1992; Ramirez,1999; Diz-Dios, 2000) y también se ha demostrado que es capaz de inhibir la replicación en macrófagos humanos del virus tipo 1 “ in vitro “ (Makonkawkeyoon, 1993; Klausner, 1996; Moreira, 1997) y reduce la producción “ in vitro “ de monocitos infectados (Moreira, 1996).

Por tanto, la Talidomida es beneficiosa en enfermedades autoinmunes (Vosgerar, 1994; Zwingenberger, 1995; Smith, 1995; Stirling, 1995; Gardner-Medwin, 1996), y se manifiesta por una ganancia de peso en los casos de HIV-1 positivo (Sharp, 1996).

La Food and Drug Administration, la agencia estadounidense que controla el uso de los medicamentos y que ordenó la retirada de la Talidomida, está estudiando recuperarla para el tratamiento del SIDA. (El País 12 nov. 1996), en los casos de alteraciones del tracto alimentario, páncreas, ras y proctitis.

Se observaron mejoras con la Talidomida para el tratamiento de ulceración aftosa en pacientes con HIV (Samson, 1990; Tercedor, 1991; Allegue, 1991; Gunzler, 1992).

Mejora del tratamiento de ulceraciones faríngeas con Talidomida (Youle, 1990; Gorin, 1990 a,b,c) y de ulceraciones esofágicas (Bernardo, 1990; Georghiou, 1990; Sire, 1995) y de úlceras mucosas (Harry, 1996; Soler, 1996 b) y úlceras en general (Gorin, 1990 a,b,c; Ghiogliotti, 1993; Strazzi, 1992).

El RAS (aftosa recurrentes severas) es la enfermedad más común que afecta a la mucosa oral y que está asociada a una alta morbilidad. El tratamiento de pacientes de SIDA con RAS con Talidomida resulta muy

beneficioso con Talidomida (Nicolau, 1990; Ghiogliotti, 1993; G^a Patos, 1993; Ball, 1994; Henriquet, 1994; Eggimann, 1994; Paterson, 1995; Weidle, 1996; Verberkoes, 1996; Jacobson, 1997).

Cuando la infección causada por proctitis no puede ser establecida o cuando la terapia antimicrobiana es insuficiente, los síntomas requieren de agentes antiinflamatorios como la sulfasalazina o esteroides; entonces el tratamiento con Talidomida obtiene una rápida mejora sintomática.

La Talidomida también ha demostrado ser eficaz en los enfermos de SIDA con tuberculosis por inhibir la producción del factor de necrosis tumoral α y estimular las células T y la proliferación linfocitaria (Bekker, 2000).

Dosificación:

Se han empleado dosis iniciales de 100 mg/día de Talidomida en pacientes con SIDA con ulceraciones orofaríngeas, seguidas de un régimen de mantenimiento con dosis de 50 mg /día o dos veces a la semana, continuando la terapia por 7 meses (Youle, 1989; Gorin, 1990 a ,b,c; Radeff, 1990; Youle, 1990; Ghiogliotti, 1993) obtienen buenos resultados.

Han sido efectivas dosis mayores (200 mg diarios desde 2 semanas a 6 meses) en el tratamiento de las ulceraciones esofágicas en pacientes con SIDA, mejorando así la calidad de vida (Ryan, 1992; Georghiou, 1990). Las mejoras clínicas, como pone de manifiesto la reducción de fiebre, ganancia significativa de peso y un sentimiento de bienestar, se han descrito en pacientes con SIDA con fiebre refractaria prolongada, tuberculosis y bacteremia intracelular por *Micobacterium avium* por Bouza (1992).

Ha sido efectiva en casos de pacientes con SIDA, la Talidomida en el tratamiento de estomatitis aftosa recurrente severa. En estos pacientes, las dosis típicas habrían sido de 200 mg orales, dos veces al día, durante un periodo de 5 días, seguidos de 200 mg una vez al día durante 8 semanas. Con este régimen no se observaron recurrencias desde los 4 a los 8 meses del seguimiento (Nicolau, 1990). En otras series, 100 mg/día durante 15 días seguidos de 50 mg/día durante 15 días, fue efectivo el tratamiento sin recaídas después de los 5 y 6 meses (Ghiogliotti, 1993).

La terapia con Talidomida en los enfermos de SIDA con ulceraciones refractarias orofaríngeas y esofaríngeas a una terapia convencional (p.e. corticosteroides, acyclovir, antibióticos) dan buenos resultados (Youle, 1990; Radeff, 1990).

Dosis de 100 mg diarios durante 7 días produjeron una mejora notable de los síntomas en pacientes con úlcera esofágica infectados con SIDA (Ryan, 1992).

Dosis de 200 mg dos veces al día durante 5 días seguidos de 100-200 mg / día durante 7-8 semanas fueron totalmente efectivas en el tratamiento del RAS en enfermos de SIDA (Nicolau, 1990); otra dosificación consiste en dosis de 100 mg/ día durante 2 semanas y luego 100 mg cada 5 días durante 6 semanas (Youle, 1989).

La Talidomida fue efectiva en el tratamiento de proctitis asociada a SIDA con dosis de 300 mg/ día, dando gran mejoría de los síntomas rectales después de 3 días de terapia (Georghiou, 1992).

TUBERCULOSIS

La Talidomida presenta un efecto inmunosupresor en animales de experimentación “ in vivo “ (Cornea, 1967) .

La Talidomida reduce la infección de la tuberculosis (Klausner, 1996) por reducción del tumor necrosis factor alfa e induce ganancia de peso en enfermos de tuberculosis pulmonar (Tramontana, 1995) Además se han obtenido notables mejoras en los enfermos de SIDA con tuberculosis (Veroso, 1996).

MYASTHENIA GRAVIS

La miastenia gravis es una enfermedad que se caracteriza por la excesiva fatiga de los músculos voluntarios e involuntarios debido a un desorden en la unión neuromuscular cuyos síntomas son:

- *caída de párpados*
- *visión doble*
- *debilidad en los músculos controlados por la voluntad: falta de fuerza en brazos, manos, dedos, piernas ...*
- *dificultad para mantener la cabeza erguida*
- *dificultad para hablar, masticar, tragar y respirar*
- *pérdida de expresión facial*

La miastenia gravis puede ser a menudo controlada con tratamiento adecuado, pero hasta el momento no se conoce cura .

En un estudio con ratas Lewis afectadas de miastenia gravis que habían sido tratadas con Talidomida se obtuvo un efecto selectivo de este fármaco en la supresión de ciertas respuestas inmunomoduladoras (Crain, 1989).

SÍNDROME DE WASTING

La pérdida involuntaria en más del 10% del peso corporal, junto con fiebre o diarrea se denomina síndrome de Wasting, y está relacionado con una progresión degenerativa de la enfermedad y la muerte, ya que no sólo se produce una pérdida de grasa sino también de masa corporal y celular.

La Talidomida ha sido utilizada con éxito en el tratamiento del síndrome de Wasting (James, 1995) y en los casos de SIDA con este síndrome (Reyes – Terán, 1994 , 1996; Baker, 1995) .

ÚLCERA AFTOSA

Se observó por parte de Mascaró (1979) la acción favorable de la Talidomida en los casos de aftas recurrentes de la boca, refractarias a cualquier otro tipo de tratamiento e igual resultado obtuvo Torras (1982). El tratamiento para los casos de aftosis severa y moderada, con dosis de 100-300 mg de Talidomida diaria durante 3 semanas, constituye la terapia más efectiva para la aftosis bucal y no sólo por el rápido control de los síntomas, sino también por el control de las recurrencias (Genvo, 1984; Grisnpan, 1989; Matarasso, 1985; Brodthagen, 1985; Kurkcuoglu, 1985; Pinquier, 1987; Grinspan, 1989; Revuz, 1990; Santis, 1991; Meni, 1993; Manesis, 1995; Bonnetblanc, 1996).

ULCERA OROGENITAL

La Talidomida resulta ser beneficiosa en el tratamiento de úlceras orogenitales (Bowers, 1983; Jenkins, 1984 y 1985; Powell, 1985).

MICROSPORIDIASIS

*La microsporidiasis es una infestación del tracto digestivo originada por *Microsporidium* sp, dando lugar a un cuadro diarreico. La Talidomida es útil para el tratamiento de esta enfermedad (Sharpstone, 1995; 1997).*

3.3.E. TALIDOMIDA EN ALTERACIONES OCULARES

CEGUERA

La Talidomida puede ayudar en el tratamiento efectivo para algunas causas de ceguera, según resultados del Hospital Infantil de Boston, la Facultad de Medicinas de Harvard y el Instituto Médico Howard Hughes (Academia Nacional de Ciencias Americana).

La investigación realizada con animales de laboratorio indica que la Talidomida inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos en las córneas. Este efecto puede resultar útil para tratar algunos tipos de cánceres y dos importantes enfermedades de la vista: la degeneración macular y la retinopatía diabética, que son dos de las principales causas de ceguera en el mundo (Kruse, 1998).

Las pruebas indican que dosis de Talidomida reducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en las córneas de conejos de laboratorios entre un 30 y un 51%. Este efecto reductor, según el Dr. Robert D'Amato, responsable de esta investigación, puede ser directamente responsable de las deformaciones fetales observadas en los años sesenta. (ABC 26-4-1994).

3.3.F. TALIDOMIDA EN ENFERMEDADES GENÉTICAS

LEUCODISTROFIAS

Las leucodistrofias son enfermedades genéticas desmielinizantes para las que no existen tratamientos curativos. La Talidomida y el β interferón podrían ser tratamientos efectivos para la adrenoleucodistrofia, ya que son inhibidores del TNF α , citocina que está presente en altas concentraciones en las lesiones cerebrales inflamatorias que presentan estos enfermos. La Talidomida y el β interferón son dos tipos de tratamientos que está analizando Moses Rodríguez, de la Clínica Mayo de Rochester, en Minnesota en un ensayo doble ciego frente a placebo. (Diario Médico 22 abril 1996).

3.3.G. TALIDOMIDA EN OTRAS ENFERMEDADES HUÉRFANAS

ENFERMEDAD DE WEBER CHRISTIAN O PANICULITIS

La Paniculitis es una enfermedad inflamatoria de la piel que se caracteriza por nódulos dolorosos en la grasa del tejido subcutáneo que tardan de 1 a 8 semanas en desaparecer. Puede acompañarse de alteraciones de la función hepática, diátesis hemorrágica y disfunción pancreática, siendo el cuadro histológico de necrosis grasa con células inflamatorias y macrófagos llenos de grasa.

El tratamiento es con Dapsona®, pero si el paciente no responde se le inyectará un concentrado de Prolastina® a razón de 60 mg/ Kg a la semana.

En 1977 Eravelly publica unos resultados favorables tras el uso de Talidomida en los pacientes de Weber Christian.

ENFERMEDAD DE JESSNER KANOF

La infiltración linfocitaria de Jessner Kanof es una alteración de la piel caracterizada por una acumulación de linfocitos en la piel. Las lesiones son de pequeño tamaño, rosadas o rojas que aparecen en la cara, cuello y/o espalda, cuyo mejor tratamiento parece ser con Talidomida (Moulin, 1983).

ENFERMEDAD DE HAILEY-HAILEY

El pénfigo benigno familiar o enfermedad de Hailey Hailey es una enfermedad autosómica dominante que parte de un trastorno en la adhesión queratinocitaria. La fragilidad cutánea es probablemente debida a alteraciones en los componentes desmosómicos y en la unión de los filamentos de queratina a los desmosomas. La infección cutánea con levaduras, bacterias o virus puede jugar un papel en la patogenia.

Los signos y síntomas de esta enfermedad suelen aparecer a partir de los once años, estando ambos sexos igualmente afectados, con un predominio en la tercera y cuarta década de la vida, aunque también se han descritos casos en la infancia.

La mayoría de los pacientes tienen una afectación limitada, predominando axilas, ingle, pliegues y parte posterior del cuello. Las mucosas se afectan con poca frecuencia. En la mitad de los pacientes aparecen estrías blancas longitudinales ungueales.

La mayoría de los pacientes no presenta problemas de salud asociados, aunque ocasionalmente ocurre un mal olor en la piel afectada y muchos pacientes empeoran con la fricción y otros con la exposición solar.

La Talidomida reporta importantes beneficios en el tratamiento de la enfermedad de Hailey Hailey (Schnitzler, 1984).

3.4 SITUACIÓN LEGAL EN ESPAÑA Y EN OTROS PAISES

(información recabada por el Ministerio de Sanidad y Consumo español)

ESPAÑA

La Talidomida se viene utilizando en España desde aproximadamente 1987-88. Hasta el año 1999 se importaba de Brasil por el Ministerio de Sanidad a través del Departamento de Medicamentos Extranjeros y a partir de entonces viene directamente de la casa madre de Alemania.

La Dirección General de Farmacia insta, en nota enviada a los Servicios de Farmacia Hospitalarios y a las Direcciones Provinciales de Sanidad y Comunidades Autónomas, a utilizar los medicamentos extranjeros sólo en las indicaciones que tienen autorizadas en el país de origen. De no ser así se incurriría en Investigación Clínica y deberían ajustarse a la normativa que lo regula (Art. 38.5 de la Ley del Medicamento).

En Brasil las indicaciones aprobadas para el uso de la Talidomida son:

- *sedante, analgésico y antiemético en el dolor neoplásico*
- *lepra*

Todo ello nos lleva a saber que en España se viene utilizando la Talidomida en Investigación Clínica en las siguientes indicaciones terapéuticas :

- Liquen plano*
- Liquen erosivo*
- Panarteritis nudosa*
- Reticuloideae actínico*
- Esclerodermia*
- Periadenitis necrótica recurrente*
- Psoriasis pustulosa*
- Queloides espontáneos*
- Xantoma diseminado*
- Infiltración linfocitaria de Jessner-Kang*
- Urticaria crónica*
- Poliartritis*
- Atrofia blanca de Millan*

- Pénfigo benigno familiar
- Pénfigo vulgar
- Morfea generalizada
- Eritema polimorfo
- Prurito en Hydroa Vacciniforme
- Lupus eritematoso
- Enfermedad injerto contra huésped
- Prúrigo nodular
- Estomatitis aftosa
- Síndrome de Behcet
- Eritema nodoso de lepra
- SIDA (ulceraciones, aftas ...)
- Eritema indurado de Bazin

Las dos formas de utilización de la Talidomida en España es o bien como parte de un ensayo clínico para demostrar alguna de sus indicaciones o bien como uso compasivo, tal como lo establece el art. 23 del RD.

En ninguna de las dos tenía cabida la Talidomida puesto que no existía un promotor del ensayo clínico tampoco podría serlo el Ministerio de Sanidad. El tratamiento de uso compasivo se considera para casos aislados que no puedan entrar en un ensayo clínico y en el caso de la Talidomida esta vía quedaba desbordada.

Todo esto conduce al Ministerio a adoptar una actitud intermedia para no privar a los pacientes de un medicamento “ potencialmente alentador “ en algunos casos, según describe la bibliografía, pero por otro lado con cierta seguridad.

Tanto en los ensayos clínicos como en el tratamiento de uso compasivo se instaura un Consentimiento Informado del Paciente ante testigo que deben firmar los pacientes que se someten a un tratamiento con Talidomida.

Consentimiento Informado del Paciente ante Testigo:

“ D declaro que D..... como médico especialista en en presencia del testigo D/ Dª con DNI me comunica la posibilidad de recibir medicación con Talidomida. Se me informa del tipo de medicación que es y especialmente de los riesgos que comportaría este medicamento en caso de embarazo, constituyendo graves malformaciones en el feto que abarcarían desde las extremidades a la cabeza.

A diferencia del Consentimiento francés, éste es más bien informativo, porque el francés en caso de fracasar la contracepción , obliga a la interrupción del embarazo.

La vía actual de aprovisionamiento de la Talidomida en España sigue siendo el Departamento de Medicamentos Extranjeros y en virtud de lo expuesto se aceptan las siguientes indicaciones:

- lupus eritematoso*
- enfermedad injerto contra huésped*
- estomatitis aftosa*
- prúrigo nodular*
- síndrome de Behcet*
- eritema nodoso de lepra*
- SIDA*

FRANCIA

La Talidomida está en trámite de registro en Francia y sí está disponible bajo prescripción controlada, necesitando el permiso del Ministerio de Sanidad.

Se acepta en dos indicaciones: lupus eritematoso crónico y lepra, aunque también es igualmente utilizada en otras indicaciones parece ser como ensayo clínico abierto en :

- enfermedad de Behcet*
- aftosis bucales*
- prúrigo nodular de Hyde*
- enfermedad de Weber Christian*
- pioderma gangrenosum*
- rectocolitis hemorrágica*
- dermatosis actínica polimorfa*
- enfermedad injerto contra huésped*
- ulceración orogenital severa*
- artritis reumatoide*

Hasta 1986 la obtención se efectuaba por petición del médico prescriptor al Director Científico de la Farmacia Central de los hospitales de París, acompañada de un certificado en el que se hacía constar que se tenía conocimiento de los peligros que podía ocasionar dicho producto.

En 1987 la Dirección de Farmacia y del Medicamento establece junto con la Sociedad Francesa de Dermatología ciertas reglas y obligaciones recogidas en una nota de la Farmacia Central de los hospitales de París.

Sólo los médicos hospitalarios están habilitados a prescribir la Talidomida, dispensándose exclusivamente por las Farmacias Hospitalarias para enfermos hospitalizados o en tratamiento ambulatorio, no pudiendo sobrepasar la cantidad dispensada los 30 días de tratamiento. El enfermo recibe junto con la medicación una hoja de información.

En el ámbito ambulatorio es reembolsada en un 70% por la Seguridad Social. Una vez cumplido el mes de tratamiento el reaprovisionamiento tendrá lugar sólo si se adjunta a la petición una ficha de vigilancia médica especializada.

Los pacientes en edad fértil deben firmar el Consentimiento Informado al Paciente que es de la forma siguiente:

“ declaro haber sido informada por el Dr. quién me prescribe un tratamiento con Talidomida. Me ha informado de los peligros de este medicamento en caso de embarazo y de la necesidad de una contracepción eficaz durante la duración del tratamiento. Se me ha realizado un examen para asegurar que no estaba embarazada en la fecha del comienzo del tratamiento. He sido informada que en caso de fracaso de la contracepción durante el tratamiento, es necesario recurrir a la interrupción del embarazo . “

ALEMANIA

Según informa la BGA (Bundesgesundheitsamt) la Talidomida se encuentra registrada en Alemania para el tratamiento de reacciones causadas por la lepra y sólo para uso hospitalario.

Actualmente es el único país europeo que la tiene registrada y se desconoce si se está utilizando mediante alguna otra vía como ocurre en otros países.

ITALIA

Según informa el Ministerio de Sanidad italiano no se encuentra registrada la Talidomida en Italia y tampoco conocemos si se está utilizando.

INGLATERRA

Según informa la MCA (Medicines Control Agency) Inglaterra tampoco cuenta con autorización aunque si menciona la prescripción facultativa.

No se conocen los requerimientos solicitados a los pacientes ni las condiciones de la población afectada.

EE.UU.

La FDA ha incluido a la Talidomida dentro del grupo de medicamentos huérfanos en las siguientes indicaciones:

- enfermedad injerto contra huésped : para la profilaxis y para tratamiento*
- lepra : en los casos de reacciones lepromatosas*
- enfermedad injerto contra huésped: en pacientes que han sido sometidos a un trasplante de médula ósea : para la profilaxis y el tratamiento.*

En el ámbito oficial ha sido difícil conseguir información debido posiblemente a que después de la catástrofe de la Talidomida se convirtió en un tema tabú .

Para el tratamiento de las reacciones lepromatosas, el fármaco está disponible por el Centro Nacional de la Enfermedad de Hansen (Carville, Louisiana).

3.5 *CONTRAINDICACIONES*

El tratamiento con Talidomida está contraindicado en los casos de:

- a. Hipersensibilidad a la Talidomida*
- b. Embarazo*
- c. En mujeres potencialmente fértiles*
- d. En pacientes con neuropatía periférica*

3.6 *PRECAUCIONES*

Se deberá tomar una serie de precauciones a la hora de administrar un tratamiento con Talidomida en los siguientes casos para garantizar una seguridad de uso (Asscher 1994).

- a. Durante la lactancia*
- b. Pacientes con alteración hepática o renal*
- c. Pacientes con alteraciones neurológicas o con historial de neuritis*
- d. Fallo cardiaco congestivo o hipertensión*
- e. Pacientes con constipación u otras alteraciones gastrointestinales*
- f. Pacientes con SIDA que presenten reacciones de hipersensibilidad a la Talidomida*

3.7 REACCIONES ADVERSAS Y EFECTOS SECUNDARIOS

*La mayor parte de las **REACCIONES ADVERSAS** suelen solucionarse con la disminución de la dosis administrada, la suspensión del fármaco o simplemente con tratamiento sintomático y son del tipo:*

Hematológicos:

La leucopenia ha sido detectada ocasionalmente en los pacientes tratados (Cazort, 1966; Iyer, 1971; Jew, 1990; Gutiérrez-Rodríguez, 1989). La trombocitopenia púrpura ha sido detectada ocasionalmente en la terapia de Talidomida (Heney, 1990).

Cardiovasculares:

Edema, principalmente de las extremidades durante el tratamiento con Talidomida y ha sido controlada con terapia de diuréticos (Cazort, 1966; Grosshan, 1984; Gutiérrez – Rodríguez, 1989; Revuz, 1990). La vasculitis alérgica ha sido una complicación rara en la terapia de Talidomida (Heney, 1991).

SNC:

Vértigo, dolor de cabeza, alteraciones del humor, irritabilidad, embriaguez y fatiga se han detectado en pacientes tratados con Talidomida (Revuz., 1990; Heney, 1990). La incidencia de la neuropatía por Talidomida ha sido estimada de forma muy variable desde valores inferiores al 1% a otros que superaban el 60% ; por lo que todavía no está del todo esclarecido si el desarrollo de neuropatías es dependiente de la dosis o si es el resultado de susceptibilidades individuales. La somnolencia es un efecto adverso de la Talidomida esperado por ser ésta un agente sedativo - hipnótico (Sheskin, 1969; de las Aguas, 1971; Grosshans, 1984; Naafs, 1985; Youle, 1989; Gutiérrez - Rodríguez, 1989; Heney, 1991; Bessis, 1992). Ha sido detectada en un 100% de los pacientes tratados con altas dosis (Gutiérrez - Rodríguez, 1989; Vogelsang, 1992).

Metabólicos:

Los aumentos de peso presumiblemente relacionados con el aumento de apetito, han sido observados en algunos de los pacientes tratados con Talidomida (Heney, 1990).

Gastrointestinales:

Nauseas, vómitos, sequedad de boca y constipación han sido observados durante el tratamiento con Talidomida (Grosshans, 1984; Naafs, 1984; Revuz, 1990; Gutiérrez-Rodríguez, 1989; Heney, 1991; Vogelsang, 1992), siendo la constipación dosis dependiente (McCarthy, 1989), así como un aumento en el apetito (Revuz, 1990).

Genitourinarios:

Los desórdenes menstruales (amenorrea, menorragia, alteraciones menstruales) (Grosshans, 1984; Naafs, 1985; Gutiérrez - Rodríguez, 1989), así como una disfunción de la erección y pérdida de la libido, han sido observadas ocasionalmente durante el tratamiento con Talidomida (Grosshans, 1984).

Dermatológicos:

Se han observado sequedad de piel, alopecia, pruritus, eritema y erupciones papulovesiculares en menos de un 10% de los pacientes durante el tratamiento con Talidomida (Sheskin, 1969; Naafs, 1984; Gutiérrez - Rodríguez, 1989; Revuz, 1990; Heney, 1990). La dermatitis exfoliativa se evita con la suspensión del tratamiento (Salafia, 1988).

Los **EFFECTOS SECUNDARIOS** más relevantes son:

Neuropatía periférica:

Dado que el efecto teratogénico de la Talidomida en la actualidad puede estar controlado, el principal factor limitante para el uso de esta forma de tratamiento es la neuropatía periférica tóxica, cuya incidencia se ha estimado de forma muy variable desde valores inferiores al 1% hasta otros superiores al 60%, por lo que todavía no está del todo esclarecido si el desarrollo de la neuropatía es dependiente de la dosis o si es el resultado de susceptibilidades individuales, ya que algunos autores afirman que la aparición de neuropatías depende del tiempo de administración (suelen aparecer a partir del quinto o sexto mes de tratamiento) y/o de la dosis administrada, aunque Ochonisky (1994) señala que la aparición de neuropatía no parece estar relacionada con la dosis diaria ni con la duración del tratamiento, sino con susceptibilidades individuales; pero en todos los casos estudiados se ha observado que las neuropatías son reversibles en un porcentaje variable de casos, con la retirada del fármaco, y llegan a ser irreversibles en otros.

Las características clínicas de la neuropatía inducida por Talidomida son bien conocidas y consisten fundamentalmente en parestesias dolorosas distales simétricas y a veces pérdida de la sensibilidad en los miembros inferiores. Mas tardíamente puede aparecer debilidad muscular. Los hallazgos electrofisiológicos son los siguientes: neuropatía axonal sensorial con disminución de la amplitud del potencial de acción de los nervios sensoriales periféricos con conservación relativa de la velocidad de conducción.

A pesar de los posibles daños neurológicos que ciertos autores comentan con el tratamiento de Talidomida (Archer, 1978; Aronson, 1984; Awofeso, 1992; Crawford, 1992), habría que determinar en cada caso las causas en cuanto al tipo de enfermedad, posología, dosis, características genéticas etc. que iniciaron la aparición de tales daños . Sin embargo otros autores, como Domínguez (1994), afirman que no se observó ninguna alteración neurológica ni aparición de neuropatía en todos los pacientes tratados con Talidomida. Observaciones similares, insistiendo también en que no se presenta este efecto colateral, se encuentran en las publicaciones de Londoño (1973); Barba Rubio (1975); Flores (1975) y Saúl (1976). Esto es particularmente llamativo en enfermos de lepra, que casi se pueden considerar como dependientes de Talidomida, por recibir el medicamento mucho tiempo y casi de forma constante, en los cuales sólo excepcionalmente pudo observarse la polineuropatía (Domínguez, 1994) . Se señala que es precisamente la sintomatología neurológica que presentan estos enfermos lo que primero mejora una vez que inician el tratamiento con Talidomida; finalmente Barnhill (1982) apunta en un artículo que la Talidomida ha sido empleada con éxito precisamente en neuralgia postherpética.

Por lo tanto es deseable llevar a cabo un estudio en los pacientes con afecciones que requieran Talidomida efectuando investigaciones electrofisiológicas en condiciones basales, y tratar de demostrar que, al igual que como sucede en enfermos que reciben diaminodifenil sulfona, la importancia de poseer genéticamente la cualidad de ser acetilador rápido o carecer de ella va a determinar la presentación de los efectos negativos atribuidos a este fármaco (Domínguez, 1994).

El desarrollo de lesiones teratógenas ha sido uno de los efectos secundarios más espectaculares observados a partir del uso a gran escala de la Talidomida (Mc Bride, 1978), que resulta teratógena a dosis intravenosas de 45 mg/ Kg (ratas Wistar) (Parkhie, 1983).

Se retira del mercado por la cantidad de niños que nacieron con malformaciones neonatales. El defecto más frecuente fue la focomelia aunque también se detectaron otras malformaciones graves que incluían sordera, parestesias faciales y oculomotoras, estenosis anal, malformaciones de cabeza y defectos vaginales y uterinos (Arbad-Zadeh, 1966).

No obstante, a diferencia del resto de efectos secundarios, las alteraciones teratogénicas se pueden obviar al evitar su consumo durante el embarazo o suprimir la posibilidad del mismo durante el periodo de tratamiento o, como apunta Arlen (1996), con la combinación de ácido acetil salicílico.

El potencial teratogéno está en relación con la dosis y el tiempo de administración. Así, en el periodo de blastogénesis se sucedieron las muertes fetales, durante la embriogénesis se detectaron las deformaciones y en el último trimestre de embarazo se sucedieron las anormalidades funcionales (Gordon, 1966), pudiéndose predecir un diagnóstico prenatal del síndrome de Talidomida (Gollop, 1987).

Es tan intensa su acción teratogéna, que con sólo una dosis de este fármaco administrado entre los días 24 y 36 del embarazo se producían las malformaciones descritas anteriormente (Lenz, 1967).

Se cree que la acción teratogéna de la Talidomida es debida a algunos de sus metabolitos, pero el ácido 2 ftalimido glutárico, a dosis de 150 mg/Kg por vía oral en conejos no es teratogéna y si lo es vía intraperitoneal a dosis de 200 mg/Kg; lo mismo le ocurre a la ftalimida, que a dosis orales de 150 mg/Kg en conejos, no resulta teratogéna y sí a dosis de 6,2 mg/Kg vía intraperitoneal en ratones (Andrew, 1984); luego se puede concluir que la activación metabólica de la Talidomida juega un papel importante en los procesos de teratogénesis (Blake, 1982), siendo el mecanismo teratogénico un asunto aún por resolver (Mc Credie, 1976; Stephens, 1988; Vaisman, 1996).

Se trata de explicar el efecto teratogéno de la Talidomida a través de una interferencia con el metabolismo del ácido glutámico o con algunos factores del complejo vitamínico B (Jonsson, 1972).

El síndrome de Roberts o focomelia:

Es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por presentar las siguientes anormalidades (Felisati, 1963, 1964; Fogh-Andersen, 1966).

- microbraquicefalia
- deficiencia grave del crecimiento
- anormalidades faciales: labio hendido con o sin paladar hendido y premaxilares gravemente prominentes. Hipertelarismo, hemangioma capilar en medio de la cara y aletas nasales delgadas. Orbitas poco profundas, ojos prominentes con escleróticas azules, micrognacia y orejas malformadas con lóbulos hipoplásicos.
- anormalidades de los miembros: hipomelia, más grave en los miembros superiores que varía considerablemente desde focomelia hasta grados menores de reducción de los miembros que a menudo incluyen hipoplasia o ausencia de radios, primeros metacarpos y pulgares, pernos, cúbitos,

carpos y tibias; sindactilia, clinodactilia del quinto dedo y deformidad de talipes. Desarrollo definitivo incompleto de los dermatoglifos.

- *escasez de pelo*
- *anormalidades genitales: hiptorquidia. El falo puede parecer relativamente más grande en relación con el tamaño del cuerpo*
- *anormalidades ocasionales: Encefalocele frontal, hidrocefalia. Microftalmia, nubes en la cornea, cataratas, coloboma del párpado y parálisis del nervio craneal. Cuello corto, anomalías cardíacas y alteraciones renales. Utero bicorneo, polihidrannios, trombocitopenia e hipospadias.*

A pesar de las intensas investigaciones, el mecanismo de inducción teratogénico de la Talidomida no está esclarecido (Beckman, 1984, Randall, 1990). No obstante la mitad ftalimida ha estado implicada (Grosshans, 1984) y se han intentado los cambios estructurales en la molécula de la Talidomida para crear derivados con acciones antiinflamatorias / inmunosupresoras, pero sin el potencial teratogénico (Barnhill, 1984, Grosshan, 1984).

Esta separación de las actividades en la molécula de la Talidomida no ha sido totalmente satisfactoria; muchos análogos capaces de suprimir la reacción de la lepra son teratogénicos (Grosshan, 1984, Jenkins, 1985).

Hoy en día, debido a sus excelentes propiedades farmacológicas en determinadas áreas, se están llevando a cabo investigaciones sobre posibles análogos estructurales de Talidomida; además, gracias a la Farmacovigilancia, los expertos en Teratogenicidad han avanzado considerablemente en la evaluación y el seguimiento de la seguridad y control de medicamentos (Lipson, 1992).

3.8 INTERACCIONES

Se ha encontrado que la Talidomida potencia la actividad de los barbitúricos, alcohol, clorpromazina y reserpina, mientras que su acción sedativa se ve antagonizada por metilamfetamina y etilfenidato. La Talidomida antagoniza la acción de la histamina, serotonina, acetilcolina y prostaglandinas en experimentos con órganos animales, pero no tiene influencia en la reacción uterina con oxitocina, vasopresina e histamina.

No se ha encontrado que altere pruebas de laboratorio, pero este fármaco puede enmascarar los síntomas TB o MAC y retardar el diagnóstico de estas infecciones, por lo que se recomienda monitorizar a los pacientes para infecciones por Mycobacterias.

3.9 SOBREDOSIFICACIÓN

La Talidomida no resulta tóxica, ya que pacientes que accidentalmente se han sobredosificado o bien intencionadamente han intentado suicidarse con Talidomida han sobrevivido sin daños detectables (Breshnfhan, 1961; Burley, 1960).

4

QUÍMICA - FARMACÉUTICA

4.1 N° CAS Y DE PATENTE FARMACÉUTICA

El principio activo, Talidomida, no se encuentra descrito en las farmacopeas de uso habitual (Ph.Europea, BP, USP, etc.). El CAS de la Talidomida es el 50-35-1 y el registro de patente es británico con número 768.821 a favor de la firma alemana CHEMIE GRUNENTHAL.

4.2 DESCRIPCIÓN QUÍMICA DE LA TALIDOMIDA

A DENOMINACIÓN QUÍMICA:

La Talidomida es un derivado del ácido glutámico; químicamente es la N-ftalimidoglutarimida. Su D.C.I. es 2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3 (2H)-diona

Otras denominaciones para la Talidomida (The Merck Index)

- Distaval
- K-17
- α ftalimidoglutarimida
- 2-ftalimidoglutarimida
- 2,6-dioxo-3-ftalimidopiperidina
- N-(2,6-dioxo-3-piperidil) ftalimida
- imida del ácido N-ftaliglutámico
- Softenon
- Sedalis
- Talimol
- Pantosediv
- Neurosedyn
- Kevadon
- Contergan

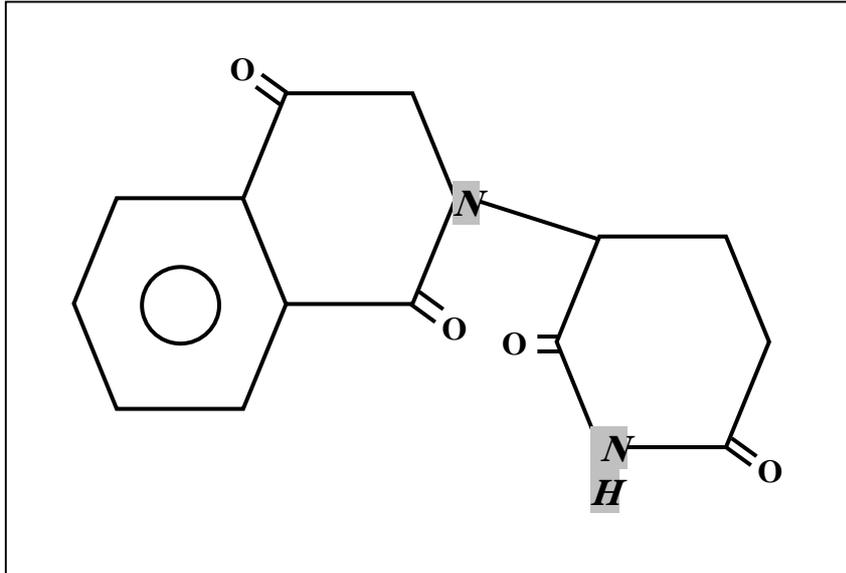


Gráfico 1: Talidomida

- B. COMPOSICIÓN CENTESIMAL:** C₁₃ H₁₀ N₂ O₄
 C 60,46% H 3,9% N 10,85 % O 24,78%
- C. PESO MOLECULAR:** 258,23 (en forma anhidra)
- D. ASPECTO FÍSICO:** polvo cristalino blanco
- E. PUNTO DE FUSIÓN:** cristales con valor de punto de fusión 269 - 271 °C

4.3 PROPIEDADES ESTRUCTURALES

A. SOLUBILIDAD:

La Talidomida es parcialmente soluble en agua (50 µg/ml), metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético glacial. La máxima solubilidad del racémico de Talidomida en agua es del orden de 2×10^{-4} mol/l (45-60 mg /L) (Schumacher, 1965; Williams, 1965).

Es muy soluble en dioxano, dimetilformamida, piridina y dimetilsulfóxido (56 mg/ml) y prácticamente insoluble en éter, cloroformo y benceno.

B. DESVIACIÓN ÓPTICA

La Talidomida es un racémico, por lo que no desvía el plano de luz polarizada.

4.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE TALIDOMIDA

(Clarke 's Isolation and Identification Of Drugs)

4.4.1 INFRARROJO

No se ha encontrado ningún espectro de referencia y sí los principales picos de la Talidomida que aparecen a las $\lambda = 1681, 727, 1205, 1250, 1316, 110 \text{ nm}$

4.4.2 ULTRAVIOLETA

Solución acuosa ácida

240 nm A = 385 b

300 nm A = 94 b

El espectro ultravioleta presenta para la Talidomida un máximo de absorción a 300 nm (Beckman, 1961).

4.4.3 ESPECTRO DE MASAS

Los principales picos de la Talidomida son a 76, 173, 104, 111, 148, 50, 169 y 130 m/z.

4.5 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA TALIDOMIDA

4.5.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La caracterización de la Talidomida se puede realizar mediante una cromatografía en capa fina; se cita la detección no específica con el reactivo tolidina clorada, que es bastante sensitivo a este medicamento (Thin layer chromatography).

Se utiliza cloro, obtenido a partir de cloruro cálcico, para preservar todo el porta del oscurecimiento. La clorinación intensiva es necesaria para la identificación de la Talidomida.

La Talidomida no puede ser extraída de la solución ácida. Se aplica sobre la placa una solución de hidróxido sódico N y la cromatografía en capa fina se lleva a cabo con cloroformo: acetona (90:10) o con dimetilformamida : metanol: agua (25 : 70 : 5).

También se ha utilizado para la separación de la Talidomida benceno:piridina (80 : 20).

La detección no sólo es posible con los métodos no específicos relacionados, sino también con el reactivo de Zwikker o después de la conversión en el correspondiente ácido hidroxámico.

El reactivo de Zwikker es: cobalto II nitrato-amoniaco (Shellard,1964).

- *reactivo en spray: 1% de solución de cobalto II nitrato en etanol absoluto.*
- *Tratamiento después de la pulverización: se seca la placa a temperatura ambiente y se introduce en una cámara saturada con vapor de agua y conteniendo una solución al 25% de hidróxido amónico.*

El valor de R_f de la Talidomida es 45 (I b)

4.5.2 ELECTROFORESIS CAPILAR:

Se puede aislar la Talidomida y los derivados hidroxilados de ésta por electroforesis capilara mediante el empleo de ciclodextrinas (Meyring, 1999).

4.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE TALIDOMIDA “in vitro”

4.6.1 ENSAYOS

ANÁLISIS TÉRMICO: Según información aportada por el Centro Nacional de Farmacobiología, por DSC se obtiene un endotermino único, asimétrico, con un onset a 277,899° C. Cuando la muestra se tritura o precalienta y después se analiza por DSC se obtiene un solo endotermino, simétrico, no observándose cambio en el onset de fusión. Estas variaciones de simetría del pico, antes y después de su trituración, pueden ser debidas a una distinta distribución granulométrica del polvo. Por la técnica TGA se obtiene una pérdida en peso de 0,5%.

4.6.2 VALORACIÓN

4.6.2.A. HPLC:

Los datos del análisis cromatográfico se obtienen de la empresa Research Biochemicals International.

Fase Móvil: 30% KH_2PO_4 (0,05 M) / ACN
 Columna: Bondclone C18 3,9 mm i.d. x 30 cm length
 Detector: UV
 Longitud de onda: 254 nm
 Flujo: 0,7 ml / minuto
 Tiempo de retención: 4,8 minutos

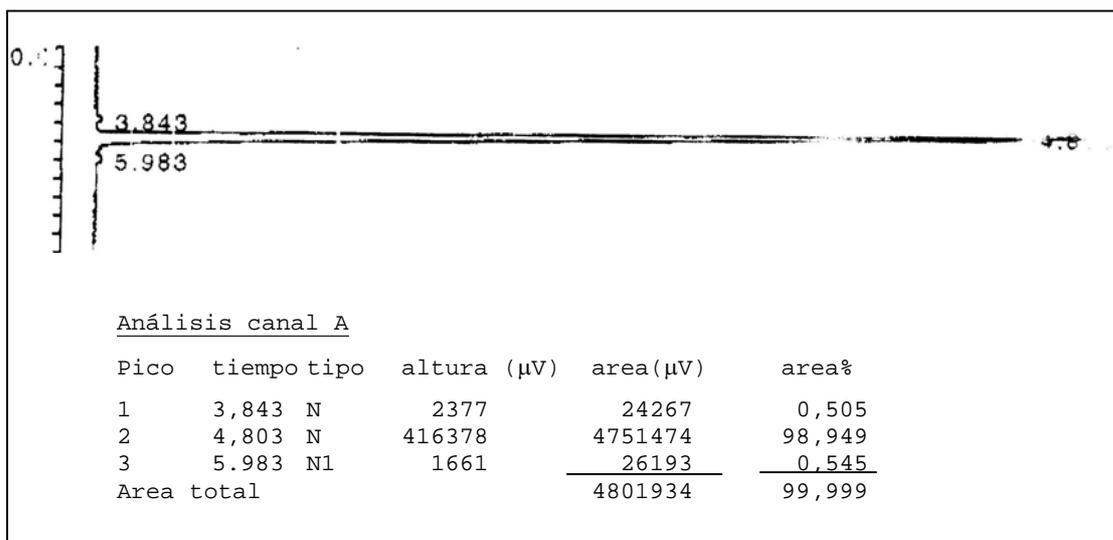


Gráfico 2: HPLC de la Talidomida

4.6.2.B. RMN: (*Research Biochemicals International*)

Los datos de RMN se obtienen de la empresa Research Biochemicals International

300 m Hz (DMSO-d)

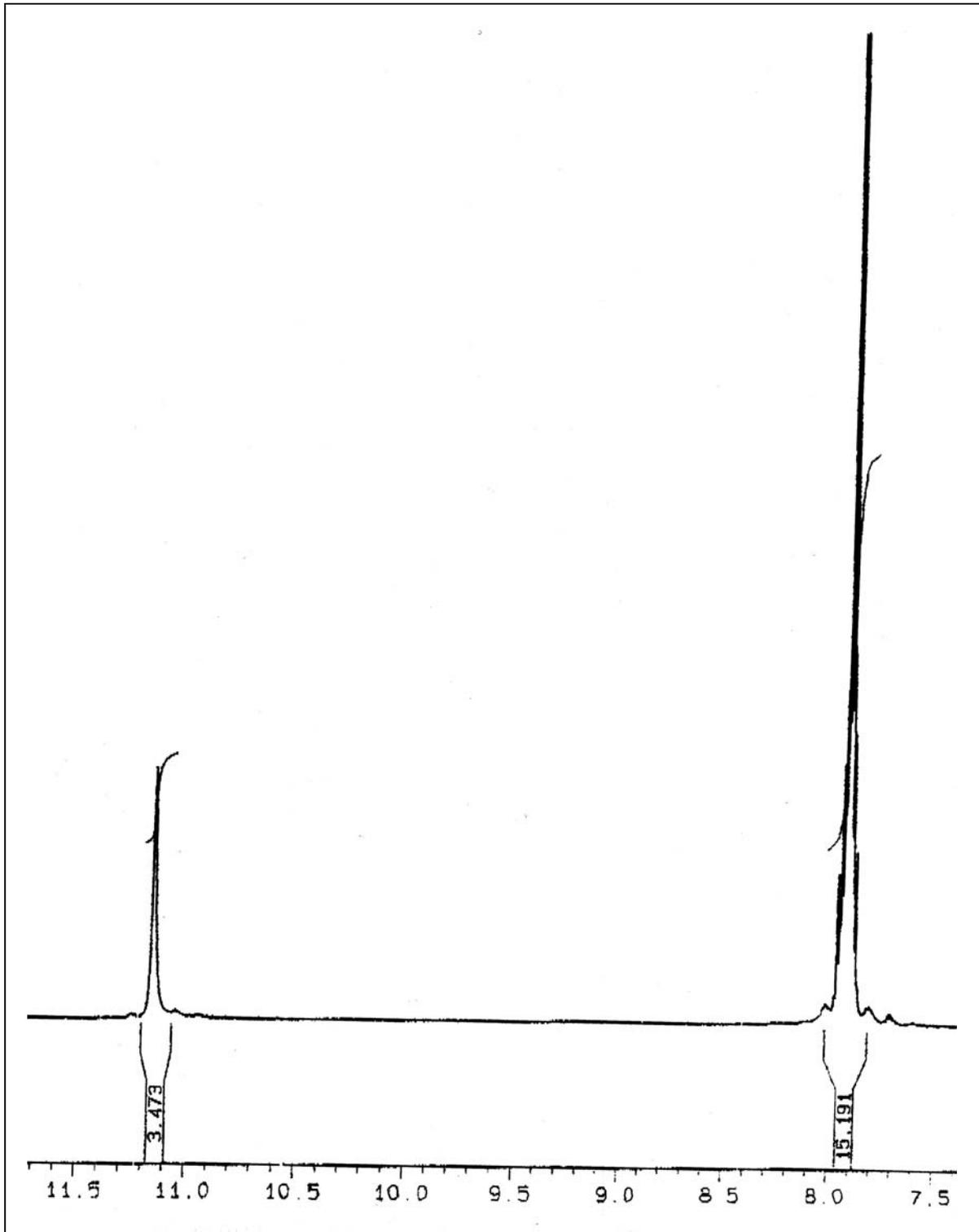


gráfico 3: RMN de la Talidomida

4.6.2.C *ULTRAVIOLETA: Absorción máxima en solventes neutros a 220 μm y 300 μm (The Merck Index)*

4.6.2.D. *POTENCIOMETRÍA:*

El Centro Nacional de Farmacobiología propone la determinación de la riqueza por medio de una valoración potenciométrica en medio no acuoso, utilizando como disolvente piridina y como valorante hidróxido de tetrabutilamonio.

4.6.2.E. *IMPUREZAS:*

Según información aportada del Centro Nacional de Farmacobiología, los estudios cromatográficos de HPLC y TLC realizados en una muestra patrón de Talidomida no detectaron presencia de impurezas significativas. No obstante, no es factible afirmar que los métodos utilizados en el control de calidad sean los adecuados para la correcta separación de Talidomida de sus impurezas de síntesis y sus productos de degradación.

4.6.2.F *DETERMINACIÓN DE TALIDOMIDA EN FORMAS SÓLIDAS Y MATERIA PRIMA*

La determinación de la Talidomida en comprimidos, cápsulas y materia prima por cromatografía líquida está descrita ampliamente por Reepmeyer (1997), que utiliza un método cromatográfico líquido, isocrático y simple.

El método utiliza una columna tipo Nova Pak octadecilsilano (150x 3,9 mm tamaño de partícula 4 micras); como fase móvil mezcla de acetonitrilo: agua (15 : 85); flujo de 1 ml / minuto; longitud de onda 237 nm y como estándar interno fenacetina.

Se utiliza el ácido fosfórico en la preparación de soluciones para inhibir la hidrólisis de la Talidomida. El método determinó entre un 99,3 a un 100,4 % de Talidomida en materia prima de cuatro fabricantes distintos; del orden de un 79,7 a un 104,8 % de Talidomida en comprimidos de cuatro fabricantes y de un 75,3 a un 102,6% de Talidomida en cápsulas de cuatro fabricantes.

La precisión del método realizada en análisis por triplicado y durante 5 días fue en comprimidos de 0,30%, en cápsulas de 0,22% y de 0,22% en materia prima. El porcentaje recuperado de una formulación simulada en comprimidos fue del 100%.. Este método utilizado por Reepmeyer (1997) ha sido también utilizado para la determinación del contenido de uniformidad en comprimidos y en cápsulas de Talidomida.

4.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE TALIDOMIDA “IN VIVO”

4.7.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV : para muestras de Talidomida en sangre, plasma u orina (Green, 1961).

4.7.2 CROMATOGRAFÍA GASEOSA : para la determinación de la Talidomida en muestras biológicas (Sandberg, 1969).

4.7.3 HPLC : para muestras de Talidomida en plasma y sangre .

El primer método descrito de HPLC para la determinación de la Talidomida en muestras biológicas es de Czejka (1987) y en él se señala la necesidad de utilizar un agente formador del par iónico en la fase móvil y del tiempo considerable, ya que se necesita más de 15 minutos para la separación en la columna.

La extracción a partir de muestras en sangre se realizó en cartuchos RP 18 con 0,5 cm³ de fase estacionaria con 0,5 ml de solución salina (pH 7,4 carbonato sódico) lavado con ácido clorhídrico 0,1M y eludido con solventes como la dimetilformamida, dimetilformamida-metanol (1:1 v/v); acetonitrilo-metanol (2:1 v/v). A continuación la cantidad extraída pasa a la columna y es cromatografiada con las fases móviles de los sistemas 1 y 2 descritos en el método de HPLC.

Este procedimiento presenta la ventaja de la concentración de las muestras en caso de que el volumen del eluyente sea menor que el volumen de la muestra y, además, se elimina la interferencia de los componentes del plasma con el lavado de las muestras con el ácido clorhídrico.

Chem (1989) utiliza un gradiente de metanol – buffer con un tiempo de separación en columna de 12 minutos.

Aboul-Enein (1991) lleva a cabo la separación de los enantiómeros de la Talidomida por medio de técnica de HPLC directa con fase estacionaria de benzoato de celulosa tris-4-metil – fenil (CHIRALCEL OJ) ; el solvente fue mezcla de hexano-etanol (50:50); el flujo de 1 ml/min y la temperatura de 25°C. El factor de capacidad (K') para el primer enantiómero eludido que fue el R (+) Talidomida fue de 9,67 y el factor de separación (α) fue de 1,54 siendo el máximo factor de resolución estereoquímico (R) obtenido de 15,05.

Eriksson (1992) utiliza un sistema isocrático similar al de Heney (1991); pero la ventaja es de que el tiempo ahora es de tan sólo 6 minutos y, además, la hidrólisis de la Talidomida se logra enlentecer con la incorporación de una solución buffer, tanto para muestras en sangre como en plasma, ya que de esta forma el valor del pH se acidifica y la Talidomida se estabiliza .

Andrew (1995) propone una serie de pautas para una correcta extracción, transporte y manipulación de las muestras biológicas de Talidomida hasta el momento de analizarlas por HPLC.

Reepmeyer (1996) logra la separación enantiomérica de la Talidomida por HPLC utilizando para ello una fase móvil con β CD .

Haque (1998) determina el racémico de la Talidomida en plasma humano, utilizando para ello una columna AVIDIN y una extracción en fase sólida. Utilizan un método por HPLC que aisla los enantiómeros de la Talidomida con fase móvil, mezcla de 2 propanol-fosfato buffer (0,1 M pH 4) en relación (2:98 v /v) y a un flujo de 0,6 ml/ min a la temperatura de 25°C y a λ de 300 nm. El tiempo del cromatograma fue inferior a 13 minutos, considerándose el método sensible y siendo válido para medir los niveles de cada enantiómero en plasma.

4.8 ESTABILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

4.8.1 PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

De los resultados del amplio trabajo sobre estabilidad publicado por Schumacher (1965) se concluye que, químicamente, la Talidomida difiere del resto de los depresores del SNC en que es altamente reactiva con nucleófilos, tales como los iones hidroxilo, resultando en una hidrólisis rápida en solución acuosa, incluso a valores de pH fisiológico. En solución buffer, la Talidomida experimenta una hidrólisis espontánea.

Por ser la Talidomida un agente no polar, se puede asumir que tiene un alto grado de unión a proteínas plasmáticas; tal unión podría proteger a este agente del proceso hidrolítico.

La Talidomida es inestable en solución acuosa a valores de pH fisiológicos y en cualquier solución de Talidomida de valor de pH superior a 7, incluso después de una hora, es muy probable encontrar en dicha solución, además de Talidomida, los doce metabolitos que se forman a partir de un proceso hidrolítico espontáneo.

A valor de pH 6, la Talidomida se hidroliza ligeramente y el producto mayoritario de hidrólisis es la α -o-carboxibenzamido glutarimida (IV), con pequeñas cantidades del ácido 4 ftalimido glutarámico (II) y del ácido 2 ftalimido glutarámico (III), formados a partir de la hidrólisis del anillo de glutarimida.

A valor de pH de 7,4 la Talidomida se hidroliza más rápidamente, de forma que en una hora desaparece un 28 % de principio activo y al cabo de 24 horas prácticamente el 100 % se hidroliza por completo, transformándose en sus metabolitos, particularmente en el ácido 2 o-carboxibenzamido glutarámico (VI) y en el ácido 4 o-carboxibenzamido glutarámico (VII). A este valor de pH el anillo de glutarimida es susceptible a la hidrólisis para dar el ácido 2-ftalimidoglutarámico (II) y el ácido 4 ftalimidoglutarámico (III).

Sin embargo, el ácido 2 ftalimidoglutarámico es muy inestable a valor de pH 7,4 ($t_{1/2}$ de 5 horas) y se transforma rápidamente en el ácido 4 o-carboxibenzamido glutarámico (VI).

A valor de pH 8 la hidrólisis es muy rápida, de forma que un 66% de Talidomida es hidrolizada en 1 hora, formándose como principal producto, una vez más, la α -o-carboxibenzamido glutarimida (IV), aunque también hay grandes cantidades del ácido 4 ftalimido glutarámico (II), pero a este valor de pH el ácido 4 ftalimidoglutarámico (II) tiene un valor de

semivida de 2 horas, siendo rápidamente transformado en el ácido 2 ortocarboxibenzamido glutarámico.

Al aumentar el valor del pH de 7,4 a 8 la velocidad de hidrólisis del anillo de glutarimida es más de 10 veces superior que con valor 7,4.

La principal ruta de hidrólisis de la Talidomida a valores de pH 6; 7,4 y 8 es por hidrólisis del anillo ftalimido para formar la α -o-carboxibenzamida glutarimida (IV), que es razonablemente estable a estos valores de pH; sin embargo, los principales metabolitos son los ácidos 2 o-carboxibenzamido glutarámico y el 4-o-carboxibenzamido glutarámico. Una pequeña proporción es hidrolizada a ácido ftálico (IX), α aminoglutarimida (X), glutamina (XII) y a ácido glutámico (XIII).

Al aumentar el valor del pH, los enlaces del anillo de glutarimida se vuelven más susceptibles a la hidrólisis y especialmente a valores de pH de 7,4 y 8 se forman considerables cantidades del ácido 2 ftalimidoglutarámico (II) y el ácido 4 ftalimidoglutarámico (III). El origen del ácido 2 ftalimidoglutámico es probablemente la transformación del producto I en el III y éste en el V siendo la α -amida del ácido 2 ftalimidoglutarámico más fácilmente hidrolizada que la α -amida de su correspondiente 4-isómero (II).

Estos datos ponen de manifiesto que una solución buffer de Talidomida a valor de pH 7 a 8 contendrá en un periodo de 24 horas, todos los productos de hidrólisis descritos en el gráfico 4 (Schumacher, 1965).

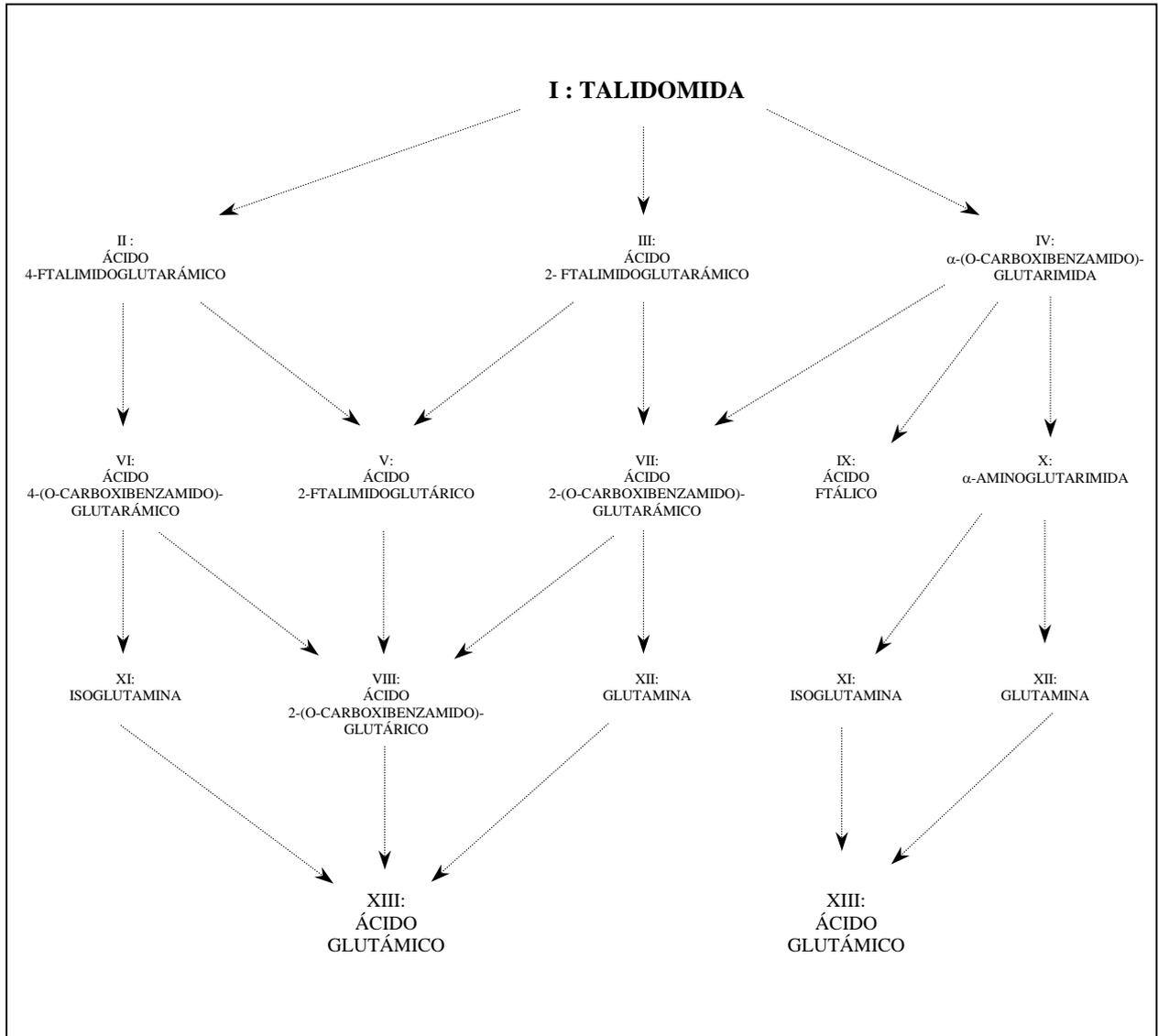


Gráfico 4 : productos de hidrólisis de la Talidomida

4.8.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA

La hidrólisis espontánea de la Talidomida, a diferentes valores de pH, puede ser analizada espectrofotométricamente y sus productos de hidrólisis pueden ser identificados por sus respectivos valores de R_f y reacciones colorimétricas en cromatogramas de papel.

4.8.2.A. ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE TALIDOMIDA

Schumacher (1965) analizó la hidrólisis espontánea de la Talidomida a diferentes valores de pH por técnicas espectrofotométricas, ya que la Talidomida en etanol acuoso o ácido diluido presenta dos picos de absorción en la región del ultravioleta del espectro: una intensa absorción se manifiesta a 220 nm y otra cerca de los 300 nm (Green, 1961).

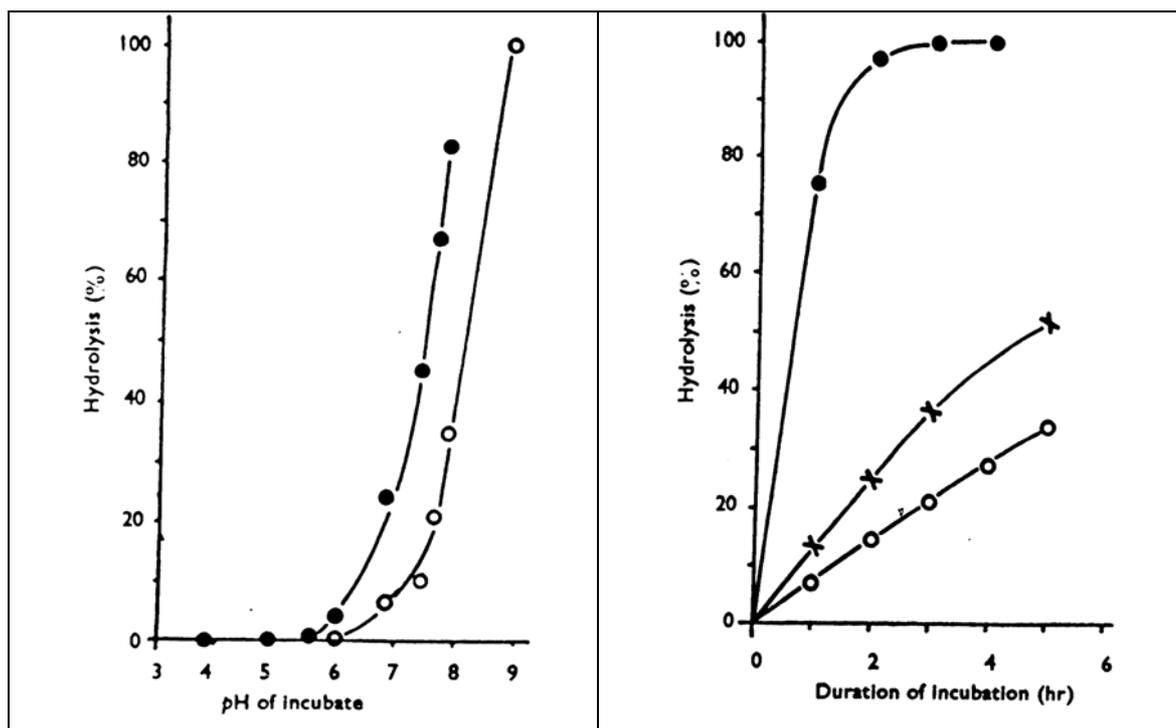
A valores de pH alcalinos el anillo de ftalimida se abre y esto va acompañado de un descenso en la densidad óptica a 220 nm.

Preparación de la solución: *se prepara una solución acuosa saturada de Talidomida a partir de 50 mg de Talidomida con 50 ml de agua destilada y filtrando durante 3 minutos. La concentración final de esta solución estimada espectrofotométricamente es de 45 a 50 µg/ml tomando un valor de E 1% 1cm a 220 nm de 1,950 (Green, 1961).*

Condiciones para la cuantificación de la hidrólisis del anillo de ftalimida: *el anillo de ftalimida de la Talidomida se hidroliza completamente después de una exposición en un exceso de hidróxido sódico N durante 10 minutos. Se trataron volúmenes de solución acuosa de Talidomida conteniendo de 73 a 294 µg de Talidomida con un exceso de hidróxido sódico N (5ml) durante 10, 20, 30 y 60 minutos. Las soluciones se neutralizan con ácido clorhídrico N diluyendo a 50 ml con agua y se mide la densidad óptica a 225 nm . Se tratan de forma idéntica alicuotas con una mezcla de 5 ml de hidróxido sódico N y 5 ml de ácido clorhídrico N diluyendo a 50 ml con agua asumiendo que la extinción a 225 nm es el tiempo cero de la hidrólisis. A los diez minutos de exposición en un álcali se produce un descenso máximo en la extinción.*

Curva de referencia de hidrólisis de Talidomida: *se prepara a partir de una solución acuosa saturada de Talidomida estimando la concentración del fármaco espectrofotométricamente a 220 nm. Se trataron durante 15 minutos alicuotas de la solución (de 1 a 4 ml) con hidróxido sódico N (5 ml) seguido de ácido clorhídrico N (5 ml) y diluido a 50 ml con solución buffer de pH 7,4 y midiendo su extinción a 225 nm y obteniendo una serie de densidades ópticas llamadas E1. Se tratan de forma idéntica alicuotas con 5 ml de hidróxido sódico N neutralizado con 5 ml de ácido clorhídrico n diluyendo a 50 ml obteniendo una segunda serie de valores denominados E2. La densidad óptica se mide a 225 nm y no al pico de absorción de la Talidomida que es 220 nm porque esto permite un ajuste más favorable del espectrofotómetro.*

Efecto del pH en la hidrólisis espontánea de la Talidomida: a partir de una solución acuosa saturada de Talidomida determinando su concentración espectrofotométricamente. Se preparan una serie de diluciones de concentración 5,5 $\mu\text{g/ml}$ en soluciones buffer de pH 3,05; 3,8; 4,9; 5,55; 6,8; 7,3; 7,6; 7,8 y 8,8 se guardan a 37°C y después de 1 hora y 5 horas la extinción a 225 nm se representa en el gráfico 5. En el gráfico 6 se muestran las diferencias en las densidades ópticas cuando se analizan muestras cada hora que están a valores de pH de 7; 7,4; 8 y 8,4.



Gráfica 5:
efecto del pH en la hidrólisis de Talidomida

- o 1 hora de incubación
- 5 horas de incubación

Gráfica 6:
Grado de hidrólisis de la Talidomida a pHs :

- o ph = 7
- X ph = 7,4
- ph = 8

Influencia de la temperatura en la solución buffer: Al trabajar en condiciones de temperatura de 37° C hay que tener en cuenta que las unidades de pH pueden variar de 0,4 en algunas soluciones buffer a 0,1 en otras.

Al comparar la hidrólisis de (+) y (-) Talidomida con la de (\pm) Talidomida, se ha encontrado que las tres sustancias se hidrolizan en un porcentaje muy similar a valores de pH de 7,2 y a 27°C, siendo cerca de un 8% la cantidad hidrolizada para una hora y para 24 horas un 80% de cada isómero se ha descompuesto.

4.8.2.B. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

La separación cromatográfica de la Talidomida y sus productos de hidrólisis fue lograda por Schumacher (1965) utilizando dos sistemas de solventes y papel Whatman nº 1. El primer solvente, A, es una mezcla de piridina: n amil alcohol: agua (7: 7: 6) en volumen y el segundo solvente, B, es una mezcla de n butanol: ácido acético glacial (10: 1) saturado con agua. Ambos se utilizan en la técnica de descenso para los cromatogramas que llevan un tiempo de 12 horas. Después de utilizarse el solvente A, el papel se deja secar durante 12 horas y luego se utiliza el solvente B obteniéndose los siguientes valores de Rf (que deben ser multiplicados por 100) para todos los metabolitos de hidrólisis de la Talidomida:

Métodos de detección: mediante luz ultravioleta, hidrazina y ninhidrina.

Luz ultravioleta: al visualizar los cromatogramas en luz ultravioleta (254 nm) las manchas de Talidomida, ácido 4 ftalimidoglutarámico y la α aminoglutarimida presentan una fluorescencia grisácea después de una exposición del papel durante 3 minutos. El resto de los metabolitos muestran manchas oscuras excepto la α -o-carboxibenzamido-glutarimida que aparece como una mancha oscura púrpura azulada. La exposición de la Talidomida y del ácido 4 ftalimidoglutarámico a la luz ultravioleta parece conducir a la formación de nuevas sustancias con distintas propiedades cromatográficas que su precursor.

Hidrazina: los cromatogramas se pulverizan con solución etanólica de hidrazina (5%) y luego calentada a 100° C durante 10 minutos; transcurrido este tiempo se visualizan los cromatogramas en luz ultravioleta y los compuestos que contienen anillo de ftalimida se transforman en ftalazina 1,4 diona con fluorescencia gris-azulada. Los derivados del ácido ftalámico y ácido ftálico muestran también una mancha gris-azulada pero más ancha.

Ninhidrina: cuando el papel se pulveriza con ninhidrina etanólica al 0,5% y luego se calienta a 80° C durante 4 minutos los aminoácidos glutamina, ácido glutámico e isoglutamina muestran unas manchas púrpuras y la isoglutamina necesita más tiempo de calentamiento que los otros dos. La α aminoglutarimida muestra una mancha rojo- púrpura .

Los análisis cromatográficos se recogen en la tabla 1

Tabla 1: cromatografía en papel de la Talidomida

Compuesto	Aspecto de la mancha			Rf x 100	
	UV	Ninhidrina	Hidrazina	A	B
I	Oscuro, verde a 5'	-	Azul verdoso	82-89	60-70
II	Oscuro, verde a 5'	-	Azul verdoso	44-53	50-65
III	Oscuro, verde a 5'	-	Azul verdoso	34-40	45-60
IV	Oscuro, púrpura	Rojo suave	Azul verdoso tenue	17-40	37-44
V	Oscuro	-	Azul verdoso	25-32	60-78
VI	Oscuro	-	Azul verdoso tenue	9-18	20-30
VII	Oscuro	-	Azul verdoso tenue	9-20	5-39
VIII	Oscuro	-	Azul verdoso tenue	3-20	12-45
IX	Oscuro	-	Azul muy tenue	55-61	57-62
X	Verdoso	Rojo	-	20-41	9-13
XI	Oscuro	Violeta	-	8-14	6-25
XII	Oscuro	Violeta	-	6-11	6-20
XIII	Oscuro	Violeta	-	0-6	0-24

4.8.2.C. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

Martin (1987) indica la separación y cuantificación de la Talidomida y de los productos de hidrólisis II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX con el método de cromatografía en fase reversa, utilizando para ello bromuro de tetrametilamonio. El resto de los metabolitos de la Talidomida (X, XI, XII y XIII) no se indican porque son sustancias fisiológicas, que en el organismo se transforman rápidamente.

Al ser la Talidomida insoluble en agua, los medios más apropiados para su extracción y análisis cromatográfico son la dimetilformamida, tetrahydrofurano, acetonitrilo y n-propanol.

Los metabolitos polares con grupos carboxílicos libres son II, III, IV, V, VI, VIII y IX que, al contrario que sucede con la Talidomida, son mucho más solubles en sistemas buffers acuosos de pH 7.

En medio alcalino la talidomida se hidroliza en los compuestos II a IX incluidos, que son productos idénticos a los encontrados en muestras humanas y animales.

La instrumentación de HPLC consistió en :

Bomba: KONTRON modelo 414
Inyector de muestras: MSI 660 T con flujo de 20 microlitros
Columna : 830
Detector de absorbancia UVICON 740 LC
Longitud de onda: 254 o 290 nm
Integrador: SMIMAZU CR 1 B

Sistema 1: precolumna BISCHOFF con 10 microm LICHROSORB RP 8 10 x 4,6 mm ID y columna analítica con 5 microm LICHROSOB RP 8, 125 x 4,6 mm ID

Sistema 2: columna analítica SPHERISOB S 5 c 18 (12,6 x 0,46 cm ID KONTRON)

Los solventes utilizados fueron metanol grado HPLC y n-propanol y dimetilformamida grado reactivo. Los reactivos utilizados fueron bromuro de tetrametilamonio, como agente formante del par iónico, la sal disódica del ácido etilen dinitriloacético, como agente acomplejante, y el ácido sulfúrico, como acidificante para la fase móvil

La separación cromatográfica por HPLC de los metabolitos de la Talidomida es dificultosa y lenta debido a que todos los compuestos son muy próximos estructuralmente, aunque la completa separación se logró mediante la formación del par iónico con bromuro de tetrametilamonio bajo las condiciones del sistema 1, tardando un tiempo aproximado de 25 minutos y obteniéndose los resultados siguientes:

Separación metabolitos Talidomida con sistema 1:

COMPUESTOS	t_R (minutos)	K	α	R_s
IV	3,0	0,7		
.....			1,33	0,7
III	4,4	1,3		
.....			1,5	1,9
II	5,8	2,4		
.....			1,21	1,2
V, VI	7,0	3,1		
.....			1,21	1,3
VIII	8,6	4,0		
.....			1,14	0,9
VII	9,6	4,7		
.....			1,13	0,8
IX	11,0	5,4		
.....			1,17	3,9

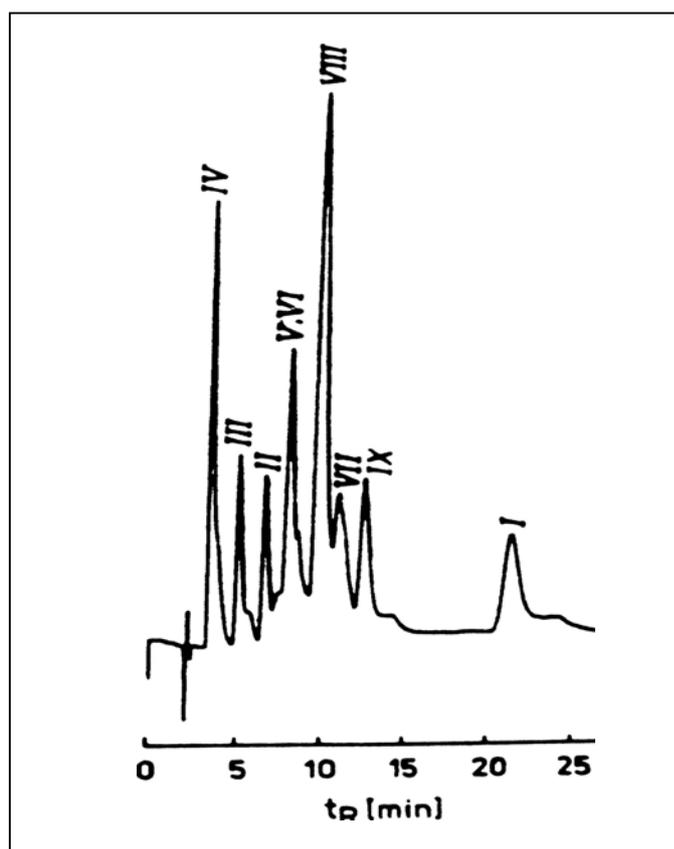


gráfico 7: Separación de los metabolitos de la Talidomida con sistema 1 de HPLC

Para los estudios de farmacocinética y los análisis “ *in vitro* “ se utilizó un sistema 2, sin la adición del agente formador del par iónico, obteniéndose una resolución cromatográfica más baja que con el sistema 1; pero que ofrece la ventaja de que el tiempo total de análisis es mucho menor.

Separación metabolitos de la Talidomida con sistema 2:

COMPUESTO	t_R (minutos)	K	α	R_s
Inyección	2,5	0		
.....			1,3	0,9
IV	3,2	0,3		
.....			2,7	1,8
VII	4,2	0,8		
.....			1,1	0,5
V,VI	4,6	0,9		
.....			1,8	1,8
II, III	6,3	1,6		
.....			1,1	0,4
VIII, IX	6,7	1,8		
.....			1,5	2,1
I	8,9	2,7		

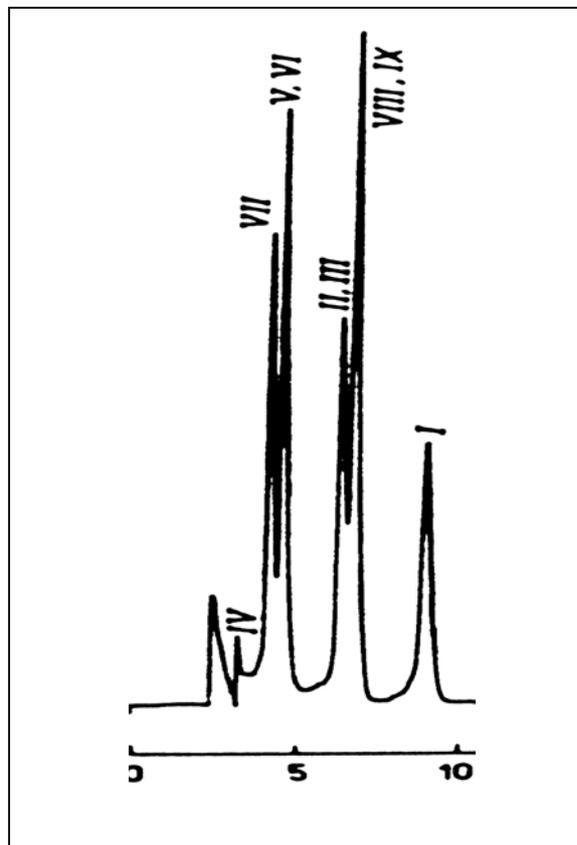


gráfico 8: Separación de los metabolitos de la Talidomida con sistema 2 HPLC

La exactitud de separación de los metabolitos de la Talidomida así como la pureza de los picos se puede representar al enfrentar el valor de b 0,5 con el factor de capacidad K , observándose que tanto en el sistema 1 como en el 2 se aprecia una desviación considerable con la línea recta tal como se representa en el gráfico 9 al comparar ambos sistemas.

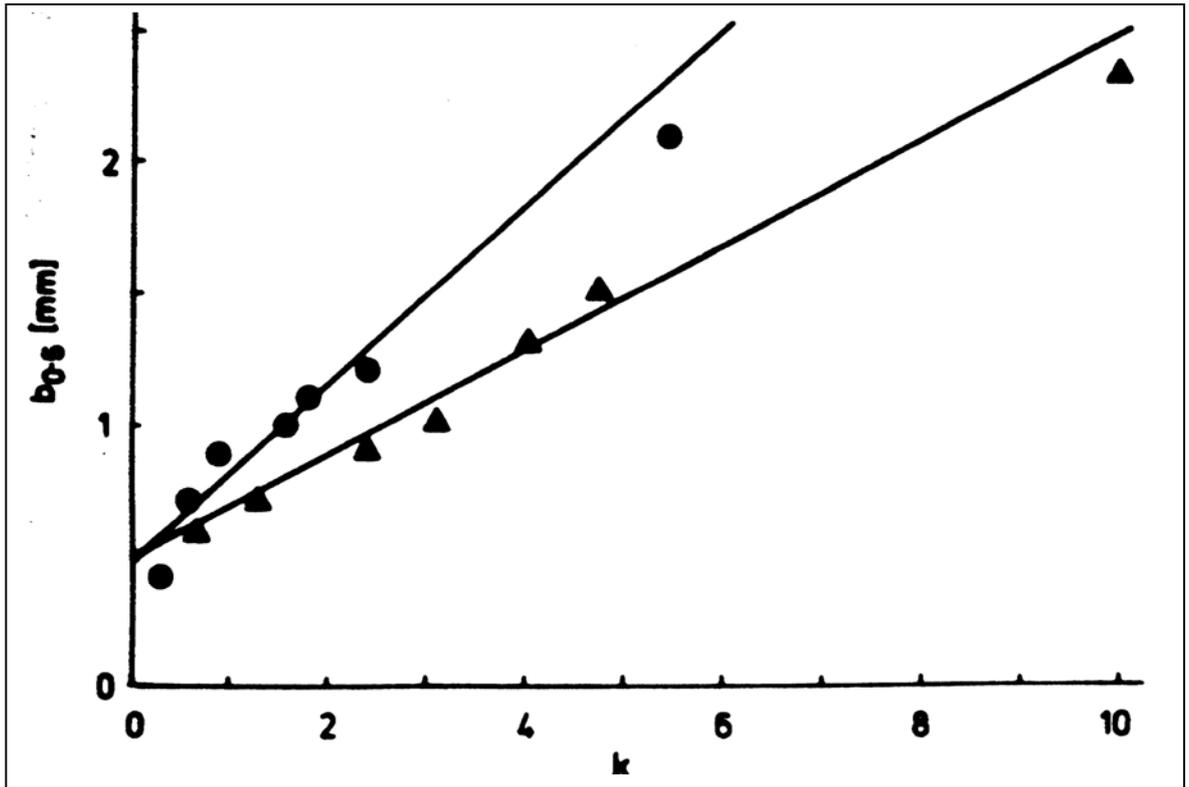


gráfico 9: Comparación de los sistemas cromatográficos de HPLC 1 y 2 para la Talidomida

4.8.2.D.ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

Para la determinación de la biotransformación “ in vitro “ de la Talidomida, Weinz (1995) ha puesto en marcha la técnica cromatográfica capilar electrocinética micelar, utilizando sulfato dodecil sódico y bromuro de hexadeciltrimetil amonio para la determinación de los posibles metabolitos hidroxilados de la Talidomida.

Se concluye que la biotransformación de la Talidomida es estereoselectiva; así, para la forma S (-) Talidomida, se formó principalmente el metabolito 5 hidroxitalidomida, mientras que para R (+) Talidomida, los metabolitos que se formaron en mayor proporción fueron los diastereoisómeros de 5 hidroxitalidomida.

Además, la enantioseparación de la Talidomida y dos de sus metabolitos hidroxilados se consiguió utilizando electroforesis capilar cargada negativamente con carboximetil β CD.

4.8.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

4.8.3.A. ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

Schumacher (1965) utiliza para el ácido 2 ftalimidoglutarámico, ácido 4 ftalimidoglutarámico y ácido 2 ftalimidoglutárico, que contienen anillo de ftalimida, una solución de cada compuesto disolviendo 14,7 mg en 5 ml de etanol y diluyendo con agua a 200 ml. Se prepara una curva de referencia de hidrólisis tratando alicuotas de 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 y 4,0 ml en 5 ml de hidróxido sódico N, neutralizando después de 15 minutos con 5 ml de ácido clorhídrico N y diluyendo a 50 ml con solución buffer de pH 7,4. Se lee la densidad óptica de cada solución a 225 nm. Una segunda serie de alicuotas se llevan a 50 ml con solución buffer y se mide la extinción a 225 nm. Se construye una gráfica para cada compuesto, relacionando concentración con descenso en densidad óptica a 225 nm durante la hidrólisis. La extinción de la hidrólisis de los compuestos puede ser determinada midiendo el descenso en la densidad óptica a 225 nm y refiriéndolo a la curva estándar “ in vitro “ las semividas para los tres compuestos se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: Estabilidad de los productos de hidrólisis de la Talidomida

<i>Compuestos</i>	<i>Semivida (hora) en diferentes soluciones buffer</i>			
	<i>pH 6</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 7.4</i>	<i>pH 8</i>
<i>Talidomida</i>	*	11	5	1-25
<i>Acido 2 – ftalidoglutarámico</i>	48	*	48	30
<i>Acido 4 – ftalidoglutarámico</i>	24	*	5	2
<i>Acido 2 – ftalimidoglutárico</i>	48	*	43	33

* No determinado

4.8.3.B. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL PARA LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

Schumacher (1965) desarrolla esta técnica donde se preparan soluciones de cada sustancia, disolviendo 15 mg de cada compuesto en solución buffer de pH 7,4 y manteniéndolas a 37° C. A 1, 4 y 24 horas se analizaron las muestras en las mismas condiciones cromatográficas descritas en el apartado anterior y se obtiene:

Acido 4 ftalimidoglutarámico: es particularmente inestable, hidrolizándose rápidamente el anillo de ftalimida en pH 6, aumentando el grado de hidrólisis conforme se asciende el valor de pH. La semivida de este compuesto a valor de pH 6 está próxima a las 24 horas, para valor de pH 7,4 es de 5 horas y para pH 8 es de 2 horas. El principal producto de hidrólisis determinado por cromatografía tras incubar las tres soluciones, es el ácido 4-o-carboxibenzamido glutarámico.

Acido 2 ftalimidoglutarámico: es mucho más estable a la hidrólisis del anillo que su 4 isómero. A pH 8 su semivida está próxima a 30 horas y a pH 7,4 y 6 menos de un tercio se ha degradado después de 48 horas de incubación. Sin embargo, la cromatografía revela que, mientras que el producto mayoritario de hidrólisis es el ácido 2-o-carboxibenzamido glutarámico algunas reacciones de hidrólisis del grupo α amido dan el ácido 2ftalimidoglutárico. A este respecto el ácido 2 ftalimidoglutarámico se diferencia de su 4-isómero en que el grupo α amida es estable a la hidrólisis.

Acido 2 ftalimidoglutárico: a pH de 7,4 y 8 la semivida es de 43 y 33 horas respectivamente. A pH de 6, es muy estable con semivida de 4 días. El producto mayoritario de hidrólisis es el ácido 2-o-carboxibenzamido glutárico.

Acidos 2 y 4 o carboxibenzamido glutarámico y ácido 2-o-carboxibenzamido glutárico: a valor de pH 7,4 y a 37° C estos tres compuestos son más estables que todos los anteriores citados, ya que en 4 horas no se detecta descomposición y después de 24 horas sólo hay trazas de aminoácidos libres y ácidos no ftálicos que puedan ser detectados por cromatografía.

α aminoglutarimida: después de incubar 1 hora este compuesto, los cromatogramas muestran trazas de aminoácidos. Después de 24 horas este compuesto desaparece completamente y el cromatograma muestra la presencia de isoglutamina, glutamina y ácido glutámico juntos.

α -o- carboxibenzamido glutarimida: a pH entre 6 y 7 se hidroliza lentamente a alfa-aminoglutarimida y a ácido ftálico y a trazas de los ácidos 2 y 4 o-carboxibenzamido glutarámico. A pH 7,4 la hidrólisis es más rápida y se detectan ácido ftálico, α aminoglutarimida, isoglutamina, glutamina, ácido glutámico,

4.8.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LA TALIDOMIDA

Schumacher (1965) determina la cuantificación de la formación de varios productos de hidrólisis se lleva a cabo a valores de pH 6; 7,4 y 8 utilizando para ello $\pm \alpha_1$ (C₁₄ carbonil ftalimido glutarimida). Se toman alicuotas (0,1 ml) a 1,4 y 24 horas de la incubación de las soluciones y, utilizando la técnica bidimensional cromatográfica asociada a la radioactividad, se puede conocer la cantidad hidrolizada de los distintos productos en función del pH como se ve en la tabla 3.

Tabla 3: Cuantificación de los productos de hidrólisis de la Talidomida

Compuesto	Producto de hidrólisis (%)								
	pH 6			pH 7,4			pH 8		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
α -(o-carboxibenzamido)glutarimida	4,2	12,7	34,5	23,1	47,5	52,5	41,3	58	14
Ácido 4-ftalimidoglutarámico	0,7	2,5	4,9	1,6	3,5	2	16	3,7	3,3
Ácido 2-ftalimidoglutarámico	0	0	1,3	0,3	1,1	1,8	2,3	2,8	6,2
Ácido 2-ftalimidoglutárico	0	0	0	0	0	0,1	0,7	1	2,7
Ácido 4- (o-	0	0	0,7	0,3	1,8	23	2,9	18	40,5
Ácido 2- (o-	0	0	0	0,3	1,6	20	1,8	10	25,7
Ácido 2- (o-carboxibenzamido)glutárico	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,5	5,2
Ácido ftálico	0	0	0	0	0	0,1	0,4	1,4	1,9
Talidomida	95,1	84	58,3	71,5	41,5	0,15	34	3,2	0,03
TOTAL	99,9	99,2	99,7	96,7	97	99,8	99,6	98,6	99,7
TALIDOMIDA HIDROLIZADA	4,9	15,2	44,4	28,3	58,5	99,8	66	96,8	99,9

4.9 COMPRIMIDOS COMERCIALES

Los comprimidos comerciales de Talidomida fueron suministrados por la empresa:

CHAMPION FARMACÉUTICA LTDA.

Av Robert Kennedy 6444

CEP 04805

Sao Paulo – Brasil

ESPECIFICACIONES PARA LOS COMPRIMIDOS DE TALIDOMIDA :

los comprimidos no se encuentran descritos en farmacopeas, por lo que no se dispone de documentación oficial que permita establecer los requerimientos de calidad para la Talidomida a fin de contrastarlos con las especificaciones del fabricante.

A. ASPECTO FÍSICO

aparición: comprimidos circulares uniformes

color: blanco o ligeramente amarillento

superficie: suave, uniforme y sin manchas

B. IDENTIFICACIÓN

La cantidad de 0,1 mg / ml en solución de N,N DMF presenta picos de absorción a las λ de 246 nm y 300 nm, respectivamente.

C. CUANTIFICACIÓN

Espectrofotometría UV: a λ de 300 nm utilizando como disolvente la DMF.

El cálculo de la concentración de Talidomida por comprimido se puede obtener de la siguiente ecuación:

$$[A_m \times M_p / A_p \times M_m] \times pm = \text{mg Talidomida / comprimido}$$

D. CONTENIDO DE PRINCIPIO ACTIVO : entre 95 y 105 mg / comprimido

E. ÁNGULO DE ROTACIÓN : racémico

F. ASPECTOS GALÉNICOS

desintegración: en agua y a 37° C el máximo tiempo es de 30 minutos

consistencia: mínimo de 3,0 Kg./cm²

fiabilidad: máxima un 2,0 %

G. MATERIAL DE ENVASE

Frasco de color ámbar herméticamente sellado con arandela de aluminio conteniendo 100 comprimidos

5

NUEVAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE ADMINISTRACIÓN DE LA TALIDOMIDA

5.1 PROBLEMAS FARMACOTÉCNICOS DE LA TALIDOMIDA

5.1.1 CONFIGURACIÓN TRIDIMENSIONAL

La configuración tridimensional o estereoquímica de los fármacos repercute en el mecanismo de acción, farmacocinética, farmacodinamia, toxicidad etc. dado que los fármacos en el organismo interactúan con multitud de estructuras tridimensionales y asimétricas orgánicas o que es lo mismo, estructuras quirales que significa que al menos presentan en su estructura un carbono con sus cuatro sustituyentes distintos y, por consiguiente, carece de plano de simetría. Las moléculas que presentan uno o más carbonos quirales tienen la misma composición química elemental (el mismo número de átomos y con la misma disposición de los grupos terminales); pero diferente configuración tridimensional, es decir, pueden existir en el espacio en dos formas diferentes que son imágenes especulares entre sí y no superponibles, denominándose cada una de estas dos estructuras enantiómeros.

Para diferenciar los enantiómeros se utilizan unas normas químicas en función del orden de mayor a menor de los diferentes grupos terminales unidos al carbono quiral, así si la dirección sigue las agujas del reloj se le asigna la letra R y si va en contra de las agujas del reloj la letra S.

El hecho de que cada uno de los enantiómeros R o S tenga la misma composición química no quiere decir que ambos posean las mismas propiedades físicas ni terapéuticas.

Propiedades físicas de los enantiómeros:

Cada uno de los enantiómeros desvía la luz polarizada hacia un lado: algunos son dextrógiros desviándola hacia la derecha y otros son levógiros desviándola hacia la izquierda. En nomenclatura química los compuestos dextrógiros se consignan con el signo (+) o la letra d y los compuestos levógiros con el signo (-) o la letra l. Una mezcla racémica de enantiómeros R y S no desvía la luz polarizada puesto que sus efectos se contrarrestan.

Definiciones de la Real Farmacopea Española:

La **rotación óptica** es la propiedad que poseen ciertas sustancias de desviar el plano de polarización de la luz polarizada.

La **rotación óptica específica** es la rotación expresada en radianes medida a una temperatura y a una longitud de onda, producida por una capa de un metro de espesor de un líquido o de una disolución que contiene un kilogramo de sustancia ópticamente activa por metro cúbico de disolución.

El **ángulo de rotación óptica** de un líquido, es el ángulo de rotación expresado en grados centígrados del plano polarizado a la longitud de onda de la línea D del sodio, medido a 20° C usando una cubeta de un decímetro de espesor.

La **rotación óptica específica** de un líquido, se define como el ángulo de rotación expresado en grados centígrados del plano de polarización a la longitud de onda de la línea D del sodio, medido a 20° C en la sustancia líquida a examinar calculado con referencia a una cubeta de un decímetro de espesor y dividido por la densidad expresada en gramos por centímetro cúbico.

La **rotación óptica específica** de una sustancia en disolución, se define como el ángulo de rotación expresado en grados centígrados del plano de polarización a la longitud de onda de la línea D del sodio medido a 20° C en una disolución de la sustancia a examinar calculado con referencia a una cubeta de un decímetro de espesor y a una concentración de un gramo de sustancia por mililitro. La rotación óptica específica de una sustancia sólida se define siempre en relación con un disolvente determinado y a una concentración dada.

En el sistema convencional, adoptado por la Real Farmacopea Española, la rotación óptica específica se expresa en grados mililitro por decímetro y por gramo.

La Talidomida es un racémico; las formas S (-) / L (-) y R (+) / D (+) representan los derivados de L (-) y D (+) ácidos glutámicos respectivamente (Gunzler, 1992).

Propiedades farmacológicas de los enantiómeros:

A nivel molecular, a pesar de la semejanza estructural entre los dos enantiómeros, sus efectos farmacológicos pueden diferir considerablemente; ya que los receptores presentes en la célula humana también tienen configuración quiral y los enantiómeros pueden presentar diferente grado de interacción frente al receptor. Por esta razón, las enzimas del organismo son estructuras proteicas en forma de hélice α y este giro se debe a que se componen exclusivamente de una cadena de S-aminoácidos. La quiralidad adquiere una gran importancia en el mecanismo de acción porque la interacción entre dos moléculas quirales depende de su complementariedad tridimensional.

Las mezclas racémicas son mezclas al 50% o equimoleculares de cada uno de los enantiómeros, que pueden presentar **cuatro comportamientos distintos** como se explican a continuación:

1. Ambos enantiómeros presentan **propiedades farmacológicas idénticas**. Este caso se da cuando la interacción del fármaco con el receptor no depende de la zona quiral de la molécula, sino que la unión se produce en otras zonas activas.
2. Ambos enantiómeros presentan la **misma actividad farmacológica**; pero con **potencias diferentes**. En este segundo caso, uno de los dos enantiómeros presenta una unión más estable y selectiva que el otro sobre la estructura con la que interactúa, aunque el menos activo también puede unirse. Cada uno de los enantiómeros presenta la misma actividad farmacológica pero con potencia distinta, dado que la parte del receptor que debe unirse a la zona quiral no es muy selectiva. Este caso es uno de los más frecuentes.
3. Cada enantiómero presenta **diferente actividad farmacológica**. Esta es otra de las situaciones más frecuentes, puesto que ambas configuraciones espaciales pueden interactuar con múltiples estructuras y con cada una de ellas presentarán una diferente actividad y fuerza de interacción.
4. **Sólo uno** de los dos enantiómeros es **terapéuticamente activo**. Si solamente uno tiene acción terapéutica (normalmente es el enantiómero S (+) o dextro), el otro sólo enturbia la absorción, varía el transporte del fármaco, aumenta las interacciones medicamentosas y provoca una sobrecarga en su metabolización y excreción.

ENANTIÓMEROS DE TALIDOMIDA

Los enantiómeros de la Talidomida (Winter, 1992; Gunzler,1992; Wnendt,1997) difieren de la forma racémica, en presentar mayor solubilidad en agua, hidrolizándose por tanto más deprisa que la forma racémica. Además, tanto la forma S(-) como la R(+) son más tóxicos que la racémica con LD 50 (ratón) de 0,5 – 1,5 g/Kg. y de 0,4 – 0,7 g/Kg. respectivamente (Haque, 1988; Fabro, 1967) .

De forma sorprendente la administración simultánea de ambos enantiomeros reduce su toxicidad incluso cuando un isómero es administrado por vía oral y el otro por vía intraperitoneal (Hague, 1988) pero los resultados experimentales en animales contradicen el comportamiento en humanos ya que tanto la forma racémica como ambos enantiómeros produjeron malformaciones (Fabro, 1967) .

Smith (1965) describió sólo efecto de teratogenicidad de la forma racémica de Talidomida y de R(+) Talidomida ; sin embargo, otros autores como Blaschke (1979) afirman que la teratogenicidad es sólo atribuible al enantiómero S(-)Talidomida y a su producto de hidrólisis el ácido S(-) N ftalil glutámico pero no es teratógeno el enantiómero R (+) Talidomida.

5.1.2 RACEMIZACIÓN DE LA TALIDOMIDA

Knoche (1994) presenta sus resultados sobre los estudios de racemización de la Talidomida y se está ensayando la posibilidad de una síntesis enantioselectiva con el objetivo de separar el componente teratogénico que presenta el S (-) enantiómero, del componente inductor del sueño que presenta el R (+) enantiómero; pero de momento, únicamente se dispone de mezclas racémicas. Además, hay estudios que apuntan a que en el organismo, la Talidomida sufre un fenómeno de inversión, entendiendo por tal fenómeno, la capacidad que presenta el organismo en cambiar la morfología tridimensional del fármaco, es decir, que aunque se administre un R (-) enantiómero inactivo existen sistemas enzimáticos o químicos capaces de transformar este enantiómero inactivo en S (+) enantiómero activo.

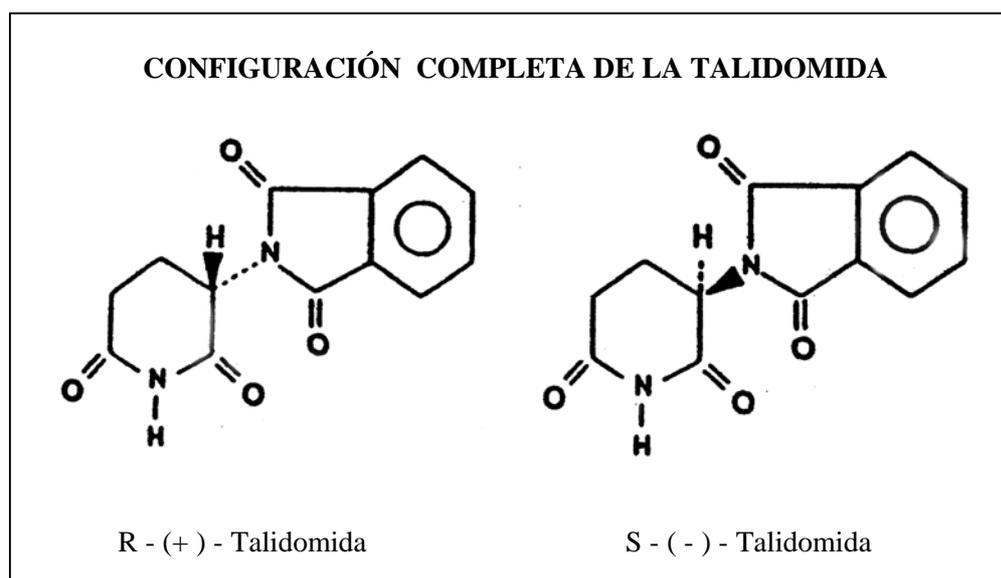


Gráfico 10: Enantiómeros de la Talidomida

Se ha estudiado la semivida de racemización de la Talidomida “in vitro” después de un periodo de incubación de los enantiómeros en diferentes medios acuosos, midiendo el índice enantiomérico mediante técnica de HPLC quiral. Para ello, se utilizó como fase estacionaria poli [(S)-N-(1-ciclohexyletil) metacrilamida] y como fase móvil tetrahidrofurano-terc-butyl metil éter (3:7, v/v) y el flujo de 1 ml/min. y longitud de onda de 230 nm. Los grados de racemización de los enantiómeros de Talidomida se estudiaron en solución buffer fosfato (0,067 M pH 7,4), en plasma de varias especies y en albúmina sérica humana .

La racemización de los enantiómeros de Talidomida, se presenta como el cambio de exceso enantiomérico (*ee*) expresado en porcentaje $[(R - S) / (R + S) * 100; (\%)]$ del enantiómero inicialmente presente. Si se representa el logaritmo natural de *ee* frente al tiempo se puede calcular la semivida de racemización ya que es una reacción de pseudo primer orden.

Las semividas de racemización de los enantiómeros de Talidomida, en solución buffer 0,067 M, pH 7,4 a 37° C son muy parecidas, siendo para (+) Talidomida de 288,8 minutos y para (-) Talidomida de 260,5 minutos. Mientras que, en el plasma cítrico humano para (+) Talidomida es de 11,5 minutos y para (-) Talidomida de 8,3 minutos a diferencia del plasma cítrico de conejo donde para (+) Talidomida es de 9,3 minutos y para (-) Talidomida de 6,5 minutos. Esto indica que no hay grandes diferencias en las semividas de racemización de la Talidomida entre las especies; aunque la (-) Talidomida se racemiza más deprisa que la (+) Talidomida como se representa en el gráfico 11.

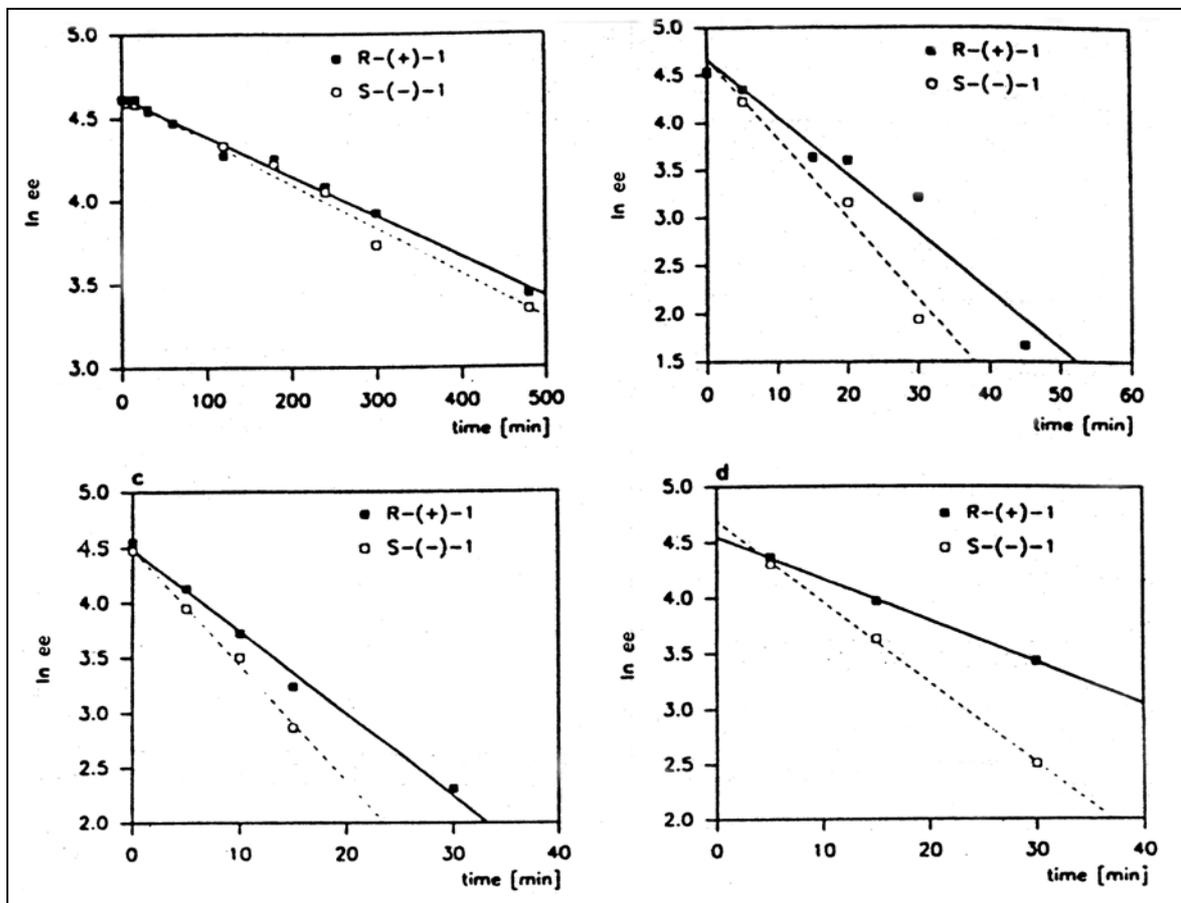


gráfico 11: Racemización de la Talidomida

Los estudios llevados a cabo con plasma heparinizado para humanos y conejos han demostrado que los anticoagulantes no tienen efecto en la racemización (Knoche, 1994).

Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo con albúmina indican que el grado de racemización en soluciones buffer en presencia de concentraciones fisiológicas de albúmina sérica sin presencia de ácidos grasos, es de 18,5 minutos para (+) Talidomida y de 9,5 minutos para (-) Talidomida, valores que son muy similares a los obtenidos en plasma humano. Esto indica que la presencia de albúmina en las soluciones buffer fosfato, acelera drásticamente la racemización de los enantiómeros de Talidomida.

En contraste con estos valores obtenidos en soluciones de albúmina sin ácidos grasos, los valores de racemización para la Talidomida en soluciones con fracción V de albúmina que es muy rica en ácidos grasos indican que el tiempo de racemización es mucho más prolongado siendo de 68,8 minutos para (+) Talidomida y de 54,4 minutos para (-) Talidomida. En consecuencia el contenido en ácidos grasos, parece que disminuye la interacción de la Talidomida con la albúmina y esto hace que su proceso de racemización sea mucho más lento.

Para los estudios de metabolismo, se incubaron los enantiómeros de Talidomida en los microsomas hepáticos de rata y después de un periodo de tiempo de 30 minutos a 37° C, el grado de racemización fué muy lento lo que hace suponer que las enzimas microsomales hepáticas no tienen influencia en los procesos de racemización de la Talidomida, como lo tiene la albúmina sérica humana.

5.1.3 METODOS ANALÍTICOS DE SEPARACIÓN DE LOS ENANTIÓMEROS DE TALIDOMIDA

5.1.3.A. CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) DE SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS DE TALIDOMIDA

Blasche (1989) y Hassan (1991) utilizan como fase estacionaria una columna quirral de poli (S)-N-(1-ciclohexiletil) metacrilamida junto con 1,2-etanodioldimetacrilato y como fase móvil benceno:dioxano (4:1); pero los principales inconvenientes aparte de lo complicado de la fase estacionaria es que la elución se realiza a 50 ° C.

Hassan (1991) utiliza una cromatografía líquida directa e isocrática sencilla con una fase estacionaria más sencilla y más disponible en el mercado y sobre todo se consigue la separación de los enantiómeros de Talidomida en menos tiempo que en 1989 puesto que se logra la separación en menos de 35 minutos y además se lleva a cabo a temperatura ambiental y no a 50° C como anteriormente evitándose en lo posible la aceleración de la racemización de la Talidomida a altas temperaturas.

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Fase estacionaria quiral: celulosa tris-4-metilfenil benzoato (Chiralcel OJ)
- Solvente: hexano : etanol (50:50)
- Flujo: 1 ml/minuto
- Velocidad: 0,25 cm/minuto
- Detección UV: 240 nm
- Sensibilidad: 0,01 AUFS
- Temperatura : 23° C
- Cantidad muestra inyectada: 2 n mol para Talidomida racémica, 1 n mol para R(+)
Talidomida y 1 n mol para S (-) Talidomida.

El pico eludido con factor de capacidad más bajo se identifica con R (+) Talidomida y el pico eludido con el factor de capacidad más alto se identifica con S (-) Talidomida, según se representa en el gráfico 12

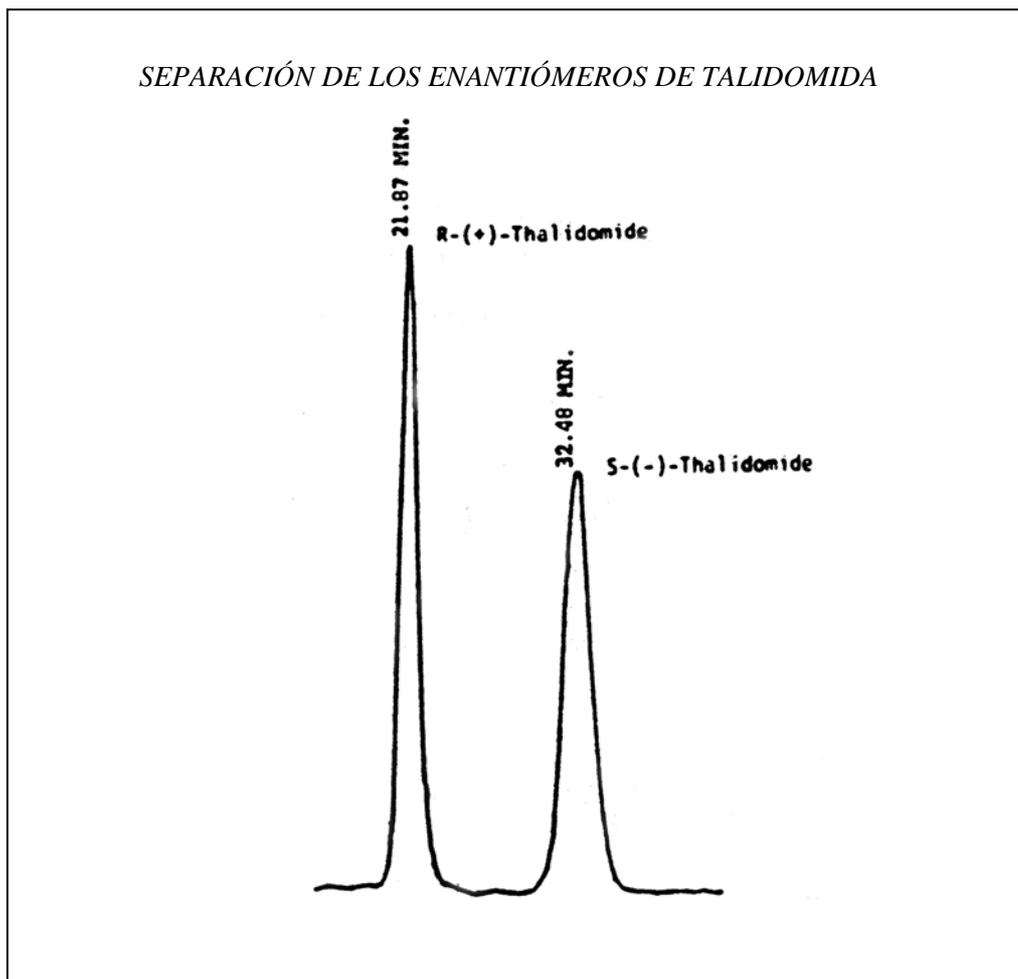


gráfico 12: Separación enantiomérica por HPLC de Talidomida racémica

El factor de capacidad (k) para el primer pico eludido es de 9,67 y el factor de separación esteroquímico (α) fué de 1,54 y el factor de resolución esteroquímico (R) fué de 15,05.

Eriksson (1995) determina los enantiómeros de Talidomida en muestras de sangre mediante resolución directa en sistema de HPLC con columna de tribenzoil celulosa. Las constantes de inversión quiral de R(+) Talidomida y de S(-) Talidomida en sangre a 37° C fueron respectivamente de 0,30 y de 0,31 h⁻¹. Las constantes de degradación fueron de 0,17 y de 0,18 h⁻¹ respectivamente con una rápida interconversión “in vivo” en humanos, predominando el R (+) Talidomida en el equilibrio.

Reepmeyer (1996) afirma que los enantiómeros R y S de la Talidomida se pueden aislar utilizando HPLC en fase reversa con columna C 18 con β CD en la fase móvil. A medida que se aumenta la concentración de la β CD de 0 a 20 mM, la resolución enantiomérica aumenta y los tiempos de retención disminuyen significativamente, además, concluyó que tras los estudios sobre la influencia de los disolventes orgánicos en la fase móvil seleccionado fué el etanol. Las constantes de equilibrio para la formación de complejos de inclusión con β CDs para R y S Talidomida en solución buffer con etanol (5:95) fueron respectivamente de 64 y 76 M⁻¹ respectivamente.

5.1.3.B.ELECTROFORESIS DE SEPARACIÓN DE ENANTIÓMEROS DE TALIDOMIDA

Weinz (1995) consigue la enantioseparación de la Talidomida utilizando técnica electroforética capilar cargada negativamente con carboximetil β CD.

5.1.4 SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA

Los bajos niveles del fármaco en plasma después de una administración oral hacen deseable una formulación intravenosa; aunque de momento no está disponible, en parte debido a la bajísima solubilidad acuosa del fármaco (50 μ g /ml) y en parte también debido a su escasa estabilidad acuosa, pues sufre rápidos procesos hidrolíticos.

SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA

La Talidomida es bien conocida por su extremada insolubilidad acuosa. Ha sido imposible realizar trabajos en su biodisponibilidad absoluta después de una administración oral en humanos

porque no hay ninguna formulación parenteral disponible. El único estudio encontrado respecto a la biodisponibilidad de la Talidomida fuÉ realizado por Schumacher. (1989), utilizando modelos en animales. Se calculó el AUC oral y el AUC iv por el método de los trapecios y se encontró un valor de biodisponibilidad de 0,93 en ratas y de 0,67 en conejos. De este modo, se estimaron los valores de Vd y Cl asumiendo una biodisponibilidad completa .

ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA

Eriksson (1992) describe los factores más influyentes en la estabilidad de la Talidomida. El principal problema que presenta la Talidomida es que sufre degradación hidrolítica en medio acuoso, a valor de pH fisiológico tanto " in vivo" como " in vitro" presentando un valor de semivida inferior a 5 horas, en solución acuosa de valor de pH 7,4 a la temperatura de 37° C.

Chem (1989) indica que la unión a proteínas plasmáticas pudiera proteger a la Talidomida de los fenómenos hidrolíticos .

Por otra parte, se ha demostrado que el grado de hidrólisis de la Talidomida es muy sensible a cambios en el valor del pH y a cambios en la temperatura; por ello ligeras variaciones en el valor del pH, son suficientes para poder de esta forma explicar las diferencias en los valores de semivida de este fármaco en sangre y en plasma.

Normalmente la sangre arterial presenta un valor de pH de 7,4-7,5 mientras que la sangre venosa es más ácida debido a que presenta una mayor concentración de dióxido de carbono. A valores por debajo de 6, la Talidomida es bastante estable, disminuyéndose el grado de hidrólisis, lo que representa una protección de las muestras frente a la degradación durante el tiempo de análisis. Así de esta forma, si se acidifica la sangre o el plasma con la adición de solución citrato buffer, pasando a un valor de pH 5,1 en la mezcla sangre-citrato (1:1) a un valor de pH 4,2 en la mezcla plasma-citrato (1:1) se puede llegar a una estabilización de la Talidomida.

Pero la estabilidad de la Talidomida no sólo se ve influenciada por el valor del pH ya que la temperatura también influye en gran medida; pues cuanto más baja es ésta, más estable permanece nuestro principio activo y así se pudo determinar que a la temperatura de (– 25° C) las muestras de Talidomida permanecían inalteradas durante un periodo de tiempo de 1 mes.

Eriksson (1992) también determina el valor de la semivida de la Talidomida en sangre, plasma, metanol, mezcla de sangre y buffer, mezcla de plasma y buffer siguiendo modelos de

curvas monoexponenciales representando el porcentaje de medicamento inalterado frente al tiempo a los valores de temperatura de (-25°C) , 5°C y 23°C .

Así para muestras de Talidomida en metanol a 23°C y a 5°C , se estimó un valor de semivida de 44 y 217 días respectivamente ya que, en su cromatograma de HPLC se obtuvieron valores de K' de 1,05; 1,52 y 1,62 mientras que no se detectaron tales picos para las muestras de Talidomida en metanol mantenidas a (-25°C) de 176 días por ello, mediante la ecuación de Arrhenius se estimó que su valor de semivida pudiera ser de 12 años, según la tabla 4.

Para las muestras de Talidomida en sangre y en plasma, sin la adición de solución citrato durante 34 días mantenidas a una temperatura de (-25°C) se observa un valor de degradación de un 13 % y de un 15 % respectivamente siendo el valor de semivida aproximadamente de 170 días y de 145 días respectivamente, según se recoge en la tabla 4.

tabla 4: Grados de degradación de la Talidomida en distintos medios

Medios	Temperatura	Semivida
Metanol	23°C 5°C (-25°C)	44 días 217 días 12 años *
Sangre	23°C 5°C (-25°C)	11 horas 82 horas 125 días *
Plasma	23°C 5°C (-25°C)	7 horas 68 horas 222 días *
Sangre – buffer	23°C	13 días
Plasma – buffer	23°C	9 días

* estimado de la ecuación de Arrhenius

Krenn (1992) señala que la hidrólisis de la Talidomida se ve fuertemente afectada por la temperatura, así después de 4 horas de incubación a 37° C sólo el 26,1 % de las muestras de Talidomida estuvieron inalteradas comparado con el 78,7 % a 23° C. Las diferencias en el valor de semivida de la Talidomida en los estudios llevados a cabo en soluciones buffer de 0,05M y de 0,2M no fueron estadísticamente significativas ya que un 46,2 % del principio activo estuvo inalterado en solución buffer 0,2M a las 4 horas frente a 42,5 % inalterado en solución buffer a 0,05M.

Huupponen (1995) ha investigado la estabilidad de la Talidomida “ in vitro “ donde no hubo evidencia de que existiera degradación del principio activo en un periodo de tiempo superior a 1 hora. Este dato contrasta con el encontrado en solución buffer, en donde se aprecia una hidrólisis espontánea; pero por ser la Talidomida un agente no polar, se puede asumir que tiene un alto grado de unión a proteínas plasmáticas y tal unión a las proteínas pudiera protegerla de los fenómenos hidrolíticos. Si esto es así, la inestabilidad de la Talidomida en soluciones buffer es una cuestión con significado fisiológico.

5.2 DISPERSIONES SÓLIDAS

5.2.1 FUNDAMENTO TEÓRICO DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS. USOS Y APLICACIONES ACTUALES.

Las dispersiones sólidas se definen como sistemas al estado sólido obtenidos tras la interposición de un principio activo o más, en el seno de un portador inerte, preparados mediante el método de la fusión, disolución o fusión-disolución, con el objeto de modificar las características del principio activo (Chiou, 1971).

Pese a que las dispersiones sólidas presentan muchas ventajas, en la actualidad sólo se han encontrado dos principios activos que se comercialicen como dispersiones sólidas: Gris-PEG (Griseofulvina y polietilenglicol, comercializado por Wander) y Cesamet (nabilona y polivinilpirrolidona, comercializado por Lilly).

5.2.2 VENTAJAS DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS

Cuando un fármaco poco soluble en agua se administra por vía oral, la velocidad de absorción se encuentra controlada por su velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal, por lo que la utilización de los métodos farmacotécnicos de exaltación de la solubilidad, como es el caso de las dispersiones sólidas, mejora la biodisponibilidad de los medicamentos poco solubles (aumenta su absorción, al aumentar su solubilidad), y en algunos casos el empleo de este tipo de formulación galénica hace que se pueda disminuir la dosis terapéutica del principio activo.

Los vehículos de las dispersiones sólidas pueden tener propiedades específicas que dan nuevas ventajas a estas formulaciones, por ejemplo el polietilenglicol protege a ciertos productos de su descomposición por la saliva, permitiendo su administración por vía bucal; así ciertas dispersiones sólidas de algunos antiinflamatorios no esteroídicos, formulados con polietilenglicol y polivinilpirrolidona disminuyen los efectos ulcerogénicos de estos principios activos.

Utilizando vehículos de baja solubilidad se pueden obtener formulaciones de cesión sostenida. Las combinaciones entre polímeros solubles e insolubles se han utilizado también en las proporciones adecuadas para modular la liberación de ciertos principios activos de forma controlada.

Las dispersiones sólidas se pueden someter a tratamientos como el de la compresión lo que las hace más manejables, siempre que se seleccione el tamaño de partícula adecuado que no afecte a la estabilidad de la dispersión.

5.2.3 **CLASES DE DISPERSIONES SÓLIDAS EN FUNCIÓN DE SU ESTRUCTURA FÍSICA Y QUÍMICA**

Mezclas eutécticas simples: se obtienen por rápida solidificación de la mezcla de dos componentes al estado líquido con completa miscibilidad líquida y sin solución sólida. Termodinámicamente se considera a este sistema como una mezcla física íntima de dos compuestos cristalinos.

Soluciones sólidas: el soluto se encuentra disuelto en un solvente al estado sólido. Se llama también cristal mixto porque ambos componentes cristalizan en un sistema homogéneo monofásico. Las soluciones sólidas se pueden dividir en:

- *Soluciones sólidas continuas (isomorfas, completas o ilimitadas):* los componentes son solubles al estado sólido en todas las proporciones.
- *Soluciones sólidas discontinuas:* son solubles al estado sólido en determinadas proporciones. Se puede decir que casi todas las sustancias son solubles al estado sólido con otras sustancias, siempre que la proporción del principio activo sea lo suficientemente pequeño.
- *Soluciones sólidas sustitucional:* la molécula de soluto sustituye a una molécula de solvente, por lo tanto ambos tamaños de moléculas deben parecerse .

Precipitados amorfos en un vehículo cristalino: los polvos amorfos presentan una velocidad de disolución mayor debido a que su energía es menor. Posiblemente se formen con más facilidad mediante la técnica de enfriamiento rápido.

Formación de complejos o compuestos: no son dispersiones sólidas propiamente dichas pero se forman durante el proceso de producción.

Mecanismos misceláneos o de combinación: en algunas dispersiones sólidas se presentan una mezcla de características de los cuatro tipos descritos anteriormente.

5.2.4 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS:

Método de fusión: este método fué propuesto por primera vez por Sekiguchi en 1961, en su trabajo se mostraba la diferencia en la absorción en el hombre de dos tipos de mezclas de sulfatiazol: una mezcla eutéctica obtenida por fusión y una mezcla física.

Método de confusión: Se basa en el hecho de que un sistema binario posee un punto de fusión diferente y a la vez inferior al de sus componentes por separado. El punto de fusión de un sistema binario depende de su composición además de la naturaleza de sus componentes y de su concentración en la mezcla.

El primer paso para obtener la dispersión sólida es conseguir el mismo tamaño granulométrico en el principio activo y el transportador. A continuación, se obtiene la mezcla física de ambos componentes.

La dispersión sólida se prepara calentando directamente la mezcla física del fármaco y del transportador inerte hasta que se produce la fusión de ambos. El calentamiento se realiza por medio de una placa calefactora o bien por inmersión en un baño de aceite. Durante todo el proceso de calentamiento se mantiene una agitación constante, hasta la obtención de un líquido confundido homogéneo. Este confundido solidifica posteriormente por un enfriamiento a temperatura ambiente o por un enfriamiento rápido en un baño de hielo, sometida a una agitación constante. La mayoría de los confundidos, necesitan a continuación de un periodo de reposo de unos pocos días en un desecador con un agente deshidratante como el anhídrido fosfórico o el gel de sílice (Markovich, 1997) La masa sólida que se obtiene se recoge, pulveriza y tamiza .

Las ventajas que presenta este método son la simplicidad, la economía y la reproducibilidad de la fabricación.

Su principal inconveniente es que no se pueda utilizar en el caso de que el portador o el principio activo sean termosensibles. En ocasiones, la descomposición es dependiente de la composición del sistema y de la temperatura, por ello se procura realizar la fusión sólo a unos grados por encima de la temperatura del principio activo para evitar descomposiciones. También se puede disminuir la temperatura de fusión trabajando en recipientes cerrados al vacío (Vila Jato, 1989) o utilizar una corriente de nitrógeno para evitar la oxidación (Chiou, 1971).

Una situación que puede presentarse es la evaporación del principio activo o del transportador, si éstos son muy volátiles. Este problema se evita calentando la mezcla física en recipientes sellados.

El punto de fusión de la mezcla depende de su composición, por ello es importante la selección del transportador así como el porcentaje en peso del fármaco.

Las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso determinaran las características del producto final ya que la forma en la que se lleve a cabo la solidificación influye en el tamaño cristalino, así como en la velocidad de cristalización y en la dureza de la dispersión sólida obtenida (McGinity, 1983). Si se utiliza la atomización como proceso para conseguir la solidificación se encuentran ciertas ventajas ya que se evita la posterior pulverización y los cambios cristalinos que se obtienen son menores (Ford, 1986).

Método por fusión previa del vehículo: *se basa en la fusión de una cierta cantidad de vehículo y luego se añade el principio activo. La mezcla se calienta lo que sea preciso y se agita hasta que el principio activo esté disuelto, o en su defecto hasta que la dispersión tenga un aspecto homogéneo. A continuación se enfría bien por un enfriamiento lento a temperatura ambiente, o por una rápida inmersión en un baño de hielo. La mezcla sólida resultante se recoge, pulveriza y tamiza (Susuki, 1997).*

Las ventajas que presenta este método son las mismas que en el método de confusión. Además, la fusión previa del vehículo suele utilizarse cuando el punto de fusión del transportador es bajo, por lo que no suelen presentarse problemas de estabilidad química del producto debido a altas temperaturas, ni tampoco problemas de evaporación (Stauchansky, 1983).

El principal inconveniente de este método es que la dispersión del principio activo está limitada por su solubilidad.

Mediante la utilización de esta técnica se han obtenido dispersiones sólidas de principios activos líquidos (Chiou, 1971)

Método del solvente coprecipitado: *Este método se basa en la disolución del principio activo y del vehículo en un solvente común que posteriormente es eliminado por evaporación. Los solventes que generalmente se utilizan son el etanol, metanol y cloroformo (Torrado, 1996; Taylor, 1997).*

Los factores que afectan a la estructura de las dispersiones sólidas obtenidas por este método son:

- temperatura de evaporación del solvente (Salama, 1981)*
- duración del proceso (Chemtob, 1985)*

- proceso de desecación (según sea mediante aire frío, a 2° C o en presencia de anhídrido fosfórico). Según el proceso de desecación que se siga los polimorfos obtenidos no son los mismos (Graf, 1982 a,b) o incluso pueden producirse formas amorfas o cristalinas (Junginger, 1976).
- naturaleza del solvente (El Dalsh, 1982) la utilización de distintos solventes conduce a la obtención de diferentes polimorfos cuyas velocidades de disolución no son equivalentes.
- porcentaje del vehículo.

La principal ventaja es que no se produce descomposición térmica de las sustancias activas, ya que la evaporación del solvente se realiza a bajas temperaturas (Lefebre, 1985)

Las desventajas asociadas a este método son, el elevado coste de preparación debido a los grandes volúmenes de disolvente que hay que utilizar; el empleo de disolventes orgánicos con riesgo a que sean inflamables o tóxicos; la influencia del disolvente sobre la estabilidad del principio activo; la elección de un disolvente común volátil y la dificultad que presenta la obtención de cristales reproducibles.

Un elemento fundamental en este método es la elección de un disolvente común que disuelve el principio activo y el transportador. Esto puede resultar complicado, ya que el principio activo suele tener carácter hidrófobo y el portador hidrófilo y al contrario. Algunos de estos solventes pueden plastificar a los transportadores haciendo la eliminación bastante difícil.

Para conseguir la eliminación total del solvente, se han utilizado procesos como la liofilización o la atomización que permite dispersar el principio activo en el portador y obtener una dispersión sólida que no necesita ser pulverizada (Tokayama,1982;Corrigan, 1984).

Método mixto: *Este método consiste en la disolución de una cantidad adecuada de principio activo en el disolvente y posteriormente se incorpora esta solución directamente sobre el transportador fundido, sin eliminación posterior del solvente. La forma polimórfica obtenida del principio activo depende del solvente utilizado.*

Este método tiene las ventajas del método de fusión y el método de eliminación del solvente; desafortunadamente en la práctica sólo se puede aplicar cuando la dosis del fármaco es muy baja, por debajo de 50 mg (Chiou, 1971).

Método de trituración: Se trata de un método alternativo cuando no se quiere utilizar disolventes orgánicos. Para conseguir la interposición entre el principio activo y el transportador se utiliza un molino de rodillo, obteniéndose unos coprecipitados del principio activo en forma amorfa (Norzawa, 1985).

5.2.5 ESTABILIDAD DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS

Los principios activos asociados a vehículos pueden sufrir alteraciones físicas o químicas:

Estabilidad química: Las alteraciones químicas dan lugar a la degradación del principio activo. Cuando se produce una coloración diferente en la dispersión sólida refleja la existencia de una degradación química aunque no significa necesariamente que se haya producido una degradación de los principios activos sino que en ocasiones puede ser debida a la descomposición de los azúcares, del sorbitol o del ácido succínico.

Estabilidad física: Las alteraciones físicas originan transformaciones a estados polimórficos que presentan distintas características de disolución. Cuando se produce una degradación física en las dispersiones sólidas fácilmente puede producirse una evolución hacia la recristalización del principio activo o hacia un aumento del tamaño de las partículas. Dependiendo del tipo de dispersión sólida la inestabilidad física se manifiesta de una o de otra manera así en los casos de:

- *mezclas eutécticas:* las partículas tienden a aumentar de tamaño con reducción de la energía interfacial del sistema. Esta evolución normalmente se ve aumentada con la temperatura y el tiempo de almacenamiento.
- *soluciones sólidas:* precipita el principio activo a partir de soluciones saturadas. Cuando la solución sólida se ha obtenido por descenso brusco de la temperatura, se llega a una forma metaestable con exceso de principio activo que tiende a precipitar para disminuir la energía libre total del sistema. Los estados vítreos son formas metaestables que tienden a evolucionar a formas más estables lo que se puede producir a mayor o a menor velocidad.
- *formas metaestables o amorfas de dispersiones sólidas:* tienden a producir los mismos cambios que en el caso anterior, donde el principio activo se dispersa al estado amorfo. La recristalización puede detectarse mediante los estudios de difracción de rayos X. También existen casos de dispersiones sólidas con principio activo al estado amorfo que son estables.

5.2.6 MECANISMOS QUE EXPLICAN EL AUMENTO EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN POR FORMACION DE DISPERSIONES SOLIDAS

Reducción del tamaño de partícula: Originariamente el aumento en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas se atribuyó a la reducción del tamaño de partícula del principio activo. Sekiguchi y Obi en 1961 demostraron que sus dispersiones sólidas presentaban un aumento de velocidad de disolución por formación de un eutéctico. En los sistemas eutécticos la reducción del tamaño de partícula se debe a una cristalización simultánea del fármaco y el vehículo, en este caso el crecimiento simultáneo de los cristales se ve retardado por la lenta migración y la dificultad de la nucleación en un medio viscoso (Attia, 1982).

Disminución en la agregación y aglomeración: en ocasiones al micronizar un principio activo se obtiene una disminución en la velocidad de disolución del mismo en contra de lo esperado, debido a que aumenta su tendencia a agregarse. Este problema se evita con las dispersiones sólidas porque cada uno de los cristales del principio activo está recubierto por el transportador inerte.

Mejora de la humectabilidad de las partículas: el vehículo de las dispersiones sólidas puede disminuir la tensión superficial del medio de disolución permitiendo un aumento en la humectabilidad de las partículas. En los sistemas eutécticos cada cristal del fármaco está íntimamente rodeado por el vehículo hidrosoluble que se disuelve rápidamente al entrar en contacto con el agua, lo que permite una mejor humectación de las partículas del fármaco retrasando la aglomeración o agregación de las partículas.

Aumento de solubilidad del fármaco: Este incremento de la solubilidad de las partículas se debe principalmente: a la obtención de formas metaestables de mayor solubilidad y a un efecto solubilizante del vehículo sobre el fármaco que se hace máximo en la capa de difusión, puesto que en esta zona la concentración del vehículo es mucho mayor que en el resto del medio de disolución. Se ha visto que el aumento en la solubilidad no es un factor imprescindible para la mejora en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas. Así por ejemplo, fármacos como el Flurbiprofeno, ácido diclofenaco, Pindolol, Diltiazem y ácido mefenámico son muy poco solubles en agua y mejoran su solubilidad, su grado de disolución y su biodisponibilidad cuando se formulan como dispersiones sólidas con proteínas solubles en agua como es la albúmina de huevo, gelatina, y caseína de leche. (Inai, 1991).

Modificación en la naturaleza cristalina del fármaco: Durante el proceso de elaboración de las dispersiones sólidas el fármaco puede sufrir cambios en su estado inicial obteniéndose polimorfos, amorfos, solvatos e incluso complejos.

Si el fármaco en su nuevo estado cumple que presenta mayor solubilidad que en su estado anterior y que no revierte a la forma menos soluble al ponerse en contacto con el medio de disolución, podrá esperarse un aumento en la velocidad de disolución con respecto a la correspondiente mezcla física.

Durante el proceso de envejecimiento de las dispersiones sólidas, las formas cristalinas pueden evolucionar hacia otros estados cristalinos de menor o de mayor velocidad de disolución (Markovich, 1997) también se han descrito situaciones similares causadas por la simple pulverización del sólido.

Los distintos estados en los que se puede encontrar el principio activo después de un proceso de elaboración de las dispersiones sólidas son:

- *polimorfismo y estados amorfos: El estado amorfo es el más inestable termodinámicamente. Se genera por el enfriamiento súbito del fundido o por precipitación rápida de soluciones orgánicas. Generalmente el compuesto amorfo es más soluble que la misma especie química cristalizada, incluyendo cualquier polimorfo (Taylor, 1997) aunque también puede ser menos soluble (Badawi, 1980).*
- *solvatos: la recristalización de muchas sustancias a partir de una solución puede conducir a la formación de un compuesto sólido que contenga moléculas de disolvente como parte integrante de su estructura cristalina; son los denominados solvatos o hidratos, en el caso de ser agua el disolvente atrapado. Los solvatos pueden considerarse formas pseudopolimórficas ya que su solubilidad y velocidad pueden diferir considerablemente de las que presentan la forma no solvatada (Corrigan, 1984).*
- *complejos: pueden formarse en el seno de las dispersiones sólidas o en el medio de disolución tras la liberación del principio activo. Los complejos formados pueden tener mayor o menor solubilidad que el compuesto puro.*

Disminución de la energía de activación: *Algunas teorías explican el aumento en la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas por un descenso en la energía de activación de la disolución.*

Formación de coacervatos: *La formación de coacervatos en la superficie del coprecipitado y el solvente también puede explicar el aumento en la velocidad de disolución para algunos coprecipitados de bajo peso molecular (Badawi, 1980).*

En el caso de que el vehículo se disuelva llevando disperso el medicamento en el medio de disolución, la cesión del medicamento (C_m) es dependiente de la velocidad de disolución del vehículo (V_v) por la proporción de medicamento presente (concentración medicamento / concentración vehículo). Lo que concuerda con las experiencias de Simonelli (1969)

$$C_m = V_v * C_{\text{mto.}} / C_{\text{vehículo}}$$

5.2.7 FORMULACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS

Las dispersiones sólidas en muchas ocasiones se presentan como sólidos poco manejables. Por esta razón normalmente requieren una formulación posterior a su obtención bien como comprimidos o como cápsulas.

La granulación por vía húmeda no se puede utilizar puesto que las sustancias líquidas destruyen la dispersión, anulando sus propiedades. Las técnicas a las que normalmente se recurre son la compresión directa o la doble y la encapsulación.

5.2.8 VEHÍCULOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO PARA LA OBTENCIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS

Albúmina y crospovidona

5.2.9 ALBÚMINA

Se definen como albúminas, a un grupo de proteínas fácilmente cristalizables y solubles en agua en un rango de pH entre 4 y 8,5. Entre los distintos tipos de albúminas destacan dos clases: seroalbúminas y ovoalbúminas.

*Las **SEROALBUMINAS** constituyen el 60 % de las proteínas del plasma y tienen como misión regular la presión oncótica de la sangre, presentan una gran capacidad de unión y transporte de hormonas, grasas y fármacos.*

En los últimos años han aparecido numerosos trabajos en los que se utiliza la albúmina, como sistema de administración de fármacos; ya que, su unión a los fármacos condiciona la distribución de los mismos en el organismo, así como su duración de acción, por tanto, el empleo

de la albúmina presenta una serie de ventajas como mejorar la biodisponibilidad y reducir efectos secundarios de fármacos como la Indometacina, o los AINE que son muy poco solubles en agua y que además presenten el inconveniente de llevar una fuerte ulcerogenicidad (Tsuji, 1993).

También con el empleo de albúminas se puede modificar la disolución de los principios activos que estén unidos a ellas, así tenemos el caso de la Norfloxacin y Prednisolona que en forma de dispersiones sólidas con ovoalbúmina y sometidas a un proceso de liofilización dan lugar a una formulación que presenta un aumento en el grado de disolución (Tsuji, 1996).

La seroalbúmina obtenida a partir de donantes o por biotecnología que se utiliza por vía parenteral; pero si la administración es por vía oral, se puede utilizar la ovoalbúmina que es mucho más económica; así para la formulación de nuestro principio activo, se escogerá la ovoalbúmina.

Otra de las ventajas del empleo de la albúmina, según recientes investigaciones, es la posibilidad de retraso de la racemización de la Talidomida (Knoche, 1994) lo que significa un avance en este tipo de problema que presenta nuestro fármaco.

Pero el principal problema que presenta nuestro principio activo es su extremada sensibilidad a los procesos hidrolíticos, lo que conduce a una racemización de la molécula en un corto periodo de tiempo, determinándose un valor de semivida de racemización para la Talidomida en solución buffer fosfato (0,067 M pH 7,4) a 37° C de 2,7 horas. Así los valores de las semividas de racemización “ in vitro “ para los enantiómeros de Talidomida son casi idénticos siendo de 288,8 minutos para la (+) Talidomida y de 260,5 minutos para la (-) Talidomida.

Los estudios “ in vivo ” en plasma humano y animal (conejos) presentan un significativo descenso en el valor de semivida de racemización de la Talidomida, siendo para el plasma humano de 11,5 minutos para (+) Talidomida y de 8,3 minutos para (-) Talidomida y para el plasma de conejo, de 9,3 minutos para (+) Talidomida y de 6,5 minutos para (-) Talidomida. En general, parece que no hay grandes diferencias interespecies; pero lo que sí parece claro es, que la (-) Talidomida se racemiza más rápido que la (+) Talidomida.

Investigaciones llevadas a cabo en soluciones buffer fosfato en presencia de concentraciones fisiológicas de seroalbúmina sin ácidos grasos, indican que los valores de semivida de racemización son, de 18,5 minutos para la (+) Talidomida y de 9,5 minutos para la (-) Talidomida, valores que son muy parecidos a los obtenidos en plasma humano.

El grado de racemización ha sido estudiado en soluciones de fracción V de albúmina que contiene un alto contenido en ácidos grasos, presentando un valor de semivida de racemización de 68,8 minutos para la (+) Talidomida y de 54,4 minutos para la (-) Talidomida. En consecuencia el alto contenido de ácidos grasos en la albúmina, parece disminuir la interacción de la Talidomida con la albúmina lo que hace que el proceso de racemización para los dos enantiómeros sea mucho más lento.

Por otro lado, cuando se incubaron enantiómeros de Talidomida en microsomas hepáticos de ratas, la racemización fué muy lenta, lo que hace suponer que, las enzimas microsomales hepáticas no tienen influencia en la racemización de los enantiómeros de Talidomida como la albúmina sérica.

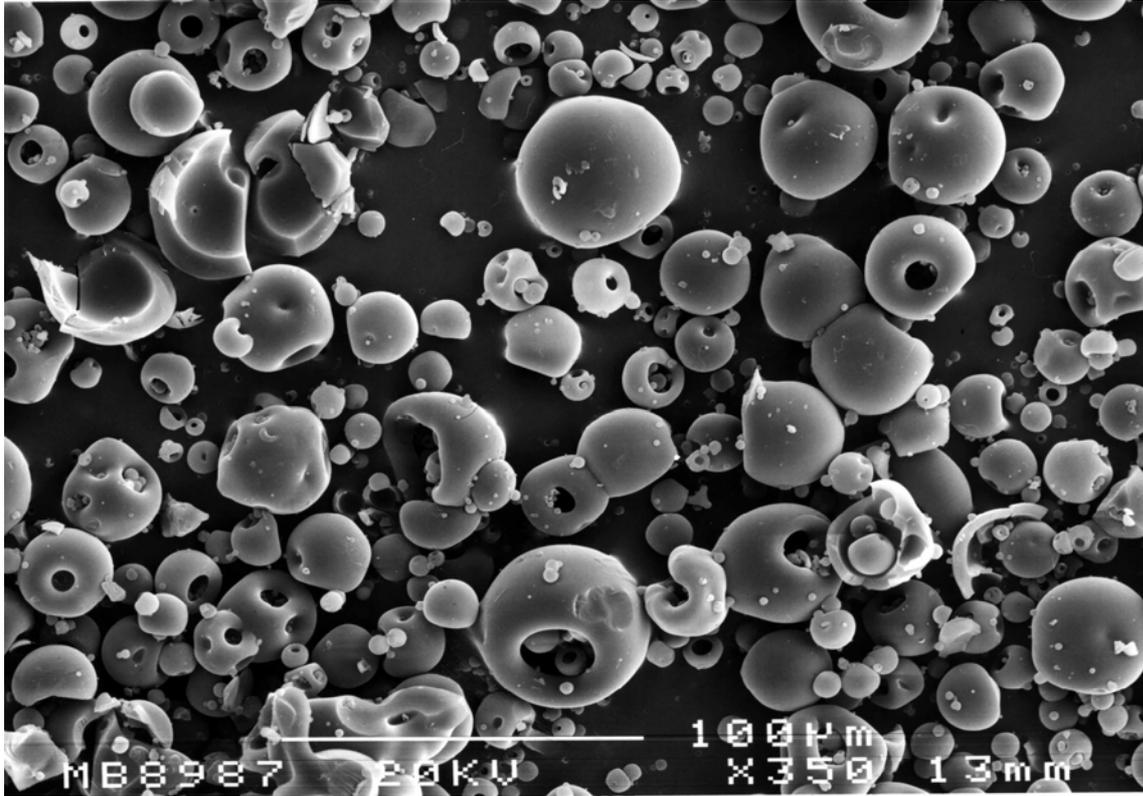
*La albúmina que se utiliza para formar dispersiones sólidas con Talidomida, con el objetivo de modificar la velocidad de liberación del fármaco en forma sólida, es la **ALBÚMINA DE HUEVO DE POLLO GRADO V** que se caracteriza por ser una glicoproteína fosforilada. La porción péptida de la molécula tiene un peso molecular de 44.287. Las porciones carbohidrato y fosfato aportan un peso adicional de 1428 y de 160 g/mol respectivamente cuyas características son:*

<i>N° CAS:</i>	<i>9006-59-1</i>
<i>Sinónimo:</i>	<i>ovoalbúmina</i>
<i>Apariencia:</i>	<i>polvo de color blanco a amarillento</i>
<i>E 1 % (280 nm):</i>	<i>6,9 a 7,6</i>
<i>EM (280 nm):</i>	<i>31.000</i>
<i>Punto isoeléctrico:</i>	<i>4,9 para la albúmina original de huevo de pollo</i>
<i>Pureza:</i>	<i>mínima 98 %</i>
<i>Solubilidad:</i>	<i>40 mg/ml en agua originan una solución clara o bien amarillenta</i>

Las condiciones de almacenamiento recomendadas para esta albúmina como producto en polvo es en condiciones secas y a la temperatura de 2 a 8° C para poder asegurar una mínima caducidad de 2 a 3 años.

Mediante técnica de calor diferencial se indica que la albúmina de huevo de pollo se desnaturaliza a la temperatura de 84° C.

En la microfotografía 1 obtenida por microscopía electrónica, se observa la morfología de la albúmina aproximada 350 aumentos.



microfotografía 1 : albúmina de huevo de pollo (x 350 aumentos)

5.2.10 CROSPVIDONA

Su denominación química es 1 etenil 2 pirrolidona homopolímero (9003-39-8) con fórmula empírica $(C_6 H_9NO)_n$ y con un peso molecular superior a 1000.000. Se caracteriza por ser un polvo higroscópico, de color blanco e inodoro que se emplea como excipiente farmacéutico en proporciones de 2 a 5% para la preparación de comprimidos por compresión directa .

Las características físicas para la crospovidona (Polyplasdone XL) son:

- *acidez / alcalinidad: pH 5,0 – 8,0*
- *densidad: 0,213 g/ cm³*
- *distribución de partícula: inferior a 400 μ m*
- *contenido en sodio: 209 ppm*
- *solubilidad: prácticamente insoluble en agua*
- *área superficie específica: 0,77 – 0,82 m² / g*

La crospovidona es una sustancia estable e higroscópica que debe ser conservada en lugar seco y fresco. Es compatible con la mayoría de las sustancias farmacéuticas orgánicas e inorgánicas por lo que se utiliza en formulaciones orales ya que no es tóxica . (Handbook of excipients).

5.3 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS (Frömming)

Las ciclodextrinas son moléculas con la capacidad de formar complejos de inclusión con dos especies químicas diferentes denominadas “huésped” y “hospedador”. La molécula “ huésped” queda encerrada en la cavidad formada por un armazón o matriz del “ hospedador”. La asociación “hospedador/huésped“ no se estabiliza por enlaces covalentes o iónicos sino que pone en juego enlaces de tipo puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals.

Las ciclodextrinas son ciclooligosacáridos no reductores, formados por polímeros de α -D glucopiranososa unidas por enlaces entre los carbonos C1 y C4. Las uniones de esta glucopiranososa se disponen de tal forma que, forman una cavidad hidrofóbica que acepta moléculas apolares como la Talidomida. La zona hidrofílica de la superficie de la ciclodextrina confiere una solubilidad acuosa a las moléculas que se unen a ella para formar un complejo de inclusión.

Las principales ventajas del uso de ciclodextrinas en la Industria Farmacéutica son la modificación de las características farmacocinéticas y biofarmacéuticas de los principios activos cuando se formulan con éstos en forma de complejos. La primera publicación que se conoce demostrando estos efectos de las ciclodextrinas tanto en ensayos “in vitro” como “in vivo” es de Fromming (1972).

La producción de ciclodextrinas consiste en dos fases. Primero se produce la enzima ciclodextrin-transglicosilasa por “Bacillus macerans” y segundo se trata el almidón parcialmente hidrolizado con esta enzima, obteniéndose una mezcla de α , β y γ CDs junto con una serie de dextrinas acíclicas. Tanto las ciclodextrinas cíclicas como las acíclicas, se separan por diferentes técnicas entre las que destacan, la adición de solventes orgánicos apropiados para el aislamiento de cada uno de las ciclodextrinas y de éstas la β CD es la preferida tanto para alimentación como para fines farmacéuticos ya que no contiene cantidades detectables de solvente orgánico.

La técnica analítica de fotometría para las ciclodextrinas es rápida pero no es específica; mientras que la cromatografía en capa fina es muy útil para análisis cualitativo y semicuantitativo siendo la técnica de HPLC la más apropiada para la determinación cuantitativa de las ciclodextrinas .

El hecho de que se utilicen en la Industria Alimenticia y en la Farmacéutica exige unos altos requerimientos de calidad así el contenido en agua se determina por Karl-Fischer o por cromatografía líquida gaseosa; los residuos orgánicos se determinan por GLC o HPLC y deben ser inferior a 1 μ g/ g; las sustancias reductoras no deben superar el 0,2 %; el contenido en iones metálicos se determina por las cenizas y deben estar en cantidad inferior a 1 μ g/ g. El 1 % de la solución acuosa debe ser limpia, incolora, con valor

de pH neutro. La cantidad de gérmenes debe ser inferior a 1000 por gramo, las esporas fúngicas menores a 100 por gramo y no deben existir microorganismos patógenos.

Las ciclodextrinas contienen 18 (α CD); 21 (β CD) ó 24 (γ CD) grupos hidroxilo que pueden ser modificados químicamente siendo las más empleadas en Farmacia los derivados de β CD.

La β CD presenta una solubilidad acuosa baja y además es la más rígida de todas las ciclodextrinas lo que, hace que cristalice antes que α o γ CD luego los derivados de β CD se destinan habitualmente a solucionar el problema de la solubilidad y el de la cristalización.

El primer derivado de β CD para usos farmacéuticos es la heptakis (2,6 diorto- metil) β CD = DIMEB pero esta CD presenta alta actividad superficial y alta afinidad por el colesterol incluso a concentraciones de 1 mg/ ml presenta efecto hemolítico para los eritrocitos humanos, además, se le une el hecho de que su preparación es complicada y costosa y en la mayoría de los casos es sustituida efectivamente por la metilada β ciclodextrina : RAMEB.

Un segundo grupo de derivados de β CD está representado por los dihidroxi propril derivados, que son excelentes solubilizadores de fármacos ácidos o básicos, no presentan actividad superficial y efecto hemolítico. Estos derivados son utilizados en Industrias Fotoquímicas y en la Industria Farmacéutica para preparación de formulaciones orales o externas.

Un tercer grupo está representado por derivados hidroxialkylados, como los hidroxietil β CDs; 2 HPBCD y 3HPBCD que no presentan actividad superficial ni efecto hemolítico y de todos estos derivados al menos el 2 HPBCD es muy bien tolerado parenteralmente incluso en altas dosis. La HPBCD es un polvo amorfo que respecto a su solubilidad parece que presenta mayor solubilidad que la ciclodextrina de origen natural β CD ya que, al ser tan soluble en agua la HPBCD se pueden preparar soluciones w/w por encima del 75 % e incluso en etanol son solubles soluciones de HPBCD del orden de 50-60 % w/w. Otra ventaja que presenta la HPBCD es su heterogenicidad y su falta de cristalinidad ya que no hay problemas de precipitación de las soluciones cuando se las somete a técnicas como la esterilización. La HPBCD tendrá que ser elegido el primero de la cadena de derivados de β CDs más apropiado por sus cualidades para el uso humano.

Un cuarto y un quinto grupo están representado por succinil dimetil β CD o malenil dimetil β CD que son derivados cristalinos.

Un sexto grupo es el de los éteres derivados amorfos y no cristalizables.

De todos estos derivados se puede concluir que un incremento en los sustituyentes voluminosos en el anillo de ciclodextrina origina un descenso en la accesibilidad a la cavidad de la ciclodextrina y una ligera sustitución es más ventajosa en este sentido. Por otro lado, un aumento en el grado de sustitución aumenta la solubilidad del complejo, además la presencia de grupos iónicos reduce el efecto hemolítico sobre los eritrocitos y también al establecerse interacciones iónicas con las moléculas iónicas del huésped se aumenta tanto la estabilidad como la solubilidad del complejo (CD : huésped).

Las ciclodextrinas se comportan, por tanto, como verdaderos transportadores de sustancias hidrofóbicas en solución, manteniéndolas en estado disuelto y transportándolas a las membranas celulares lipofílicas y como éstas tienen mayor afinidad hacia la sustancia huésped, las ciclodextrinas quedan en la fase acuosa, que se transporta hacia el colon, donde se metaboliza hidrolizándose intensivamente por acción de la microflora, siendo los últimos metabolitos a excretar el CO₂ y el agua y sólo una cantidad insignificante de la CD de la administración oral es absorbido por el tracto intestinal en forma inalterada.

Aunque la principal ventaja del uso de las ciclodextrinas es la modificación de las características farmacocinéticas y biofarmacéuticas que confieren a las sustancias acomplejadas, hay otras serie de ventajas que derivan de su uso como pueden ser una reducción de los efectos adversos así la indometacina, flurbiprofeno, ácido bifenilacetico y naproxeno reducen su irritación gastrointestinal al formularse con ciclodextrinas . Además, las ciclodextrinas pueden proteger a los eritrocitos de la hemólisis inducida por una variedad de principios activos así de este beneficio se aprovecha la imiprimania cuando es formulada con ciclodextrinas. Respecto a los sabores también se ha visto que las ciclodextrinas pueden mejorar sabores desagradables de sustancias acomplejadas e incluso también pueden eliminar ciertos olores desagradables como es el caso de la femoxetina o clobifrato que enmascaran sus sabores con las ciclodextrinas.

Pero aunque se han descritos bastantes ventajas, el uso farmacéutico de las ciclodextrinas viene limitado por una serie de restricciones relativas al tamaño de la cavidad de las mismas que hace que sustancias de gran tamaño, o bien moléculas orgánicas hidrofílicas como son las proteínas , o moléculas altamente hidratadas como son los azúcares o bien sustancias ionizables, no pueden ser acomplejadas ya que, sólo pueden formar complejo con las ciclodextrinas, moléculas apolares con tamaño adecuado a la cavidad de la ciclodextrina.

Para el uso farmacéutico, la constante de estabilidad de los complejos debe estar comprendida entre 200 a 10.000 ya que, valores mayores de la constante de estabilidad de complejo, conducen a una liberación incompleta del principio activo, lo que nos llevaría a una dosificación errónea. Otra limitación es la estequiometría de los complejos ya que, relaciones CD :PA del orden 1:1; 2:1 o 3:2 son las más ventajosas.

Por otra parte, hay una serie de restricciones que son las relativas a los posibles efectos catalíticos, que inciden en la degradación del principio activo cuando se formulan soluciones con ciclodextrinas y otra

desventaja es la interacción de las mismas con los lípidos humanos y el posible riesgo de precipitación como ocurre con el colesterol/ β CD en administración iv en animales.

Respecto a la toxicología de las ciclodextrinas, la toxicidad oral de β CD es de LD50 mayor de 12,5 g/Kg. (ratón); de 18,8 g/Kg. (ratas) y mayor de 5 g/Kg. (perros). Para γ CD la LD50 es mayor de 16 g/Kg. (ratón) y mayor de 8 g/Kg. (ratas). La toxicidad parenteral para β CD en vía iv es de LD50 de 788 mg/Kg. (ratas) con síntomas de nefrotoxicidad, siendo la γ CD la más apropiada para vía iv, debido a su alta solubilidad y su rápida degradación enzimática con valor de LD50 mayor de 4000 mg/Kg. (ratón) y mayor de 2400 mg/Kg. (ratas). La toxicidad subcutánea para γ CD es de LD50 mayor de 4000 mg/kg. (ratón) y mayor de 2400 mg/Kg. (ratas). La toxicidad intraperitoneal para β CD es de LD50 de 373 mg/Kg. (ratas macho); 356 mg/kg. (ratas hembra); 372 mg/Kg. (ratón macho); 331 mg/Kg. (ratón hembra). La BCD no presenta ni efectos mutagénicos ni teratogénicos en conejos así como la α CD y γ CD tampoco presentan embriotoxicidad ni teratogenicidad en ratas.

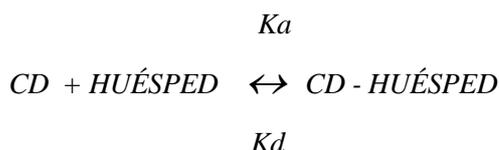
La incorporación de una sustancia o huésped a una ciclodextrina forma el denominado complejo de inclusión, aunque existen otras denominaciones como aducto, clatrato, compuesto molecular, criptato o complejo; pero teniendo en cuenta que no se establecen uniones covalentes entre la sustancia y la ciclodextrina y, que la unión está determinada por el equilibrio de asociación – disociación del huésped con la ciclodextrina, el término de complejo de inclusión parece ser el más apropiado.

Las ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con sustancias que presenten un tamaño compatible con la dimensión de su cavidad interna; así es que los factores geométricos influyen más que los químicos en la determinación del tipo de huésped que pueden albergar, así las moléculas incluidas se orientan de forma que sus zonas hidrofóbicas se unan lo máximo a la cavidad apolar y sus zonas hidrofílicas queden lo más unida a la zona hidrofílica externa de las ciclodextrinas, por tanto, sólo sustancias que sean menos polares que el agua podrán acomplejarse con las ciclodextrinas y la estabilidad del complejo de inclusión será proporcional al carácter hidrofóbico del huésped.

El carácter hidrofílico en las moléculas de ciclodextrinas y apolar en la zona interna se pone de manifiesto con los estudios de RMN y de difracción de rayos X donde se muestra que, las moléculas de glucosa en las ciclodextrinas se configuran en forma de silla y su disposición cíclica origina una estructura de forma tórica.

5.3.1 FORMULACIONES LÍQUIDAS DE COMPLEJOS DE CDs

La formación de un complejo de inclusión con las ciclodextrinas determina un descenso de entalpía y un incremento de entropía del sistema, por reducción de la energía de éste; lo que ocasiona un aumento de la estabilidad del complejo y viene regulado por el equilibrio entre la asociación y disociación de la molécula huésped y ciclodextrina expresándose para complejo de tipo 1:1 de forma:



$$K = K_d / K_a$$

$$K_a = [CD-H] / [CD] [H] \text{ expresada en } M^{-1}$$

$$K_d = [CD] [H] / [CD-H] \text{ expresada en } M$$

Para otros porcentajes de complejos habrá que tener en cuenta la relación estequiométrica entre el huésped y la ciclodextrina.

El valor de K , depende mucho del valor del pH para aquellos huéspedes ionizables; ya que, para aquellas sustancias con carácter ácido, acomplejarán mejor en medio alcalino y viceversa mientras que, si el huésped presenta carácter neutro no hay influencia del pH en el valor de la constante. Además, la K depende de la temperatura de forma que aumentos de ésta, producen un descenso del valor de la constante, con tendencia a la disociación. Por tanto, el estado de equilibrio de un complejo determinará su estabilidad y su solubilidad, así un complejo muy estable debe de ser muy soluble y difícil de obtener en forma cristalina por el contrario, un complejo con baja estabilidad deberá tener baja solubilidad y podrá aislarse en forma cristalina.

En fase líquida, los complejos estables con ciclodextrinas presentan una protección frente a alteraciones químicas ya que la cantidad de sustancia libre sin acomplejar es muy pequeña, además, las ciclodextrinas presentan un interesante efecto catalítico para la nitrosación de las aminas de la sustancia huésped y esto es importante por el efecto carcinogénico de los productos de reacción de las nitrosaminas. Este efecto catalítico también se observa con la preparación de complejos de inclusión sólidos.

Por otro lado la complejación con ciclodextrinas en fase líquida puede conferir a la solución fotoestabilidad y en este sentido las ciclodextrinas alquiladas parecen ser más efectivas que las ciclodextrinas no sustituidas.

Además, la constante de estabilidad del complejo influye directamente en la farmacocinética del principio activo acomplejado; ya que, si es un valor de constante bajo resulta en un rápido incremento en sangre y un alto valor del pico máximo y al contrario al aumentar la estabilidad de la constante, la disociación se hace más lenta y hay menor concentración de fármaco libre en fluidos gastrointestinales. Por ello, sustancias muy poco soluble en agua presentan tras la complejación con ciclodextrinas, una mejora de sus condiciones farmacocinéticas al aumentar su solubilidad y su grado de disolución.

La preparación de formulaciones líquidas orales con complejos de ciclodextrinas está limitado, debido a problemas en dosificación y suficiente estabilidad; pero su empleo mejoraría la solubilidad del fármaco en solución, aumentaría la estabilidad química y física de la formulación, enmascararía sabores y olores desagradables y minimizaría efectos adversos. La incorporación de ciclodextrinas a soluciones, suspensiones y emulsiones provoca:

- soluciones: las ciclodextrinas mejoran la solubilidad de fármacos muy poco soluble en agua; pero se corre el riesgo de que las ciclodextrinas disueltas sirvan de nutrientes a los microorganismos como le pasa a la indometacina / HPBCD en solución que sufre cristalización, debido a una descomposición de la ciclodextrina por contaminación microbiana.
- suspensiones: con las ciclodextrinas no hay crecimiento cristalino e incluso puede proteger al principio activo de degradación, como es el caso de la suspensión de metronidazol/ β CD, que al cabo de 6 meses a 8° C no presenta crecimiento cristalino y el metronidazol está protegido fotoquímicamente.
- emulsiones: las ciclodextrinas tienen poco uso, tal vez en la Industria Alimentaria y en Cosmética donde pueden servir en la preparación de emulsiones agua/aceite pero los liposomas no son compatibles con las ciclodextrinas, ya que éstas forman complejos resultando en una lisis de las membranas liposomiales.

La preparación de formulaciones líquidas parenterales con ciclodextrinas puede modificar la estabilidad y solubilidad del fármaco, como es el caso de la prostaglandina E1/ α CD o bien puede cambiar la farmacocinética del principio activo, como le ocurre a la dexametasona /HPBCD que sufre notables mejorías en su biodisponibilidad o también las ciclodextrinas pueden llegar a reducir los efectos irritativos locales por ejemplo la tiamucina/ γ CD (1:3) no tienen efectos irritantes en la piel de los conejos. También se pueden reducir los efectos hemolíticos del fármaco como le pasa a la carbamacepina/HPBCD aunque por otra parte, también se pueden presentar problemas de interacciones con otros ingredientes de la formulación como le ocurre a los ésteres de 1,4 dihidropiridina acomplejada con ciclodextrinas, que conduce a una variedad cuantitativa del éster solubilizado por problemas de interacciones internas en la formulación.

5.3.2 FORMULACIONES SÓLIDAS DE COMPLEJOS DE CDS

La estructura de los complejos con ciclodextrinas en fase líquida no es la misma que para la fase sólida ya que, en la primera las moléculas del huésped están únicamente incluidas en la cavidad de la ciclodextrina y en la segunda fase no solo están las moléculas del huésped en la cavidad de la ciclodextrina, sino que también están entre las moléculas de ciclodextrinas, además algunas de las moléculas de ciclodextrinas incluyen moléculas de agua, consecuentemente los compuestos sólidos cristalinos o amorfos casi nunca responden a una relación estequiométrica.

Los complejos de inclusión con ciclodextrinas en fase sólida, confieren estabilidad química al fármaco acomplejado y un aumento de la estabilidad física.

La mayoría de los complejos de inclusión con ciclodextrinas en fase sólida, preparados por liofilización son amorfos y se evitará la transición al estado cristalino por exclusión de la humedad atmosférica.

La incorporación de ciclodextrinas para la formación de complejos en fase sólida, puede provocar una estabilización química o física del principio activo como es el caso de nocloprost/ β CD este potente derivado de prostaglandina antiulceroso presenta mejoras en su estabilidad térmica. También se puede mejorar el grado de disolución y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua, como le ocurre a la biodisponibilidad de la prednisolona en complejo 1:2 con la β CD en humanos. Las ciclodextrinas pueden suprimir la volatilidad de fármacos con alta presión de vapor, así la nitroglicerina con la β CD o bien pueden transformar fármacos líquidos en sólidos como es el caso de las soluciones saturadas de esteroides en soluciones acuosas de HPBCD tras la liofilización dan un polvo con largo tiempo de caducidad. Por otro lado la incorporación de ciclodextrinas puede

eliminar incompatibilidades entre el principio activo y los demás constituyentes de la formulación como le pasa a la furosemida que se puede formular con la β CD y con celulosa microcristalina sin problemas de incompatibilidades y por último las ciclodextrinas pueden mejorar los efectos adversos, como es el caso de la testosterona en complejos liofilizados con HPBCD en comprimidos por compresión directa alcanza el C máx mucho antes que el principio activo sin ciclodextrina y con menor dosis, luego esto evita los efectos secundarios derivados de administrar grandes dosis de medicamento.

5.3.3 FORMULACIONES DÉRMICAS CON COMPLEJOS DE CDS

La incorporación de ciclodextrinas en las formulaciones dérmicas puede mejorar la biodisponibilidad tópica al mejorar la liberación del principio activo del vehículo y aumentar la concentración de fármaco libre disuelto. Así es el caso de la dexametasona con complejos de β y γ CD. También se puede aumentar el efecto terapéutico, como le ocurre al profármaco del ácido 4 bifenil acético que mejora su efecto antiinflamatorio con las CDs. Por otra parte, el uso de CDs puede evitar incompatibilidades del fármaco con otros constituyentes de la formulación. Pero no todo son ventajas ya que, pueden aumentar el grado de consistencia o viscosidad del preparado dérmico por incorporar altas cantidades de ciclodextrinas lo que disminuiría el grado de difusión del fármaco disuelto. Además, si la constante de asociación es muy alta hay una disminución del fármaco libre luego, habrá menor absorción, este es el caso de la prednisolona con complejos de CDs y también pueden darse casos de competencia del principio activo y del resto de los constituyentes de la formulación por ocupar la cavidad de las CDs y por último también pueden darse irritaciones locales como consecuencia de las propiedades superficiales que presentan las CDs en especial las metiladas.

5.3.4 FORMULACIONES RECTALES Y VAGINALES CON COMPLEJOS DE CDS

La incorporación de ciclodextrinas a la preparación de formulaciones rectales y vaginales puede modificar las propiedades físicas de los supositorios, como es el caso del profármaco acetato etil 4 bifenil que con β CD aumenta su viscosidad y disminuye su solubilidad. También puede aumentarse la estabilidad del fármaco con inhibición del crecimiento cristalino, así el clorbutanol mejora su estabilidad con β CD. Las CDs también pueden aumentar la liberación y absorción del principio activo; así un aumento en la biodisponibilidad del fármaco permitirá una reducción de la dosis y por ello los efectos locales pueden aliviarse. Por otro lado se pueden eliminar incompatibilidades entre el principio activo y los constituyentes de los supositorios o bien modificar la permeabilidad de la membrana rectal; pero como desventaja se da la competición entre el fármaco incluido y otros constituyentes de la formulación por la cavidad de la ciclodextrina.

5.3.5 FORMULACIONES OFTÁLMICAS Y NASALES CON COMPLEJOS DE CDS

La incorporación de ciclodextrinas para la formulación de preparaciones oftálmicas puede mejorar la solubilidad, como es el caso del clobetasona-17-butirato con β CD o bien puede mejorarse la estabilidad y aliviarse irritaciones locales como le ocurre al flurbiprofeno con β y γ CD. También se puede mejorar la penetración y la biodisponibilidad en la córnea, como le pasa a la ciclosporina: Como desventaja se puede dar un descenso en la biodisponibilidad si la constante de estabilidad es muy alta o bien puede darse reacciones de competencia entre los constituyentes de la formulación y disminuir la estabilidad.

La incorporación de ciclodextrinas para la formulación de preparaciones nasales puede mejorar la solubilidad del principio activo; así la hidroxidodecadinil ciclohexadiendiona con la α CD. También se puede mejorar la estabilidad como le ocurre a la benzopiranopiridina con β CD. También se pueden aliviar los efectos adversos en la membrana mucosa y aumentar el grado de penetración a través de la mucosa nasal con aumento de la biodisponibilidad como le pasa a la buroselina .

5.3.6 OTRAS FORMULACIONES CON COMPLEJOS DE CDS

La incorporación de ciclodextrinas a fármacos en aerosoles puede resultar beneficiosa, como es el caso de la dexametasona con la HPBCD que resulta tener unas excelentes calidades.

Para las microcápsulas se obtiene una estabilidad frente a procesos oxidativos y degradativos; ya que, los polímeros de las CDs no pueden penetrar la membrana de las microcápsulas y sólo lo puede hacer el principio activo, de forma que se consigue una liberación sostenida del medicamento, este es el caso de la penicilina con la CDs en microencapsulación.

Para los parches, se obtiene una liberación constante del principio activo y además se puede evitar el efecto primer paso como es el caso de la nitroglicerina.

5.3.7 FORMULACIONES DE LIBERACIÓN SOSTENIDA CON COMPLEJOS DE CDS

La incorporación de ciclodextrinas a formulaciones de liberación sostenida de medicamento, puede evitar el pico de la concentración máxima y esto se puede lograr con derivados de CDs muy poco solubles, con altos valores de constante de estabilidad del complejo de forma que exista poca cantidad de fármaco libre como le ocurre al carboximetil etil con β CD , o bien que la ciclodextrina soluble esté en exceso así el equilibrio de disociación se desplaza a la formación de complejo. Ejemplos de liberación sostenida con CDs son el diltiazem con la β CD y la prostaglandina con ciclodextrinas.

5.3.8 TIPOS DE CDS EMPLEADAS EN ESTA MEMORIA:

a. CAVITRON 8205 (HPBCD 410-901)

Es una ciclodextrina de aspecto pulverulento, blanco, inodoro. Sintetizada a partir de Cavitron 82000 β CD por sustitución de los grupos hidroxil de la ciclodextrina por grupos hidroxipropil.

PM:	1292 – 1309 g/mol
Sustancia seca:	95 %
Grado de sustitución:	6,5
Cenizas:	0,5 %
Propilenglicol	1,5 %
PH (1 % sol.):	7,5
Solubilidad	> 50 % (agua, 25° C)

Condiciones de conservación en lugar fresco, seco y apartado de materiales químicos y con olor, asegurándose de una buena ventilación ya que es un polvo inflamable y explosivo.

b. CAVITRON 84000 (γ CD 410-110)

Es una ciclodextrina de aspecto pulverulento, de color blanco, inodoro producida por la acción enzimática del almidón.

<i>PM:</i>	<i>1297 g/mol</i>
<i>Sustancia seca:</i>	<i>86 %</i>
<i>γ ciclodextrina:</i>	<i>98 %</i>
<i>Rotación óptica:</i>	<i>176,5 grados</i>
<i>PH (1 % sol):</i>	<i>7,5</i>
<i>Solubilidad</i>	<i>25,6 g/100 ml(agua, 25° C)</i>

Condiciones de almacenamiento en lugar fresco, seco, apartado de reactivos químicos puesto que es una sustancia inflamable y explosiva.

c. CY 2004 – 1 (METOXI CD)

Es una ciclodextrina de aspecto pulverulento, de color blanco, inodora

<i>PM:</i>	<i>1303- 1317 g/ mol</i>
<i>Solubilidad :</i>	<i>>33 % agua, 25° C y también es soluble en agua caliente.</i>

Condiciones de almacenamiento en lugar fresco, seco , apartado de reactivos químicos puesto que es una sustancia inflamable y explosiva.

6

MATERIAL

6.1 REACTIVOS

- Acetonitrilo HPLC (Scan-HPLC)
- Acido bórico (Panreac PA)
- Acido cítrico (Panreac PA-ACS-ISO)
- Acido clorhídrico 35% (Panreac, PRS)
- Agua desionizada, calidad farmacéutica
- Anhídrido acético (Panreac PA)
- Anhídrido ftálico (Panreac,PRS)
- Avicel ® PH 101,(FMC, calidad farmacéutica)
- Biftalato potásico (Panreac PRS)
- Carbonato amónico(Panreac PRS)
- Citrato sódico (Panreac PRS)
- Cloruro potásico (Panreac PA)
- Crospovidona Polyplasdone ®XL (Isp Technologies, INC, calidad farmacéutica)
- Dimetil sulfóxido (Panreac PA-ACS)
- Encompress (Juliá-Parrera)
- Eter dietílico (Merck Extrapuro)
- Fosfato potásico monobásico (Panreac PA-ACS-ISO)
- Hidróxido Sódico (Panreac PRS)
- HPBCD (Cavitron 82005) (Cerester Ibérica)
- L-acido glutámico (Panreac, PRS)
- Lauril sulfato sódico (Panreac, PRS)
- Metoxi CD (Cavitron)(Cerester Ibérica)
- Nitrógeno líquido
- Ortofosfato hidrógeno disódico (Panreac PRS)
- Ovoalbúmina grado V (Sigma Prod.Nº A5253)
- Piridina (Panreaz PRS)
- Reactivo de Karl-Fischer (Panreac, RE)
- γ CD (Cavitron 84000) (Cerester Ibérica)

Soluciones amortiguadoras del pH: (pag 2049, USP XXIII)

- **Solución tampón pH 2,4:** mezclar 50 ml de biftalato potásico 0,2 M con 35-42 ml de ácido clorhídrico 0,2 M para ajustar el pH enrasando con agua en matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón pH 3,4:** mezclar 50 ml de biftalato potásico 0,2 M con 6,3 – 10,4 ml de ácido clorhídrico 0,2 M para ajustar el pH enrasando con agua en matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón pH 4,4:** mezclar 50 ml de biftalato potásico 0,2 M con 6,6 – 11,1 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar el pH y enrasar con agua a matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón pH 5,4:** mezclar 50 ml de biftalato potásico 0,2 M con 34,1- 38,8 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar el pH y enrasar con agua a matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón pH 6,4:** mezclar 50 ml de fosfato potásico monobásico con 11,6 – 16,4 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar el pH y enrasar a matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón pH 7,4:** mezclar 50 ml de fosfato potásico monobásico 0,2 M con 39,1 – 42,4 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar el pH y enrasar con agua a matraz volumétrico de 200 ml.
- **Solución tampón pH 8,4:** mezclar 50 ml de ácido bórico 0,2 M con 8,6 – 11,8 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar pH y enrasar con agua a matraz volumétrico de 200 ml
- **Solución tampón ftalato ácido de potasio pH 5,2:** disolver 1,02 gramos de ftalato ácido de potasio en 30 ml de hidróxido sódico 0,1 M y completar hasta volumen de 100 ml con agua.
- **Solución tampón fosfato potásico monobásico pH 6,4:** mezclar 50 ml de fosfato potásico monobásico con 11,6-16,4 ml de hidróxido sódico 0,2 M para ajustar pH y enrasar con agua a volumen de 200 ml
- **Solución tampón citrato pH 5 (0,75 M):** modificado a la BP 93 PAG A77 ya que se forma a partir de la disolución de 1,118 gramos en 5000 ml de agua
- **Solución tampón citrato pH 5 (0,375 M):** modificado a la BP 93 PAG A77 ya que se preparó mezclando volúmenes iguales de solución tampón citrato pH 5 (0,75 M), formado disolviendo 1,118 gramos en 5000 ml, con agua ajustando el valor del pH con ácido clorhídrico 0,2 M
- **Solución tampón citrofosfato pH 6,5 :** según BP 93 PAG A 77 mezclando 29 ml de ácido cítrico 0,1 M con suficiente ortofosfato hidrógeno disódico 0,2 M para 100 ml

6.2 MATERIAL:

- agitador magnético LABINCO LD-10[®]
- agitador tubos
- aparato compresión BONALS[®]
- aparato de destilación
- aparato disolución Turu-Grau[®]
- aparato disolución Van-Kel VK 700[®]
- aparato resistencia a la fractura: PHARMA TEST PTB 311[®]
- balanza de precisión METTLER[®] AJ 100
- baño de ultrasonidos BRANSON 2200[®]
- cámaras
- centrífuga
- congelador
- controladores de humedad relativa (desecadores)
- cromatógrafo de líquidos Gilson
 - bombas 305 y 306
 - mezclador 811 b
 - detector UV modelo 116
 - inyector de muestras 231XL
 - integrador Spectra Physics 4270
- difractómetro rayos X Philips X Part MPD[®]
- disgregador PHARMA TEST PTZ 1[®]
- duquesas
- espectroscopio RMN-H⁺
- espectrofotómetro BECKMAN DU-6[®]
- estufas
- filtros Buchner
- filtros de jeringa TRACER[®] 0,45 μ
- filtros de membrana
- filtros de pliegues

- *Karl-Fisher 658 Processor, 655 Dosimat, E 624 Agitador, METHROM ®*
- *liofilizador TELSTAR ® L-3*
- *manta calefactora*
- *matraces aforados*
- *microscopio electrónico de barrido JEOL ® JSM 6400*
- *mortero*
- *mufla*
- *pera*
- *ph metro CRISON ® MicropH 2002*
- *pie de rey*
- *pipetas*
- *placas térmicas eléctricas*
- *refrigerador*
- *refrigerante de reflujo*
- *rotavapor*
- *tubos ensayo*
- *vasos de precipitados*
- *viales*

7

MÉTODOS CLÍNICOS

7.1 ESTUDIO DE CAMPO DE UTILIZACIÓN CLÍNICA DE LA TALIDOMIDA

La Talidomida es un medicamento huérfano que se importa en España y se utiliza en terapéutica aplicando un protocolo estricto para las indicaciones admitidas o bien como parte de un ensayo clínico o como “ uso compasivo ” en indicaciones no admitidas.

La utilización clínica de la Talidomida se ha evaluado mediante el envío de una documentación actualizada, a distintos servicios de dermatología de diversos hospitales españoles para recoger de esta forma, las distintas aplicaciones farmacológicas que se están empleando actualmente y, sobre todo, para conocer el grado de resultado en las mismas, pudiendo así compararlas con los datos bibliográficos.

La utilización de medicamentos, es un concepto acuñado por la Organización Mundial de la Salud que, excede de las indicaciones clínicas aprobadas para una sustancia concreta. En este sentido, la OMS creó un grupo de trabajo en 1986 para recopilar el uso real que los médicos hacen de los medicamentos y a partir de ese año el Drug Utilization Research Group (DURG) , se encarga de recopilar bibliografía y estudios estadísticos para comprobar como se lleva a cabo la utilización de los medicamentos en diversos países.

En nuestro trabajo, dado que la Talidomida se encuentra sometida a unas importantes restricciones de uso y se exige un protocolo estricto de utilización para las indicaciones aprobadas, quisimos comprobar por medio de una encuesta, el grado de utilización de los servicios de dermatología de los hospitales, tanto públicos como privados, y obtener una valoración clínica de su actividad para diversas indicaciones.

Hay que destacar que el trabajo no tiene las características de una encuesta llevada a cabo con la metodología aplicable a este tipo de estudios y que su valor es solamente cualitativo, aunque puede servir de orientación en futuras aplicaciones de un medicamento formulado a base de Talidomida y teniendo en cuenta los resultados de nuestro trabajo.

7.2 ENCUESTAS

La encuesta se llevó a cabo mediante el modelo que se acompaña en la tabla 5 y se remitió por correo con una carta de petición a 150 servicios de dermatología de hospitales españoles tanto públicos como privados.

En el modelo de encuesta, se indicaban las principales indicaciones del fármaco y se preguntaba a los médicos sobre la utilización que se hacía de la misma en esos centros.

Los resultados que se obtuvieron se clasificaron en óptimos, buenos, regulares y malos, aunque de esta última respuesta no hubo ninguna, pudiendo suponer que en estos casos no se había utilizado o estaba mal formulada la pregunta por nuestra parte, ya que si los resultados eran malos en alguna indicación concreta, el hospital prefería no utilizarlo y por tanto no contestaba.

En la encuesta también se preguntaba sobre si se ensayaba en otras indicaciones, siendo casi invariablemente la respuesta negativa por las implicaciones sobre ensayos clínicos.

Además, se preguntaba por los medicamentos más frecuentes con los que se asocia, si conocían el procedimiento para obtener el producto y si había dificultades de suministro, siendo en estos casos la respuesta afirmativa casi invariable.

Por último, se permitía al encuestado hacer observaciones en texto libre encontrando en algunos casos que se pedía la libre comercialización del producto aunque con restricciones, como las existentes con los derivados del ácido retinoico.

Hay que destacar, que en ningún caso se ha pensado llevar a cabo un tratamiento estadístico de los datos obtenidos, debido a los posibles fallos metodológicos que implica desconocer si los hospitales que no han respondido es por causas de no utilizar Talidomida en sus tratamientos o simplemente por no haber contestado a la encuesta. No obstante, desde un punto de vista exclusivamente cualitativo, resulta muy ilustrativa las respuestas tabuladas.

HOSPITAL:

SERVICIO: JEFE DE SERVICIO:

ENCUESTA SOBRE UTILIZACIÓN CLÍNICA DE LA TALIDOMIDA

UTILIZACIÓN CLÍNICA

SE UTILIZA SE HA UTILIZADO YA NO SE UTILIZA SE PIENSA UTILIZAR NO

EN CASO DE UTILIZARSE EN ALGUNA OCASIÓN, SEÑALAR INDICACIÓN Y RESULTADOS

INDICACIÓN	RESULTADOS			
	ÓPTIMO	BUENO	REGULAR	MALO
LEPRA.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LUPUS ERITEMATOSO DISCOIDE.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SÍNDROME BEHCET.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED..	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PRÚRIGO NODULAR HE HYDE.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PRÚRIGO ACTÍNICO.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PANICULITIS DE WEBER-CHRISTIAN.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AFTAS ORALES RECIDIVANTES.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ERITEMA MULTIFORME.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PIODERMA GANGRENOSO.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SIDA (ÚLCERAS OROFARÍNGEAS, AFTAS...)...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CEGUERA.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿ Se están ensayando otras indicaciones ?
NO SI ¿ Cuáles ?

¿ Se asocia a otra medicación ?
Corticoides Antibióticos Citostáticos Otros

¿ Se conoce el procedimiento de abastecimiento de Talidomida en España ?
NO SI

¿ Se tiene dificultad para obtener el producto ?
NO SI

OBSERVACIONES:

RESPONDIÓ A LA ENCUESTA DR.

FIRMA

FECHA

Tabla 5 : encuesta hospitalaria de uso de la Talidomida

7.3 RESULTADOS DE LA ENCUESTA

Los resultados de las encuestas hospitalarias sobre el uso de la Talidomida, están recogidos en la tabla 6 y se corresponden aproximadamente con un tercio de los centros a los que se les envió la documentación.

Las principales indicaciones descritas para nuestro principio activo se identifican con una numeración que va del 1 al 12 y los resultados que se clasifican en óptimos, buenos, regulares y malos se abreviaron por sus iniciales, con el objeto de poder recoger todos los datos en una misma tabla y de esta forma facilitar la lectura global de la misma.

A continuación, se citan las indicaciones así como los tipos de resultados señalados en la tabla 6 con sus respectivas claves de localización.

CLAVE DE ENFERMEDADES		CLAVE DE RESULTADOS	
1	LEPRA	O	ÓPTIMO
2	LUPUS ERITEMATOSO	B	BUENO
3	SÍNDROME BEHCET	R	REGULAR
4	INJERTO CONTRA HUÉSPED	M	MALO
5	PRÚRIGO NODULAR		
6	PRÚRIGO ACTÍNICO		
7	PANICULITIS DE WEBER-CHRISTIAN		
8	AFTAS ORALES RECIDIVANTES		
9	ERITEMA MULTIFORME		
10	PIODERMA GANGRENOSO.		
11	SIDA (ÚLCERAS OROFARÍNGEAS, AFTAS...)...		
12	CEGUERA		

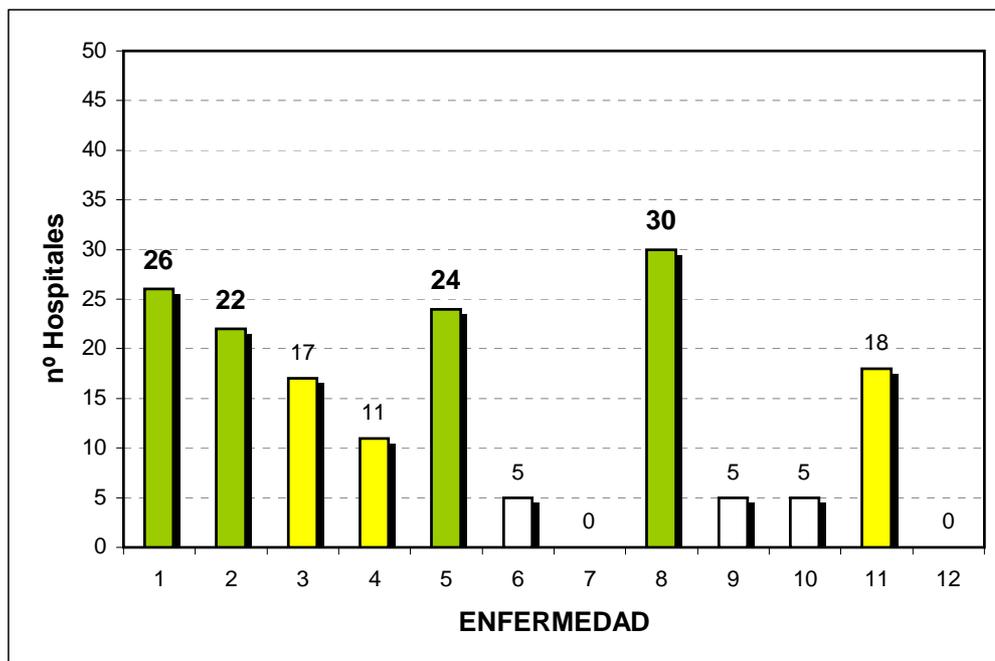
Tabla 6 : resultados de la encuesta hospitalaria de uso de la Talidomida

CENTRO SANITARIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	OTROS	MED.ASOC.
AMBULATORIO OVIEDO		R												
CABUEÑES GIJÓN	B	B				O					B		ATOPIA	
CALATAYUD ZARAGOZA	B													CORTICOIDES
CARLOS HAYA MÁLAGA		O												CORTICOIDES
CONSORCIO MATARÓ								B		R				
CRISTAL - PIÑOR ORENSE								O						CITOSTÁTICOS
CRUZ ROJA BARCELONA	O	B	B	B	O	B		O	O	R	B	R		
CRUZ ROJA MADRID	O	B	B	B	B		R	O	B	B				
DEL AIRE MADRID													SARCOIDOSIS	
DOCE DE OCTUBRE MADRID	O	R	R	R	B	R	R	R		R	R			CORTICOIDES
DR FLEMING SEVILLA	O	R	O	O	B			O		B	O			
GARCÍA NOBLEJAS MADRID	B	O	O	O	B			O		B				
GENERAL YAGÜE BURGOS			B					B			B			
GIL CASARES SANTIAGO	B	B	B		B			B						CORTICOIDES
GÓMEZ ULLA MADRID		B												
GRAL ALBACETE	O	O			O			O		R	R			CORT., ANTIBIO.
GRAN VÍA CASTELLÓN	O							B	B		B			
HELLÍN ALBACETE								O						ANTIBIÓTICOS
INSALUD JURIA VALENCIA					B			R						
LA ALIANZA SABADELL		B			R				B					
LAS PALMAS	O													ANTIB., CORTIC.
MERCED SEVILLA	O							O						ANTIBIÓTICOS
MILITAR DE SEVILLA								O			B		SARCOIDOSIS	CORTICOIDES
MILITAR PALMA DE MALLORCA	O				B			B						CORTICOIDES
MONTE NARANCO OVIEDO	O	B						R						
MONTEOLIENTE VALENCIA		B						R			B			
MURCIA - VIRGEN ARRISACA	O	B			B			O			B			
MUTUA TERRASA		O			B									CORT., ANTIHIS.
Nº Sº DE LA ANTIGUA ÁLAVA					B			O						
Nº Sº DE SONSOLES ÁVILA			B								O			CORTICOIDES
NAVAL DE CÁDIZ	O	R												
PARC TAULÍ SABADELL					R									ANTITRETOVIR
POLICLÍNICA SAN JOSÉ ÁLAVA	O	B	B		B			B	R	B			PENFIGOIDE	CORT., ANTIBIO.
PRIMERO DE OCTUBRE MADRID	O	R	R	R	B	R	R	R		R	R			CORTICOIDES
PROVINCIAL ALMERÍA	O				B									CORTICOIDES
PUERTA DE HIERRO MADRID	O	B	B	O	O			O		R	O		LIQUEN PLANO	CORT.ANT.CIT.
PUNTA EUROPA CÁDIZ	O	B	O	O	R			O			O		VASCULITIS	
QUINTANA MADRID		B	B		B			O						
REINA SOFÍA CÓRDOBA	O				B	B		O						
RIO CARRIÓN PALENCIA	O		B	B	B			O			B			CORTICOIDES
SANATORIO VALLÉS MADRID						B		B					INFIL.LINFOC.	CORTICOIDES
SANT PAU BARCELONA	O	B		B	O	R		B			B			CORTICOIDES
SEVERO OCHOA MADRID					O						O			CORTICOIDES
TXAGORRITXU ÁLAVA		R	B		O	B		O		R	O			CORTICOIDES
UNIVERSITARIO CANARIO	O	O	B	B				O	O				ACTINODE	
UNIVERSITARIO GETAFE MADRID		B	B	B	B			O			B			
UNIVERSITARIO GUADALAJARA		B	O	O	B			O			O		UTICARIA IDIOP	
VALLE HEBRÓN BARCELONA		O	O					O		B			LÍQUEN PLANO	
VIRGEN DE LA SALUD TOLEDO	B	R			B			B			B			ANTIISTAM.

Los resultados recibidos nos permiten realizar una valoración cualitativa sobre la utilización clínica de la Talidomida, en diversos hospitales españoles, tanto públicos como privados, ya que no fué posible llevar a cabo un tratamiento estadístico por desconocimiento del resto de los encuestados debido a que las encuestas pendientes de contestación, no se sabe si fué por no utilizar este fármaco o bien por no enviar la encuesta cumplimentada.

Los resultados de las encuestas hospitalarias sobre el uso de la Talidomida, indican que la mayor aplicación y los resultados óptimos de tratamiento se obtienen en la lepra y en las aftas orales, mientras que para otras indicaciones como son el lupus eritematoso, el síndrome de Behcet, la enfermedad injerto contra huésped, el prúrigo nodular, el prúrigo actínico, el eritema multiforme y el sida presentan una respuesta buena al tratamiento con nuestro fármaco.

En la gráfica de la encuesta, se representa en un diagrama de barras la totalidad de los resultados óptimos y buenos con el empleo de la Talidomida en función del número de hospitales que enviaron respuestas. En el eje de ordenadas, se muestran las enfermedades enumeradas según la clave de enfermedades y en el eje de abscisas, el número de centros sanitarios que utilizan Talidomida en cada enfermedad. Las barras en verde muestran un mayor uso de la Talidomida (entre el 45 % y el 60 % de los centros sanitarios), en amarillo un uso medio (entre el 20 % y el 35 %) y en blanco un menor uso (10 % o menos).



gráfica de la encuesta

En base a los datos recibidos de los hospitales encuestados, se puede señalar que actualmente en España, se utiliza la Talidomida con resultados óptimos y buenos en las siguientes indicaciones farmacológicas que ordenadas de mayor a menor son las aftas orales, la lepra, el prúrigo nodular, el lupus eritematoso, el SIDA, el síndrome de Behcet y la enfermedad injerto contra huésped.

Los resultados regulares del tratamiento con Talidomida fueron para la enfermedad de Weber-Christian y el pioderma gangrenoso, según los datos obtenidos de las encuestas hospitalarias .

No se obtuvo ninguna contestación de mal resultado con el tratamiento de nuestro fármaco; pero desconocemos si es debido a una errónea formulación de la pregunta por nuestra parte o bien porque en caso de mal resultado, el centro sanitario prefiere interrumpir la medicación con Talidomida y por tanto no contesta a nuestra encuesta.

Además, según la información recibida de los centros sanitarios podemos señalar que las principales indicaciones de uso de la Talidomida en España son la lepra, el lupus eritematoso, el prúrigo nodular y las aftas orales ya que así lo corroboran más de la mitad de los hospitales que respondieron, según se representa en la gráfica de la encuesta.

Con los datos obtenidos de los centros encuestados, hemos podido dibujar un mapa territorial señalando las provincias donde más se emplea Talidomida, destacando las CC.AA. de Madrid y Cataluña.



Utilización Clínica de la Talidomida en España

8

MÉTODOS QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA

La Talidomida es un medicamento huérfano que el Estado importa únicamente para los tratamientos autorizados y al no comercializarse en España, no pudimos disponer de materia prima, viéndonos obligados a sintetizarla nosotros mismos.

La síntesis química- farmacéutica de este principio activo se abordó basándonos en pautas de su patente británica nº 768.821 y en referencias bibliográficas de King (1949) y de Jonsson (1972).

La bibliografía señala que la síntesis de Talidomida parte del anhídrido ftálico y del L-ácido glutámico, en mezclas equimoleculares con adición de piridina a reflujo y posterior incorporación del anhídrido acético, obteniéndose así el anhídrido 2 ftalimido glutámico racémico que tras la adición de carbonato amónico reacciona dando Talidomida racémica.

8.1 SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA

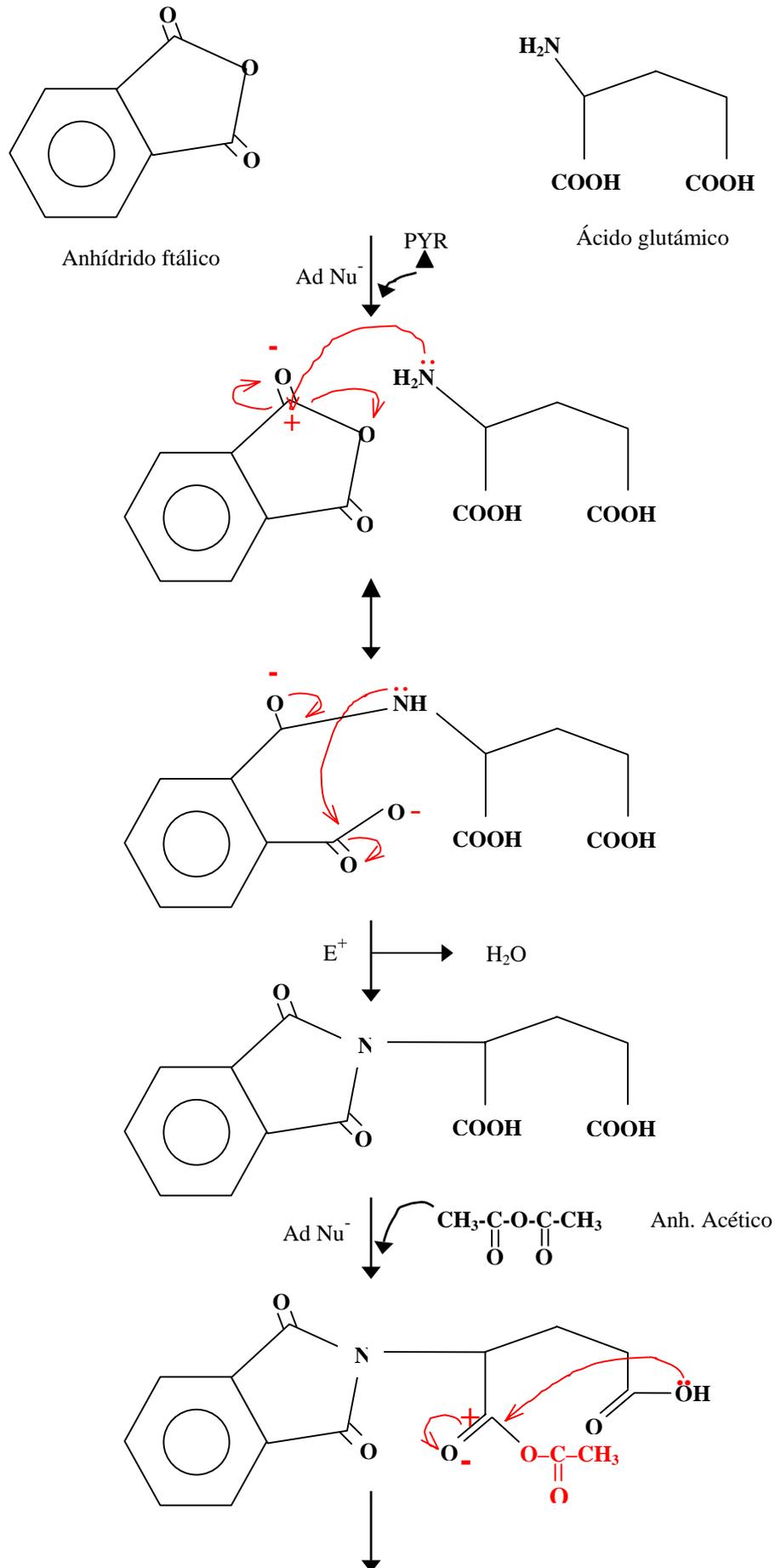
- 1º** *Destilamos aproximadamente 3,5 litros de piridina, para de esta forma obtener unos 2,6 litros que necesitamos para sintetizar 1000 gramos de Talidomida.*
- 2º** *Adicionamos al matraz la cantidad de 1000 gramos de anhídrido ftálico y de 1000 gramos de ácido glutámico, junto con los 2,6 litros de piridina anteriormente obtenida en el proceso de destilación.*
- 3º** *Una vez iniciado el proceso de destilación se mantiene refluendo aproximadamente 3 horas.*
- 4º** *Recogemos el destilado sobre potasa, tal y como está descrito en la purificación de la piridina. Hay que utilizar piridina porque el medio ha de ser ligeramente alcalino para asegurar la ciclación. En principio también nos podría servir la dimetilformamida; ya que, proporciona medio alcalino; pero resulta de difícil eliminación y por otra parte, el dioxano no se ha probado mientras que con la piridina, se favorece que el grupo amino del ácido glutámico esté libre y así de esta forma, se pueda dar el ataque nucleófilo con apertura de anillo. La reacción con la piridina transcurre en caliente para que el medio sea lo más anhidro posible.*
- 5º** *Terminado el proceso de destilación, se observa que el semiproducto formado es de color amarillo anaranjado y de aspecto ligeramente espeso. Se procede a su filtración en filtros de pliegues para separar cualquier resto sólido .*

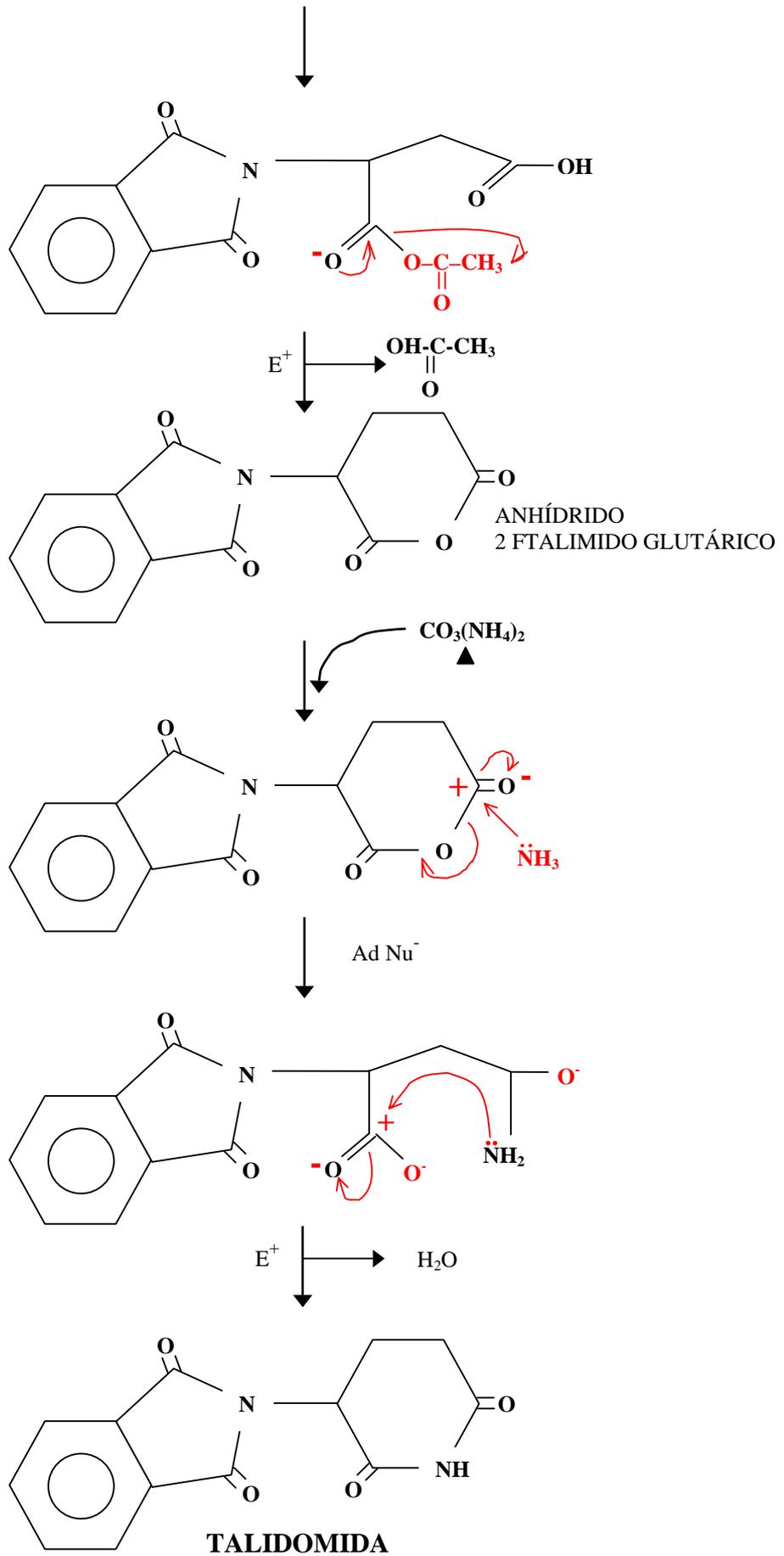
- 6º** El semiproducto, una vez filtrado, lo hacemos pasar por un rotavapor para separar a vacío la piridina que es el disolvente de la reacción. El rotavapor que utilizamos trabaja a una presión de 100 mb y lleva un baño de agua cuya temperatura es aproximadamente de 70° C y presión de 18 mm Hg. El anhídrido 2 ftalimido glutárico obtenido tiene aspecto de aceite semisólido y es analizado por RMN- H^+ para determinar en que forma se encuentra (gráfico 15).
- 7º** Se reparte el anhídrido 2 ftalimido glutárico en matraces, que se calientan en baño de agua a una temperatura aproximada de 80°C y se añade a cada matraz 350 ml de anhídrido acético. Se observa un cambio físico en el semiproducto ya que pasa de estado sólido a líquido.
- 8º** Se calientan los matraces en una manta calefactora, a una temperatura de 136° C , que es la temperatura de reflujo del anhídrido acético y así aseguramos la ciclación del ácido inicialmente formado. Se conecta a columna de reflujo para que no se pierda el disolvente, ya que al calentarse y evaporarse se condensa de nuevo y vuelve a caer el producto al matraz. El disolvente circula por dentro de las bolas en la columna de reflujo y se enfría por la corriente exterior de agua. El tiempo aproximado de calentamiento en la manta es de 40 minutos y para que se de la reacción de formación del anhídrido 2 ftalimido glutárico es de 15 minutos.
- 9º** Una vez calentado los matraces en la manta calefactora se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas, así se puede formar un precipitado de color amarillo.
- 10º** Transcurrido ese tiempo, se ha formado un precipitado amarillento y un sobrenadante de anhídrido acético que se decanta. En el matraz que contiene el precipitado del anhídrido 2 ftalimido glutárico, se añade éter ya que el anhídrido es insoluble en este disolvente y esto sirve para disgregar el precipitado en un polvo más fino.
- 11º** Filtración en sistema Buchner eliminando el líquido de filtración; pues como se analiza en el gráfico 16 no contiene al anhídrido 2 ftalimido glutárico y , por tanto, lo podemos rechazar.
- 12º** Se lava varias veces con éter y se extiende el semiproducto en bandejas para facilitar el secado manteniéndolo en un desecante durante 4 días.
- 13º** Una vez seco el anhídrido 2 ftalimido glutárico, se lleva a mortero la cantidad de 10 gramos de este semiproducto junto con 1,9 gramos de carbonato amónico, pulverizando bien y siguiendo el procedimiento descrito por Jonsson (1972).
- 14º** Una vez obtenida una mezcla homogénea se pasa a matraz y llevamos a un agitador durante 30 minutos para asegurar la mezcla.

- 15°** *Transcurrido este tiempo, se lleva el matraz a una mufla a temperatura de 250° C durante 15 minutos. Durante este tiempo la mezcla cambia de estado sólido a líquido y de color blanco a un color caramelo desprendiendo gases de amoníaco y de anhídrido carbónico.*
- 16°** *Al cabo de ese tiempo, se retira el matraz de la mufla y se deja enfriar aproximadamente unos 30 minutos hasta que se da la cristalización.*
- 17°** *Una vez formados los cristales procedemos a su recristalización, en placa caliente y con la adición de 75 ml de ácido acético glacial disolvemos totalmente el producto formado que ya es Talidomida.*
- 18°** *Pasamos el producto disuelto en ácido acético glacial al matraz que se conecta a un refrigerante de reflujo, para que de esta forma la disolución sea completa y no se pierda disolvente; ya que circula por el interior de las bolas del refrigerante, y entra en contacto con las paredes frías por donde circula el agua, se condensa y vuelve a caer al matraz. La temperatura de la placa eléctrica del refrigerante es aproximadamente de 300° C, ya que es la temperatura de ebullición del ácido acético glacial y el motor rotatorio se conecta en el nivel 7.*
- 19°** *Una vez conectado todo el sistema refrigerante y puesto en marcha se observa que se empieza a formar un precipitado de color blanco lechoso hasta que se alcanza la completa disolución adquiriendo un color marrón claro semitransparente.*
- 20°** *Se filtra la disolución por filtro de pliegues.*
- 21°** *Una vez filtrada la disolución se lleva a matraz con reposo durante 24 horas.*
- 22°** *Transcurrido este tiempo se observa que se ha formado un precipitado de color blanco lechoso y procedemos a su filtración en sistema Buchner. Al filtrado se le hace un análisis espectroscópico de RMN- H^+ para ver si hay restos de Talidomida o del anhídrido 2 ftalimido glutárico y como no hay restos podemos rechazar el filtrado (gráfico 17).*
- 23°** *El producto final obtenido tras la filtración es Talidomida que se deja secar.*

La síntesis químico-farmacéutica de la molécula de Talidomida, según nuestro método de escala de laboratorio está esquematizada en el gráfico 13 y nos permite obtener lotes de 5 g de producto.

Gráfico 13: Proceso de síntesis química-farmacéutica para la molécula de Talidomida





8.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL (TALIDOMIDA)

Se determina el aspecto físico, la estructura por RX y la morfología de la Talidomida sintetizada, por medio de microscopía electrónica de barrido.

ASPECTO FISICO:

Las muestras de Talidomida materia prima sintetizadas por nosotros presentan aspecto pulverulento, de color blanco e inodoro.

RX:

Se recurre a esta técnica para determinar la estructura de la Talidomida materia prima. En la gráfica 14 se representa el difractograma de nuestro principio activo observándose una estructura cristalina con máximos de intensidad característicos.

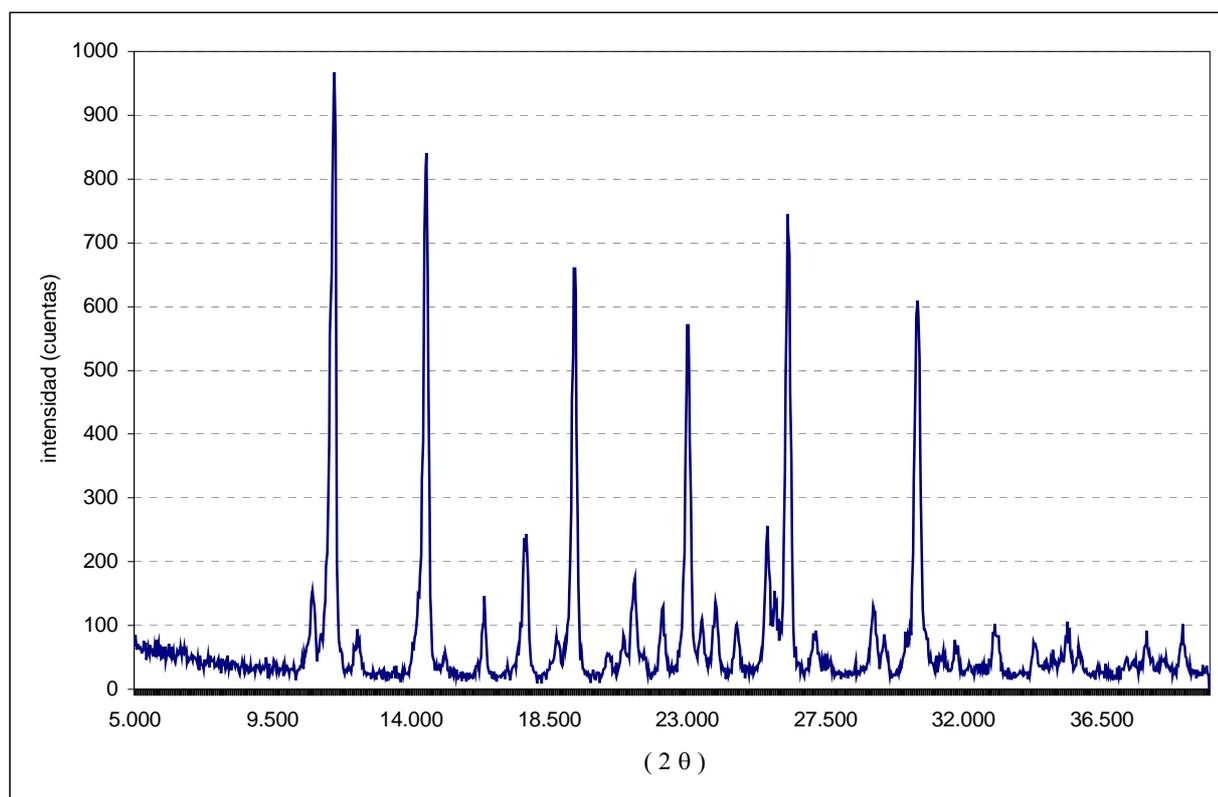
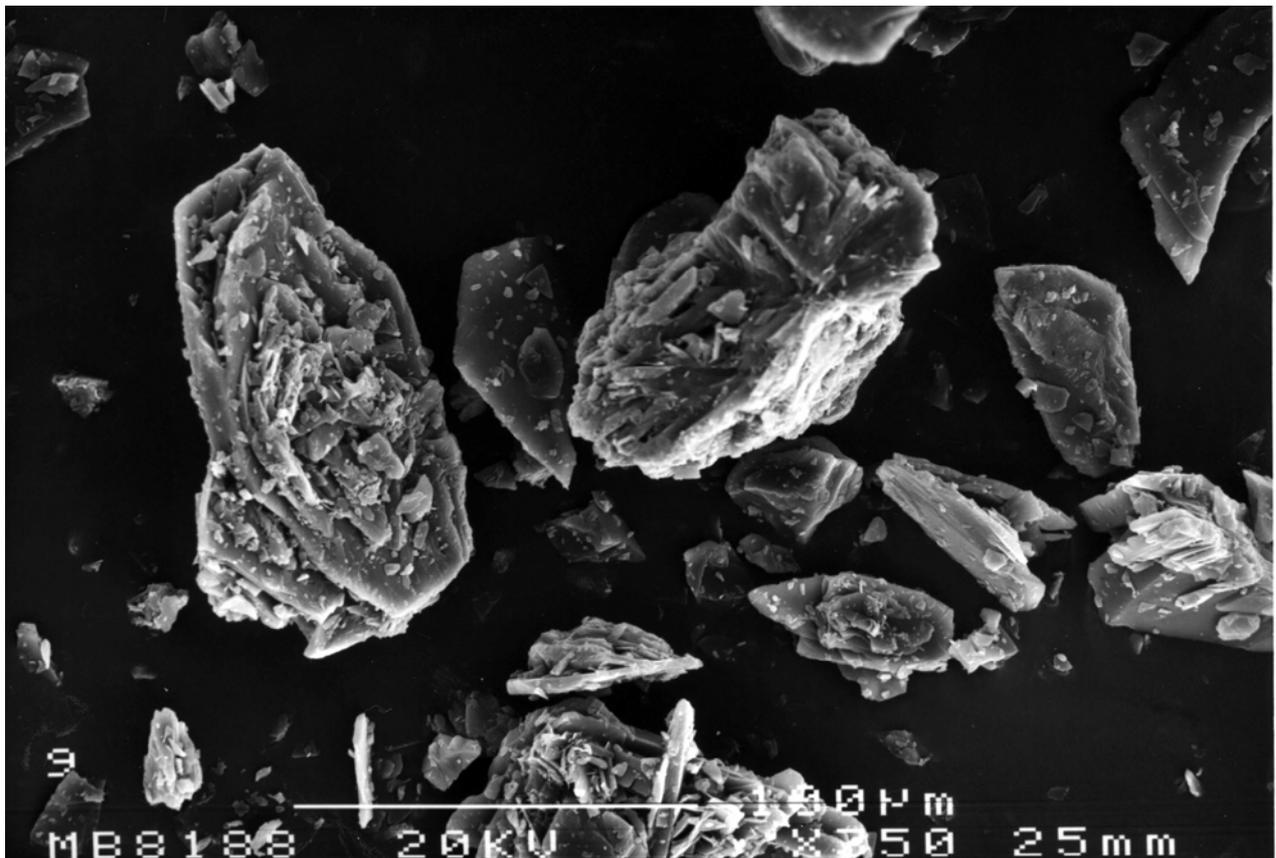


gráfico 14: Difractograma de la Talidomida materia prima (azul)

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO:

La morfología de la Talidomida materia prima se muestra en la microfotografía 2, obtenida en microscopio electrónico de barrido Jeol® JSM 6.400 observándose a 350 aumentos partículas de distinto tamaño con superficie rugosa.



microfotografía 2 : morfología de la Talidomida materia prima (x 350 aumentos)

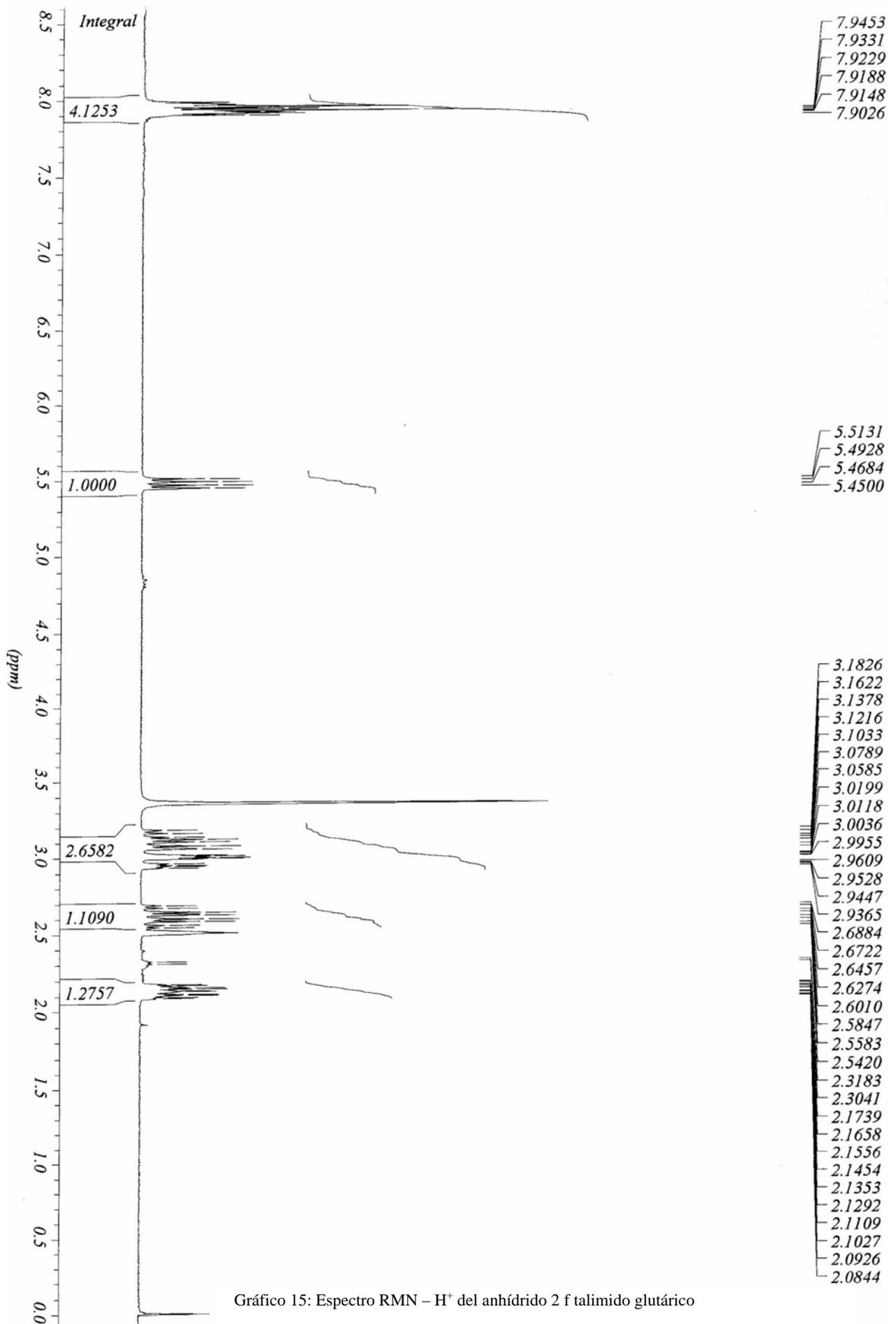
8.3 IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO INTERMEDIO Y FINAL

La identificación de los productos intermedio y final de síntesis de la molécula de Talidomida, se lleva a cabo mediante espectroscopía RMN- H^+ a 300 MHz y con DMS como disolvente deuterado, que aparece a 2,5 ppm.

Los análisis espectroscópicos del producto intermedio, del filtrado de separación del producto intermedio, del filtrado de separación del producto final y del producto final se representan en los gráficos 15, 16, 17 y 18, respectivamente.

PRODUCTO INTERMEDIO:

El producto intermedio de síntesis de la molécula de Talidomida, es el anhídrido 2 ftalimido glutárico que analizado por espectroscopia RMN- H^+ no presenta impurezas y además se encuentra protonado. El espectro RMN se representa en el gráfico 15.



FILTRADO DE SEPARACION DEL PRODUCTO INTERMEDIO:

El filtrado analizado por espectroscopia RMN- H^+ nos permite comprobar que la filtración es eficiente y es capaz de separar el anhídrido 2 ftalimido glutárico, por lo que se puede rechazar el filtrado ya que, no contiene producto intermedio, representándose su espectro en el gráfico 16.

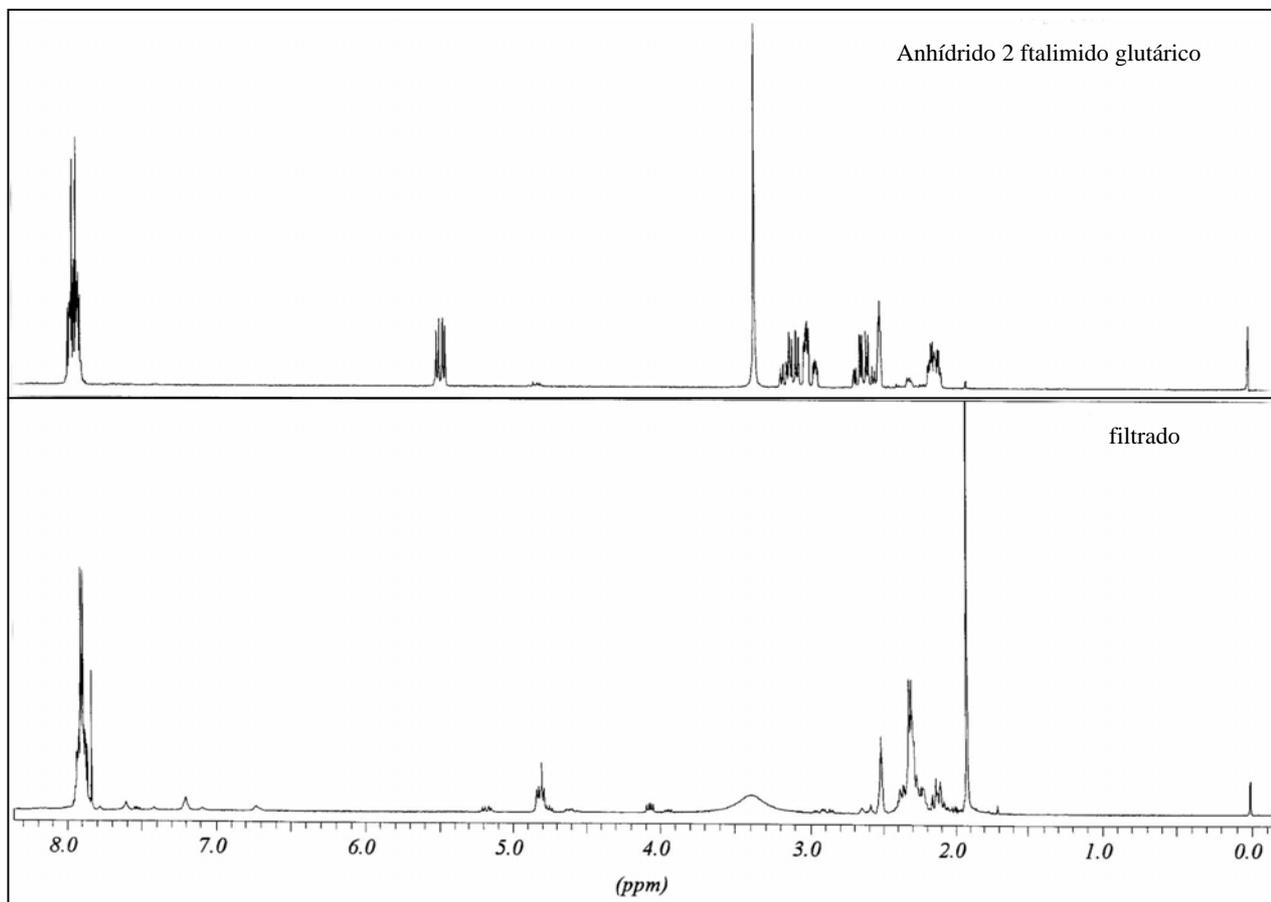


gráfico 16: espectro RMN – H^+ de separación de filtrado de anhídrido 2 ftalimido glutárico

FILTRADO DE SEPARACION DEL PRODUCTO FINAL:

El filtrado analizado por espectroscopia RMN- H^+ nos permite comprobar que la filtración es eficiente y es capaz de separar la Talidomida, por lo que se puede rechazar el filtrado ya que, no contiene Talidomida representándose su espectro en el gráfico 17.

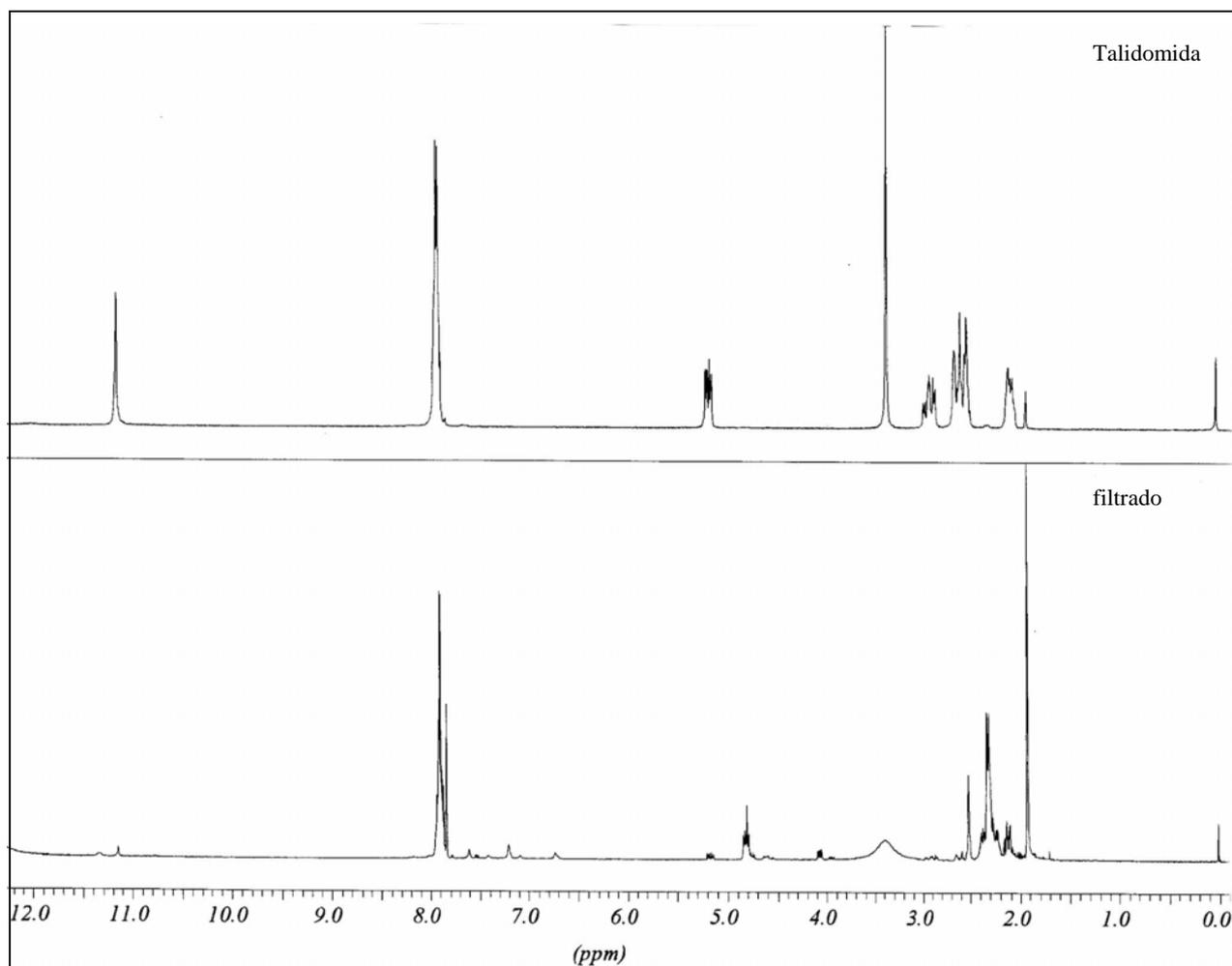
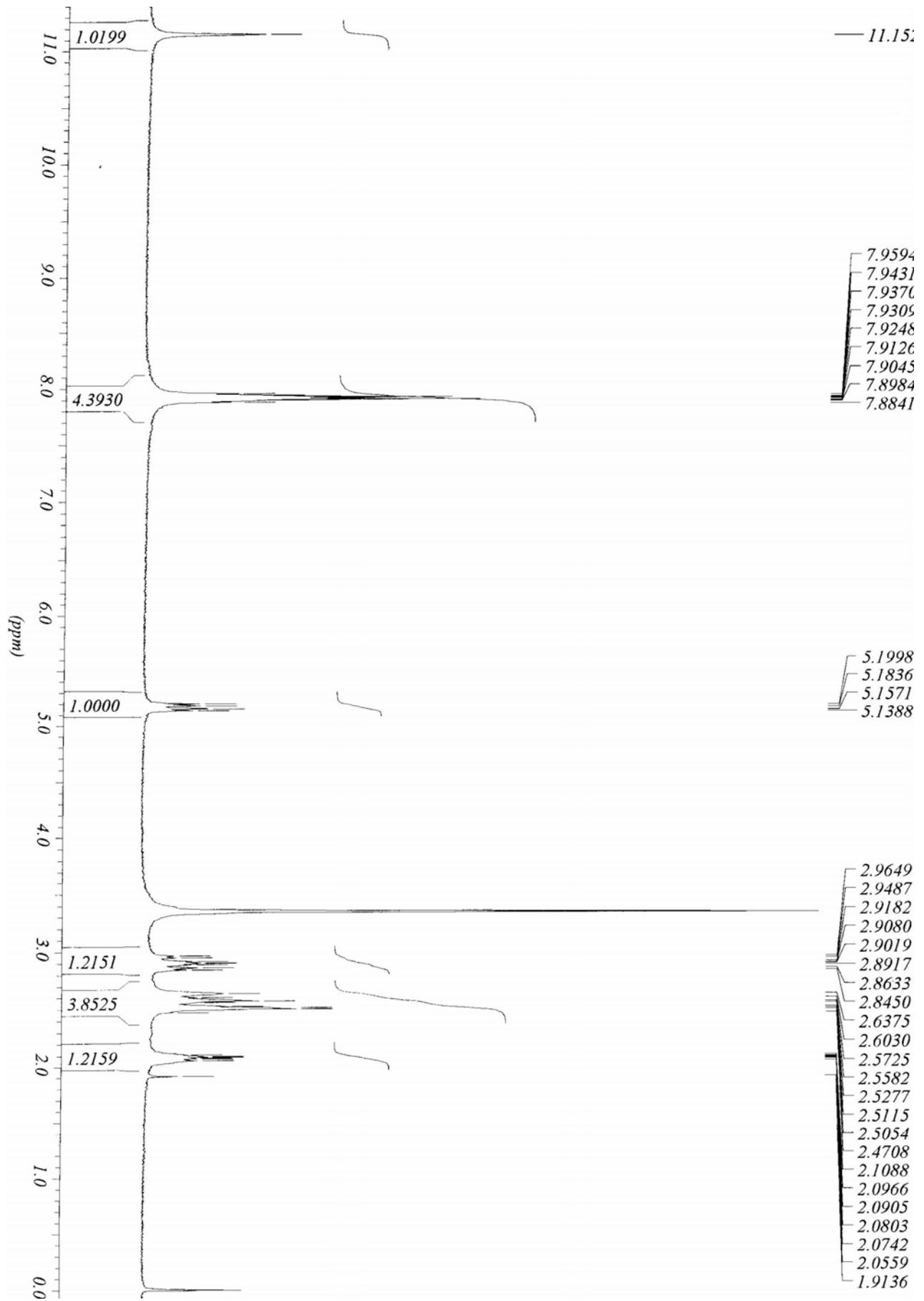


gráfico 17: espectro RMN – H^+ de separación de filtrado de Talidomida

PRODUCTO FINAL:

Se analizan muestras de todas las síntesis de producto, mediante espectroscopia RMN- H^+ para poder así determinar si se ha obtenido como producto final Talidomida y si ésta es pura.

Los análisis espectroscópicos nos indican que en todas las síntesis llevadas a cabo para la obtención de Talidomida, se obtuvo un producto en estado puro ya que, no hay otros productos que aparezcan salvo una pequeñísima cantidad de ácido acético que se elimina del producto por volatización. El espectro de RMN se representa en el gráfico 18.

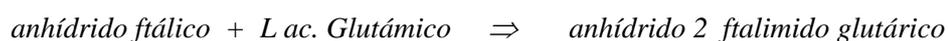
gráfico 18: espectro RMN - H⁺ de Talidomida

8.4 RIQUEZA DEL PRODUCTO FINAL

La Talidomida sintetizada presenta una muy pequeña cantidad de ácido acético que se calcula a partir del análisis espectroscópico de RMN- H^+ siendo este valor de 2,67%.

8.5 RENDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS INTERMEDIOS Y FINAL DE LA SÍNTESIS DE LA MOLÉCULA DE TALIDOMIDA

Para el cálculo del rendimiento práctico de obtención del producto intermedio o **anhídrido 2 ftalimido glutámico**, consideramos la relación estequiométrica de síntesis siguiente:



En función de esta relación, los 1,175 Kg. de anhídrido 2 ftalimido glutámico obtenidos experimentalmente en el proceso de síntesis de la molécula de Talidomida, suponen un 67% de rendimiento práctico, valor que es inferior al encontrado en bibliografía (74% ; King, 1949) para esta misma síntesis químico-farmacéutica de nuestro principio activo.

Por otro lado, para el cálculo del rendimiento práctico de obtención del producto final o **Talidomida** consideramos la relación estequiométrica de síntesis siguiente:



En función de esta relación, los **279,19 gramos obtenidos** experimentalmente representan un **23,84 % de rendimiento**.

8.6 CONSERVACIÓN DEL PRODUCTO FINAL

La conservación de la Talidomida materia prima es en botes opacos, cerrados herméticamente y mantenidos en condiciones normales de almacenamiento, a 25°C de temperatura y 60% de humedad relativa.

8.7 ANÁLISIS DEL PRODUCTO FINAL

Cada muestra de síntesis de Talidomida fue identificada mediante espectroscopía de RMN- H^+ con el objeto de asegurarnos que en cada proceso de síntesis, se obtenía únicamente nuestra molécula.

8.8 COSTE SÍNTESIS TALIDOMIDA

Para la síntesis farmacéutica de 279,19 gramos de Talidomida que pensamos requerir en esta memoria, se utilizaron los siguientes reactivos en las cantidades que se indican a continuación:

	Cantidad Empleada	Coste	Coste total
Anhídrido ftálico	1 kg	2.190 pts/kg	2.190 pts
L ac glutámico	1 kg	9.420 pts/kg	9.420 pts
Piridina	3,5 litros	7.505 pts/ litro	26.267 pts
Anhídrido acético	1,4 litros	2.512 pts/litro	3.516 pts
Carbonato amónico	223,25 g	9.180 pts/ kg	2.049 pts
Ac acético glacial	8.812 ,5 ml	2.387 pts/litro	21.034 pts

Teniendo en cuenta que el coste de los reactivos para la síntesis químico-farmacéutica de 279,19 gramos de Talidomida fue de 64.476 pts, calculamos que el **coste por gramo de nuestro principio en el año 1998** es de **222,33 pts**.

9

MÉTODOS ANALÍTICOS

9.1 SOLUCIÓN PATRÓN DE TALIDOMIDA

Se pesa la cantidad de 50 mg de Talidomida materia prima y se disuelven en un volumen de 200 ml de DMSO, de forma que la solución presente una concentración de principio activo de 50 µg/ml y un valor de pH de 6,58. A partir de esta solución patrón se realizarán las diluciones necesarias para los distintos ensayos.

9.2 SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN

La solubilidad, en magnitud, de la Talidomida se determina por el método de agitación . Las muestras permanecen en un baño de agitación que está a 25° C y 60 % de humedad, evitando de esta forma la posible evaporación del disolvente y durante un periodo de tiempo de 24 horas.

Se preparan las siguientes soluciones tampón, de valores de pHs 2,4; 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4 y 8,4; que están descritas en el apartado de reactivos, presentando todas ellas igual tono osmótico.

Una vez comprobado el valor del pH de todas las muestras, tras la adición de Talidomida, se introducen en baño de agitación durante 24 horas.

Se filtra a través de un filtro de 45 µ y se procede a su análisis.

9.3 CONDICIONES PREVIAS AL ENSAYO DE ESTABILIDAD

Se preparan soluciones patrón de Talidomida, según el método analítico descrito anteriormente. Las muestras se mantienen a 25° C y 60 % de humedad durante distintos intervalos de tiempo y se lleva a cabo un barrido espectrofotométrico entre las λ de 200 a 400 nm, a las 0, 1 y 2 horas.

Todas las muestras tuvieron una concentración inicial de principio activo de 70 $\mu\text{g/ml}$; para lo cual, se tomaron 2,8 ml de la solución patrón preparada según el método analítico y se llevaron a un volumen de 10 ml con agua destilada.

9.4 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

Se somete a muestras que contienen Talidomida materia prima, a un periodo de tiempo de 6 meses a las siguientes condiciones:

MUESTRA	TEMPERATURA	HUMEDAD DESECADOR	VIAL
1	25° C	60 %	Abierto
2	40° C	75 %	Abierto
3	50° C	---	Cerrado*

(*) Esta muestra se utilizará únicamente en los ensayos de higroscopicidad.

Posteriormente, se analizan las muestras por espectrofotometría, tomando la cantidad de 50 mg de muestra y llevando a volumen de 100 ml con DMSO. De esta solución se toma 1,6 ml y se lleva a volumen de 10 ml con citrato buffer pH 5 (0,375 M), de forma que la concentración final de principio activo es de 80 $\mu\text{g/ml}$ y se lee a la longitud de 299 nm, utilizando como blanco la solución de citrato buffer pH 5 (0,375 M).

9.5 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCION PATRÓN

Se somete a muestras de solución patrón de Talidomida preparada según el método analítico a condiciones de almacenamiento de 25° C y 60 % humedad, durante un periodo de tiempo de 15 días y a condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % humedad) durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se alcaliniza una solución patrón hasta valor de pH 11,6 con hidróxido sódico 0,2 M y se le somete a condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % humedad) durante 24 y 48 horas. Las muestras son analizadas por sus respectivos métodos analíticos.

9.6 MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA TALIDOMIDA

Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de la Talidomida son la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la técnica espectrofotométrica.

Debido a que nuestro principio activo no se encuentra descrito en las farmacopeas de uso habitual, será necesario validar las dos técnicas analíticas mencionadas.

9.6.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se pone a punto la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, para el análisis cuantitativo de la Talidomida como materia prima y como producto terminado.

Puesta a punto del método HPLC:

Tomando como modelo los trabajos de Eriksson (1992) y Lyon (1995), se ha seleccionado una fase móvil que contenía mezcla de agua y acetonitrilo. Debido a la naturaleza de nuestro principio activo, a medida que aumenta la proporción de acetonitrilo en la mezcla de solventes, se produce un descenso en el tiempo de retención para nuestro principio activo; de forma que la relación existente entre la polaridad de la fase móvil y el tiempo de retención se refleja en la gráfica 19.

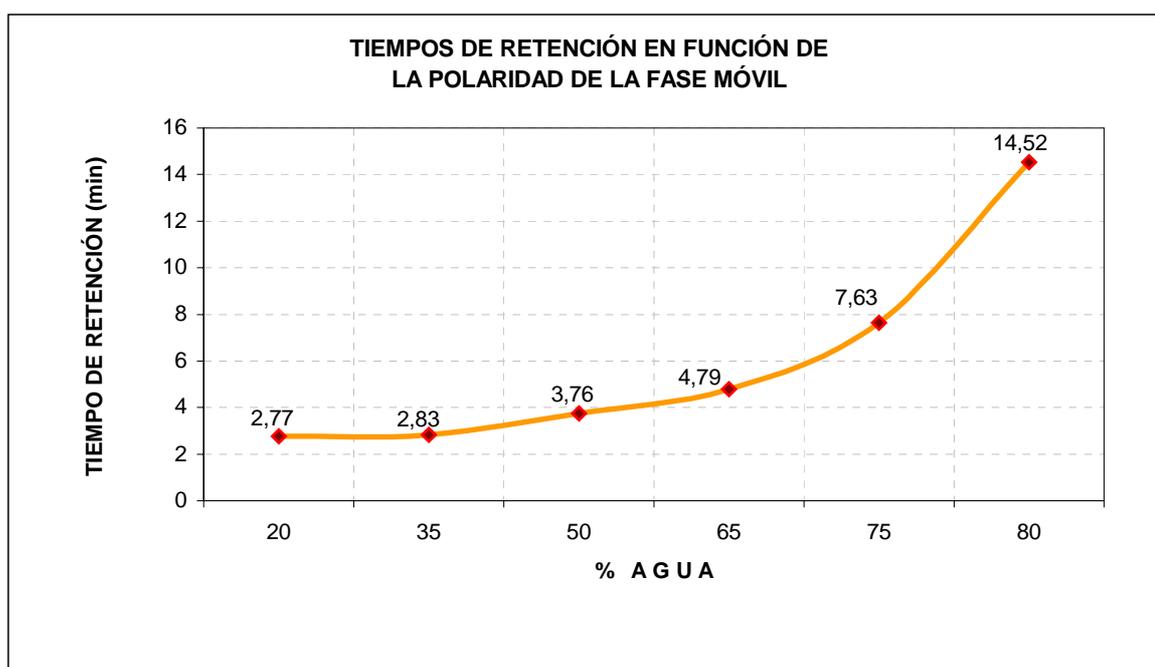


gráfico19: Retención para la Talidomida en análisis por HPLC con distintas fases móviles

De este estudio se seleccionan como fase móvil, la mezcla agua : AcN (65:35) con flujo 1 ml/minuto, como la más adecuada para nuestros ensayos. La longitud de onda de análisis fue seleccionada a 299 nm, por presentar un máximo característico en el barrido espectrofotométrico.

Esta longitud de onda nos permite la obtención de un rango de concentración entre 100-20 $\mu\text{g/ml}$ de principio activo, cuando trabajamos con sensibilidad 0,5 y atenuación de 8 para un loop de 100 μl .

La longitud de onda seleccionada por nosotros fue de 299 nm; mientras que otros autores como Lyon (1995) y Eriksson (1992) presentan una λ de 214 nm y 220 nm respectivamente; Krenn(1992) de 230 nm y Czejka (1987) trabaja a una λ de 254 nm y de 290 nm. Para nuestros estudios de estabilidad intentamos determinar la disminución del principio activo, sin la posible interferencia de distintos excipientes, que pudieran aparecer a longitudes de onda más bajas, por ello se seleccionó la λ de 299 nm.

En base a estos estudios se determinaron las siguientes condiciones cromatográficas para el análisis de nuestro principio activo:

columna:	C 18 SPHERISORB ODS-2 5 μ 20 x 0,46 cm
fase móvil:	agua : AcN (65:35) (v/v)
flujo:	1 ml/ minuto
volumen de inyección:	100 μl
longitud de onda:	299 nm
sensibilidad:	0,5
atenuación:	8
velocidad del papel:	0,25 cm/minuto
tiempo de análisis:	7 minutos

Determinación cualitativa de la Talidomida:

La gráfica 20, representa el cromatograma característico de una muestra de Talidomida, donde el tiempo de retención es de 4,63 minutos.

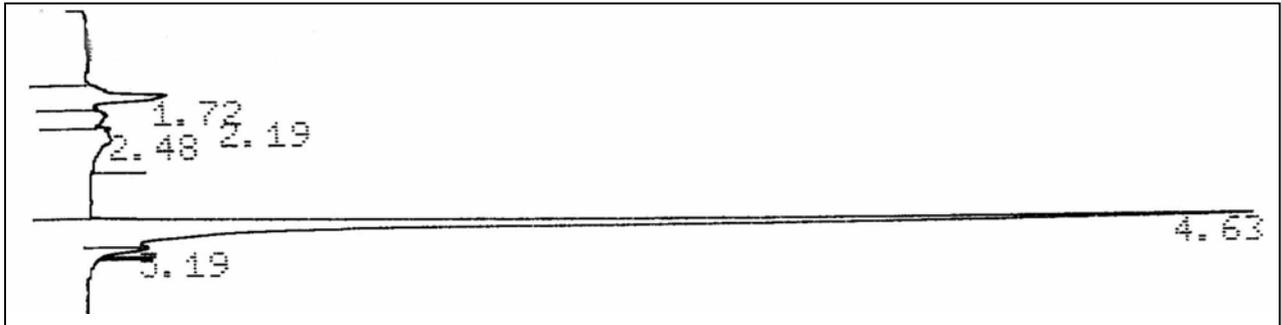


gráfico 20: cromatograma característico para la Talidomida según nuestras condiciones

Determinación cuantitativa de la Talidomida:

Se toma de una solución patrón de Talidomida (preparada según el método analítico), distintas alícuotas que se completan a volumen con agua destilada, realizándose varias determinaciones de cada punto para obtener la recta de calibrado siguiente:

$$ABC: (- 5.860,25) + 1.461,40^{\circ} C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2: 0,9905 \quad n : 20$$

9.6.2 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

Se pone a punto la técnica de análisis espectrofotométrico, para la cuantificación de la Talidomida materia prima y producto terminado.

Puesta a punto del método espectrofotométrico:

Se calculan dos curvas de calibrado, una para la Talidomida en solvente acuoso y otra para la Talidomida en solvente citrato buffer pH 5 (0,375 M) (descrito en reactivos).

Para ambas curvas, se toma de una solución patrón de Talidomida la cantidad de 2 ml y se llevan a 10 ml con agua o con solución citrato pH 5 (0,375 M) según el tipo de curva de forma que la concentración de Talidomida es de 50 µg/ml.

Determinación cualitativa de la Talidomida:

Para la determinación del máximo de absorbancia, se realizan en ambos casos, los barridos espectrofotométricos desde 200 a 400 nm, determinándose que, tanto en solución acuosa como en solución citrato pH 5 (0,375 M), la Talidomida presenta un máximo de absorción a la λ de 299 nm (gráficos 21 y 22).

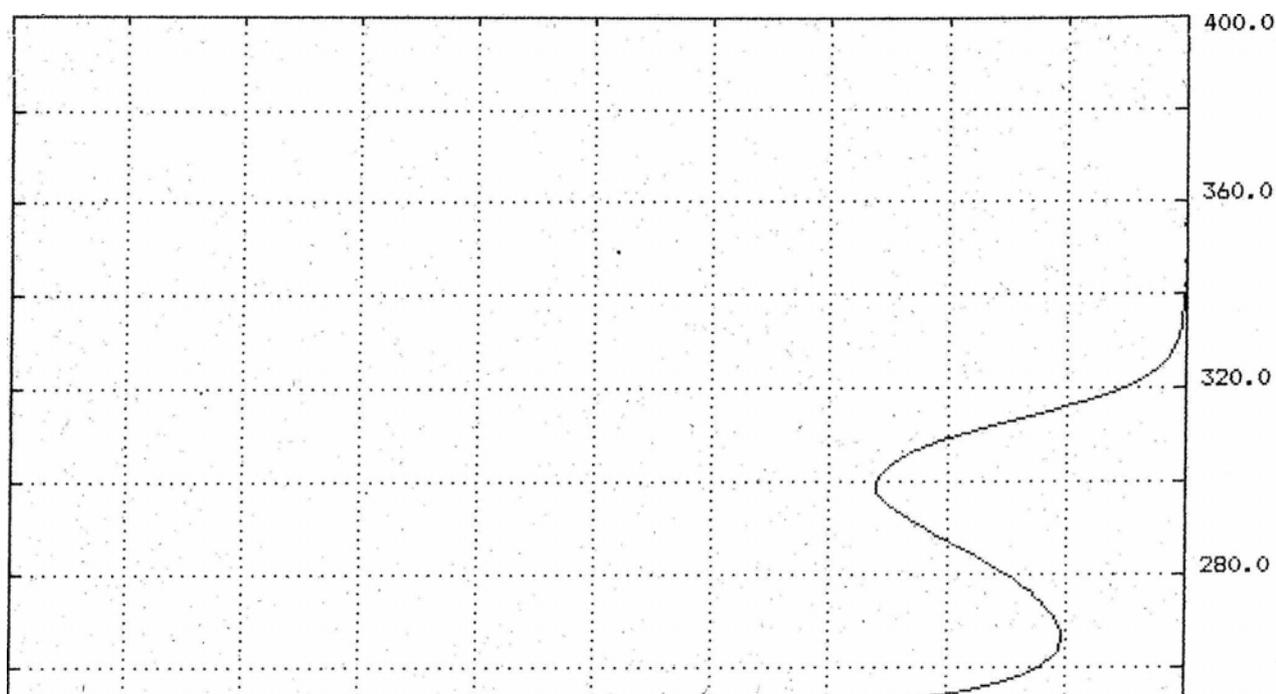


gráfico 21: Barrido espectrofotométrico de la Talidomida en solvente acuoso

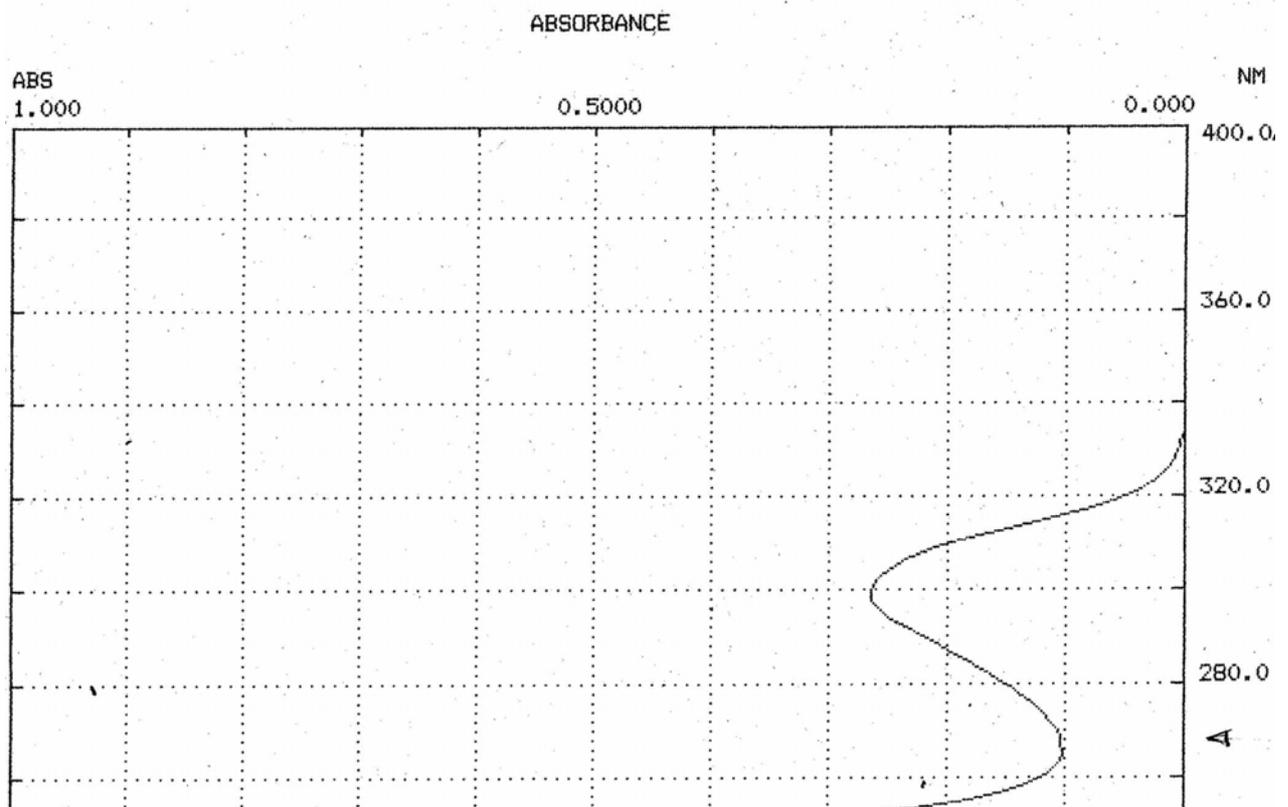


gráfico 22: Barrido espectrofotométrico de la Talidomida en solución citrato buffer pH 5 (0,375 M)

Determinación cuantitativa de la Talidomida:

Para la determinación del análisis cuantitativo de la Talidomida, tanto en solución acuosa como en solución citrato pH 5 (0,375 M), se miden las absorbancias de varias muestras de distintas concentraciones de principio activo, preparadas a partir de la solución patrón y empleando, según el caso, el disolvente acuoso o bien el solvente citrato pH 5 (0,375 M). Se comprueba que existe una relación directa entre las concentraciones y las absorbancias obteniéndose las siguientes rectas de calibrado:

- solución acuosa:

$$U.A.: 0,01766 + 7,8693 \times 10^{-3} C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2: 0,9985 \quad n : 27$$

- solución citrato pH 5 (0,375 M):

$$U.A.: 0,0160 + 8,79 \times 10^{-3} C (\mu\text{g/ml})$$

$$r^2: 0,9902 \quad n: 27$$

VALIDACION DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA TALIDOMIDA: HPLC Y ESPECTROFOTOMETRÍA

Al no estar descrita la Talidomida en las farmacopeas habituales (Ph Eur, BP y USP), los distintos métodos analíticos empleados en el análisis de este principio activo han de ser sometidos a un proceso previo de validación analítica.

Según las Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, la validación se debe aplicar no sólo a los procesos de fabricación, sino también a los métodos de análisis y control.

En la Orden del 19 de abril de 1985 (B.O.E. Nº 103 del 30 de abril) por la que, se introducen las Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad de los Medicamentos, se define la validación como “ la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos“, o lo que es lo mismo “ es la obtención de pruebas de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema, produce en realidad el resultado previsto“.

Gracias a la validación, se consigue un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, así como permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento; además, se obtiene una disminución del número de fallos y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costes asociados.

A continuación, se muestran los resultados del estudio de validación del método HPLC y espectrofotométrico para la Talidomida, como materia prima y como producto terminado:

En el estudio de validación se determina:

- 1º selectividad y especificidad*
- 2º linealidad*
- 3º precisión*
- 4º exactitud*

1º Selectividad y especificidad:

Se dice que un método analítico es “selectivo” cuando es capaz de determinar cualitativamente el analito sin interferencia de ningún otro compuesto.

El método de HPLC, se muestra como selectivo y específico, comprobándose que no existe ninguna sustancia que interfiera en el análisis de las distintas formulaciones de nuestro analito (dispersiones sólidas y formulaciones líquidas) mientras que, el método espectrofotométrico parece ser selectivo en estudios de estabilidad. Como pueden aparecer nuevos productos de degradación, sin que presenten una absorbabilidad a la longitud de onda a la que se analiza espectrofotométricamente, pensamos que es preferible realizar los estudios de estabilidad con el método de HPLC.

La selectividad espectrofotométrica se observa frente a las dispersiones sólidas, donde se comprueba que, a la longitud de onda del análisis, no existe interferencia ni con la ovoalbúmina, ni con la HPBCD, ni con la crospovidona, en el medio de disolución buffer y a la longitud de onda de máxima absorción para nuestro principio activo.

En el gráfico 22 se muestra un barrido espectrofotométrico de la Talidomida en solución citrato buffer pH 5 (0,375 M), que al ser comparado con los gráficos 23, 24 y 25 siendo respectivamente de albúmina, crospovidona e HPBCD en la misma solución citrato, se comprueba que no existe interferencia por parte de ninguno de estos excipientes, en el análisis espectrofotométrico de nuestro principio activo.

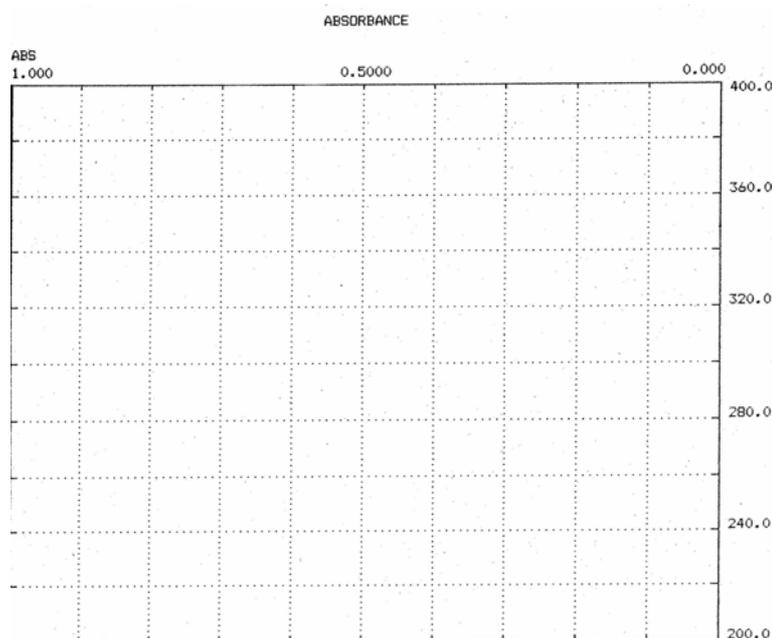


gráfico 23: Barrido espectrofotométrico de la albúmina en solución citrato buffer pH 5 (0,375 M)

También se observa una selectividad del método espectrofotométrico, frente a la Talidomida materia prima y Talidomida en comprimidos, ya que el barrido espectrofotométrico es igual en comprimidos que en el principio activo sólo, lo que nos demuestra que a la longitud de onda del análisis (299 nm) no existe interferencia con el resto de excipientes empleados en la formulación de nuestro principio activo; por ello, podemos seleccionar este método de análisis espectrofotométrico para los estudios de velocidad de disolución.

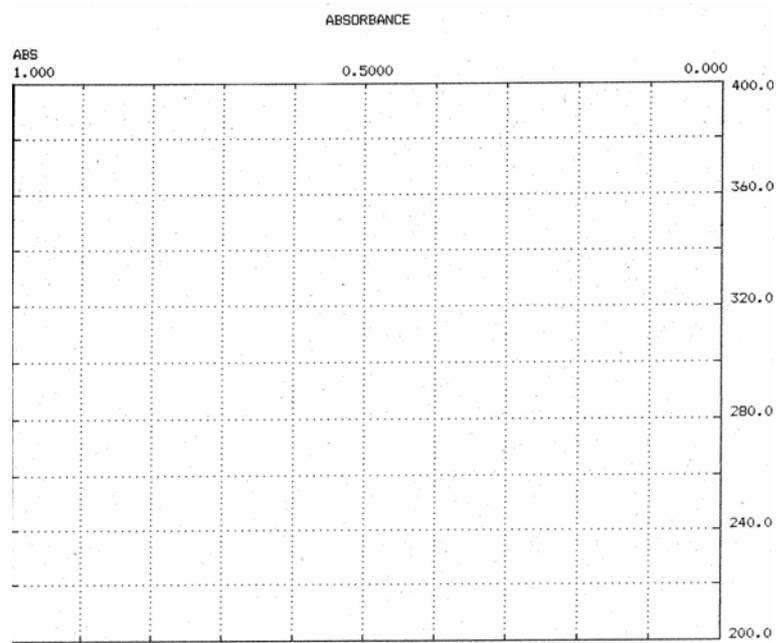


gráfico 24: Barrido espectrofotométrico de la crospovidona en solución citrato buffer pH 5 (0,375 M)

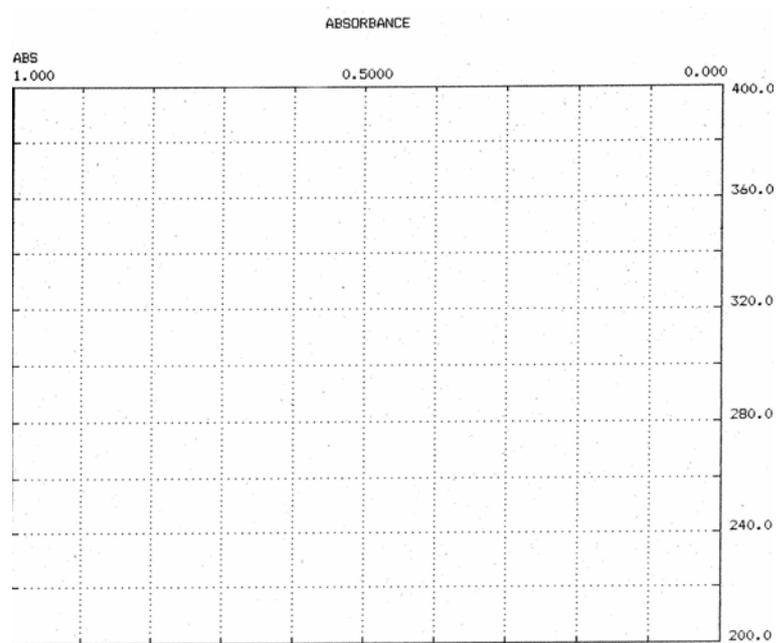


gráfico 25: Barrido espectrofotométrico de la HPBCD en solución citrato buffer pH 5 (0,375 M)

A continuación se recogen en una tabla los valores de absorbabilidad para una concentración de 65 µg/ml para la Talidomida materia prima y para unos comprimidos de dispersión sólida (1:2) (Tal: alb), observándose que no existe interferencia del resto de los excipientes para la determinación cuantitativa de la Talidomida en ambos casos.

MUESTRAS 65 µg/ml	ABSORBANCIAS		
Talidomida Materia prima	0,547	0,549	0,549
Comprimidos (1:2) Talidomida:albumina	0,540	0,537	0,513

2º linealidad

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

En la recta $y = a + b x$, a es la ordenada en el origen y b es la pendiente. A mayor pendiente mayor sensibilidad, considerando la sensibilidad como la respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito.

En el estudio de linealidad se determina:

- 2.1. *varianza de la pendiente*
- 2.2. *intervalo de confianza para la pendiente*
- 2.3. *limite de confianza de la ordenada en el origen*
- 2.4. *limite de detección*
- 2.5. *límite de cuantificación*

- 2.1. La varianza de la pendiente (S_b^2) se utiliza como expresión matemática de la linealidad, de forma que a menor varianza mejor linealidad.

La linealidad para el método HPLC presenta:

$$ABC: (- 5860,25) + 1461,4 C (\mu\text{g/ml})$$

r^2 :	0,9905	n: 20
S_{y,x^2} :	16292938,22	
Sb^2 :	1133,028	
Sb :	33,66	
$Sb\ rel\ (\%)$:	2,30 %	

Al estar el valor de la desviación estándar relativa ($Sb\ rel\ \%$) entre 2 y 5 % podemos considerar al método HPLC con unos valores aceptables de linealidad.

El método espectrofotométrico presenta en solución acuosa la linealidad :

$$U.A.: 0,01766 + 7,8693 \times 10^{-3} C \ (\mu\text{g/ml})$$

r^2 :	0,9985	n: 27
S_{y,x^2} :	$1,5846361 \times 10^{-3}$	
Sb^2 :	8,803533889	
Sb :	$2,967074972 \times 10^{-4}$	
$Sb\ rel\ (\%)$:	3,77 %	

Al estar el valor de $Sb\ rel\ \%$ entre 2 y 5 %, podemos considerar al método espectrofotométrico con unos valores aceptables de linealidad.

2.2. Intervalo de confianza para la pendiente:

Se calcula por el análisis de regresión, mediante la ecuación $b \pm t\ Sb$, donde t es el valor de la t -Student para $(n - 2)$ grados de libertad y una $P < 0,05$, y Sb es la varianza de la pendiente.

Así tenemos que para el método de HPLC, el intervalo de confianza de la pendiente es $1461,40 \pm 70,7206$ con el límite superior de 1532,12 y el límite inferior de 1390,68.

El método espectrofotométrico (en solución acuosa) presenta un intervalo de confianza de la pendiente de $7,8693 \times 10^{-3} \pm 6,1121 \times 10^{-4}$ con el límite superior de $8,48 \times 10^{-3}$ y el valor del límite inferior de $7,258 \times 10^{-3}$.

2.3. Límites de confianza de la ordenada en el origen:

*El error sistemático del método, se calcula mediante el valor de **a**, intersección con el eje de coordenadas (ordenada en el origen), que en el caso ideal debería ser cero.*

A continuación, se ha calculado el límite de confianza de su ordenada en el origen, para lo que se determinó en primer lugar la varianza de su término independiente (S_a^2), obteniéndose para el método HPLC los valores:

$$S_a^2: 5030644,32 ; \quad S_a: 2242,909789 \quad \text{y} \quad S_a \text{ rel } (\%): (- 38,27 \%)$$

Y para el método espectrofotométrico se obtiene:

$$S_a^2: 3,756174459 \times 10^{-4} \quad S_a : 0,019380852 \quad \text{y} \quad S_a \text{ rel } (\%): 109,7 \%$$

*Los límites de confianza del término independiente se calculan mediante la ecuación $a \pm t S_a$, donde **t** es el valor de la t-Student para $(n - 2)$ grados de libertad y $P < 0,05$, y **S_a** es la varianza del valor de intersección.*

Si el valor cero, se encuentra dentro de los límites de intersección, este método no tiene “sesgo” y se considera proporcional.

Así tenemos que para el método HPLC, el valor de intersección es de $(- 5860,25) \pm 4712,3534$ con valor del límite superior de $(- 1147,90)$ y valor del límite inferior de $(- 10572,61)$ y como no incluye al cero entre sus límites, podemos considerar que el método HPLC presenta sesgo.

El método espectrofotométrico presenta un valor de intersección de $0,017665925 \pm 0,039924556$ con valor del límite superior de $0,0575$ y valor del límite inferior de $(- 0,0222)$ y como incluye el cero, el método espectrofotométrico no presenta sesgo y por tanto, como pasa por el origen de coordenadas, se puede considerar, en el intervalo de concentraciones estudiado, proporcional a sus valores de absorbancia.

2.4 Límite de detección:

Se define como la cantidad mínima de analito que se puede detectar en una muestra. Existen distintas técnicas para la determinación del límite de detección teórico, según la

ecuación propuesta (Morellu, 1983) que ya ha sido empleada en otros trabajos de experimentación (Torrado, 1994)

$$DL = S\sigma^2 \left\{ \frac{n-2}{n-1} \right\}^{1/2} * tp / b$$

Donde **n** es el número de muestras, **tp** es el valor t de Student para n – 2 grados de libertad y $P < 0,05$; **b** es la pendiente y **Sσ²** es el cuadrado de la varianza que caracteriza la dispersión de las muestras con respecto a la línea de regresión.

Así para HPLC, el límite de detección es: 22798, 93.

Debido a que la recta de HPLC presenta sesgo, calcularemos el límite de detección a partir de los resultados de área, lo que nos permitirá conocer la menor cantidad de principio activo que somos capaces de detectar por nuestro método. Este límite de detección se corresponde con un valor de concentración de 19,61 µg/ml.

2.5. Límite de cuantificación:

Se define como la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar en una muestra con aceptable precisión y exactitud. El cálculo del límite de cuantificación lo realizamos mediante el análisis de tres concentraciones diferentes dentro de la recta de calibrado. Las concentraciones estudiadas fueron 60, 62 y 65 µg/ml. Los resultados obtenidos, nos permiten considerar que existe una diferencia entre 60 y 65 µg/ml, capaz de ser detectada en nuestra recta de calibrado, permitiéndonos considerar que variaciones de concentración de 5 µg/ml sí que podrán ser cuantificadas por el método HPLC.

El cálculo del límite de cuantificación experimental para espectrofotometría lo realizamos mediante el análisis de tres concentraciones distintas dentro del rango de calibración, que fueron 60, 62 y 65 µg/ml. Los resultados obtenidos nos permiten considerar que existe una diferencia entre 60 y 65 µg/ml, capaz de ser detectada en nuestra recta de calibrado, permitiendo que variaciones de concentraciones de 4 µg/ml puedan ser cuantificadas de forma experimental por este método.

3° Precisión:

La precisión expresa el grado de acercamiento (grado de dispersión) entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras, dando idea de los errores aleatorios.

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad es la medida de la variación observada en el método por el mismo analista en un día de trabajo. Se determina analizando un número significativo de muestras de un lote homogéneo, por medio del coeficiente de variación (C.V.) y a partir de tres concentraciones distintas, de forma que valores de coeficiente de variación menores del 5 % serán considerados como aceptables (Torrado, 1996).

La repetibilidad del método, tanto para técnica de HPLC como para técnica espectrofotométrica, fue determinada mediante el análisis de 6 alícuotas de 3 muestras de concentraciones de principio activo de 45 µg/ml para la muestra que contenía el 75 % ; 60 µg/ml para la muestra que contenía el 100 %, y 75 µg/ml para la muestra que contenía el 125 % . Los valores obtenidos y sus coeficientes de variación se recogen en la tabla 7.

Tabla 7: Repetibilidad para HPLC y espectrofotometría

MUESTRA	REPETIBILIDAD (HPLC)			REPETIBILIDAD (ESPECTROFOTOMETRÍA)		
	75 %	100 %	125 %	75 %	100 %	125 %
1	74,04	100,8	129,35	72,86	101,3	127,95
2	71,85	91,10	130,75	74,85	100,17	129,3
3	71,92	94,51	128,62	69,7	93,37	126,47
4	70,91	98,5	126,04	67,73	94,5	128,43
5	68,77	99,48	127,18	70,25	99,61	129,01
6	69,5	95,55	126,81	71,3	98,47	125,03
Media ± SD	71,16 ± 1,89	96,65 ± 3,61	128,1 ± 1,76	71,11 ± 2,49	97,9 ± 3,22	127,69 ± 1,65
CV	2,65	3,73	1,37	3,51	3,29	1,29

Al presentar los valores de CV para HPLC como máximo de 3,73 y para la técnica espectrofotométrica de 3,51, podemos afirmar que ambas técnicas tienen una buena repetibilidad.

La reproducibilidad expresa la precisión del método analítico cuando es realizado en condiciones ligeramente diferentes, en nuestro caso diferentes días. Se determina analizando un número significativo de muestras tomadas de un lote homogéneo, en diferentes laboratorios, por distintos analistas y diferentes equipos aplicando el mismo procedimiento analítico.

La reproducibilidad para HPLC y técnica espectrofotométrica, se determinó midiendo 3 muestras diferentes de principio activo de 45, 60 y 75 µg/ml, que se corresponden con el 75, 100 y 125 % durante 3 días distintos, obteniéndose los valores que se recogen en la tabla.8.

Tabla 8: Reproducibilidad por HPLC y espectrofotometría

DIAS	REPRODUCIBILIDAD (HPLC)			REPRODUCIBILIDAD (ESPECTROFOTOMETRIA)		
	75 %	100 %	125 %	75 %	100 %	125 %
1	72,86	97,7	128,32	73,13	98,23	125,07
2	70,32	98,32	125,4	72,21	99,13	126,14
3	68,13	96,17	127,13	70,47	96,07	127,10
Media±SD	70,43±2,36	97,39±1,10	126,9±1,46	71,93±1,35	97,81±1,57	126,1±1,01
CV	3,36	1,13	1,15	1,87	1,60	0,80

Al presentar el CV para HPLC como máximo 3,36 y 1,87 para técnica espectrofotométrica, podemos considerar que ambas técnicas tienen buena reproducibilidad.

Las técnicas analíticas de HPLC y espectrofotométrica presentan valores de CV inferiores al 5 % tanto para la reproducibilidad como para la repetibilidad, considerándose por tanto técnicas precisas.

4° Exactitud

La exactitud del método se determinó realizando 3 diluciones distintas, preparadas mediante la adición del principio activo y la cantidad proporcional de cada excipiente empleado en nuestras dispersiones sólidas. Como excipientes se usaron albúmina, crospovidona y HPBCD. Este ensayo se realizará sólo con la mayor proporción de excipientes, considerando que, si en estas

proporciones tenemos buenos resultados de recuperación, parece lógico pensar que esta recuperación también se producirá con menores porcentajes de cada uno de estos excipientes.

La recuperación en porcentaje, para técnica espectrofotométrica, se calculó mediante comparación de las absorbancias ; para técnica de HPLC se calculó mediante comparación de las áreas obtenidas de una disolución patrón, según la tabla 9.

Tabla 9: Porcentaje de recuperación por espectrofotometría

TAL : CD (1:2)	TAL : CROSP (1:2)	TAL : ALB (1:2)
94,7	93,47	100,03
104,7	98,2	100,6
101,8	96,37	102,02

$n = 9$ media: $99,09 \pm 3,70$; CV= 3,73

Este coeficiente de variación nos permite considerar que la técnica espectrofotométrica tiene buena recuperación y que por tanto ninguno de los excipientes retiene al principio activo.

Tabla 10: Porcentaje de recuperación por HPLC

TAL: CD (1:2)	TAL:ALB (1:2)
99,16	103,97
92,04	99,64
95,98	102,14

$n = 6$ media: $95,72 \pm 3,56$; CV= 3,72

Este coeficiente de variación nos permite considerar que la técnica de HPLC tiene una buena recuperación y que por tanto ninguno de los excipientes retiene al principio activo. En el caso de la crosopovidona no se llegó a realizar estudios de exactitud, debido a que no se utilizó la técnica de HPLC en este tipo de dispersiones sólidas.

9.7 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

9.7.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El estudio de la morfología de las distintas muestras se realiza mediante aproximación sencilla de la presentación de sus imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido con microscopio modelo Jeol® JSM 6400. Las muestras se depositan en el porta y se fijan a él en forma de una fina capa, a continuación se secan a vacío y se someten a un proceso de recubrimiento, con una capa de oro que permitirá su observación por SEM.

Las muestras se introducen en el microscopio electrónico de barrido y se toman fotografías a distintos aumentos, midiéndose con una regla la longitud de las partículas fotografiadas, determinándose así la longitud en micras con un factor de conversión, calculado gracias a la escala existente en las fotos.

9.7.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En un difractómetro Philips X Pert-MPD (CAI Difracción de Rayos X UCM, Facultad de Farmacia) se determinó la estructura cristalina de las muestras de Talidomida, que se fijaron al porta mediante presión y se expusieron a una radiación de $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) con un intervalo de 2θ desde 5 a 25°C , con una intensidad de 1000 cuentas y con un tamaño de paso de $0,04^\circ (2\theta)$ y 1 segundo por paso.

9.7.3 RMN- ^1H

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) está descrita en la Real Farmacopea Española (1997) y se basa en la propiedad de núcleos, como es nuestro caso de ^1H , de poseer un momento magnético nuclear permanente. Cuando éstos se sitúan en un campo magnético exterior toman con respecto a él ciertas orientaciones bien definidas a las que corresponden niveles de energía distintos.

Un espectro de resonancia magnética protónica se presenta como un conjunto de señales correspondientes a los protones y características de su entorno nuclear y electrónico en la molécula. La separación entre una señal dada y la que corresponde a un compuesto de referencia, se llama desplazamiento químico (δ), se expresa en partes por millón (ppm) y caracteriza al tipo de protón en función del entorno nuclear y electrónico. Con frecuencia las señales se subdividen en grupos de picos relacionados, llamados dobletes, tripletes... multipletes. Esta multiplicidad se debe a la presencia de

campos magnéticos permanentes procedentes de núcleos adyacentes. La intensidad de cada señal, medida por la superficie bajo la señal, es proporcional al número de protones equivalentes.

Equipo: un espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

Procedimiento: disolver las muestras a examinar en un disolvente orgánico deuterado, que en nuestro caso será el dimetilsilano (DMS), que aparece a 2,5 ppm.

9.8 MÉTODOS DE FARMACOTECNIA

9.8.1 ENSAYO DE DISOLUCIÓN PARA FORMAS ORALES SÓLIDAS

Este ensayo se describe en la Real Farmacopea Española (1997) y se utiliza para determinar la velocidad de disolución del principio activo en formas orales sólidas.

Se utiliza tanto el dispositivo de paletas como el de cestillo en dos aparatos de disolución distintos, Turu-Grau® y Van-Kel®, siendo su constitución la siguiente:

Equipo de paleta: formado por:

- *Un envase cilíndrico de fondo semiesférico, de vidrio borosilicatado o de otro material transparente. El envase está dotado de una tapa, para evitar la evaporación, un orificio central por el que pasa el eje del agitador y otros orificios que permiten la introducción de un termómetro y de los dispositivos de toma de muestra. El volumen a utilizar en este envase es de 500 ml de medio de disolución.*
- *Medio de disolución: es una solución al 0,1N de ácido clorhídrico (medio 0); con 0,5 mg/ml de LSNa (medio 1); con 1 mg/ml de LSNa (medio 2) y con 2 mg/ml de LSNa (medio 3).*
- *Un agitador constituido por un eje vertical, en cuya parte interior se fija una paleta, cuya forma corresponde a una parte de un círculo delimitada por dos planos paralelos. La paleta está insertada en el centro del eje de tal forma que, su base coincide exactamente con el nivel del extremo del eje, el cual se coloca de forma que no se desvíe más de 2 mm del eje del envase y que la parte inferior de la paleta se sitúe a una distancia de 25 ± 2 mm del fondo interior del envase. La parte superior del eje del agitador, está unida a un motor dotado de un regulador de velocidad que gira en nuestro caso a 100 rpm.*
- *Un baño de agua termostado que permite mantener la temperatura del medio de disolución a 37°C durante el ensayo.*

Equipo de cestillo: formado por:

- *Un envase idéntico al descrito para el equipo de paleta.*
- *Medio de disolución: idéntico al descrito para el equipo de paleta.*
- *Un agitador constituido por un eje vertical en cuya parte inferior se fija un cestillo cilíndrico constituido por dos partes; la parte superior consiste en una placa con un orificio de 2 mm soldada al eje agitador y la parte inferior, cilíndrica, constituida por una tela soldada; los hilos tienen un diámetro de 0,254 mm y la abertura de las mallas cuadradas es de 0,381 mm; la tela está bordeada en*

cada extremo por una estrecha banda metálica. La parte inferior, que es amovible, se destina a recibir la muestra. Mediante unas ligaduras se ajusta la parte superior del cestillo y se fija la parte inferior al eje del envase de forma concéntrica durante el ensayo. La distancia del cestillo al fondo interior del envase debe ser de 25 ± 2 mm. La parte superior del eje del agitador está unida a un motor dotado de un regulador de velocidad que gira en nuestro caso a 50 rpm.

- *Un baño de agua termostado que permite mantener la temperatura del medio de disolución a 37°C durante el ensayo.*

Procedimiento: tanto para el equipo de paleta como de cestillo

Introducir en el envase el volumen del medio de disolución calentándolo hasta $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Para el equipo en paleta, se coloca la unidad en el fondo del envase y en un cestillo para el segundo equipo. Evitar cuidadosamente la formación de burbujas en la superficie y poner en marcha los distintos aparatos de disolución a la velocidad indicada controlandose con una precisión de $\pm 4\%$.

Toma de muestras y evaluación:

Para ambos equipos, paleta y cestillo, se efectúa la toma de muestras del medio de disolución con una frecuencia determinada, en una zona equidistante entre la superficie del mismo y la parte superior de la paleta o del cestillo. Las muestras se filtran y se procede a su análisis, expresándose en porcentaje de contenido la cantidad de principio activo disuelto en un tiempo prescrito.

La preparación cumple con el ensayo de disolución cuando el contenido individual está comprendido entre el 85 al 115% del contenido medio.

9.8.2 ENSAYO DE DISGREGACIÓN DE COMPRIMIDOS

Este ensayo se describe en la Real Farmacopea Española (1997) y se utiliza para determinar la mayor o menor aptitud de los comprimidos para disgregarse en medio líquido, entendiéndose por “disgregación” cuando no queda residuo sobre la rejilla o, si queda residuo, está constituido solamente por una masa blanda que no constituye un núcleo palpable y no impregnado o no permanecen sobre la rejilla más que fragmentos de recubrimiento o de cubierta.

Aparato: PHARMA TEST PTZ 1®

El equipo utilizado para el ensayo de disgregación cumple con las indicaciones descritos en la Real Farmacopea Española (1997) y lo forma un aparato constituido por un ensamblaje rígido que soporta 6 tubos cilíndricos de vidrio provistos de un disco cilindrico, que está atravesado por cinco orificios. Los tubos se mantienen verticales mediante dos placas atravesadas cada una por seis orificios que son equidistantes del centro de la placa. Bajo la placa inferior, se fija una tela metálica y la placa superior lleva igualmente una varilla metálica que permite conectar esta ensambladura a un dispositivo mecánico, destinado a asegurar un movimiento vertical.

A continuación se coloca el aparato en un vaso de precipitados con agua hasta un volumen que cuando el conjunto esté en la posición más elevada, la rejilla metálica se encuentra a menos de 15 mm por debajo de la superficie del líquido y cuando el conjunto esté en la posición más baja, la rejilla está a menos de 25 mm del fondo, manteniendo los extremos superiores de los tubos abiertos por debajo de la superficie del agua que se mantiene a una temperatura de 37°C.

Procedimiento:

El procedimiento consiste en introducir en cada tubo un comprimido y situar el conjunto en el vaso cilíndrico que contiene el agua, de forma que se mide la disgregación con 6 comprimidos. Poner en funcionamiento el aparato y retirar el conjunto para examinar el estado de los comprimidos. El ensayo es satisfactorio si todas las muestras están disgregadas.

9.8.3 RESISTENCIA DE LOS COMPRIMIDOS A LA ROTURA

Este ensayo se describe en la Real Farmacopea Española (1997) y tiene como finalidad la determinación de la resistencia a la rotura de los comprimidos, medida como la fuerza necesaria para provocar su rotura por aplastamiento.

Aparato: PHARMA TEST PTB 311®

Consiste en una mordaza con dos mandíbulas enfrentadas que se desplazan una hacia la otra. La superficie de aplastamiento de las mandíbulas es plana y mayor que la zona de contacto con el comprimido.

Procedimiento:

Se situa el comprimido entre las mandíbulas y se efectúa la medida de 10 comprimidos, dando el valor medio junto con su desviación estándar, mínimo y máximo de las fuerzas medidas expresadas en newtons.

9.8.4 DETERMINACIÓN DEL PESO

Este ensayo se realiza de acuerdo con las especificaciones generales de la Real Farmacopea Española (1997) de uniformidad de masa de las preparaciones presentadas en dosis únicas.

Aparato: METTLER AJ 100[®]

En una balanza de precisión se obtiene el peso de los comprimidos.

Procedimiento:

Previamente se calibra la balanza y a continuación procedemos a la pesada de cada comprimido, hasta un total de 20 comprimidos, expresando los resultados como peso medio junto con el valor de su desviación estándar. La masa individual, de cómo máximo 2 de los 20 comprimidos, puede desviarse de la masa media en un porcentaje mayor de un 5% (para comprimidos de 250 mg o más); pero la masa de ninguna unidad puede desviarse en más del doble de este porcentaje.

9.8.5 DETERMINACIONES DE ALTURA Y DIÁMETRO DE LOS COMPRIMIDOS

Las dimensiones de los comprimidos se calculan con un calibre expresando los resultados en mm.

Aparato: PIE DE REY

Es un medidor de las dimensiones de los comprimidos.

Procedimiento:

Se procede a medir la altura y el diámetro de 10 comprimidos, expresando el resultado como altura media y diámetro medio junto con sus respectivas desviaciones estándares.

9.9 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los parámetros estadísticos se han realizado con el programa “ Statgraphics Plus 3.0” a partir de una distribución normal; por ello la medida de la tendencia central de los resultados se presenta como la media de varias determinaciones replicadas.

Para describir la variabilidad asociada a las determinaciones se presenta el coeficiente de variación, parámetro más fácil de comparar, calculado a partir de la desviación estándar con denominador “ $n - 1$ ”, también denominada cuasidesviación típica (Sánchez,1996).

Se ha empleado el cálculo de los intervalos de confianza, con un nivel de confianza del 95%, considerando la normalidad de los datos, para conocer el intervalo en el que se encuentra el valor medio real de la población (Martín 1994). En aquellos casos en los que se comparan varios grupos y se determina que la variabilidad en todos los grupos es semejante, se emplea como mejor estimador la variabilidad conjunta de todos los grupos, calculada en el análisis de varianza o variancia (Doménech,1999).

A partir de la variabilidad global, encontrada en las determinaciones con homogeneidad de varianza y del tamaño de muestra empleado, se han calculado las diferencias que se pueden detectar con los contrastes estadísticos.

En la mayoría de los parámetros calculados se ha supuesto que se cumple la distribución normal, debido a que no disponemos de suficientes medidas como para realizar una prueba estadística para comprobarlo y a que la normalidad suele asumirse siempre que no haya indicios que aconsejen lo contrario.

Las comparaciones de los resultados medios de los distintos parámetros determinados en más de dos grupos se han realizado mediante análisis de varianza de una vía, en los casos en los que únicamente se pretende determinar la existencia de diferencias entre grupos, y no determinar la influencia de los factores en el resultado. Para realizar este análisis se asume que los datos son homocedásticos, es decir, se cumple la condición de homogeneidad de varianza y, además, que la distribución es normal.

Al mismo tiempo que se realiza el análisis de varianza, se comprueba la existencia de diferencias entre los valores medios de cada uno de los grupos mediante los contrastes de comparaciones múltiples de las diferencias menos significativas.

9.10 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA HUMEDAD

La determinación de la humedad de nuestro principio activo, se puede realizar mediante la pérdida de peso, por secado o mediante el método de Karl-Fischer. En nuestro estudio, se ha seleccionado este último método porque requiere una menor cantidad de muestra.

El ensayo se realizó en un equipo Methrom® sobre una muestra de 100 mg aproximados, pesados exactamente, que proporciona de forma automática el resultado de la humedad en porcentaje al introducir el peso de la muestra analizada. Se realizaron tres determinaciones y se presentan los datos de la media junto con su desviación estándar.

El equipo adiciona el reactivo de Karl-Fischer, mediante un dosificador automático al vaso que contiene metanol según Karl-Fischer y la muestra depositada antes de iniciar el funcionamiento del equipo, hasta que un potenciómetro detecta que se ha consumido todo el agua que contenía la muestra.

Para poder determinar el comportamiento higroscópico de la Talidomida, se somete la cantidad aproximada 0,5 g de principio activo a las siguientes condiciones descritas de temperatura y humedad durante un periodo de tiempo de 6 meses.

Tabla 11: condiciones de temperatura y humedad para estudios de higroscopicidad

MUESTRA	DESECANTE	HUMEDAD	TEMPERATURA	VIAL
1	NaClO_3	75 %	25° C	Abierto
2		16 %	25° C	Abierto
3		97 %	25° C	Abierto
4	CaCl_2	35 %	25° C	Abierto
5		50 %	25° C	Abierto
6	Cl_2Na	75 %	40° C	Abierto
7	$(\text{NO}_3)_2\text{Zn}6\text{H}_2\text{O}$	42 %	25° C	Abierto
8	$\text{Cl}_2\text{Ca}6\text{H}_2\text{O}$	32 %	25° C	abierto

9.11 SOLUCIONES DE TALIDOMIDA

Para seleccionar la solución tampón adecuada para la Talidomida, se llevan a cabo estudios de estabilidad con dos soluciones tampón de valor de pH 5; dos soluciones tampón de valor de pH 6,5; una solución tampón de pH 7,4 y otra solución tampón de pH 8,4 .

Las soluciones tampón que se emplean para este estudio están recogidas en el capítulo de reactivos y material y son:

- | | |
|---|------------------|
| - solución tampón ftalato ácido potásico | pH 5,4 |
| - solución tampón fosfato potásico monobásico | pH 6,4 |
| - solución tampón citrato | pH 5 (0,75 M) |
| - solución tampón citrato | pH 5 (0,375 M) |
| - solución tampón citrofosfato | pH 6,5 |
| - solución tampón fosfato | pH 7,4 (0,2 M) |
| - solución tampón ácido bórico | pH 8,4 (0,2 M) |

Las muestras parten de 2 ml de una solución patrón de Talidomida, preparada según el método analítico, ajustando a volumen de 10 ml con cada una de las anteriores soluciones tampón, de forma que la concentración inicial de principio activo es de 50 µg/ml. Una vez preparadas las muestras, se conservan en condiciones de 25° C de temperatura y 60 % de humedad y en condiciones aceleradas de temperatura 40° C y humedad del 75 % hasta su análisis.

9.12 MEZCLAS FÍSICAS

Se preparan con el objeto de observar las diferencias estructurales y morfológicas existentes entre los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD frente a la respectiva mezcla física, así como las diferencias entre las dispersiones sólidas de Talidomida con ovoalbúmina y crospovidona frente a las correspondientes mezclas físicas.

Las muestras de Talidomida se preparan a partir de 80 mg de principio activo, seguidos de agitación vigorosa durante 5 minutos. Las muestras de la mezcla física (Talidomida: vehículo) en relaciones (p/p) 1:1 y 1:2 siendo los vehículos la HPBCD, albúmina y crospovidona, se preparan a partir de 80 mg de Talidomida y 80 mg de vehículo para la relación 1:1, y a partir de 80 mg de Talidomida y 160 mg de vehículo para la relación 1:2, seguidos de agitación vigorosa durante 5 minutos.

9.13 TALIDOMIDA RECRISTALIZADA

La Talidomida recristalizada se obtiene por proceso de liofilización y se realiza con el fin de observar la influencia del método en la obtención de complejos de inclusión con ciclodextrinas, así como de dispersiones sólidas con albúmina y crospovidona, pudiéndose analizar la morfología, estructura física y velocidad de disolución del principio activo tras el proceso de recristalización.

Para llevar a cabo el proceso de liofilización, preparamos las muestras de nuestro principio activo, de forma que se pesa la cantidad de 80 mg de Talidomida y se disuelven en 24 ml de DMSO, llevando a volumen de 180 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M)

Las muestras se congelan a partir de la temperatura ambiente, hasta alcanzar gradualmente la temperatura de (- 40° C) manteniéndolas así durante diez horas.

A continuación se someten las muestras a un proceso de liofilización en liofilizador tipo TELSTAR L3[®]. En muchos casos, con el fin de acelerar el proceso de liofilización, se aporta una desecación secundaria que no fue empleada para el caso de la Talidomida, ya que nuestro principio activo podía sufrir alteraciones en su estabilidad (Krenn, 1992) y por ello, para evitar esta degradación con la desecación, tuvimos cuidado de que la temperatura del ciclo no sobrepasara los 25° C. La duración del ciclo de liofilización variará en función del volumen a liofilizar.

Una vez obtenida la Talidomida recristalizada, se conserva en viales herméticamente cerrados, protegidos de la luz y con silicagel para evitar la captación de humedad.

9.14 SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS

Las CDs empleadas para la determinación del coeficiente de solubilidad de la Talidomida son : HPBCD, metoxi CD y γ CD.

Se preparan muestras de Talidomida por triplicado en las proporciones de CD de 0 % ; 2,5 % ; 5 % ; 7,5 % ; 10 % ; 12,5 % ; 15 % ; 17,5 % ; 20 % ; 25 % y 50 % de la forma:

0 % : Adicionar 0,4 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375M).

Para los estudios de solubilidad comparada entre medios de disolución, se pesan 5 mg de principio activo y se llevan a 10 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M) y en otros casos se llevan a 10 ml con solución citrofosfato pH 6.

2,5 % : Adicionar 0,05 g de CD junto con 0,5 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M).

5 % : Adicionar 0,1 g de CD junto con 1 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

7,5 % : Adicionar 0,15 g de CD junto con 1,5 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

10 % : Adicionar 0,2 g de CD junto con 2 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

12,5 % : Adicionar 0,25 g de CD junto con 2,5 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

15 % : Adicionar 0,3 g de CD junto con 3 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

17,5 % : Adicionar 0,35 g de CD junto con 3,5 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato pH 5 (0,375 M).

20 % : Adicionar 0,4 g de CD junto con 4 mg de Talidomida y llevar a volumen de 2 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M).

25 % : Adicionar 2,5 g de CD junto con 25 mg de Talidomida y llevar a volumen de 10 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M) y otras muestras con solución tampón citrofosfato pH 6,5 .

50 % : Adicionar 5 g de CD y llevar a volumen de 10 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M) y otras muestras con solución tampón citrofosfato pH 6,5.

Una vez preparadas las muestras y siguiendo el método analítico de disolución para la Talidomida, llevamos las muestras a un baño de agitación, donde la temperatura del agua es de 25° C y la humedad relativa ambiental de 60 %, permaneciendo así un periodo de tiempo de 2 horas.

Transcurrido este tiempo, se procede a la lectura espectrofotométrica de todas las muestras a λ de 299 nm, que es donde se presenta el máximo de absorción para nuestro principio activo y donde no existe absorción por parte de las CDs, luego no hay interferencias en el análisis.

La lectura espectrofotométrica de las muestras de CD al 0 % y a 2,5 % se hace directamente a λ de 299 nm, mientras que para el resto se hace una dilución previa a su lectura.

El blanco es una solución citrato de pH 5 (0,375 M) en los casos donde el medio de disolución sea esta solución y una solución citrofosfato pH 6,5 en los casos donde el medio de disolución sea esta otra solución.

9.15 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CICLODEXTRINAS

Para el estudio de la estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con CDs se preparan soluciones de concentración inicial de principio activo de 50 µg/ml de la forma siguiente:

Solución (1 : 1) TAL:HPBCD :

Pesar 10 mg de Talidomida y disolverlos en 40 ml de DMSO adicionando 10 mg de HPBCD y llevando a volumen de 200 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 2) TAL:HPBCD :

Pesar 10 mg de Talidomida y disolverlos en 40 ml de DMSO adicionando 20 mg de HPBCD y llevando a volumen de 200 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 5) TAL:HPBCD :

Pesar 10 mg de Talidomida y disolverlos en 40 ml de DMSO adicionando 50 mg de HPBCD y llevando a volumen de 200 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 9) TAL:HPBCD :

Pesar 10 mg de Talidomida y disolverlos en 40 ml de DMSO adicionando 90 mg de HPBCD y llevando a volumen de 200 ml con solución tampón citrato pH 5 (0,375 M).

9.16 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE TALIDOMIDA CON CICLODEXTRINAS

El método de obtención de los complejos de inclusión de nuestro principio activo con CDs es por medio de la técnica de liofilización. Con este proceso podemos desecar disoluciones de nuestro principio activo, muy inestables en presencia de agua, con el fin de obtener un polvo liofilizado, constituido por todas las sustancias sólidas existentes en el medio acuoso originario.

Se estudia el efecto de los distintos vehículos y de las diferentes proporciones Talidomida: vehículo; para ello se preparan complejos de inclusión de Talidomida con la HPBCD en diferentes proporciones (p/p) de principio activo : vehículo (1:1, 1:2) de forma:

Complejo de inclusión (1 : 1) TAL:HPBCD :

Pesar la cantidad de 80 mg de Talidomida y disolverlos en 24 ml de DMSO adicionando 80 mg de HPBCD y llevando a volumen de 180 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M).

Complejo de inclusión (1 : 2) TAL: HPBCD :

Pesar la cantidad de 80 mg de Talidomida y disolverlos en 24 ml de DMSO adicionando 160 mg de HPBCD y llevando a volumen de 180 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M).

A continuación se someten las muestras a un proceso de liofilización en liofilizador tipo TELSTAR. L3[®]

La conservación es en botes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y con silicagel para evitar la captación de humedad.

Los análisis se realizan por técnica espectrofotométrica, porque como ya se ha indicado, la HPBCD utilizadas en la preparación de los complejos de inclusión de nuestro principio activo, no influyen en la lectura espectrofotométrica de nuestro fármaco (gráfico 25).

9.17 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON ALBÚMINA

Para el estudio de la estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con albúmina, se preparan soluciones de concentración inicial de principio activo de 80 µg/ml de la forma siguiente:

Solución (1 : 1) TAL : ALB :

Se pesan 10 mg de Talidomida y se disuelven en 40 ml de DMSO añadiendo 10 mg de albúmina y llevando a volumen de 125 ml con tampón citrato buffer pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 2) TAL : ALB :

Se pesan 10 mg de Talidomida y se disuelven en 40 ml de DMSO añadiendo 20 mg de albúmina y llevando a volumen de 125 ml con tampón citrato buffer pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 5) TAL : ALB :

Se pesan 10 mg de Talidomida y se disuelven en 40 ml de DMSO añadiendo 50 mg de albúmina y llevando a volumen de 125 ml con tampón citrato buffer pH 5 (0,375 M).

Solución (1 : 9) Talidomida : albúmina :

Se pesan 10 mg de Talidomida y se disuelven en 40 ml de DMSO añadiendo 90 mg de albúmina y llevando a volumen de 125 ml con tampón citrato buffer pH 5 (0,375 M).

9.18 DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CON CROSPVIDONA

El método de obtención de las dispersiones sólidas de Talidomida con ovoalbúmina y con crospovidona es por medio de la técnica de liofilización. Con este proceso podemos desecar disoluciones de nuestro principio activo muy inestables en presencia de agua, con el fin de obtener un polvo liofilizado, constituido por todas las sustancias sólidas existentes en el medio acuoso originario.

Se estudia el efecto de los distintos vehículos y de las diferentes proporciones Talidomida: vehículo; para ello se preparan dispersiones sólidas de Talidomida a partir de dos vehículos distintos (albúmina y crospovidona) en diferentes proporciones (p/p) de principio activo : vehículo (1:1, 1:2) según:

Dispersión (1 : 1) TAL: vehículo :

Pesar la cantidad de 80 mg de Talidomida y disolverlos en 24 ml de DMSO adicionando 80 mg de vehículo y llevando a volumen de 180 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M).

Dispersión (1 : 2) TAL: vehículo :

Pesar la cantidad de 80 mg de Talidomida y disolverlos en 24 ml de DMSO adicionando 160 mg de vehículo y llevando a volumen de 180 ml con solución citrato de pH 5 (0,375 M).

A continuación se somete a las muestras a un proceso de liofilización en liofilizador tipo TELSTAR.L3[®]

La conservación es en botes herméticamente cerrados, protegidos de la luz y con silicagel para evitar la captación de humedad.

Los análisis se realizan por técnica espectrofotométrica porque, como ya se ha indicado, los vehículos utilizados en la preparación de las dispersiones sólidas de nuestro principio activo (albúmina y crospovidona) no influyen en la lectura espectrofotométrica de nuestro fármaco (gráficos 23 y 24).

10

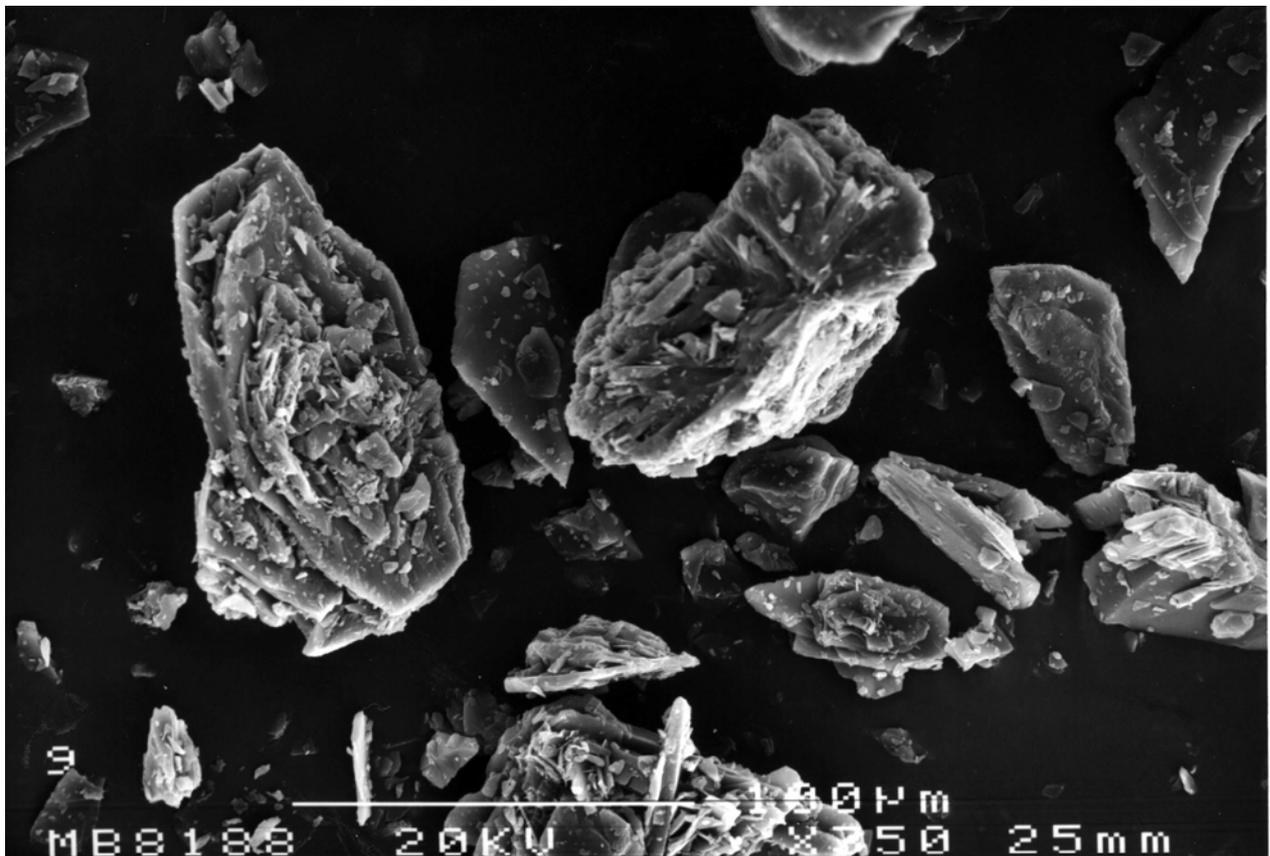
TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

10.1 ANÁLISIS DE LA TALIDOMIDA

Se lleva a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de la Talidomida materia prima. En el análisis cualitativo se estudia la morfología de la Talidomida materia prima por microscopía electrónica de barrido y la estructura cristalina mediante difracción de RX. En el análisis cuantitativo se estudia la riqueza del principio activo por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Análisis cualitativo:

La morfología de la Talidomida materia prima se analiza por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando microscopio Jeol® JSM 6.400, obteniendo la microfotografía 2 donde se observa a 350 aumentos partículas de distinto tamaño, con superficie rugosa.



microfotografía 2 : morfología de la Talidomida materia prima (x 350 aumentos)

La difracción de RX nos permite estudiar la estructura cristalina de la Talidomida materia prima representada en el gráfico 14.

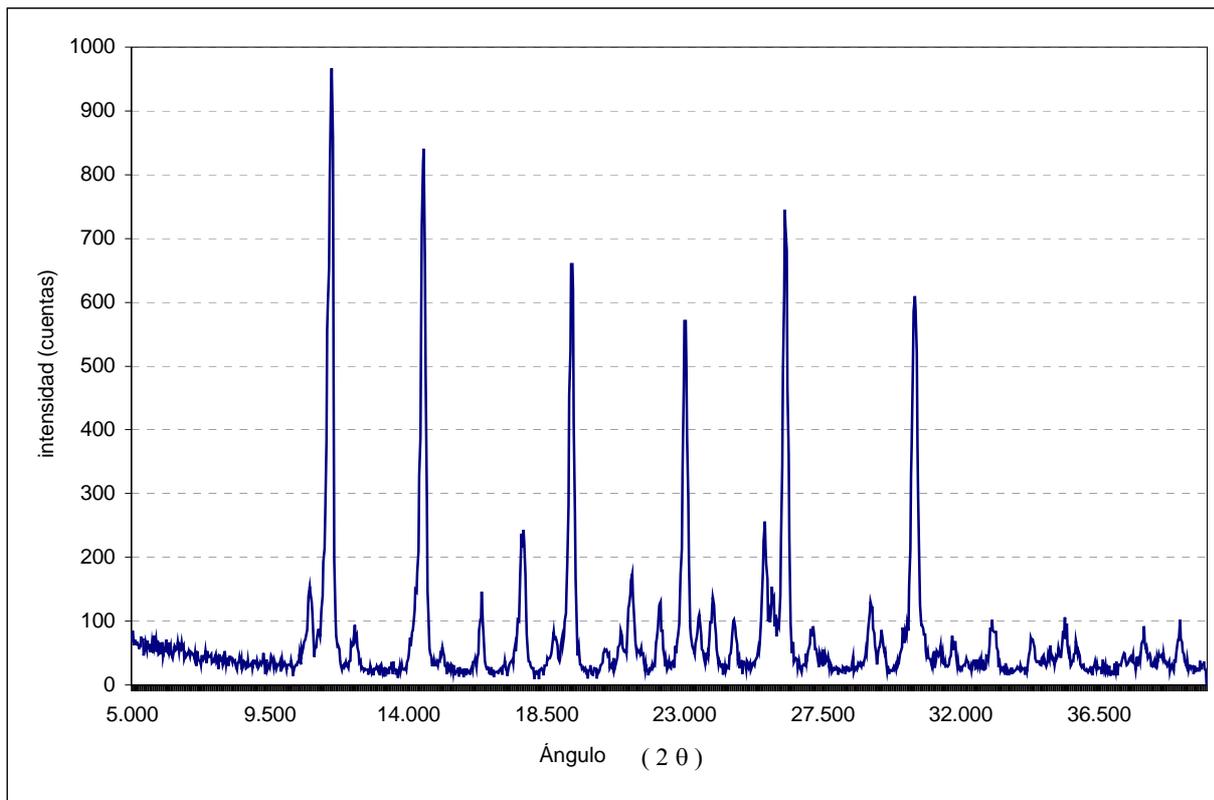


gráfico 14: Difractograma de la Talidomida materia prima (azul)

Este difractograma nos identifica a la materia prima como un producto cristalino con unos máximos de intensidad bien definidos.

Análisis cuantitativo:

Para determinar la riqueza de la Talidomida sintetizada para esta memoria tomamos como sustancia patrón la Talidomida suministrada por el CNF.

Para proceder con el análisis cuantitativo de nuestro principio activo preparamos soluciones de Talidomida sintetizada y Talidomida patrón, partiendo de 50 mg en 200 ml de DMSO, de la cual se hace una dilución para tener una concentración de principio activo de 80 µg/ml.

A continuación se analizan las muestras por HPLC siguiendo el método descrito para la Talidomida y se halla la riqueza de la Talidomida sintetizada, obteniéndose un valor medio de riqueza obtenido de 95,94%.

10.2 SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIÓN PATRÓN

El estudio del coeficiente de solubilidad de la Talidomida en solución patrón se realiza mediante el método de agitación; para ello se estudia la influencia de distintas soluciones amortiguadoras del pH en la solubilidad de nuestro principio activo, ensayando con medios ácidos, medios próximos a la neutralidad y medios alcalinos.

Las soluciones amortiguadoras del pH que se van a estudiar presentan todas ellas igual tono osmótico, con valor próximo a 0,28 y valores de pH: 2,4; 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4; y 8,4 que se preparan según descripción del método analítico de solubilidad de la Talidomida en solución patrón.

A partir de los análisis de HPLC, se representa en la gráfica 26 el coeficiente de solubilidad de la Talidomida en condiciones de 25°C de temperatura y humedad del 60% al cabo de un periodo de tiempo de 24 horas.

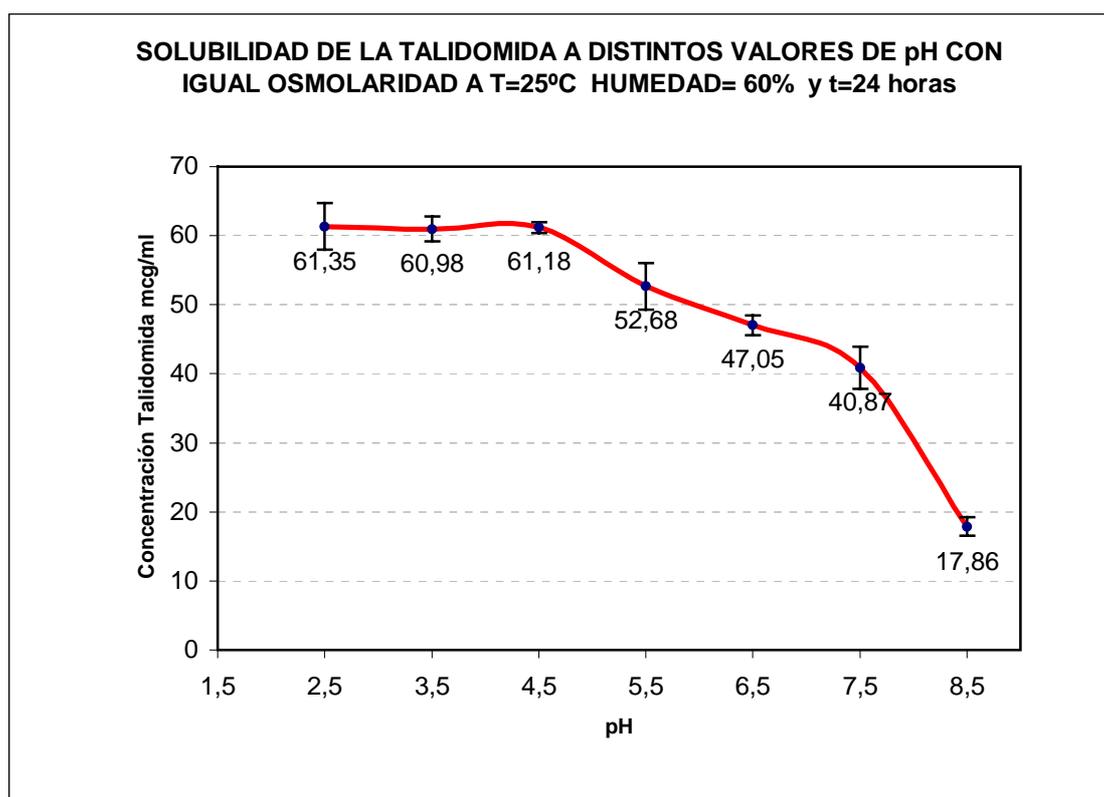


Gráfico 26: coeficiente de solubilidad de la Talidomida en soluciones de distintos valores de pH

El mejor coeficiente de solubilidad para nuestro principio activo se obtiene en medio ácido y a medida que el valor del pH es menor; de forma que, para los valores de pHs comprendidos de 2,4 a 4,4 se alcanza la mayor solubilidad para la Talidomida sin apenas diferencias en cantidad. Sin embargo, este rango de pH es un inconveniente para una administración por vía oral.

Por otra parte, cuando se estudia la influencia sobre nuestro principio activo de valores de pHs superiores a 7,4 se observa un marcado descenso en los valores de solubilidad de la Talidomida, de forma que para el valor de pH de 8,4 el valor de solubilidad para nuestro principio activo es de 17,86 µg/ml.

El rango de valores de pHs comprendido entre 5,4 a 6,4 presenta unos valores de solubilidades para nuestro principio activo de 52,68 y 40,87 µg/ml, respectivamente. Este rango es de menor solubilidad que el rango ácido; pero resulta más compatible con el medio gastrointestinal, lo que facilita la administración de la Talidomida por vía oral.

En base a los estudios de solubilidades realizados sobre la Talidomida por el método de agitación, con diferentes soluciones amortiguadoras del pH, podemos indicar que a mayor acidez en el valor del pH hay una mayor solubilización de nuestro principio activo; pero para una propuesta por vía oral, elegimos el rango de valor de pH comprendido entre 5,4 a 6,4 que presenta unos valores de solubilidad para la Talidomida aceptables y sobre todo representa un rango viable para una vía oral.

10.3 CONDICIONES PREVIAS AL ENSAYO DE ESTABILIDAD

En el estudio siguiente se procede a determinar la estabilidad de la Talidomida en una solución patrón según condiciones del método analítico. Para ello se analizan muestras del principio activo a las 0, 1 y 2 horas de haberse preparado y haber estado sometida la solución a condiciones de 25° C de temperatura y 60 % de humedad .

El análisis cuantitativo se realizó mediante espectrofotometría, leyendo a λ del máximo de absorción de la Talidomida, que es a 299 nm según el método analítico.

Las representaciones espectrofotométricas de estabilidad de nuestro principio activo en solución patrón se representan en los gráficos 27,28 y 29, siendo respectivamente a las 0, 1 y 2 horas.

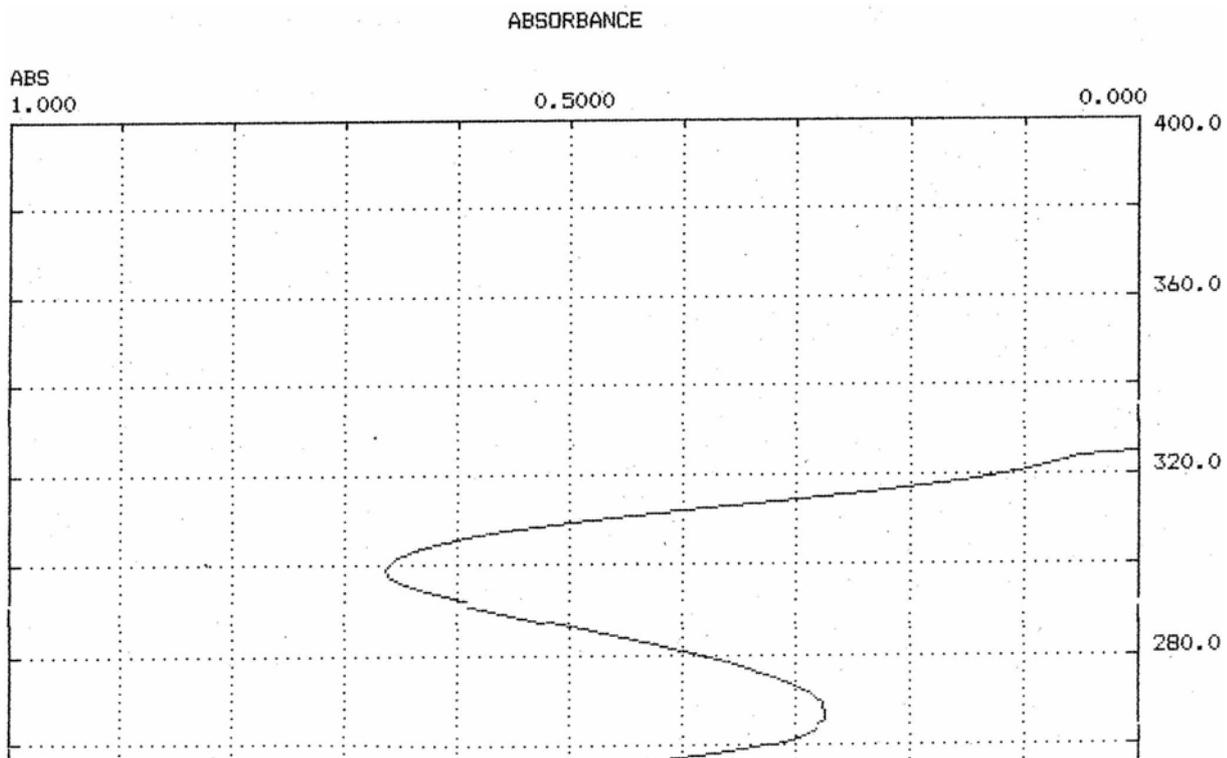


gráfico 27: Espectrofotograma de la solución patrón de Talidomida preparada extemporáneamente en condiciones normales (25° C, 60 %)

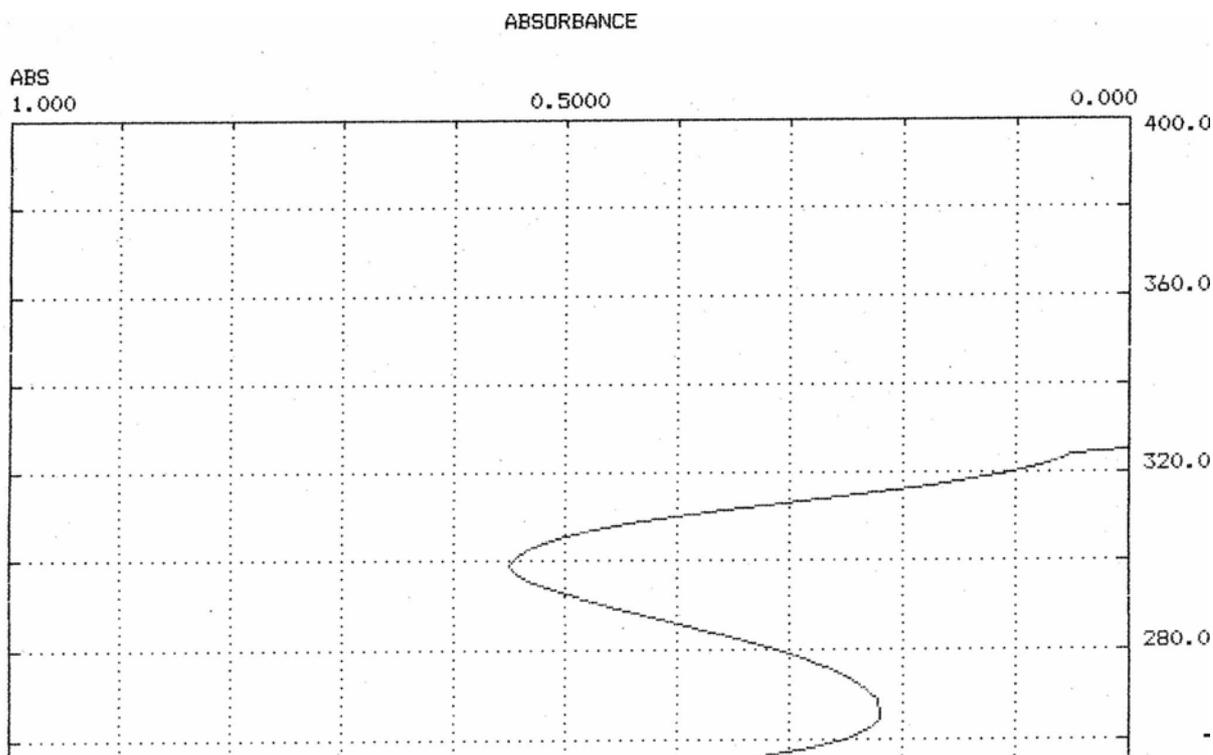


gráfico 28: Espectrofotograma de la solución patrón de Talidomida a una hora de preparación en condiciones normales (25° C, 60 %)

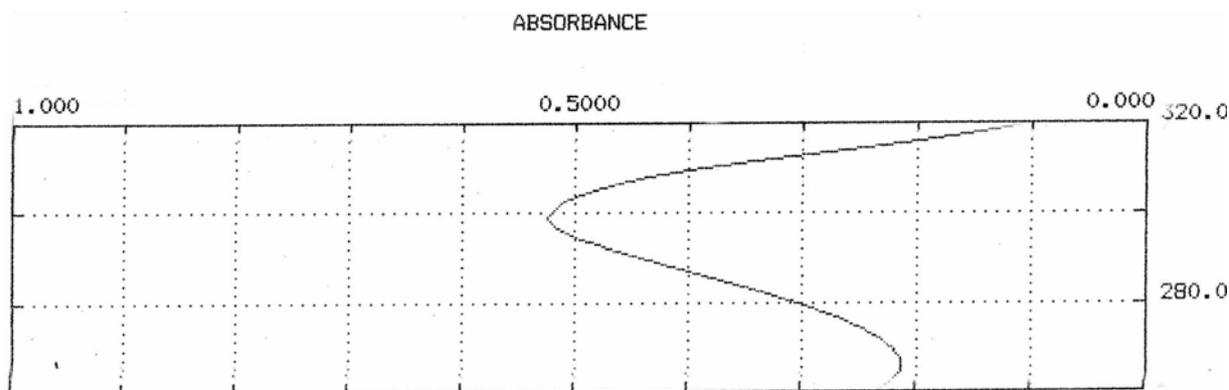


gráfico 29: Espectrofotograma de solución patrón de Talidomida a dos horas de preparación en condiciones normales (25°C, 60 %)

De forma cualitativa, observamos que el pico de absorbancia de la muestra que ha estado preparada por un periodo de tiempo de 2 horas, es menor que el de la muestra preparada a la hora y éste a su vez menor que el correspondiente pico que presenta la solución patrón de Talidomida, preparada de forma extemporánea, lo que nos lleva a concluir que, como cabía esperar, la absorbabilidad para la Talidomida disminuye a medida que aumenta el tiempo.

De forma cuantitativa, los porcentajes inalterados de Talidomida al cabo de 0, 1 y 2 horas de haber estado preparada se recogen en la tabla 12.

Tabla 12: Condiciones previas al ensayo de estabilidad de la Talidomida en solución patrón

MUESTRA	TIEMPO ALMACENAMIENTO	% TALIDOMIDA INALTERADO
1	0 horas	100 %
2	1 hora	95,84 %
3	2 horas	90,97 %

De los datos obtenidos se comprueba que efectivamente la Talidomida sufre hidrólisis espontánea en solución buffer (Schumacher, 1965), siendo el porcentaje inalterado de Talidomida muy dependiente del tiempo, ya que por hora la Talidomida experimenta una degradación de un 5 % en nuestra solución patrón de DMSO con valor de pH de 6,58 y preparada según el método analítico; mientras que Schumacher (1965) indica que a valor de pH 7,4 la Talidomida es rápidamente hidrolizada, desapareciendo el 28 % en 1 hora y prácticamente el 100 % en 24 horas.

Podemos indicar que al acidificar el medio de disolución se retarda la degradación de la Talidomida al aumentarse su estabilidad (Eriksson, 1992; Lyon, 1995), como se demuestra con nuestros resultados, ya que hemos logrado reducir el porcentaje degradado de principio activo por hora, pasando de un valor de 28 % en medio de pH 7,4 (Schumacher, 1965) a un valor de un 5 % en medio de pH 6,58.

10.4 ESTABILIDAD DE TALIDOMIDA EN SOLUCION PATRÓN

Se procede a realizar un estudio de estabilidad de la Talidomida materia prima en solución patrón en las condiciones de almacenamiento de temperatura 25° C y humedad 60 % y en condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % humedad).

Para ello, se preparan muestras de solución patrón de Talidomida, siguiendo el método analítico, que contienen una concentración de principio activo de 50 µg/ml, almacenándose parte de ellas a 25° C y 60 % de humedad para analizarse a las 0 horas y a los 15 días y otras muestras se guardan a 40° C y 75% de humedad para analizarse a las 24 y 48 horas.

Posteriormente, se alcalinizó el pH de la solución patrón de nuestro principio activo, pasando de valor inicial de pH de 6,58 a valor de pH de 11,6 mediante la adición de una solución tampón , analizándose a las 24 y 48 horas.

Los análisis de las muestras se realizaron por HPLC en las condiciones descritas en el método analítico, recogiendo los valores de porcentaje inalterado para Talidomida en la tabla 13.

Tabla 13: Estabilidad de la Talidomida en solución patrón

CONDICIONES	pH	TIEMPO	% TALIDOMIDA INALTERADO
25° C 60 %	6,58	0 horas	100 %
25° C 60 %	6,58	15 días	6,95 %
40° C 75 %	6,58	24 horas	102 %
40° C 75 %	6,58	48 horas	92,69 %
40° C 75 %	11,6	24 horas	No hay pico
40° C 75 %	11,6	48 horas	No hay pico

De los estudios de estabilidad de la Talidomida en solución patrón, en condiciones normales de almacenamiento (25° C y 60 % humedad) y tras la alcalinización del medio y sometido a condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % de humedad), se puede concluir que :

La Talidomida en nuestra solución patrón de pH 6,58 en condiciones de 25° C y 60 % de humedad, después de 15 días sufre una degradación superior al 90 %, quedando sólo un 7 % de Talidomida sin degradarse.

En condiciones aceleradas (40°C, 75%) nuestra solución patrón de pH 6,58 a las 48 horas, experimenta e una degradación del principio activo del orden de 7 %.

La solución patrón presenta un valor de pH de 6,58 y cuando elevamos el valor del pH hasta un nivel básico, el anillo de glutarimida de la molécula de Talidomida es más susceptible de hidrólisis(Schumacher, 1965) y la degradación de este principio activo es pH dependiente; por ello esta solución patrón de Talidomida a un valor de pH de 11,6 y a una temperatura de 40° C se degrada en su totalidad en menos de 24 horas, no apareciendo ningún pico en la muestra de análisis. Además, la ausencia de picos significativos en los cromatogramas de las muestras de carácter básico, nos confirma que los productos de degradación no tienen absorbancia en la longitud de onda seleccionada para el análisis (299 nm) y que no interfieren con el método analítico de HPLC.

10.5 VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

Al no estar recogido el ensayo de velocidad de disolución de la Talidomida en ninguna de las habituales farmacopeas habituales, procedemos a estudiar la disolución de nuestro principio activo según el procedimiento descrito en el método analítico de farmacotecnia para la Talidomida.

Primeramente, se ensaya en sistema Turu-Grau[®], en las condiciones descritas en el método y a velocidad de giro de 50 rpm mediante cestillos y a 100 rpm mediante paletas, con la adición de LSNa en concentraciones del orden de 0,5, 1 y 2 mg/ml al medio de disolución de CIH 0,1N, para poder así evaluar la influencia de este agente en la eficacia de disolución de nuestro principio activo.

Los valores de los porcentajes medios de Talidomida disueltos (\pm SD) en sistema Turu Grau[®] con sistema de cestillos y paletas se representan en las gráficas 30 y 31, respectivamente.

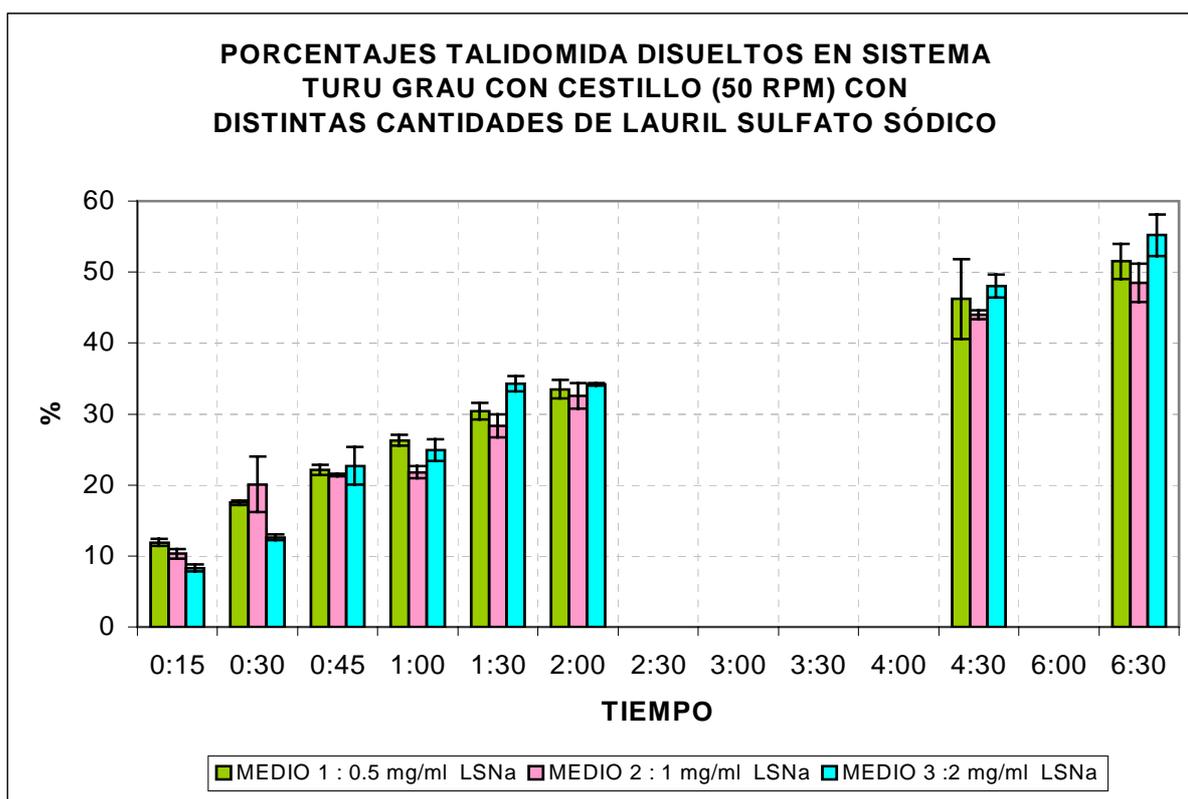


gráfico 30 : Disolución de la Talidomida en sistema Turu-Grau[®] con cestillos

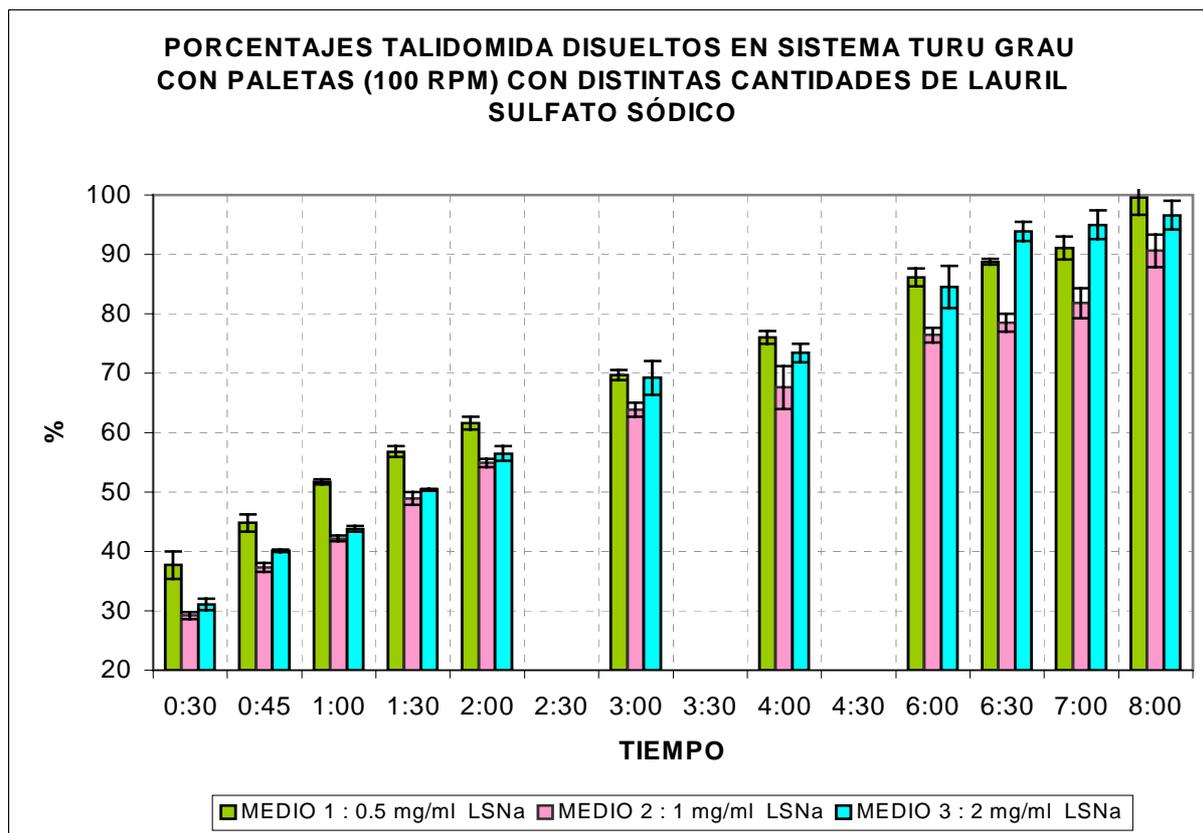


gráfico 31: Disolución de la Talidomida en sistema Turu-Grau® con paletas

Los resultados del ensayo de velocidad de disolución para la Talidomida en sistema Turu-Grau con cestillos a 50 rpm y paletas a 100 rpm indican que el LSNa, empleado como tensoactivo, no mejora la velocidad de disolución de nuestro principio activo en medio CIH 0,1 N, ya que no se observan diferencias significativas entre los distintos medios de disolución que contenían 0,5; 1 y 2 mg/ml de este agente.

Por otro lado, los porcentajes de Talidomida disueltos en función del tiempo son mayores si se utiliza paletas en lugar de cestillo llegando a poder determinar el porcentaje disuelto del 80 % de principio activo a las 6 horas con independencia de la cantidad de LSNa empleado en el medio de disolución mientras que, con el cestillo a la mitad de revoluciones que la paleta, y también con independencia del medio y a este mismo tiempo, sólo se disuelve aproximadamente un 50 % de principio activo. Por tanto se escoge las paletas para los ensayos de disolución.

Una vez estudiada la eficacia de disolución de la Talidomida en sistema Turu-Grau® en medio de disolución CIH 0,1 N con la incorporación de diferentes cantidades de LSNa y con sistema de cestillos a 50 rpm y paletas a 100 rpm, pasamos a estudiar la eficacia de disolución de este principio activo en sistema Van-Kel® en medios de disolución CIH 0,1 N con incorporación de distintas cantidades de LSNa y con sistema de paletas a 100 rpm.

Los valores de los porcentajes medios disueltos de Talidomida (\pm SD) en sistema Van-Kel® con paletas a 100 rpm se representan en el gráfico 32.

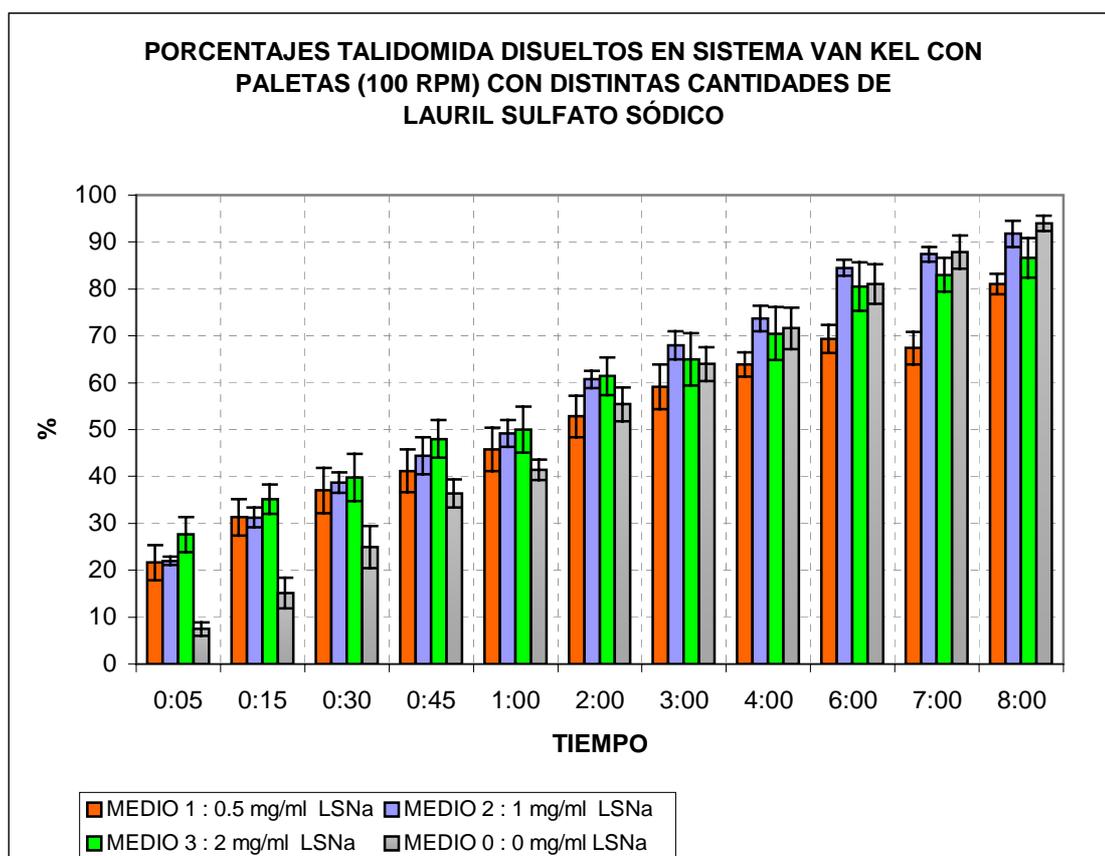


gráfico 32: Disolución de la Talidomida en sistema Van-Kel® con paletas

Los resultados del ensayo de disolución para la Talidomida en sistema Van-Kel® con paletas (100 rpm) en medio CIH 0,1N señalan que el LSNa empleado como tensoactivo no mejora la velocidad de disolución de nuestro principio activo, puesto que en todos los casos que contenían 0,5; 1 y 2 mg/ml de LSNa y en el caso donde no se incorporó este agente , se alcanzó el 80 % disuelto de principio activo a las 6 horas.

Por consiguiente, independientemente del sistema de disolución empleado en los ensayos de disolución de Talidomida (Turu-Grau[®] o Van-Kel[®]), se puede concluir que la velocidad de disolución de nuestro principio activo es muy lenta, debido a su baja solubilidad acuosa (50 µg/ml Krenn, 1992). Sin embargo, podemos seleccionar como tiempo de disolución límite para alcanzar el 80 % de principio activo, seis horas para el caso de la Talidomida.

Si se comparan los valores porcentuales de Talidomida disueltos en función del tiempo en sistema Turu-Grau[®] y Van-Kel[®], con paletas a una velocidad de 100 rpm y con medios de disolución que contienen distintos porcentajes de LSNa, se obtiene que este agente no interfiere en la mejora de la velocidad de disolución de nuestro principio activo y que no hay diferencias sustanciales entre las medidas tomadas con uno y otro sistema de disolución.

10.6 HIGROSCOPICIDAD DE LA TALIDOMIDA

Se determina el comportamiento higroscópico de la Talidomida tras someter una muestra de nuestro principio activo a las condiciones de temperatura y humedad recogidas en el método analítico.

Las muestras se analizan por sistema Karl-Fisher después de un periodo de almacenamiento de 6 meses a 25°C y 40° C y a distintos valores de humedades según las condiciones del método analítico, representándose en la gráfica 33 la isoterma de absorción de humedad para la Talidomida en estas condiciones.

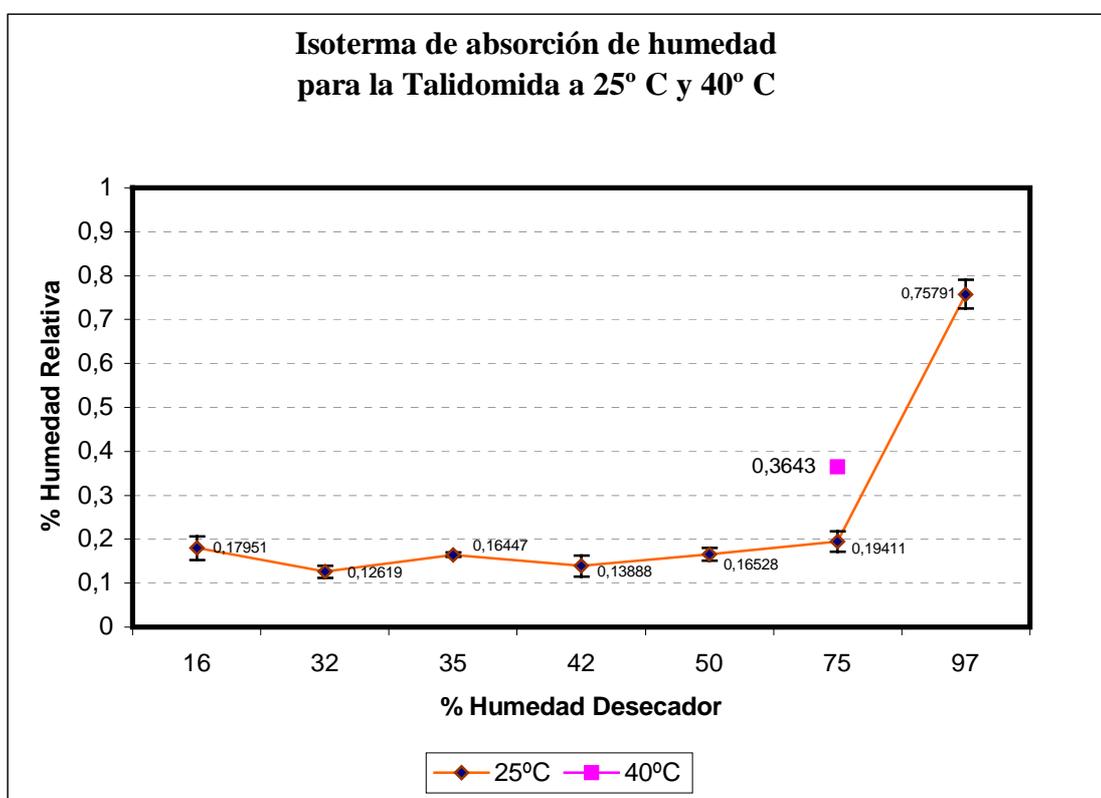


grafico 33: Isoterma de absorción de humedad para la Talidomida

De los ensayos higroscópicos sobre la Talidomida, se deduce que a 25° C nuestro principio activo es muy poco higroscópico cuando se conserva en valores de humedades relativas inferiores al 75 %, dando valores próximos a 0,15 %.

Con valores de humedades relativas del 75 %, la humedad relativa de la Talidomida no se ve afectada significativamente, dando valores próximos a 0,2 %.

Con valores de humedades del 97 % se aprecia un incremento significativo en el valor de humedad relativa de la Talidomida, llegando a presentar un valor de captación de agua por parte del principio activo del orden de 0,8 %.

Estos resultados nos permiten considerar a la Talidomida como una sustancia poco higroscópica en condiciones normales (25°C, 60%) que no se ve influenciada por la humedad ambiental.

Por otra parte, esta característica de baja higroscopicidad de este principio activo es un factor importante a tener cuenta en los estudios de liofilización, ya que en estos procesos suele aumentar el valor de higroscopicidad de las muestras liofilizadas, como ocurre en el caso del ácido acetil salicílico (Torrado, 1998).

La baja higroscopicidad de la Talidomida representa una ventaja, ya que el aumento en la higroscopicidad por un proceso de liofilización no será tan marcado como cuando se trabaja con principios activos mucho más higroscópicos, que captarán agua mas rápidamente, como ocurre por ejemplo con el ácido acetil salicílico, principio activo muy higroscópico (Torrado, 1998).

Para poder estudiar la influencia de la temperatura sobre la humedad de la Talidomida, se ha realizado un estudio de higroscopicidad en condiciones aceleradas de temperatura y humedad (40° C y 75 %), ya que son las condiciones que se siguen en estudios acelerados de estabilidad según normas europeas vigentes (EMEA CPMP / QWP / 556 / 96).

El empleo de condiciones aceleradas (40° C y 75 % humedad) va a suponer un incremento en el porcentaje de agua frente a los valores que se obtienen en estudios que se realizan en condiciones ambientales (25° C y 60 % humedad), obteniéndose porcentajes de agua del orden de 0,36 % para temperaturas de 40° C, frente a valores de 0,2 % para temperatura de 25° C.

El incremento de los valores de higroscopicidad de la Talidomida en condiciones de almacenamiento de temperatura y de humedad es un resultado previsible, si bien el resultado obtenido nos permite reafirmarnos en la convicción de que nuestro principio activo es poco higroscópico, si se compara con otros principios activos utilizados en Farmacia, como es el caso del ácido acetil salicílico (Torrado, 1998).

10.7 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

Determinamos cuantitativamente la Talidomida en muestras que han estado sometidas a condiciones ambientales (25° C y 60 % humedad), a condiciones aceleradas de estabilidad (40° C 75 % humedad) y a condiciones forzadas (49° C), durante un periodo de tiempo de 6 meses, según se describe en el método analítico.

De los estudios de estabilidad de la Talidomida materia prima, podemos concluir que las muestras sometidas durante 6 meses a valores de humedad relativa inferiores del 75 % y en condiciones de temperatura de 25° C, no muestran ninguna degradación del principio activo, ya que el porcentaje inalterado al cabo de este tiempo es de 98,28 %.

Por otra parte, las muestras sometidas durante 6 meses a condiciones aceleradas de humedad relativa del orden del 75 % y temperatura de 40°, presentan un incremento en el porcentaje de humedad de 0,36439, que puede ser responsable en la aparición de una pérdida de estabilidad de la Talidomida, observándose que, cuando analizamos este principio activo, el porcentaje de estabilidad sin degradarse es del orden del 78,48 % lo que demuestra que este principio activo en presencia de humedad sufre procesos degradativos.

Sin embargo, las muestras sometidas durante 6 meses únicamente a condiciones aceleradas de estabilidad con valores de temperatura de 49° C, no presentaban tampoco degradación de la Talidomida, puesto que el porcentaje de este principio activo transcurrido este tiempo es de 99,83 %.

Estos resultados nos permiten señalar que la estabilidad de la Talidomida se ve más influenciada por la humedad que por la temperatura.

10.8 DISCUSIÓN PARCIAL

La Talidomida materia prima sintetizada en este trabajo es de una **riqueza de 95,94 %**, comparada con la muestra patrón suministrada por el CNF.

Nuestro principio activo presenta mayor coeficiente de solubilidad en medio ácido, a valores de pHs comprendidos entre 2,4 y 4,4 obteniéndose menores valores de solubilidad, a mayor valor de pH; pero teniendo en cuenta que este medio tan ácido no es compatible con el tracto gastrointestinal, se elige el rango de pH comprendido entre 5,4 y 6,4 que es además viable para una administración oral de este fármaco.

El porcentaje inalterado de Talidomida es muy dependiente del tiempo, ya que por hora nuestro principio activo experimenta una degradación en solución patrón de un 5 %, por lo que las preparaciones de soluciones patrones de Talidomida serán extemporáneas, no superando el tiempo de 1 hora para su análisis.

Los estudios de estabilidad de la Talidomida en solución patrón en condiciones normales (25° C y 60 % de humedad) tras un periodo de tiempo de 15 días presenta un porcentaje inalterado de principio activo del 7 % y en condiciones aceleradas (40° C y humedad del 75 %) sufre una degradación del 7 % a las 48 horas.

Al alcalinizar una solución patrón de Talidomida y someterla a condiciones aceleradas de temperatura 40° C y humedad del 75 %, se vuelve pH dependiente y sufre total degradación del principio activo en un periodo de tiempo de 24 horas.

En ausencia de datos de farmacopeas relativos a la velocidad de disolución de la Talidomida y una vez ensayados con distintos medios y aparatos de disolución, se puede concluir que la velocidad de disolución de nuestro principio activo es mayor si se emplea paletas que cestillos, siendo el porcentaje disuelto en medio clorhídrico 0,1 N independiente del sistema de disolución (Turu-Grau® o Van-Kel®), y no estando influenciado por la presencia de LSNa y aunque **la velocidad de disolución de nuestro principio activo es muy lenta** debido a su baja solubilidad acuosa, **se alcanza la disolución del 80 % de Talidomida en 6 horas.**

Los estudios de higroscopicidad sobre la **Talidomida** nos permiten considerar a nuestro principio activo como una **sustancia poco higroscópica que no se ve influenciada por la humedad ambiental en condiciones normales de almacenamiento** (25° C y 60 %), lo cual resulta ventajoso en procesos tales como la liofilización, ya que este principio activo no captará agua tan rápidamente como otras sustancias que son más higroscópicas.

La Talidomida materia prima presenta una degradación del 2 % a los 6 meses en condiciones normales (25° C y 60 %) y del 1 % en el mismo periodo de tiempo en condiciones forzadas (49° C) sin presentar control de humedad durante el almacenamiento; mientras que a los 6 meses en condiciones aceleradas (40° C y 75 %) sufre una degradación en torno a un 22 % lo que demuestra que **este principio activo en presencia de humedad sufre procesos degradativos**.

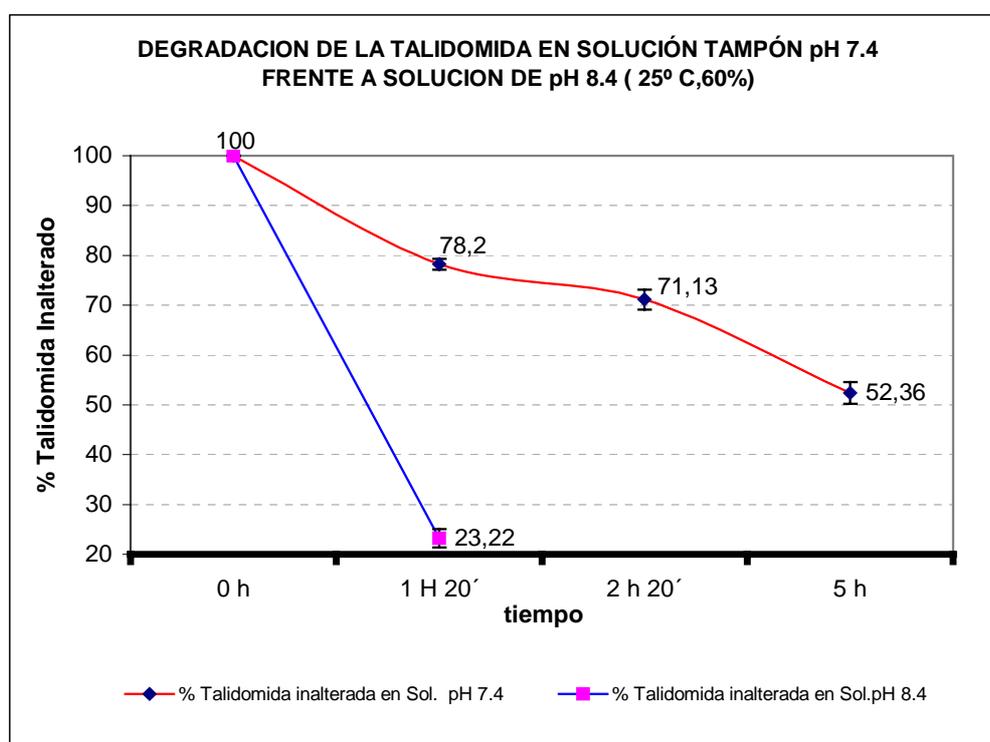
11

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIONES

11.1 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE LA TALIDOMIDA EN SOLUCIONES DE VALOR DE pH ALCALINO

Para poder estudiar la estabilidad de la Talidomida en soluciones alcalinas, se preparan muestras en soluciones tampón de valor de pH 7,4 y 8,4 según el método analítico, conservándose en condiciones de 25°C y 60 % de humedad hasta su análisis mediante HPLC.

Los valores del análisis comparativo de las muestras sometidas a solución tampón fosfato potásico monobásico, de valor de pH 7,4 y de las muestras de solución tampón ácido bórico, de valor de pH 8,4 están recogidos en la gráfica 34.



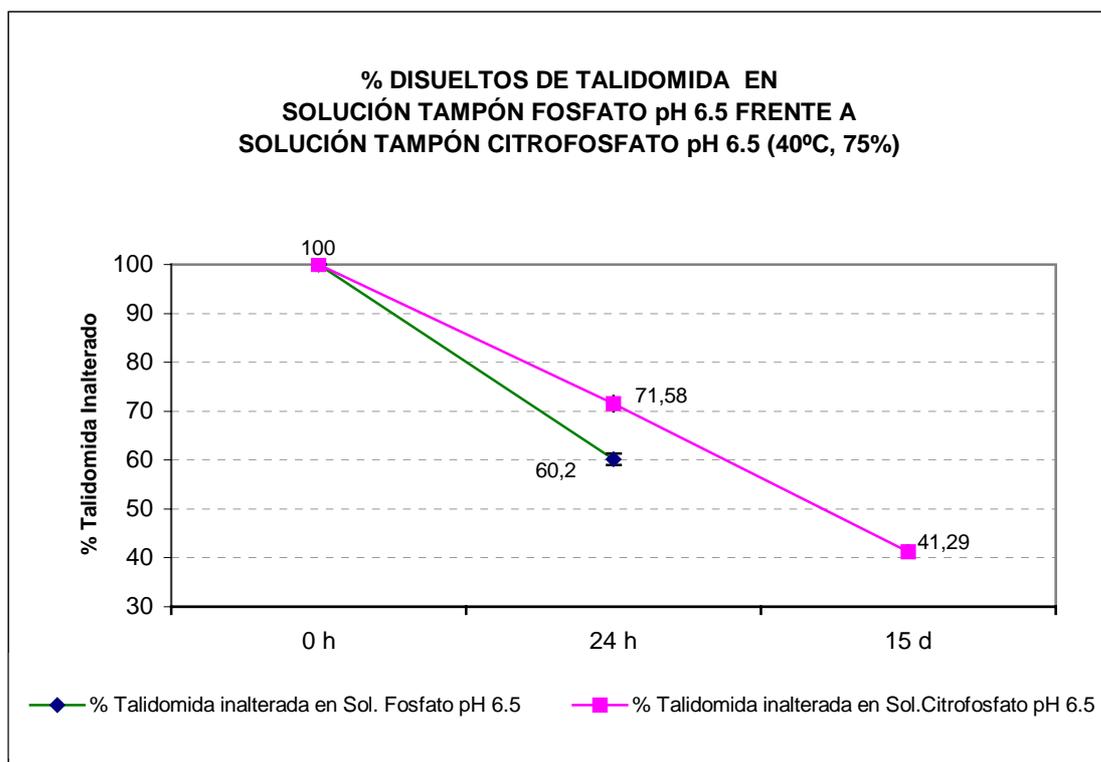
gráfica 34: Estabilidad de la Talidomida en soluciones de pH 7,4 y 8,4 en condiciones ambientales (25°C, 60%)

Se observa que en estas soluciones de carácter alcalino, la inestabilidad de la Talidomida es muy acusada, produciéndose a valores de pH próximos a la neutralidad prácticamente el 50 % de degradación en un periodo de tiempo muy corto (5 horas).

Al comparar las degradaciones que experimenta la Talidomida en estas soluciones de carácter alcalino, se puede deducir que a mayor alcalinidad en el valor de pH, se produce un aumento en la inestabilidad de nuestra solución y mayor rapidez en la degradación nuestro principio activo; por ello la acidificación aumenta la estabilidad de la Talidomida en soluciones (Lyon, 1995).

El hecho de que en soluciones alcalinas de valor de pH 8,4 se produzca una degradación del 80 % en apenas 1 hora y 20 minutos, dificulta en gran medida la realización de los ensayos, por lo que a este valor de pH sólo se pudo realizar una única determinación por HPLC.

Por tanto, se observa la enorme influencia del pH en la estabilidad de la Talidomida, ya que a mayor valor de pH, mayor inestabilidad para nuestro principio activo, lo que nos lleva a seleccionar soluciones de carácter ácido para, de esta forma, aumentar la estabilidad de la Talidomida en soluciones.



gráfica 35 : Estabilidad de la Talidomida en soluciones de pH 6,5 en condiciones aceleradas (40°C,75%)

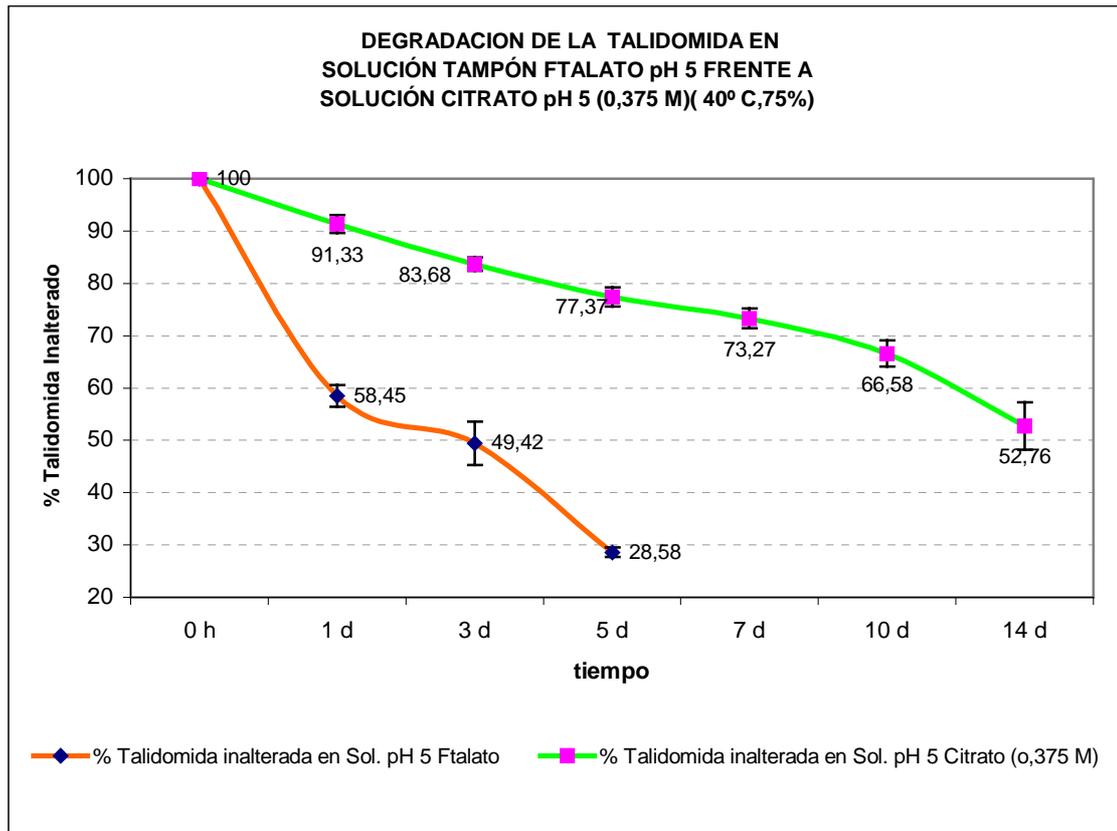
Se observa que si comparamos el tampón fosfato frente al tampón citrofosfato, ambos de valor de pH 6,5 , en condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % humedad), se produce una rápida degradación de la Talidomida, alcanzándose valores degradativos próximos al 40% y al 30% , respectivamente, a las 24 horas del estudio.

En las condiciones de estabilidad indicadas, las soluciones de Talidomida experimentan un rápido proceso degradativo, lo que dificulta en gran medida la realización del ensayo, ya que su degradación está teniendo lugar a la vez que se están efectuando sus lecturas.

Esta acelerada degradación coincide con los trabajos publicados por Schumacher (1965) en estudios de estabilidad de la Talidomida, a valores de pH cercanos a 7.

Como conclusión, a los estudios de estabilidad de la Talidomida en dos soluciones buffer, de valor de pH 6,5 en condiciones aceleradas (40° C, 75%), podemos indicar que la solución que presenta una mayor estabilidad para nuestro principio activo es la de tipo citrofosfato.

Posteriormente se evaluó la influencia de dos soluciones amortiguadoras de pH 5, fialato y citrato (0,375 M) en la estabilidad de la Talidomida, en soluciones sometidas a condiciones aceleradas de temperatura de 40° C y humedad del 75 %, representándose los respectivos valores en la gráfica 36.



gráfica 36: Estabilidad de la Talidomida en soluciones de pH 5 en condiciones aceleradas (40°C,75%)

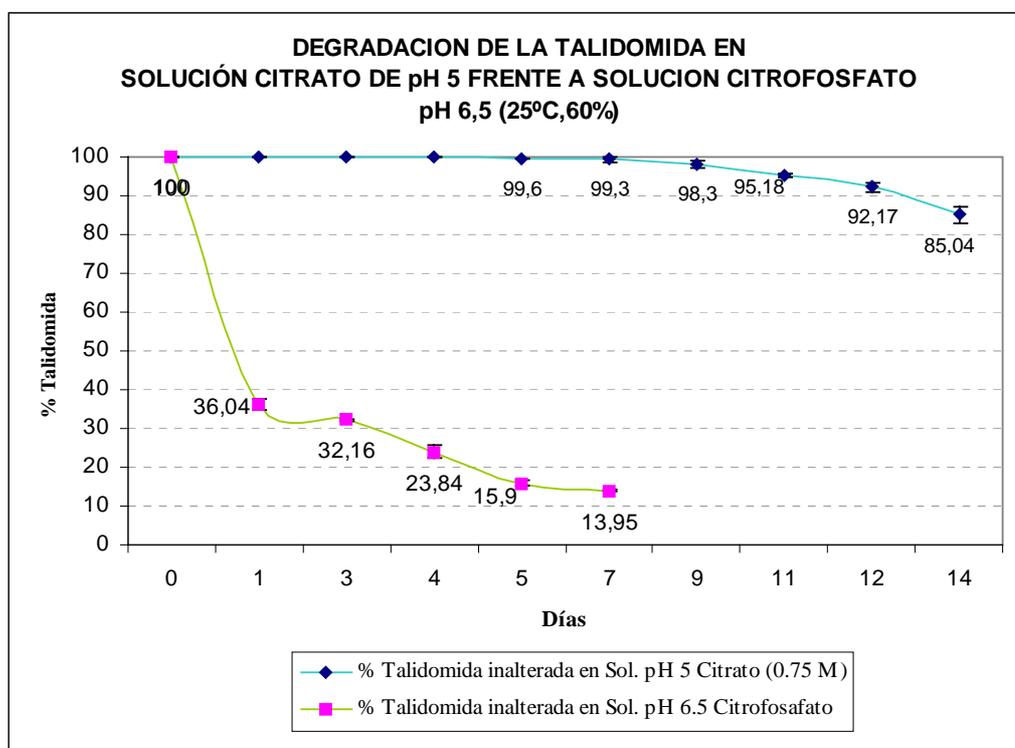
En estos estudios de estabilidad a valores de pH inferiores de 6, se comprueba que la degradación de la Talidomida es más lenta (Eriksson, 1992), llegando a valores cercanos al 50 % en las muestras de valor de pH 5 (citrato 0,375 M) al cabo de 14 días, mientras que a valor de pH 5 (ftalato) se alcanzan porcentajes de degradación muy superiores, quedando sólo un 28 % de Talidomida inalterada a los 5 días.

A los 5 días, el porcentaje de Talidomida sin degradarse, en las soluciones de pH 5 (ftalato) y en las soluciones de pH 5 (citrato 0,375 M) es de 28,58 % \pm 0,89 y 77,37 % \pm 1,84, respectivamente. Estos valores hacen que seleccionemos, por su mayor estabilidad, al citrato como solución reguladora de pH más apropiado para la formación de soluciones de Talidomida.

Como conclusión, a los estudios de estabilidad de la Talidomida sometida a la influencia de dos soluciones amortiguadoras de pH 5 (ftalato y citrato de molaridad 0,375 M), en condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 %), podemos indicar que la solución que presenta una mayor estabilidad para la Talidomida es la de valor pH 5 y tipo citrato con valor de molaridad de 0,375 M.

Si se comparan los resultados de estabilidad para nuestro principio activo en soluciones amortiguadoras de pHs 5 y 6 en condiciones aceleradas (40° C y 75 %), se puede considerar que las soluciones amortiguadoras de pH 5 y tipo citrato y la solución reguladora de pH 6,5 y tipo citrofosfato son las más estables para nuestro principio activo y por ello, abordamos unos estudios comparativos de estas dos soluciones reguladoras en condiciones normales (25° C y 60 % humedad).

Así, en estas condiciones normales (25° C y 60 % humedad) se estudió la influencia de la solución amortiguadora de pH 5 (citrato 0,75 M) frente a la solución buffer de pH 6,5 (citrofosfato), analizando también la influencia de la fuerza iónica al realizar un estudio comparativo en estas condiciones, de muestras sometidas a solución buffer de molaridad 0,75 M frente a otras muestras sometidas a soluciones reguladoras de pH de molaridad 0,375 M, representándose en la gráfica 37.



gráfica 37: Estabilidad de la Talidomida en soluciones de pH 5 y 6,5 en condiciones ambientales (25°C,60%)

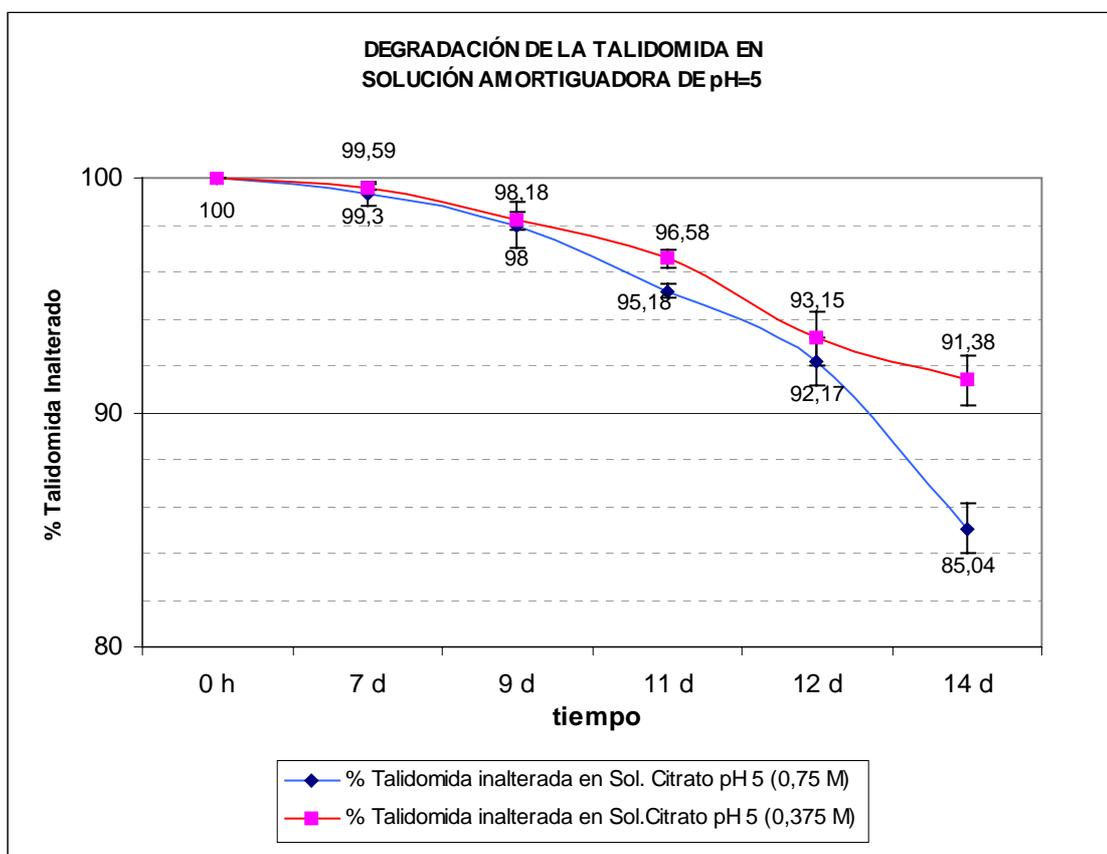
La degradación de la Talidomida es mayor en soluciones de pH 6,5 que en solución de pH 5, ya que al cabo de 7 días presenta un 99,3 % de principio activo inalterado en solución de pH 5, mientras que para soluciones de pH 6,5 se obtiene únicamente un 13,95 % inalterado.

Como conclusión, a los ensayos de estabilidad llevados a cabo en condiciones normales (25° C y 60% de humedad) para la Talidomida en soluciones de pH 5 (citrato 0,75 M) y soluciones de pH 6,5 (citrofosfato) se puede observar que la solución amortiguadora de pH 5 (citrato 0,75 M) ofrece más estabilidad para la Talidomida que la solución amortiguadora de pH 6,5 y tipo citrofosfato.

De todos los estudios de estabilidad de la Talidomida en soluciones llevados a cabo en valores de pH alcalinos y de valores 5 y 6,5 , tanto en condiciones normales (25° C y 60 %) como en condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 %), se observa que la solución reguladora del pH que ofrece mayor estabilidad a las soluciones de Talidomida es la que presenta valor de pH 5 y tipo de buffer citrato.

Por ello, y una vez seleccionada la solución amortiguadora del pH de mayor estabilidad para nuestro principio activo, llevamos a cabo una serie de ensayos de estabilidad en condiciones ambientales (25°C,60%) para determinar la influencia de la fuerza osmótica en las soluciones de Talidomida.

De esta forma, procedemos con estudios de estabilidad de dos soluciones amortiguadoras de pH de valor 5 y tipos de buffer citrato, de molaridades 0,75 M y 0,375 M respectivamente, recogiendo los resultados en la gráfica 38.



gráfica 38: Estabilidad de la Talidomida en soluciones tampon de pH 5 y molaridades 0,75 y 0,375 (25°C,60%)

Si comparamos la fuerza iónica, observamos que la solución de citrato de molaridad 0,375 M, es decir, la de menor molaridad, tiene mayor estabilidad frente a la solución de molaridad 0,75 M; así, para un periodo de tiempo de 14 días en condiciones normales (25°C, 60%), se obtienen unos valores de estabilidad de $91,38 \pm 1,49$ en solución citrato de pH 5 (0,375 M) y de $85,04 \pm 2,05$ para soluciones de pH 5 (0,75 M).

Por tanto, de las soluciones amortiguadoras de pH ensayadas, la que ofrece una mayor estabilidad para nuestro principio activo es la tipo citrato y valor de pH 5 y fuerza iónica 0,375 M , que además presenta la ventaja de ser una solución próxima a los valores de osmolaridad plasmática.

11.3 DISCUSIÓN PARCIAL

*En los estudios de estabilidad en condiciones normales (25°C,60%) para la Talidomida en soluciones de carácter alcalino (pHs 7,4 y 8,4) se observa la **gran influencia del pH en la estabilidad de nuestro principio activo, siendo mayor la inestabilidad cuanto mayor es el valor del pH.***

En condiciones aceleradas (40°C,75%), y entre dos soluciones buffer de pH 6,5 (fosfato y citrofosfato), la solución que ofrece mayor estabilidad para nuestro principio activo, es la de pH 6,5 y tipo citrofosfato con un porcentaje de principio activo inalterado del 70% (24 horas) y entre dos soluciones buffer de pH 5 (ftalato y citrato 0,375 M), en estas mismas condiciones, la solución más estable para la Talidomida es la de tipo citrato con un valor inalterado de 77% (5 días).

En condiciones normales (25°C, 60%) y entre las soluciones buffer de pH 6,5 y pH 5 citrato (0,75M), la solución más estable para nuestro principio activo es la de tipo citrato, con un valor de porcentaje inalterado del 99% (7 días).

En condiciones normales (25°C, 60%) y entre las soluciones buffer de pH 5 y fuerzas iónicas 0,75M y 0,375 M, la solución que presenta mayor estabilidad para la Talidomida es la de molaridad 0,375 con un valor de principio activo inalterado del 91% (14 días).

Concluimos que el valor del pH influye drásticamente en la estabilidad de las soluciones de Talidomida degradándose más a mayor valor del pH. (Lyon, 1995) ; pero la temperatura también es un factor decisivo en la estabilidad de la Talidomida en soluciones (Lyon, 1995) ya que, aunque era de esperar un proceso degradativo en condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 %), la degradación que experimentaron las muestras de soluciones de Talidomida en estas condiciones fué mucha más drástica que la obtenida en condiciones normales (25°C y 60%), ya que para la solución amortiguadora de pH 5 (citrato 0,375 M) el porcentaje inalterado de Talidomida a los 14 días en condiciones normales (25° C y 60 % de humedad) es de $91,38 \pm 1,49$ mientras que el porcentaje inalterado de Talidomida en condiciones aceleradas (40° C y 75 %) para la misma solución amortiguadora y en el mismo tiempo es de $52,76 \pm 4,5$.

De todas las soluciones amortiguadoras ensayadas, seleccionamos el tampón citrato de pH 5 y osmolaridad 0,375 M, como el medio más adecuado para obtener soluciones de nuestro principio activo ya que se logra una importante mejora en la estabilidad de la Talidomida, permitiendo que nuestra solución presente un valor de degradación de Talidomida inferior al 5 % . (96,58%) durante el tiempo de almacenamiento (11 días).

12

POLIMORFOS DE TALIDOMIDA

12.1 LIOFILIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La mejora de la biodisponibilidad de fármacos poco solubles, como es el caso de la Talidomida, ocurre normalmente como consecuencia de un cambio polimórfico durante procesos tales como la liofilización, al transformar la estructura cristalina en una forma amorfa o en una forma cristalina de mayor nivel energético.

Así por ejemplo, la cristalinidad se ve afectada por la liofilización para el Imipenem (Crocker,1996) y otras sustancias que disminuyen drásticamente su cristalinidad transformándose en sustancias amorfas con mejores valores de solubilidad son el Prazicuantel en dispersiones sólidas (De la Torre,1999) o el Imipenem (Connolly,1996).

En nuestro caso, como estamos buscando formas con cambios en la cristalinidad, con el objetivo de mejorar la solubilidad del principio activo, procedemos a una liofilización de la Talidomida materia prima.

En trabajos con Imipenem, se estudian las condiciones de liofilización que nos permiten obtener una menor cristalinidad, observándose, en general, que la etapa limitante de este proceso es la congelación, obteniendo disminuciones importantes en la cristalinidad cuando las muestras se congelan rápidamente y se mantienen congeladas 10 horas antes de aplicarse el vacío como ocurre con el Imipenem (Connolly, 1996).

Para el estudio de las formas recristalizadas de la Talidomida materia prima, procedemos a preparar muestras de este principio activo, según el método analítico de obtención de Talidomida recristalizada.

A continuación, se aplica un proceso de liofilización, en liofilizador tipo TELSTAR L 3[®].

Al comienzo de la liofilización, se mantienen las muestras durante un periodo de tiempo de 2 horas a la temperatura de (-50 °C) y a las 24 horas, comienza el proceso de desecación, la temperatura es de (-25°C) y a las 48 horas de (-11°C) para terminar el ciclo a las 72 horas con un valor de temperatura de 26°C.

Para el caso de la Talidomida, no se someten las muestras a una desecación secundaria para no alterar la estabilidad del principio activo (Krenn, 1992); por ello, la temperatura del ciclo no superó los 25° C.El vacío de la cámara durante las primeras 48 horas es de 0,04 mbs, equilibrándose a las 72 horas a un valor de presión de 0,02 mbs.

12.2 CARACTERIZACIÓN DE LA TALIDOMIDA RECRISTALIZADA

Se caracteriza el aspecto físico, la estructura y la morfología de la Talidomida recristalizada comparándola con la Talidomida materia prima.

Aspecto físico:

Las muestras de Talidomida materia prima sin recristalizar presentan aspecto pulverulento, de color blanco e inodoro, mientras que las muestras de Talidomida materia prima recristalizadas presentan aspecto pulverulento, de color blanco, inodoro, menos denso, seco, uniforme y homogéneo.

RX:

Esta técnica nos permite comparar las estructuras que presentan la Talidomida materia prima (sin recristalizar) frente a la Talidomida materia prima (recristalizada). Así en el gráfico 39 se representan los difractogramas respectivos para cada una de las anteriores sustancias, observándose un acusado descenso en la cristalinidad para la Talidomida materia prima (recristalizada).

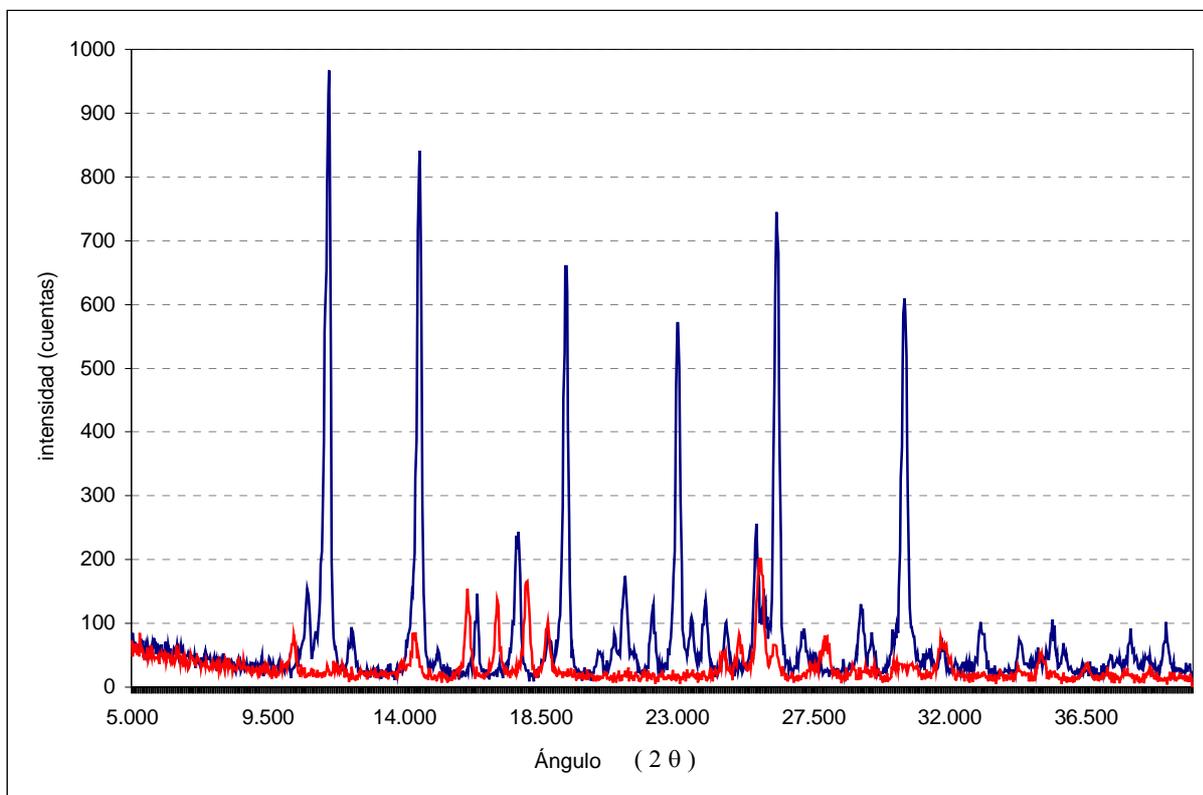
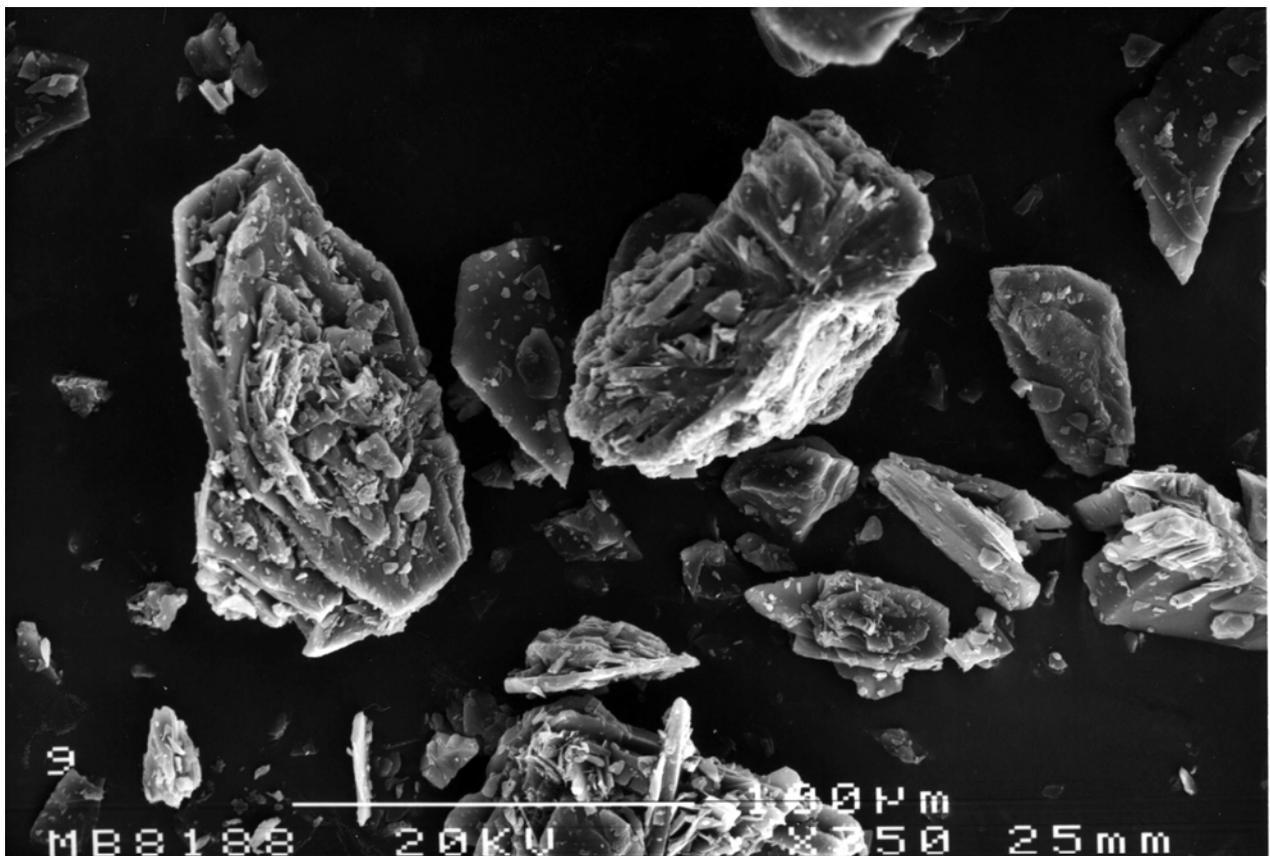


gráfico 39: Difractograma de la Talidomida materia prima (azul) frente a la Talidomida recristalizada (rojo).

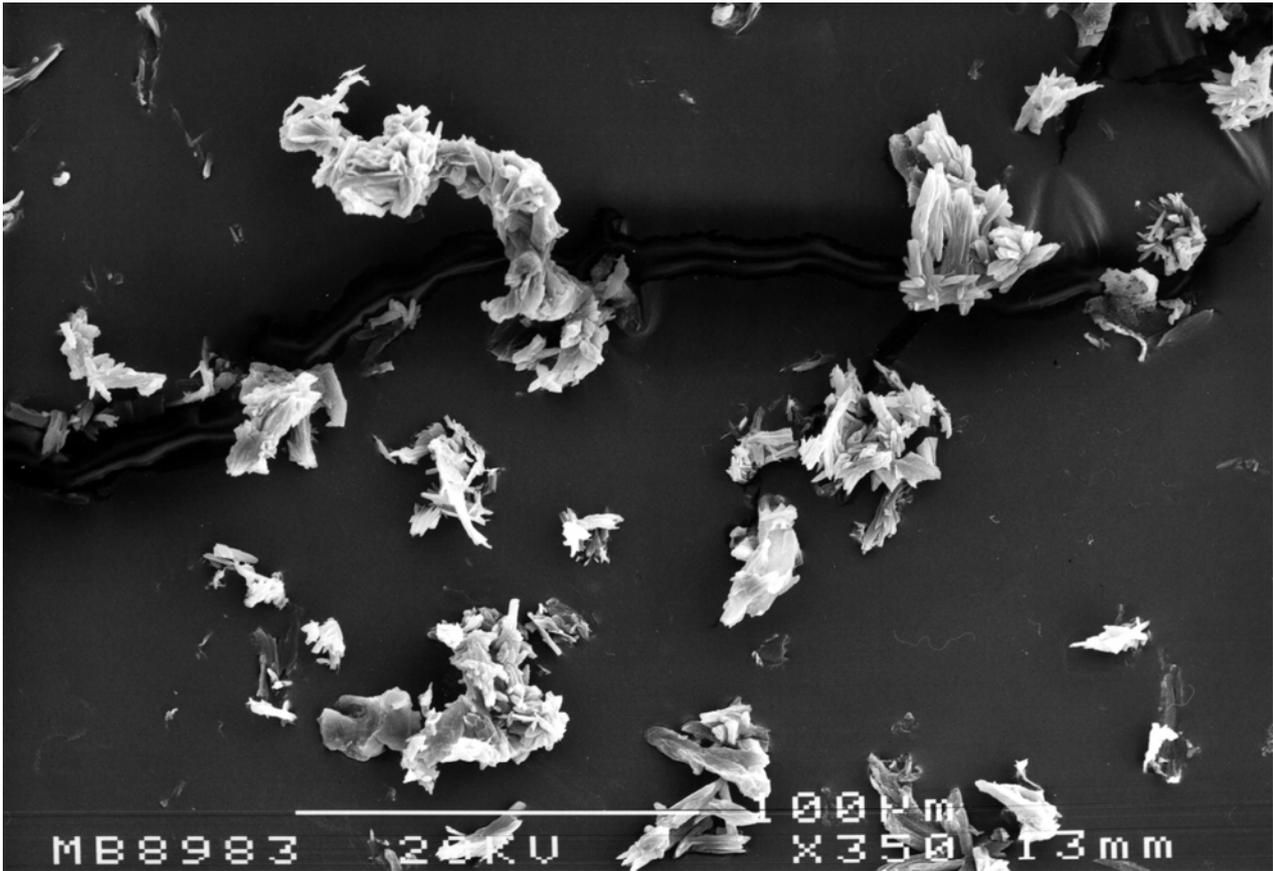
Microscopía electrónica:

La morfología de la Talidomida materia prima (sin recristalizar), se muestra en la microfotografía 2, observándose a 350 aumentos partículas de distinto tamaño con superficie rugosa.

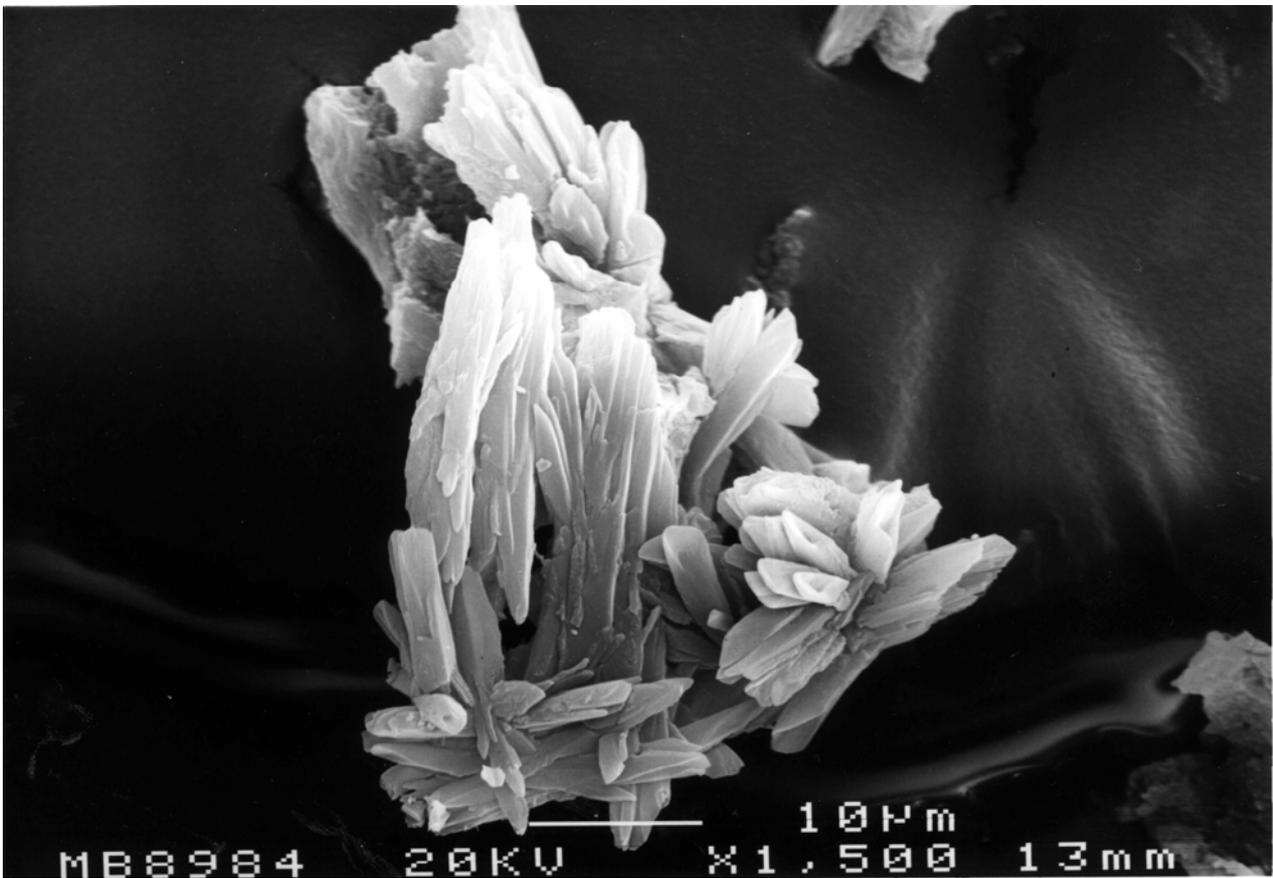
La morfología de la Talidomida materia prima (recristalizada) se muestra en las microfotografías 3 y 4, observándose a 350 y 1500 aumentos un tamaño de partícula menor y una apariencia física diferente a la Talidomida materia prima (sin recristalizar). En la microfotografía 4, aproximada 1500 aumentos, se observa un crecimiento de determinados planos cristalinos, posiblemente debidos al proceso de recristalización.



microfotografía 2 : Morfología de la Talidomida materia prima x 350 aumentos



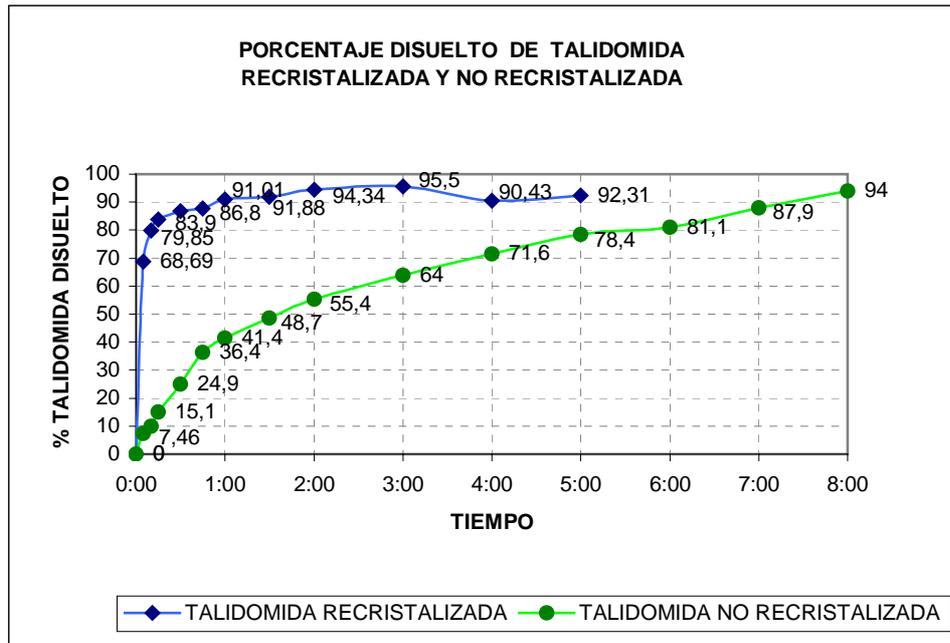
microfotografía 3 : morfología de la Talidomida materia prima recristalizada (x 350 aumentos)



microfotografía 4 : morfología de la Talidomida materia prima recristalizada (x 1500 aumentos)

12.3 VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN TALIDOMIDA RECRISTALIZADA Y NO RECRISTALIZADA

El ensayo de velocidad de disolución de la Talidomida recristalizada, se lleva a cabo siguiendo las condiciones descritas en el método analítico de velocidad de disolución de la Talidomida, representándose en la gráfica 40 los valores porcentuales disueltos de Talidomida recristalizada frente a los respectivos valores de Talidomida materia prima en función del tiempo.



gráfica 40: Disolución comparada de la Talidomida materia prima y de la Talidomida recristalizada

Del ensayo de velocidad de disolución de la Talidomida materia prima sin recristalizar y Talidomida recristalizada, en nuestras condiciones de trabajo, se observa que se alcanza un 80 % del principio activo disuelto a los 10 minutos en la Talidomida recristalizada; mientras que, si no está recristalizada, se alcanza este porcentaje a las 6 horas, luego con el proceso de liofilización se ha conseguido mejorar considerablemente la velocidad de disolución de nuestro principio.

Además, no sólo la Talidomida materia prima recristalizada cumple con gran diferencia frente a la Talidomida materia prima no recristalizada el ensayo de disolución (tabla 14), sino que además a los cinco minutos frente al 8 % disuelto de Talidomida sin recristalizar, se disuelve un 69 % de Talidomida recristalizada, lo que señala las grandes mejoras del proceso de liofilización en la velocidad de disolución de nuestro principio activo.

Tabla 14: Ensayos de disolución para la Talidomida materia prima y Talidomida recristalizada

FORMULACIONES	% 5 MINUTOS	TD 80 %
<i>TALIDOMIDA MATERIA PRIMA SIN RECRISTALIZAR</i>	$7,46 \pm 1,24$	6 horas
<i>TALIDOMIDA MATERIA PRIMA RECRISTALIZADA</i>	$68,69 \pm 3,55$	10-15 minutos

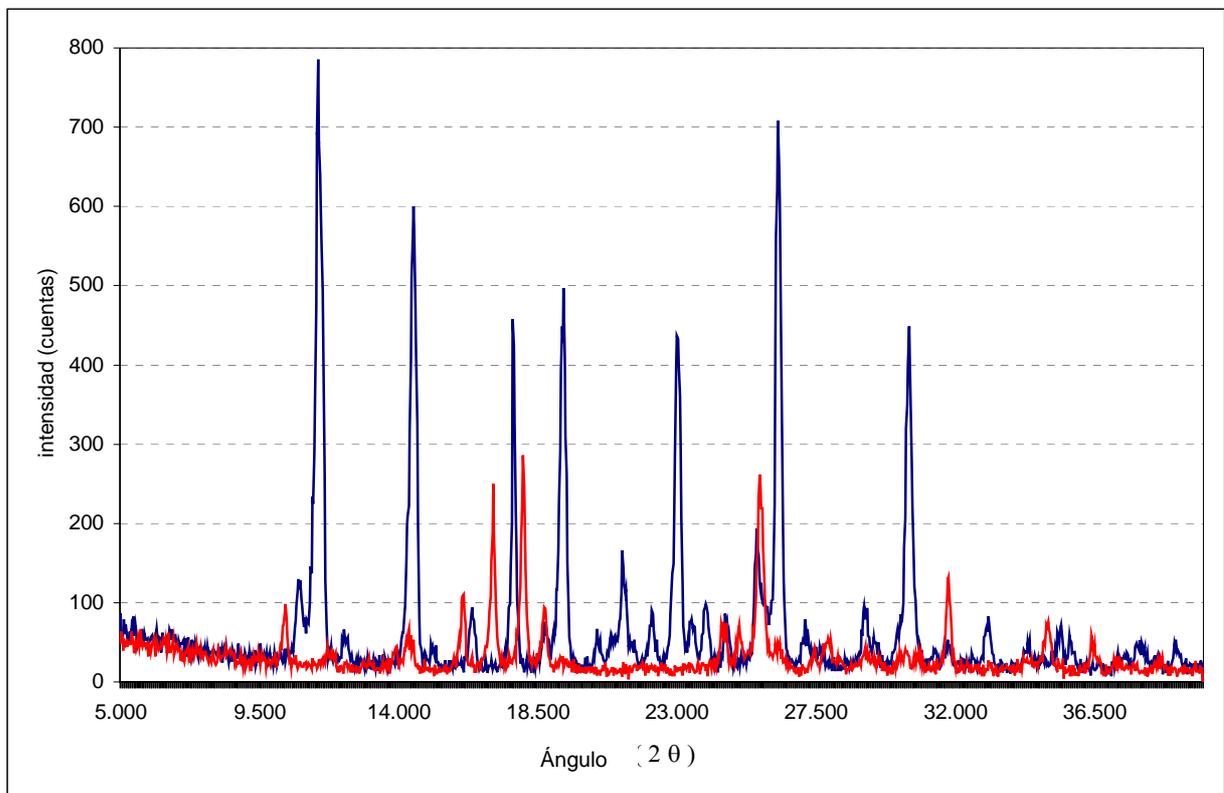
Para los porcentajes de disolución a los 5 minutos, se observa que existe una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la Talidomida materia prima sin recristalizar y la Talidomida materia prima recristalizada y también el ensayo de velocidad de disolución a los 15 minutos, vuelve a demostrarnos que existe una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la Talidomida materia prima no recristalizada y la Talidomida materia prima recristalizada.

12.4 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA RECRISTALIZADA Y NO RECRISTALIZADA

Se determina la estabilidad física y química de la Talidomida recristalizada, comparándola con la Talidomida no recristalizada.

Estabilidad física:

Se determina comparando los difractogramas de R X de la Talidomida materia prima (sin recristalizar) y de la Talidomida materia prima (recristalizada), sometidas a condiciones de temperatura de 25° C y humedad del 75 % , durante un periodo de tiempo de 11 días, según se muestra en la gráfica 41.



gráfica 41: Difractograma de la Talidomida materia prima (azul) frente a la Talidomida recristalizada (rojo) sometidas a condiciones de estabilidad (25°C, 75% ,11 días)

Primeramente evaluamos los cambios en la estabilidad de la Talidomida materia prima (no recristalizada) sometida a unas condiciones de humedad relativa (75%), para lo cual comparamos las estructuras obtenidas mediante difracción de RX de la Talidomida materia prima (gráfico 14) conservada en condiciones ambientales (25°C, 60%) frente a la materia prima que permanece en condiciones de 25°C y 75% de humedad (11 días) (gráfico 41) ,observándose un descenso en la intensidad de la cristalinidad así como la existencia de una pequeña captación de agua por parte de la muestra que estuvo sometida a mayores valores de humedad relativa, puesto que aparece una mayor intensidad en los picos característicos del agua (próximos a $18^\circ \theta$) probablemente debido a las condiciones de humedad del estudio de estabilidad.

No se observa la existencia de diferentes picos en la Talidomida no recristalizada sometida a condiciones de 25°C y 75% de humedad frente a la Talidomida que permanece en condiciones ambientales (25°C, 60%), por lo que no detectamos productos de degradación por difracción de RX, en las condiciones determinadas para este estudio de estabilidad.

Por otro lado, al comparar las estructuras de las formas no recristalizadas de Talidomida frente a las formas liofilizadas de nuestro principio activo, ambas sometidas a condiciones de 25°C, 75% de humedad y 11 días (gráfico 41), se puede observar un gran descenso en la intensidad para la Talidomida recristalizada, probablemente debido al proceso de liofilización. Además, también aparecen determinados picos en la zona característica del agua que seguramente sean debidos a las condiciones de humedad del estudio de estabilidad.

Estabilidad química:

La Talidomida materia prima conservada en condiciones de temperatura de 25° C y humedad del 60 % y en ausencia de luz y de aire no varía apenas sus propiedades en un año (Koch, 1988).

Los estudios de estabilidad química se realizaron sobre muestras de Talidomida recristalizada, sometidas a condiciones de 25° C y 60 % humedad y a condiciones de 40° C y 75 % humedad, comparándolos con los datos obtenidos para la Talidomida materia prima no recristalizada, en las mismas condiciones de almacenamiento, para periodos de tiempos que no superaron los 6 meses.

El análisis se ha basado en una única determinación de muestra, debido a la gran dificultad en obtener producto liofilizado, ya que se tiene que trabajar con grandes volúmenes y esto conlleva que el proceso de liofilización sea muy largo y que en muchos casos sea necesario repetirlo, puesto que no se consigue en algunas ocasiones obtener buenas muestras liofilizadas.

Pero, a pesar de medir una única determinación para cada muestra, se analiza por las dos técnicas validadas para nuestro principio activo (espectrofotometría UV visible y HPLC), contrastando de esta forma la veracidad de los resultados que se recogen en la tabla 15.

Tabla 15: Estabilidad química para la Talidomida materia prima y Talidomida recristalizada

FORMULACIÓN	CONDICIONES	% INALTERADO	
		3 MESES	6 MESES
TALIDOMIDA M.P.NO RECRISTALIZADA	25° C 60 %	99,62 %	98,28 %
	40° C 75 %	87,04 %	78,48 %
TALIDOMIDA M.P.RECRISTALIZADA	25° C 60 %	82,53 %	80,72 %
	40° C 75 %	79,69 %	63,89 %

En los estudios de estabilidad llevados a cabo sobre muestras de Talidomida materia prima frente a muestras de Talidomida recristalizada, sometidas a condiciones de almacenamiento (25° C, 60 %) y a condiciones aceleradas (40° C y 75 %), observamos que las formas no recristalizadas experimenta una mayor degradación en condiciones aceleradas de estabilidad, puesto que a los 6 meses alcanzan un valor de porcentaje inalterado de principio activo del orden de 78,48 %, mientras que estas mismas muestras sometidas a condiciones de 25° C y 60 % humedad no presentan fenómenos de degradación, alcanzándose un valor de 98,28 % de principio activo inalterado.

El proceso de liofilización seleccionado para nuestro principio activo da lugar a la formación de un polimorfo de Talidomida, caracterizado por presentar un incremento en su velocidad de disolución. Sin embargo, como cabría esperar, los estudios de estabilidad nos confirman que la forma recristalizada de la Talidomida es menos estable, pasando de un porcentaje inalterado de principio activo del orden de 98,28 % para muestras de Talidomida no liofilizada, a un valor de 80,72 % para muestras de Talidomida liofilizada en condiciones de 25° C y 60 % humedad, para un periodo de tiempo de 6 meses.

Este mismo proceso degradativo es observado en muestras sometidas a condiciones aceleradas de estabilidad (40° C y 75 % humedad); así, se pasa de un porcentaje inalterado de principio activo del orden de 78,48 % para muestras de Talidomida no liofilizada, a un valor de 63,89 % para muestras de Talidomida liofilizada después de 6 meses de almacenamiento.

Esto nos permite considerar que, aunque el proceso de liofilización disminuye la estabilidad de nuestro principio activo, no va a ser tan acusado como cabría esperar, puesto que se pone de manifiesto, por los datos obtenidos del estudio de estabilidad, que existe una mayor influencia del tiempo de almacenamiento en las muestras de Talidomida no liofilizada que en las muestras de Talidomida liofilizada.

Por ello, en las muestras de Talidomida no liofilizada en condiciones aceleradas de estabilidad (40°C y 75% humedad), se observa una degradación del principio activo durante todo el tiempo de almacenamiento (87,04 % a los 3 meses y 78,48 % a los 6 meses), mientras que en las muestras de Talidomida liofilizada observamos una degradación muy importante en los tres primeros meses (79,69 % de principio activo inalterado) y posteriormente, al ir aumentando el tiempo de almacenamiento, su degradación es más sostenida, alcanzándose al final del estudio de estabilidad (6 meses) y en condiciones aceleradas (40° C y 75 % humedad), valores inalterados de principio activo del orden de 63,89 %.

Esto nos hace sospechar que las muestras de Talidomida liofilizadas son más susceptibles a los procesos de hidrólisis, probablemente debido a la presencia de regiones amorfas o de restos de agua que son responsables de la mayor degradación inicial de las muestras de Talidomida liofilizada.

12.5 DISCUSIÓN PARCIAL

La Talidomida materia prima sometida a procesos de liofilización experimenta un gran descenso en la cristalinidad de su estructura, como se pone de manifiesto en los espectro de R X .

*Este descenso en la cristalinidad de su estructura, hace que nuestro principio activo presente una velocidad de disolución mucho más rápida que la Talidomida materia prima no recristalizada, ya que **las formas recristalizadas cumplen el ensayo de disolución del 80 % de principio activo disuelto en 10 - 15 minutos, mientras que las formas cristalinas (Talidomida materia prima) alcanzan este porcentaje de principio activo disuelto a las 6 horas.***

Los estudios de estabilidad química acelerados en la Talidomida materia prima recristalizada ponen de manifiesto que las formas amorfas de nuestro principio activo son más inestables que las formas cristalinas, probablemente debido a la presencia de regiones amorfas o de restos de agua, que son los responsables de la mayor degradación inicial de la Talidomida liofilizada.

13

COMPLEJOS DE INCLUSIÓN POR INCORPORACIÓN DE CICLODEXTRINAS

13.1 FORMAS LÍQUIDAS DE TALIDOMIDA CON CICLODEXTRINAS

Se procede a determinar la solubilidad y la estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con CDs, para ello primeramente calculamos el coeficiente de solubilidad de nuestro principio activo en las formas líquidas con HPBCD, metoxiCD y γ CD, que son las CDs seleccionadas para nuestro estudio y en los porcentajes de CD del 0 %; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 12,5 %; 15 %; 17,5 % y 20 % en medio citrato pH 5 (0,375 M).

A continuación evaluamos la influencia del pH en la solubilidad de la Talidomida, llevando a cabo estudios en medio citrato pH 5 (0,375 M) y en medio citrofosfato pH 6,5 en forma líquida, con la ciclodextrina de mayor coeficiente de solubilidad para nuestro principio activo.

Por último determinamos la estabilidad de la Talidomida en la forma líquida con la CD y en el medio de disolución seleccionados.

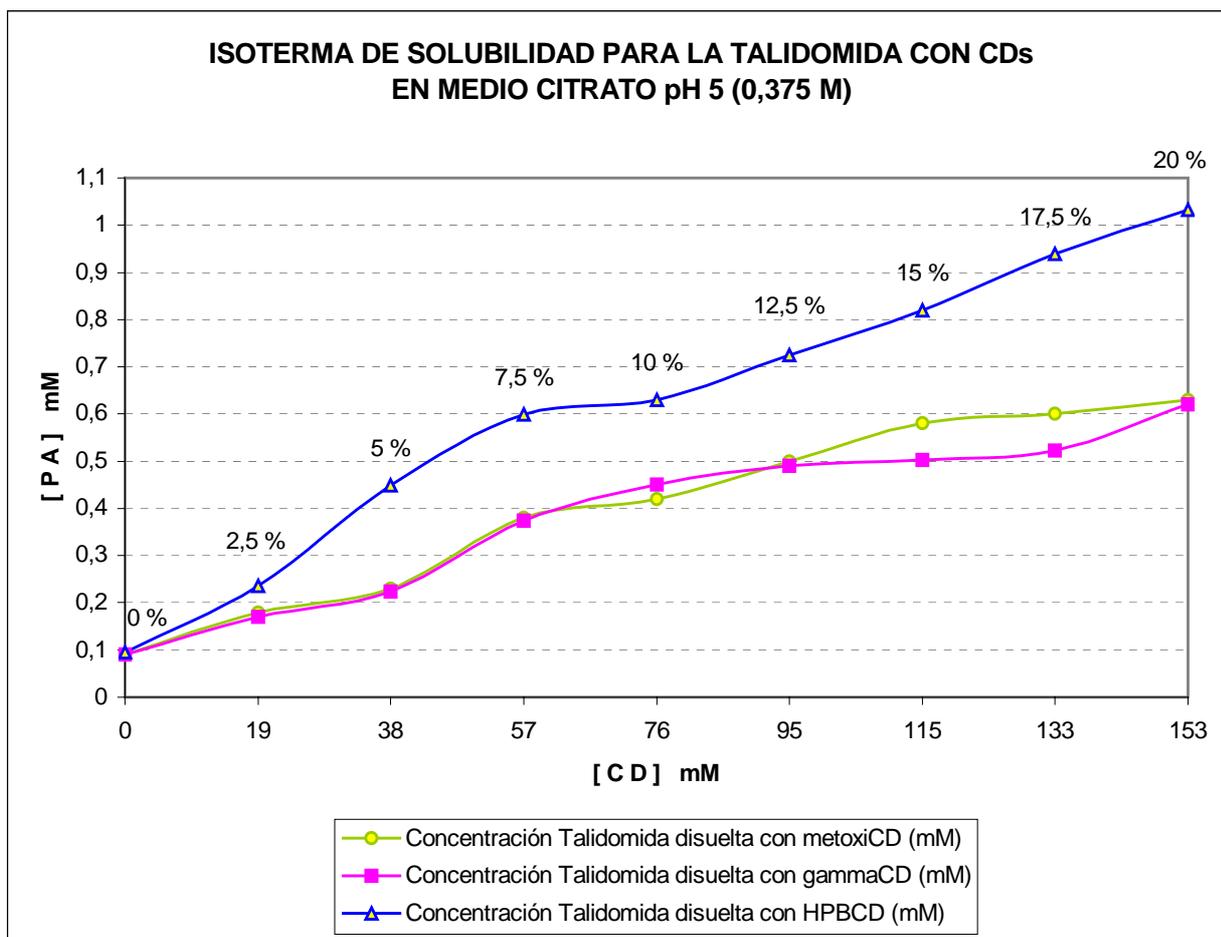
13.2 SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA A DISTINTOS PORCENTAJES DE CICLODEXTRINAS

Se determina el coeficiente de solubilidad en formas líquidas con la HPBCD, metoxiCD y γ CD a los porcentajes (p/v) de CD de 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5% y 20% en medio citrato pH 5 (0,375 M).

La preparación de las muestras se realiza a temperatura ambiente (25°C), siguiendo el método analítico de solubilidad de la Talidomida en formas líquidas con CDs. El tiempo de mezcla es de 2 horas, ya que, transcurrido este tiempo, se cuestiona si el complejo contendría sólo el fármaco intacto o bien algunos de sus productos de hidrólisis.

Los análisis se realizan mediante técnica espectrofotométrica, con lecturas a λ de 299 nm, que es la de máxima absorción para nuestro principio activo.

A partir de los datos de absorbancia para los complejos de inclusión de Talidomida con CDs, podemos representar la isoterma de solubilidad para nuestro principio activo en la gráfica 42.



gráfica 42 : Isoterma de solubilidad para la Talidomida en complejos de inclusión con CDs

Al analizar los efectos de varias concentraciones de metoxiCD, γ CD e HPBCD en el complejo de inclusión con Talidomida, obtenemos una relación lineal entre las concentraciones de CD y la solubilidad del complejo. Así, al aumentar la concentración de las soluciones de CD, hay más cavidades de CD disponibles para acomodar Talidomida (Krenn, 1992).

Se observa en la isoterma de solubilidad para la Talidomida (gráfico 42) una cinética de aceleración, en la que se producen incrementos en las concentraciones de nuestro principio activo a medida que aumentan las concentraciones de CDs, dependiendo de la solubilidad acuosa de la CD utilizada para ello (Higuchi, 1965; Vianna, 1998). Esta fase de aceleración muestra una curva tipo AL, igual que la Anandamida en complejo de inclusión con dimetil β CD y con HPBCD (Jarho, 1996); el agente antimalárico Artemisinina con los derivados de β CD (Usuda,2000) y la Espirinolactona con HPBCD (Jarho, 2000).

La solubilidad para nuestro principio activo en complejo de inclusión con metoxiCD, γ CD e HPBCD en las proporciones (p/v) ensayadas en nuestro estudio, aumenta de forma lineal con el aumento de CD. Así se logra incrementar la solubilidad de nuestro principio activo con la formación de complejos de inclusión con CDs, obteniéndose los mayores valores de coeficiente de solubilidad para la Talidomida con el empleo de la HPBCD.

La solubilidad acuosa del fármaco sin acomplejar, aumentó de 50 μ g/ ml (Schumacher,1965; Williams, 1965) a 266 μ g/ml con el complejo de HPBCD en proporción (p/v) al 20% y a 162 μ g/ml y 160 μ g/ml con complejos de metoxiCD y γ CD, respectivamente, en proporciones (p/v) al 20%. Por tanto, corroboramos los datos de Koch (1988) al afirmar que la solubilidad de la Talidomida tras la formación de complejos de inclusión con diferentes tipos de CDs está en relación directa con el tipo y con la cantidad de CD empleada.

A continuación procedemos a calcular la constante de estabilidad (K_c) para los complejos de inclusión de Talidomida con las CDs, mediante una expresión matemática no lineal que utiliza las pendientes de la isoterma de solubilidad para nuestro principio activo (gráfica 42) y la solubilidad del fármaco en el medio donde se forma el complejo con la CD; así, según Piel (1998), la constante de estabilidad de un complejo de inclusión con CD se puede deducir de la expresión:

$$K_c = S / S_o (1 - S)$$

Donde:

K_c : constante de estabilidad del complejo de inclusión

S : pendiente de la curva de solubilidad

S_o : solubilidad del principio activo en ausencia de CD

De esta forma, obtenemos los valores más bajos de constante de estabilidad para los complejos de inclusión de Talidomida con la γ CD, con valor de $K_c = 26 M^{-1}$ y para el complejo de inclusión con la metoxiCD es de $31 M^{-1}$, mientras que el mayor valor de constante de estabilidad lo presenta los complejos de inclusión de nuestro principio activo con la HPBCD, con valor de $K_c = 36 M^{-1}$.

Los datos experimentales que se han obtenido en los ensayos de solubilidad para la Talidomida en complejos de inclusión con CDs en medio citrato pH 5 (0,375 M) pueden variar con los encontrados en la bibliografía, ya que siempre existe un nivel de cantidad de complejo PA : CD disuelto para cada concentración de Talidomida y además la CD varía en el número de sustituyentes, lo que afecta a la capacidad de formación de complejo de inclusión PA:CD y a su solubilidad. Por otro lado, el grado de sustitución no sólo varía entre los fabricantes de las CDs, sino también entre los lotes individuales de producto (Krenn, 1992).

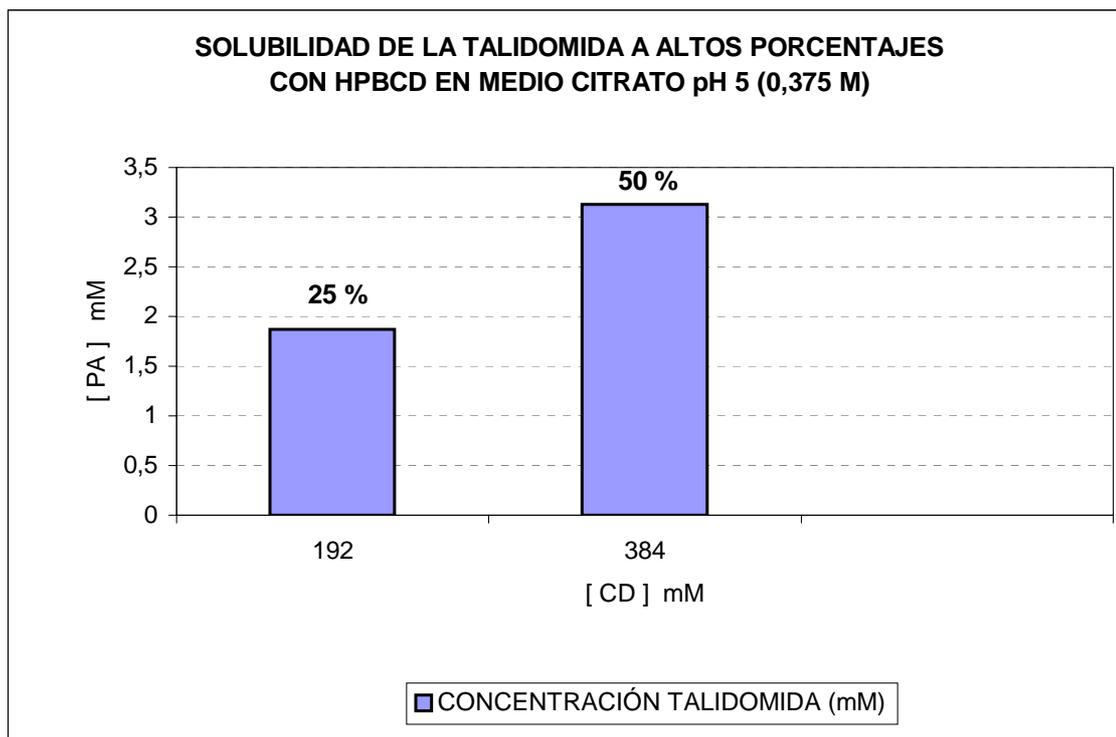
No se ha ensayado con la β CD porque según determinados autores (Krenn, 1992) el empleo de la HPBCD en soluciones (45% p/v) para la formación de complejos de inclusión con la Talidomida incrementa marcadamente la solubilidad acuosa de este principio activo (más de 45 g/100 ml), lo que representa unas 30 veces más que la β CD; además, esta CD presenta una solubilidad acuosa de 1,85 g/100 ml (Uekama 1996).

Estos buenos datos de solubilidad de la Talidomida con los complejos de inclusión de HPBCD también se obtienen para otros principios activos lipofílicos, como la Amandamida, acomplejada con la HPBCD en soluciones al 10% (p/v), que aumenta considerablemente su solubilidad acuosa (Jarho, 1996); el Nifedipino, que en complejos con HPBCD logra aumentar su solubilidad, lo que repercute en su biodisponibilidad, presentando un efecto terapéutico más prolongado (Wang, 1993); y la Flutamida, que en complejos con HPBCD en proporciones de CD del 50% (p/v), experimenta un incremento en su solubilidad del orden de 170 veces más que el principio activo solo (Zuo, 2000).

Una vez que hemos seleccionado la HPBCD como la CD más apropiada para la formación de complejos de inclusión con la Talidomida según nuestras condiciones de trabajo, realizamos otro estudio de solubilidad del fármaco en medio citrato pH 5 (0,375 M) y a temperatura ambiente (25°C) en soluciones de CD en porcentajes (p/v) de 25 % y 50 %, no superándose este último valor pues podríamos encontrarnos que se empeorarían las características farmacotécnicas del principio activo debido a la gran cantidad de CD.

El interés de este estudio fué el observar la solubilidad de la Talidomida a mayores concentraciones de CD, ya que autores como Krenn (1992) emplean altos porcentajes de CD (45% p/v de HPBCD), obteniendo excelentes resultados para la solubilidad del principio activo.

En la gráfica 43 se representa la solubilidad de la Talidomida con complejos de HPBCD a altos porcentajes de CD.



gráfica 43 : Solubilidad de la Talidomida con HPBCD en medio citrato pH 5 (0,375 M)

Como cabía esperar, hay un aumento del coeficiente de solubilidad para la Talidomida con el aumento de porcentajes (p/v) de CD, al haber disponibles más cavidades de CD, que pueden así acomodar más moléculas de Talidomida .

13.3 SOLUBILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN DISTINTOS MEDIOS DE DISOLUCIÓN

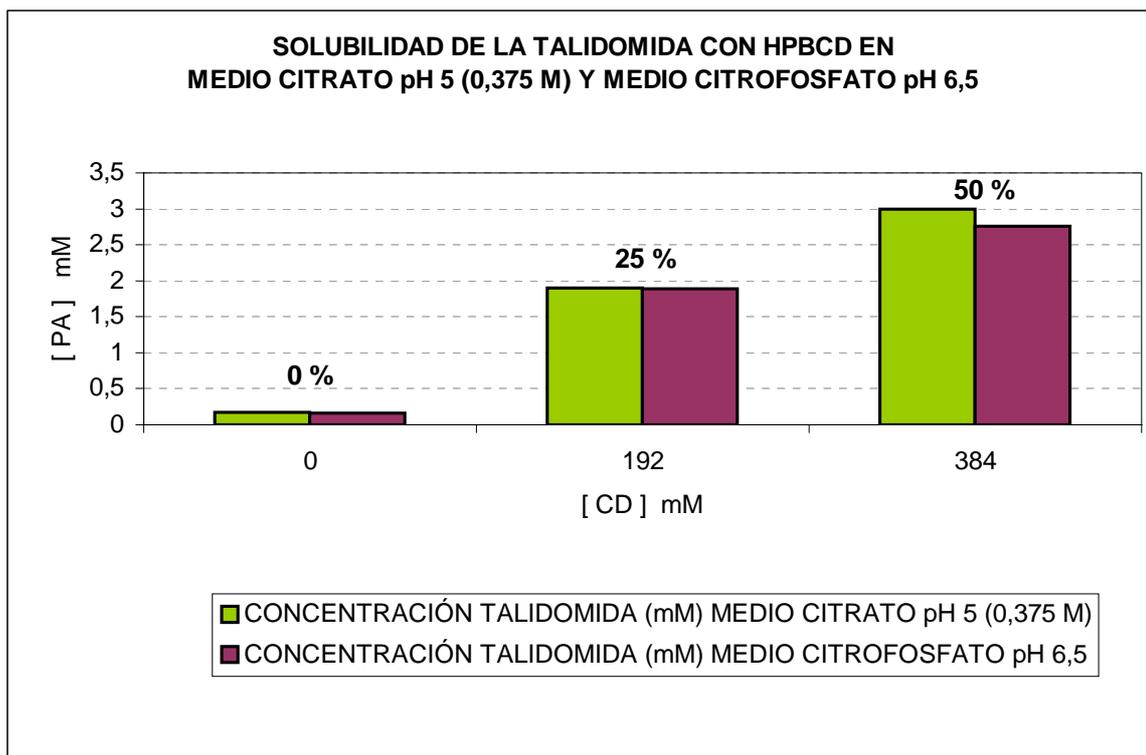
Una vez seleccionada la HPBCD como la CD más apropiada para la formación de complejos de inclusión con la Talidomida, debido a que esta CD presenta los mayores valores de coeficiente de solubilidad para nuestro principio activo en medio citrato pH 5 (0,375 M), procedemos a evaluar la influencia del pH en la solubilidad de la Talidomida, para lo cual se llevan a cabo una serie de ensayos de solubilidad en medio citrato pH 5 (0,375 M) y medio citrofosfato pH 6,5 en formas líquidas a temperatura de 25°C con la incorporación de HPBCD en porcentajes (p/v) de 0% , 25% y 50%.

En otros principios activos, tales como el Albendazol, el pH influye en la solubilidad de los complejos de inclusión con β CD, HPBCD y metil β CD (Castillo, 1999), por ello evaluamos la influencia del pH en la solubilidad de nuestro principio activo y elegimos los dos medios de disolución anteriormente indicados, en base a los buenos datos de solubilidad que se obtuvieron para nuestro principio activo (capítulo 11).

La preparación de las muestras se realiza siguiendo el método analítico de solubilidad para la Talidomida en formas líquidas con CDs y de igual manera el tiempo de mezcla es de 2 horas, para evitar de esta forma posibles problemas de inestabilidad de nuestro principio activo.

La ausencia de interferencia del tampon citrofosfato pH 6,5 se realiza por comparación frente a los valores de absorbancia de distintas concentraciones de Talidomida frente a la recta de calibrado, observándose que no existen diferencias significativas en las concentraciones de Talidomida encontradas cuando se emplea como medio de disolución el tampon citrofosfato.

La isoterma de solubilidad para la Talidomida con la formación de complejo de inclusión con HPBCD en medio citrato pH 5 (0,375 M) y medio citrofosfato pH 6,5 se representa en la gráfica 44.



gráfica 44 : Solubilidad de la Talidomida con HPBCD en distintos medios de disolución

El estudio comparativo de solubilidades para la Talidomida en formas líquidas, tras la formación de complejos de inclusión, con incorporación de HPBCD en los porcentajes de 0 %; 25 % y 50 % en medio tampón citrato de pH 5 (0, 375 M) y medio citrofosfato pH 6,5 , pone de manifiesto que a porcentajes bajos de CDs (de 0 % al 25 %) no se observa una influencia del medio de disolución en la solubilidad de la Talidomida, obteniéndose para un 25 % de ciclodextrina concentraciones disueltas de Talidomida en medio citrato de pH 5 (0, 375 M), y para el medio citrofosfato de pH 6,5 valores muy semejantes próximos a 1,9 mM.

Cuando aumentamos la concentración de CD a un 50 % , las concentraciones de Talidomida en medio citrato pH 5 (0, 375 M) y medio citrofosfato de pH 6,5 también están en torno a 2,9 mM.

Por ello, nuestros estudios sobre la influencia del pH en las soluciones al 0%, 25% y 50% (p/v) con HPCD en los medios de pH 5 y 6,5 no indican diferencias significativas en los niveles de fármaco acomplejado. Krenn (1992) tampoco encontró influencia del pH en las soluciones de nuestro principio activo en los medios de pH 3,5 a 7.

Sin embargo, parece ser que la temperatura sí influye en la solubilidad del complejo con nuestro principio activo, ya que Krenn (1992) consigue una concentración de fármaco acomplejado con HPBCD soluble de casi 4 mg/ml elevando la temperatura de las soluciones a 70°C; pero nosotros hemos trabajado a temperatura ambiente (25°C) en base a los resultados de estabilidad que se obtuvieron para nuestro principio activo en solución patrón (capítulo 10). En otros principios activos, como es el caso de la Flutamida en complejos de inclusión con HPBCD, la solubilidad del fármaco aumenta proporcionalmente con la temperatura (Zuo, 2000).

De los estudios de solubilidad de la Talidomida en medio citrato pH 5 (0,375 M) y medio citrofosfato pH 6,5 en formas líquidas, con incorporación de HPBCD en los porcentajes de CD de 0 %; 25 % y 50 %, se puede concluir que no hay diferencias significativas en los coeficientes de solubilidades para la Talidomida en el rango de porcentajes de 0 % a 25 %, cualquiera que sea el medio de disolución empleado.

Otro ejemplo de formas líquidas donde se alcanza una considerable mejora en la solubilidad del fármaco, con incorporación de derivados de β CDs en porcentajes que van hasta el 50%, lo constituye el Loteprednol (Bodor, 2000).

13.3 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON CD

Según datos de Krenn (1992), la mejora de la solubilidad acuosa de los complejos de Talidomida con HPBCD, mejora la estabilidad del fármaco. Así, una vez seleccionada la HPBCD como aquella que presenta mayor coeficiente de solubilidad para nuestro principio activo en medio citrato pH 5 (0,375 M), procedemos a evaluar la estabilidad que presenta la Talidomida en formas líquidas con distintas relaciones (p/p) de PA: HPBCD en el medio.

Para ello preparamos soluciones de Talidomida y HPBCD en medio citrato pH 5 (0,375 M) en las proporciones (p/p) 1:1; 1:2; 1:5 y 1:9 , presentando todas ellas como concentración inicial de principio activo 50 µg/ml, según el método analítico de formas líquidas para Talidomida. A continuación las muestras se conservan en condiciones de estabilidad de 25° C de temperatura y 60 % de humedad relativa durante un periodo de tiempo de 15 días, analizándose por HPLC.

En los análisis cromatográficos se observa que el tiempo de retención para la Talidomida, (5,8 minutos) y para el complejo de Talidomida: HPBCD (4,9 minutos) están próximos, lo que indica mucha cercanía entre la Talidomida materia prima y el complejo de Talidomida con la HPBCD; pero el hecho de que el tiempo de retención sea menor para el complejo de Talidomida con HPBCD que para nuestro principio activo solo, indica que el complejo es más hidrófilo que la Talidomida (Koch, 1988).

Apoyándonos en la curva de calibración para la Talidomida en HPLC, calculamos los valores del porcentaje medio de Talidomida que permanece inalterado, al cabo del periodo de tiempo del estudio, en las condiciones determinadas anteriormente ($\pm SD$), representándose en la gráfica 45.

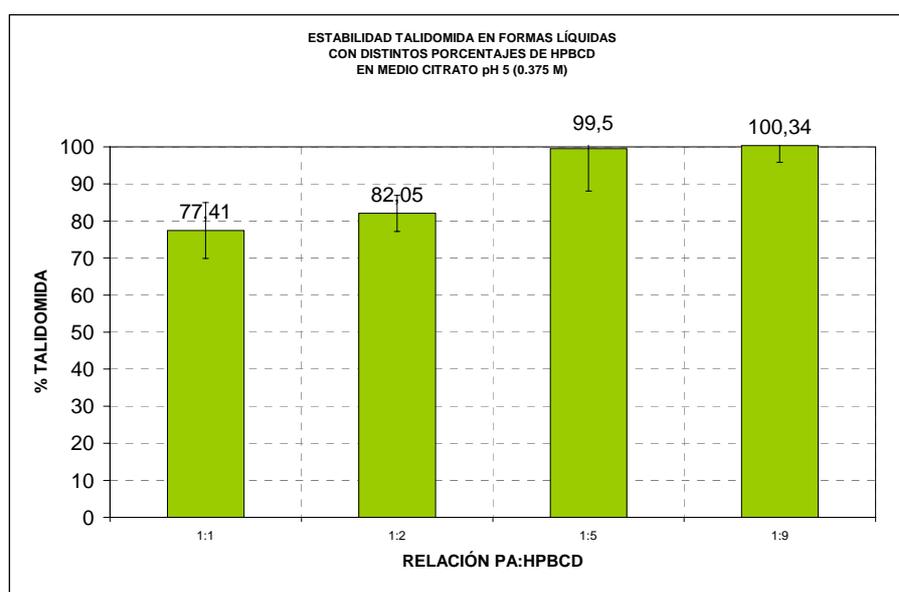


gráfico 45: Estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con HPBCD (25°C,60%,15 días)

De los datos de este estudio de estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con distintos porcentajes de HPBCD y en medio citrato pH 5 (0,375 M), observamos que el porcentaje de Talidomida permanece inalterado cuando la ciclodextrina (HPBCD) se encuentra en el medio, en proporción 1:5 (p/p) o superior, mientras que cuando el porcentaje de ciclodextrina (HPBCD) es inferior y del orden de 1:1 (p/p), obtenemos una disminución en la estabilidad de la Talidomida.

Así, con proporciones de PA : CD (HPBCD) del orden de 1:1 (p/p), obtenemos una marcada degradación del principio activo, presentando valores de Talidomida inalterado de sólo un 77,41 % \pm 7,54 , mientras que el complejo 1:2 PA : HPBCD presenta unos valores de estabilidad de 82,05% \pm 5,34. Este resultado nos lleva a concluir que la HPBCD en relaciones 1:2 (p/p) puede mejorar la estabilidad de la Talidomida en solución en medio citrato pH 5 (0, 375 M) según nuestras condiciones de trabajo. Aunque los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD en proporciones (p/p) 1:5 y 1:9 presentaron mejores valores de estabilidad, la gran cantidad de CD que se tiene que incorporar en estas formulaciones hace que la rechacemos en futuros estudios.

Otros autores (Krenn, 1992) también señalan que los complejos de Talidomida con HPBCD mejoran la estabilidad del fármaco, ya que obtienen niveles de degradación del principio activo similares en muestras congeladas y en muestras preparadas a temperatura ambiente, pasando de un valor de semivida de 2,1 horas en solución acuosa en ausencia de CD, a otro valor de 4,1 horas en solución diluida con HPBCD. Otro ejemplo de formas líquidas que consiguen mejorar la estabilidad del principio activo es la Fenotiazina, en complejos con derivados de β CD del orden (pa: CD) 1:1 y 1:2 (Lutka, 2000).

13.5 COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE LA TALIDOMIDA CON CDs

Los complejos de inclusión de la Talidomida con la HPBCD se preparan en proporción (p/p) de PA:CD, del orden 1 : 1 y 1 : 2, según el método de obtención de dispersiones sólidas. Se eligen estas relaciones en peso, ya que la relación 1:2 PA : HPBCD nos permite obtener buenos datos de estabilidad y en caso de que se produzcan aumentos marcados en la velocidad de disolución en la Talidomida, en proporciones 1 : 2 frente a 1 : 1, se realizará un posterior proceso de liofilización que nos permita estudiar mayores porcentajes de complejos de Talidomida con HPBCD.

A continuación, se aplica un proceso de liofilización en un liofilizador tipo TELSTAR L 3[®].

Al comienzo de la liofilización se mantienen las muestras durante un periodo de tiempo de 2 horas a la temperatura de (- 50° C) y a las 24 horas comienza el proceso de desecación; la temperatura es de (- 25° C) y a las 48 horas de (-11° C), para terminar el ciclo a las 72 horas con un valor de temperatura de 26° C. Como ya se indica en el proceso de liofilización de la Talidomida materia prima, no se aplica una desecación secundaria por problemas de inestabilidad de nuestro principio activo (Krenn, 1992).

El vacío de la cámara durante las primeras 48 horas es de 0,04 mbs, equilibrándose a las 72 horas a valor de 0,02 mbs.

Todos los ciclos de liofilización fueron semejantes y sus variaciones son debidas únicamente a una mayor duración del ciclo por presentar mayores volúmenes a liofilizar.

13.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE TALIDOMIDA CON HPBCD

En la caracterización se determina el aspecto físico y la estructura cristalina de los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD.

Aspecto físico: *para el complejo de inclusión 1 : 1 PA : HPBCD como para 1 : 2 PA : HPBCD es de un aspecto pulverulento, de color blanco, exfoliable, inodoro , seco y de fácil manejo.*

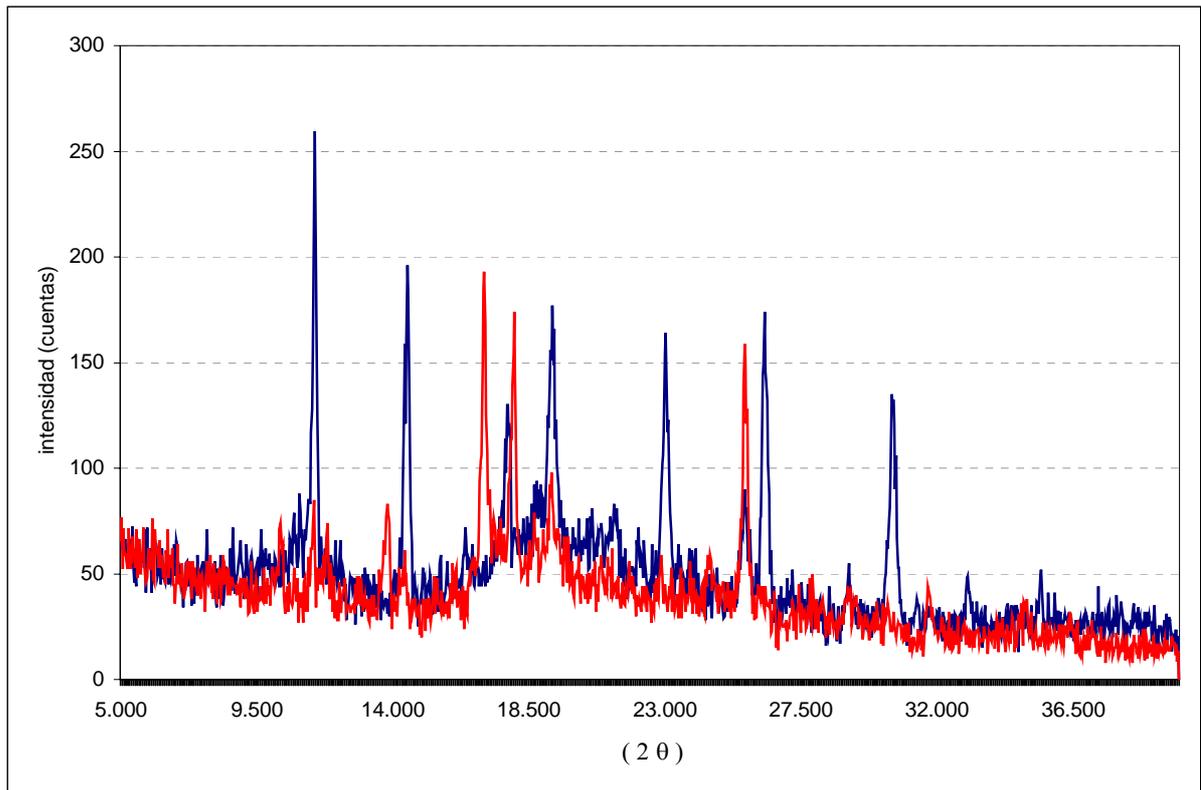
Rayos X: *Esta técnica nos permite evaluar los cambios en la cristalinidad de las mezclas físicas de Talidomida con HPBCD en proporciones 1 : 1 y 1 : 2 frente a los complejos de inclusión de Talidomida: HPBCD (1:1) (1:2).*

Así, en la gráfica 46 se representa el difractograma de la mezcla física PA : HPBCD (1:1), observándose la presencia de picos máximos de intensidades que coinciden con los máximos de la Talidomida materia prima frente al difractograma del complejo de inclusión de PA: HPBCD (1:1), en donde aparece un descenso acusado en los valores de intensidades.

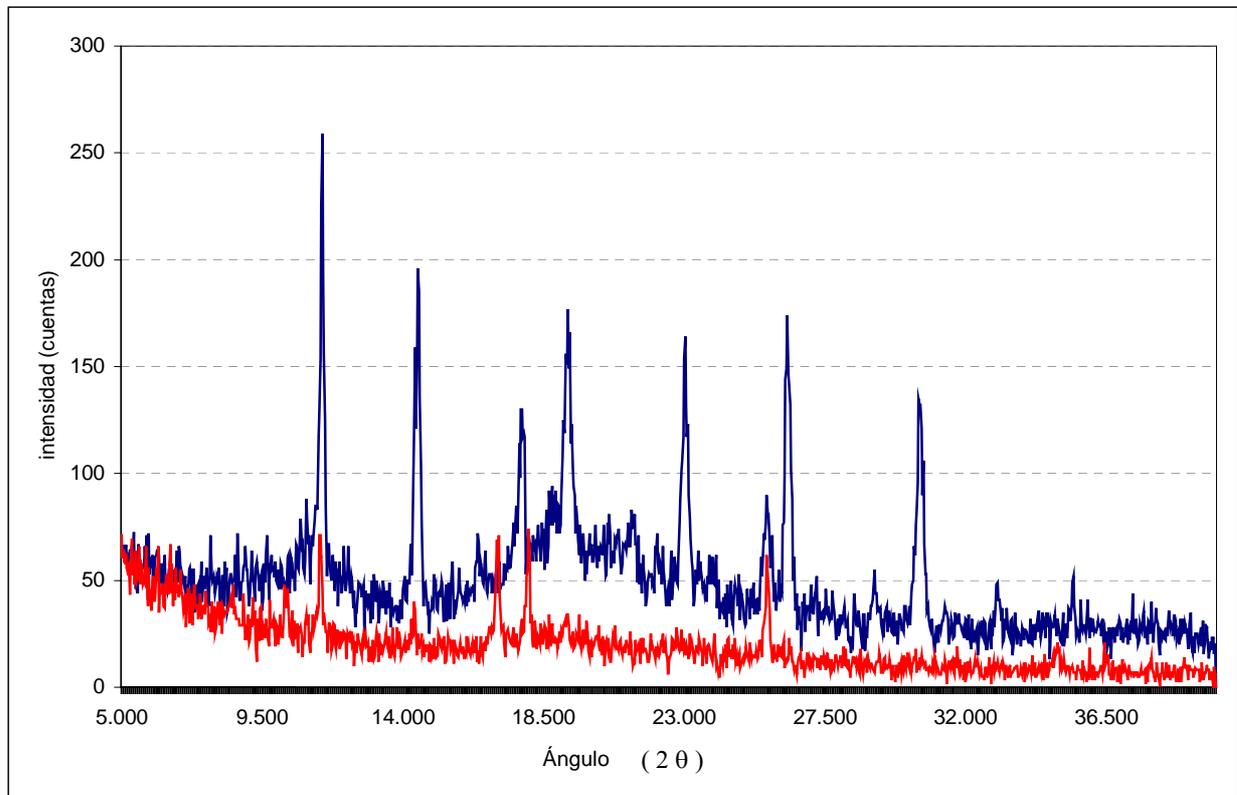
En la gráfica 47 se representa el difractograma de la mezcla física PA : HPBCD (1:2), observándose la presencia de picos máximos de intensidades que coinciden con los máximos de la Talidomida materia prima frente al difractograma del complejo de inclusión de PA : HPBCD (1:2), en donde también se observa un descenso en los valores de intensidad.

En el complejo de inclusión PA : HPBCD (1:1) se observa un descenso de intensidad en algunos de los planos de difracción, pero en el complejo PA : HPBCD (1:2) el descenso en los valores de cristalinidad es mucho más acusado, llegando a aparecer únicamente picos para los máximos que tenían mayores valores de intensidades relativas.

Mediante los difractogramas de RX se observa que el proceso de recristalización de las mezclas físicas de Talidomida con HPBCD presenta unas características amorfas y esta pérdida de cristalinidad puede influir sobre la velocidad de disolución de distintos complejos de inclusión.



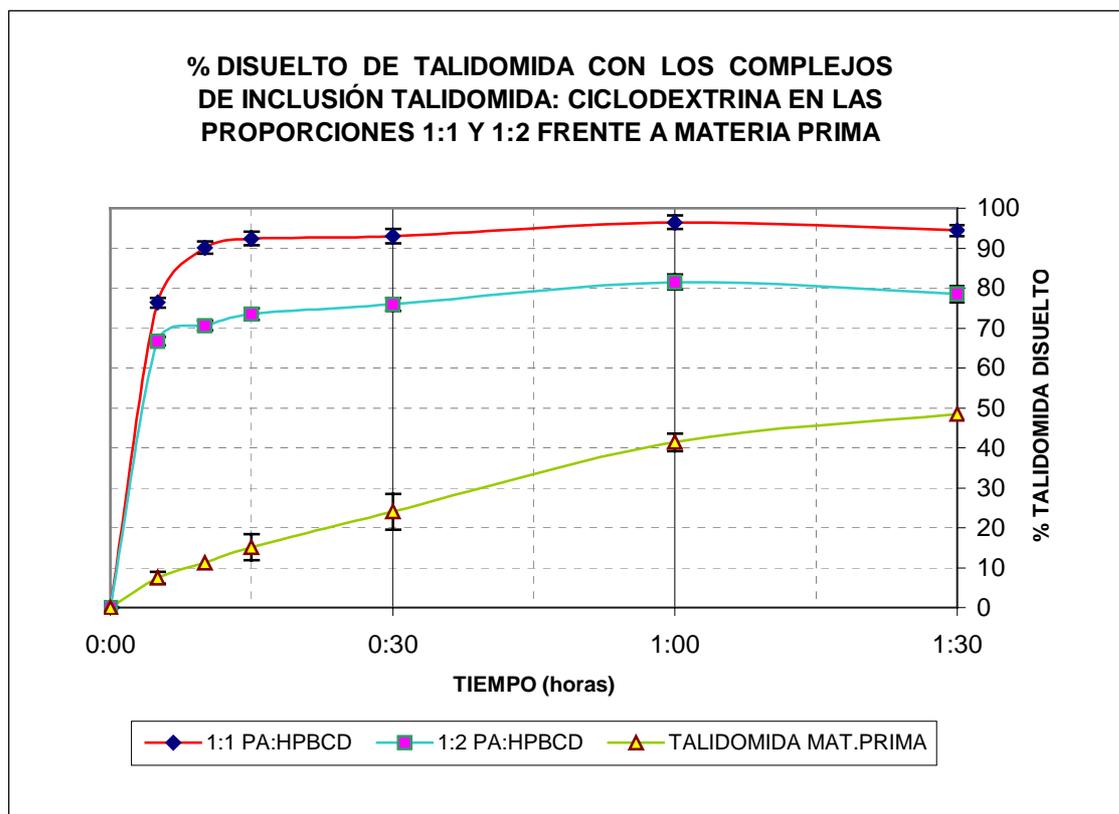
gráfica 46 : Difractogramas de la mezcla física PA : HPBCD (1 : 1) (azul)
frente al complejo de inclusión PA : HPBCD (1 : 1) (rojo)



gráfica 47 : Difractogramas de la mezcla física PA : HPBCD (1 : 2) (azul)
frente al complejo de inclusión PA : HPBCD (1 : 2) (rojo)

13.7 DISOLUCIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE TALIDOMIDA CON HPBCD

Los valores disueltos de los complejos de inclusión recristalizados de Talidomida con HPBCD, en las proporciones (p/p) 1:1 y 1:2, junto con los valores disueltos de Talidomida materia prima sin recristalizar, se representan en la gráfica 48.



gráfica 48: Disolución de los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD

Con ambas formulaciones (1:1 PA:HPBCD y 1:2 PA:HPBCD) se consigue incrementar marcadamente el porcentaje disuelto de principio activo en función del tiempo, frente a los valores de disolución que se obtienen con la Talidomida materia prima; por lo que se puede afirmar que los complejos de inclusión de Talidomida con CD, obtenidos tras procesos de liofilización, incrementan significativamente la velocidad de disolución de nuestro principio activo.

A continuación se recogen en la tabla 16 los porcentajes disueltos de Talidomida a los cinco minutos para la Talidomida materia prima sin recristalizar, Talidomida materia prima recristalizada y los complejos de inclusión, PA : HPBCD (1:1) y (1:2), así como el tiempo de disolución necesario para alcanzar el 80% disuelto de principio activo en las anteriores formulaciones.

tabla 16: Ensayos de disolución para los complejos de inclusión de Tal:HPBCD

Formulación	% a 5'	TD 80%
TALIDOMIDA MAT. PRIMA	7,46 ± 1,24	6 h
TALIDOMIDA MAT. PRIMA RECRISTALIZADA	68,69 ± 3,55	10' – 15'
1:1 (TAL: HPBCD) RECRISTALIZADA	76,37 ± 1,26	5' - 10'
1:2 (TAL: HPBCD) RECRISTALIZADA	66,73 ± 10,14	1 h

En estos perfiles de disolución, se aprecia que los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD producen un marcado incremento en la velocidad de disolución de nuestro principio activo. Así, en los complejos de inclusión 1:1 y 1:2 (TAL : HPBCD) superan el 80 % disuelto en menos de 60 minutos, mientras que la Talidomida materia prima sólo presenta disuelto un 41,4 % ± 2,19 para este tiempo de disolución.

Otro ejemplo lo constituyen los complejos de inclusión obtenidos también por técnica de liofilización de la Hidrocortisona con HPBCD, que consigue mejorar la solubilidad acuosa del principio activo, de forma que el porcentaje de disolución del fármaco a la hora es de 25-40%, comparado con el 5% del principio activo sin acomplejar con CDs (Filipovic, 2000); los complejos de inclusión de Albendazol: HPBCD en proporciones (1:1) que logra incrementar significativamente el grado de disolución de este fármaco (Castillo, 1999) y los complejos de inclusión de la Bropirimina con HPBCD en relaciones (1:1), que mejoran en gran medida la solubilidad acuosa de esta sustancia (Echezarreta, 2000).

ANOVA

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución, a los cinco minutos, para la Talidomida materia prima sin recristalizar, Talidomida materia prima recristalizada y las formulaciones con CDs en las proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 se representa en las tablas 17 y 18 respectivamente. Proporcionan un valor de $F = 52,78$ con $P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de disolución de Talidomida materia prima con el resto de las formulaciones recristalizadas.

El análisis por comparaciones múltiples, muestra que la Talidomida materia prima presenta una velocidad de disolución estadísticamente inferior al resto de las formulaciones ($P < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas entre la Talidomida materia prima recristalizada y las formulaciones con complejos de inclusión con CDs.

**Tabla 17 : ANOVA TALIDOMIDA MATERIA PRIM A / TALIDOMIDA MATERIA PRIM A RECRISTALIZADA
ANALISIS DE VARIANZA**

FORMULACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	9042,75	3	3014,25	52,78	0,0000
INTRAGRUPOS	456,9	8	57,1125		
TOTAL	9499,65	11			

Tabla 18 : ANALISIS CONTRASTES PARA P=95 % POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD)

FORMULACIÓN	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRASTE	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima sin Recristalizar	3	7,46667	X	A / C	±61,2	±14,2292
B: complejo 1:2 Tal: CD	3	65,7333	X	A / D	±68,8333	±14,2292
C: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	68,6667	X	A / B	±58,2667	±14,2292
D: complejo 1:1 Tal:CD	3	76,3	X	C / D	- 7,63333	±14,2292
				C / B	2,93333	±14,2292
				D / B	10,5667	±14,2292

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución, a los quince minutos, del principio activo sin recristalizar, recristalizado y en formulación con CDs en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2, se representa en las tablas 19 y 20, respectivamente. Proporcionan un valor de $F = 88,61$ con un valor de

$P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de disolución de la Talidomida materia prima con el resto de formulaciones recristalizadas.

Curiosamente se observa la presencia de un grupo homogéneo entre la Talidomida recristalizada y los complejos de inclusión, con una mayor proporción de CD (1:2 PA:CD), mientras que en el complejo en proporción 1:1 PA:CD es el que presenta una mayor velocidad de disolución, con valores cercanos al 99 %.

**Tabla 19 : ANOVA TALIDOMIDA MATERIA PRIMA / TALIDOMIDA MATERIA PRIMA RECRISTALIZADA
ANÁLISIS DE VARIANZA**

FORMULACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	11937,6	3	3979,21	88,61	0,0000
INTRAGRUPOS	359,267	8	44,9083		
TOTAL	12296,9	11			

Tabla 20 : ANÁLISIS CONTRASTES PARA P=95 % POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD)

FORMULACIÓN	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRASTE	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima sin Recristalizar	3	15,767	X	A / C	± 68,167 (*)	± 12,6177
B: complejo 1:2 Tal: CD	3	73,267	X	A / D	± 83,367 (*)	± 12,6177
C: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	83,933	X	A / B	± 57,500 (*)	± 12,6177
D: complejo 1:1 Tal:CD	3	99,133	X	C / D	- 15,200 (*)	± 12,6177
				C / B	10,667	± 12,6177
				D / B	- 25,867 (*)	± 12,6177

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Por otra parte, no encontramos mejora en los porcentajes de disolución a medida que aumentamos la concentración de CD en el complejo. Este resultado, unido a la dificultad en la dosificación que se encontraría en la utilización de mayores proporciones de Talidomida : ciclodextrina, nos lleva a seleccionar la proporción (p/p) de PA: HPBCD (1:2) como la más adecuada, al presentar una mejora significativa en los perfiles de disolución, a la vez que aumenta la estabilidad de nuestro principio activo cuando se compara con proporciones menores de complejos con CDs.

Un resultado similar se ha obtenido con distintos principios activos. Así, la Bromhexina acomplejada con la β CD, en complejos de relación de PA:CD del tipo 1:1, han resultado una mejora en la solubilidad y un notable incremento en el perfil de disolución del fármaco (Ammar, 1995); la Glicazida en complejos con β CD en relación 1,5 : 1 (Ozkan, 2000) y el paracetamol en dispersión sólida con β CD, mejora su solubilidad y su grado de disolución (Tasic, 1992).

El Nifedipino liofilizado con 2- HPBCD mejora su grado de disolución, solucionando de esta forma sus problemas de biodisponibilidad en formas sólidas (Wang, 1993), ya que este principio activo sólo alcanza a la hora un porcentaje disuelto del orden de $22,6 \% \pm 0,6$, mientras que en complejo con la HPBCD alcanza un 50 % de principio activo disuelto a los $9,1 \pm 0,2$ minutos y a la hora se disuelven $92,9 \pm 1,3$ % de fármaco. Así, las formas liofilizadas de Nifedipino con la HPBCD (1/3 p/p) fueron seleccionadas por mejorar considerablemente, tanto “in vitro” como “in vivo”, la farmacocinética de este fármaco (Wang, 1993) y de forma descendente desde la relación 1:2, 1:1, 2:1 y peor en la relación 3:1.

13.8 DISCUSIÓN PARCIAL

De los estudios de solubilidad de la Talidomida en formas líquidas con incorporación de varios tipos de CDs a distintos porcentajes y en medio citrato de pH 5 (0,375 M) según nuestras condiciones de trabajo, se obtuvieron los mejores resultados en grado de disolución de nuestro principio activo en los complejos de inclusión de Talidomida con HPBCD, pasando de una concentración de principio activo disuelto sin adición de CD, de $0,1659 \pm 5,29 \times 10^{-3}$ μ moles a un valor de concentración del orden de cuatro y ocho veces superior con porcentajes de HPBCD de 5 % y de 10 % respectivamente, que son valores viables para una formulación.

Mediante expresiones matemáticas se calcularon las constantes de estabilidad de los diferentes complejos de inclusión de Talidomida con CD, obteniéndose el mayor valor de constante para el complejo formado con HPBCD, lo que nos indica que de todos los complejos formados con las ciclodextrinas ensayadas, el complejo con HPBCD es el más estable para nuestro principio activo en nuestras condiciones de trabajo.

De los estudios de solubilidad de Talidomida en formas líquidas con HPBCD en medio citrato de pH 5 (0,375 M) frente a medio citrofosfato de pH 6,5 y en nuestras condiciones de trabajo, se obtiene que a valores inferiores del 25 % de ciclodextrina no hay influencia del medio y a valores del 50 % hay mayor solubilidad de nuestro principio activo en medio citrato de pH 5 (0,375 M).

De los estudios de estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con HPBCD en medio citrato de pH 5 (0,375 M) y en nuestras condiciones de trabajo se deduce que el porcentaje de Talidomida permanece inalterado cuando la ciclodextrina se encuentra en el medio en proporción 1:2 (p/p) o superior de PA:CD

Los porcentajes de disolución para nuestro principio activo a los 5 minutos en complejos de inclusión de la Talidomida con la HPBCD, en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 es de $76,37 \pm 1,26$ y de $66,73 \pm 1,01$ respectivamente, frente a los $7,46 \% \pm 1,24$ que presenta la Talidomida materia prima y los $68,69 \% \pm 3,55$ de la Talidomida recristalizada. Por otro lado, el 80 % disuelto se alcanza en 6 horas para la Talidomida materia prima, de 10 a 15 minutos para la Talidomida recristalizada y para los complejos 1:1 y 1:2 PA: HPBCD se necesitan de de 5-10 minutos y 1 hora respectivamente.

Por todo ello se selecciona la HPBCD como la ciclodextrina más apropiada para la formación de formas líquidas y sólidas con Talidomida, debido a su alta solubilidad acuosa superior al resto, a su mayor valor de la constante de estabilidad del complejo frente al resto de las otras CDs, y por no tener toxicidad oral detectable (Wang, 1993).

14

FORMULACIONES DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA

14.1 FORMAS LÍQUIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA

Se preparan unas formas líquidas de Talidomida con ovoalbúmina, ya que la crospovidona forma suspensiones.

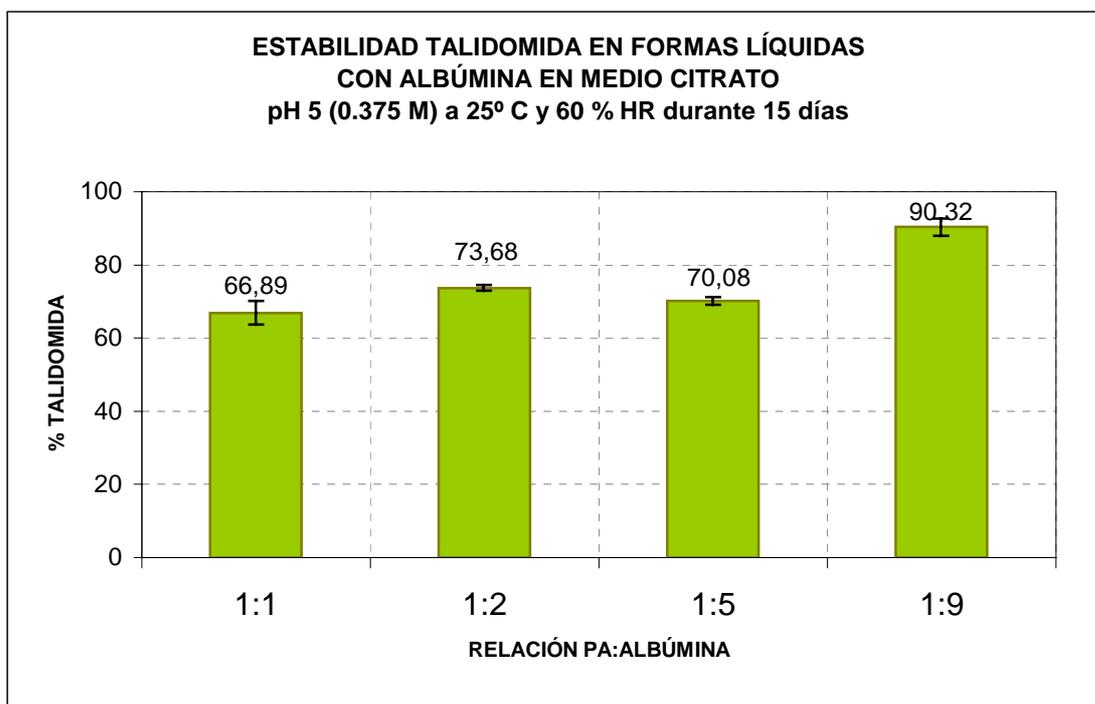
Las soluciones de albúmina se preparan en medio citrato pH 5 (0,375 M) y en las relaciones (p/p) (Tal : alb) 1:1; 1:2; 1:5 y 1:9, según el método analítico de formas líquidas de Talidomida con albúmina, presentando todas ellas una concentración inicial de principio activo de 80 µg/ml.

14.2 ESTABILIDAD DE LA TALIDOMIDA EN FORMAS LÍQUIDAS CON ALBÚMINA

Para poder determinar la estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con albúmina, se somete a las soluciones descritas anteriormente a condiciones de almacenamiento de 25° C y humedad del 60%, a un periodo de almacenamiento de 15 días .

De los datos del análisis espectrofotométrico, se aprecia una mayor estabilización de la Talidomida a medida que aumenta la cantidad de albúmina, tal como se representa en la gráfica 49; así, en las proporciones de Tal:Alb de tipo 1:1, el porcentaje de Talidomida inalterado es de 66,89 (± 3,24) mientras que, con mayores incrementos de albúmina del orden de 1:9, el porcentaje inalterado de principio activo es de 90,32 (± 2,31).

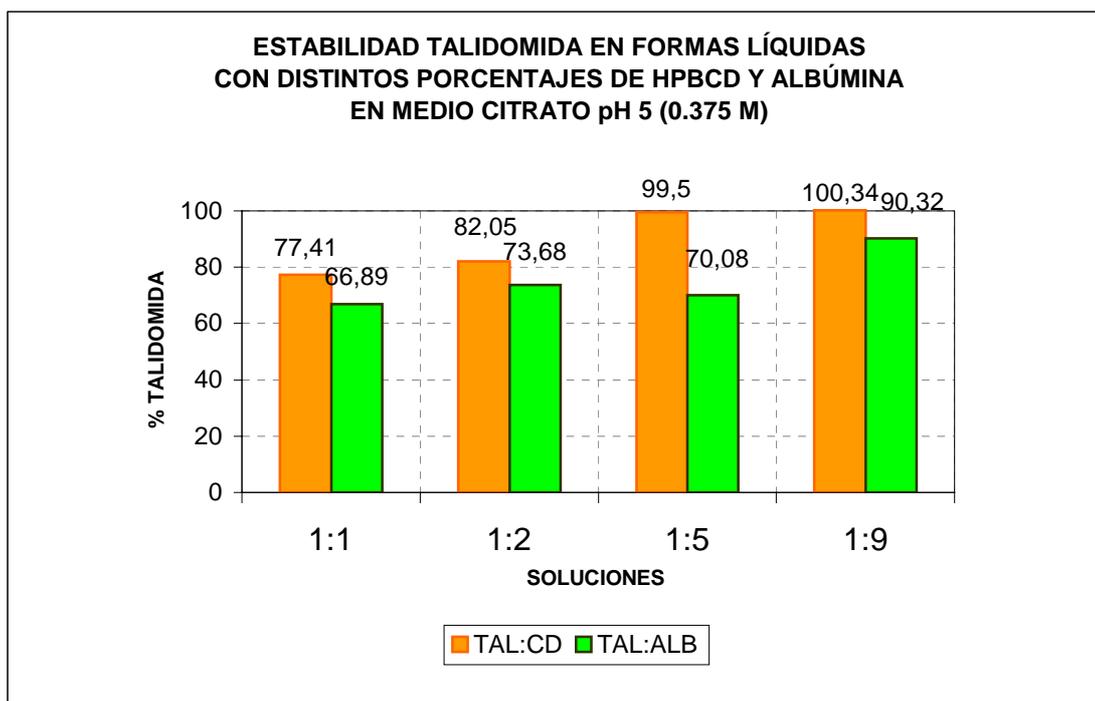
Para proporciones de Tal: Alb del orden de 1:2 y 1:5, el porcentaje inalterado de Talidomida es muy similar, siendo del orden de 73,68 (± 0,76) y de 70,08 (± 1,05) respectivamente.



gráfica 49: Estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con albúmina (25°C, 60%, 15 días)

Si tenemos en cuenta que una solución patrón de Talidomida conservada en condiciones de temperatura de 25° C y de humedad del 60 %, al cabo de 15 días presenta un porcentaje de Talidomida inalterada del orden del 7% , podemos observar que la albúmina empleada en la formación de tales soluciones ejerce sobre nuestro principio activo un efecto estabilizador en todas las proporciones de Talidomida : albúmina ensayadas.

Cuando comparamos los valores de estabilidad para la Talidomida en formas líquidas con CDs y con albúmina en proporciones de principio activo:excipiente del orden de 1:1, 1:2; 1:5 y 1:9, almacenadas durante un periodo de tiempo de 15 días en condiciones de temperatura de 25° C y de 60% de humedad, se observa que, aunque se alcanzan los mayores valores de estabilidad para nuestro principio activo en complejos con CDs, los datos obtenidos de las soluciones con albúmina no se diferencian mucho de los obtenidos con CDs en proporciones (p/p) del orden 1:2 y 1:9, tal como se representa en la gráfica 50.



gráfica 50 : Estabilidad de la Talidomida en formas líquidas con HPBCD y albúmina (25°C, 60%, 15 días)

Así, para relaciones (p/p) de 1:1 y 1:5 de PA : CD, los porcentajes de principio activo inalterado son del orden de 77,41 ($\pm 7,54$) y de 99,5 ($\pm 6,3$) respectivamente, mientras que para las proporciones (p/p) de 1:1 y 1:5 de PA : ALB, los valores inalterados para nuestro principio activo son de 66,89 ($\pm 3,24$) y de 70,08 ($\pm 1,05$) respectivamente.

En función de los resultados de la gráfica 50, podemos considerar que no existen grandes diferencias entre las respectivas formulaciones de Talidomida con CD frente a las formulaciones de Talidomida con albúmina, en cuanto a valores de estabilidad se refiere, para nuestro principio activo en nuestras condiciones de almacenamiento a las proporciones (p/p) de 1:2 y de 1:9.

Debido a la cantidad de excipiente que se tiene que incorporar a la formulación con albúmina, se selecciona la proporción (p/p) 1:2 TAL:ALB para posteriores estudios de nuestras soluciones.

14.3 DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA

Las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina y con crospovidona en medio citrato pH 5 (0,375 M), se preparan incorporando la albúmina o la crospovidona en las relaciones (p/p) 1:1 y 1:2 de Talidomida: vehículo, según el método analítico de dispersiones sólidas.

A continuación, se aplica un proceso de liofilización en un liofilizador tipo TELSTAR L3[®].

Al comienzo de la liofilización se mantienen las muestras durante un periodo de tiempo de 2 horas a la temperatura de (- 50° C) y a las 24 horas comienza el proceso de desecación; la temperatura es de (- 25° C) y a las 48 horas de (-11° C) para terminar el ciclo a las 72 horas con un valor de temperatura de 26° C. Como ya se indica en el proceso de liofilización de la Talidomida materia prima, no se aplica una desecación secundaria por problemas de inestabilidad de nuestro principio activo (Krenn, 1992).

El vacío de la cámara durante las primeras 48 horas es de 0,04 mbs equilibrándose a las 72 horas a valor de 0,02 mbs.

Todos los ciclos de liofilización fueron semejantes y sus variaciones son debidas únicamente a una mayor duración del ciclo por presentar mayores volúmenes a liofilizar.

14.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA

DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA

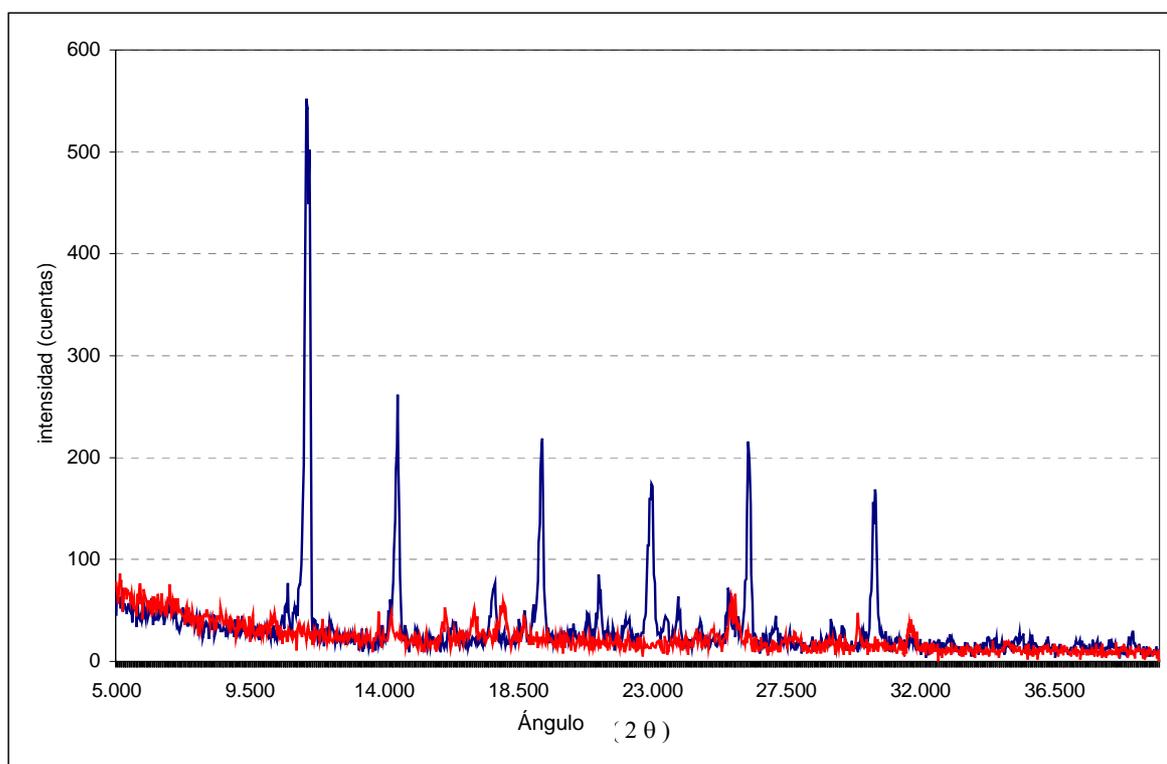
Se determina el aspecto físico, la estructura cristalina y la morfología de las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2.

Aspecto físico:

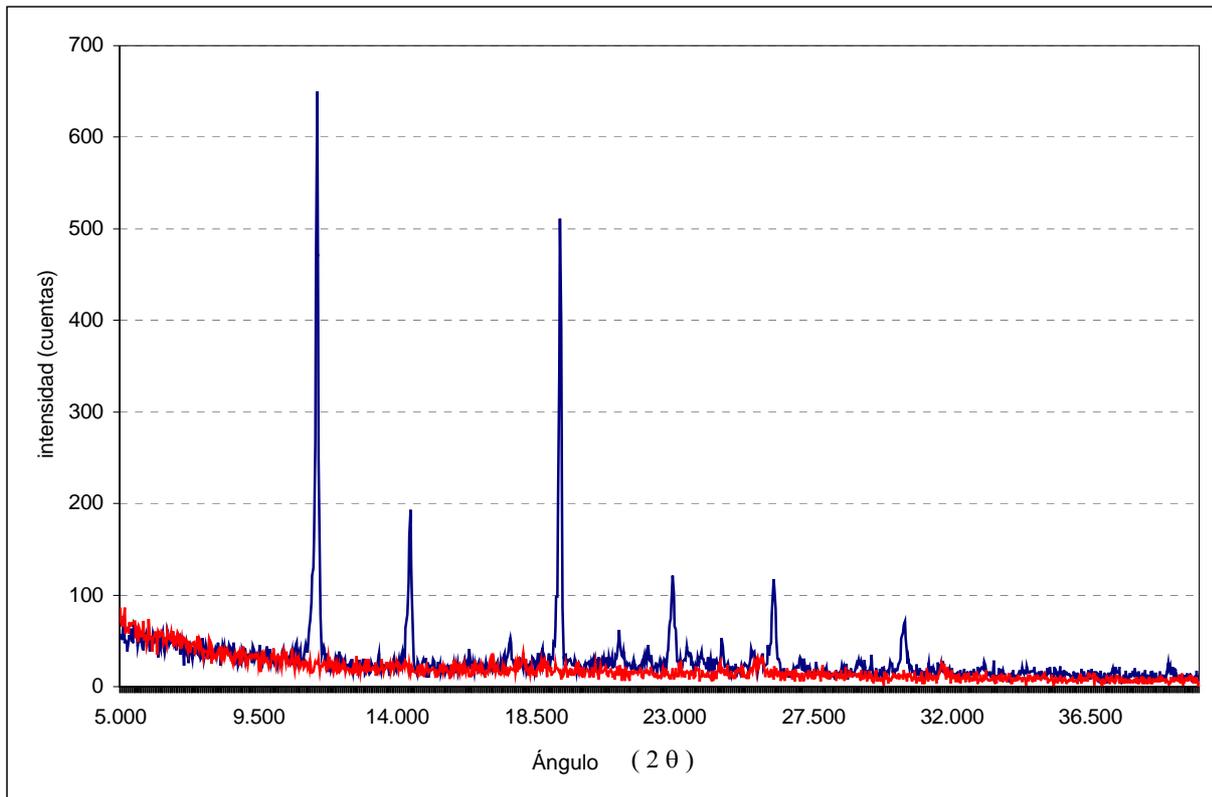
Todas las muestras de las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina, tanto en proporciones (p/p) 1:1 como 1:2, tenían aspecto de polvo de color blanco, seco, de fácil manejo y con ligero olor a albúmina, uniforme y homogéneo.

RX:

Esta técnica nos permite comparar las estructuras cristalinas que presentan las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 frente a las respectivas mezclas físicas, observándose claramente en las dispersiones sólidas, una estructura amorfa originada por el proceso de liofilización, mientras que las mezclas físicas presentan una estructura cristalina tal y como se recoge en las gráficas 51 y 52.



Gráfica 51: Difractogramas de la mezcla física Tal:Alb (1:1) (azul) y la dispersión sólida Tal:Alb (1:1) (rojo)



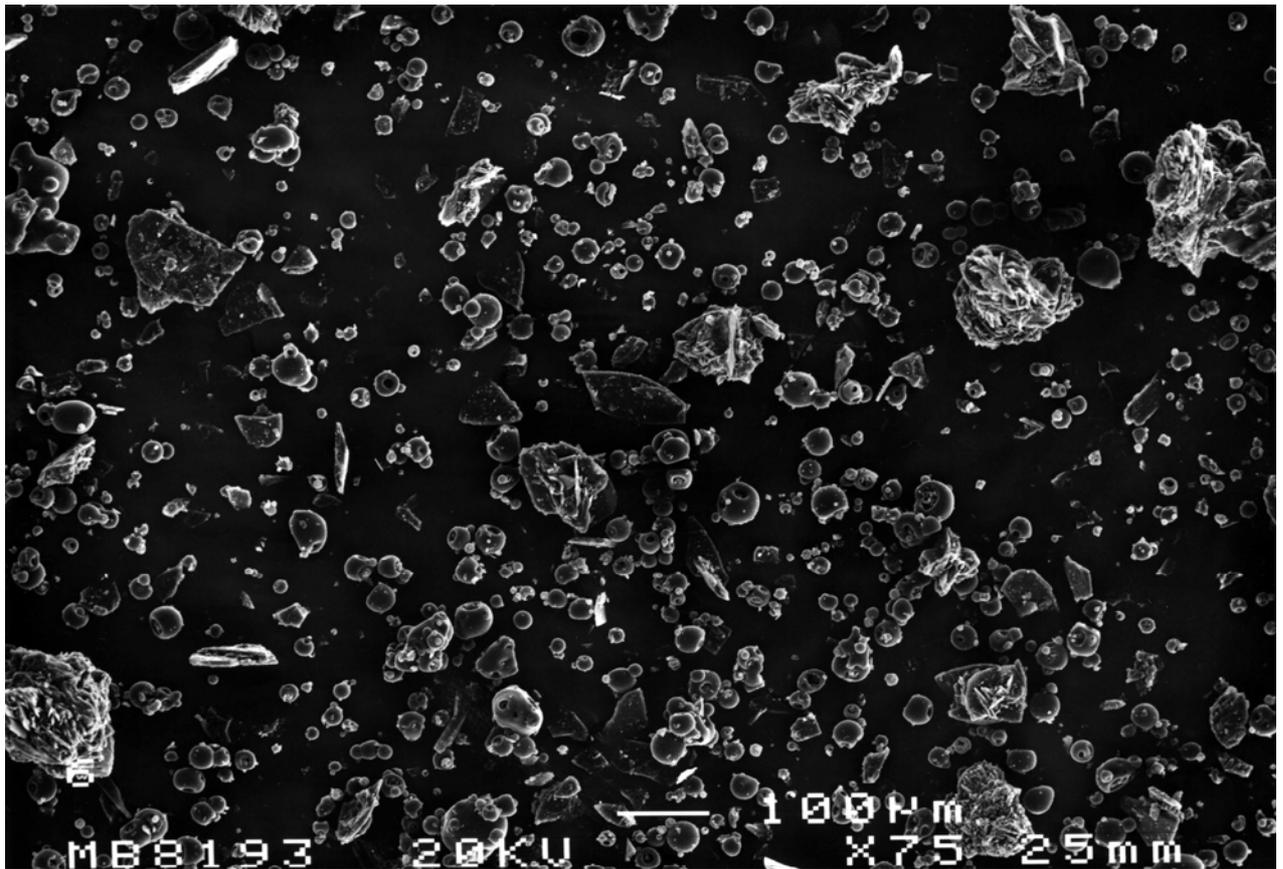
gráfica 52: Diffractogramas de la mezcla física Tal:Alb (1:2) (azul) y la dispersión sólida Tal:Alb (1:2) (rojo)

Cuando se comparan las dispersiones sólidas con albúmina, tanto en relación(p/p) 1:1 como 1:2 TAL:ALB, se observa un ligero descenso en la cristalinidad al aumentar la proporción de albúmina en la formulación.

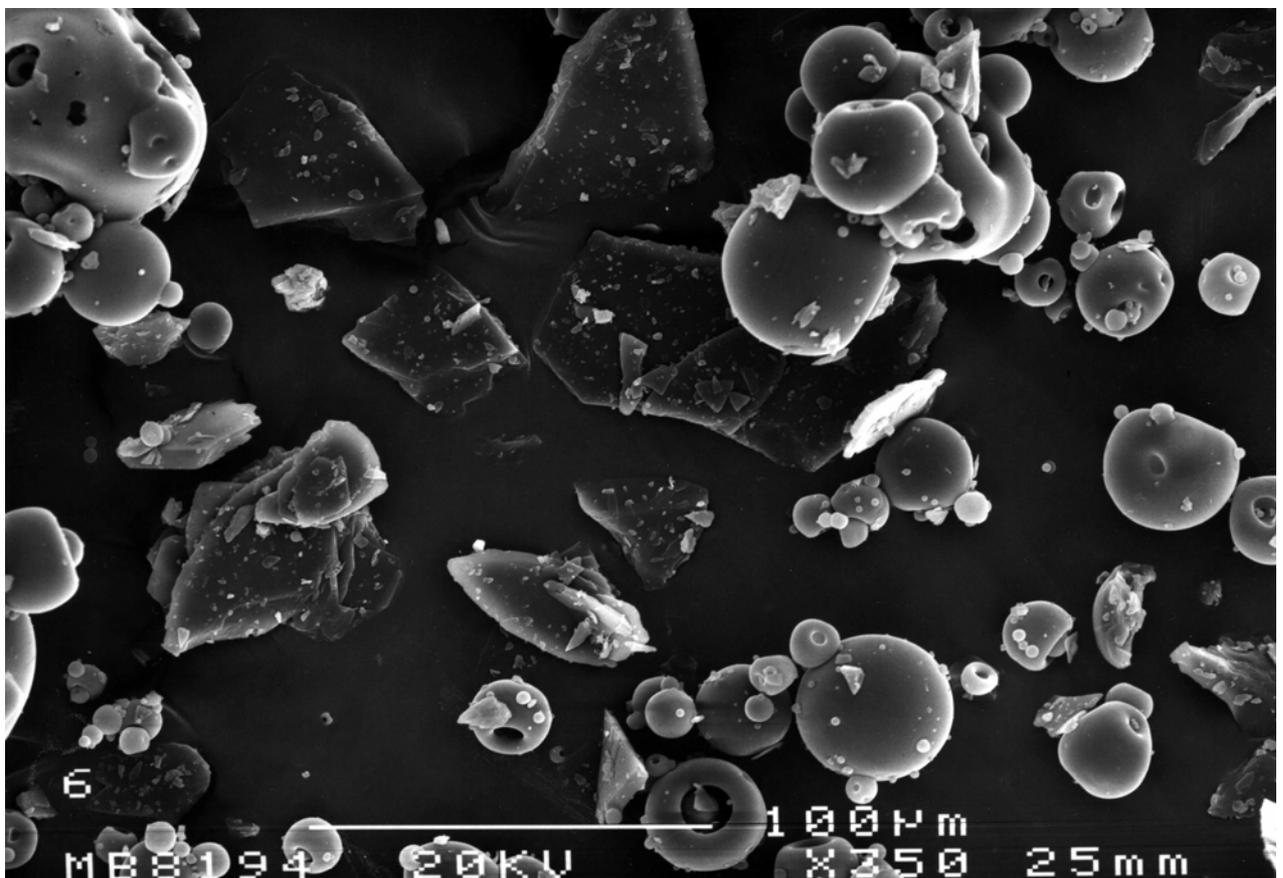
Microscopía electrónica:

La morfología de las mezclas físicas de Tal:alb en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 es comparada con la de las dispersiones sólidas de Tal:alb en relaciones (p/p) 1:1 y 1:2. Así, en la microfotografía 5 se puede observar la estructura de la mezcla física Tal: alb (1:1) diferenciándose claramente unas formas redondeadas que se corresponden con la albúmina y unas formas de mayor tamaño con superficie rugosa, que se corresponden con la Talidomida, ya que si se compara la microfotografía 2 (Talidomida materia prima) con la microfotografía 5 se distingue perfectamente la estructura que corresponde a cada sustancia en la mezcla física.

Estas diferencias se aprecian más claramente en la microfotografía 6, donde las estructuras están aproximadas 350 aumentos, distinguiéndose perfectamente la albúmina de la Talidomida según sus formas ya descritas.



Microfotografía 5: morfología de la mezcla física (Tal:alb) (1:1) x 75 aumentos

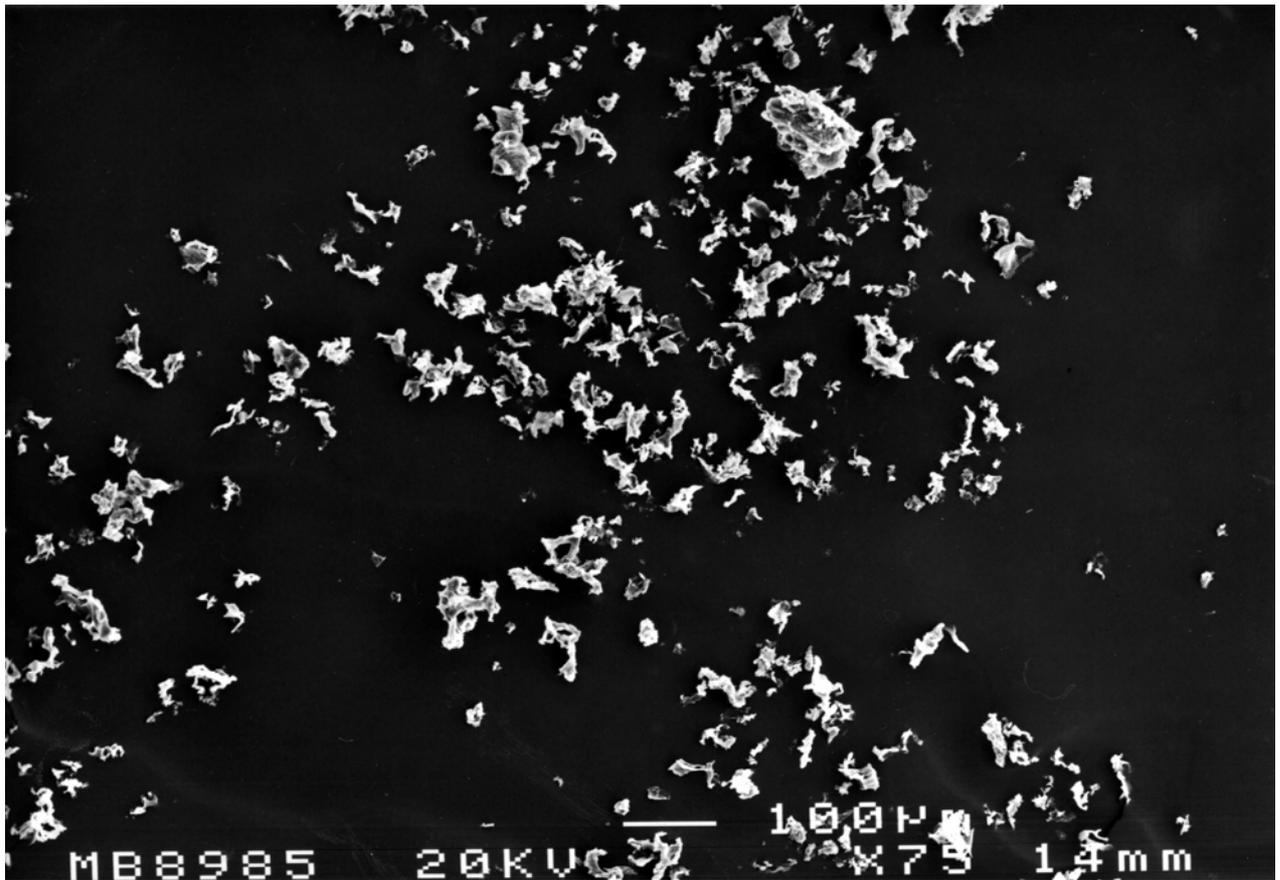


Microfotografía 6: morfología de la mezcla física (Tal:alb) (1:1) x 350 aumentos

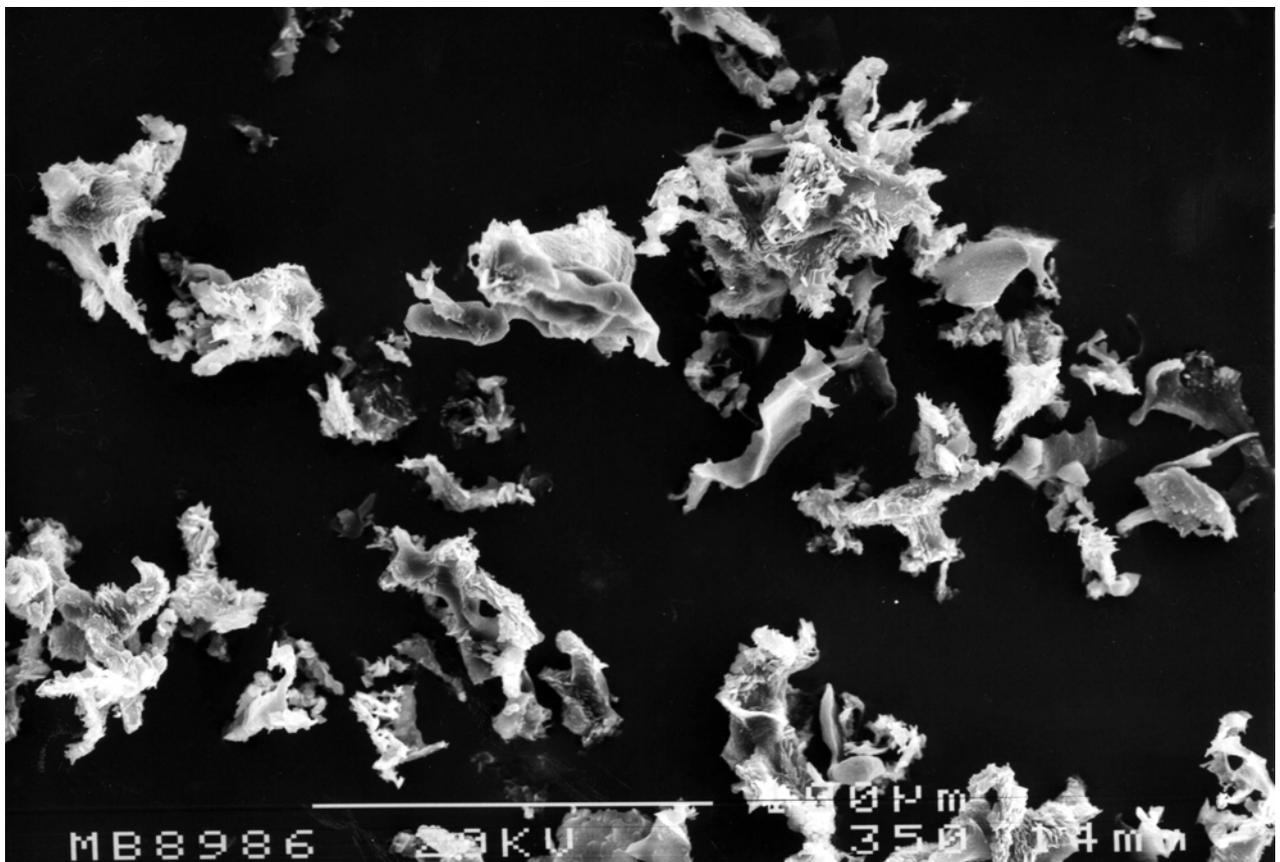
En las microfotografías 7 y 8 se aprecia la estructura de la dispersión sólida de Tal : alb en proporción (p/p) (1:1), aproximada 75 y 350 aumentos respectivamente, observándose el cambio de forma física tras sufrir el proceso de liofilización. Así, en primer lugar observamos una acusada disminución del tamaño, tanto del principio activo como del vehículo, y una ausencia de las partículas esféricas que corresponden a la albúmina, apreciándose una estructura fibrosa que atribuimos a la dispersión de Tal:alb, según se visualiza en la microfotografía 8 a 350 aumentos.

Por otra parte, la mezcla física de Tal : alb (1:2) se puede observar en las microfotografías 9 y 10 aproximadas 75 y 350 aumentos respectivamente, y como se indica anteriormente para la mezcla física Tal:alb (1:1), se distinguen las formas redondeadas que se corresponden con la albúmina y las formas de mayor tamaño y aspecto rugoso de la Talidomida, apreciándose mayor número de formas redondeadas, puesto que la proporción en peso de albúmina es el doble que de Talidomida.

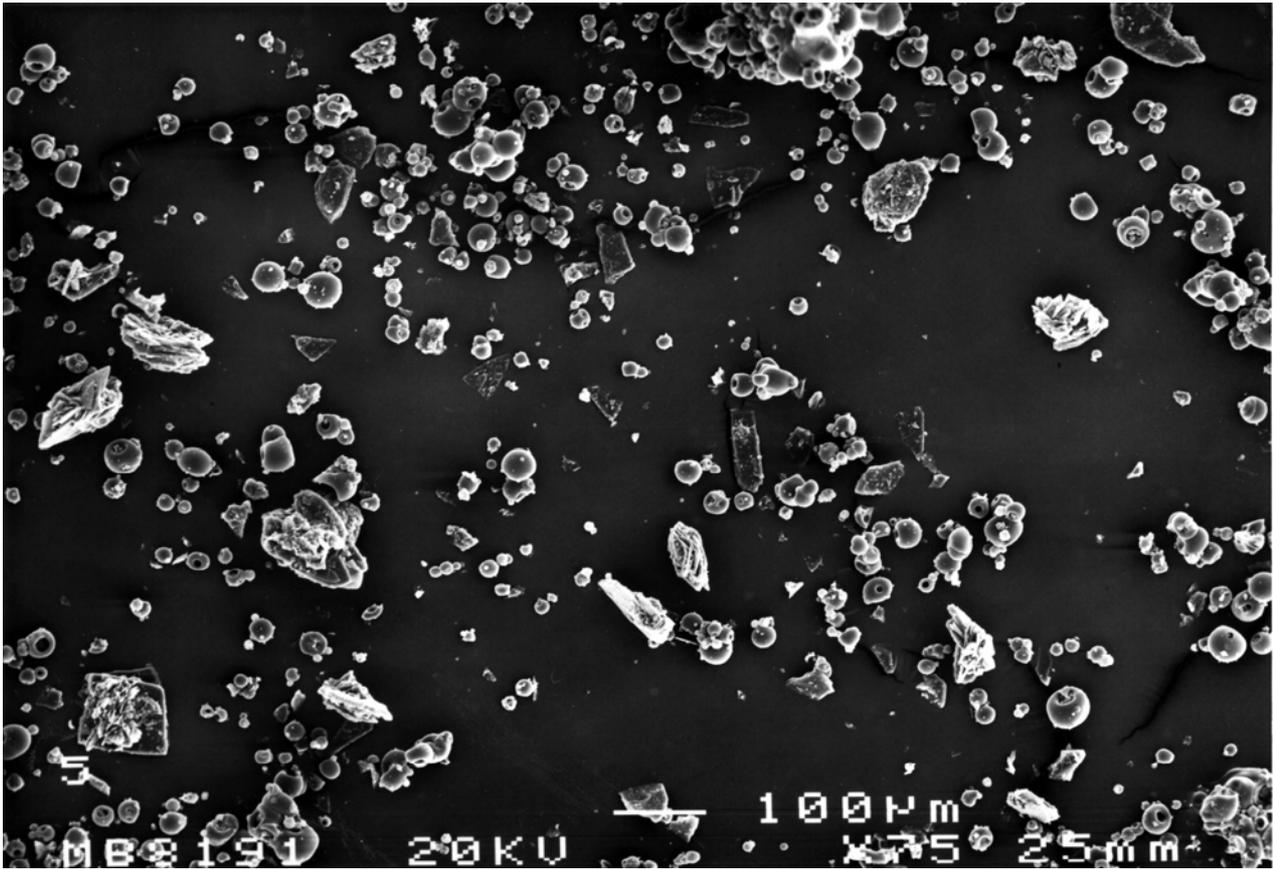
En las microfotografías 11 y 12 se observa la morfología de la dispersión sólida de Tal : alb en proporción (p/p) (1:2), aproximada 350 y 3000 aumentos respectivamente, visualizándose el espectacular cambio físico y la inclusión de la Talidomida en las moléculas de albúmina



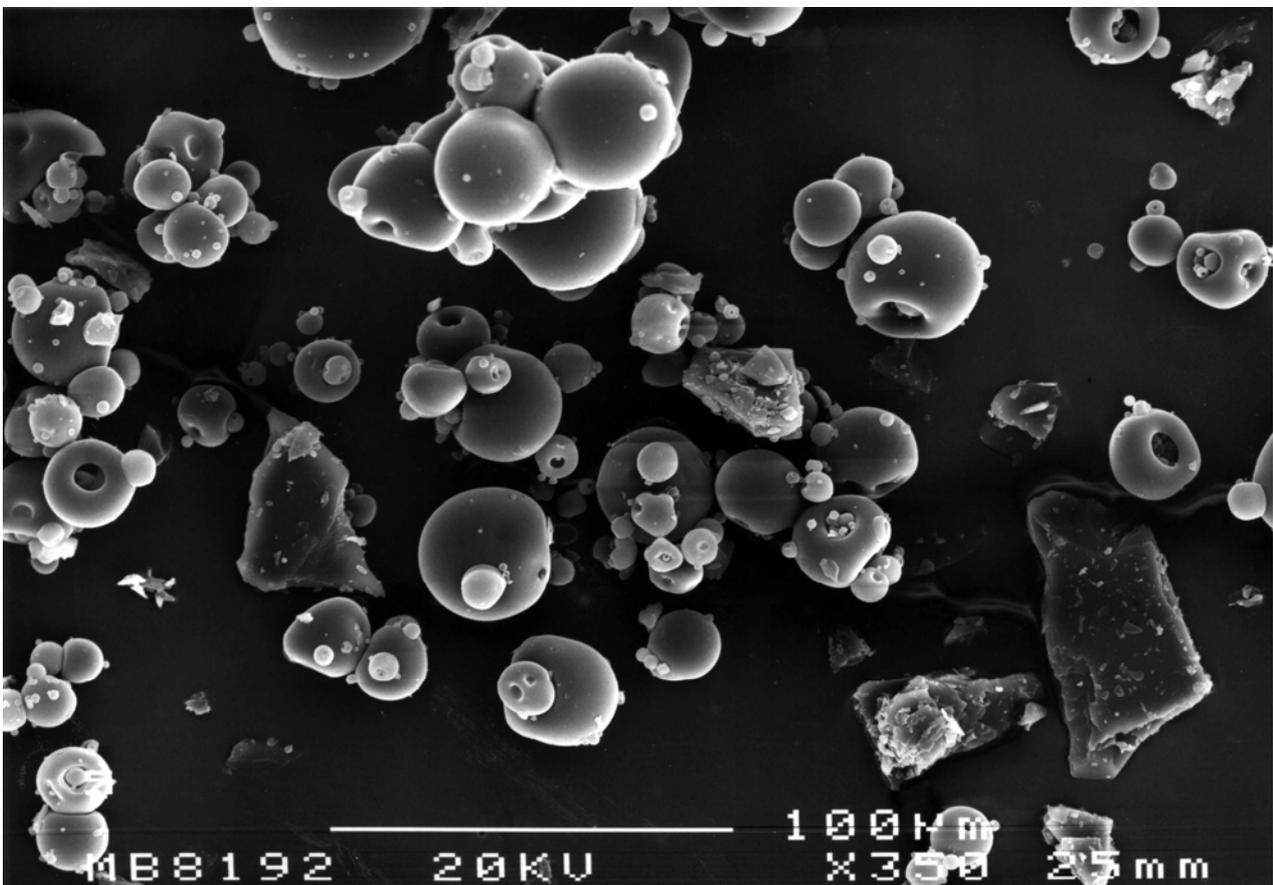
Microfotografía 7: morfología de la dispersión sólida (Tal:alb) (1:1) x 75 aumentos



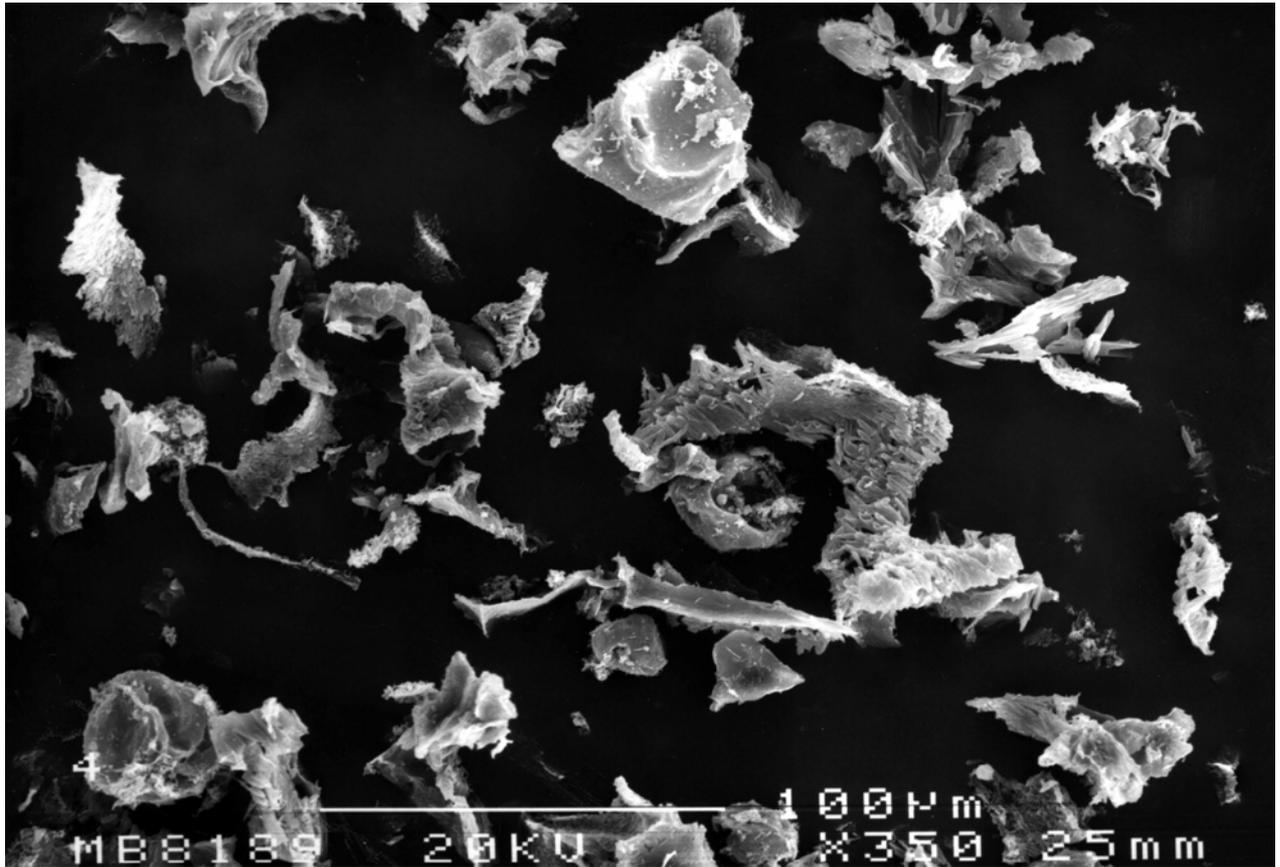
Microfotografía 8: morfología de la dispersión sólida (Tal:alb) (1:1) x 350 aumentos



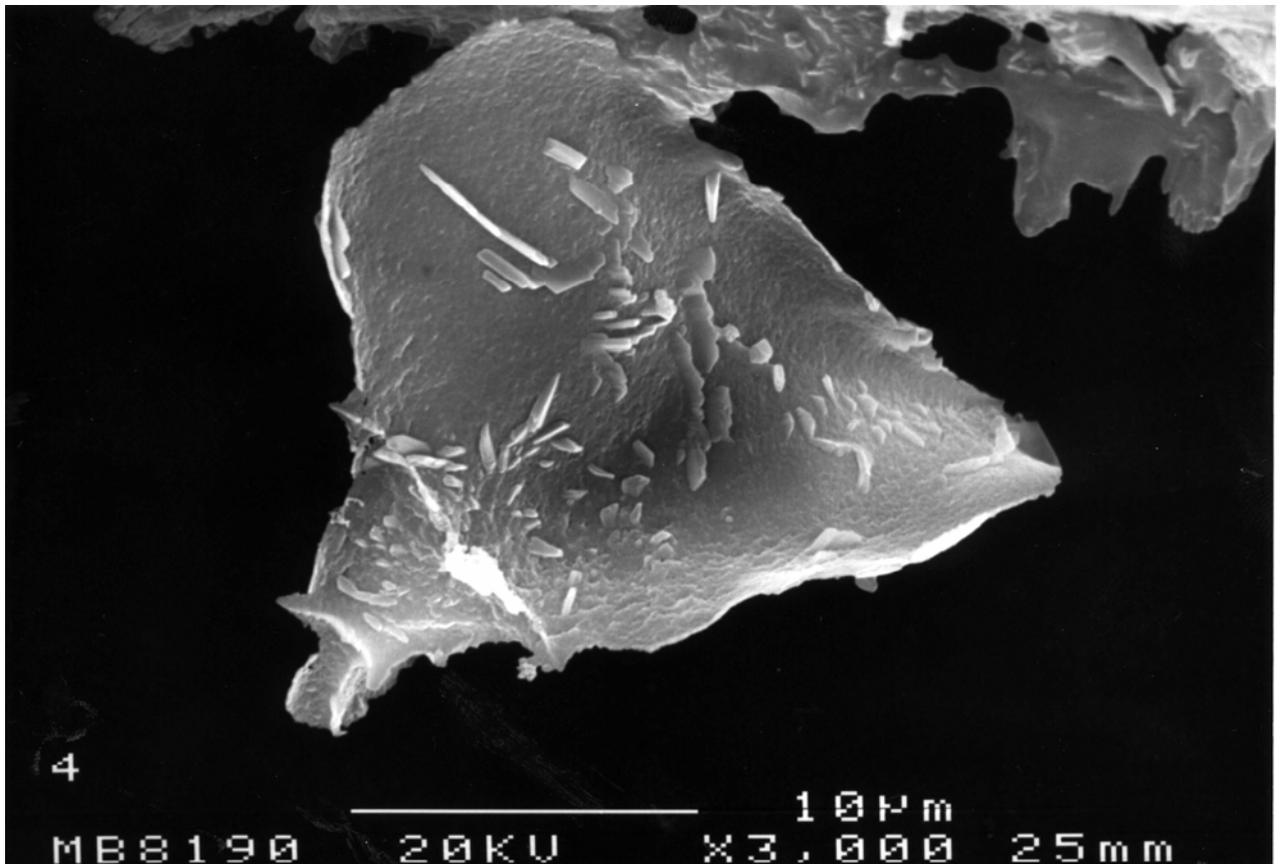
Microfotografía 9: morfología de la mezcla física (Tal:alb) (1:2) x 75 aumentos



Microfotografía 10: morfología de la mezcla física (Tal:alb) (1:2) x 350 aumentos



Microfotografía 11: morfología de la dispersión sólida (Tal:alb) (1:2) x 350 aumentos



Microfotografía 12: morfología de la dispersión sólida (Tal:alb) (1:2) x 3000 aumentos

DISPERSIONES SOLIDAS DE TALIDOMIDA CON CROSPVIDONA

Se determina el aspecto físico y la estructura cristalina de las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2.

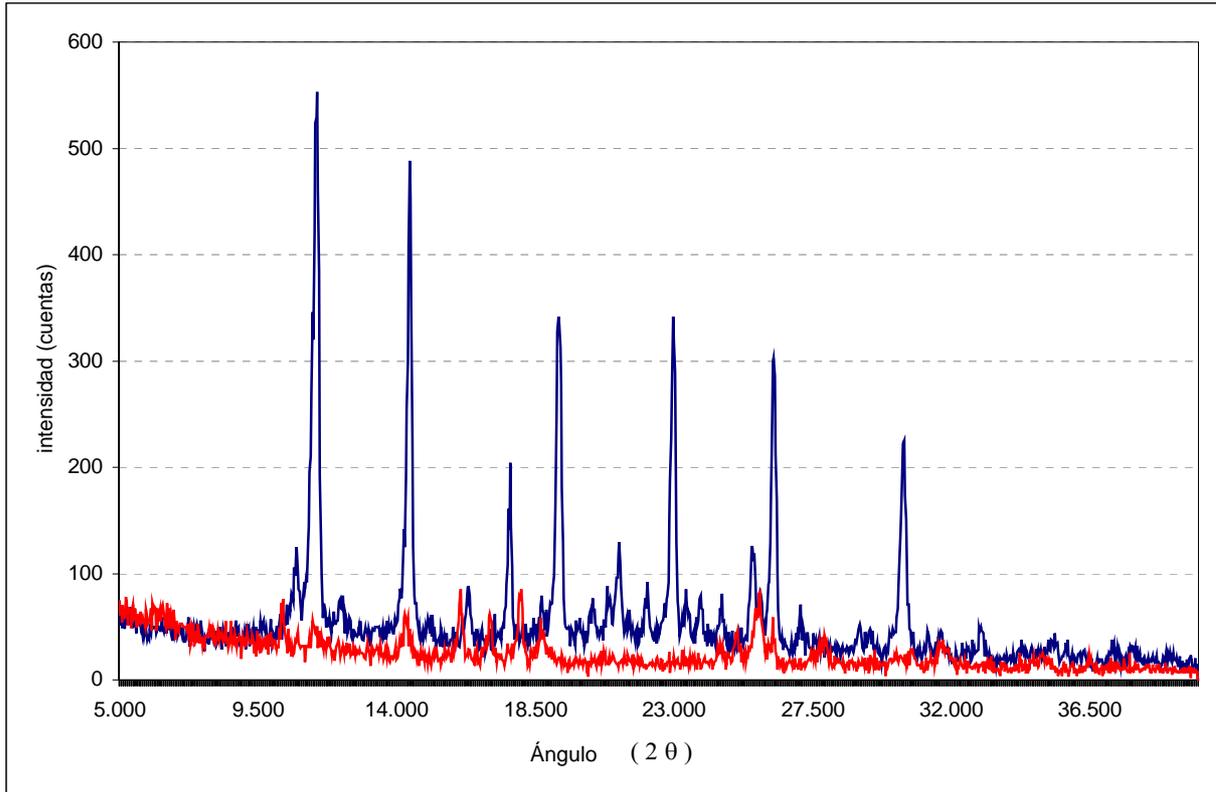
Aspecto físico:

Todas las muestras de las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona tenían aspecto de polvo de color blanco, seco, inodoro y de fácil manejo.

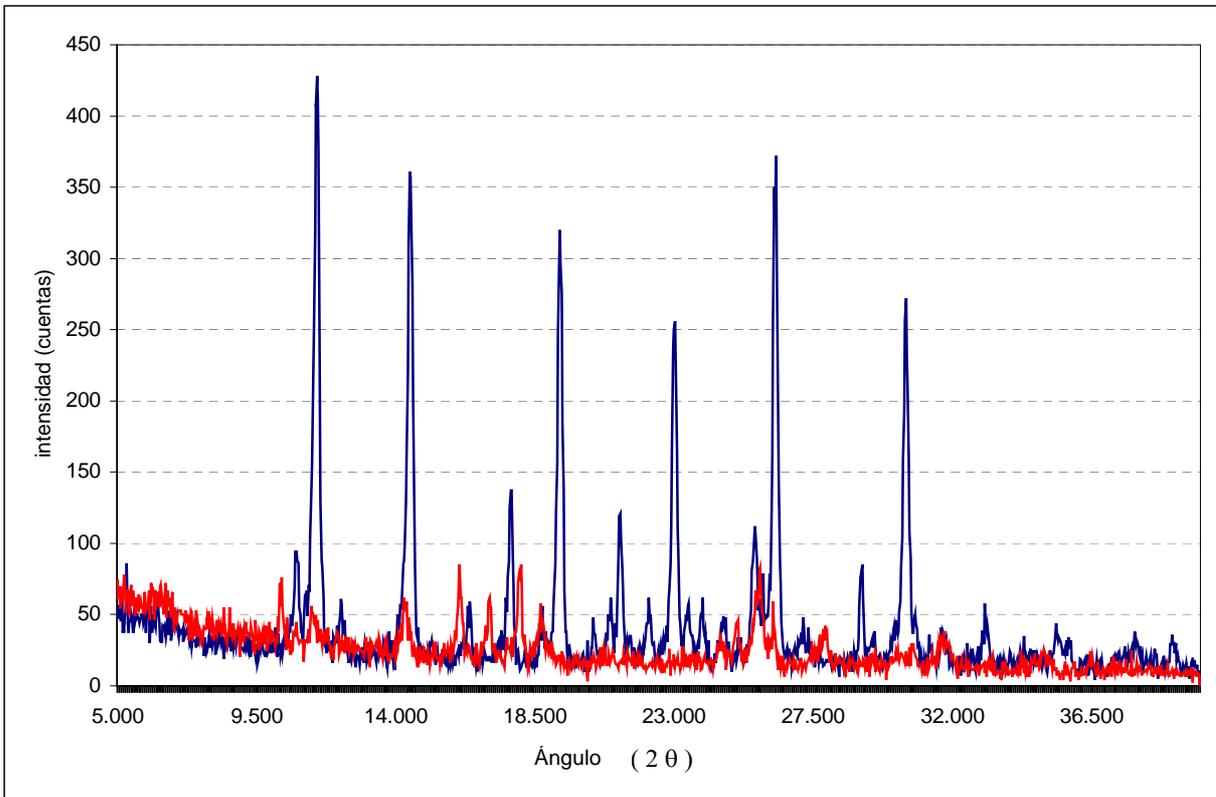
RX:

Esta técnica nos permite comparar las estructuras cristalinas de la mezcla física (p/p) 1 : 1 TAL:CROSP frente a la dispersión sólida 1 : 1 TAL:CROSP en la gráfica 53 y la estructura de la mezcla física de 1 : 2 TAL:CROSP frente a la dispersión 1 : 2 TAL:CROSP en la gráfica 54.

En ambas gráficas se observa un descenso acusado en los valores de intensidad de las dispersiones liofilizadas frente a las mezclas físicas de Talidomida con crospovidona. Sin embargo, cuando comparamos ambas dispersiones, 1:1 y 1:2 TAL: CROSP, no encontramos una mejora en los valores de intensidad al incrementar la proporción de crospovidona en la dispersión.



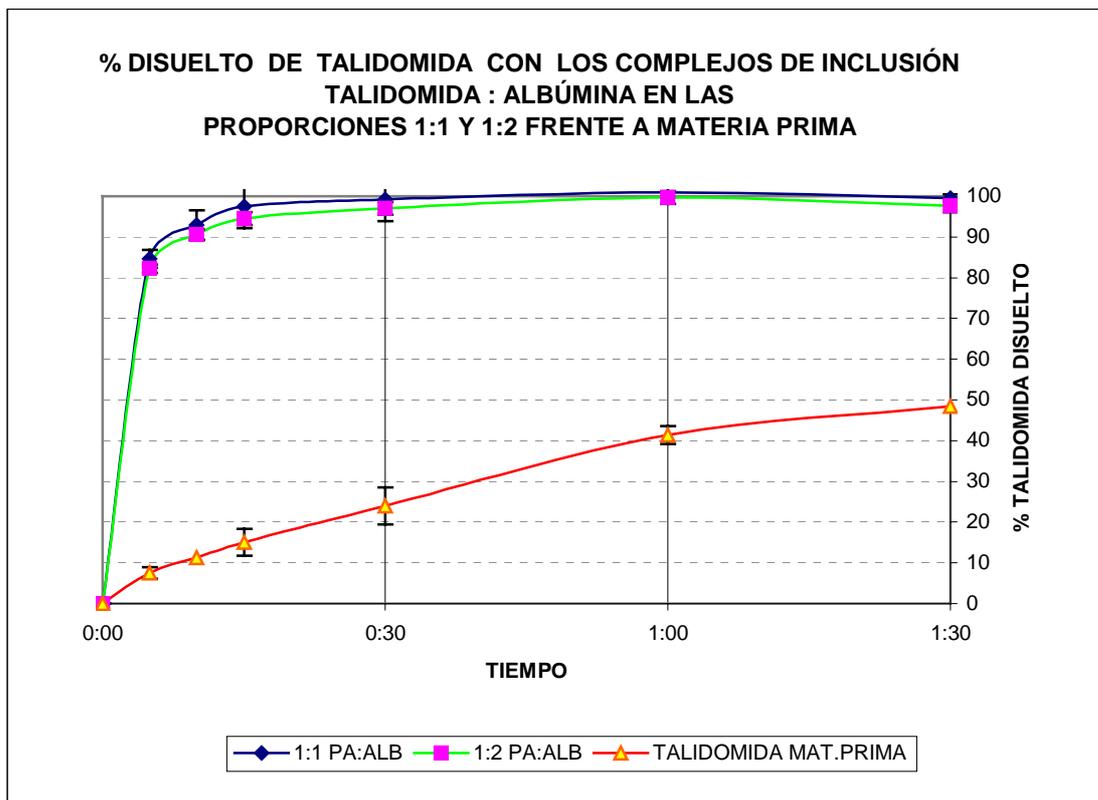
gráfica 53: Diffractogramas de la mezcla física Tal:crosp (1:1) (azul) y la dispersión sólida Tal:crosp (1:1) (rojo)



gráfica 54: Diffractogramas de la mezcla física Tal:crosp (1:2) (azul) y la dispersión sólida Tal:crosp (1:2) (rojo)

14.5 DISOLUCIÓN DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA

Los porcentajes de principio activo disuelto para las dispersiones sólidas de Tal: alb en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 se representan frente a los respectivos valores de la Talidomida materia prima en la gráfica 55.



gráfica 55: Disolución de las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina

En la tabla 21 se representan los porcentajes de principio activo disueltos a los cinco minutos, así como el tiempo para alcanzar el 80% disuelto de principio activo para las formulaciones de Talidomida materia prima sin recristalizar, Talidomida materia prima recristalizada y dispersiones sólidas 1:1 y 1:2 de TAL:ALB, respectivamente.

Tabla 21: Ensayos de disolución para las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina

FORMULACIÓN	% a los 5´	TD 80%
TALIDOMIDA MAT.PRIMA	7,46 ± 1,24	6 h
TALIDOMIDA MAT.PRIMA RECRISTALIZADA	68,69 ± 3,55	10´ - 15´
DISPERSION 1:1 TALIDOMIDA:ALBÚMINA	84,66 ± 2,21	< 5´
DISPERSION 1:2 TALIDOMIDA :ALBÚMINA	82,22 ± 1,08	< 5´

De los ensayos de disolución podemos concluir que entre las dispersiones sólidas de nuestro principio activo con la albúmina no existen diferencias significativas en el valor del porcentaje medio disuelto de Talidomida ($\pm SD$) en función del tiempo .

Pero si se compara estos valores de disolución de las dispersiones sólidas de Tal:alb con los datos obtenidos para la Talidomida materia prima sin recrystalizar, se observa una gran diferencia, puesto que con la incorporación de la albúmina se logra una gran aceleración en el proceso de disolución de nuestro principio activo; de esta forma tenemos que a los cinco minutos para la Talidomida materia prima, se disuelve únicamente un 7,46 % ($\pm 1,24$) de principio activo, alcanzándose la disolución del 80% de fármaco en un periodo de tiempo de 6 horas, mientras que tanto para la formulación 1:1 como para la formulación 1:2 de TAL:ALB se obtiene un porcentaje superior al 80% en cinco minutos de ensayo.

Por otro lado, si se comparan los valores del ensayo de disolución de las formulaciones 1:1 y 1:2 de TAL:ALB con los datos obtenidos de disolución de la formulación de Talidomida materia prima recrystalizada, se obtienen mejoras con las formulaciones de albúmina en la disolución de nuestro principio activo, de forma que a los cinco minutos con la formulación de Talidomida recrystalizada se disuelve un $68,69 \pm 3,55$, comparado con los $84,66\% \pm 2,21$ y con los $82,22\% \pm 1,08$ de las dispersiones 1:1 y 1:2 de TAL:ALB, respectivamente. Además, el tiempo en alcanzar el 80% de principio activo disuelto es menor con las formulaciones de albúmina, ya sea en la proporción (p/p) 1:1 como en la 1:2, puesto que éstas presentan disuelto un 80% de fármaco en tiempos inferiores a los cinco minutos, mientras que para la formulación de Talidomida recrystalizada el tiempo en alcanzar disuelto el 80% de Talidomida es de 10 a 15 minutos.

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución a los 5 minutos para la Talidomida materia prima sin recrystalizar, Talidomida materia prima recrystalizada y las formulaciones con albúmina en las proporciones (p/p) 1:1 y 1:2, se muestran en las tablas 22 y 23, respectivamente. Proporcionan un valor de $F = 474,47$ con $P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de disolución de Talidomida materia prima y el resto de las formulaciones.

Un segundo grupo homogéneo, con valor de velocidad de disolución cercano al 69%, se obtiene con la Talidomida materia prima recrystalizada, mientras que el tercer grupo estaría formado por las dispersiones sólidas de TAL:ALB en las proporciones en peso 1:1 y 1:2, alcanzando valores de porcentajes de disolución a los cinco minutos entre 85 y 89%. Este último resultado nos permite considerar que el proceso de recrystalización mejora de forma apreciable la velocidad de disolución, mientras que una mejora significativa frente a la Talidomida recrystalizada se obtiene con la incorporación de crospovidona en estos liofilizados.

**Tabla 22: ANOVA (TALIDOMIDA MATERIA PRIMA / TALIDOMIDA MATERIA PRIMA RECRISTALIZADA)
ANÁLISIS DE VARIANZA**

FORMULACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	12686,1	3	4228,71	474,47	0,0000
INTRAGRUPOS	71,3	8	8,9125		
TOTAL	12757,4	11			

Tabla 23: ANÁLISIS CONTRASTES PARA P=95% POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (L S D)

FORMULACION	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRASTE	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima SinRecristalizar	3	7,4667	X	A / B	- 61,2 *	± 5,62102
B: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	68,6667	X	A / C	- 77,2 *	± 5,62102
C: dispersión 1:1 Tal:alb	3	84,6667	X	A / D	- 80,9333 *	± 5,62102
D: dispersión 1:2 Tal:alb	3	88,4	X	B / C	- 16,0 *	± 5,62102
				B / D	- 19,7333	± 5,62102
				C / D	- 3,7333 *	± 5,62102

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución a los quince minutos del principio activo sin recristalizar, recristalizado y en formulaciones con albúmina en proporciones en peso 1:1 y 1:2, se muestran en las tablas 24 y 25 respectivamente. Ofrecen un valor de $F = 221,37$ con $P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre la Talidomida materia prima y el resto de las formulaciones, un segundo grupo formado por la Talidomida materia prima recristalizada y el tercer grupo homogéneo formado por las dispersiones sólidas 1:1 y 1:2 de TAL:ALB.

**Tabla 24: ANOVA(TALIDOMIDA MAT. PRIMA / TALIDOMIDA MAT. PRIMA RECRISTALIZADA)
ANÁLISIS DE VARIANZA**

FORMULACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	14342,1	3	4780,69	221,37	0,0000
INTRAGRUPOS	172,767	8	21,5958		
TOTAL	14514,8	11			

Tabla 25: ANÁLISIS CONTRASTES PARA P=95% POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (L S D)

FORMULACION	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRASTE	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima sinRecristalizar	3	15,76667	X	A / B	- 68,1667 *	± 8,74985
B: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	83,9333	X	A / C	- 81,7	± 8,74985
C: dispersión 1:1 Tal:alb	3	97,4667	X	A / D	- 85,4667 *	± 8,74985
D: dispersión 1:2 Tal:alb	3	101,233	X	B / C	- 13,5333 *	± 8,74985
				B / D	- 17,3 *	± 8,74985
				C / D	- 3,76667	± 8,74985

* denota una diferencia estadísticamente significativa

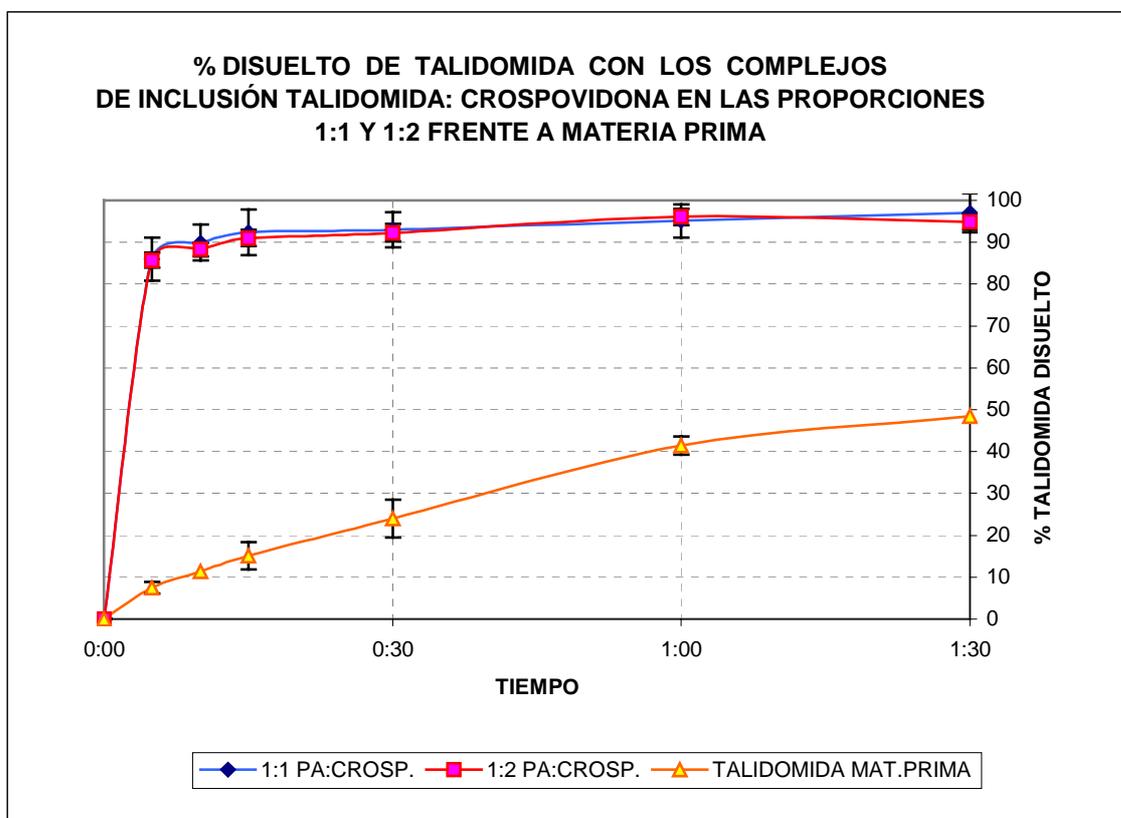
Si comparamos los valores del ensayo de disolución de los complejos de inclusión de la Talidomida con CDs frente a las dispersiones sólidas con la albúmina, también resulta más ventajoso la utilización de la albúmina en el incremento de la velocidad de disolución de nuestro principio activo, puesto que a los cinco minutos, frente a los $76,37\% \pm 1,26$ disuelto de principio activo con el complejo de TAL:CD en la proporción 1:1, están los $84,66\% \pm 2,21$ disuelto de principio activo con la dispersión de TAL:ALB en la relación 1:1 y frente a los $66,73\% \pm 1,01$ disuelto de TAL: CD en relación 1:2 están los $82,22\% \pm 1,08$ disueltos de Talidomida con la dispersión 1:2 TAL:ALB. Se observa que no existe mejoras en la velocidad de disolución cuando se incrementa el porcentaje de albúmina en la dispersión.

Estos buenos datos de solubilidad alcanzados con formulaciones de albúmina se corroboran con datos obtenidos para otros principios activos; por ejemplo, la Indometacina con la formación de dispersiones sólidas con albúmina de huevo liofilizado mejora su biodisponibilidad y además presenta una reducción de su ulcerogenicidad (Tsuji, 1993).

Otros conocidos principios activos, tales como la Prednisolona o la Norfloxacin, en forma de dispersiones sólidas con ovoalbúmina, logran mejorar sus grados de disolución de forma notable (Tsuji, 1996).

DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON CROSPVIDONA

Los valores medios del porcentaje disuelto de principio activo en las dispersiones sólidas 1:1 y 1:2 (p/p) TAL:CROSP en función del tiempo frente a la Talidomida materia prima se representan en la gráfica 56.



gráfica 56 : Disolución de las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona

En la tabla 26 se recogen los valores del porcentaje disuelto de Talidomida en las formulaciones de materia prima sin recristalizar, materia prima recristalizada y dispersiones sólidas de TAL:CROSP del orden 1:1 y 1:2 , así como el tiempo en alcanzar el 80% de principio activo disuelto en las mencionadas formulaciones.

Tabla 26: Ensayo de disolución para las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona

FORMULACIÓN	% a los 5´	TD 80%
TALIDOMIDA MAT.PRIMA	7,46 ± 1,24	6 h
TALIDOMIDA MAT.PRIMA RECRISTALIZADA	68,69 ± 3,55	10´ - 15´
DISPERSION 1:1 TAL: CROSP	85,97 ± 5,11	< 5´
DISPERSION 1:2 TAL : CROSP	85,7 ± 1,78	< 5´

De los datos obtenidos de los ensayos de disolución de las dispersiones sólidas de TAL:CROSP en las proporciones 1:1 y 1:2 , se puede concluir que entre ambas formulaciones de crospovidona no hay diferencias, pues en los dos casos se alcanza una disolución superior al 80% de principio activo en tiempo inferior a cinco minutos.

Si se compara la velocidad de disolución de las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona con los datos de disolución de la Talidomida materia prima no recristalizada, se obtiene que con la crospovidona se logra mejorar significativamente la velocidad de disolución de nuestro principio activo, ya que frente al porcentaje de 7,46 % ± 1,42 disuelto en la Talidomida materia prima a los cinco minutos, se obtiene la cantidad de 85,97% ± 5,11 y de 85,7 % ± 1,78 en las dispersiones 1:1 y 1:2 de TAL:CROSP, respectivamente. Además, el 80% de principio activo disuelto en la Talidomida materia prima se alcanza a las 6 horas, mientras que tanto para la formulación 1:1 como para la 1:2 de TAL:CROSP, el 80% de Talidomida se alcanza en tiempos inferiores a 5 minutos.

Por otro lado, si comparamos los datos de disolución de las formulaciones de crospovidona con la Talidomida materia prima recristalizada, se obtienen notables mejoras en cuanto a la velocidad de disolución de nuestro principio activo se refiere, ya que para la Talidomida materia prima recristalizada se obtiene un valor de 68,69 % ± 3,55 a los cinco minutos y para las dispersiones sólidas 1:1 y 1:2 de TAL:CROSP se obtienen los valores 85,97 % ± 5,11 y 85,7% ± 1,78 , respectivamente. Además el 80% de principio activo disuelto se alcanza a los 10-15 minutos para la Talidomida materia prima recristalizada,

mientras que para las formulaciones con crospovidona se alcanza el 80% disuelto de Talidomida en tiempos inferiores a los cinco minutos.

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución a los cinco minutos, para la Talidomida materia prima sin recristalizar, Talidomida materia prima recristalizada y las dispersiones sólidas 1:1 y 1:2 de TAL:CROSP se representa en las tablas 27 y 28, respectivamente. Proporcionan un valor de $F = 101,23$ con $P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre la Talidomida materia prima y el resto del grupo.

En el análisis de comparaciones múltiples podemos establecer un segundo grupo homogéneo en el que incluimos a la Talidomida materia prima recristalizada, mientras que el tercer grupo englobaría a las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona en proporciones en peso 1:1 y 1:2, representando este último grupo mayores velocidades de disolución, con porcentajes disueltos a los cinco minutos cercanos al 86%.

Se observa que la diferencia en la velocidad de disolución entre ambas dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona en relaciones (p/p) 1:1 y 1:2 no llega a ser estadísticamente significativa.

Los perfiles de disolución similares entre la dispersión sólida 1:1 y 1:2 TAL:CROSP se confirman con los resultados obtenidos en la difracción de RX, en los que se observó una cristalinidad similar, por lo que se podría seleccionar las proporciones (p/p) 1:1 TAL:CROSP para su empleo en posteriores estudios de estabilidad.

**Tabla 27: ANOVA(TALIDOMIDA MAT. PRIMA / TALIDOMIDA MAT. PRIMA RECRISTALIZADA)
ANÁLISIS DE VARIANZA**

FORMULACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	13468,6	3	4489,54	101,23	0,0000
INTRAGRUPOS	354,787	8	44,3483		
TOTAL	13823,4	11			

Tabla 28: ANÁLISIS CONTRASTES PARA P = 95 % POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (L S D)

FORMULACION	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRAST E	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima sin recristalizar	3	7,46667	X	A / B	- 61,2 *	± 12,5387
B: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	68,6667	X	A / C	- 78,4667 *	± 12,5387
C: dispersión 1:1 Tal:crosp	3	85,9333	X	A / D	- 84,6667 *	± 12,5387
D: dispersión 1:2 Tal:crosp	3	92,1333	X	B / C	- 17,2667 *	± 12,5387
				B / D	- 23,4667 *	± 12,5387
				C / D	- 6,2	± 12,5387

* denota una diferencia estadísticamente significativa

El análisis de varianza de los resultados de velocidad de disolución a los quince minutos, del principio activo sin recristalizar, recristalizado y en formulaciones con crospovidona en proporciones en peso 1:1 y 1:2 se representan en las tablas 29 y 30, respectivamente. Proporcionan un valor de $F = 144,25$ con $P < 0,0001$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre la Talidomida materia prima sin recristalizar y el resto de las formulaciones.

Curiosamente la Talidomida recristalizada y la dispersión sólida (1:1) TAL:CROSP no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$), mientras que la dispersión (1:2) TAL:CROSP presenta mayores valores de velocidad de disolución con diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto del resto de las formulaciones.

**Tabla 29: ANOVA (TALIDOMIDA MAT. PRIMA / TALIDOMIDA MAT. PRIMA RECRISTALIZADA)
ANÁLISIS DE VARIANZA**

FORMULACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
INTERGRUPOS	12609,2	3	4203,06	144,25	0,0000
INTRAGRUPOS	233,1	8	29,1375		
TOTAL	12842,3	11			

Tabla 30: ANÁLISIS CONTRASTES PARA P = 95 % POR EL MÉTODO DE LA MENOR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (L S D)

FORMULACION	MUESTRAS	MEDIA	HOMOGENEIDAD GRUPOS	CONTRAST E	DIFERENCIAS	±LIMITES
A: Talidomida Mat prima sin recristalizar	3	15,76667	X	A / B	- 68,1667 *	± 10,1635
B: Talidomida Mat prima Recristalizada	3	83,9333	X	A / C	-76,4333 *	± 10,1635
C: dispersión 1:1 Tal:crosp	3	92,2	X X	A / D	- 78,4 *	± 10,1635
D: dispersión 1:2 Tal:ceosp	3	94,1667	X	B / C	- 8,26667	± 10,1635
				B / D	- 10,2333 *	± 10,1635
				C / D	- 1,96667	± 10,1635

* denota una diferencia estadísticamente significativa

Si comparamos los valores de disolución de las dispersiones sólidas de nuestro principio activo con la crospovidona frente a los complejos de inclusión con CDs, se observa que para tiempos de cinco minutos la disolución es mejor con formulaciones de crospovidona que con las CDs, ya que frente a los porcentajes de 76,3 % ± 1,26 y de 66,73 % ± 1,01 que se obtienen con las formulaciones 1:1 y 1:2 de TAL:CD respectivamente, se encuentran las cantidades de 85,97 % ± 5,11 y de 85,7 % ± 1,78 de las dispersiones 1:1 y 1:2 TAL:CROSP, respectivamente; pero tanto para las formulaciones con CDs como para las que presentan crospovidona, la totalidad disuelta de nuestro principio activo se alcanza a los 90 minutos.

Al comparar los valores de disolución de las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona frente a las formuladas con albúmina, se obtienen los mejores valores de porcentajes medios disueltos de principio activo en función del tiempo con las formulaciones de albúmina, ya que, aunque tanto en la dispersión con albúmina como en la dispersión con crospovidona se alcanza el 80% de principio activo disuelto en tiempos inferiores a cinco minutos, en las formulaciones con albúmina se alcanza más rápidamente la total disolución de nuestro principio activo que en las dispersiones de crospovidona, de forma que a los 15 minutos está la totalidad de la Talidomida disuelta tanto en las relaciones 1:1 como en 1:2 de TAL:ALB, mientras que para proporciones 1:1 y 1:2 de TAL:CROSP son necesarios 90 minutos para la total disolución (superior al 95%) del principio activo.

Las dispersiones sólidas de Talidomida con crospovidona también presentan buenos datos de solubilidad, aunque en menor grado que los alcanzados con formulaciones de albúmina, ya que las dispersiones de Talidomida con crospovidona requieren 90 minutos para disolver la totalidad del principio activo, mientras que las dispersiones de albúmina, tanto en relaciones 1:1 como 1:2, sólo necesitan 15 minutos para alcanzar la total disolución de la Talidomida. Otros principios activos, como el Nifedipino, obtienen un notable aumento en el grado de disolución tras formularse con la hidroxipropil celulosa por técnicas de atomización (Wang, 1993), o bien se incrementa el grado de disolución del agente antifúngico MFB 1041 con sistemas de dispersiones sólidas con polímeros del tipo de las celulosas (Toshiya,1996).

14.6 ESTABILIDAD FÍSICA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA Y CROSPVIDONA

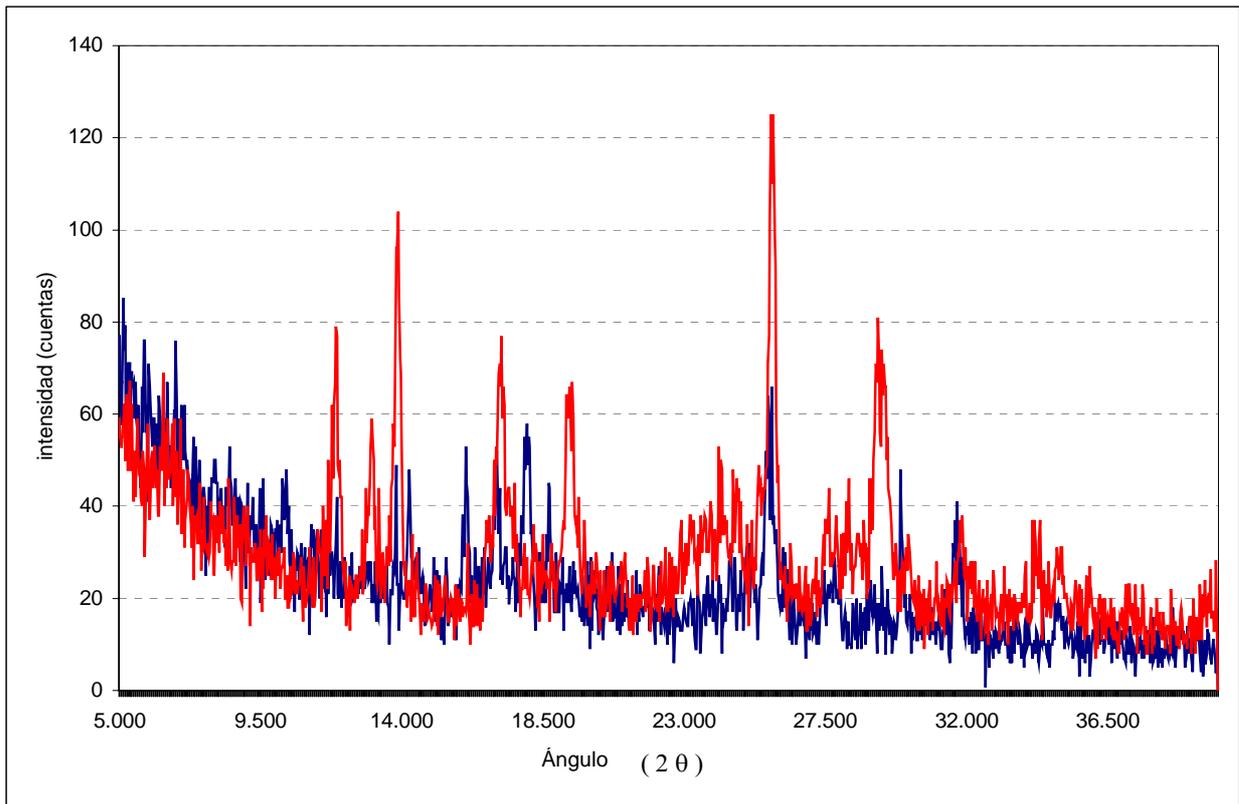
Las muestras de las dispersiones sólidas de TAL:ALB en proporciones (p/p) 1:1 y 1:2, así como la muestra de la dispersión de TAL:CROSP en la relación (p/p) 1:1, conservados durante un periodo de 11 días a la temperatura de 25° C y humedad de 75%, son analizadas por RX .

En estos estudios de estabilidad se comprueba que, la humedad ambiental favorece la recristalización del principio activo, observándose la aparición de valores de intensidad en todas las dispersiones de albúmina y crospovidona cuando se comparan con sus difracciones de RX realizadas antes de ser sometidas a estas condiciones de almacenamiento.

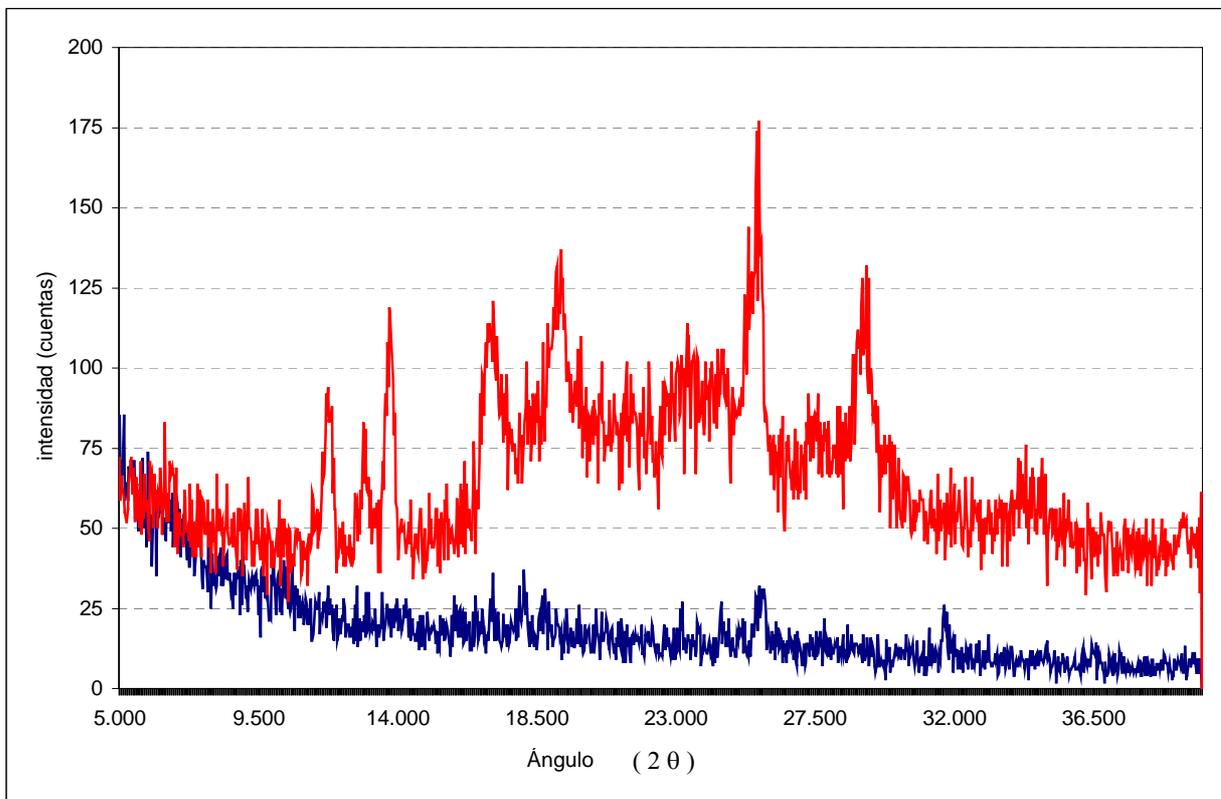
En la gráfica 57 se comparan las difracciones de RX de la dispersión sólida 1:1 TAL:ALB almacenada en condiciones de temperatura de 25° C y 60% de humedad y 25° C y 75% humedad durante 11 días .

En la gráfica 58 se comparan las difracciones de RX de la dispersión sólida 1:2 TAL:ALB almacenada en condiciones de temperatura de 25° C y 60% de humedad y 25° C y 75% humedad durante 11 días.

En estos estudios de estabilidad, se observa un incremento en la cristalinidad de las dispersiones sólidas 1:2 TAL:ALB cuando se compara con la dispersión sólida 1:1 TAL:ALB, sometida a las mismas condiciones de almacenamiento. Esto nos lleva a pensar que, la mayor proporción de albúmina en la dispersión sólida favorecerá la recristalización del principio activo, pudiendo afectar a su estabilidad.

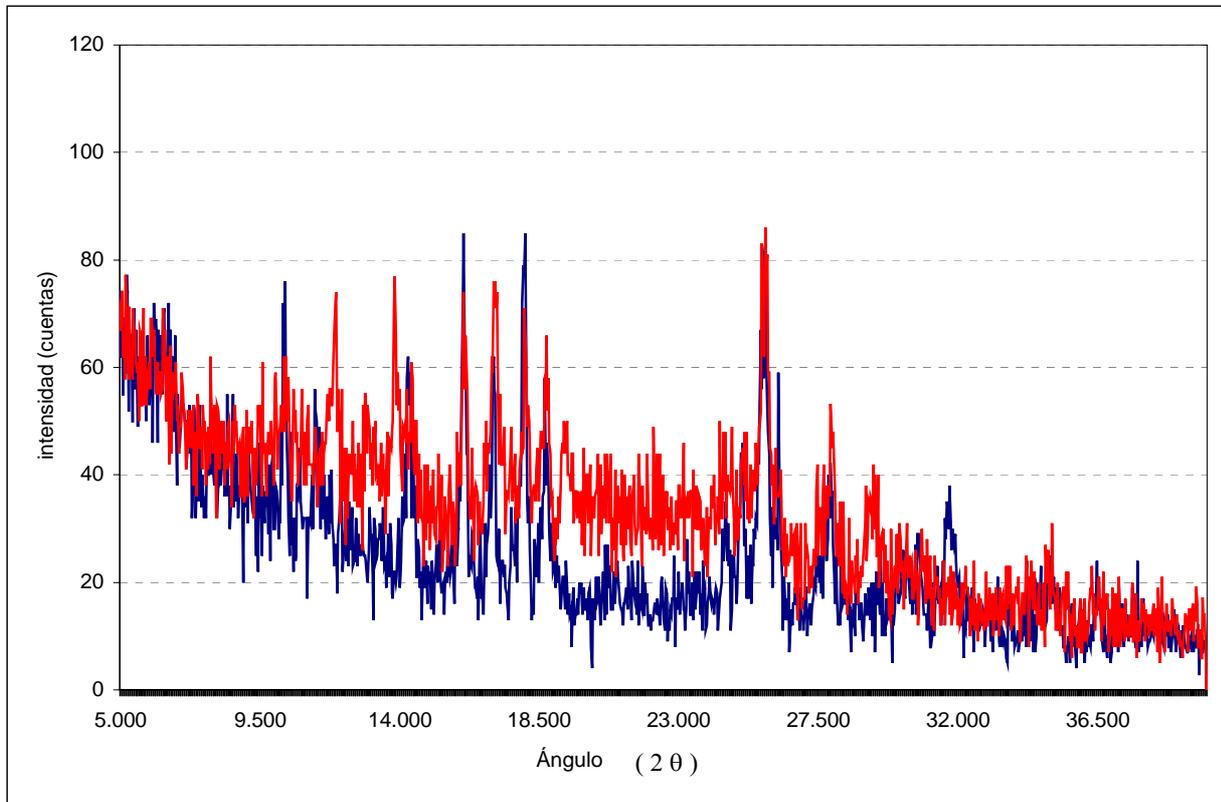


gráfica 57: Diffractogramas de la dispersión sólida (1:1) (TAL:ALB) a 25°C y 60% (azul) frente a 25°C y 75% (rojo)



gráfica 58: Diffractograma de la dispersión (1:2) (TAL:ALB) a 25°C y 60% (azul) frente a 25°C y 75% (rojo)

En la gráfica 59 se comparan las difracciones de RX de la dispersión sólida 1:1 TAL:CROSP almacenada en condiciones de temperatura de 25° C y 60% de humedad y 25° C y 75% humedad durante 11 días.



gráfica 59: Difractograma de la dispersión (1:1) (TAL:CROSP) a 25°C y 60% (azul) frente a 25°C y 75% (rojo)

Al igual que ocurre con las dispersiones sólidas de nuestro principio activo con albúmina, observamos un incremento en la cristalinidad después del almacenamiento en nuestras condiciones. Sin embargo, la intensidad en la cristalinidad de las dispersiones sólidas con crospovidona es inferior al valor que presenta la albúmina, lo que nos hace sospechar que este vehículo podría ser más adecuado para evitar la recristalización del principio activo en condiciones forzadas de humedad.

14.7 ESTABILIDAD QUÍMICA DE LAS DISPERSIONES SÓLIDAS DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA .

Se llevan a cabo unos estudios de estabilidad química únicamente en las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina, por ser estas formulaciones las que presentan una buena estabilidad en formas líquidas, si se comparan con las ciclodextrinas, y por presentar los mejores valores de disolución para nuestro principio activo en formas sólidas, si las comparamos tanto con las ciclodextrinas como con la crospovidona.

Se determina el porcentaje inalterado de Talidomida de muestras de dispersiones sólidas con albúmina que estuvieron conservadas en condiciones de temperatura de 25° C y humedad 60% y en condiciones aceleradas de temperatura de 40° C y humedad de 75% a los 3 y 6 meses de almacenamiento.

El análisis se hizo a partir de una única determinación de muestra, debido a la gran dificultad en obtener producto liofilizado, ya que se tiene que trabajar con grandes volúmenes y esto conlleva que el proceso de liofilización sea muy largo.

Pero a pesar de medir una única determinación para cada muestra, se analiza por dos técnicas validadas para nuestro principio activo (espectrofotometría UV visible y HPLC) contrastando la veracidad de los datos que se obtienen en la tabla 31.

Tabla 31: Estabilidad química de las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina .

FORMULACION	ALMACENAMIENTO	TIEMPO	% PA INALTERADO
Dispersión 1:1 TAL:ALB	25° C 60 % humedad	3 meses	99,82 %
		6 meses	97,01 %
Dispersión 1:1 TAL:ALB	40° C 75% humedad	3 meses	99,31 %
		6 meses	96,24 %
Dispersión 1:2 TAL:ALB	25° C 60% humedad	3 meses	97,44 %
		6 meses	93,01 %
Dispersión 1:2 TAL:ALB	40° C 75% humedad	3 meses	84,14 %
		6 meses	81,09 %

Dawson (1992) pone de manifiesto que la liofilización de citokinas con albúmina da lugar a la formación de preparados con un periodo de estabilidad muy prolongado, en condiciones extremas de almacenamiento, incluso a temperaturas de 56° C durante 1 año.

En el caso de las dispersiones sólidas de albúmina, no se observan grandes problemas de estabilidad entre los 3 y 6 meses de almacenamiento, tanto en condiciones normales (25° C, 60% humedad) como en condiciones aceleradas (40° C, 75%) con independencia de la albúmina empleada en cada tipo de dispersión.

Así, las muestras 1:1 TAL:ALB sometidas a condiciones normales (25° C , 60% humedad) y aceleradas (40° C, 75% humedad) presentan valores de porcentaje de principio activo inalterado a los 3 meses de almacenamiento próximos al 100% y a los 6 meses tampoco se aprecian diferencias entre las muestras sometidas a condiciones normales y las que estuvieron en condiciones aceleradas, alcanzándose valores próximos al 97%.

Sin embargo, las muestras 1:2 TAL:ALB sí presentan una mayor degradación de nuestro principio activo bajo condiciones aceleradas, pasando de un 97,44% (25° C, 60% humedad) a los 3 meses a un 84,14% (40° C, 75% humedad) para el mismo tiempo de almacenamiento.

Esta disminución de la estabilidad de la Talidomida se sigue apreciando en muestras 1:2 TAL:ALB para periodos de almacenamiento de 6 meses pasando de un valor de 93% (25° C 60% humedad) a un valor de 81,09% (40° C 75% humedad).

Algunos autores, como Jordan(1994) y Geraldine (1994) ponen de manifiesto que la albúmina sérica bovina pudiera presentar un efecto estabilizante, ya que las dispersiones sólidas de este excipiente formaban agregados estables por estar unidos covalentemente vía unión disulfide (Ahern,1985; Volkin, 1987; Liv, 1991) o bien mediante agregación por uniones no covalentes como son las interacciones hidrofóbicas (Pikal, 1991) o bien por interacciones químicas (Townsed, 1988; Hora, 1992) .

14.8 DISCUSIÓN PARCIAL

Con la incorporación de la albúmina se logra una gran aceleración en el proceso de disolución de nuestro principio activo; así a los cinco minutos frente al 8% y al 70% disuelto de Talidomida en formulaciones de Talidomida materia prima y de Talidomida recristalizada, se obtienen valores superiores al 80% tanto con formulaciones 1:1 como con 1:2 de TAL:ALB.

Por otra parte, el 80% de principio activo disuelto en las formulaciones de Talidomida materia prima se alcanza a las 6 horas y para la Talidomida recristalizada sólo son necesarios de 10 a 15 minutos, pero las formulaciones 1:1 y 1:2 de TAL:ALB mejoran significativamente los valores de disolución del principio activo, ya que se necesitan únicamente tiempos inferiores a 5 minutos.

Las formulaciones líquidas de nuestro principio activo con albúmina, concretamente la proporción (p/p) 1:2, presenta unos valores de estabilidad para la Talidomida en condiciones normales (25°C,60%) similares a los obtenidos con las formas líquidas de CDs; además, las formulaciones de Talidomida con albúmina presentan mejores valores de disolución si las comparamos con formulaciones de nuestro principio con CDs o con crospovidona, ya que, para estas últimas, la totalidad de Talidomida disuelta se alcanza a los 90 minutos, mientras que sólo son necesarios 15 minutos para las relaciones (p/p) 1:1 y 1:2 TAL:ALB .

Los valores de estabilidad para la dispersión 1:1 TAL:ALB a los 3 meses, tanto en condiciones normales (25°C, 60%) como en condiciones aceleradas (40°C, 75%) es del 99% y a los 6 meses, también en ambas condiciones de estabilidad, es de 97% . La dispersión sólida 1:2 TAL:ALB presenta un porcentaje inalterado de principio activo a los 3 y 6 meses en condiciones normales (25°C, 60%) de 97% y 93% respectivamente, mientras que los valores de estabilidad en condiciones aceleradas (40°C, 75%) a los 3 y 6 meses es de 84% y 81%, respectivamente. Estos resultados nos indican que ambas formulaciones con albúmina, tanto en proporción (p/p) 1:1 como 1:2 , presentan unos adecuados valores de estabilidad, pero se escoge la relación 1:2 por ser más estable en formas líquidas.

15

PROPUESTA GALÉNICA PARA LA TALIDOMIDA

15.1 COMPRIMIDOS COMERCIALES DE TALIDOMIDA

Se procede a caracterizar los comprimidos comerciales de Talidomida, determinando el envasado, los parámetros galénicos y sus valores de disolución.

No se abordan estudios de estabilidad en estos comprimidos, pues desconocemos el tiempo que llevan fabricados, así como las condiciones a las que han estado sometidos antes de su recepción.

Envasado:

Los comprimidos comerciales que se utilizaron en los ensayos estaban envasados en frasco de color ámbar, sellados con una arandela de aluminio conteniendo 100 comprimidos de 100 mg.

Parámetros galénicos:

Se recogen en la tabla 32, los correspondientes valores de los parámetros de peso, diámetro, altura, dureza y disgregación de los comprimidos comerciales de Talidomida.

Tabla 32: Parámetros galénicos de los comprimidos comerciales de Talidomida

Comprimidos comerciales de Talidomida	Media	SD
PESO (g)	0,258	0,0029
DIAMETRO (mm)	8,04	0,01
ALTURA (mm)	3,38	0,16
DUREZA MEDIA (N)	26,18	12,51
DUREZA MAXIMA (N)	49	
DUREZA MINIMA (N)	12,6	
DISGREGACION (sg)	29,33	

Disolución:

El estudio de disolución para los comprimidos comerciales de Talidomida sigue el método analítico de disolución para nuestro principio activo y se representa en la gráfica 61 (pág 304).

15.2 PROPUESTA GALÉNICA PARA LA TALIDOMIDA

Los resultados obtenidos de los estudios de estabilidad de las formulaciones líquidas de Talidomida con la hidroxipropil β ciclodextrina y con la albúmina son muy parecidos y más concretamente para las proporciones 1:2 y 1:9 (principio activo: vehículo), por lo que se llevó a cabo la preparación de complejos de inclusión de nuestro principio activo con la HPBCD y dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina y con crospovidona en relaciones 1:1 y 1:2 , ya que, en el caso de que se produjeran incrementos marcados en la velocidad de disolución de la forma 1:2 frente a la 1:1 , se estudiarían relaciones de mayores proporciones de vehículo.

Por otro lado, se obtuvieron los mejores valores de disolución para nuestro principio activo con las dispersiones sólidas de albúmina y crospovidona que con los complejos de inclusión con ciclodextrinas, alcanzándose el 85% disuelto de fármaco a los cinco minutos; sin embargo, la totalidad disuelta se alcanzó mucho antes con las formulaciones de albúmina (15 minutos) que con las de crospovidona (90 minutos).

Cuando sometimos las dispersiones sólidas de albúmina a estudios de estabilidad, obtuvimos resultados similares para las proporciones 1:1 y 1:2 , siendo superiores a los valores de estabilidad para la Talidomida que se obtuvieron con las formulaciones líquidas tanto de albúmina (mejor con la relación 1:2 que 1:1) como de ciclodextrinas.

Por tanto, se escogen las formas sólidas para una propuesta de formulación galénica para la Talidomida, por ser más estables que las formas líquidas, y como recurso farmacotécnico se selecciona la dispersión sólida de Talidomida con albúmina en la proporción 1:2.

15.3 COMPRIMIDOS DE EXCIPIENTES

Para la formulación de nuestro principio activo se han seleccionado como posibles excipientes el AVICEL y el ENCOMPRESS, basándonos en sus características farmacotécnicas, que los destacan por ser unos excipientes óptimos para formulación de comprimidos por compresión directa, ya que son unos excipientes muy inertes, muy conocidos y compatibles con gran cantidad de medicamentos.

Como paso previo a la formulación de los comprimidos de Talidomida materia prima, se preparan unos comprimidos de excipientes, conteniendo unicamente avicel y emcompress, para poder estudiar su viabilidad.

Se estudia la compresión y la estabilidad de los excipientes para poder seleccionarlos en una formulación con nuestro principio activo.

Compresión:

Se procede a la compresión directa de los excipientes avicel y emcompress en los porcentajes de 75% y 25%, respectivamente.

15.4 ESTABILIDAD FÍSICA DE LOS COMPRIMIDOS DE EXCIPIENTES

Se procede a determinar la estabilidad física de los excipientes, avicel y encompress, para poder seleccionarlos como adecuados para la formulación de nuestro principio activo.

Para ello se toman 3 comprimidos que contienen únicamente los excipientes avicel y encompress en las proporciones de 75% y 25%, respectivamente, y que han sido obtenidos por compresión directa, y se someten a condiciones de 25° C y humedad del 97 % durante un periodo de tiempo de 3 horas.

En las condiciones de estabilidad determinadas, procedemos a examen visual de los comprimidos para poder evaluar el aspecto físico de los mismos.

Se concluye que los comprimidos formulados únicamente con los excipientes avicel y emcompress en las condiciones de estabilidad determinadas anteriormente, no experimentan grandes cambios en cuanto a alteraciones físicas, ya que NO presentan hinchamientos, deformaciones, roturas, grietas, coloraciones, ni motas que pudieran indicarnos que no son estables en estas condiciones, mientras que otros excipientes, tales como los derivados del almidón y azúcares sometidas a estas mismas condiciones de temperatura y humedad, sí experimentan cambios físicos (Handbook of Pharmaceutical excipients) y no se podrían seleccionar para la compresión de nuestro principio activo.

Por tanto, los datos obtenidos en el estudio de estabilidad de los comprimidos formulados únicamente con los excipientes avicel y emcompress, nos permiten seleccionar tales excipientes como viables para formular nuestro principio activo.

15.5 COMPRIMIDOS DE TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

Una vez que se han seleccionado el avicel y el emcompress como buenos excipientes por ser muy estables en las condiciones determinadas de estabilidad, se llevaron a cabo una serie de ensayos rápidos de compatibilidades entre la Talidomida y estos excipientes para poder evaluar la compatibilidad entre todas las sustancias .

Los datos del estudio de compatibilidades entre nuestro principio activo y los excipientes, señalan que podemos escoger el avicel y el emcompress, porque en pruebas previas con una serie de excipientes para compresión directa han demostrado ser compatibles con nuestra sustancia; además, han demostrado ser muy estables en las condiciones de estabilidad (25°C, 97% humedad, 3 horas), son muy inertes, muy conocidos y muy compatibles con muchos principios activos.

Por todo ello seleccionamos el avicel y emcompress para formular comprimidos de Talidomida por compresión directa.

A continuación se formulan comprimidos de Talidomida con avicel y emcompress, evaluando su compresión, envasado, parámetros galénicos, disolución y almacenamiento. Además, se determina tanto la estabilidad física como la estabilidad química de los comprimidos de Talidomida materia prima.

Compresión :

Se procede a una compresión directa de la Talidomida materia prima, con punzones de 8 mm, con los excipientes avicel y emcompress en proporciones de 75 % y 25 % respectivamente Las cantidades por comprimido y por lote son las siguientes:

Por comprimido	Por lote (25 gramos)
50 mg Talidomida	6,25 gramos Talidomida
112,5 mg Avicel	14,0625 gramos Avicel
37,5 mg Emcompress	4,6875 gramos Emcompress

Envasado:

Del proceso de compresión se obtienen 121 comprimidos, de los cuales 50 se envasan en sobres de aluminio / aluminio sellados herméticamente con calor para evitar el contacto con la humedad y se mantienen en condiciones ambientales (25° C, 60 %).

Parámetros galénicos:

Se recogen en la tabla 33, los correspondientes valores de los parámetros de peso, diámetro, altura, dureza y disgregación para los comprimidos de Talidomida materia prima sintetizada por nosotros.

Tabla 33: Parámetros galénicos de los comprimidos de Talidomida materia prima

Comprimidos Talidomida Mat prima	Media	SD
<i>PESO (g)</i>	205,68	6,06
<i>DIAMETRO (mm)</i>	8,09	$6,74 \times 10^{-3}$
<i>ALTURA (mm)</i>	4,17	0,14
<i>DUREZA MEDIA (N)</i>	56,91	6,77
<i>DUREZA MAXIMA (N)</i>	65,7	
<i>DUREZA MINIMA (N)</i>	40,5	
<i>DISGREGACION (sg)</i>	1,175	

Disolución:

El ensayo de disolución para los comprimidos de Talidomida materia prima sigue el método analítico de disolución para nuestro principio activo y se representa en la gráfica 61 (pág 304).

Almacenamiento:

Para el estudio de estabilidad se somete un lote de 25 comprimidos de Talidomida materia prima a condiciones normales (25° C ,60 %) y otro lote de 25 comprimidos a condiciones aceleradas (40° C, 75%) .

15.6 ESTABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS DE TALIDOMIDA MATERIA PRIMA

Se procede a determinar la estabilidad física en condiciones de almacenamiento de 25° C y humedad del 97 % y la estabilidad química tanto en condiciones normales (25°C, 60 %) como en condiciones aceleradas (40° C , 75 %) de los comprimidos de Talidomida materia prima.

Estabilidad física:

Para el estudio de estabilidad física de los comprimidos de Talidomida materia prima se toman 3 comprimidos y se someten a las condiciones de 25° C y humedad del 97 % , durante un periodo de 3 horas. Transcurrido este tiempo, se visualiza que no hay cambios físicos en cuanto a modificación del tamaño, observándose los siguientes resultados:

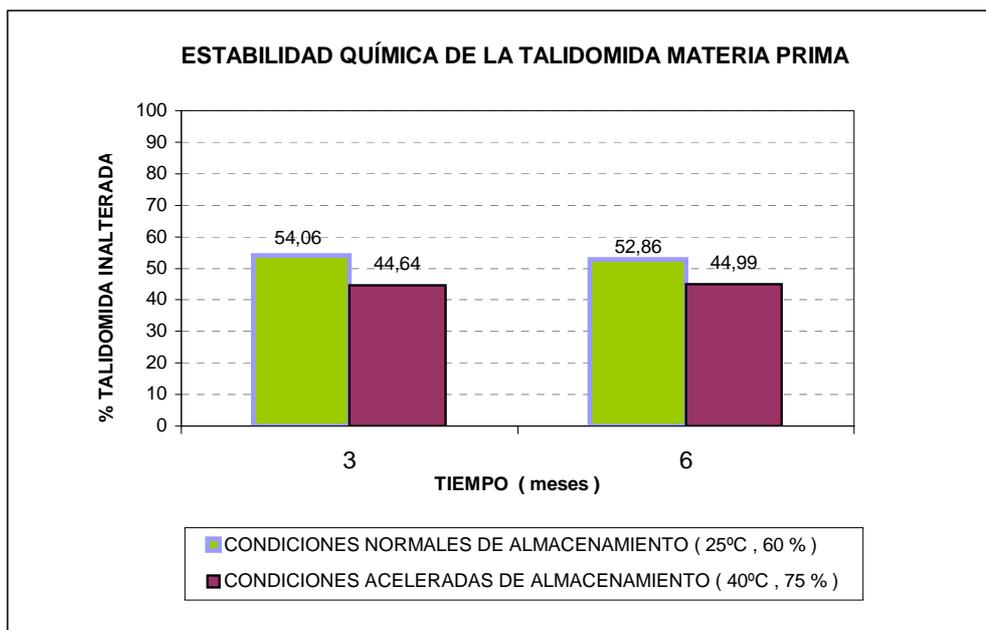
Tabla 34: Estabilidad física de los comprimidos de Talidomida materia prima

PARAMETROS	MEDIA	SD
<i>DUREZA (N)</i>	34,9	18,67
<i>DIAMETRO (mm)</i>	8,09	0,04
<i>ALTURA (mm)</i>	4,2	0,2

Los estudios de estabilidad en los comprimidos de Talidomida materia prima formulada con los excipientes avicel y emompress demuestran que son poco higroscópicos, ya que sometidos a las condiciones de 25° C y humedad del 97 % durante 3 horas no presentan alteraciones físicas.

Estabilidad química:

Los comprimidos de Talidomida materia prima sometidos a estudios de estabilidad química en condiciones normales (25° C , 60 %) y condiciones aceleradas (40° C , 75 %) son analizados por HPLC según el método analítico para la Talidomida, recogándose sus resultados en la gráfica 60.



gráfica 60 : Estabilidad química de los comprimidos de Talidomida materia prima

Los excipientes utilizados en la compresión de la Talidomida materia prima afectan a la estabilidad de nuestro principio activo; así, se obtienen valores de porcentaje inalterado próximos al 50 % a los 3 meses de almacenamiento en condiciones normales (25°C, 60% humedad) y del orden de 44,64 % en condiciones aceleradas (40° C , 75 % humedad).

Esta diferencia entre valores a unas y otras condiciones de estabilidad, nos hace suponer que los excipientes incluidos en nuestra formulación (avicel y emcompress) favorecen la degradación del principio activo, posiblemente debido al incrementar la humedad de la formulación y favorecer de esta forma los procesos hidrolíticos del principio activo.

En condiciones normales de almacenamiento (25°C , 60 %) nuestros comprimidos de Talidomida materia prima presentaron un valor de humedad en el equilibrio del 1,01 %, valor muy superior al que presenta la Talidomida materia prima (inferior al 0,2 %); esto nos hace suponer que los excipientes incluidos en nuestra formulación favorecen la degradación del principio activo, al favorecer su hidrólisis por aumentar su captación de agua.

Curiosamente, los resultados obtenidos a los 6 meses de almacenamiento son muy similares a los valores obtenidos a los 3 meses, tanto en condiciones normales (25°C , 60 %) como en condiciones aceleradas (40°C , 75 %), lo que nos hace sospechar que existe un elevado proceso de degradación inicial seguido de una segunda fase de degradación más lenta.

Este resultado nos confirma que la humedad relativa que captan los excipientes es el principal agente causante del proceso degradativo de la Talidomida.

15.7 COMPRIMIDOS DE LA DISPERSIÓN SÓLIDA DE TALIDOMIDA CON ALBÚMINA EN PROPORCIÓN (P/P) 1 : 2

Se formulan comprimidos de la dispersión sólida (1:2) TAL:ALB, determinándose su compresión, envasado, parámetros galénicos y disolución. Además, se determina tanto la estabilidad física como la estabilidad química de los comprimidos de nuestro principio activo.

Compresión :

Se procede a una compresión directa, de la dispersión TAL:ALB (p/p) (1:2) con los excipientes avicel y emcompress, en las proporciones de 75 % y 25 % respectivamente. Las cantidades por comprimido y por lote son:

Por comprimido(300 mg)	Por lote (4,8 gramos)
150 mg dispersión (contienen 50 mg Talidomida)	2,4 g dispersión
112,5 mg Avicel	1,8 g Avicel
37,5 mg Encompress	600 mg Encompress

Envasado:

Por una parte, se envasan 16 comprimidos de la dispersión TAL:ALB (p/p) (1:2) en sobres de aluminio / aluminio cerrados herméticamente con calor; para evitar la posible captación de humedad y se mantienen en condiciones normales de almacenamiento (25°C, 60 %). Por otro lado, se envasan en viales protegidos de la luz, la dispersión TAL:ALB (p/p) (1:2) en estado polvo sin la adición de los excipientes.

Parámetros galénicos:

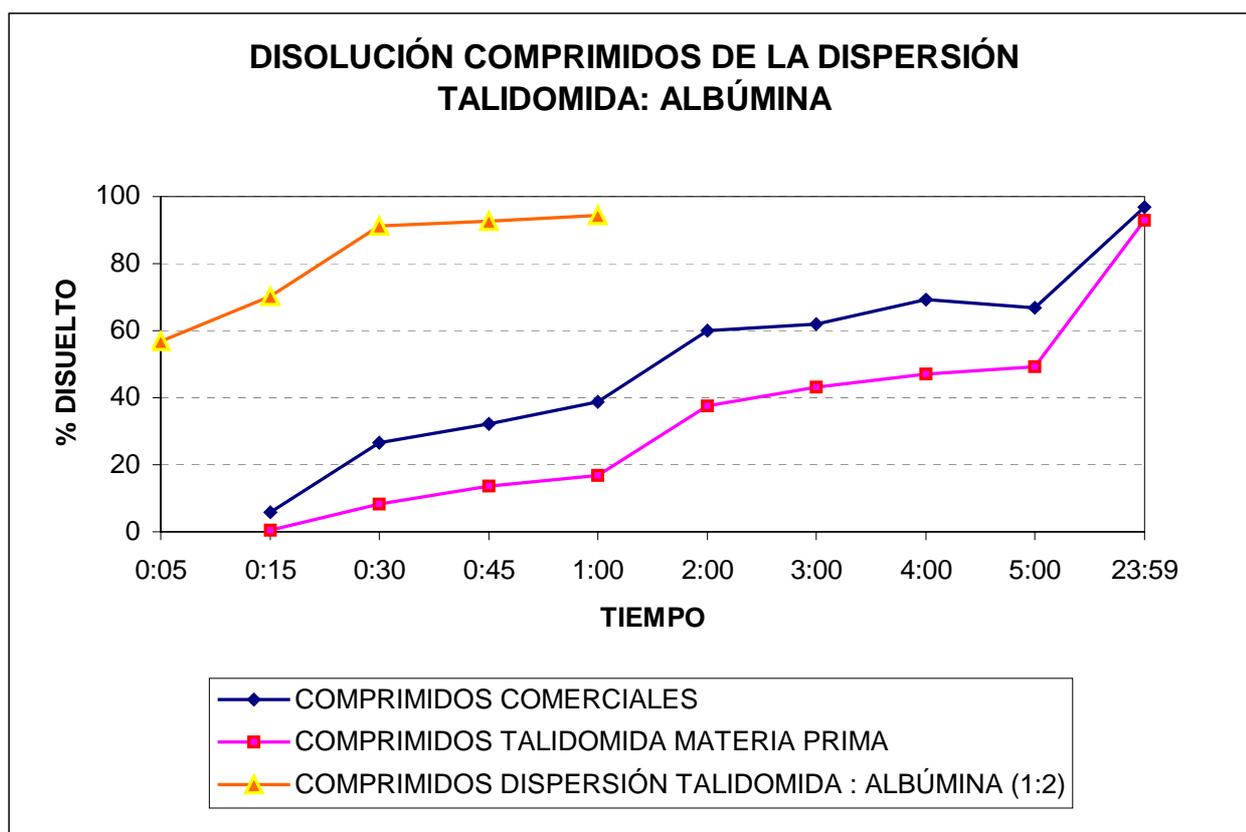
Se representa en la tabla 35, los correspondientes valores para los parámetros de peso, diámetro, dureza y disgregación de los comprimidos de la dispersión sólida de nuestro principio activo con la albúmina.

Tabla 35: Parámetros galénicos de los comprimidos de la dispersión sólida TAL:ALB 1:2 (p/p)

COMPRIMIDOS DISPERSIÓN TAL : ALB (P/P) (1:2)	MEDIA	S D
PESO (mg)	298	1,73
DIÁMETRO (mm)	12,07	0,04
ALTURA (mm)	2,34	0,02
DUREZA MEDIA (N)	99	2,10
DISGREGACIÓN	3' 44''	

Disolución:

El ensayo de disolución para los comprimidos de la dispersión sólida TAL:ALB (p/p) (1:2) sigue el método analítico de disolución para nuestro principio activo y se lleva a cabo mediante análisis espectrofotométrico, leyendo a λ de 299 nm, que es la de máxima absorción para la Talidomida. El estudio se realiza por triplicado, representándose en la gráfica 61 los valores porcentuales de Talidomida disuelta en función del tiempo, comparándolos con los valores de disolución de los comprimidos comerciales y de los comprimidos de Talidomida materia prima.



gráfica 61: Disolución de los comprimidos comerciales de Talidomida, comprimidos de Talidomida materia prima y comprimidos de la dispersión sólida 1.2 TAL:ALB

Los comprimidos comerciales, así como los de Talidomida materia prima, alcanzan el 80 % de principio activo disuelto en tiempos superiores a las 5 horas, mientras que los comprimidos de la dispersión 1:2 TAL:ALB cumplen, con gran diferencia, frente a las anteriores formulaciones, el ensayo de disolución, ya que el 80 % disuelto se alcanza aproximadamente a los 20 minutos.

Además, a los 5 minutos, frente a porcentajes disueltos de principio activo inferiores a 5 % que se obtienen con los comprimidos comerciales de Talidomida y porcentajes casi nulos con los comprimidos de Talidomida materia prima, se disuelve cerca de un 57 % de Talidomida con los comprimidos propuestos de la dispersión 1:2 (p/p) TAL:ALB.

Se observa un incremento en la velocidad de disolución para los comprimidos de la dispersión TAL:ALB,(p/p) (1:2) cuando se comparan con los comprimidos de Talidomida materia prima, en vista de lo cual se puede considerar que los comprimidos de la dispersión sólida de nuestro principio activo con albúmina presentan una estabilidad aceptable, a la vez que una mejora muy importante en la velocidad de disolución de la Talidomida

15.8 ESTABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS DE LA DISPERSIÓN SÓLIDA 1:2 (P/P) TALIDOMIDA: ALBÚMINA

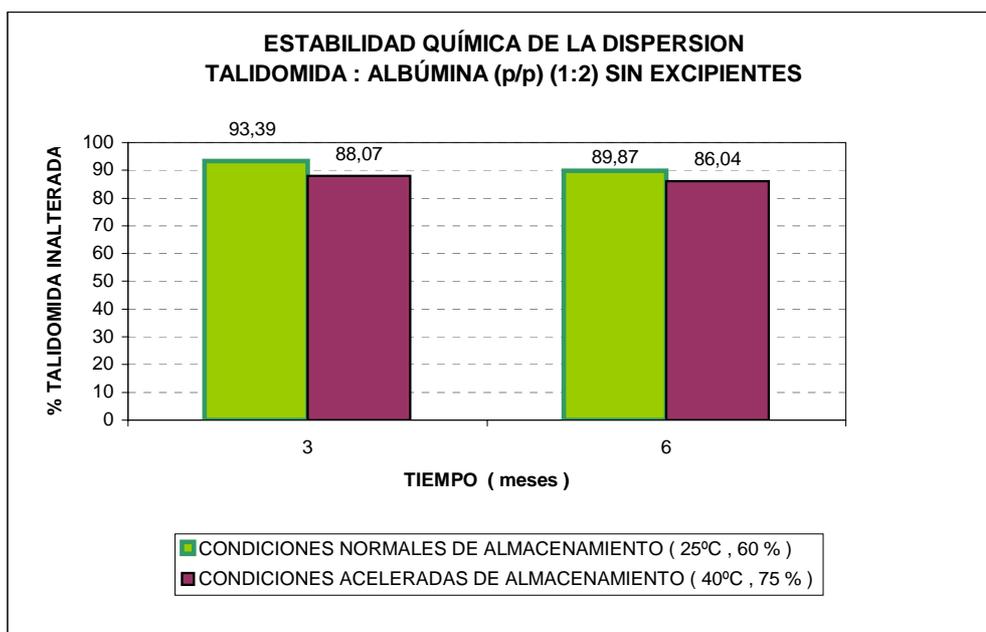
Se procede a determinar primeramente la estabilidad química de la dispersión (1:2) (p/p) TAL:ALB sin excipientes, tanto en condiciones normales de almacenamiento (25°C, 60 %) como en condiciones aceleradas (40°C, 75 %).

Posteriormente se llevan a cabo estudios para valorar tanto la estabilidad física como la estabilidad química de los comprimidos de la dispersión (1:2) (p/p) con la adición de los excipientes seleccionados para esta formulación (avicel y emcompress), tanto en condiciones normales del almacenamiento (25°C, 60 %) como en condiciones aceleradas (40°C, 75 %).

Estabilidad química de la dispersión sólida (1 : 2) (TAL : ALB) sin excipientes:

Se somete la dispersión TAL:ALB (p/p) (1:2), obtenida en un proceso de liofilización a escala semi industrial, a unas condiciones normales de estabilidad (25°C, 60 %) y a unas condiciones aceleradas (40°C, 75 %) durante 3 y 6 meses, realizando los análisis por HPLC según método analítico, y representando los porcentajes de principio activo inalterado al cabo del tiempo en la gráfica 62.

Sus resultados nos permiten comparar la influencia del proceso de liofilización semi industrial sobre la estabilidad de nuestras dispersiones sólidas.



gráfica 62: Estabilidad química de los comprimidos de la dispersión sólida 1:2 (p/p) TAL:ALB sin excipientes

De los datos del estudio de estabilidad química de la dispersión 1:2 TAL:ALB sin la adición de los excipientes, podemos deducir que se produce un fuerte fenómeno degradativo inicial siendo los valores degradados a los 3 y 6 meses en condiciones normales (25°C, 60 %) sobre un 10 % y alrededor de un 15 % en condiciones aceleradas de estabilidad (40°C, 75 %).

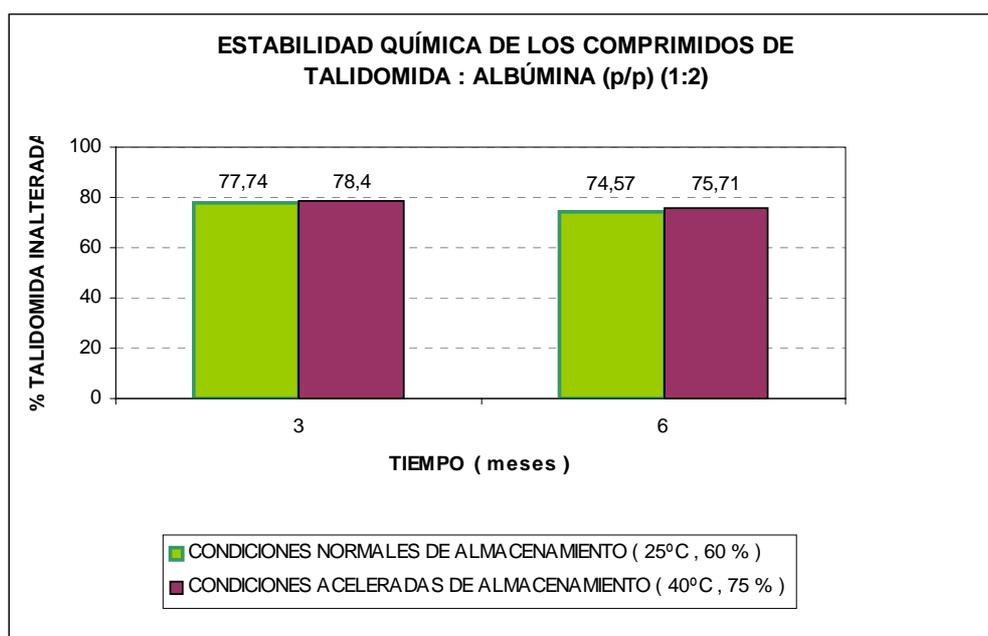
Si tomamos en cuenta los resultados de estabilidad para este lote semi industrial a condiciones normales (25°C, 60%) frente a las muestras liofilizadas en un proceso de escala de laboratorio, observamos un ligero descenso en la estabilidad, que podríamos atribuir a las condiciones del proceso de liofilización utilizadas para lotes mayores.

Estabilidad física de los comprimidos de la dispersión (1 : 2) (p/p) TAL : ALB

Se somete a unos comprimidos de Tal:alb (p/p) (1:2), formulados con excipientes avicel y encompres a condiciones normales de almacenamiento (25° C, 60 %) y a condiciones aceleradas (40° C, 75 %) durante 3 y 6 meses. Transcurrido este tiempo no se observan alteraciones en el color, la forma o el aspecto de ninguno de los comprimidos, ni tampoco en el envase.

Estabilidad química de los comprimidos de la dispersión (1 : 2) (p/p) TAL : ALB

Se somete a los comprimidos de la dispersión sólida 1:2 Tal:alb, formulados con los excipientes avicel y emcompres, a condiciones normales de almacenamiento (25°C, 60 %) y a condiciones aceleradas (40°C, 75 %) durante 3 y 6 meses, realizando los análisis por técnica HPLC según método analítico y representándose los resultados en la siguiente gráfica 63:



gráfica 63: Estabilidad química de los comprimidos de la dispersión 1:2 (p/p) TAL:ALB con excipientes

En los comprimidos de la dispersión se observa una menor degradación en todas las condiciones de almacenamiento comparado con los comprimidos de Talidomida materia prima.

Los comprimidos de Tal:alb (p/p) (1:2) presentan en condiciones normales (25° C, 60 %) a los 3 meses, valores de principio activo inalterado de 77,74 %, y a los 6 meses valores de 74,57 %, resultados que son muy superiores a los que presentan los comprimidos de Talidomida materia prima en las mismas condiciones de almacenamiento, ya que a los 3 meses presenta un valor de principio activo inalterado de 54,06 % y a los 6 meses de 52,86 % .

En condiciones aceleradas de estabilidad (40° C 75 %) y a los 3 meses, presentan valores de porcentaje de principio inalterado de 78,4 %, valor que es considerablemente superior al que presentan los comprimidos de Talidomida materia prima, del orden de 44,64 % en las mismas condiciones.

Esta mejora en la estabilidad de nuestro principio activo la podemos atribuir a que, durante el proceso de formación de dispersión sólida, se produce un efecto protector de la albúmina sobre los radicales del principio activo, susceptibles a los fenómenos hidrolíticos, que se han visto incrementados por la presencia del excipiente en la formulación.

Sin embargo, en condiciones aceleradas (40°C, 75%) no se observa un aumento en la degradación cuando se compara con las condiciones normales (25°C, 60%). Este resultado es similar al encontrado en los comprimidos de Talidomida materia prima con excipientes, lo que parece indicar que el aumento en la temperatura y humedad relativa no influye tanto en la estabilidad de nuestros comprimidos.

15.9 DISCUSIÓN PARCIAL

El proceso de liofilización ha conseguido mejorar considerablemente la velocidad de disolución de nuestro principio activo, como lo demuestran los buenos resultados de disolución que obtenemos con los comprimidos de la dispersión sólida de Talidomida con albúmina en proporciones (p/p) 1:2.

Además, con la incorporación de albúmina se logra una gran aceleración en el proceso de disolución de la Talidomida tanto en relación 1:1 como en la 1:2, pues se alcanza el 80 % disuelto de principio activo en menos de 5 minutos, presentando los mejores valores de disolución frente a los valores obtenidos con las CDs y con la crospovidona, según capítulos anteriores; por ello se ha propuesto la formulación de los comprimidos de Talidomida con albúmina.

Las proporciones (p/p) 1:1 y 1:2 de Tal : alb, no presentan diferencias significativas en los valores porcentuales de disolución para nuestro principio activo, pero al obtenerse los mejores valores de estabilidad para la relación 1:2 frente a la 1:1, se eligió esta última proporción para la formulación de nuestro principio activo.

Los comprimidos de la dispersión 1:2 (p/p) Tal : alb formulados con los excipientes avicel y emcompress en proporciones 75 % y 25 %, respectivamente, presentan una menor degradación de nuestro principio activo frente a los comprimidos de Talidomida materia prima formulados con los mismos excipientes, pero sin albúmina.

Así, el porcentaje degradado tanto a los 3 meses como a los 6 meses en condiciones aceleradas (40°C, 75 %) es aproximadamente de un 25 % para los comprimidos de la dispersión 1:2 (p/p) Tal:alb, mientras que, en estas mismas condiciones de estabilidad, el porcentaje degradado para los comprimidos de Talidomida materia prima es de un 55 %. De forma análoga, en condiciones normales (25°C, 60%), tanto a los 3 meses como a los 6 meses, los comprimidos de la dispersión con albúmina presentan un valor de degradación aproximado de un 25 % y los comprimidos de Talidomida materia prima de un 45%.

Los excipientes, avicel y emcompress, en proporciones de 75 % y de 25 %, respectivamente, han resultado viables y poco higroscópicos, según datos obtenidos en estudios de estabilidad física, para formulaciones con Talidomida, pero afectan de alguna forma a la estabilidad, ya que favorecen la degradación de los comprimidos de dispersión (1:2) TAL:ALB.

Así, si se comparan los valores degradados de principio activo en la dispersión 1:2 TAL:ALB sin la adición de los excipientes frente a los comprimidos de este mismo complejo formulados con los excipientes avicel y emcompress, en proporciones de 75 % y de 25 %, respectivamente, se observa una disminución de la estabilidad de la Talidomida cuando se adicionan los excipientes.

16

DISCUSIÓN FINAL

Poner a punto un medicamento nuevo es un proceso largo, costoso y biotecnológicamente complicado y más sobre todo si se trata de un medicamento huérfano, como es el caso de la TALIDOMIDA, que es importante desde el punto de vista clínico pero no resulta rentable para la Industria Farmacéutica por su escaso mercado y cuya provisión el Estado debe garantizar.

En estos últimos años surge un interés clínico por la Talidomida, ya que resulta ser el fármaco más eficaz en las reacciones leprosas y especialmente en el eritema nodoso de lepra. Esta sustancia es muy activa y hace desaparecer un elevado número de polineuropatías en el prítigo actínico y en el lupus eritematoso discoide crónico, dadas sus acciones antiinflamatorias e inmunosupresivas. Es muy valiosa en el prúrigo nodular, pioderma gangrenoso, ulceraciones aftosas, síndrome de Behcet y en la neurología postherpética.

Pero desgraciadamente este auge clínico no ha ido acompañado de una mejora industrial de la molécula de Talidomida, que utiliza hoy en día las formas farmacéuticas sintetizadas con la tecnología de hace 50 años.

Este trabajo está dirigido a encontrar formas farmacéuticas que permitan una administración de la Talidomida más eficaz y segura.

El principal problema que encontramos al abordar este trabajo fue el de la materia prima, ya que al tratarse de un medicamento huérfano no se comercializaba y el Estado sólo lo autorizaba en Investigación Clínica, siendo las únicas dos vías autorizadas los ensayos clínicos y el tratamiento de uso compasivo.

Por ello nunca pudimos disponer de Talidomida materia prima y nos vimos en la obligación de sintetizarla a partir de referencias bibliográficas (King,1949; Jonsson,1972), siendo el proceso de síntesis farmacéutica bastante complicado, debido principalmente a la poca información que existe al respecto, y por otro lado también muy laborioso, ya que sintetizamos según nuestro método de escala de laboratorio en lotes de 5 gramos de Talidomida

Para dar una idea de la dificultad con la que nos enfrentamos, baste decir que para obtener el producto intermedio, anhídrido 2 ftalimido glutárico, se tardaron aproximadamente dos semanas de sucesivas reacciones, tal y como se describe en el método de síntesis químico-farmacéutica de la Talidomida, y a partir de aquí se emplearon 3 días para obtener únicamente 5 gramos de producto final.

Paralelamente al desarrollo químico-farmacéutico de la molécula de Talidomida, se abordó un estudio de campo de utilización clínica de nuestro medicamento, para lo cual se envió una documentación clínica actualizada y una encuesta modelo a los distintos servicios de dermatología de distintos hospitales españoles, tanto públicos como privados, recogiendo las diferentes aplicaciones farmacológicas que se

estaban empleando y, sobre todo, para conocer el grado de resultado en las mismas, pudiendo así compararlas con los datos bibliográficos.

Las encuestas hospitalarias se llevaron a cabo mediante un modelo que se recoge en los métodos clínicos, donde se describían las principales indicaciones, así como también se preguntaba sobre la utilización que ese centro hospitalario hacía de la Talidomida. Las respuestas tabuladas fueron muy ilustrativas desde el punto de vista cualitativo, ya que señalan que la aplicación de este principio activo está ofreciendo unos resultados muy buenos, en los casos de lepra y de aftas orales, y buenos en la gran mayoría de las indicaciones terapéuticas.

Una vez que sintetizamos la molécula de Talidomida y comprobamos el enorme interés clínico que suscita, nos planteamos la necesidad de ofrecer una nueva tecnología farmacéutica que permita una administración más eficaz y segura de nuestro principio activo, ya que fundamentalmente presenta tres problemas farmacotécnicos, como son la racemización, la escasa solubilidad acuosa y la baja estabilidad acuosa.

El problema de la racemización de la molécula de Talidomida se está investigando actualmente, ya que todavía no se ha conseguido una síntesis enantioselectiva del fármaco y por otra parte al sufrir inversión quiral “in vivo” se recurre a la forma racémica para su administración.

Al ser la Talidomida un fármaco muy poco soluble en agua y administrarse por vía oral, su velocidad de absorción se encuentra controlada por la velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal; por eso, si logramos mejorar la velocidad de disolución de este principio activo, conseguiremos optimizar la biodisponibilidad de la Talidomida.

Primeramente evaluamos el coeficiente de solubilidad de la Talidomida, para lo cual sometimos a nuestro principio activo a diversos ensayos de solubilidad en distintas soluciones amortiguadoras del pH, obteniendo los mejores valores de solubilidad para nuestro principio activo a medida que el valor del pH era más ácido, más concretamente en el rango de pH entre 2,4 y 4,4; pero para una propuesta de administración de Talidomida por vía oral, se eligió el rango de pH comprendido entre 5,4 y 6,4, que presenta unos valores aceptables de solubilidad para nuestro principio activo y sobre todo representa un rango de pH viable como forma farmacéutica líquida de administración por vía oral.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad de nuestro principio activo en soluciones de carácter alcalino, neutro y ácido, corroborándose los datos bibliográficos de Eriksson (1992), al demostrar la enorme influencia del pH en la estabilidad de nuestro principio activo, ya que a mayor valor de pH, mayor inestabilidad de la molécula, lo que nos lleva a seleccionar un valor de pH ácido para aumentar la estabilidad de nuestro principio activo en soluciones, puesto que a valores de pH próximos a la

neutralidad, la Talidomida presenta una acusada degradación. Además observamos una influencia del tipo de buffer y su osmolaridad sobre la estabilidad de nuestro principio activo en soluciones líquidas, obteniéndose una mayor estabilidad en las soluciones de citrato que en las soluciones de ftalato cuando presentan la misma osmolaridad y pH. La influencia de la osmolaridad se estudió en un tampón citrato de pH 5, comprobándose las osmolaridades de 0,375 M y 0,75 M, y se obtuvo una estabilidad para la Talidomida del $91,38 \% \pm 1,49$ después de 14 días en solución citrato 0,375 M, frente a los $85,04 \% \pm 2,05$ para la solución citrato de pH 5 (0,75 M).

La temperatura es asimismo un factor decisivo en la estabilidad de nuestro principio activo (Lyon 1995), ya que aunque era de esperar un proceso degradativo en condiciones aceleradas de estabilidad (40°C , 75%), la degradación que experimentan las muestras de las soluciones de Talidomida fue mucho más drástica que la obtenida en condiciones normales, ya que para la solución amortiguadora de pH 5 (citrato 0,375 M), el porcentaje inalterado de Talidomida a los 14 días en condiciones normales (25°C , 60%) es de $91,38 \pm 1,49$, mientras que el porcentaje inalterado de Talidomida en condiciones aceleradas (40°C , 75%) para la misma solución amortiguadora es de $52,76 \pm 4,5$.

Por consiguiente seleccionamos la solución amortiguadora de pH 5 y tipo citrato con valor de osmolaridad de 0,375 M como la más apropiada para obtener soluciones de Talidomida, puesto que presenta una aceptable solubilidad y una importante mejora en la estabilidad de nuestro principio activo.

Por otro lado, respecto a la disolución de la Talidomida, nos encontramos una total ausencia de datos de farmacopeas, por lo que iniciamos unos ensayos de disolución en distintos aparatos y en distintos medios de disolución, concluyendo que la velocidad de disolución de la Talidomida es mayor si se emplean sistemas de disolución con paletas en lugar de con cestillos, pero el porcentaje medio disuelto de principio activo es independiente si se utiliza el sistema Turu-Grau o el Van-Kel, y no se ve influenciado por la presencia de lauril sulfato sódico. Así, según nuestros datos, la Talidomida materia prima presenta una velocidad de disolución muy lenta, debido a su baja solubilidad acuosa, disolviéndose el 80% de Talidomida en 6 horas.

Para solucionar los problemas de solubilidad y estabilidad de nuestro principio activo se utilizan recursos farmacotécnicos, como son las dispersiones sólidas y el empleo de complejos de inclusión con ciclodextrinas, que exaltan la solubilidad del fármaco; esto conlleva una optimización de la biodisponibilidad de la Talidomida, ya que se aumenta la absorción al mejorar la solubilidad del principio activo y, por consiguiente, se mejoran las propiedades farmacocinéticas y biofarmacéuticas. (Krenn, 1992)

Se prepararon formas líquidas de Talidomida con distintas ciclodextrinas y albúmina, y formas sólidas de nuestro principio activo con la ciclodextrina seleccionada, la albúmina y la crospovidona.

Los estudios de higroscopicidad realizados sobre nuestro principio activo nos permiten considerar a la Talidomida como una sustancia poco higroscópica, que no se ve influenciado por la humedad ambiental en condiciones normales de almacenamiento (25°C, 60 %). Esto resulta ventajoso en procesos tales como el de la liofilización, que suelen ir acompañados de un aumento en el valor higroscópico de las muestras liofilizadas. Por eso, al ser la Talidomida una sustancia poco higroscópica, no captará agua tan rápidamente como otras que sean higroscópicas y se beneficiará la estabilidad del principio activo.

Por este motivo iniciamos los procesos de liofilización de nuestro principio activo, con el objetivo de encontrar formas con cambios en la cristalinidad que mejoren la solubilidad de la Talidomida. Así se consigue una notable mejora en la velocidad de disolución de nuestro principio activo con un porcentaje de disolución de la Talidomida del 80 % en 10 minutos para las formas recristalizadas del principio activo, mientras que las formas sin recristalizar alcanzaban el 80 % disuelto del principio activo en 6 horas.

Por consiguiente, el proceso de liofilización seleccionado para nuestro principio activo da lugar a un acusado descenso en la cristalinidad de la Talidomida, responsable del incremento en la velocidad de disolución de nuestro principio activo.

Los resultados de estabilidad, tanto en condiciones normales (25°C,60%) como en condiciones aceleradas (40°C, 75%), nos permiten observar una mayor inestabilidad de nuestra Talidomida recristalizada por liofilización frente a la materia prima inalterada. Esta mayor degradación posiblemente sea debido a la captación de agua en las regiones amorfas de nuestra materia prima liofilizada, que favorecerá las reacciones de degradación hidrolítica que sufre este principio activo.

Las ciclodextrinas se escogieron como un posible vehículo para la formación de complejos de inclusión con Talidomida, basándonos en referencias bibliográficas (Krenn,1992) que apuntan que la ciclodextrina más efectiva en la mejora de la solubilidad y de la estabilidad acuosa de nuestro principio activo es la hidroxipropil beta ciclodextrina. En la formación del complejo de inclusión con la Talidomida, la solubilidad del fármaco se incrementa considerablemente, pasando de un valor de 50 µg/ml a otro superior de 1,7 mg/ml, extiéndose además el tiempo de semivida de la solución a 4,1 horas. Tomando como base estos estudios iniciales, preparamos formas líquidas de Talidomida con la metoxiCD, la γCD y la HPBCD en distintos porcentajes en medio citrato pH 5 (0,375 M), seleccionado como el más estable y, como ya hemos indicado, donde nuestro principio activo presenta unos coeficientes de solubilidad adecuados. De todas las formas líquidas con las ciclodextrinas, la formulación de Talidomida con la HPBCD es la que ofrece los mayores coeficientes de solubilidad para nuestro principio activo.

A continuación se evaluó la estabilidad de las formas líquidas de Talidomida con la ciclodextrina seleccionada, que es la HPBCD, concluyendo que el porcentaje de principio activo permanece inalterado cuando la ciclodextrina se encuentra en el medio en proporción 1:5 (p/p) o superior de mezcla (Talidomida : ciclodextrina), mientras que cuando es inferior y del orden 1:1 (p/p) (principio activo: ciclodextrina), se obtiene una disminución de la estabilidad de la Talidomida, lo que nos lleva a seleccionar la relación (p/p) 1:2 como aquella que ofrece una buena estabilidad para nuestro principio activo en solución en medio citrato pH 5 (0,375 M), según nuestras condiciones de trabajo, al requerir un gran volumen de ciclodextrina las proporciones (p/p) 1:5 y 1:9 .

Las formas sólidas se prepararon en proporciones 1:1 y 1:2 de Talidomida: HPBCD, ya que la relación 1:2 nos permite obtener buenos datos de estabilidad para nuestro principio activo. Así, con ambas formulaciones se consigue incrementar marcadamente el porcentaje disuelto de principio activo en función del tiempo, ya que en cinco minutos aproximadamente la formulación sólida de Talidomida presenta un 70 % disuelto de principio activo, comparado con el 8 % disuelto de Talidomida materia prima y, por otro lado, el 80 % disuelto con el complejo de ciclodextrina se alcanza a los 60 minutos, mientras que para alcanzar este porcentaje disuelto de principio activo en la Talidomida materia prima son necesarias 6 horas.

Por otro lado, se escogió la albúmina como vehículo en la formación de dispersiones sólidas de Talidomida, ya que, según datos bibliográficos (Knoche, 1994), la albúmina puede reducir el problema de la racemización de la Talidomida. Se escogió la ovoalbúmina y no la albúmina humana porque se puede administrar por vía oral, siendo además más económica.

Así, se prepararon formas líquidas y sólidas de Talidomida con la ovoalbúmina. Las formas líquidas presentaban distintas proporciones (p/p) Talidomida: albúmina en medio citrato pH 5 (0,375 M), con valores de estabilidad para nuestro principio activo semejantes a los obtenidos con las respectivas formulaciones líquidas de Talidomida con la HPBCD, por lo que podemos considerar que no existen grandes diferencias entre las formulaciones líquidas de Talidomida con HPBCD y las formulaciones con albúmina, en cuanto a valores de estabilidad se refiere, para nuestro principio activo en nuestras condiciones de almacenamiento y para las proporciones (p/p) Talidomida: vehículo del orden 1:2 y 1:9.

Para las relaciones (p/p) de Talidomida: albúmina del orden 1:1 y 1:2 y según los resultados de nuestros estudios de estabilidad en estas formas líquidas, podemos concluir que es bastante más estable el complejo 1:2 (p/p) Talidomida: albúmina que el complejo 1:1.

La incorporación de albúmina para formulación de dispersiones sólidas con nuestro principio activo logra mejorar la velocidad de disolución de la Talidomida; de esta forma se obtiene que a los 5 minutos, tanto la dispersión 1:1 como la 1:2 de Talidomida: albúmina, presentan unos valores de principio activo disuelto del 80 %, mientras que para la Talidomida materia prima sólo se alcanza un 8 % disuelto en el mismo tiempo.

Si comparamos los valores de disolución de nuestro principio activo en dispersiones sólidas de albúmina frente a los complejos de inclusión con ciclodextrinas, resulta más ventajoso la utilización de albúmina en el incremento de la velocidad de disolución de la Talidomida, puesto que a los 5 minutos frente a los 76,37 % ($\pm 1,26$) disuelto de principio activo con el complejo 1:1 (p/p) Talidomida: HPBCD, están los 84,66 % ($\pm 2,21$) de la dispersión 1:1 Talidomida: albúmina, y frente a los 66,73 % ($\pm 1,01$) disuelto con complejo 1:2 (p/p) Talidomida: HPBCD, están los 82,22 % ($\pm 1,08$) disueltos con la dispersión 1:2 de Talidomida: albúmina.

Respecto a la estabilidad de las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina, no hemos observado grandes cambios en la estabilidad de nuestro principio activo durante los 6 meses de almacenamiento, tanto en condiciones normales (25°C, 60%) como en condiciones aceleradas (40°C, 75%). Esto nos permite escoger la dispersión sólida de Talidomida: albúmina en relación (p/p) 1:2, por ser la proporción que presenta los mejores valores de disolución para nuestro principio activo.

El empleo de crospovidona en la formación de dispersiones sólidas con Talidomida también logra mejorar significativamente la velocidad de disolución de nuestro principio activo, ya que tanto la relación (p/p) 1:1 como la 1:2 de Talidomida: crospovidona, alcanzan el 80 % disuelto en tiempos inferiores a 5 minutos, igual que ocurría con las formulaciones de albúmina, pero la diferencia está en que las dispersiones sólidas de albúmina alcanzan más rápidamente la total disolución del fármaco que es a los 15 minutos, tanto para las relaciones (p/p) 1:1 como la 1:2 de Talidomida: albúmina, mientras que son necesarios unos 90 minutos para alcanzar la total disolución del principio activo, tanto en proporciones (p/p) 1:1 como 1:2 de Talidomida: crospovidona.

Por tanto, de entre todas las formulaciones ensayadas con nuestro principio activo, la dispersión sólida de Talidomida: albúmina en proporción (p/p) 1:2 resulta ser la más adecuada para someterla a una compresión directa, puesto que ofrece una adecuada estabilidad para el principio activo y una rápida velocidad de disolución del mismo.

Así, los comprimidos propuestos de Talidomida formulados a partir de la dispersión sólida 1:2 (p/p) de nuestro principio activo con albúmina presentan un 80 % de disolución en aproximadamente 20 minutos, y a los 5 minutos alcanzan un 57 % disuelto, mientras que los comprimidos comerciales de Talidomida alcanzan el 80 % disuelto en más de 5 horas y a los 5 minutos presentan porcentajes disueltos inferiores al 5%.

Por ello podemos concluir nuestro trabajo afirmando que la formulación propuesta para la Talidomida a partir de la formación de una dispersión sólida con albúmina (p/p) en relación 1:2 de Talidomida: albúmina y con distintos excipientes, nos permite obtener unos comprimidos con unas propiedades farmacotécnicas adecuadas, a la vez que mejoramos su estabilidad frente a excipientes higroscópicos.

De los estudios de estabilidad realizados con la Talidomida, podemos considerar a las reacciones hidrolíticas como su principal vía de degradación (Lyon, 1995); aunque se trata de una sustancia con una baja higroscopicidad relativa, la presencia de excipientes higroscópicos en la elaboración de los comprimidos o el empleo de vehículos higroscópicos como la albúmina, han demostrado que aceleran su degradación. Sin embargo, la utilización de dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina utilizadas en comprimidos con excipientes higroscópicos presentan una mejora en los resultados de estabilidad frente al almacenamiento, cuando se compara con los mismos comprimidos que carecen de la albúmina como vehículo de la dispersión sólida. Otros productos, tales como las citokinas, en dispersión sólida con albúmina presentan una estabilidad muy buena, incluso en condiciones extremas de almacenamiento (Dawson, 1992)

Esto nos lleva a pensar que la albúmina puede captar la humedad que aportan a la formulación estos excipientes de compresión, protegiendo a la Talidomida de sus reacciones de hidrólisis.

Es un problema la elevada pérdida de actividad, tanto de los comprimidos comerciales (más) como de la fórmula propuesta (menos), lo que debería obligar a un replanteamiento en el ajuste de la dosis y fecha de caducidad del medicamento.

17

CONCLUSIONES

1º *La Talidomida, que actualmente se importa en España, se usa en terapéutica aplicando un protocolo estricto para las indicaciones admitidas, o bien como parte de un ensayo clínico o como "uso compasivo" en indicaciones no admitidas. Las principales indicaciones son de tipo dermatológico, como la lepra, síndrome de Behcet y prurigo; de tipo infeccioso, como el SIDA, tuberculosis y úlceras; de tipo reumatológico, como la artritis; de tipo hematológico, como la enfermedad injerto contra huésped; de tipo oncológico y angiogénico, así como otras enfermedades huérfanas. La valoración médica obtenida mediante el envío de encuestas a hospitales muestra que, en general, los resultados son óptimos y buenos en muchas de las indicaciones mencionadas.*

2ª *La Talidomida es un medicamento huérfano que el Estado importa únicamente para los tratamientos autorizados y al no comercializarse en España, no pudimos disponer de materia prima, viéndonos obligados a sintetizar nuestro propio principio activo, que se obtuvo con una riqueza del 96 %.*

3ª *La estabilidad del principio activo en solución patrón es muy dependiente del tiempo, experimentando una degradación cercana al 5% por hora, por lo que las soluciones serán extemporáneas. Además está muy influenciado por el valor del pH, ya que a mayor alcalinidad mayor inestabilidad de la molécula, y depende también del tipo de solución amortiguadora, así como de su osmolaridad, seleccionándose la solución de pH 5 citrato 0,375 molar como la más apropiada para la preparación de soluciones de Talidomida, puesto que presenta una aceptable solubilidad y una importante mejora de la estabilidad.*

4ª *En ausencia de datos de farmacopeas relativos a la disolución del principio activo, podemos concluir que ésta es independiente del aparato utilizado y que no está influenciada por la presencia de sustancias tensoactivas, como el lauril sulfato sódico, mostrando en nuestros ensayos una lenta velocidad de disolución, debida a su escasa solubilidad acuosa, que hace que se alcance el 80% del fármaco a las 6 horas.*

5ª *Con el objeto de mejorar los principales inconvenientes que presenta la Talidomida de escasa solubilidad acuosa y poca estabilidad en solución, que pueden influir extraordinariamente en la acción terapéutica, se han empleado varios recursos galénicos, entre los que destacamos los complejos de inclusión con las ciclodextrinas y las dispersiones sólidas con albúmina y crospovidona, obteniéndose grandes mejoras farmacotécnicas para nuestro principio activo.*

6ª *Las formulaciones líquidas de Talidomida con ciclodextrinas ofrecen los mejores valores de disolución con el empleo de la hidroxipropil beta ciclodextrina al 5 y 10%, por incrementar en cuatro y ocho veces, respectivamente, la solubilidad del principio activo, y presentan los mejores valores de estabilidad cuando la ciclodextrina se encuentra en proporción 1:2 (p/p) o superior. Los complejos de inclusión, tanto en relación 1:1 como 1:2 (p/p), suponen una mejora farmacotécnica importante, alcanzando cerca del 70% de fármaco disuelto en cinco minutos.*

7ª *Las formulaciones líquidas de Talidomida con albúmina presentan una estabilidad en las relaciones 1:2 y 1:9 (p/p) parecida a la obtenida con las ciclodextrinas, siendo además las formulaciones con albúmina las que consiguen con mayor rapidez la total disolución del fármaco.*

8ª *Como cabía esperar, de los resultados de nuestros estudios de estabilidad obtuvimos que las formas sólidas de Talidomida presentaron una mejora importante frente a las formulaciones líquidas, siendo seleccionadas las dispersiones sólidas de Talidomida con albúmina en proporción 1:2 (p/p) por sus características farmacotécnicas para la elaboración de comprimidos.*

9ª *Los comprimidos propuestos de Talidomida cumplen, con gran diferencia frente a los comerciales, el ensayo de disolución, alcanzando el 80% disuelto a los 20 minutos, frente a porcentajes disueltos de principio activo inferiores al 5% con los comerciales.*

10ª *Por último, consideramos que sería conveniente continuar este trabajo desde el punto de vista farmacológico y clínico, para evaluar la influencia de las mejoras farmacotécnicas alcanzadas en las acciones terapéuticas descritas para la Talidomida.*

18

BIBLIOGRAFÍA

. ABOUL-,H.Y.; ISLAM,M.R.

Direct HPLC separation of Thalidomide enantiomers using cellulose tris-4-methylphenyl benzoate chiral stationary phase.

Journal Liquid Chromat.,14:667-7 (1991)

AHERN,T.; KLIBANOVA,A.M.

The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100C

Science , 128 : 1280-4 (1985)

ALTOMONTE, V.

Use of thalidomide for GVHD defened

Oncol.Nurs.Forum, 20: 428 (1993)

ALLEGUE,F.; SARRIA CEPEDA, C.

Aftosis mayor tratada con Talidomida en un paciente afectado de SIDA

Enferm.Infecc Microbiol Clin., 9: 133-4 (1991)

AMMAR,H.; NAHHAS,S.

Improvement of some pharmaceutical properties of drugs by cyclodextrin complexation

Pharmazie, 50: 408-10 (1995)

ANDREW,G.

Determination of Thalidomide by HPLC: methodological strategy for clinical trials

Clinical Biochemistry, 28: 467-70 (1995)

ANDREW,G.; BRAUN,L.

Teratogen metabolism:activation of Thalidomide and Thalidomide analogues to products that inhibit the attachment of cells to

Bioch.Pharm., 33: 1471-7 (1984)

ANDRULIS,P.J.

Treatment of rheumatoid arthritis with thalidomide alone or in combination with other antiinflammatory agents

Interational patent appl., 95: 533 (1995)

ARBAB-ZADEH,A.

Toxic and teratogenic effects of Thalidomide

DTSCH., 57: 285-90 (1966)

ARCHER,J.

Thalidomide and neurological damage revisited

JAMA, 239: 1608-9 (1978)

ARLEN,R.R.; WERS,P.G.

Inhibition of Thalidomide teratogenicity by acetylsalicylic acid: evidence for prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation

Journal Pharmacol Exp Ther.,277: 1649-58 (1996)

ARONSON,I.K.; YU,R.

Thalidomide induce peripheral neuropathy effect of serum factor on nerve cultures

Arch.Dermatol, 120: 1466-70 (1984)

ASSCHER, W.

Safety of Thalidomide

BMJ, 309: 193-4 (1994)

ATRA,E.; SOTO,EL.

Treatment of the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus with Thalidomide

Clin Exp Rheumatol, 111: 487-93 (1993)

ATTIA, M.A.; ABOUTALEB,AE.; HABIB,F.S.

A study on the dissolution of diazepam from its solid dispersiones and coprecipitates in the presence of various

Pharmazie, 37: 274-77 (1982)

AVALOS-DIAZ, E.; GUZMAN-ENRIQUEZ, L.

Inhibitory effect on endocytosis in polymorphonuclear cells caused by Thalidomide
Arch Invest.Med (Mex), 16: 139-43 (1985)

A WOFESO, N.

Thalidomide peripheral neuropathy
Trop.Doct., 22: 139-40 (1992)

BACH, A.; BICHEL, J.

Studies on the possible antineoplastic effect of thalidomide
Acta Pathol.Microbiol.Scand., 59: 491-9 (1963)

BADAWI, A.A.; EL-SAYED, A.

Dissolution studies of povidone sulfathiazole coacervated systems
J.Pharm.Sci., 69: 492-7 (1980)

BAKER, R.

Thalidomide for mouth ulcers and wasting
BETA, 8: (1995)

BALL, S.C.; SEPKOWITZ, K.A.

Thalidomide for treatment of oral aphthous ulcers in patients with HIV syndrome
AM. J. Gastroenterol., 92: 169-70 (1997)

BALL, S.C.; SEPKOWITZ, K.A.

Thalidomide for treatment of aphthous ulcers in patients with HIV
INT.CONF.AIDS, 10: 224 (1994)

BARANARAS, E.; ADEYAYE, C.

Crospocidone
Anal. Profiles Drugs Subst., 24: 87-163 (1996)

BARBA RUBIO, J

Lupus eritematoso discoide y Talidomida
Dermatologica, 19: 131-9 (1975)

BARNHILL, R.L.; Mc DOUGALL, A. C.

Thalidomide use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions
J.Am.Acad Dermatol., 7: 317-23 (1982)

BARNHILL, R.L.; DOLL, N.J.; MILLIKAN, L.E

Studies on the antiinflammatory properties of Thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes
J Am Acad Dermatol., 11: 814-9 (1984)

BARRIERE, H.

Cutaneous sarcoidosis. Treatment with Thalidomide
Press Med., 12: 963 (1983)

BECKMAN, D.A.; BRENT, R.L.

Mechanisms of teratogenic
Ann Rev Pharmacol Toxicol., 24: 483-500 (1984)

BECKMAN, R.; KAMPF, H.H

Zur quantitativen Bestimmung und zum qualitativen Nachweis von N-Phthalyl-L-glutaminsäureimid (Thalidomid)
Arzneimittel Forschung, 11: 45-7 (1961)

BEKKER, L.G.; HASLETT, P.

Thalidomide induced antigen-specific immune stimulation in patients with HIV type 1
J Infect Dis., 181: 954-65 (2000)

BEKKER, L.G.; HASLETT, P.; MAARTERNS, G.

Thalidomide induced antigen specific immune stimulation in patients with HIV and tuberculosis
J Infect Dis., 181: 954-65 (2000)

BERGER, T.G.; HOFFMAN, C.; THIEBERG, M.D.

Prurigo Nodularis and photosensitivity in AIDS: treatment with Thalidomide
J.Am.Acad. Dermatol., 33: 837-8 (1995)

BERNAL, J.E.; DURAN, M.M.

Cellular immune effects of Thalidomide in actinic prurigo
Int J Dermatol., 31: 599-600 (1992)

BERNARDO, B.; ARRIZABALAGA, J.,

Eficacia de la Talidomida en las úlceras esofágicas inespecíficas en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Med Clin Barc., 94: 638-9 (1990)

BESSIS, D.; GUILLOT, B.; MONPOINT, S.

Thalidomide for systemic lupus erythematosus.
Lancet, 339: 549-50 (1992)

BLAKE, D.A.; GORDON, G.B.

The role of metabolic activation in Thalidomide teratogenesis
Teratology, 25: 28-9 (1982)

BLASCHE, G.; KRAFT, H.P.; MARKGRAF, H.

Determination of enantiomers of thalidomide by HPLC
Chem. Uer., 113: 2318-22 (1989)

BLASCHKE, G.; KRAFT, K.P.

Chromatographische Racematrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere
Arzneimittel- Forschung, 29: 1640-2 (1979)

BODOR, N.; DRUSTRUP, D.; WU, W.

Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of a novel soft corticosteroid loteprednol etabonate
Pharmazie, 55: 206-9 (2000)

BONNETBLANC, J.M.; ROYER, C.

Thalidomide and recurrent aphthous stomatitis: a follow up study
Dermatology, 193: 321-3 (1996)

BORE, P.J.; SCOTHORNE, R.J.

Effect of Thalidomide on survival of skin homografts in rabbits
Lancet, 9: 1240 (1966)

BOURDILLON, C.

Thalidomide in erythema nodosum leprosum
Lepr.Rev., 59: 184-5 (1988)

BOUZA, E.; MUÑOZ, P.; DIAZ, M.D.

Thalidomide in patients with acquired immunodeficiency syndrome
Arch Inter Med., 152: 1089-90 (1992)

BOWERS, P.W.; POWELL, R.J.

Effect of thalidomide on orogenital ulceration
Br.J.Med., 287: 799-800 (1983)

BRAUN, A.G.; HARDING, F.A.

Teratogen metabolism: Thalidomide activation is mediated by cytochrome P 450
Toxicology and Applied ., 82: 175-9 (1986)

BRESHNAHAN, T.J.

Attempted suicide with Thalidomide: a case report
Applied Therapeutics, 3: 621-6 (1961)

BRODTHAGEN, H.

Significant response of oral aphthosis to Thalidomide treatment
Am Acad Dermatol., 13: 509 (1985)

BURLEY, D.M.

Overdosage with Thalidomide
Medical Word, 93: 26-8 (1960)

BURROWS, N.P.; WALPORT, M.J.

Lupus erythematosus profundus with partial C4 deficiency responding to Thalidomide
Br.J.Dermatol., 125: 62-7 (1991)

CALABRESSE, L.; FLEISCHER, A.B.

Thalidomide: current and potential clinical applications
Am J Med., 108: 487-95 (2000)

CASTILLO, J.A.; PALOMO, J.; GARCIA, J.J.; LASTRES, J.L.

Preparation and characterization of albendazole beta cyclodextrin complexes
Drug Dev Ind Pharm., 25: 1241-8 (1999)

CAZORT, R.J.; SONG, Y.K.

A trial of thalidomide in progressive lepra reactions
Curr Ther Res., 8: 299-311 (1966)

CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS

Thalidomide
11 Ed: 1007 (1989)

CONNOLLY, M.

Freeze crystallization of Imipenem
Journal of Pharmaceutical, 85: 174-5 (1996)

CORNEA, P.; VLADUTIU, A.

The immune suppressive effect of thalidomide in experimental tuberculosis in guinea pigs
Tubercle, 48: 51-3 (1967)

CORRIGAN, O.I.; HOLOHAN, E.M.

Amorphous spray dried hydroflumethiazide polyvinyl pyrrolidone systems: physicochemical properties
Journal Pharmaceutical, 36:217-221 (1984)

CRAIN, E.; Mc INTOSH, K.R.

The effect of Thalidomide on experimental autoimmune myasthenia gravis
J Autoimmun, 2: 197-202 (1989)

CRAWFOR, C.L.

Thalidomide neuropathy
N.Engl.J.Med., 327: 735 (1992)

CROCKER, L.; Mc CAULEY, J.

Comparison of the crystallinity of Imipenem samples by X Ray Diffraction of amorphous material
Journal of Pharmaceutical, 84:226-7 (1996)

CZEJKA, M.J.; KOCH, H.P.

Determination of Thalidomide and its major metabolites by high performance liquid chromatography
J.Chromatography, 413: 181-7 (1987)

CHAO,N.J.; PARKER,P.M.

Paradoxical effect of thalidomide prophylaxis on chronic GVHD
Biol.Blood.Marrow Transplant., 2: 86-92 (1996)

CHEM, T.L.

Determination of Thalidomide by HPLC
Drug Metab. Dispos., 17: 402 (1989)

CHEMTOB, C

Thalidomide
S.T.P. Pharma, 1: 531-8 (1985)

CHEN,T.L.; VOGELSANG,G.B.; PETTY,B.G.

Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of Thalidomide after oral dosing in healthy male volunteers
Drug Metab.Disp, 17: 402-5 (1989)

CHEROVATI,K.; CLAUDY,D.

Treatment by thalidomide of chronic multiforme erythema:its recurrent and continuous variants
Ann.Dermatol.Venereol., 123: 375-7 (1996)

CHING,L.; BROWNE,W.

Interaction of Thalidomide, phthalidomide analogs of Thalidomide and pentoxifylline with the tumor agent 6,6
Br.J. Cancer, 78: 336-343 (1998)

CHIOU, W.L.; RIEGELMAN, S.

Pharmaceutical applications of solid dispersion systems
Journal of Pharmaceutica , 60: 1281-130 (1971)

D'AMATO,R.

Methods and compositions using Thalidomide or other angiogenesis inhibitory compound and antiinflammatory of angiogenesis
PCT Int Appl., 98: 63 (1998)

D'AMATO,R.;LOUGHNAN,M.

Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis
Proc.Natl.Acad.Sci., 91: 4082-5 (1994)

DALY,BM.; SHUSTER,S.

Antipruritic action of Thalidomide
Acta Derm Venereol., 80: 24-5 (2000)

DAVEY,PP.; ASHRAFIAN,H.

New therapies for heart failure, is Thalidomide the answer ?
QJM, 93: 305-11 (2000)

DAVIDSEN, S.K.; SUMMERS, J.B.

Inhibition of TNF alpha synthesis
Expert. Opin.Ther.Patents., 5: 1087-110 (1995)

DAWSON, P.J.

Effect of formulation and freeze -drying on the long term stability of r-DNA derived cytokines
Dev. Biol.Stand., 74: 273-82 (1992)

DE LA TORRE,P.; TORRADO,S.; TORRADO,S.

Preparation, Dissolution and Characterization of Paraziquantel solid dispersions
Chem Pharm Bull., 47: 1629-163 (1999)

DE LAS AGUAS,J.T.

Thalidomide in the treatment of lepra reactions
Int J.Leprosy, 39: 593-7 (1971)

DE, AU.; PAL, O.

Possible antineoplastic agents
J Pharm SCI, 64: 262-6 (1975)

DEAN, R.; GOODLESS, MD

Reactional states in Hansen disease
Southern Medical Journal, 84: 138 (1991)

DIZ-DIOS, P.; SOPENA, B.

Thalidomide for the treatment of acquired immunodeficiency syndrome associated refractory oral ulcers
Arch.Otolaryngol.Head.Neck.S., 126: 89-92 (2000)

DOMENECH MASSONS, J.M.

Descripción de caracteres cuantitativos
Métodos Estadísticos, 29-42 (1999)

DOMINGUEZ, L.

A propósito de la incidencia de neuropatía periférica en pacientes tratados con Talidomida
Arch Dermatol., 5:164 (1994)

DOUTRE, MS; BEYLOT-BARRY, M.

Lupus erythemateux cutane subaigu
Presse Med., 29: 1311-6 (2000)

ECHEZARRETA, M.; TORRES, JJ.; CASTINEIRAS, L.

Complexation of the interferon inducer, bropirimina with hydroxypropyl beta cyclodextrin
Eur J Pharm Sci., 9: 381-6 (2000)

EFSTEIN, JH

Polymorphous light eruption
Dermatol Clin., 4: 243-51 (1986)

EGGIMANN, P.; CHAVE, J.P.; GLAUSER, M.P.

Thalidomide for recurrent aphthous ulcerations in HIV-infected patients: a prospective, multicenter, double-blind placebo
Program.Abstr.Intersci.Conf., 199 (1994)

EISEN, T.; BOSHOFF, C.

Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer
Br J Cancer., 82: 812-7 (2000)

EISENBUD, L.

Recurrent aphthous stomatitis of the Behcet's type: succesful treatment with Thalidomide
Oral Surg Oral Med Oral Pathol., 64: 289-92 (1987)

EL DALSH, S.S; EL SAYED, A.A.

Effect of the solvent used in coprecipitation on the dissolution rate of spironolactone
Pharmazie, 37: 606-7 (1982)

EMEA

Note for guidance on stability testing of existing active substances and related finished products. The european agency for
Human Medicines _Evaluation, 556 (1996)

ERAVELLY, J.

Thalidomide in Weber Christian disease
Lancet, 8: 251 (1977)

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S

Determination of Thalidomide in plasma and blood by HPLC avoiding hydrolytic degradation
Journal Chromatography, 582: 211-6 (1992)

ERIKSSON,T.; BJORKMAN,S.

Enantiomers of Thalidomide: blood distribution and the influence of serum albumin on chiral inversion and hydrolysis
Chirality, 10: 223-8 (1998)

ERIKSSON,T.; BJORKMAN,S.

Stereospecific determination chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of Thalidomide
Chirality, 7: 44-52 (1995)

FABRO,S.; SMITH,R.L.

Toxicity and Teratogenicity of optical isomers of Thalidomide
Nature, 215: 296 (1967)

FAURE,M.; THIVOLET,J.; GAUCHERAND,M.

Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by Thalidomide
Arch Dermatol Res., 269: 275-80 (1980)

FAZAL,N.; LAMMAS,S.A.

Effect of blocking TNF alpha on intracellular BCG growth in human monocyte derived macrophages
Fems.Microbiol.Immunol., 5: 337-45 (1992)

FEDERMAN,G.L.; FEDERMAN, D.G.

Recalcitrant pyoderma gangrenosum treated with Thalidomide
Mayo.Clin.Proc., 75: 842-4 (2000)

FELISATI,D.

On the teratogenicity of Thalidomide with special reference to malformations of the cephalic portion of the body
Ann.Laringol.Otol.Rinol.Faringo., 62: 397-415 (1963)

FELISATI,D.

Teratogenic action of Thalidomide
Lancet, 15: 724-5 (1964)

FILIPOVIC,J.; VOINOVICH,D.; MONEGHINI,M

Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone hydroxypropyl beta cyclodextrin inclusion complex
Eur J Pharm Sci., 9: 373-9 (2000)

FINE,HA.; FIGG,WD

Phase II trial of the antiangiogenic Thalidomide in patients with recurrent high grade gliomas
J Clin Oncol., 18: 708-15 (2000)

FISHMAN,SJ.; FEINS,NR

Thalidomide for Crohn disease
Gastroenterology, 119: 596 (2000)

FLORES,O.

Prurigo solar de altiplanicie, resultados preliminares de su tratamiento con Talidomida en 25 casos
Dermatol Rev.Mex., 19: 26 (1975)

FOGH-ANDERSEN,P.

Thalidomide and congenital deaf deformities
Acta Chir Scand., 131: 197-200 (1966)

FORD, J.L.

The current status of solid dispersions
Pharm. Acta Melv., 61: 69-88 (1986)

FROMMING,K.H.; SZEJTLI,J.

Cyclodextrins
Cyclodextrins in Pharmacy, 1-38 (1993)

FROMMING,K.H.; SZEJTLI,J.

*Cyclodextrins in various drug
Cyclodextrins in Pharmacy 151-193 (1993)*

FROMMING,K.H.; WEYERMANN,I.

*Erhöhung der in vitro losung sgoschwindigkeit durch EinschluBverbindungen mit Bcd
Arch.Pharm., 35: 290 (1972)*

GARCIA PATOS,V.; PUJOL, RM

*Aftosis orofaríngea persistente en pacientes con SIDA
Medicina cutánea ibero latino, 21: 203-7 (1993)*

GARDNER-MEDWIN,J.M.

*Thalidomide in autoimmune conditions
Expert Opin.Invest.Drugs, 5: 829-41 (1996)*

GENVO,MF.; FAURE,M.

*Treatment of aphthosis with Thalidomide and with colchicine
Dermatologica, 168: 182-8 (1984)*

GEORGALA,S.; KATOULIS,A.C.

*Thalidomide treatment for hypertrophic lupus erythematosus
Clin.Exp.Dermatol., 23: 141 (1998)*

GEORGHIOU, PR.; KEMP, RJ

*HIV associated oesophageal ulcers treated with Thalidomide
Med J Aust., 152: 382-3 (1990)*

GEORGHIOU,P.R.; ALL WORTH,A.M.

*Thalidomide in painful AIDS associated proctitis
J.Infect Dis., 166 :939-40 (1992)*

GERALDINE, M.; SUMIE, Y.;TADAO, T.

*The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state
J.Pharm.Pharmacol., 46: 182-5 (1994)*

GHIGLIOTTI,G.; REPETTO,T.; FARRIS,A.

*Thalidomide treatment of choice for aphthous ulcers in patients seropositive for human immunodeficiency virus
J.Am.Acad.Dermatol., 28: 271-2 (1993)*

GODFREY,T.; KHAMASHTA, M.A.

*Therapeutic advances in systemic lupus erythematosus
Curr.Opin. Rheumatol., 10: 435-41 (1998)*

GOLLOP,T.R.; EIGIER,A.

*Prenatal diagnosis of Thalidomide syndrome
Prenat.Diag., 7: 295-8 (1987)*

GORDON,G.

*The mechanism of Thalidomide deformities correlated with the pathgenic effects of prolonged dosage in adults
Dev.Med.Chil.Neurol., 8: 761-7 (1966)*

GORLA.; ROSSLM;

*Tumor necrosis factor alpha increased production with tuberculosis and HIV
J Infect Dis., 182: 639-40 (2000)*

GORIN,I.; VILETTE,B.

*Thalidomide in hyperalgie ulceration of AIDS
Lancet, 335:1343 (1990)*

GORIN,I.; VILETTE,B.

Thalidomide may cure AIDS ulcers
Nurs. Times,86: 2410 (1990)

GORIN,I.; VILETTE,B.; GEHANO,P.

Thalidomide in hyperalergic pharyngeal ulceration of AIDS
Lancet, 335: 1343 (1990)

GRAF, Z.; BEYER, C.

Act. Pharm. Technol., 28: 131-5 (1982)

GRANDA,E.

Medicamentos huérfanos
Farmacia Profesional, 1: 8-12 (1988)

GRASLAND, A.;POUCHOT,J.

Effectiveness of Thalidomide treatment during cutaneous sarcoidosis
Rev.Med.Interne., 19: 208-9 (1998)

GREEN, J.N.; BENSON, B.C.

Determinaton of Thalidomide in blood, plasma and orine by spectrofotometry UV
J. Pharm. Pharmacol., 13: 117-21 (1961)

GRINSPAN,D.; BLANCO,GF

Treatment of aphthae with Thalidomide
J Am Acad Dermatol., 20: 1060-3 (1989)

GROSSHANS,E.; ILLY,G.

Thalidomide therapy for inflammatory dermatoses
Int J Dermatol., 23: 598-602 (1984)

GUIMARAES, N.

Thalidomide a eclectic medicine in dermatology
An.Bras.Dermatol., 65: 11-4 (1990)

GUIMARAES, N.

Use of Thalidomide in dermatology
An.Bras.Dermatol., 70: 61-7(1995)

GUNZLER,V.

Thalidomide in human immunodeficiency virus patients
Drug Saf., 7:116-34 (1992)

GUTIERREZ RODRIGUEZ,O.

Thalidomide: a promising new treatment for rheumatoid arthritis
Arthritis Rheum.,27: 1118-21 (1984)

GUTIERREZ RODRIGUEZ,O.; STARUSTA BACAL, P.

Treatment of refractory rheumatoid arthritis
J.Rheumatol.,16: 158-63 (1989)

HAMZA,M.; HAMZAOU,K.

Thalidomide and cell mediated immunity in Behcet disease
Clin _Rheumatol., 6: 608-9 (1987)

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS

Derivados del almidón, 2nd Ed.: 483 (1994)

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS

Azúcares: 2nd Ed.: 506 (1994)

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS

Crospovidone: 2nd Ed.:163 (1994)

HAQUE,A.; STEWART,J.

Determinación racémico en plasma humano utilizando columna Avidin y extracción en fase sólida
Journal Liq Chromatography ,21: 2151-63 (1998)

HARRY,T.C.

Thalidomide treatment of mucosal ulcerations in HIV infection
Arch.Dis.Child., 75: 90 (1996)

HASHIMOTO,Y.

Novel biological response modifiers derived from Thalidomide
Curr.Med.Chem., 5: 163-78 (1998)

HASLETT,P.; CORRAL,L.; ALBERT,M.

Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes preferentially inducid proliferation cytokine production and cytotoxic
J.Exp.Med., 187: 1885-92 (1998)

HASPER,M.F

Chronic cutaneous lupus erythematosus
Arch Dermatol., 107: 83-6 (1983)

HASPER,MF.; KLOKKE,AH.

Thalidomide in the treatment of chronic discoid lupus erythematosus
Acta Dermat Venereol.,62: 321-4 (1982)

HASSAN Y.;ABOUL, E.; RAFIQU, M.

Direct HPLC separation of Thalidomide enantiomers using cellulose tris-4-methylphenyl benzoate chiral stationary phase
Journal of Liquid.,14: 667-673 (1991)

HASTINGS, R.C.; MORALES, M.J.

Studies of the mechanism of the action of Thalidomide in leprosy
In.J.Lepr., 41: 494 (1973)

HASTINGS,RC.; TRAUTMAN,JR.; ENNA,CD

Thalidomide in the treatment of erythema nodosum leprosum
Clin Pharmacol Ther.,11: 481-7 (1970)

HAWKINS,D.F.

Thalidomide for systemic lupus erythematosus
Lancet, 339: 1057 (1992)

HENEY,D.; BAILEY, CC.;LEWIS,IJ

Thalidomide in the treatment of graft versus host disease in children
Lancet, 2: 317 (1988)

HENEY,D.; BAILEY,CC; LEWIS,IL

Thalidomide for chronic graft versus host disease
Lancet, 44: 199-204 (1990)

HENEY,D.; NORFOLK,DR; WHEELDON,J.

Thalidomide treatment for chronic graft versus host disease
Br.J.Haematol., 78: 23-27 (1991)

HENRIQUET, F.; ROY, M.T., REPETTO, T.

Thalidomide in oral aphthous ulceration in patients with HIV infection
Palliat Med., 8: 255-6 (1994)

HERRMANN, N.; ALBRECHT, G.

Adult cutaneous Langerhans cell granulomatosis successful treatment with Thalidomide
H.G.Z.Hautkr., 73: 383-7 (1998)

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A.

Phase Solubility Techniques
Adv. Anal. Chem. Instr., 4 : 117-212 (1965)

HOLM, A.L.; BOWERS, K.E.

Chronic cutaneous lupus erythematosus treated with thalidomide
Arch Dermatol., 129: 1548-50 (1993)

HORA, M.S.; RANA, R.K.

Development of a lyophilized formulation of interleukin 2
Dev.Biol.Stand., 74: 295-303 (1992)

HORA, M.S.; RANA, R.K.

Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor.
Pharm.Res., 9: 33-6 (1992)

HUIZINGA, T.W.; DIJKMANS, B.A.

An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis.
Ann.Rheum.Dis., 55: 833-6 (1996)

HUNZIKER, T.; KREBS, A.

Thalidomide in dermatology
Hautarzt, 34: 66-72 (1983)

HUUPPONEN, R.; PYYKKO, K.

Stability of Thalidomide in human plasma
Clinical Chem., 41: 1199 (1995)

INAI, T.

Enhancement of dissolution and absorption of mefenamic acid by egg albumin
J. Pharm. Sci., 80: 484 (1991)

JACOBSON, J.M.; GREENSPAN, J.S.

Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with HIV infection
N.Engl.J.Med., 336 :1487-93 (1997)

JADHAV, U.H.; PATKIAH

Thalidomide in type 2 lepra reaction
Indian J Lepr., 62: 316-20 (1990)

JAKEMAN, P.; SMITH, W.C.

Thalidomide in leprosy reaction
Lancet, 343: 8895 (1994)

JAKKULA, M.; LE CRAS, T.D.

Inhibition of angiogenesis by the use of Thalidomide
Am J Physiol Lung Cell Mol., 279: 600-7 (2000)

JAMES, J.S.

Thalidomide for wasting syndrome: progress forward compromise
AIDS Treat. News, 234: 1-5 (1995)

JARHO,P.; URTTIA.

Hydroxypropyl beta cyclodextrin increases aqueous solubility and stability of Amandamide
Life Sciences, 58: 181-185 (1996)

JARHO,P.; VANDER,D.; STELLA,V.

Cyclodextrin catalyzed deacetylation of spironolactone is pH and cyclodextrin dependent
J Pharm Sci., 89: 241-9 (2000)

JENKINS,JS.; POWELL,RJ.

Thalidomide in severe orogenital ulceration
Lancet, 2: 1424-6 (1984)

JENKINS,S.; POWELL,R.J.

Thalidomide urogenital ulcers and risk of teratogenicity
Lancet, 1: 511 (1985)

JEW,LJ

Thalidomide in erythema nodosum leprosum
Ann Pharmacotes, 24: 482-3 (1990)

JOHNKE,H.; ZACHARIAE,H.

Thalidomide treatment of prurigo nodularis
Ugeskr Laeger, 155 : 3028-30 (1993)

JONSSON, N.A.

Chemical structure and teratogenic properties
Acta Pharm.Suecica, 9 : 425-446 (1972)

JORDAN, G.M.; YOSHIOKA, S.

The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state
J.Pharm.Pharmacol., 46: 182-5 (1994)

JORIZZO,J.L.; SOLOMON,A.R.

Behcet's syndrome.Immunopathologic and histopathologic assessment of pathergy lesions is useful in diagnosis and follow
Arch Pathol Lab Med., 109: 747-51 (1985)

JULIUSSON,G.; CELSING,F

Frequent good partial remissions from Thalidomide including best response ever in patients with advanced refractory and
Br J Haematol., 109: 89-6 (2000)

JUNGINGER, H.

Thalidomide
Pharm. Ind., 39: 383-8 (1976)

KANBAYASHI,T.; NISHINO,S.

Thalidomide immune modulation and narcolepsy
Sleep, 19: 116 (1996)

KARROW,NA.; Mc CAY,JA

Thalidomide stimulates splenic IgM antibody response and cytotoxic T lymphocyte activity and alters leukocyte subpopulation
Toxicol Appl Pharmacol., 165: 237-44 (2000)

KATZ,JA.

Thalidomide for Crohn's disease high dose, low dose or no doze at all ?
Inflamm Bowel Dis., 6: 152-3 (2000)

KEENAN, R.J.; EIRAS, G.

Immunosuppressive properties of Thalidomide.Inhibition of in vitro lymphocyte proliferation alone and in combination with
Transplantation, 52: 908-10 (1991)

KERBEL,RS.; VILORIA PETIT,A.

Accidental antiangiogenic drugs. Antioncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic
Eur J Cancer, 36: 1248-57 (2000)

KERBEL,RS.; VILORIA,A.; KLEMENT,G.

Accidental antiangiogenic drugs. Antioncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic
Eur J Cancer, 36: 1248-57 (2000)

KING,F.E.; KIDD, D.A.

A new synthesis of glutamine and of gamma dipeptides of glutamic acid from phthalylated intermediates
Journal Chemical Soc., 693: 3315-19 (1949)

KLAUSNER,J.D.; FREEDMAN, U.H.

Thalidomide as anti TNF alpha inhibitor: implications for clinical use
Clin.Immunol. Immunopathol., 818: 219-23 (1996)

KNABE, J.

Thalidomide an endless story
Pharm.Unsearer Zeit, 27: 66-7 (1998)

KNELLER,A.; RAANANI,P.

Therapy with Thalidomide in refractory multiple myeloma patients
Int.J. Dermatol., 39: 391-3 (2000)

KNOCHE, B.;BLASCHKE, G.

Investigations on the in vitro racemization of Thalidomide by high performance liquid chromatography
Journal of Chromatography, 666: 235-240 (1994)

KNOP,J.

Treatment of chronic discoid lupus erythematosus with Thalidomide
Arch Dermatol., 271: 165-70 (1981)

KNOP,J.; BONSMANN,G.; HAPPLE,R.

Thalidomide in the treatment of sixty cases of chronic discoid lupus erythematosus
Br J Dermatol., 108: 461-6 (1983)

KOCH, H.P.;

Thalidomide and congeners as antiinflammatory agentes
Prog.Med.Chem., 22: 165-242 (1985)

KOCH,M.; STEINACKER,C.

Loslichkeits und stabilitatsverbesserung von Thalidomid durch bildung von einschlussskomplexen mit cyclodextrinen
Arch.Pharm., 321: 371-373 (1988)

KRENN,M.; GAMOSIK,M.

Improvements in solubility and stability of Thalidomide upon complexation with hydroxypropyl beta cyclodextrin
Journal of Pharmac. Sciences, 81: 685-9 (1992)

KRUSE,F.E.; JOUSSEN, A.M.

Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor
Graefes Arch. Clin. Exp. Opth., 236: 461-6 (1998)

KURKCUOGLU,N.; ATAKAN,N

Thalidomide in the treatment of recurrent necrotic mucocutaneous aphthae
Br J Dermatol., 112: 632 (1985)

KYRIAKIS,KP.; KONTOCHRISTOROULOS,GL.; PANTELEOS,D

Experience with low dose Thalidomide therapy in chronic discoid lupus erythematosus
Int J Dermatol., 39: 218-222 (2000)

LAIR,G.; MARIE, I.

Langerhans histiocytosis in adults: cutaneous and mucous lesion regression after treatment with Thalidomide
Rev.Med.Interne, 19: 196-8 (1998)

LANGUILLON,J.

The effects of Thalidomide on leprosy reaction
Int J Leprosy, 39: 590-2 (1971)

LARLESIMO,M.; GIUSTINI,S.

Treatment of cutaneous and pulmonary sarcoidosis with thalidomide
J.Am.Acad.Dermatol., 32: 866-9 (1995)

LARSSON,H.

Treatment of severe colitis in Behcet syndrome with Thalidomide
J Intern Med., 228: 405-7 (1990)

LEE,J.B.; KLOBENZER,P.S.

Disfiguring cutaneous manifestation of sarcoidosis treated with Thalidomide
Journal Am.Acad.Dermatol., 39: 835-8 (1998)

LEFEBRE,C.; BRAZIER, H.

Treatment with Thalidomide
STP Pharma, 1: 300-22 (1985)

LEVIS,W.R.

Treatment of leprosy in the United States
Bull NY Acad Med., 60: 696-711 (1984)

LIPSON,A.M.

Thalidomide retrospective: what did the clinical teratologist learn?
Teratology, 46: 411-3 (1992)

LITTLE,RF.; WYVILL,KM

Activity of Thalidomide in AIDS related Kaposi sarcoma
J Clin Oncol., 18: 2593-260 (2000)

LIU, W.R.; LANGER, R.

Moiture induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state
Biotech. Bioeng., 37: 177-184 (1991)

LO,J.S.; BERG,R.E.; TOMECKI, K.J.

Treatment of discoid lupus erythematosus
Int J.Dermatol., 28: 497-507 (1989)

LONDONO,F.

Thalidomide in the treatment of actinic prurigo
Int J Dermatol., 12: 326-8 (1973)

LOPEZ DE LA TORRE,M.; TERCEDOR,J.

Uso de anticonceptivos hormonales en dermatología bases farmacológicas para su aplicación.
Piel, 12: 106-111 (1997)

LOPEZ GIL,JA

Talidomida y enfermedad injerto contra huesped: bases de una nueva indicación y efectos secundarios
Med.Clin. Barc., 99: 545-8 (1992)

LOPEZ,J.; ULIBARRENA,C.; GARCIA LARANA, J.

Thalidomide as therapy for intestinal chronic GVHD
Bone Marrow Transplantation, 11: 251-2 (1993)

LOPEZ-TALAVERA, J.C.; CADELINA, G.

Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha decrease nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic Hepatology, 23: 1616-21 (1996)

LOWELL, C.R.; HAWK, J.L.

Thalidomide in actinic prurigo
Br J Dermatol., 108: 467-71 (1983)

LUTKA, A.

Effect of cyclodextrin complexation on aqueous solubility and photostability of phenothiazine
Pharmazie, 55: 120-3 (2000)

LYON, A.; DURAN, G.; RAISYS, V.

Determination of Thalidomide by High Performance Liquid Chromatography: methodological strategy for clinical trials
Clinical Biochemistry, 28: 467-70 (1995)

MAKONKA WKEYONN, S.; LIMSON-POBRE, R.N.

Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1
Proc.Natl.Sci.USA, 90: 5974-8 (1993)

MANESIS, D.A.

Thalidomide: an alternative for treatment of aphthous ulcers
Step Perspect., 7: 16-7 (1995)

MARKOVICH, R.J.; EVANS, C.A.

Thalidomide
J. Pharm. Biomed. Analysis, 16: 661-73 (1997)

MARTIN ANDRES, A.; LUNA DEL CASTILLO, J.D.

Estadística descriptiva
Bioestadística para las ciencias de la salud, 4 Ed: 11-45 (1994)

MARTIN, J.

Determination of Thalidomide and its major metabolites by high performance liquid chromatography
Journal of Chromatography, 413: 181-7 (1987)

MASCARO, J.H.

Thalidomide in the treatment of recurrent necrotic and giant mucocutaneous aphthae and aphthosis
Arch Dermatol., 115: 636-7 (1979)

MATARASSO, S.; FORTUNATO, L.

Aphthosis
Minerva Stomatol., 34: 57-63 (1985)

MAURER, T.A.; PONCELET, A.

Thalidomide for the treatment of prurigo nodularis of HIV infected patients
Inf.Conf.AIDS, 11: 312 (1996)

Mc BRIDE, W.G.

Teratogenic action of Thalidomide
Lancet, 1: 1362 (1978)

Mc CARTHY, D.M.; KANFER, E.J.; BARRET, A.J.

Thalidomide for the therapy of graft versus host disease following allogenic bone marrow transplantation
Biomed.Pharmacoter., 43: 693-7 (1989)

Mc CREDIE, J.

Mechanism of the teratogenic effect of Thalidomide
Med.Hypotheses, 2: 63-9 (1976)

McCARTHY,DM.; KANFER,EJ; TAYLON,J.

Thalidomide for graft versus host disease
Lancet, 2: 1135 (1988)

McGINITY, J.W.; MAINCENT, P.; STEINFINE, H.

3rd Int. Conference on Pharm., 5: 211-7 (1983)

McHUGH, S.M.; RIFKIN, I.R.

The immunosuppressive drug Thalidomide induces T helper cell type 2 and concomitantly inhibits th 1 cytokine production.
Clin.Exp.Immunol., 99: 160-7 (1995)

MENI,S.; IMONDI,D.

Recurrent giant aphthous ulcers in a child protracted treatment with Thalidomide
Pediatr Dermatol., 10: 283-5 (1993)

MEYRING,M.; CHAUKUETADZE,B.; BLASCHKE,G.

Enantioseparation of Thalidomide and its hydroxylated metabolites using capillary electrophoresis with various cyclodextrins
Electrophoresis, 20: 2425-31 (2000)

MINCHINTON,A.I.; FRYER,K.H.

The effect of thalidomide on experimental tumors and metastases
Anticancer Drugs, 7: 339-43 (1996)

MISERY,L.; LARBRE,B

Remission of Langerhans cell histiocytosis with Thalidomide treatment
Clin Exp Dermatol., 18: 487 (1993)

MIYACHI,Y.

A possible mechanism of action of Thalidomide on rheumatoid arthritis
Arthritis Rheum., 28: 836 (1985)

MIYACHI,Y.

Antioxidant action of Thalidomide.
Acta Dermatol., 80: 219-23 (1985)

MOISSON,Y.F.; JAINER,M.; CIVATTE,J.

Thalidomide for recurrent erythema multiforme.
Br.J.Dermatol., 126: 92-3 (1992)

MONCADA, B.; BARANDA,M.L.

Thalidomide effect on T cell subsets as a possible mechanism of action.
Int J Lepr Other Mycobact Dis., 53: 201-5 (1985)

MOREIRA,A.L.; CORRAL, L.G.

Thalidomide and its analogs reduce HIV type 1 replication in human macrophages in vitro.
AIDS Res. Hum.Retroviruses, 13:857-63: (1997)

MOREIRA,A.L.; YE,W.; SKEN,Z.

Thalidomide reduces HIV 1 production in acutely infected human manocytes in vitro.
Conf.Retro.Coppportun.Infect., 3 111: (1996)

MORELLU,B.

Analyst, 108: 870-973 (1983)

MOULIN,G.; BONNET,F; BARRUT,D.

Traitment de la maladie de Jessner et Kanof par la Thalidomide.
Ann Dermatol Venereol., 110: 611-614 (1983)

MUNRO,CS.; COX,NH

Pyoderma gangrenosum associated with Behcet syndrome response to Thalidomide.
Clin Exp Dermatol., 13: 408-10 (1988)

NAAFS,B.; BAKKERS,E.

Thalidomide treatment of subacute cutaneous lupus erythematosus.
Br J Dermatol., 107: 83-6 (1982)

NAAFS,B.; FABER,WR

Thalidomide therapy.
Int J Dermatol., 24: 131-3 (1985)

NGUYEN,M.; TRAN,C.

Thalidomide and chemotherapy combination: preliminary results of preclinical and clinical studies.
Int.J.Oncol., 10: 965-9 (1997)

NICOLAUD,P.; WEST,TE

Thalidomide:treatment of severe recurrent aphthous stomatitis in patients with AIDS.
DICP Ann Pharmacother., 24: 1054-6 (1990)

NORZAWA, Y.; MIZUMOTO, T; HIGASHIDE, F.

Improving dissolution rates of practically insoluble drug phenytoin by roll mixing with polyvinyl pyrrolidone.
Pharm Acta. Helv., 60: 175-7 (1985)

OCHONISKY,S.; REVUZ,J.

Thalidomide use in dermatology.
Eur.J.Dermatol., 4: 9-15 (1994)

OCHONISKY,S.; VERROUST,J.

Incidencia de la neuropatía por Talidomida y hallazgos clínicos y electrofisiológicos en 42 pacientes.
Arch.Dermatol., 5: 128-31 (1994)

OLMOS SANZ,A.; GIMENEZ,R.

Lesión pioderma gangrenoso.
Piel, 13: 369 (1998)

OZKAN,Y.; ATAY,T.; DIKMEN,N.

Improvement of water solubility and in vitro dissolution rate of glicazide by complexation with betacyclodextrin.
Pharm.Acta.Helv., 74: 365-70 (2000)

PARIKH,D.A.; GANAPATI,R.

Thalidomide in leprosy study of 94 cases.
Indian J.Lepros., 58: 560-6 (1986)

PARKER,P.M.; CHAO,N.

Thalidomide as salvage therapy for CGVHD.
Blood, 86: 3604-9 (1995)

PARKHIE, M; WEBB, M.

Embryotoxicity and teratogenicity of Thalidomide in rats.
Teratology, 27:327-32 (1983)

PATERSON,D.L.; GEORGHIOU,P.R.

Thalidomide as treatment of refractory aphthous ulceration related to human immunodeficiency virus infection.
Clin.Infec.Dis., 20: 250-4 (1995)

PATT,YZ.; HASSAN,HM

Durable clinical response of refractory hepatocellular carcinoma to orally administered Thalidomide.
Am J Clinic Oncol., 23: 319-21 (2000)

PEARSON,J.; VEDAGIRI,M.

Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with Thalidomide.
Lepr Rev. ,40: 111-6 (1969)

PEYRON,JL; HEYNADIER.J.

The pharmacological basis for the treatment of photodermatoses.
Biochimie, 68: 899-904 (1986)

PFALTZGRAFF,R.E.

The management of reaction in leprosy.
Int J Leprosy ,57: 103-9 (1989)

PHARM-HUY,C.; GALONS,H.

In vitro and in vivo immunosupresant effect of Thalidomide.
Int.J.Immunol Pharmacol., 19: 289-96 (1997)

PHILLIPS,P.H.; PLUDA, J.M.

Clinical trials referral resource. Clinical trial using thalidomide.
Oncology, 10: 1498,150 (1996)

PIEL,G.; EVRARD, B.

Development of miconazole by the use of cyclodextrins.
Int.Journal of Pharmaceutics, 169: 15-22 (1998)

PIKAL, M.J.; DELLERMAN, K.M.

The effects of formulation variables on the stability of frize-dried human growth hormone.
Pharm. Research, 8:427-36 (1991)

PINQUIER,L.; REVUZ,J.

Traitement de la aphtose buccale recidivante.
Ann Dermatol Venereol., 114: 751-7 (1987)

PLAYFAIR

Effect of Thalidomide on skin graft survival.
Lancet, 1: 1003-4 (1964)

POSTEMA,P.T.; DEN HAAM, P.

Treatment of colitis in Behcet's disease with Thalidomide.
Eur.J.Gastroenterol Hepatol., 8: 929-31 (1996)

POWELL,R.J.; ALLEN,B.R.

Investigation and treatment of orogenital ulceration : studies on a possible mode of action of Thalidomide.
Br.J.Dermatol., 113: 141-4 (1985)

PRIGENT,F.; OUAZZANI,W,

Cutanwous sarcoidosis treatment with Thalidomide.
Press Med, 12: 3007 (1983)

PROENCA, N.G.

Thalidomide an eclectic medication in dermatology.
Rev.Paul. Med., 107: 41-6 (1989)

RADEFF,B.; KUFFER,R.

Recurrent aphthosus ulcer in patients infected with human immunodeficiency virus: successful treatment with Thalidomide
J Am Acad Dermatol., 23: 523-5 (1990)

RAMIREZ, V.; ESQUIVEL,L.; PONCE DE LEON,S.

Thalidomide as therapy for HIV related oral ulcers.
Clin Infect Dis., 28: 892-4 (1999)

RAMSELAAR,CG.; BOONE,RM

Thalidomide in the treatment of neuro Behcet syndrome.
Br J Dermatol., 115: 367-70 (1986)

RANDALL,T.

Research focuses on immunosuppressive effect, unknown teratogenic mechanism of Thalidomide
JAMA, 263: 1473 (1990)

RANDALL,T.

Thalidomide's back in the news but in more favorable circumstances.
JAMA, 263: 1467-8 (1990)

RANSELAAR, C.G.;BOONE, R.M.

Thalidomide in the treatment of neuro-Behcet's syndrome.
Br.J.Dermatol., 115: 367-70 (1986)

RAVOT,E.; LISZIEWICZ,J.

New uses for old drugs in HIV infection: the role of hydroxyurea cyclosporin and Thalidomide.
Drugs, 58: 953-63 (1999)

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Disgregación de comprimidos y cápsulas: 131-2 (1997)

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Ensayo de determinación de peso de comprimidos: 136 (1997)

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Ensayo de disolución para formas orales sólidas: 132-5 (1997)

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Espectrometría de resonancia magnética nuclear: 38 (1997)

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

Resistencia de los comprimidos a la rotura: 140 (1997)

REEPMEYER,J.C.

Separation of R and S Thalidomide by reversed phase HPLC with beta-cyclodextrin in the mobile phase.
Chirality, 8: 11-7 (1996)

REEPMEYER,J.C.;COX, D.C.

Liquid Chromatographic determination of Thalidomide in tablets, capsules and raw materials.
JADAC International, 80: 767-773 (1997)

REVUZ, J.

Actualite du Thalidomide.
Ann.Dermatol Venereol., 117: 313-321 (1990)

REVUZ,J.;GUILLAUME,JC.

Crossover study of Thalidomide vs placebo in severe recurrent aphthous stomatitis.
Arch Dermatol., 126: 923-7 (1990)

REYES-TERAN,G.; SIERRA-MADERO,J.G.

Effects of thalidomide on HIV associated wasting syndrome. A randomized double blind placebo controlled clinical trial
AIDS, 10: 1501-7 (1996)

RIBEIRO,RA.; VALE,ML.

Analgesic effect of Thalidomide on inflammatory pain.
Eur J Pharmacol., 391: 97-103 (2000)

RINGDEN,O.; ASCHEN,J.; WESTEBERG,L.

Thalidomide for severe acute graft versus host disease.
Lancet, 2: 568 (1988)

RODRIGUEZ,QG

Thalidomide promising new treatment for rheumatoid arthritis.
Arthritis Reumatol., 27: 1118-21 (1984)

ROUSSEAU, L.;BEYLOT-BARRY, M.

Cutaneous sarcoidosis successfully treated with low doses of Thalidomide.
Arch Dermatol., 134: 1045-6 (1998)

RUSTIN,M.H.; GILKE,S.

Pyoderma gangrenosum associated with Behcet's disease.
J.Am.Acad.Dermatol., 23: 941-4 (1990)

RYAN,J

Thalidomide treatment of oesophageal ulceration.
GUT, 47: 156 (2000)

RYAN,J.; COLMAN,J.; PEDERSON,J.

Thalidomide to treat esophageal ulcer in AIDS.
N Engl Journal Med., 327: 208-9 (1992)

SALAFIA,A.; KHARKAR,RD

Thalidomide and exfoliative dermatitis.
Int J Leprosy, 56: 625 (1988)

SALAMA, H.A.; AMMAR, H.O.

On the dissolution of chlorothiazide powders and solid dispersions.
Pharm. Ind., 43 :1242-5 (1981)

SAMPAIO

Tratamento de reacao leprótica pela Talidomida.
Rev Paul Med., 68: 301 (1966)

SAMPAIO,E.P.; SARNO,E.N.

Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes.
J.Exp.Med., 173: 699-703 (1991)

SAMSON,J.; KUFFER,R.

Thalidomide the treatment of choice in aphthae in HIV infection.
Presse Med., 19 :722 (1990)

SANBERG, B.H.

Determination of Thalidomide in biological samples by gaseous chromatography.
Anal. Biochem., 8:129 (1969)

SANCHEZ,M.; FRUTOS,G.; CUESTA,PL

Análisis de la varianza.
Estadística y matemática , 323-357 (1996)

SANCHEZ-BURSON,J.; LARRAONA,J.L.

Thalidomide in the treatment of entero-Behcet.
Rev.Esp.Reumatol., 21: 236-8 (1994)

SANTIS,HR

Aphthous stomatitis and its management.
Curr. Opin. Dent., 1: 763-8 (1991)

SARMA,P.; MAJID,U

Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloride from hydroxypropyl methylcellulose matrices.
Pharm. Research, 10 (1993)

SAUL, A.

Polymorphous light eruption. Treatment with Thalidomide.
Aust.Journal of Dermatology, 17: 17 (1976)

SAURAT,JH.; CAMENZIND,M.; HELG,C.

Thalidomide for graft versus host disease after bone marrow transplantation.
Lancet, 1: 359 (1988)

SAURAT;J.H.

Grande aphthose juvenile controlee por la Thalidomide.
Arch Dermatol., 118: 536 (1982)

SAURER,M.; GUNTHER,J.

Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals.
Am.J.Pathol., 156: 151-8 (2000)

SAYLAN, T.; SALTİK, Y.

Thalidomide in the syndrom of Behcet´s synthome.
Arch Dermatol., 118.: 536 (1982)

SCOLARI

La Thalidomide dans le traitement dus lupus erythemateux chronique.
Dermatologica, 165: 355-62 (1982)

SCRIP

Thalidomide, 1933: 30 (1994)

SCHNITZLER,L.

Beneficial effect of Thalidomide in a case of Hailey Hailey pemphigus.
Ann.Dermatol Venereol., 111: 285-6 (1984)

SCHUMACHER,H.; BLAKE,D.; GUILLETTE,JR

Disposition of Thalidomide in rabbits and rats.
J. Pharmacol. Exp Ther., 160: 210-11 (1968)

SCHUMACHER,H.; SMITH,R.L.; WILLIAMS,R.T.

The metabolism of Thalidomide, the spontaneous hydrolysis of Thalidomide in solution.
British J. Med., 25: 324-37 (1965)

SCHUMACHER,H.; WILSON,J.

Thalidomide disposition in rhesus momkey and studies of its hydrolysis in tissue of this and other species.
Pharmacol Exp Ther., 173: 265-9 (1970)

SCHWINGHAMMER,TL

Role of immunosuppressants in the treatment and prevention of GVHD.
ASHP , 26: 92 (1991)

SEKIGUCHI,K.; OBI,N.

Chem.Pharm.Bull., 9: 866-72 (1961)

SHANNON, E.; ASEFFA, A.

Thalidomide´s ability to augment the synthesis of IL-2 in vitro in HIV infected patients.
Inmunopharmacology, 46: 175-9 (2000)

SHANNON,EJ.; MIRANDA,RO.; MIRALES,MJ.

Inhibition of de novo IgM antibody synthesis by Thalidomide as a relevant mechanism of action in leprosy
Scand J Immunol., 13: 553 (1981)

SHARP, M.; GETTY,J.

Thalidomide associated weight gain in HIV-1
Int.Conf.AIDS, 11: 20 (1996)

SHARPSTONE, D.; ROWBOTTON,A.

Thalidomide: a novel therapy for microsporidiosis
Gastroenterology, 112: 1823-9 (1997)

SHARPSTONE,D.; ROWBOTTOM,A.

The treatment of microsporidial diarrhoea with thalidomide
AIDS, 9: 658-9 (1995)

SHELLARD,EJ.; OSISIOGU,JV.

Lab Practica , 13: 516 (1964)

SHESKIN

Zur therapie de prurigo nodularis Hyde mit Thalidomide
Hautarzt, 26: 215-8 (1975)

SHESKIN,J.

Thalidomide in the treatment of lepra reactions
Clin Pharmacol Ther., 6: 303-6 (1965)

SHESKIN,J.; CONVIT, J

Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction
Int J leprosy, 37: 135-46 (1969)

SHESKIN,J.; SAGHER,F.

Five years experience with Thalidomide treatment in leprosy reaction
Int J Leprosy, 39: 585-8 (1971)

SIMONELLI,A.P.; MEHTA,S.C.; HIGUCHI,W.I.

Factors affecting the dissolution of ketoprofen from solid dispersiones in varios water soluble polymers
J.Pharm.Sci., 58: 538-49 (1969)

SIRE, S.; FRAISSE,P.; REY,D.

Efficacy of thalidomide in the treatment of esophageal ulcers in HIV patients
Gastroenterol.Clin.Biol., 19: 128-9 (1995)

SMITH,D.

Thalidomide and HIV: several possible uses
AIDS Treat.News, 221: 1-4 (1995)

SMITH,R.L.; FABRO, S.

Studies on the relationship between the chemical structure and embriotoxic activity of Thalidomide and related compounds
Symposium on embriopathic , 194-209 (1965)

SOLER,R.A.; MIGLIORATI,C.

Thalidomide treatment of mucosal ulcerations in HIV patients
Arch.Dis.Chil., 74: 64-5 (1996)

SOTO DE DELAS,J.; LEACHE,A.

Talidomida: nuevas utilidades en dermatologia
Rev Med Univ Navarra, 32: 159-61 (1988)

STAUCHANSKY, S.; GOWAN, W.

3eme Congrese Int. De , 5: (1983)

STEPHENS, T.D.

Proposed mechanisms of action in Thalidomide embryopathy
Teratology, 38: 229-39 (1988)

STEPHENS, T.D.; BUNDE, C.J.; FILLMORE, B.J.

Mechanism of action in Thalidomide teratogenesis
Biochem Pharmacol., 59: 1489-99 (2000)

STEVENS, R.J.

The place of thalidomide in the treatment of inflammatory disease
Lupus, 5: 257-8 (1996)

STEVENS, R.J.; ANDUYAR, C.

Thalidomide in the treatment of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus
Br.J.Rheumatol., 36: 353-9 (1997)

STIRLING, D.

Potencial use of thalidomide in HIV AIDS
Annv.Rep.Med.Chem., 30: 319-27 (1995)

STRAZZI, S.; LEBBE, C.

Aphthosis ulcers in HIV infected patients: treatment with Thalidomide
Genitourin Med., 68: 424-5 (1992)

SUYE, M.; MORAGA, F.; CABAYAS, M.

Talidomida: el ressorgiment d'un farmac
Pediatría catalana, 56: 334-5 (1999)

SUZUKI, H.; SUNADA, H.

Chemical and Pharm. Bulletin, 45: 1688-93 (1997)

TAKAYAMA, K.; NAMBU, N.; NAGAI, T.

Chem. Pharm. Bull., 30: 3013-6 (1982)

TASIC, J.; JOVANOVIĆ, M.; DJURIC, Z.

The influence of beta cyclodextrin on the solubility and dissolution rate of paracetamol solid dispersion
J.Pharm.Pharmacol, 44: 52-5 (1992)

TAVARES, J.L.; WANGOO, A.

Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages
Respir.Med., 91: 31-9 (1997)

TAYLOR, L.S.; ZOGRAFI, G.

Pharmaceutical research
Pharm. Research, 14: 1691-8 (1997)

TEO, S.K.; COLBURN, W.A.; THOMAS, S.D.

Celgene corporation, Warren, New Jersey 07059 USA
J Clin Pharmacol, 39: 1162-8 (1999)

TEO, S.K.; SABOURIN, P.J.; O'BRIEN, K.

Metabolism of Thalidomide in human microsomes, cloned human cytochrome P-450 isozymes and Hansen's disease patients
J.Biochem.Mol.Toxicol, 14: 140-7 (2000)

TERCEDOR, J.; ORTEGO, N.

Treatment of recurrent aphthae with Thalidomide in patients with acquired immunodeficiency syndrome
Med Clin Barc, 97: 79 (1991)

THE MERCK INDEX

Thalidomide
8 Ed:1031

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Thalidomide
E.Stahl 2 Ed: 538-40

THOMAS,L.; DUCROS,B.

Successful treatment of adults Langerhans cell histiocytosis with Thalidomide
Arch Dermatol, 129: 1261-4 (1993)

TIAN-LING,C.; GEORGIA,B.

Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of Thalidomide after oral dosing in healthy male volunteers
Drug Metabolism , 17: 160 (1989)

TORRADO,G.; FRAILE,S.; TORRADO,S.; TORRADO,S.

Process induced crystallite size and dissolution changes elucidated by a variety of analytical methods.
Int Journal of Pharmaceutics, 166: 55-63 (1998)

TORRADO,S.; TORRADO,S; CADORNIGA,R.

Comparison of assay methods by second derivative spectroscopy, colorimetry and fluorescence spectroscopy of salicylic
Journal of Pharm. And biomed. , 12: 383-7 (1994)

TORRADO,S.; TORRADO,S; TORRADO, J.J.; CADÓRNIGA, R

Formulation parameters of albendazole solution
Int. Journal of Pharmaceutics, 140: 247-50 (1996)

TORRAS,H.

La Talidomida en el tratamiento de la aftosis y enfermedad de Behcet
Med Cut Iber Am., 10: 103-112 (1982)

TORRAS,H.; LECHA,M.; MASCARO,J.H.

Thalidomide treatment of recurrent necrotic giant mucocutaneous aphthae and aphthosis
Arch Dermatol, 118: 875 (1982)

TOSHIYA, K.; YUKIYO,A.

Oral absorption improvement of poorly soluble drug using solid dispersion technique
Chem.Pharm.Bull., 44: 568-571 (1996)

TOWNSED, M.W.; DE LUCA, P.P.

Use of lyoprotectants in the freeze drying of a model protein, ribonuclease
A.J. Parent. Sci. Tech., 42: 190-8 (1988)

TRAMONTANA,J.M.; UTAIPAT,U.

Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary
Mol.Med., 1: 384-97 (1995)

TSUIMIN,T.; JEN-SEN,W.

Modification of physical characteristics of microcrystalline cellulose by codrying with beta-cyclodextrins.
Journal of Pharm.Sci., 87: 117-122 (1998)

TSUJI,Y.

Pharmacological and Pharmaceutical properties of freeze-dried formulation of eggs albumin, several drugs and olive oil.
Biolog. Pharm. Bull., 19 :636-40 (1996)

TSUJI, Y.; KAKEGAWA, H.

Pharmacological and pharmaceutical properties of freeze-dried formulations of egg albumin, indomethacin, olive oil or fatty

Biolo.Pharm.Bull., 16: 675-8 (1993)

UEKAMA, K.

Cyclodextrins in drug carrier systems

Critical Rev Ther Drug Carrier, 3:1-41 (1996)

USUDA, M.; ENDO, T.; NAGASE, H.; TOMOMO, K.

Interaction of antimalarial agent artemisinin with cyclodextrins

Drug Dev Ind Pharm., 26: 613-9 (2000)

VAISMAN, B.

Mechanism of teratogenic action of Thalidomide

Teratology, 53: 283-4 (1996)

VAN DEN BROEK, H.

Treatment of prurigo nodularis with Thalidomide

Arch Dermatol, 116: 571-2 (1980)

VARGAS

Current treatment of the lepra reaction with Thalidomide

Dermatol, 15: 142-154 (1971)

VELOSO, V.G.; GRINSZTEJN, B.

Thalidomide for AIDS patients with tuberculosis

Int.Conf.AIDS, 11: 303 (1996)

VENENCIE, P.Y.; SAURAT, J.H.

Pyoderma gangrenosum in child treated with thalidomide

Ann.Pediatr., 29: 67-9 (1982)

VERBERKMOES, A.; BOER, K.

Thalidomide for genital ulcer in HIV-positive woman

LANCET, 347: 974 (1996)

VIANNA, R.; BENTLEY, V.; RIBEIRO, G.

Formation of cyclodextrins complexes with corticosteroids: their characterization and stability

Int.Journal of Pharmaceutics, 167: 205-213 (1998)

VILA JATO, J.L.; BLANCO MÉNDEZ, J.

5th Int. Conference, 5: 122-9 (1989)

VOGELSANG, GB

Thalidomide neuropathy (letter)

J med., 327: 735 (1992)

VOGELSANG, GB.; FARMER, ER.; HESS, AD.

Thalidomide for the treatment of chronic graft versus host disease

N.Engl.J.Med., 326: 1055-8 (1992)

VOGELSANG, GB.; GORDON, G.

Immunosuppressive activity of thalidomide

Fed.Proc., 44: (1985)

VOGELSANG, GB.; HESS, A.D.

Thalidomide induction of bone marrow transplantation tolerance

Transplant Proc., 19: 2658-61 (1987)

VOGELSANG,GB.; HESS,AD.; GORDON,G.

Treatment and prevention of acute graft versus host disease with Thalidomide in a rat model Transplantation, 41: 644-7 (1986)

VOGELSANG,GB.; SANTOS,GW.; COLVIN,OM.

Thalidomide for graft versus host disease Lancet, 1: 827 (1988)

VOGELSANG,GB.; WELLS,MC

Combination low dose Thalidomide and cyclosporine prophylaxis for acute graft versus host disease in a rat mismatched Transplant.Proc., 20: 226-8 (1988)

VOLKIN, D.B.; KRIBANOV, A.M.

Thermal Destruction Processes in proteins involving cystine residues J. Biolog. Chem., 262: 2945-50 (1987)

VOSGERAR,J.C.

Autoimmunity in human immunodeficiency virus infection and the use of thalidomide PANMINERVA MED, 34: 1-4 (1994)

WANG,Z.; HORIKAWA,T.

Design and in vitro evaluation of a modified release oral dosage form of Nifedipine by hybridization of hydroxypropyl beta J.Pharm Pharmacol., 45: 942-6 (1993)

WATERS,M.F.

An internally controlled double blind trial of Thalidomide in severe erythema nodosum leprosum Lepr Rev., 42: 26-42 (1971)

WATERS,M.F.

Use of Thalidomide in leprosy Br Med J, 303: 470 (1991)

WECHSLER,B.; LE-THI-HUONG,DU.

Medical treatment of Behcet disease J Mal Vasc., 13: 262-9 (1988)

WEIDLE,P.J.

Thalidomide for aphthous ulcers in patients infected with the HIV virus Am.J.Health Syst.Pharm., 53: 368,71,78 (1996)

WEINZ,C.; BLASCHE,G.

Investigation of the in vitro biotransformation and simultaneous enantioselective separation of Thalidomide and its neutral Journal Chrom.B.Biomed Appl., 674: 287-92 (1995)

WILLIAMS,A.T.; SCHUMACHER,H.

The chemistry and metabolism of Thalidomide Symposium on embryopathic, 167-82 (1965)

WINKEMANN,RK.; CONNOLLY,SM.; DYLE, JA

Thalidomide treatment of prurigo nodularis Acta Derm Venereol., 64: 412-7 (1984)

WINTER,W.;FRANKUS,E.

Thalidomide enantiomers Lancet, 339: 365 (1992)

WNENDT,S.; ZWINGENBERGER,K.

Thalidomide's chirality Nature, 385: 303-4 (1997)

WOOD,PM.; PROCTOR,SJ

The potential use of Thalidomide in the therapy of graft versus host diseaseq
Leukemia Res., 14: 395-9 (1990)

YOULE,M.; CLARBOUR,J.; FARTHING,C.

Treatment of resistant aphthosus ulceration with Thalidomide in patients positive of HIV antibody
BMJ, 298: 432 (1989)

YOULE,M.; HAWKINS,S.; GAZZARD,B

Thalidomide in hyperalgic pharyngeal ulceration of AIDS
Lancet, 335: 1591 (1990)

YOUNG GON BAIK, HEE JOON YU

Thalidomide therapy on prurigo nodularis
Ann Dermatol., 5: 117-20 (1993)

ZHU,J.; BAI,X.

Thalidomide suppresses T and B cell responses to myelin antigen in experimental allergic neuritis
Clin.Neuropharmacol., 20: 152-64 (1997)

ZOMAS,A.; ANAGNOSTOPOULOS,N.

Successful treatment of multiple myeloma relapsing after high dose therapy and autologous transplantation with Thalidomide
Bone Marrow Transplant, 25: 1319-20 (2000)

ZUO,Z. KWOU,G.; STEVENSON,B

Flutamide hydroxypropyl betacyclodextrin complex
J Pharm Sci., 3: 220-7 (2000)

ZWINGENBERGER,K.; WNENDT,S.

Inmunomodulation by thalidomide: systemic review of the literature and unpublished observations
J.Inflamm., 46: 177-211 (1995)