



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Aportación al estudio de nanopartículas de fármacos con actividad analgésica/anestésica

Xavier García Sala



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.

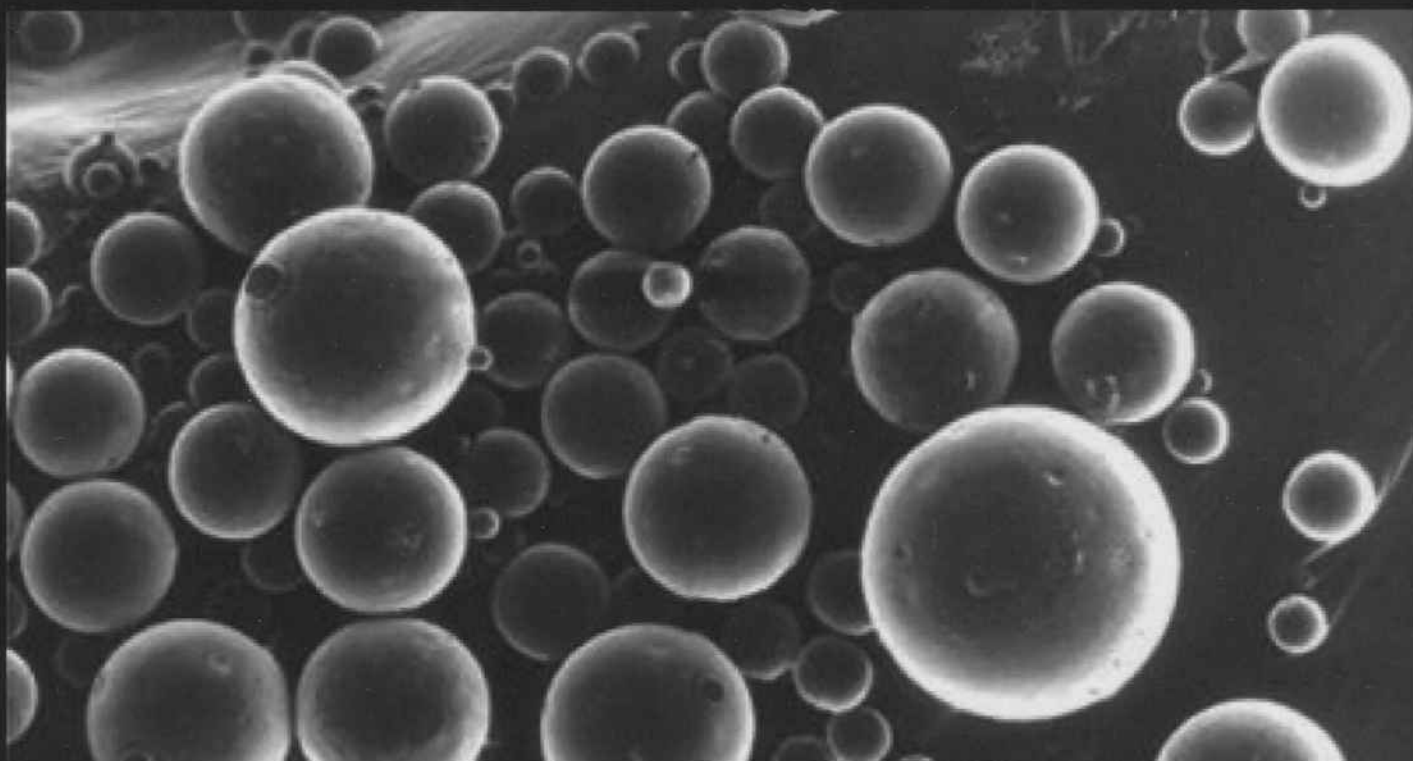
Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.

# **Tesis Doctoral**

**Departamento Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Unidad Biofarmacia y Farmacocinética  
Facultad de Farmacia. UB**

**Bienni 2003-2005**



## **Aportación al estudio de nanopartículas de fármacos con actividad analgésica/anestésica**

**Xavier Garcia Sala**

**Directores de tesis:  
Elvira Escribano Ferrer  
Josep Doménech Berrozpe**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Departamento Farmacia y Tecnología Farmaceutica  
Unidad Biofarmacia y Farmacocinética  
Facultad de Farmacia. UB

Memoria presentada por Xavier Garcia Sala. Licenciado en Farmacia por la Universidad de Barcelona.

Xavier Garcia Sala

ELVIRA ESCRIBANO FERRER, Profesora Titular de la Unidad Biofarmacia y Farmacocinética, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica de la Universidad de Barcelona, y JOSÉ DOMÉNECH BERROZPE, catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética de la Universidad de Barcelona, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica de la Universidad de Barcelona.

En calidad de directores de la Tesis con título “Aportación al estudio de nanopartículas de fármacos con actividad analgésica/anestésica” realizada por el Licenciado Xavier Garcia Sala, consideran finalizado el trabajo y autorizan su presentación a fin que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Barcelona, a 20 de Enero de 2011.

E. Escibano

Fdo.: Elvira Escibano Ferrer

Fdo.: José Doménech Berrozpe

Als meus pares, al meu germà i a les meves princeses (P.C. i P.I.)



## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>FARMACOLOGÍA DEL DOLOR</b> .....	<b>7</b>
1.1.1	<i>Dolor fisiológico o nociceptivo</i> .....	7
1.1.1.1	<i>Tratamiento farmacológico del dolor nociceptivo</i> .....	8
1.1.1.2	<i>Modelos experimentales para el estudio del dolor nociceptivo</i> .....	9
1.1.2	<i>Dolor patológico: el dolor neuropático</i> .....	10
1.1.2.1	<i>Tratamiento farmacológico del dolor neuropático</i> .....	10
1.1.2.2	<i>Modelos experimentales para el estudio del dolor neuropático</i> .....	13
<b>1.2</b>	<b>ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS COMO ANALGÉSICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>NANOPARTÍCULAS</b> .....	<b>16</b>
1.3.1	<i>Polímeros</i> .....	18
1.3.2	<i>Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas</i> .....	20
1.3.3	<i>Caracterización de las nanopartículas poliméricas</i> .....	23
1.3.4	<i>Estudios de liberación</i> .....	24
1.3.5	<i>Aplicaciones en el campo médico/farmacéutico</i> .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>ANALGESIC AND ANTIALLODYNIC EFFECTS OF ANTIDEPRESSANTS AFTER INFILTRATION INTO THE RAT</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>IN VITRO CHARACTERIZATION AND IN VIVO ANALGESIC AND ANTI-ALLODYNIC ACTIVITY OF PLGA-BUPIVACAINE NANOPARTICLES</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS-LOADED BIODEGRADABLE PLGA NANOPARTICLES: IN VITRO CHARACTERIZATION AND IN VIVO ANALGESIC AND ANTI-ALLODYNIC EFFECT</b> .....	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Actividad analgésica de los antidepresivos tricíclicos (ADTs) en solución</b> .....	<b>69</b>
4.1.1	<i>Efecto antinociceptivo</i> .....	69
4.1.2	<i>Efecto antialodínico</i> .....	70
<b>4.2</b>	<b>Bupivacaína en nanopartículas</b> .....	<b>72</b>
4.2.1	<i>Obtención, caracterización y estudio de liberación de la bupivacaína en nanopartículas</i> .....	72
4.2.2	<i>Actividad antinociceptiva y antialodínica de las nanopartículas de bupivacaína</i> .....	73
<b>4.3</b>	<b>Antidepresivos tricíclicos en nanopartículas</b> .....	<b>75</b>
4.3.1	<i>Obtención y caracterización de las nanopartículas de ADTs</i> .....	75
4.3.2	<i>Estudios de liberación de las nanopartículas de ADTs</i> .....	75
4.3.3	<i>Actividad antinociceptiva y antialodínica de las nanopartículas de ADTs</i> .....	77
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>ÁNEXO: VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>7.1</b>	<b>Condiciones cromatográficas</b> .....	<b>87</b>
<b>7.2</b>	<b>Linealidad</b> .....	<b>87</b>
<b>7.3</b>	<b>Exactitud y precisión</b> .....	<b>88</b>
<b>7.4</b>	<b>Límites de detección y cuantificación</b> .....	<b>90</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Cuando se llevan a cabo tratamientos farmacológicos para curar o paliar alteraciones patológicas en el organismo, es necesario que el fármaco administrado acceda a la biofase o lugar de acción. La rapidez con la que el fármaco accede a la zona anatómica objeto de tratamiento depende, mayoritariamente, de la vía de administración; pero la duración de la acción del principio activo está condicionada por la formulación empleada en el tratamiento. Por eso, en la actualidad, en el campo de la tecnología farmacéutica tiene una gran importancia el diseño de nuevas formulaciones que, por una parte, aumenten el rendimiento terapéutico del fármaco ampliando el tiempo de permanencia del mismo en la biofase y, por otra, espacien las pautas de administración con lo que se minimizan los efectos secundarios del fármaco y se consigue una mayor anuencia por parte del paciente. Las formas farmacéuticas de liberación modificada cumplen las consideraciones expuestas anteriormente y, dentro de este ámbito de investigación, los fármacos formulados en nanopartículas constituyen en la actualidad una de las formulaciones más consideradas y estudiadas.

Los analgésicos son, sin duda, unos de los fármacos más ampliamente utilizados por la población. El dolor puede venir producido por diversas alteraciones orgánicas y su tratamiento constituye un importante campo de investigación debido a las consecuencias implícitas que tiene sobre el paciente. En este contexto, los analgésicos formulados en formas farmacéuticas de liberación modificada son objeto, en muchos casos preferente, de la investigación biofarmacéutica.

El trabajo expuesto en la presente Memoria tiene como base la elucidación del efecto sobre el dolor de distintos fármacos con actividad analgésica y el desarrollo de formulaciones de estos fármacos en nanopartículas, estudiando su caracterización y la velocidad de liberación de los principios activos nanoencapsulados a fin de obtener información acerca del diseño óptimo de este tipo de formas farmacéuticas.

### 1.1 FARMACOLOGÍA DEL DOLOR

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial. La función fisiológica del dolor es señalar al sistema nervioso que una zona del organismo está expuesta a una situación que puede provocar una lesión. Esta señal de alarma desencadena una serie de procesos y mecanismos cuyo objetivo es evitar o limitar los daños y hacer frente al estrés (Florez, 2007). Se puede dividir en dos categorías: dolor fisiológico o patológico.

#### 1.1.1 *Dolor fisiológico o nociceptivo*

El dolor fisiológico está producido por un estímulo lesivo que suele acabar cuando el estímulo desaparece. Se habla de *dolor somático* cuando los receptores están en la piel, músculos o articulaciones. En cambio, el *dolor visceral* se da cuando los receptores se encuentran en las vísceras y se caracteriza por una sensación más difusa y profunda. En ambos casos, la conducción se realiza a través de dos vías de transmisión, una rápida formada por fibras mielinizadas A $\delta$  y otra lenta formada por fibras C no mielinizadas. También cabe considerar el *dolor inflamatorio* que aparece cuando hay una lesión tisular y el organismo protege esta lesión promoviendo su reparación mediante una respuesta inflamatoria.

Cuando se produce una lesión o traumatismo, se desencadenan una serie de sucesos como liberación de potasio, liberación de bradiquinina hacia el plasma, o de prostaglandinas en la región del tejido dañado (mediante las ciclooxigenasas -COX-) que, a la vez aumentan la sensibilidad del terminal nervioso a la bradiquinina y otras sustancias productoras del dolor o algógenas. Las sustancias algógenas inducen la activación de los terminales nociceptivos aferentes, produciendo potenciales de acción que se propagan hacia el sistema nervioso central a través de la médula espinal. Estos potenciales de acción se transmiten en sentido inverso e invaden además otras ramas nerviosas colaterales donde estimulan la liberación de neuropéptidos, como la sustancia P, que está asociada con un aumento en la permeabilidad vascular y ocasiona una liberación marcada de bradiquinina, y aumento en la producción de histamina (desde los mastocitos) y de serotonina (desde las plaquetas). Tanto la histamina como la serotonina son potentes activadores de los nociceptores (Julius and Basbaum, 2001).

#### 1.1.1.1 Tratamiento farmacológico del dolor nociceptivo

Un analgésico es un medicamento que calma o elimina el dolor. Aunque se puede usar el término para cualquier sustancia o mecanismo que reduzca el dolor, generalmente se refiere a un conjunto de fármacos, de familias químicas diferentes que calman o eliminan el dolor por diferentes mecanismos.

El tratamiento estándar está basado principalmente en la administración de antiinflamatorios no esteroideos, los cuales se pueden clasificar en:

-inhibidores no selectivos de la COX-1 y COX-2:

- salicilatos*: ácido acetilsalicílico, trifusal, etc.
- paraminofenoles*: paracetamol y derivados
- pirazolonas*: metamizol, dipirona, etc.
- ácidos propiónicos*: ibuprofeno y análogos
- ácidos acéticos*: diclofenaco y análogos
- derivados indolacéticos*: indometacina, sulindac, etc.
- oxicames*: piroxicam, tenoxicam, etc.

-inhibidores selectivos de la COX-2 ó *coxibs*: celecoxib, etoricoxib, etc.

Sus principales acciones farmacológicas son:

- (a) analgésica (frente a dolores de intensidad leve a moderada por mecanismo periférico y central);
- (b) antipirética (disminuyen la fiebre causada por pirógenos pero no causan hipotermia);
- (c) antiinflamatoria (variable de unos fármacos a otros, pero se requieren dosis más altas que para los efectos anteriores), y
- (d) antiagregante plaquetaria (efecto máximo con ácido acetilsalicílico y derivados).

Estas acciones farmacológicas se explican por la inhibición de la ciclooxigenasa, enzima que convierte el ácido araquidónico de las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables que se transforman en prostaglandinas y tromboxanos, sustancias importantes en los mecanismos patogénicos de inflamación.

Aunque la mayoría de los componentes de este grupo comparten las tres acciones, su eficacia relativa para cada una de ellas puede ser diferente, al igual que su toxicidad. Su uso clínico va a depender pues, tanto de su eficacia como de su toxicidad relativa. Estos fármacos alivian o suprimen dolores de localización, naturaleza e intensidad diversas, tanto agudos como crónicos, o mejoran procesos inflamatorios de variada etiología. La inmensa mayoría de las molestias y dolores en nuestra vida cotidiana son asequibles a estos fármacos: mialgias, artralgias, cefalalgias, neuralgias, etc. Sin embargo, en general siempre resulta más fácil controlar un dolor en sus fases iniciales que cuando está fuertemente establecido (Florez, 2007).

### 1.1.1.2 Modelos experimentales para el estudio del dolor nociceptivo

El dolor en los animales puede ser estimado solamente por el examen de sus reacciones, pero al mismo tiempo la existencia de una reacción no significa necesariamente que exista una sensación concomitante. Un estímulo nocivo puede ser definido por su naturaleza física, su lugar de aplicación y por lo que ha ocurrido previamente en esa zona del tejido. Se ha empleado la estimulación eléctrica por cortocircuitos para producir el proceso de transducción en las terminaciones nerviosas libres y en otros sitios no específicos, lo cual tiene como ventaja la posibilidad de una aplicación brusca y breve, y de este modo lograr que los resultados sean señales sincronizadas de las fibras nerviosas primarias aferentes pertinentes para diferenciarlas de las fibras A $\delta$  y C. El calor estimula selectivamente los termorreceptores y nociceptores, pero la baja potencia calorífica de los estímulos convencionales restringen su utilidad. Las fuentes radiantes tienen el inconveniente de emitir ondas en el espectro visible e infrarrojo para los cuales la piel es un pobre absorbente y un buen reflector. La desventaja que tienen los dispositivos térmicos es que activan simultáneamente a los termorreceptores y a los mecanorreceptores, además de que su capacidad para transferir calor depende de la cualidad de su contacto con la piel y de la presión con la cual son aplicados. Estos problemas pueden ser superados con el uso de láser CO<sub>2</sub>, pero su elevado coste constituye su mayor impedimento.

Los estímulos químicos difieren de los anteriormente mencionados por el inicio progresivo de su efectividad, la duración de su acción y el hecho que tienen una naturaleza empírica. Los modelos experimentales que emplean estímulos químicos son, indudablemente, los más similares al dolor clínicamente agudo. En la actualidad está bien establecido que los agonistas colinérgicos muscarínicos producen efectos antinociceptivos en modelos de dolor agudo. Sin embargo, se conoce relativamente poco acerca de los efectos de los agonistas de los receptores muscarínicos en modelos que abarquen la sensibilización central en las vías del dolor. Con este fin se está empleando en la actualidad la vedaclidina, que es una mezcla de agonista y antagonista de receptores muscarínicos, en modelos de ratas.

En las pruebas nociceptivas se observan un amplio espectro de reacciones, pero casi siempre están incluidas las respuestas motoras. En las pruebas de dolor físico, las reacciones se evocan por estímulos térmicos (*plantar test*, prueba "del golpe de cola" *tail-flick test* y de la placa-caliente *hot-plate test*), mecánico o eléctrico (pruebas de vocalización y del salto asustado *flinch-jump test*). Pero existen otras pruebas como la del dolor tónico con utilización de inyecciones de agentes algogénicos intradérmicos (*formalin test*) o intraperitoneal (*writhing test*) o la dilatación de órganos huecos. En general, las pruebas *plantar test*, *tail-flick* y *hot-plate* son las más usadas (Lima y col., 2003).



### **1.1.2 Dolor patológico: el dolor neuropático**

El dolor patológico puede ser causado por una lesión en el sistema nervioso (dolor neuropático) o provenir de un procesamiento anormal por parte del sistema nervioso (dolor funcional). Es un dolor que persiste cuando el estímulo desaparece.

El dolor neuropático es un síndrome de muy difícil manejo en la práctica clínica. Suele originarse a consecuencia de lesiones o enfermedades que afectan el sistema somatosensorial. Lesiones de nervios periféricos, la diabetes, el virus herpes zóster, entre otros, son ejemplos de causas clínicas de dolor neuropático. A pesar de que su mecanismo no está del todo claro, parece ser que está relacionado con una interacción entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario (Katzung and Bertram, 2007).

El dolor neuropático presenta una gran variedad de síntomas: puede percibirse como una sensación quemante, persistente que, frecuentemente está asociado a signos sensoriales como la alodinia (dolor que resulta al aplicar un estímulo inocuo o indoloro), o la hiperalgesia (incremento de la respuesta a un estímulo que normalmente es doloroso). También puede observarse la presencia de signos sensoriales anormales de tipo espontáneo o evocado, tales como disestesias (sensaciones anormales y displacenteras) y parestesias (sensaciones anómalas no desagradables).

Los mecanismos responsables de la aparición del dolor neuropático se clasifican en periféricos y centrales. Los *mecanismos periféricos* implican, entre otros, la generación de una actividad espontánea anormal (descargas ectópicas) en los aferentes primarios, la disminución del umbral de activación de los nociceptores, la comunicación cruzada entre fibras de transmisión, la sobreactividad de los canales de sodio en los nervios periféricos y la inflamación del nervio afectado. El daño de las neuronas sensoriales puede desarrollar cambios en la excitabilidad de las neuronas vecinas, aún en las que no resultan inicialmente afectadas por la lesión, y estos cambios pueden generar potenciales de acción al aplicar cualquier tipo de estimulación en la periferia, inclusive estimulación inocua (alodinia). Estos cambios pueden manifestarse a lo largo de la vía de transmisión nociceptiva. Después de un daño a un nervio periférico no sólo los canales de sodio están alterados; también los canales de calcio participan en la generación de la alodinia y la hiperalgesia.

Con respecto a los *mecanismos centrales*, se producen diversas variaciones neuroquímicas en el entorno de la lesión, tales como la liberación de glutamato, de sustancia P, de óxido nítrico, e incluso modificaciones de la citoarquitectura neuronal (neuroplasticidad), que podrían inducir la activación patológica de las neuronas nociceptivas centrales. También se considera anormal la disminución del umbral de activación de las neuronas de relevo de la vía del dolor, y las alteraciones del sistema de modulación endógena del dolor.

#### **1.1.2.1 Tratamiento farmacológico del dolor neuropático**

Desde el punto de vista clínico, caben considerar sobretodo los opioides, los anticonvulsivantes, los antidepresivos tricíclicos (ADT), los inhibidores de la recaptación de serotonina, los estabilizadores de membrana, la capsaicina y el baclofeno, aunque en los sistemas actuales de clasificación hay notable superposición (Florez, 2007).

## **Analgésicos opioides**

La evidencia reciente parece indicar que diversos fármacos de este grupo, entre ellos *alfentanilo*, *fentanilo*, *morfina* y *oxicodona*, tienen un efecto analgésico en sujetos con dolor neuropático (McCleane, 2003). Es posible que la *codeína* comparta estas propiedades. Sin embargo, por lo general no son productos ampliamente aceptados, en parte por la experiencia obtenida en otras situaciones. El hecho de que la dosis deba incrementarse gradualmente para que se observe el mismo efecto es otra característica desfavorable. Se requieren estudios que evalúen la tolerancia analgésica cuando los opioides se emplean en pacientes con dolor neuropático. Aunque nada parece indicar que estos fármacos no puedan administrarse en este tipo de enfermos, se debe ser cuidadoso al incrementar indefinidamente la dosis en enfermos con dolor neuropático ocasionado por patologías no terminales.

En la actualidad se dispone de opioides de gran potencia para uso por vía oral, rectal, tópica y parenteral, inclusive epidural e intratecal. Independientemente de la vía de administración, el sitio común de acción de cualquier opiáceo es a nivel del receptor específico. A menos que presenten algún mecanismo diferente de acción, cabe asumir que todos son relativamente comparables en términos de eficacia (Baron y col., 2010).

Un caso particular dentro de este grupo es el *tramadol*, ya que posee propiedades adicionales. Se sabe que este fármaco a parte de ejercer efecto sobre la recaptación de monoaminas, es agonista de los receptores  $\mu$ . Ofrece así menores riesgos de depresión respiratoria, tolerancia y dependencia, en comparación con los opioides puros (Nossaman, 2010).

## **Anticonvulsivantes**

La *fenitoína*, a pesar de que fue uno de los primeros fármacos usados como analgésico, ya no se utiliza debido a que produce taquifilaxia que produce y porque se asocia a un perfil de toxicidad particular. Su uso prolongado se acompaña de inducción enzimática a nivel hepático e hiperplasia gingival, como ejemplo de algunas de las complicaciones más frecuentes. Además, puede inducir sedación y alteraciones cognitivas. Sin embargo, es eficaz en la reducción del dolor neuropático en sujetos con neuropatía diabética.

La *carbamazepina* sigue siendo la mejor opción entre los anticonvulsivantes para el alivio del dolor neuropático. Sin embargo, su uso prolongado se asocia con numerosos efectos adversos, entre ellos inducción enzimática hepática, modificaciones en los niveles de los lípidos en sangre, cambios en la concentración de hormonas sexuales, descenso del sodio y aumento del peso corporal. Es estructuralmente similar a los ADT, y al igual que ellos tiene un efecto antagonista sobre los canales de sodio. También es probable que tenga acción central y periférica sobre los canales de adenosina, y puede inhibir la liberación de glutamato.

La *oxicarbazepina* es un derivado de la carbamazepina que comparte su acción analgésica aunque aparentemente con mejor margen de seguridad.

El uso de *gabapentina* en pacientes con dolor neuropático está universalmente aceptado. Actúa sobre la subunidad  $A\delta_2$  de los receptores de calcio. Su eficacia está probada no sólo en pacientes con dolor neuropático -neuralgia del trigémino, neuralgia posherpética y neuropatía diabética- sino también en otras situaciones, entre ellas esclerosis múltiple y dolor asociado a cáncer (McCleane, 2003). El aumento gradual de la dosis puede reducir las manifestaciones adversas, relativamente comunes al inicio de la terapia.

Existe evidencia de que la *lamotrigina* puede ser eficaz en el alivio del dolor neuropático incluso en pacientes en quienes fracasaron otras medidas analgésicas, como

la cirugía (Scrivani y col., 2010). La erupción cutánea es el efecto adverso más frecuente. Además, puede ser necesario el tratamiento durante 6 semanas para que se observen los efectos, por lo que no es útil en situaciones agudas. Asimismo, parece requerirse una dosis relativamente alta para obtener el efecto analgésico. Debido a su larga semivida puede administrarse una vez por día. Al contrario de los anticonvulsivantes tradicionales, las alteraciones cognitivas y la sedación son efectos mucho menos frecuentes.

Finalmente, la evidencia que avala la eficacia del *ácido valproico* para tratar el dolor neuropático es relativamente escasa (McCleane, 2003). Uno de sus principales atributos parece ser su buen perfil de seguridad. Se ha visto que el fármaco se tolera muy bien en pacientes con neuropatía diabética. Se considera que actúa al aumentar la síntesis e inhibir la degradación del neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico).

### **Antidepresivos tricíclicos (ADT)**

A diferencia de los anticonvulsivos, los ADT tienen una estructura química semejante y comparten el mecanismo de acción. Por tanto, es menos razonable cambiar un principio activo por otro de este grupo cuando el enfermo no responde de forma adecuada. No obstante, cada uno se asocia con un margen de seguridad distinto.

*Amitriptilina*, *imipramina*, *clomipramina*, *desipramina* y *doxepina* son eficaces en dolor neuropático, independientemente del efecto antidepresivo. Se considera que estos fármacos actúan en numerosos lugares en la vía del dolor, tanto a nivel central como periférico.

También está contemplada la administración tópica de ADT. Esta forma de administración se asocia con una reducción de los efectos adversos, pero sólo es aplicable cuando la zona de dolor neuropático es relativamente pequeña. La evidencia a partir de estudios animales confirma un mecanismo de acción periférico.

### **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina**

La serotonina es un potente neurotransmisor en las vías centrales excitatorias y, en consecuencia, se espera que estos fármacos tengan efecto analgésico. Además, el margen de seguridad es mayor que el de los ADT. Sin embargo, los estudios al respecto mostraron una potencia algo inferior a la de los ADT.

Algunos ejemplos son: *citalopram*, *fluoxetina*, *fluvoxamina*, *paroxetina*, *duloxetina*, etc. Este último, formulado en cápsulas que contiene pellets con cubierta entérica, ha sido aprobado recientemente para el tratamiento de la neuropatía diabética (Fishbain y col., 2008).

### **Estabilizadores de membrana**

El efecto analgésico de los estabilizadores de membrana se deriva de su antagonismo de los canales de sodio. La utilidad de la *mexiletina*, usada en el tratamiento de arritmias cardíacas durante muchos años, se confirmó en modelos animales de diabetes así como también en pacientes con neuropatía diabética y con lesión de nervios periféricos. Desafortunadamente, el fármaco tiene un margen terapéutico estrecho por la frecuencia con que aparecen efectos adversos en relación con dosis habituales.

Otros anestésicos locales han sido utilizados en el tratamiento tanto del dolor agudo como crónico. Los anestésicos locales administrados de forma parenteral parecen suprimir la actividad de las fibras activas espontáneas en neuronas, deprimiendo las fibras aferentes C, evocando la actividad en las médula espinal y silenciando la descarga

ganglionar de la raíz dorsal sin bloquear la conducción nerviosa (McCleane, 2004). Algunos estudios muestran la utilidad de la *lidocaína* en neuralgia postherpética y en otras situaciones de dolor neuropático (McCleane, 2003).

### Baclofeno

El *baclofeno*, relajante muscular, ejerce efecto analgésico al actuar como agonista de los receptores GABA-2 inhibitorios. Existe evidencia de que en pacientes con neuralgia del trigémino reduce la frecuencia y gravedad de los ataques. Sin embargo, este beneficio no parece observarse en otras situaciones de dolor neuropático. Otras ventajas del fármaco son su buen margen de seguridad y la disminución de los calambres musculares que, a menudo ocurren en forma simultánea con el dolor neuropático agudo (Florez, 2007).

### Capsaicina

El mecanismo por el cual la *capsaicina* induce analgesia se relaciona aparentemente con la depleción de sustancia P en las terminales nerviosas sensitivas. Sin embargo, como la depleción es reversible, en el dolor crónico debe emplearse en forma sostenida.

En resumen (Tabla 1), existen pocos fármacos con aprobación específica para el tratamiento del dolor neuropático. Aunque se conocen numerosos fármacos con demostrada acción analgésica, la falta de aprobación limita su uso por médicos no especialistas. En general, puede considerarse al tramadol como fármaco de primera línea seguido por alguno de los ADT. Los parches de lidocaína y la capsaicina son otras alternativas útiles. Ante la falta de respuesta puede intentarse el uso de anticonvulsivantes o bien de baclofeno (en neuralgia del trigémino).

Tabla 1. Principales fármacos para el tratamiento del dolor

DOLOR	Tipo de fármaco	Ejemplos
<b>Fisiológico</b>	<i>Inhibidores no selectivos COX-1 y COX-2</i>	<i>salicilatos</i> : ácido acetilsalicílico, trifusal,...
		<i>paraminofenoles</i> : paracetamol
		<i>pirazolonas</i> : metamizol, dipirona
		<i>ácidos propiónicos</i> : ibuprofeno
		<i>ácidos acéticos</i> : dilofenaco
		<i>derivados indolacéticos</i> : indometacina, sulindac
	<i>oxicames</i> : piroxicam, tenoxicam	
	<i>Inhibidores selectivos de la COX-2</i>	<i>coxibs</i> : celecoxib, etoricoxib
<b>Patológico: Neuropático</b>	<i>Opioides</i>	alfentanilo, fentanilo, morfina, tramadol
	<i>Anticonvulsivantes</i>	carbamazepina, oxycarbamazepina, gabapentina, lamotrigina
	<i>Antidepresivos tricíclicos</i>	amitriptilina, imipramina, clomipramina, desipramina y doxepina
	<i>Inhibidores recaptación serotonina</i>	citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, duloxetina,
	<i>Estabilizadores membrana</i>	mexiletina, lidocaína
	<i>Otros</i>	baclofeno/capsaicina

#### 1.1.2.2 Modelos experimentales para el estudio del dolor neuropático

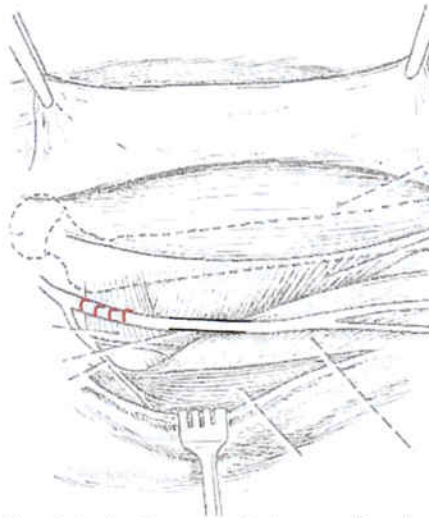
En la práctica clínica, se distinguen varios tipos de neuropatías. Sin embargo, se sugiere, pero no se ha demostrado en su totalidad, que todos los tipos de dolor neuropático comparten un mecanismo fisiopatológico común (Gómez-Barrios y Tortorici, 2009). Con el objeto de estudiar esta patología se han desarrollado diversos modelos en animal



de experimentación. Estos generalmente consisten en: a) lesiones parciales o totales del nervio ciático, b) lesiones de nervios raquídeos en la región lumbar, y c) utilización de fármacos como el paclitaxel, la vincristina y la estreptozotocina. Estos últimos producen dolor neuropático por inducción de toxicidad en los nervios periféricos.

En la mayoría de los modelos que se utilizan en la actualidad las alteraciones son realizadas en un miembro posterior, causando un daño parcial en los nervios periféricos o espinales. En este tipo de modelos se estudian la hiperalgesia y la alodinia inducidas mediante la aplicación de estímulos térmicos o mecánicos, que son los más utilizados para determinar el grado de nocicepción en los animales de experimentación. Entre los modelos más empleados para generar un trauma mecánico en los nervios figuran la constricción crónica del nervio (CCN), el modelo de ligadura parcial del nervio ciático (LPN), el modelo de ligadura del nervio espinal (LNS) y el modelo de ligadura neural por omisión (LNO).

El modelo de CCN consiste en realizar cuatro ligaduras laxas en el nervio ciático antes de su trifurcación en la zona poplítea (Figura 1). Al ser laxas, las ligaduras impiden, pero no bloquean totalmente, la circulación en la porción del nervio que resulta afectada. En respuesta a las ligaduras se desarrolla una reacción inflamatoria que conlleva la pérdida de la mayoría de fibras A y una leve reducción de las fibras C. Con este procedimiento los signos sensoriales de alodinia e hiperalgesia son medidos exitosamente. Además, el modelo de CCN permite evaluar al animal en ambos miembros posteriores para efecto de comparación, manteniéndose incluso la presencia de reflejos nocidefensivos en la pata afectada.



*Figura 1. Esquema de la inducción de la lesión constrictiva por ligadura del nervio ciático en la pata de la rata.*

El modelo de LPN consiste en una ligadura fuertemente ajustada alrededor de una porción del nervio ciático, la cual produce una desafrentación parcial, pero no diferencial. Con esta maniobra alrededor de 2/3 de la población total de fibras resulta eliminada. Este modelo proporciona un menor grado de inflamación, con respecto al modelo de CCN, pero produce dolor espontáneo. A su vez, al igual que el de CCN, permite evaluar al animal en ambos miembros posteriores para efecto de comparación.

El modelo de LNS consiste en producir un daño en los nervios espinales L5 y L6, por medio de una ligadura realizada con un alto grado de ajuste, lo cual provoca una sección transversal del nervio. En este caso, los miembros posteriores dejan de ser inervados en más de un 50%, afectando incluso a los ganglios vecinos de la raíz dorsal. Este modelo

es significativamente más invasivo que el de CCN e induce conductas nociceptivas por un tiempo más prolongado.

Más recientemente, se ha desarrollado el modelo LNO, que consiste en realizar una sección transversal, por separado, en los nervios peroneal y tibial, dejando intacto el sural del miembro posterior. De esta forma, el modelo permite evaluar territorios de la piel no dañados y territorios de áreas desnervadas. Este modelo produce una rápida y prolongada (>6 meses) modificación conductual (nocicepción).

## 1.2 ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS COMO ANALGÉSICOS

Los antidepresivos tricíclicos constituyen un grupo de medicamentos antidepresivos que reciben su nombre de su estructura química, que incluye una cadena de tres anillos. Los tricíclicos son uno de los más importantes grupos de fármacos usados en el tratamiento médico de los trastornos del estado de ánimo (como los trastornos bipolares), junto con los IMAO (inhibidores de la monoaminoxidasa), el litio, y los inhibidores selectivos de la recaptación de las monoaminas.

En la Figura 2 se muestra la estructura química de algunos antidepresivos tricíclicos.

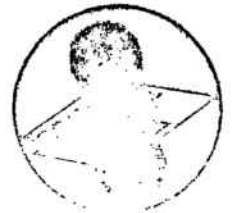
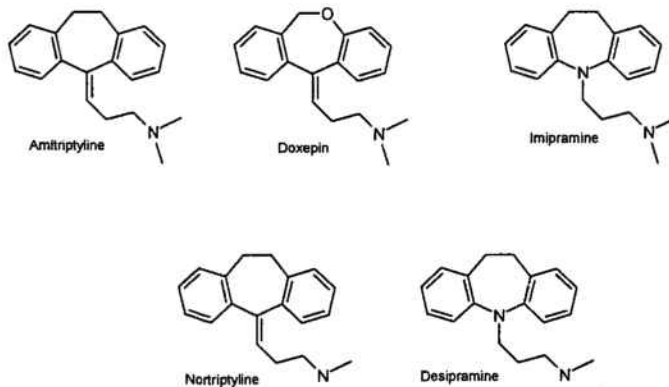


Figura 2. Estructuras químicas de algunos antidepresivos tricíclicos

Su acción terapéutica parece cursar por bloqueo de la recaptación de noradrenalina y/o serotonina, aumentando así los niveles disponibles de estos neurotransmisores que van a ir a unirse al receptor post-sináptico (Florez, 2007), aunque parecen mostrar diferencias entre ellos. Por ejemplo, los antidepresivos tricíclicos convencionales imipramina y clomipramina actúan inhibiendo preferentemente la recaptación de serotonina. La amitriptilina muestra una alta afinidad por la noradrenalina y una moderada afinidad por la serotonina, mientras que la doxepina muestra alta afinidad por ambas monoaminas (Abdel-Salam y col., 2003).

Sin embargo, los antidepresivos poseen otros mecanismos de acción, tales como el bloqueo de los canales de sodio, hecho que ha aumentado su interés como anestésicos locales (Pancrazio y col., 1998; Wang y col., 2004). La noradrenalina y serotonina, además, forman parte del mecanismo endógeno de control del dolor por la vía inhibitoria descendente, modulando la llegada de impulsos al cerebro y médula espinal. Así, aunque probablemente la modulación de la nocicepción por parte de los ADT se da

a nivel central, los mecanismos espinales y supraespinales también es probable que jueguen un importante papel (McCleane, 2008).

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto que la amitriptilina, la doxepina y la imipramina, fármacos que inhiben la recaptación de monoaminas de una manera no selectiva, muestran un potente efecto antinociceptivo y que su uso crónico parece ser seguro y efectivo (Sansone and Sansone, 2008; Da Cunha y col., 2009), incluso más que otros anestésicos locales como la bupivacaína o la lidocaína (Oatway y col., 2003; Haderer y col. 2003). La amitriptilina, por ejemplo, es un potente inhibidor de los canales voltaje-dependientes de sodio (Ogata y Narahashi, 1989; Barber y col., 1991). Esto se debe probablemente a que, en los canales de sodio, el lugar de acción de la amitriptilina coincide con el lugar de acción de los anestésicos locales (Nau y col., 2000). A este fármaco se le ha considerado un efecto positivo en dolor neuropático en pacientes tanto diabéticos como no diabéticos (cáncer de mama, migrañas, entre otros). Sin embargo, este efecto analgésico puede resultar perjudicial para el paciente cuando el antidepresivo se sobredosifica, ya que puede desencadenar arritmias u otro tipo de cardiotoxicidad debido al bloqueo de los canales de sodio cardíacos (Sudoh y col., 2002).

De la misma manera, se han obtenido resultados prometedores para la imipramina en un modelo experimental de hiperalgesia y alodinia, y en el tratamiento del dolor esofágico (Hota y col., 2007). La administración intratecal de doxepina produce efectos analgésicos en la actividad motora, propiocepción y nocicepción, de manera dosis-dependiente (Cheng y col., 2006).

Finalmente, cabe destacar la reciente exploración de la vía tópica para este tipo de fármacos y para esta indicación. Existe un interés considerable en el desarrollo de analgésicos tópicos para el tratamiento tanto del dolor agudo como el crónico, ya que permitiría alcanzar concentraciones efectivas del fármaco cerca del lugar de origen del dolor, reduciendo a su vez los efectos adversos (Besson y col., 2008).

### 1.3 NANOPARTÍCULAS

En la respuesta producida por medicamentos se deben considerar dos aspectos: el tiempo que permanece el fármaco en su lugar de acción (aspecto temporal) y la cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica (aspecto espacial). Las formulaciones convencionales no permiten controlar estos dos aspectos, con lo que en la década de los años 1980 se desarrollaron nuevas estrategias y sistemas de liberación de fármacos con el objetivo principal de conseguir una optimización de la liberación del principio activo para modificar el aspecto temporal y/o espacial, por medio de lo que actualmente se conoce como liberación prolongada, dando lugar al desarrollo de nuevas formas de dosificación de medicamentos y a la administración de éstos a través de nuevas vías, alternativas a la vía oral, como la nasal, transdérmica, colónica, pulmonar, etc. (Vila Jato, 2009).

A su vez, en las últimas décadas ha tenido lugar un espectacular desarrollo de la biología celular y molecular que ha permitido no sólo un mejor conocimiento de la fisiopatología de numerosos procesos patológicos, sino también la identificación de diversas dianas terapéuticas con el consiguiente desarrollo de nuevos fármacos cuya estructura va, desde sencillas moléculas a complejas macromoléculas, tales como proteínas o plásmidos. Estas moléculas pueden tener un variado origen, pero con frecuencia presentan problemas de solubilidad y, para alcanzar una adecuada biodisponibilidad biofísica (en fármacos con elevada actividad intrínseca puede ser



suficiente un 10%), deben poseer unas propiedades fisicoquímicas que les permitan atravesar las barreras fisiológicas, como son los epitelios, membranas celular y nuclear, así como ser estables tanto física como químicamente en fluidos biológicos (Couvreur y Vauthier, 2006).

Habitualmente, tras la administración de un principio activo formulado en una determinada forma farmacéutica, el fármaco es liberado del sistema y transportado por la sangre a las distintas zonas del organismo a las cuales es capaz de acceder, con lo que no elige lugar de acción. Mediante la vectorización es posible, utilizando la sangre como transporte, incluir el fármaco en un sistema, por ejemplo nanoestructurado que, tras alcanzar la diana terapéutica, libere el fármaco que contiene.

La aplicación de la nanotecnología a las ciencias biomédicas supone unas mejores oportunidades de diagnóstico y unas terapéuticas más efectivas, e implica el diseño de sistemas nanométricos (de 1 a 1000 nanómetros (Roney y col., 2006)) de liberación de fármacos. En función de la indicación terapéutica buscada, el tamaño de partícula puede suponer un obstáculo a la hora de atravesar los capilares, vasos linfáticos y mucosas. Los nanosistemas son capaces de atravesar los capilares cosa que no son capaces de hacer, por ejemplo, los microsistemas mayores de 4  $\mu\text{m}$ , que probablemente se verían atrapados mecánicamente y filtrados por el primer lecho capilar (Alonso, 2004; Llabot y col., 2008). Está demostrado además, que la administración intravenosa de partículas mayores de 5  $\mu\text{m}$  puede causar muerte debido a un embolismo (Heurtault y col., 2003). Otra ventaja de los nanosistemas respecto a los microsistemas, es que éstos últimos pueden presentar reacciones adversas asociadas a un elevado efecto *burst* en su liberación. Este efecto *burst* se puede reducir disminuyendo el tamaño de partícula (Matsumoto y col., 2005). Otros autores indican que en los nanosistemas poliméricos, al presentar mayor superficie específica, se produce mayor difusión de los productos de degradación del polímero en el medio de liberación, y por tanto menor degradación del fármaco encapsulado (Sanchez y col., 2003).



Figura 3. Diversos nanosistemas que pueden utilizarse para la administración de fármacos

Ejemplos de nanosistemas son: liposomas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, vectores de ADN, conjugados poliméricos o dendrímeros (Figura 3), que se encuadran dentro del campo de la Nanotecnología Farmacéutica y con los que es posible conseguir algunas de las finalidades siguientes (Vila Jato, 2009):

- Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química, aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de los nuevos principios activos procedentes del área de la biotecnología.

- Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, aspecto de importancia relevante cuando se trata de buscar alternativas a la administración parenteral de fármacos.
- Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos bien para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- Incrementar la penetración y distribución intracelular que son necesarias cuando la diana sobre la que va a actuar el fármaco se encuentra en el interior de la célula.
- Mejorar las técnicas de imagen y diagnóstico *in vivo*.

Respecto a las posibilidades de nuevas terapéuticas resulta de gran relevancia la nanomedicina en campos como cáncer, procesos infecciosos, vacunas, trastornos metabólicos, trastornos autoinmunes y rechazo de trasplantes, procesos inflamatorios y dolor.

En general los nanosistemas farmacéuticos deben cumplir con las siguientes especificaciones:

- Deben ser biocompatibles y/o biodegradables, especialmente los destinados a su administración por una vía parenteral.
- Tener un tamaño de partícula nanométrico.
- Poseer una elevada capacidad de incorporación del principio activo (encapsulación).
- Presentar un prolongado tiempo de circulación en el torrente circulatorio.
- Es deseable que el sistema presente una específica o inespecífica capacidad de acumulación en determinados lugares del organismo.

El presente trabajo se centra en las nanopartículas poliméricas.

### 1.3.1 Polímeros

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos en forma de nano o micropartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables. Sin embargo el riesgo potencial de infecciones e inmunogenicidad inducidas por sustancias poliméricas de origen animal o vegetal llevó a la necesidad de utilizar materiales sintéticos para reemplazar los polímeros naturales. Consecuentemente, una gran variedad de polímeros sintéticos han sido sintetizados en los últimos quince años, teniendo en cuenta el requisito básico para materiales de aplicación biomédica: estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Los más representativos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunos polímeros biodegradables utilizados en la preparación de nanosistemas farmacéuticos.

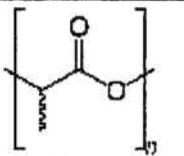
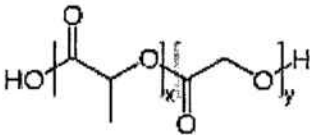
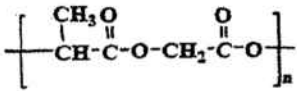
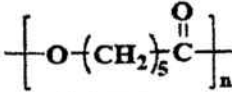
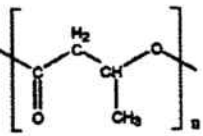
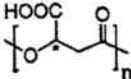
POLÍMERO	FÁRMACO CANDIDATO
<b>HIDROFÍLICOS ó NATURALES</b>	
Proteínas:	
Albúmina, Gelatina	Hidrofilico, afin a proteínas
Polisacáridos:	
Alginato, Quitosano	Hidrofilico, afin a proteínas
Dextrano	Hidrofilico, no soluble en solvente polar
<b>HIDROFÓBICOS ó SINTÉTICOS</b>	
Poli(alquilocianoacrilatos) (PACA)	Hidrofilico ó hidrofóbico (soluble aceite)
Poliésteres (PLA, PLGA, PECL)	Hidrofilico o hidrofóbico

(M.J. Alonso, 1996; Tuncel and Demil, 2010)

Los poliésteres son un grupo particularmente atractivo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, algunos miembros de este grupo de polímeros presentan baja inmunogenicidad y pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico (Mundargi y col., 2008).

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas (Tabla 3) destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, bien de unidades monoméricas de ácido láctico (PLA) o bien de dímeros láctico-co-glicólico (PLGA). Estos polímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables (Al Malyan y col., 2006). El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente, al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables.

Tabla 3. Poliésteres más utilizados en el desarrollo de nanopartículas; PLA: ácido poliláctico; PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico); PCL: poli-ε-caprolactona; PHB: poli (β-hidroxibutirato); PHBV: poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxisvalerato; PMLA: ácido poli (B,L-málico).

Poliéster	Estructura química
PLA	
PLGA	
PCL	
PHB	
PHBV	
PMLA	

La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que puede traducirse en una reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas en caso que se hubieran encapsulado (Thomas y Burg, 2004). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica. Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de



que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor (Bergsman y col., 1995).

### **1.3.2 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas**

Durante las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas para la formulación de nanopartículas. Su fabricación ha evolucionado principalmente en tres aspectos: 1) búsqueda de componentes menos tóxicos; 2) simplificación del proceso para fabricación a nivel industrial; y 3) optimización de las técnicas en cuanto a rendimiento y eficacia de encapsulación (Hans y Lowman, 2002).

Los métodos para la preparación de nanopartículas son distintos en función de si se parte de polímeros preformados o de sus monómeros.

Los principales métodos para preparar nanopartículas son: emulsificación/evaporación del disolvente, nanoprecipitación, «*salting out*», difusión del disolvente y utilización de fluidos supercríticos.

Además debe considerarse que influyen diversos factores en la formación de nanopartículas: la temperatura de preparación, el método de evaporación del solvente polar, el volumen de fase acuosa, el tipo y/o la concentración de tensioactivo o el peso molecular del polímero (Zambaux y col., 1998).

#### **Emulsificación/evaporación del disolvente**

La técnica de emulsificación y evaporación del disolvente consiste en disolver el polímero hidrofóbico en un solvente orgánico y emulsionarlo en una fase acuosa (Figura 4). Una vez formada la nanoemulsión, se procede a evaporar el disolvente a temperatura controlada: el solvente difunde a la fase externa hasta saturación. Las moléculas de solvente que alcanzan la interfase agua-aire, se evaporan. Como consecuencia de la evaporación del solvente el polímero precipita dando lugar a la formación de las nanopartículas con el fármaco en su interior (Le Corre, 1994).

La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son órganoclorados, principalmente el diclorometano y el cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, fácil emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. El alcohol polivinílico (PVA) ha sido el agente estabilizante más empleado a la hora de preparar las nanopartículas biodegradables a partir de poliésteres. Además, es uno de los pocos que previene la agregación de partículas durante los pasos post-preparativos como pueden ser la purificación y el liofilizado. Sin embargo, existen alternativas, como la utilización de albúmina sérica humana, poloxámeros o poloxaminas (Vila Jato, 2009).

Los polímeros más empleados en esta técnica son el PLA, el PLGA, la poli- $\epsilon$ -caprolactona y el polihidroxibutirato. La concentración y peso molecular del polímero a utilizar también afectarán a la formación de nanopartículas. En el caso del PLGA, el más empleado de los poliésteres, el peso molecular presenta un efecto inverso sobre el tamaño y la eficiencia de encapsulación. La copolimerización del PLGA puede ser llevada a cabo por diferentes rutas de síntesis, obteniéndose diferentes formas de PLGA, normalmente identificadas respecto al ratio ácido láctico:ácido glicólico (75:25, 50:50, etc.) y con diferentes pesos moleculares (Astete y Sabliov, 2006). Se pueden preparar nanopartículas de aproximadamente 100 nm con polímeros de bajo peso molecular, sin embargo, se reduce la eficiencia de encapsulación del fármaco. Por otra parte, un aumento de la concentración de polímero aumenta la eficiencia de encapsulación pero también aumenta el tamaño de las nanopartículas.

Los fármacos lipofílicos que se puedan solubilizar en la solución de polímero serán los de elección para esta técnica, usando una emulsión simple O/A. En cambio, la emulsión múltiple A/O/A será la elegida para la encapsulación de principios activos hidrófilos.

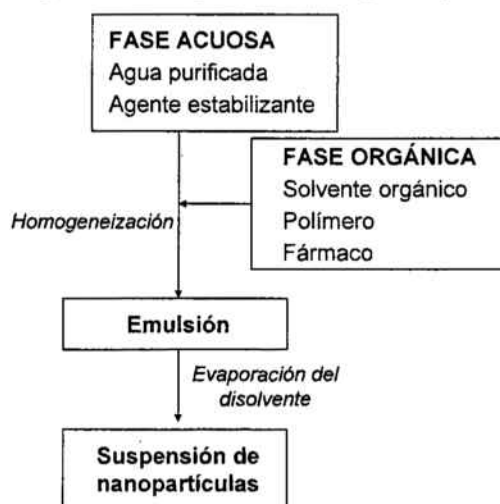


Figura 4. Técnica de emulsificación y evaporación del disolvente (emulsión simple O/A)

### Nanoprecipitación

Esta técnica también recibe el nombre de “sustitución o desplazamiento del disolvente”. En este proceso, el polímero, el fármaco y, de manera opcional, un estabilizante lipofílico se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona o metanol. Esta solución se adiciona sobre un no-solvente bajo agitación magnética, entendiéndose por “no solvente” aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble. A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. El procedimiento consiste en la disolución del fármaco y el polímero en la fase orgánica y posterior incorporación a una fase acuosa (Figura 5) (Fessi y col., 1989). Generalmente, el no-solvente está constituido por una solución acuosa que contiene un agente tensioactivo, por ejemplo, PVA o poloxámero 188 (polietileno-polipropileno glicol).

El mecanismo de formación de las partículas por este método se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente. Aquí, se observa una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfase. Estas gotículas se estabilizan rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se da la completa difusión del disolvente y, por tanto, la precipitación del polímero. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad de elección del sistema fármaco/polímero/disolvente/no-solvente en el cual se forman las nanopartículas que permita una eficiente encapsulación de fármaco en ellas. De acuerdo con Barichello y col. (1999), los fármacos con poca afinidad por el polímero, tienden a difundir de la fase orgánica al medio acuoso externo durante el proceso de formación de las nanopartículas, provocando así una baja eficiencia de encapsulación.

Esta técnica está limitada a fármacos altamente solubles en un solvente polar pero ligeramente solubles en agua. Sin embargo, está siendo explorado más a fondo para lograr encapsular principios activos hidrófilos mediante el uso de diferentes tipos de solventes, volúmenes o polímeros (Barichello y col., 1999; Govender y col., 1999) o incluso adsorbiendo el principio activo en la superficie de las nanopartículas (Zou y col., 2009).



Con respecto al método de evaporación del disolvente, la nanoprecipitación presenta la ventaja de que, además de ser un método apropiado para encapsular principios activos hidrofóbicos, se consume menor energía durante el proceso de formación de las nanopartículas, ya que únicamente requiere una agitación leve (por ejemplo agitación magnética) en lugar de sonicación o microfluidización.

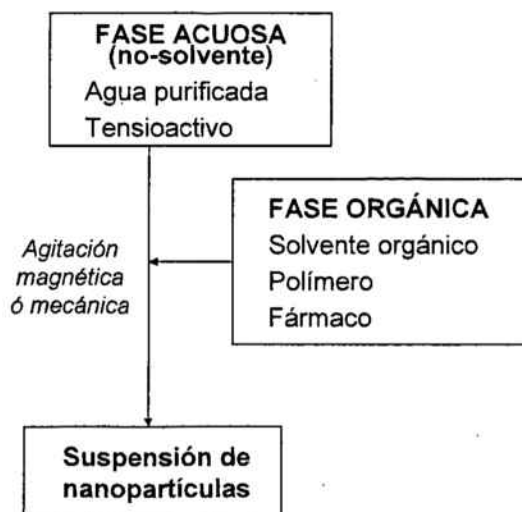


Figura 5. Técnica de nanoprecipitación o desplazamiento del disolvente.

### «Salting out»

Este método se basa en la separación de un disolvente hidromiscible de una solución acuosa rica en electrolitos. La acetona suele ser el disolvente elegido debido a sus características de solubilización y su buena separación de soluciones acuosas con los electrolitos (o agentes «salting out»). El polímero y el fármaco se disuelven en acetona, y esta solución se emulsifica bajo una fuerte agitación mecánica en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante. Esta emulsión se diluye con un volumen suficiente de solución acuosa para potenciar la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. El disolvente y los electrolitos se eliminan por filtración de flujo transversal. El mecanismo de formación de las nanopartículas se asemeja en cierto modo a la nanoprecipitación: la difusión de la acetona desde las gotículas durante el paso de dilución puede generar turbulencias en la interfase y la precipitación del polímero en forma de nanopartículas (Vila Jato, 2009).

Una de las principales ventajas de esta técnica es la posibilidad de incorporación de altas cantidades tanto de polímero como de fármaco, ya que el tamaño medio de las nanopartículas no es tan dependiente de la concentración de polímero empleada, a diferencia de lo que ocurre en otros métodos. En contrapartida, esta técnica es exclusivamente apropiada para fármacos lipofílicos, electrolitos que permitan la separación de las fases evitando la precipitación y agentes estabilizantes compatibles con soluciones acuosas saturadas y que no coacervan en presencia del disolvente.

### Difusión del disolvente

Esta técnica podría considerarse una modificación de la anterior («salting out»), evitando el uso de sales y, por tanto, una serie de intensos pasos de purificación. Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua y, esta fase orgánica se

emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un estabilizante. La posterior adición de agua al sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas (Vila Jato, 2009).

A diferencia de otros métodos, la formación de las nanopartículas no puede ser completamente explicada por las turbulencias producidas en la interfase. Por lo tanto, se ha sugerido que las nanopartículas se forman por la inestabilidad fisicoquímica que produce el transporte del disolvente, de manera similar al mecanismo utilizado para explicar los procesos de emulsificación espontánea.

### **Fluidos supercríticos**

En esta técnica, el fármaco y el polímero se solubilizan en un fluido supercrítico (el más empleado es el CO<sub>2</sub> por su baja toxicidad) y la solución se expande a través de una boquilla. El fluido supercrítico se evapora durante el proceso de generación del aerosol, y las partículas de soluto precipitan. Las principales ventajas que ofrece esta técnica son la reducción en el uso de disolventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas. Sin embargo, este novedoso proceso requiere una elevada inversión inicial para la obtención del equipamiento necesario y operar a elevadas presiones usando sistemas de alta presión (Vila Jato, 2009).

#### **1.3.3 Caracterización de las nanopartículas poliméricas**

La importancia de las técnicas de caracterización de nanopartículas se justifica por la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño y la distribución granulométrica, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulación, el contenido en principio activo y el perfil de liberación del fármaco encapsulado son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanopartículas.

El **tamaño** puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas. La microscopía óptica convencional no es adecuada para la caracterización de nanopartículas porque su resolución está limitada a 1 µm. Por lo tanto, el tamaño de los sistemas nanoparticulados debe ser evaluado mediante microscopía electrónica o difracción de láser (*light scattering*).

En particular, la microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy-SEM*), además del tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas. En esta técnica, la muestra es recubierta (con oro o platino) y utilizada como conductor eléctrico. Los electrones emitidos de la muestra nanoparticulada bajo un vacío elevado son detectados y se forma la imagen.

Otras técnicas usadas son: microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy-TEM*), que permite una observación del interior de las nanopartículas; la microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy-AFM*), que permite rastrear la topografía de la muestra nanoparticulada, o la Espectroscopía de Correlación Fotónica (*Photon Correlation Spectroscopy-PCS*), técnica basada en difracción de láser que se caracteriza por su rapidez de análisis (Gaumet y col., 2008).

El potencial zeta proporciona información sobre la **carga superficial** de las nanopartículas, que condiciona las interacciones de las mismas con membranas celulares, y es un importante indicador de la estabilidad del sistema coloidal. El potencial zeta puede determinarse mediante anemometría láser Doppler o por técnicas

electroforéticas empleando la ecuación de Smoluchowski (Liu y co., 2006). El potencial zeta depende de las condiciones del medio de dispersión, sobretodo de la concentración de electrolitos y del pH, del tipo de fármaco encapsulado y de los grupos terminales del polímero usado (Heurtault y col., 2009).

La **eficiencia de encapsulación (%)** es la relación entre la cantidad encapsulada del fármaco y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación. El **contenido o carga de principio activo (drug loading) (%)** revela la cantidad real del fármaco encapsulado respecto al peso total de la formulación. En general, ambos parámetros se determinan tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría-UV, HPLC, ELISA, etc.).

### 1.3.4 Estudios de liberación

La **liberación del fármaco** a partir de un sistema polimérico nanoparticulado depende de diversos factores: 1) desorción del fármaco de la superficie de las nanopartículas; 2) difusión del fármaco a través de la matriz polimérica; 3) difusión a través de la pared polimérica; 4) erosión de la matriz polimérica; y 5) combinación de los procesos de difusión y erosión. En primer lugar, se produce la liberación rápida del fármaco adsorbido en la superficie de la nanopartícula (efecto *burst*) seguido de la liberación más lenta del fármaco incluido en el interior de las mismas. Las propiedades de liberación y los mecanismos implicados están basados en el coeficiente de difusión del fármaco y en la velocidad de biodegradación del polímero (Vila Jato, 2009).

Una vez obtenidas las nanopartículas, se puede estudiar la liberación *in vitro* del principio activo e identificar el modelo matemático que describe mejor su perfil con el objetivo de elucidar el mecanismo que rige la liberación en cada caso. Algunos de los modelos más utilizados en estos estudios son:

$$\text{Cinética de orden cero:} \quad M_t/M_\infty = k \cdot t$$

$$\text{Cinética de primer orden:} \quad M_t/M_\infty = 1 - e^{-k \cdot t}$$

$$\text{Modelo de Higuchi (raíz cuadrada):} \quad M_t/M_\infty = k \cdot t^{1/2}$$

$$\text{Modelo Korsmeyer-Peppas:} \quad M_t/M_\infty = k \cdot t^n$$

donde  $M_t$  es la cantidad de fármaco liberada a tiempo  $t$ ;  $M_\infty$  es la cantidad total (máxima) liberada;  $M_t/M_\infty$  es la fracción de fármaco liberada a tiempo  $t$ ;  $k$  es la constante de velocidad de liberación; y  $n$  es el exponente difusional indicativo del mecanismo de liberación del fármaco. Como se ha mencionado anteriormente, varios mecanismos pueden estar implicados en la liberación de un fármaco a partir de una matriz esférica: difusión (o mecanismo Fickiano, cuando  $n \leq 0.43$ ); transporte no-Fickiano (también llamado caso-II o orden cero, cuando  $n \geq 0.85$ ), o una combinación de ambos procesos (transporte anómalo, cuando  $0.43 \leq n < 0.85$ ) (Korsmeyer y col. 1983; Peppas, 1985; Ritger y Peppas, 1987).

En general, los estudios de liberación de fármacos a partir de nanopartículas son metodológicamente complicados debido al tamaño nanométrico de dichos sistemas, que dificulta la separación de las nanopartículas del medio de liberación. La concentración

del fármaco en dicho medio se determina a lo largo del tiempo utilizando el método analítico más adecuado en cada caso y que dependerá de la molécula encapsulada.

La difusión en bolsas de diálisis y la separación basada en ultracentrifugación o filtración a presión reducida han sido técnicas utilizadas para la determinación del perfil de liberación de fármacos a partir de nanopartículas. En el primer caso, la dispersión acuosa de nanopartículas se coloca en una bolsa de diálisis de celulosa y se sella por ambos lados. La bolsa de diálisis se introduce en un compartimento receptor que contiene un medio de disolución atemperado y en ligera agitación. Las muestras se van retirando a intervalos de tiempo regulares y el volumen retirado se sustituye por medio de disolución. En el segundo caso, una suspensión de nanopartículas se deposita en células de ultracentrifugación conteniendo medio receptor y en moderada agitación. A intervalos de tiempo regulares se retiran alícuotas de medio que se hacen pasar a través de la membrana de ultrafiltración a baja presión para facilitar su paso (Govender y col., 1999). También se pueden utilizar células de difusión de Franz (Moebus y col., 2009; Morales y col., 2010), constituidas por un compartimento donador y un receptor entre los cuales se colocará una membrana y sobre la cual se depositará una suspensión de la formulación a ensayar.

Existen otras técnicas complementarias para la caracterización de los sistemas nanoparticulados, entre ellas la DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), utilizada para evaluar el comportamiento térmico de los componentes de una formulación nanoparticulada.

### **1.3.5 Aplicaciones en el campo médico/farmacéutico**

Las principales aplicaciones de las nanopartículas poliméricas en el campo médico/farmacéutico son las que se exponen a continuación:

#### **Diagnóstico mediante imagen**

El desarrollo de agentes de contraste nanoparticulados está contribuyendo en gran medida al campo del diagnóstico y de la imagen a nivel molecular, ya que estos sistemas proporcionan una mayor estabilidad del agente, una toxicidad reducida y una semivida más larga. Además, se está avanzando en el desarrollo de nanopartículas multifuncionales que contienen tanto agentes de contraste como fármacos y en el marcaje de las mismas con ligandos específicos para conseguir agentes de contraste dirigidos hacia un órgano diana. De esta manera, es posible la liberación localizada del agente terapéutico a la vez que se monitoriza su efectividad. Esta combinación de diagnóstico más terapia, también llamada teragnóstico, posibilitará una terapia individualizada para cada paciente (Matsuura y Rowlands 2008).

De entre los diversos materiales que podrían emplearse para este fin, los poliésteres han despertado un gran interés debido sobretodo a su ya mencionada biocompatibilidad. Cabe destacar que, a pesar de su amplia utilización en los sistemas de liberación prolongada de fármacos, hasta el momento existen pocos estudios acerca del uso de nanopartículas de poliésteres como vehículos de agentes de contraste.

En la última década una de las mayores novedades para la obtención de imágenes ópticas ha sido el desarrollo de los nanocristales, también denominados *quantum dots*. Los quantum dots son agentes de contraste inorgánicos fluorescentes que absorben la luz en un amplio margen de longitudes de onda, pero emiten una luz casi monocromática en función de su tamaño y composición. La mayoría de estos materiales contienen al menos un componente metálico tóxico en su núcleo, habitualmente cadmio,



lo cual limita su uso clínico. Su solubilidad es otro factor a tener en cuenta, ya que generalmente se preparan en disolventes orgánicos no polares. Es por ello que estas estructuras deben ser vehiculizadas en materiales biodegradables y biocompatibles como las nanopartículas poliméricas.

### **Tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias**

Una de las ventajas asociada al tamaño de las nanopartículas, es su captación por parte del sistema fagocítico mononuclear. Así, se ha aprovechado esta característica para su empleo como vector de fármacos dirigidos a estas células. En el caso de *Leishmania*, (parásito intracelular) se han encapsulado diversos fármacos como la anfotericina B en nanopartículas de PLGA o PCL o la primaquina, la pentamidina y la atovacuona en nanopartículas de PLA para su liberación a nivel intracelular en macrófagos (Vila Jato, 2009). Se ha descrito además el uso de nanopartículas de PLGA para la administración en infecciones bacterianas intracelulares como micobacterias (Gaspar y col., 2008), para la cual se ha testado la administración oral del antibiótico estreptomycin así como nanopartículas conteniendo tres fármacos eficaces contra esta bacteria (la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida) y administradas por vía pulmonar (Pandey y Khuller, 2007).

### **Cáncer**

Un campo de investigación de creciente interés es la aplicación de estas nanopartículas en la terapia frente al cáncer. El empleo de nanopartículas de poliésteres se fundamenta en su capacidad de disminuir la toxicidad sistémica intrínseca de los agentes quimioterápicos, hecho que limita en gran parte la dosis administrada a los pacientes, así como mejora la eficacia de los tratamientos. Las nanopartículas son dirigidas al foco del tumor, desde el que van liberando de manera controlada el fármaco antineoplásico, prolongando la semivida del fármaco y ejerciendo una acción local.

Existen múltiples ejemplos de estos fármacos antineoplásicos encapsulados en partículas de PLGA [5-Fluorouracilo (Li y col., 2008), paclitaxel (Jin y col., 2008), doxorubicina (Yadav y col., 2007), camptotecina, etc. o en nanopartículas de PCL como el tamoxifeno (Shenoy y Amiji, 2005) o el taxol (Kim y Lee, 2001).

### **Restenosis**

La restenosis es una enfermedad en la que se produce el estrechamiento y obstrucción de una arteria, que experimentan algunos pacientes tras haberse sometido a un procedimiento de angioplastia. La administración controlada y sostenida de fármacos desde nanopartículas implantadas en el lugar de la intervención quirúrgica se ha postulado como una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. El tamaño de las nanopartículas permite su penetración en la pared arterial, desde donde se puede liberar el fármaco, alcanzando así un mayor efecto terapéutico. Diversas moléculas han sido encapsuladas en nanopartículas de PLGA para ser empleadas en el tratamiento de la restenosis, tales como el agente antiproliferativo U-86983, lisinopril, saclitaxel, dexametasona, rapamicina, alendronato o la trigina (Vila Jato, 2009).

### **Vacunación**

En los últimos años se ha estudiado la encapsulación o adsorción de antígenos en la superficie de nanopartículas biodegradables con el objetivo de desarrollar mejores vacunas y reducir tanto la frecuencia como el número de dosis requeridas para la inmunización. Además se ha estudiado el empleo de nuevas vías de administración de vacunas que resulten más seguras para el paciente. Las nanopartículas que contienen

antígeno encapsulado pueden ser empleadas como un adyuvante eficaz, dado que pueden actuar como reservorio y liberar el antígeno de manera sostenida, así como protegerlo de la degradación y dirigirlo a las mucosas en el caso de la inmunización oral, nasal o pulmonar, o a las células presentadoras de antígeno en el caso de las inoculaciones parenterales.

### **Terapia génica**

Las nanopartículas poliméricas de PLGA han sido empleadas para el desarrollo de vectores no virales en terapia génica. Los vectores virales presentan problemas de inmunogenicidad, además de su posible integración en el genoma celular y la limitación del material genético que son capaces de incorporar. En los últimos años se han descrito múltiples vectores no virales modificados con lípidos catiónicos, polímeros canónicos (Wasungu y Hoekstra, 2006), etc... El empleo de las nanopartículas de poliésteres como vectores garantiza una mayor estabilidad, una mayor duración de la expresión génica y sobre todo una menor citotoxicidad al emplear polímeros biodegradables y biocompatibles.

### **Administración de péptidos y proteínas**

El desarrollo experimentado en los últimos años en la tecnología para la producción y purificación de proteínas terapéuticas recombinantes, así como la alta especificidad y actividad de las mismas, ha provocado un creciente interés por el empleo de éstas en el tratamiento de múltiples enfermedades. El desarrollo de esta tecnología, ha forzado el progreso paralelo de tecnologías para la administración de estas macromoléculas, ya que la administración libre de las mismas presenta problemas de baja biodisponibilidad por vía oral debido a su inestabilidad en el tracto gastrointestinal, a que presentan una semivida corta por la acción de las proteasas, y a que muchas de ellas no son capaces de difundir a través de determinadas barreras biológicas como la barrera hematoencefálica. En los últimos años se han intensificado los esfuerzos para la encapsulación de estas proteínas y péptidos en nanopartículas de PLGA, ya que estos vectores poliméricos pueden mantener su integridad y actividad.

Así por ejemplo, se han descrito trabajos de formulación de nanopartículas de PLGA para mejorar la biodisponibilidad de péptidos como la ciclosporina A y de hormonas como la insulina. Otra de las vías estudiadas para la administración de proteínas es la pulmonar. Se han diseñado nanopartículas de PLGA recubiertas de quitosano para la administración pulmonar del péptido calcitonina (Vila Jato, 2009).

### **Tratamiento de la inflamación**

Uno de los principales inconvenientes de los fármacos antiinflamatorios, por ejemplo, diclofenaco o indometacina, es su toxicidad local en contacto con los tejidos. Estos fármacos inducen úlceras en la mucosa gastrointestinal cuando son administrados por vía oral y pueden provocar daño en el epitelio córneo tras su instilación o en el tejido muscular tras su inyección. La toxicidad local puede reducirse de forma considerable mediante encapsulación de estos fármacos en nanopartículas o liposomas, manteniendo intacta la actividad del fármaco debido a la mejor repartición de las nanopartículas a lo largo del tracto gastrointestinal, con lo que las concentraciones locales serían mucho más bajas y se reducirían los efectos ulcerativos (Guterres y col., 1995).

En el caso de tratamientos oculares, un importante incremento en la biodisponibilidad de la indometacina fue descrito al incorporar este fármaco en nanocapsulas de PCL (Calvo y col., 1996). Mediante microscopía confocal, se pudo demostrar que la formulación de nanocápsulas aumentaba la penetración del principio activo en el

epitelio de la córnea por un mecanismo de endocitosis. Un trabajo similar utilizando ibuprofeno encapsulado en nanopartículas de Eudragit también demostró de forma concluyente que estos nanosistemas aumentaban la biodisponibilidad del antiinflamatorio y la eficacia de su actividad farmacológica (Bucolo y col., 2002).

### **Tratamiento del dolor**

Aunque la investigación de nanopartículas en el campo del dolor se encuentra en su fase inicial, recientemente formulaciones similares como los liposomas han atraído la atención acerca de su potencial uso en el tratamiento y control del dolor, principalmente como vehículos capaces de sostener la liberación de compuestos anestésicos. Estos vehículos pueden ser utilizados por vía tópica o por inyección directa en el momento de la intervención quirúrgica. Para anestesia local, la formulación de liposomas conteniendo anestésicos (lidocaína, tetracaína, etc.) se incorporó en una crema que fue aplicada sobre la superficie de la piel (Grant, 2003). Estas formulaciones permitían una administración eficaz y mostraban un inicio de la acción comparable a otras formulaciones en uso (Vila Jato, 2009).

Los liposomas también forman parte de las técnicas emergentes para analgesia postoperatoria en cirugía ortopédica (Viscusi, 2004). Se han propuesto para la administración de morfina como una alternativa a los otros tratamientos convencionales del dolor con este fármaco (Viscusi, 2004). La formulación liposomal de morfina propuesta para el control postoperatorio del dolor es una formulación de liberación prolongada de administración epidural.

Además de los liposomas, un estudio reciente ha demostrado la eficiencia de las nanocápsulas lipídicas sólidas con ibuprofeno para el tratamiento y control del dolor (Lamprecht y col., 2004). Administradas a animales de laboratorio por vía oral o por vía intravenosa, estas nanocápsulas inducían un alivio del dolor durante un periodo prolongado. Una ventaja de este sistema es que ofrece una formulación inyectable de ibuprofeno, lo cual es una alternativa interesante a las formulaciones convencionales que conllevan elevadas cantidades de tensioactivos o cosolventes.

## 2 OBJETIVOS

Los objetivos de la presente Memoria tienen dos vertientes claramente diferenciadas y, a la vez complementarias. De acuerdo con lo expuesto en la Introducción, se conjugan aspectos farmacológicos/farmacodinámicos en el campo de la analgesia, con investigaciones biofarmacéuticas en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos, concretamente de nanopartículas.

En primer lugar se pretende poner de manifiesto el mejor perfil farmacológico/farmacodinámico respecto a la actividad analgésica de una serie de antidepresivos tricíclicos y, seleccionar aquellos fármacos que presenten mayor actividad a partir de un estudio comparativo utilizando la rata como animal de experimentación. Los antidepresivos tricíclicos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de trastornos depresivos desde los años '60 (Baldessarini, 1995). Su acción terapéutica parece cursar por bloqueo de la recaptación de noradrenalina y/o serotonina, aumentando así los niveles disponibles de estos neurotransmisores. Sin embargo, poseen otros mecanismos de acción, como el bloqueo de los canales de sodio. De ahí que se haya apuntado su posible uso como potenciales analgésicos (Pancrazio y col., 1998; Wang y col., 2004).

En segundo lugar y, una vez seleccionados los fármacos con mejor perfil farmacológico/farmacodinámico, se pretende obtener el máximo rendimiento de los mismos mediante el diseño de nanopartículas utilizando el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) como polímero. Las nanopartículas, como consecuencia de su reducido tamaño y gran superficie específica pueden proporcionar grandes ventajas terapéuticas respecto a las formas convencionales, si el diseño tecnológico de estas formas farmacéuticas de liberación modificada es el adecuado (Debbage, 2009). Este hecho se debe principalmente a que las nanopartículas permiten mantener al fármaco durante más tiempo en el lugar de acción (aspecto temporal) y que acceda mayor cantidad del mismo a la diana terapéutica (acción espacial), minimizando a su vez los efectos secundarios de los fármacos.

Por otro lado, la bupivacaína es un anestésico local de tipo amida clasificada como de larga duración de acción y de elevada potencia anestésica y de amplio uso en clínica tras su administración por infiltración como analgésico postoperativo (Sawynok y col., 2001). Sin embargo, se han descrito algunos efectos cardiovasculares y signos de toxicidad en el sistema nervioso central tras su administración frecuente, incluso a dosis no muy elevadas (Arky y Charles, 2003; Zhang y col., 2008). Un posible procedimiento para minimizar estos efectos adversos, sería formular la bupivacaína en nanopartículas poliméricas.

En resumen, los objetivos de la presente Memoria pueden concretarse en los siguientes puntos:

- 1.- Estudio comparativo de la acción analgésica de una serie de antidepresivos tricíclicos: amitriptilina, doxepina, imipramina, desipramina, nortriptilina, fluoxetina y fluvoxamina, utilizando al anestésico local bupivacaína como referencia.



2.- Desarrollo, caracterización, estudio del mecanismo de liberación y evaluación de la actividad analgésica de nanopartículas de PLGA conteniendo bupivacaína para administración subcutánea.

3.- Desarrollo, caracterización, estudio del mecanismo de liberación y evaluación de la actividad analgésica de nanopartículas de PLGA de los antidepresivos tricíclicos seleccionados (amitriptilina, doxepina e imipramina) para administración subcutánea.

Para llevar a cabo estos objetivos, el plan de trabajo de la presente Memoria ha sido el siguiente:

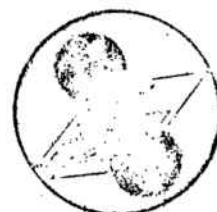
- (1) Estudio comparativo de la evolución temporal del efecto analgésico frente a un estímulo nociceptivo térmico a distintas dosis de una serie de antidepresivos (amitriptilina, doxepina, imipramina, desipramina, nortriptilina, fluoxetina, fluvoxamina) tras administración subplantar en rata para seleccionar los fármacos más potentes y/o de efecto más sostenido.
- (2) Evaluación de la actividad analgésica/antialodínica de los fármacos seleccionados en el estudio anterior frente al dolor neuropático en animales inducidos con lesión constrictiva crónica del nervio ciático. Como referencia se utilizará el anestésico local bupivacaína.
- (3) Puesta a punto y validación de las técnicas analíticas por HPLC tanto para la bupivacaína como para los antidepresivos tricíclicos seleccionados por su potencia analgésica (amitriptilina, doxepina e imipramina).
- (4) Diseño y preparación de nanopartículas poliméricas de PLGA (50:50) conteniendo bupivacaína o los antidepresivos tricíclicos previamente mencionados.
- (5) Caracterización *in vitro* de las nanopartículas preparadas, mediante la determinación del tamaño de partícula, potencial zeta, SEM, eficiencia de encapsulación y carga de fármaco.
- (6) Estudios de liberación *in vitro* y elucidación del mecanismo de liberación de los fármacos a partir de las nanopartículas preparadas, mediante el ajustado de distintos modelos a los datos experimentales de cantidad disuelta acumulada en función del tiempo.
- (7) Evaluación de la actividad analgésica y antialodínica de las nanopartículas mediante estímulo térmico y mecánico, respectivamente, y utilizando a la rata como animal de experimentación.

### **3 PUBLICACIONES**

**3.1 Analgesic and antiallodynic effects of antidepressants after infiltration into the rat.**

**3.2 In vitro characterization and in vivo analgesic and anti-allodynic activity of PLGA-bupivacaine nanoparticles.**

**3.3 Tricyclic antidepressants-loaded biodegradable PLGA nanoparticles: in vitro characterization and in vivo analgesic and anti-allodynic effect.**



### 3.1 ANALGESIC AND ANTIALLODYNIC EFFECTS OF ANTIDEPRESSANTS AFTER INFILTRATION INTO THE RAT

*[Pharmacology. 2010; 86(4):216-23]*

Los antidepresivos tricíclicos pueden ser una opción terapéutica real para el tratamiento de estados de dolor crónico como el dolor neuropático gracias a su capacidad de producir una acción analgésica duradera. Sin embargo, hay pocos datos que comparen la relación dosis-respuesta bajo las mismas condiciones experimentales.

En este trabajo se investigó tanto la evolución temporal del efecto analgésico como la dependencia de la dosis de un amplio grupo de antidepresivos por vía subplantar en la rata sana frente a un estímulo nociceptivo térmico. Se seleccionaron fármacos inhibidores mixtos de la recaptación de serotonina y norepinefrina (amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, doxepina) e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (fluoxetina y fluvoxamina). De todos éstos, los que resultaron ser más potentes y/o de efecto más sostenido se evaluaron posteriormente frente a una de las manifestaciones de dolor neuropático, la alodinia, en animales inducidos con lesión constrictiva crónica del nervio ciático. En ambos casos se usó el fármaco anestésico bupivacaína como referencia.

Con los resultados obtenidos se construyó una curva dosis-respuesta analgésica para cada fármaco. El efecto analgésico más duradero se obtuvo para la doxepina y la imipramina. A pesar que la amitriptilina a dosis bajas mostró una actividad similar a la de la doxepina, dosis mayores no incrementaron su analgesia. Los inhibidores selectivos de la serotonina no mostraron una acción farmacológica relevante a ninguna de las dosis ensayadas.

En animales inducidos con lesión constrictiva crónica del nervio ciático, la doxepina y, en menor grado la amitriptilina y la imipramina, mostraron una importante protección frente a la alodinia. La bupivacaína no resultó efectiva.

Desde un punto de vista comparativo, la duración del efecto antialodínico fue menor que la encontrada para los mismos fármacos en los estudios de antinocicepción. Sin embargo, en ambos casos, las dosis efectivas fueron menores que las necesarias para producir un efecto antidepresivo. De los resultados obtenidos, se deduce que la doxepina podría ser considerada como una alternativa real en el tratamiento del dolor.

# Analgesic and Antiallodynic Effects of Antidepressants after Infiltration into the Rat

Xavier Garcia<sup>a</sup> Jaume del Valle<sup>b</sup> Elvira Escibano<sup>a</sup> Josep Domenech<sup>a</sup>  
Josep Queralt<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics Unit, Faculty of Pharmacy, and <sup>b</sup>Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Key Words

Tricyclic antidepressants · Analgesia · Allodynia · Sciatic nerve

## Abstract

Tricyclic antidepressants (TCA) have potent local anesthetic properties and may produce a long-lasting pain blockade that could be of interest in relieving chronic pain states such as neuropathic pain, but there are only few data comparing their dose-response curves of analgesic activity under the same experimental conditions. This study examines the time course of pain-relieving properties of 7 TCA in heat-induced paw withdrawal after subcutaneous administration. Mixed inhibitors of norepinephrine and serotonin uptake (amitriptyline, nortriptyline, imipramine, desipramine, doxepin) and selective inhibitors of serotonin uptake (fluoxetine and fluvoxamine) were assayed. The TCA with the longest analgesic activity were selected to test its antiallodynic effect in the neuropathic pain model of chronic sciatic nerve constriction injury. Bupivacaine was used as a reference drug in both experiments. A dose versus time of maximal analgesic effect curve was constructed for each drug. The longest analgesic effect was obtained for doxepin and imipramine. Although low doses of amitriptyline showed the same activity than doxepin, higher doses failed to reach the same effect. Selec-

tive inhibitors of serotonin showed no action at all doses tested. In the chronic sciatic nerve constriction injury model, doxepin and, to a smaller degree, amitriptyline and imipramine protected from allodynia; bupivacaine was ineffective. The antiallodynic effect always lasted less long than the analgesic effect. These observations provide support for the potential use of TCA as durable analgesics. Doxepin overall showed the most outstanding results in pain relief.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Tricyclic antidepressants (TCA) have been widely used for the treatment of major depressive disorders since the early 1960s [1]. Their therapeutic action seems to be caused by blocking the reuptake of noradrenalin and/or serotonin, thus increasing the levels of these neurotransmitters available to bind the postsynaptic receptor. Noradrenalin and serotonin are also implicated in enhancing endogenous analgesic mechanisms via descending inhibitory pain pathways in the brain and spinal cord that modulate incoming pain impulses.

But antidepressants have other mechanisms of action, such as the inhibition of sodium channels, which increase the interest in their use as local anesthetics [2, 3]. Several

in vivo and in vitro reports showed that amitriptyline is a potent voltage-gated Na<sup>+</sup> channel blocker [4, 5], even more than the local anesthetic bupivacaine [6]. Site-directed mutagenesis studies indicate that the receptor site for amitriptyline within the voltage-gated Na<sup>+</sup> channel overlaps with that for local anesthetics [7]. Thus, TCA interact with several molecular targets, and their ability to relieve pain may not be attributable to a single molecular mechanism. Although several reports state the higher antinociceptive effect of amitriptyline, doxepin and imipramine, especially compared to bupivacaine [8, 9], only few works have studied its analgesic activity after local peripheral administration, and to our knowledge, there are no studies comparing their dose-response curves of analgesic activity under the same experimental conditions.

Neuropathic pain is a chronic pain state characterized by painful spontaneous burning sensations, hyperalgesia (hypersensitivity to pain) and allodynia (perception of a nonnoxious stimulus like a light touch as painful). Such pain occurs as a result of injuries to or dysfunctions in the peripheral and central nervous systems. The exact mechanism of the development and maintenance of neuropathic pain has not been elucidated. However, many studies indicate an interaction between the nervous system and the immune system [10]. Standard treatments for alleviating this pain, such as nonsteroidal antiinflammatory drugs or even opioids, are ineffective. Subtypes of tetrodotoxin-resistant, voltage-gated sodium channels are involved in the development of certain types of neuropathic pain. After nerve injury, hyperexcitability – caused by accumulation of sodium channels – and spontaneous firing take place at the site of injury and in the dorsal root ganglion cell bodies. The fact that these sodium channels only seem to be present in peripheral nerves and that they can be kept in a resting state, offers the possibility for developing drugs which selectively block these damaged and overexcited nerves [11]. According to Vissers et al. [12], the selection of the antiallodynia test is important to complete the comparison of the potencies of drugs. Few reports, often with no concordant results, exist on the antiallodynic effect of TCA after subcutaneous infiltration. Recently, Su et al. [13] reported that intravenous amitriptyline, acting as a sodium channel blocker, selectively inhibits ectopic discharge at a low frequency and bursting discharge in a rat neuropathic pain model. Amitriptyline suppressed mechanical allodynia following peripheral administration, but not following intraperitoneal injection, in a rat model of neuropathic pain [14]. Hota et al. [15] reported that imipra-

mine modulated hyperalgesia and allodynia in a partial sciatic nerve transaction model of neuropathic pain. No clear data on the effect of doxepin administered alone in animal models of allodynia are available.

Based on the previous work and the above considerations, the objective of this study was to perform a comparison of the dose dependence and time course of the pain-relieving properties of seven TCA after local infiltration into the rats under the same experimental conditions, and to select the more effective TCA for testing their allodynia-relieving properties in a neuropathic model of pain. Bupivacaine was used as a reference drug in both experiments.

## Materials and Methods

### Materials

Amitriptyline, doxepin, imipramine, nortriptyline, desipramine, bupivacaine, fluoxetine hydrochlorides and fluvoxamine maleate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sodium chloride 0.9% was obtained from Braun (Rubí, Spain). Figure 1 shows the chemical structures of the drugs used in this study.

### Animals and Experimental Procedures

The studies were conducted under a protocol approved by the animal experimentation ethics committee at the University of Barcelona, Spain. The animals were treated in accordance with the Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals as issued by the International Association for the Study of Pain [16].

A total of 198 adult male Sprague-Dawley rats (300–350 g) were purchased from Harlan Interfauna Ibérica (St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) and were subjected to a quarantine period of 7 days at arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to a controlled diet and tap water ad libitum. The temperature and relative humidity of the filtered air were continuously monitored. The temperature was kept at 24 ± 1°C, and the relative humidity at 50–60%. Artificial lighting was used to create a 12/12-hour light/dark cycle.

Experiments were conducted on animals that had been handled daily for 3 days to get familiarized with the experimenter, the experimental environment and the testing equipment. All experiments were conducted in the morning in order to avoid possible circadian influences on measured variables.

### Analgesic Effect on Nociceptive Pain

Pain due to thermal stimulation was determined using a plantar test (Ugo Basile, Comerio, Italy) based on that described by Hargreaves et al. [17]. The rats were individually placed in Plexiglas cubicles over a glass surface and maintained at a room temperature of 25°C. Radiant heat emitted by a focused projection bulb was applied to the midplantar surface of each hindpaw. The current stimulus was maintained at 4.5 A, and the maximum time of exposure was set to 20 s to limit possible tissue damage. The time elapsed to the brisk withdrawal of the hindpaw from the



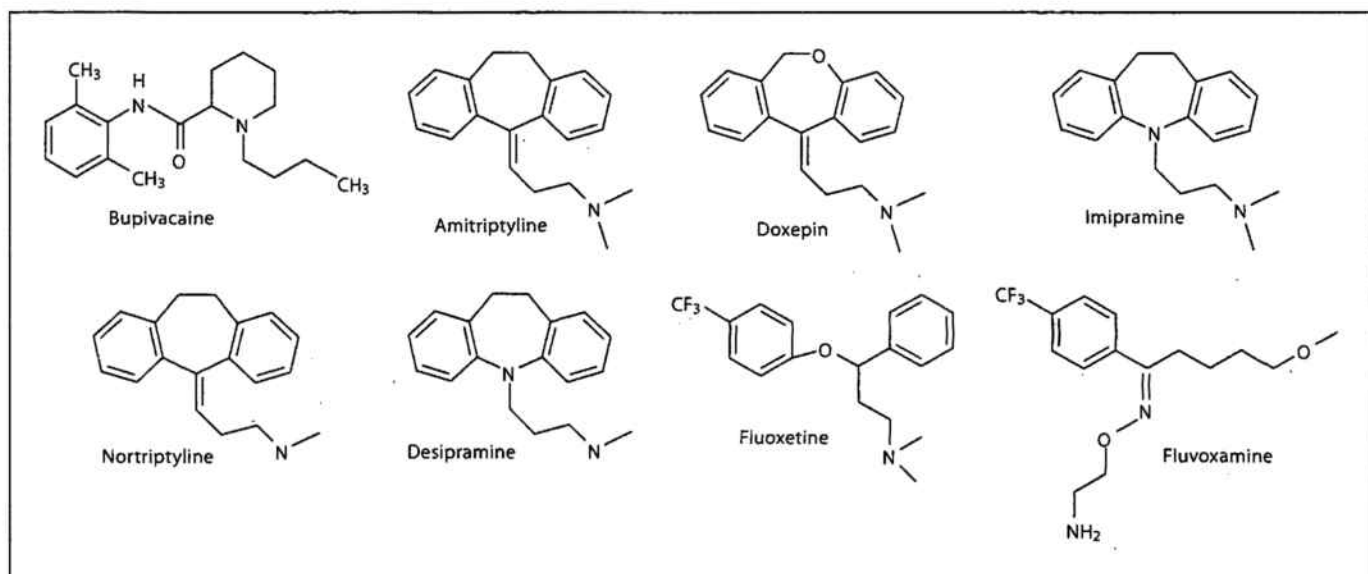


Fig. 1. Chemical structures of the drugs assayed.

thermal stimulus was automatically recorded using photodiode motor sensors.

Thermal sensitivity, expressed in seconds, was measured in both hindpaws, and only animals with a basal reaction time lower than 10–12 s were selected for treatment. Thus, the maximum analgesic effect was reached when the reaction time increased from 10–12 to 20 s. All animals were randomly allocated to groups of 6 animals and were administered 100  $\mu$ l of a solution of the different drugs in saline, at different dose levels (table 1). An additional group received the vehicle alone (control group). In all cases, the solution was subcutaneously injected into the plantar surface of the right hindpaw (subplantar administration).

The heat-induced paw withdrawal threshold was measured in both paws before treatment (time 0) and 2.5, 5 and 10 min after injection, and then every 10 min after administration of TCA or bupivacaine. Each experiment was finished when the paw withdrawal latency came back to the pretreatment value. The mean of 2 recordings was calculated at each time.

#### Antiallodynic Effect on Nerve Injury

The chronic constriction injury model is a model of peripheral mononeuropathic pain caused by an injury to the peripheral nervous system. This model induces signs and symptoms that mimic human conditions of neuropathy. Before surgery, tactile sensitivity (nociceptive thresholds) of the animals, expressed in grams, was measured in both hindpaws, using an automated apparatus for applying reproducible light touch (Dynamic Plantar Aesthesiometer 37400; Ugo Basile). The animals were placed in their compartments on the metal mesh surface. After a short period in which they showed exploratory behavior, they remained still in a resting position. At this time, the test began. With the help of an adjustable angled mirror, the tactile stimulator unit was placed beneath the selected hind paw to position the filament below the plantar surface of the animal. When the unit was started,

Table 1. Doses assayed in plantar test for each drug

	Dose, mg
Bupivacaine	0.25, 0.5, 1 and 1.25
Amitriptyline	0.0625, 0.125, 0.25 and 0.5
Doxepin	0.0625, 0.075, 0.125, 0.25 and 0.5
Imipramine	0.09, 0.125, 0.25 and 0.5
Nortriptyline	0.125, 0.25 and 0.5
Desipramine	0.25, 0.5 and 1
Fluoxetine	0.25 and 0.5
Fluvoxamine	0.25 and 0.5

the electrodynamic actuator lifted the stainless steel filament, which touched the plantar surface and began to exert an upward force below the threshold of feeling. The force was increased until the animal moved its paw or until a maximal cutoff value of 50 g was applied for 20 s. This cutoff value was taken for the sham-operated healthy control animals.

The animals were then subjected to the chronic constriction injury model, as previously described by Bennett and Xie [18]. Nerve or sham surgery was performed on all rats under isoflurane anesthesia (Inibsa SA, Spain; 4% induction and 3% maintenance) and oxygen. Surgery was always performed on the left hindleg. The common sciatic nerve was exposed at the level of the middle of the thigh by blunt dissection through the biceps femoris. Proximal to the sciatic trifurcation, about 7 mm of nerve was freed of adhering tissue, and 4 ligatures (Ethicon Mersilk 4.0; Johnson & Johnson, Scotland) were loosely tied around it with about 1 mm of spacing. The muscle and the skin were closed in 2 layers with

Ethicon Mersilk 4.0. Sham controls were performed for each surgery by exposing the nerve without inducing any ligature. All surgical procedures were carried out under sterile conditions and were performed by the same experimenter.

Constriction injury to the sciatic nerve reduced the pain threshold on the ipsilateral paw from 50 to 12–14 g, indicating that tactile allodynia had developed. Four days after the surgery, the antiallodynic effect of the administered drugs was tested in allodynic animals. The rats were randomly allocated to 5 groups of 6 animals and were subcutaneously injected in the ipsilateral paw with 100  $\mu$ l of a solution of the different drugs in saline 0.9% NaCl. Amitriptyline, doxepin and imipramine were given at 0.5 mg, while bupivacaine was administered at 1 mg. An additional group received the vehicle alone and acted as the control group. After a washout period, the animals were administered the same doses in the contralateral paw in order to investigate the possible systemic effect.

Allodynia was measured, as previously described, at selected times after drug treatment. Two determinations were conducted at each time point.

#### Data Analysis

For each drug and dose, the duration of the analgesic effect (in minutes) on nociceptive pain was established until the recovery of the basal pain threshold. A dose-response curve was constructed for each drug. Different equations were fitted to the data and the best approach was selected (based on the highest correlation coefficient value,  $R^2$ ) to calculate the effective dose able to reach a 120-min analgesic effect ( $ED_{120}$ ) for each drug. Fittings were performed by means of Sigma Plot version 7.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc., Chicago, Ill., USA).

To evaluate the time course of antiallodynia during treatment, comparisons of tactile sensitivity (in grams) at each time point were conducted between the different administration groups. Data are expressed as means  $\pm$  SD.

Additionally, in the antinociceptive experiments, the values of the area under the curve (AUC) were calculated from the curve between the paw withdrawal thresholds versus the different time points of measurement for animals administered 0.25 and 0.5 mg for all drugs and for the control animals. In the antiallodynia experiments, the AUC values were calculated from the curve between the differences in the force inducing paw withdrawal before and after treatment versus the different time points of measurement for all groups. The trapezoidal rule was the method used for AUC determinations by means of WinNonlin version 2 professional software (Pharsight, Mount View, Calif., USA).

All data were statistically compared by means of an ANOVA, followed by a post hoc test (Scheffé method) when necessary. Statistical analysis was performed using the SPSS package, version 15.0 (SPSS Inc.).  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all cases.

## Results

No animals showed signs of respiratory distress or displayed symptoms of motor impairment or paralysis.

### Analgesic Effect on Nociceptive Pain

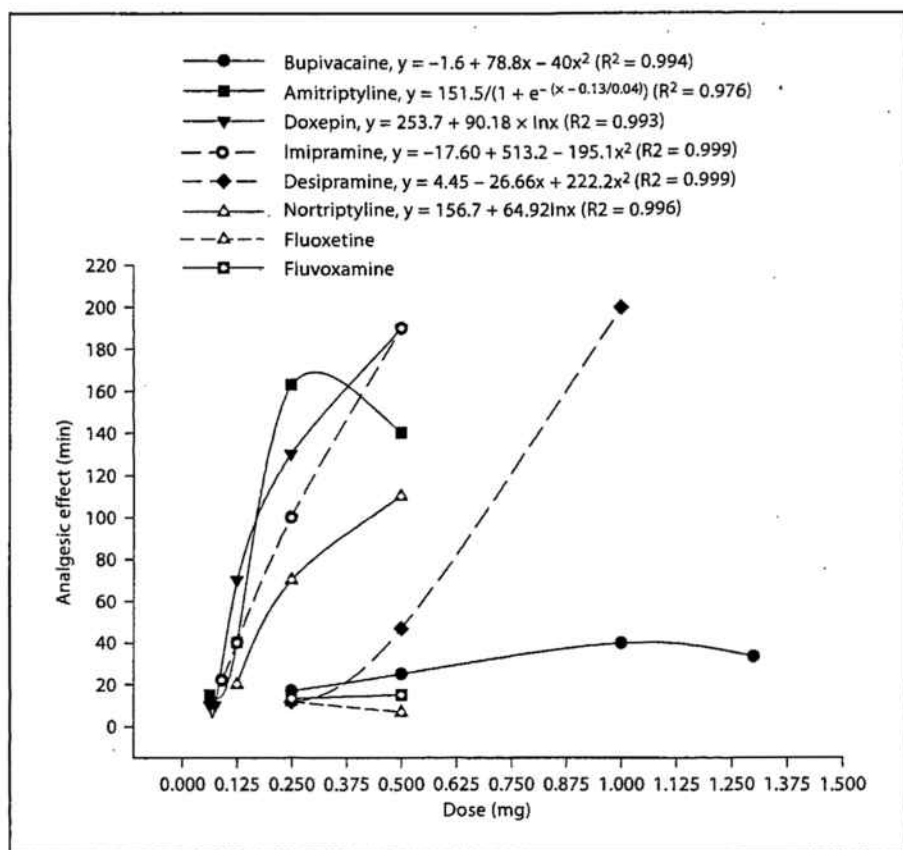
All drugs reached its maximum antinociceptive effect 2.5 min after dosing. The persistence of this effect was dose dependent. Figure 2 shows the dose (milligrams/paw)-response (minutes of analgesia) curves for the different drugs tested. The bupivacaine, imipramine and desipramine dose-response curves fitted to a polynomial quadratic model. The doxepin and nortriptyline data fitted to a logarithmic model, while a sigmoid equation was obtained for amitriptyline. Based on these equations, which showed  $R^2$  from 0.976 to 0.999, the  $ED_{120}$  was predicted for each drug. Values of 0.19, 0.23, 0.30, 0.57 and 0.79 mg per paw were obtained for amitriptyline, doxepin, imipramine, nortriptyline and desipramine, respectively. The  $ED_{120}$  values could not be calculated for bupivacaine, fluoxetine and fluvoxamine because of their flat dose-response curve profiles.

The analgesic effect of bupivacaine did not exceed 40 min of duration, even at high doses (1 mg/paw). Analgesia was observed neither when selective inhibitors of serotonin uptake (fluoxetine and fluvoxamine) were given at any dose level. The dose-response curve of amitriptyline showed a decrease when the dose was increased to 0.5 mg per paw, which occurred simultaneously with the appearance of a considerable paw edema after administration at this dose level. Thus, only the analgesic effect of doxepin, imipramine (0.5 mg/paw) and high doses of desipramine (1 mg/paw) lasted more than 180 min. Nortriptyline was not tested at doses higher than 0.5 mg due to its insolubility in saline.

None of the administered drugs produced any systemic analgesia since no differences with respect to the control group could be observed in the nonadministered contralateral paw.

At 0.25 mg, the rank order of AUC values was amitriptyline > doxepin > imipramine > nortriptyline > bupivacaine > fluvoxamine > desipramine > fluoxetine (2,984  $\pm$  140.1, 2,818  $\pm$  364.1, 2,376  $\pm$  79.3, 2,122  $\pm$  177.6, 1,701  $\pm$  22.1, 1,499  $\pm$  48.6, 1,321  $\pm$  114.2 and 1,196  $\pm$  27.5 min·s, respectively). Only amitriptyline, doxepin, imipramine and nortriptyline showed significantly higher ( $p < 0.05$ ) values than the control group (AUC = 1,560  $\pm$  98.6 min·s). At this dose level, amitriptyline and doxepin showed the highest AUC values ( $p < 0.05$ , compared to imipramine and nortriptyline).

At 0.5 mg, the highest AUC values were obtained for doxepin and imipramine (3,787  $\pm$  5.5 and 3,550  $\pm$  38.5 min·s, respectively), followed by amitriptyline and nortriptyline (3,009  $\pm$  128.0 and 2,758  $\pm$  227.6 min·s, respectively). Then, the following rank order was found:



**Fig. 2.** Analgesic effects per dose and best-fitted equations of the drugs assayed. Each point is the mean of 2 measures.

desipramine > bupivacaine > fluvoxamine > fluoxetine (2,206 ± 80.5, 1,867 ± 185.7, 1,531 ± 121.8 and 1,150 ± 101.2 min·s, respectively). No statistical differences with respect to the control group were found for fluoxetine and fluvoxamine, while the values obtained for amitriptyline, doxepin, imipramine, desipramine and nortriptyline were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of the control group. At this dose level, doxepin and imipramine showed the highest AUC values ( $p < 0.05$ , compared to amitriptyline and nortriptyline).

#### Anti-Allodynic Effect on Nerve Injury

The antiallodynic effect of the 3 antidepressant drugs with the highest analgesic effect – amitriptyline, doxepin and imipramine – at 0.5 mg per paw, compared to bupivacaine (1 mg/paw), is shown in figure 3. Amitriptyline and imipramine induced a significant antiallodynic effect up to 70 min after injection, while the antiallodynic effect at the same dose of doxepin lasted up to 90 min ( $p < 0.05$ , with regard to the other drugs in this time period between 70 and 90 min after dosing). No significant antiallodynic effect with respect to the con-

trol was observed at the high dose of bupivacaine assayed.

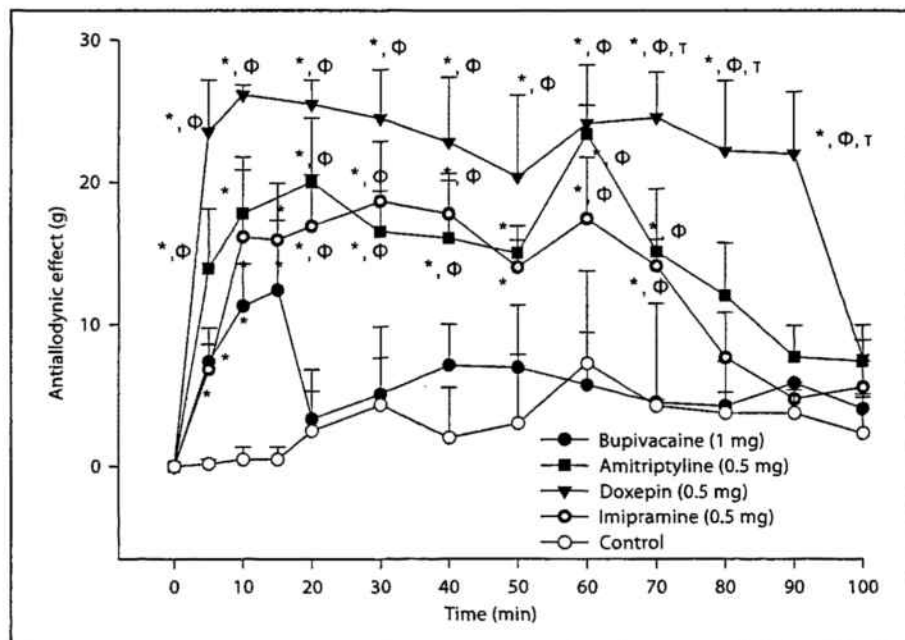
The AUC values for all drugs were statistically higher ( $p < 0.05$ ) than that obtained for the control group (105.2 ± 40.46 min·g). The values obtained for doxepin (2,745 ± 213.1 min·g), amitriptyline (1,775 ± 282.4 min·g) and imipramine (1,277 ± 234.9 min·g) were 4.1, 2.6 and 1.9 times higher than that of bupivacaine (675.8 ± 234.7 min·g). The antiallodynic effect of doxepin was statistically stronger than that of amitriptyline and imipramine. None of the tested drugs showed an antiallodynic effect when administered to the contralateral paw.

#### Discussion

The results obtained in the present study evidence that amitriptyline, imipramine and doxepin (TCA nonselectively blocking the reuptake of monoamines) express the most potent analgesic effect, as previously pointed out by other authors [19, 20]. Nortriptyline, desipramine, fluoxetine and fluvoxamine were clearly less potent than the



**Fig. 3.** Time course of the antiallodynic effect after administration of bupivacaine at 1 mg, and amitriptyline, doxepin and imipramine at 0.5 mg. Whiskers: SD. \*  $p < 0.05$  compared with saline (control);  $\Phi$   $p < 0.05$  compared with bupivacaine;  $\tau$   $p < 0.05$  compared with amitriptyline and imipramine.



other ones and failed to elicit a complete nerve blockade even at high doses. Furthermore, the high  $ED_{120}$  values obtained for them suggest that they would be of only limited use in local anesthesia. Despite their subtle differences in structure, TCA do not differ markedly in their  $IC_{50}$  values for  $Na^+$  channel block in vitro [21, 22]. All TCA block  $Na^+$  currents rather effectively, which suggests that TCA can bind to the  $Na^+$  channels with relatively high affinity compared to bupivacaine. But, according to our results, there probably is another factor related to the structure-activity relationship that influences the effectiveness of analgesia: tertiary amines (amitriptyline, doxepin and imipramine) have different physical/chemical properties from the secondary amines desipramine and nortriptyline – in fact metabolites of imipramine and amitriptyline, respectively – that determine their potency, as seen from the results obtained [20]. Although some studies state that the higher analgesic activity of fluoxetine compared to fluvoxamine was based on the inhibition of G-protein-activated inwardly rectifying  $K^+$  and voltage-gated  $Na^+$  channels, we found no action at the tested doses for both drugs [23].

Regarding the route of administration, the intrathecal route has been extensively explored by other authors for the administration of TCA. Intrathecal amitriptyline reversed thermal hyperalgesia induced by carrageenan in a dose-dependent manner at 60  $\mu$ g [24]. Wordliczek et al. [25] reported that doxepin administered intrathecally at

62.5  $\mu$ g increased the nociceptive threshold in the paw pressure test, reduced formalin-induced pain behavior and potentiated the morphine antinociceptive effect in the formalin test, and Cheng et al. [26] observed satisfactory anesthetic effects on motor activity, proprioception and nociception at 86  $\mu$ g. These latter results indicate that local analgesic effects of doxepin could be potentiated by spinal modulating effects on nociceptive pathways. In our study, we have administered doxepin at a higher dose but via a different route (subcutaneous), and the results obtained showed that at low subcutaneous doses ( $ED_{120} = 0.23$  mg), the drug provides a prolonged analgesia in the animal species assayed. This issue regarding the route of injection was also discussed by Devulder [27], who concluded that subcutaneous morphine (also at higher doses) provides pain control superior to intrathecal morphine.

Oatway et al. [28] tested the local subplantar administration of amitriptyline and showed that 15 min after the thermal injury (exposure of the hindpaw to 52°C for 45 s), it produced analgesia at doses between 0.08 and 0.28 mg when injected into the ipsilateral paw. In our studies, the dose-response curve and observations obtained for this drug evidenced that higher doses did not prolong the pharmacologic effect and increased the paw volume, but that a dose of 0.19 mg would ensure a 120-min analgesia (fig. 2). The mechanisms underlying this intrinsic paw edema produced by amitriptyline remain unclear, as also

pointed out by other authors [28, 29]. However, the paw edema seems to be expressed independently of analgesic action and both effects appear to coexist. Further observations regarding the toxicity of the drug were made by Barnett et al. [30]. Although they worked with around 10-fold higher doses and a different injection technique (near the trochanter), they observed spontaneous lesions in the subcutaneous tissue of the rats.

In a chronic sciatic nerve constriction injury model, doxepin and, to a smaller degree, amitriptyline and imipramine protected from allodynia; bupivacaine was ineffective. Bomholt et al. [31] showed that intraperitoneal amitriptyline at 3–30 mg/kg had no effect on allodynia in response to von Frey hair stimulation of the injured hindpaw. Intravenous administration of the same drug at 4.7 mg/kg failed to block allodynia in rats with spinal nerve, ligature-induced painful neuropathy [32]. Our results are in accordance with data obtained for this drug by Sung and Wang [14], who reported that peripheral administration of amitriptyline at doses between 0.028 and 0.28 mg suppressed mechanical allodynia in neuropathic pain produced by tight ligature of the left L5 and L6 spinal nerves. These findings, together with our results, suggest that doses even lower than the one we have used (0.5 mg) for this drug would be effective in this type of pain. Thus, taking into account the paw edema observed at increasing doses of the drug, it would be of interest to minimize the amount of amitriptyline to be injected.

Although imipramine given daily at 3 mg/kg needed 21 days to modulate hyperalgesia in the partial sciatic nerve transaction model of neuropathy [15], we have observed that a single subcutaneous injection of imipramine could be enough to relieve allodynia in rats for a relatively prolonged time (70 min when administering 0.5 mg).

Only topical doxepin at 3.3% has proved to be moderately effective in reducing peripheral neuropathic pain with allodynia [33–35] and pain from oral mucositis re-

sulting from cancer or cancer therapy [36], both in clinical practice. Our results emphasize the potential antiallodynic effect of doxepin via local infiltration since its pharmacological action was clearly stronger than that of amitriptyline, imipramine and bupivacaine. Its antiallodynic activity, located at the injection site, could be based on the combination of different mechanisms of action such as an increase in synaptic adrenergic activity by deactivation of norepinephrine reuptake in descending inhibitory pain fibers, or even a possible influence of the high affinity reported for histamine H<sub>1</sub> receptors [37].

## Conclusions

The overall results confirm that, for these drugs, the duration of the antiallodynic effect was shorter than that found in the antinociceptive experiments, but in both cases the doses needed to produce the pharmacological action were lower than those inducing an antidepressant action.

Antidepressants are a mainstay of the treatment of many chronic pain conditions, even when depression is not a factor [38] and its chronic use seems safe and effective [39]. Their potential value as analgesics has recently been confirmed by the approval of the first antidepressant (duloxetine) for the management of diabetic peripheral neuropathic pain [40]. We have tested seven TCA for pain relief at the same dose levels and under the same conditions in order to achieve a comparison of the dose-duration relationship of the drugs. The observations derived from this study – together with those obtained for amitriptyline, imipramine and doxepin in the neuropathic pain model – provide support for the potential use of TCA as durable analgesics. Doxepin showed the most outstanding results in pain relief overall and should be considered as a therapeutic alternative in pain relief.

## References

- 1 Baldessarini RJ, Kando JC, Centorrino F: Hospital use of antipsychotic agents in 1989 and 1993: stable dosing with decreased length of stay. *Am J Psychiatry* 1995;152:1038–1044.
- 2 Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK, Lynch C 3rd: Inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> channels by antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:208–214.
- 3 Wang GK, Russell C, Wang SY: State-dependent block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. *Pain* 2004;110:166–174.
- 4 Ogata N, Narahasi T: Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1989;97:905–913.
- 5 Barber MJ, Starmer CF, Grant AO: Blockade of cardiac sodium channels by amitriptyline and diphenylhydantoin: evidence for two use-dependent binding sites. *Circ Res* 1991;69:677–696.
- 6 Gerner P, Srinivasa V, Zizza AM, Zhuang ZY, Luo S, Zurakowski D, Eappen S, Wang G: Doxepin by topical application and intrathecal route in rats. *Anesth Analg* 2006;102:283–287.

- 7 Nau C, Seaver M, Wang SY, Wang GK: Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:1015-1023.
- 8 Abdel-Salam OMW, Nofal MS, El-Shenawy M: Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res* 2003;48: 157-165.
- 9 Sudoh Y, Cahoon EE, de Girolami U, Wang GK: Local anesthetic properties of a novel derivative, *N*-methyl doxepin, versus doxepin and bupivacaine. *Anesth Analg* 2004;98: 672-676.
- 10 Guneli E, Onal A, Ates M, Bagriyanik HA, Resmi H, Orhan CE, Kolatan HE, Gumustekin M: Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Neurosci Lett* 2010;479: 226-230.
- 11 Kalso E, Tasmuth T, Neuvonen PJ: Amitriptyline effectively relieves neuropathic pain following treatment of breast cancer. *Pain* 1996;64:293-302.
- 12 Vissers KC, Geenen F, Biermans R, Meert TF: Pharmacological correlation between the formalin test and the neuropathic pain behavior in different species with chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:479-486.
- 13 Su X, Liang AH, Urban MO: The effect of amitriptyline on ectopic discharge of primary afferent fibers in the L5 dorsal root in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 2009;108:1671-1679.
- 14 Sung B, Wang GK: Peripherally administered amitriptyline derivatives have differential anti-allodynic effects in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2004;357: 115-118.
- 15 Hota D, Bansal V, Pattanaik S: Evaluation of ketamine, nimodipine, gabapentin and imipramine in partial sciatic nerve transection model of neuropathic pain in rat: an experimental study. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29:443-446.
- 16 Zimmermann M: Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharm* 2001;429:23-37.
- 17 Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J: A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
- 18 Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33:87-107.
- 19 Korzeniewska-Rybicka I, Płaźnik A: Analgesic effect of antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59:331-338.
- 20 Sansone RA, Sansone LA: Pain, pain, go away: antidepressants and pain management. *Psychiatry (Edgmont)* 2008;5:16-19.
- 21 Sudoh Y, Cahoon EE, Gerner P, Wang GK: Tricyclic antidepressants as long-acting anesthetics. *Pain* 2003;103:49-55.
- 22 Dick IE, Brochu RM, Purohit Y, Kaczorowski GJ, Martin WJ, Priest BT: Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *J Pain* 2007;8: 315-324.
- 23 Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K: Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac). *Br J Pharmacol* 2003;138:1119-1128.
- 24 Eisenach JC, Gebhart GF: Intrathecal amitriptyline acts as an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. *Anesthesiology* 1995;83:1046-1054.
- 25 Wordliczek J, Banach M, Labuz D, Przewlocka B: Intrathecal administration of doxepin attenuated development of formalin-induced pain in rats. *J Neural Transm* 2005; 112:1321-1329.
- 26 Cheng BC, Chan BR, Chen TW, Cheng KI, Wang JJ, Chu CC: Doxepin has a potent and long-acting spinal anesthetic effect in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 2006;22:68-74.
- 27 Devulder JE: Subcutaneous morphine is superior to intrathecal morphine for pain control in a patient with hypernephroma. *J Clin Anesth* 1998;10:163-165.
- 28 Oatway M, Reid A, Sawynok J: Peripheral antihyperalgesic and analgesic actions of ketamine and amitriptyline in a model of mild thermal injury in the rat. *Anesth Analg* 2003; 97:168-173.
- 29 Sawynok J, Esser MJ, Reid AR: Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. *Pain* 1999;82:149-158.
- 30 Barnett CS, Louis DN, Kohane DS: Tissue injury from tricyclic antidepressants used as local anesthetics. *Anesth Analg* 2005;101: 1838-1843.
- 31 Bombholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G: Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2005;48:252-263.
- 32 Wang YX, Bowerson SS, Pettus M, Gao D: Antinociceptive properties of fenfluramine, a serotonin reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:1008-1016.
- 33 McCleane GJ: Topical doxepin hydrochloride reduces neuropathic pain: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Pain Clin* 2000;12:47-50.
- 34 McCleane GJ: Topical application of doxepin hydrochloride, capsaicin and a combination of both produces analgesia in chronic human neuropathic pain: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Br J Clin Pharmacol* 2000;49:574-579.
- 35 Besson M, Desmeules J, Piquet V: What is the place of topical analgesia in neuropathic pain? *Rev Med Suisse* 2008;4:1498-1500, 1502-1504.
- 36 Epstein JB, Epstein JD, Epstein MS, Oien H, Truelove EL: Doxepin rinse for management of mucositis pain in patients with cancer: one week follow-up of topical therapy. *Spec Care Dentist* 2008;28:73-77.
- 37 Taylor JE, Richelson E: High-affinity binding of [<sup>3</sup>H]doxepin to histamine H<sub>1</sub>-receptors in rat brain: possible identification of a subclass of histamine H<sub>1</sub>-receptors. *Eur J Pharmacol* 1982;78:279-285.
- 38 Zin CS, Nissen LM, Smith MT, O'Callaghan JP, Moore BJ: An update on the pharmacological management of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *CNS Drugs* 2008;22:417-442.
- 39 da Cunha RJ Jr, Barrucand L, Verçosa N: A study on electrocardiographic changes secondary to use of tricyclic antidepressants in patients with chronic pain (in English, Portuguese). *Rev Bras Anesthesiol* 2009;59:46-55.
- 40 Fishbain DA, Detke MJ, Wernicke J, Chapell AS, Kajdasz DK: The relationship between antidepressant and analgesic responses: findings from six placebo-controlled trials assessing the efficacy of duloxetine in patients with major depressive disorder. *Curr Med Res Opin* 2008;24:3105-3115.

### 3.2 IN VITRO CHARACTERIZATION AND IN VIVO ANALGESIC AND ANTI-ALLODYNIC ACTIVITY OF PLGA-BUPIVACAINE NANOPARTICLES

[*Journal of Nanoparticle Research*. DOI 10.1007/s11051-010-9979-1]

Received: 27 July 2009 / Accepted: 28 May 2010; In press

Un sistema inyectable de liberación modificada que contenga un anestésico local capaz de producir analgesia duradera podría suponer un avance importante en el tratamiento del dolor. La bupivacaína es un anestésico local de larga duración y de elevada potencia anestésica, ampliamente utilizada en infiltración como analgésico post operativo por su rápida acción. Sin embargo, se han descrito algunos efectos cardiovasculares y signos de toxicidad en el sistema nervioso central tras su administración frecuente, incluso a dosis no muy elevadas. Así pues, la encapsulación de bupivacaína podría conllevar una doble ventaja: una liberación prolongada de fármaco que permita optimizar su actividad farmacológica y la reducción de su toxicidad. En este trabajo solo se estudió la primera. Se utilizó una técnica de emulsificación y evaporación del disolvente para obtener nanopartículas de PLGA conteniendo bupivacaína. El mecanismo de liberación *in vitro* del principio activo a partir de la matriz polimérica, y la actividad farmacológica (analgésica y antialodínica) *in vivo* de la formulación se evaluaron posteriormente.

Se obtuvieron nanopartículas con un tamaño de  $453 \pm 29$  nm, una eficiencia de encapsulación de  $82.10 \pm 0.001\%$ , una carga de fármaco de  $45.06 \pm 0.001\%$  y un efecto *burst* a los 30 min de sólo un  $4.6 \pm 0.6\%$ . De acuerdo con el valor del exponente difusional de la ecuación de Korsmeyer-Peppas, ajustada a los datos experimentales de cantidad liberada vs. tiempo ( $n = 0.95$ ), un mecanismo no Fickiano (o transporte caso II) es el que regula la liberación del fármaco en este sistema.

Tras infiltración local de la bupivacaína a una dosis de 1.25 mg, el efecto del fármaco se vió incrementado tanto a nivel antinociceptivo como antialodínico cuando se administra en nanopartículas respecto a la solución del mismo fármaco. Los valores de área bajo la curva de los perfiles respuesta vs. tiempo mostraron un 67 y un 36% de incremento para dicho parámetro a partir de las nanopartículas, para la actividad antinociceptiva y antialodínica, respectivamente.



## In vitro characterization and in vivo analgesic and anti-allodynic activity of PLGA-bupivacaine nanoparticles

Xavier Garcia · Elvira Escribano ·  
Josep Domenech · Josep Queralt ·  
Joan Freixes

Received: 27 July 2009 / Accepted: 28 May 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** An injectable controlled release system containing local anesthetics able to provide long-lasting analgesia in nociceptive and neuropathic pain could have a marked impact in pain management. In order to address this issue, bupivacaine, a widely used local anesthetic, has been nanoencapsulated using poly(lactic-co-glycolic acid) from an oil-in-water emulsion by the solvent evaporation technique. Nanoparticles were evaluated in vitro studying their drug release mechanism by fitting different model equations, and in vivo by testing its analgesic and anti-allodynic activity in front of heat-induced nociceptive pain and sciatic nerve chronic constriction injury in rats, respectively. The particle size of the PLGA nanoparticles obtained was of  $453 \pm 29$  nm, the encapsulation efficiency, drug loading, and burst effect at 30 min were  $82.10 \pm 0.001$ ,  $45.06 \pm 0.001$ , and  $4.6 \pm 0.6\%$ , respectively. A prolonged release of the drug in comparison to bupivacaine solution was seen. The mean dissolution time (MDT) obtained for nanoparticles was relatively long ( $9.44 \pm 0.56$  h) proving the sustained release process, while the dissolution

efficiency (DE) ( $84.10 \pm 1.01\%$ ) was similar to the maximum percentage of drug released. Korsmeyer–Peppas was the best model that fitted our release data. A non-Fickian mechanism was concluded to be involved in the release of bupivacaine from the nanoparticles, taking into account the value of the diffusional exponent obtained ( $n = 0.95$ ). After local infiltration in the rat, the antinociceptive and anti-allodynic activity of the nanoencapsulated bupivacaine was longer lasting than that of bupivacaine solution. An increase in the values of the area under the curve (AUC) of the antinociceptive and anti-allodynic effect versus time of 67 and 36%, respectively, was observed when the drug was encapsulated.

**Keywords** Bupivacaine · PLGA nanoparticles · In vitro release · Korsmeyer–Peppas · Antinociception · Antiallodynia · Modeling and simulation · Nanomedicine

### Introduction

Local anesthetics, administered via peripheral or central route, are widely used for regional anesthesia and control of major pain. Bupivacaine, an amide-type molecule, has been widely used for infiltration and local anesthesia after surgery because of its rapid onset and relatively long-lasting anesthetic effect as compared to other commonly used local anesthetics (Sawynok et al. 2001). However, some cardiovascular and central nervous system toxicity has been observed

---

Xavier Garcia—IN2UB member.

---

X. Garcia (✉) · E. Escribano · J. Domenech ·  
J. Queralt · J. Freixes  
Department of Pharmacy and Pharmaceutical  
Technology, Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics  
Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona,  
08028 Barcelona, Spain  
e-mail: xavier.garcia@ipsen.com

after frequent local administration, even at low dose-levels (Arky and Charles 2003; Zhang et al. 2008).

In this way, the encapsulation of the drug in a modified-sustained release form can lead to a slower uptake of the drug in the systemic circulation, avoiding high plasma concentrations and increasing in time its pharmacodynamic effect (Hariharan et al. 2006; Hoffart et al. 2006; Kalaria et al. 2008). Some reports have shown that microspheres or liposomes could be used as a delivery system to reduce the absorption rate of bupivacaine and, therefore, prolong the duration of action (Le Corre et al. 2002; Yu et al. 2002; Zhang et al. 2008). However, microspheres could have some problems regarding a high initial burst effect, which is suspected of causing side effects. This burst effect could be reduced by decreasing the particle size of the particles (Matsumoto et al. 2005). Other authors have hypothesized that the greater specific surface area of nanospheres, compared to microspheres, can lead to a greater diffusion of the polymer degradation products toward the release medium, thereby minimizing the degradation of the encapsulated drug (Sanchez et al. 2003).

The use of nanoparticles have also some other general advantages. They have been reported to reduce drug-associated adverse effects and ensure biocompatibility (De Jong and Borm 2008), to increase the intracellular penetration (Couvreur et al. 1992) and to enhance the pharmacological activity (Fonseca et al. 2002). The small size, customized surface, improved solubility, and multifunctionality of nanoparticles are opening many doors and creating new medical applications. Indeed, their novel properties offer the ability to interact with complex cellular functions (Singh and Lillard 2009). Nanoparticulate systems have the potential to improve topical drug release (Zhao et al. 2009), to increase the efficacy of drug delivery in the eye (Wadhwa et al. 2009), to reduce the phagocytic uptake in general (Avgoustakis 2004) and particularly in the respiratory tract (Buxton 2009), or even to improve brain drug delivery (Khalil and Mainardes 2009; Mistry et al. 2009). Future developments depend on identification of clinically relevant targets and on raising targeting efficiency of the multifunctional nanocarriers (Debbage 2009).

PLGA is a well-known and widely used biodegradable copolymer (Avgoustakis 2004) that has been approved by the FDA for use as suture material and in various drug delivery systems, with some of them

being related to clinical pain management (Al Malyan et al. 2006). It degrades by hydrolysis of its ester bonds into lactic and glycolic acids, both of which are further metabolized into carbon dioxide and water through the Krebs's cycle (Betancourt et al. 2007).

The hypothesis that a decrease in the particle size of the encapsulated bupivacaine can lead to more efficient and safety treatment has to be tested in vivo to prove its pharmacological activity in relieving pain, both nociceptive and neuropathic. Pain feeling is mostly nociceptive, caused by a somatic or visceral injury and, is sensitive to conventional analgesics. However, when a peripheral nerve is injured, neuropathic pain comes out. This pain could be associated with abnormal sensations like allodynia, a perception of a non-noxious stimulus, such as light touch, that becomes painful, and for which standard analgesics are ineffective.

Based on these considerations, the major aims of the present study were: (i) to nanoencapsulate bupivacaine in a biodegradable polymer and to characterize the formulation in terms of size, drug loading and encapsulation efficiency; (ii) to identify the best release mathematical model to elucidate the mechanisms involved in this process; and (iii) to evaluate in vivo the antinociceptive and anti-allodynic effect after its infiltration in rats.

## Materials and methods

### Materials

Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50; Resomer<sup>®</sup> RG503 MW 9000), was obtained from Boehringer-Ingelheim, Spain. Bupivacaine hydrochloride  $\geq 99\%$  and polyvinyl alcohol (PVA) 87–89% MW 13,000–23,000 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Bupivacaine base was prepared in our laboratory from bupivacaine hydrochloride by a precipitation method using ammonium hydroxide 25% PRS (Panreac Química, Barcelona, Spain). HPLC-grade methanol, acetonitrile, and other chemicals of analytical grade (*N*-methyl-2-pyrrolidone PAI, methylene chloride ACS-ISO, ammonium acetate PA ACS, potassium dihydrogen phosphate PRS, and disodium hydrogen phosphate anhydrous PA ACS) were purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain).

## Preparation of nanoparticles

Bupivacaine base-loaded nanoparticles were obtained from an oil-in-water emulsion using a solvent evaporation/extraction procedure according to the method developed by Le Corre et al. 1994, after testing different volume phases, drug/polymer ratios, percent emulsifier, stirring rates and conditions for solvent evaporation. In brief, PLGA (250 mg) and the drug (250 mg) were dissolved in 5 mL of the organic solvent (methylene chloride). The organic phase was then added dropwise into the aqueous phase (100 mL of purified water with 1% PVA) using an Ultraturrax (Ika T10 basic, Germany) followed by solvent rotaevaporation at 37 °C for 1 h.

Separation of non-encapsulated compound was performed by centrifugation at 8640×g (Sigma, 4K10, Germany) for 30 min. The nanoparticles were recovered by filtration in Amicon Ultra 100K tubes (Millipore Iberica, Spain) after washing with deionized water three times. The end of the washes was determined after measuring by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) the absence of drug in the supernatant.

## Analytical method

The concentration of bupivacaine in the different aqueous samples was determined by a validated (inter-day) HPLC methodology. The HPLC system consisted of two Waters 515 pumps, a 717 plus Waters autosampler and a Waters dual  $\lambda$  absorbance detector 2487 with UV detection (Waters Cromatografía SA, Barcelona, Spain) set at 213 nm. The analyses were performed at room temperature with a C18 Kromasil column (5  $\mu$ m particle diameter, 15 × 0.46) (Teknokroma S. Coop. C. Ltda., Barcelona, Spain). The mobile phase, consisting of methanol: acetonitrile (50:50)/phosphate buffer pH 7.0 [70:30], was pumped at 1 mL/min. Calibrations were made by the external standard method.

The calibration curves were prepared in phosphate buffer pH 6 with a concentration range of 100–1.5625  $\mu$ g/mL.

## Drug loading and encapsulation efficiency

In order to evaluate the drug loading and encapsulation efficiency, an aliquot of loaded nanoparticles

were dissolved in *n*-methyl-2-pyrrolidone. The resulting solution was injected onto the chromatograph, following the conditions mentioned before.

The drug loading and the encapsulation efficiency were calculated as follows:

$$\text{Drug loading(\%)} = (M_{\text{drug}}/M_{\text{np}}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency(\%)} = (M_{\text{drug}}/M_{\text{theo.drug}}) \times 100 \quad (2)$$

where  $M_{\text{drug}}$  is the mass of drug determined in the dissolution sample with *n*-methyl-2-pyrrolidone,  $M_{\text{np}}$  is the mass of nanoparticles employed,  $M_{\text{theo.drug}}$  is the theoretical amount of drug used in the preparation of the nanoparticles.

## Morphology, particle size distribution and Zeta potential

Particle size analysis of nanoparticles was performed by Dynamic Light Scattering (DLS), which yields the mean particle diameter. DLS measures Brownian motion and relates this to the size of the particles, by illuminating them with a laser and analyzing the intensity fluctuations in the scattered light. In order to measure particle size distribution, the polydispersity index (PI), ranging from 0.0 for an entirely monodisperse sample to 1.0 for a polydisperse sample, was used. Zeta potential is an important and useful indicator of particle surface charge which can be used to characterize the particles obtained and to predict and control the stability of colloidal suspensions or emulsions. Laser Doppler anemometry, calculated from the mean electrophoretic mobility, quantifies the particle charge (Heurtault et al. 2003).

Both determinations were performed by using a Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Malvern, UK).

The surface morphology of the nanoparticles was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM) in an argon atmosphere, previous coating with gold, and observed on a Hitachi S4100 FEG in the Scientific and Technical Services (University of Barcelona, Spain).

## In vitro release study

In vitro release study of the encapsulated bupivacaine was performed by means of Franz-diffusion cells (Franz 1975) (0.7854 cm<sup>2</sup> surface area) at 37 °C and

stirred at 600 rpm using a cellophane membrane MWCO: 12,00–14,00 (Cellu Sep T3<sup>®</sup>, Membrane Filtration Products Inc., USA) and phosphate buffer pH 7.4 (PBS) in the receptor compartment, assuring sink conditions. The donor compartment was filled with 0.2 mL of a solution of bupivacaine in PBS (at 50 µg/mL) or with a suspension of the nanoparticles in PBS. Experiments were made in six replicates. Samples from the receptor compartment were taken periodically, and the same volume of PBS was replaced. The drug concentration in PBS was measured by HPLC following the methodology described before.

The burst effect of the nanoparticles in the release study was calculated as follows (Lee et al. 2006; Zhang et al. 2008):

$$\text{Burst effect(\%)} = \left( \frac{\text{cumulative amount released in the first 30 min}}{\text{total amount of drug in the nanoparticles}} \right) \times 100 \quad (3)$$

The release data, expressed as fractional release ( $M_t/M_\infty$ ) versus time, was fitted to zero-order, first-order and Higuchi models to investigate the release rate; and to Korsmeyer–Peppas model to find out the mechanism of drug release from the nanoparticles:

$$\text{Zero order kinetics: } M_t/M_\infty = k \cdot t \quad (4)$$

$$\text{First order kinetics: } M_t/M_\infty = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (5)$$

$$\text{Higuchi (square root) model: } M_t/M_\infty = k \cdot t^{1/2} \quad (6)$$

$$\text{Korsmeyer – Peppas model: } M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (7)$$

where  $M_t$  is the amount of drug released at time  $t$ ,  $M_\infty$  is the total amount released,  $M_t/M_\infty$  is the fraction of drug released at time  $t$ ,  $k$  is the release rate constant, and  $n$  is the diffusional exponent indicative of the mechanism of drug release. Several mechanisms may be involved in the release process of spherical matrices: the drug diffusion from the nanoparticle (or Fickian mechanism;  $n \leq 0.43$ ), non-Fickian transport (or case-II transport, zero order;  $n \geq 0.85$ ) or the combination of both processes (anomalous transport;  $0.43 \leq n < 0.85$ ). In order to fit the Korsmeyer–Peppas empirical model only, the initial 60% of drug released was used (Korsmeyer et al. 1983; Peppas 1985; Ritger and Peppas 1987).

The best model was chosen by examination of the fitness of the predicted curve to the data, by comparison

of the Akaike information criterion (AIC) determined for each model (Yamaoka et al. 1978) and by examination of the validity of the final parameter estimates (including magnitude and confidence intervals).

Some additional amodelistic parameters [dissolution efficiency (DE) and mean dissolution time (MDT)] were also calculated for the encapsulated bupivacaine from the in vitro release data.

The DE% of the nanoparticles was calculated as follows (Khan 1975; Costa and Lobo 2001):

$$\text{DE\%} = \frac{\int_0^t M \cdot dt}{C_{100} \cdot t} \times 100 \quad (8)$$

where the numerator represents the area under the dissolution curve up to a certain time,  $t$ , and the denominator is the rectangular area between the total amount of drug released and the last experimental time point,  $t$ .

The MDT is defined as the mean residence time of a drug in solid state in the formulation. It is a useful parameter to characterize the drug release rate from a dosage form and, in this case, indicates the drug release retarding properties of the polymer. It was calculated by means of the following expression:

$$\text{MDT} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{t}_i \cdot \Delta M_i}{\sum_{i=1}^n \Delta M_i} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{t}_i \cdot \Delta M_i}{M_\infty} \quad (9)$$

where  $i$  is the sample number,  $n$  is the number of dissolution sample times,  $t_i$  is the time at midpoint between  $t_i$  and  $t_{i-1}$  (calculated with the expression  $(t_i + t_{i-1})/2$ ),  $\Delta M_i$  is the increase in the amount of drug released at each time interval, and  $M_\infty$  is the asymptote of the dissolved amount of drug.

Both amodelistic parameters were reliably calculated because the maximum percentage of drug released was  $\geq 90\%$  (Khan 1975).

#### Animal experiments

The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain. The animals were treated in accordance with the Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals as issued by the International Association for the Study of Pain (Zimmerman 1983).

A total of 36 adult male Sprague-Dawley rats (330–350 g) were purchased from Harlan Interfauna



Ibérica (St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) and were subjected to a quarantine period of 7 days on arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to controlled diet and tap water ad libitum. The temperature was kept at  $24 \pm 1$  °C and the relative humidity was kept at 50–60%. Artificial lighting was used to provide 12-h light and 12-h dark every 24 h.

Experiments were conducted on animals that had been handled daily and that had been familiarized with the experimenter, the experimental environment, and the testing equipment for 3 days.

#### *Analgesic effect in front of nociceptive pain*

Pain to thermal stimulation was determined using a Plantar Test (Ugo Basile, Comerio, Italy) based on that described by Hargreaves et al. (1988). Rats were placed individually in plexiglas cubicles over a glass surface and maintained at a room temperature of 25 °C. Radiant heat, emitted from a focused projection bulb, was applied to the mid-plantar surface of each hind paw. The current stimulus was maintained at 4.5 A and the maximum time of exposure was set to 20 s to limit possible tissue damage. The elapsed time to the brisk withdrawal of the hind paw from the thermal stimulus was recorded automatically using photodiode motor sensors.

Only animals with a basal reaction time lower than 11 s were selected for the treatment. Animals were randomly allocated into three groups of six animals:

- Control group: 0.3 mL vehicle (saline) were injected in the subplantar region of the left paw.
- Group of rats treated with 0.3 mL of a solution of bupivacaine, injected in the subplantar region of the left paw at dose level of 1.25 mg.
- Group of rats treated with 0.3 mL of PLGA–bupivacaine nanoparticles, injected in the subplantar region of the left paw at dose level of 1.25 mg.

At selected times after administration, the paw withdrawal latency (or paw withdrawal threshold—PWT) was measured in both paws at different time points until this latency came back to the basal (pretreatment) value (after 20 s of applying the stimulus, as will be described). Two determinations were performed at each time point.

#### *Anti-allodynic effect in front of nerve injury*

The chronic constriction injury model of painful mononeuropathy, described by Bennett and Xie (1988), was used. Nerve or sham surgery was performed in all rats under isoflurane anesthesia (4% induction and 3% maintenance) and oxygen. Surgery was always performed in the left hind leg. The common sciatic nerve was exposed at the level of the middle of the thigh by blunt dissection through the biceps femoris. Proximal to the sciatic trifurcation, about 7 mm of nerve was freed of adhering tissue, and four ligatures (Ethicon Mersilk 4.0, Johnson-Johnson Intl., Scotland) were loosely tied around it with about 1 mm spacing. The muscle and the skin were closed in two layers with 4.0 Ethicon Mersilk 4.0. Sham controls were performed for each surgery by exposing the nerve without inducing any ligature. All surgical procedures were carried out under sterile conditions and were performed by the same experimenter.

Four days after surgery, rats that developed tactile allodynia were randomly allocated to one of the following experimental groups (six rats each):

- Sham control rats: the left sciatic nerves were exposed but left unaffected. 0.3 mL vehicle (saline) was injected in the subplantar region of the left paw.
- Group of rats with chronic constriction injury, treated with 0.3 mL of a solution of bupivacaine, injected in the subplantar region of the left paw, at dose level of 1.25 mg.
- Group of rats with chronic constriction injury, treated with 0.3 mL of PLGA–bupivacaine nanoparticles, injected in the subplantar region of the left paw, at dose level of 1.25 mg.

Threshold for tactile sensitivity was measured in both hind paws, using an automated apparatus for applying reproducible light touch (Dynamic Plantar Aesthesiometer 37400, Ugo Basile, Comerio, Italy). Animals were placed in their compartments on the metal mesh surface. After a short period, in which they showed exploratory behavior, they remained still in a resting position. At this time, the test began. With the help of an adjustable angled mirror, the tactile stimulator unit was placed beneath the selected hind paw to position the filament below the plantar surface of the animal. When the unit was started, the electrodynamic's actuator lifted the stainless steel filament, which touched the plantar surface and began to exert an

upward force below the threshold of feeling. The force was increased until the animal moved its paw or until a maximum of 50 g was applied for 20 s.

Allodynia degree was defined as the difference in grams of force required to elicit paw withdrawal (paw withdrawal threshold—PWT) at selected times after vehicle or drug treatment and the PWT before treatment (basal). Two determinations were performed at each time point.

#### Data analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). In order to test the linearity of the analytical method used to determine drug concentrations, the mean values of the concordance between chromatographic areas and their expected concentration (Area/C) were compared by ANOVA.

In analgesia experiments, the area under the curve (AUC) values were calculated from the curve between the PWT versus the different time points of measurement, while in the anti-allodynia experiments, the AUC values were calculated from the curve between the differences in the PWT versus the different time points of measurement. The trapezoidal rule was applied in all cases by means of WinNonlin v.2 professional software (Pharsight, USA).

In order to evaluate the course of antinociception and anti-allodynia during treatment, comparisons among the latencies at each time point between the group treated with the nanoparticles, the group treated with the drug solution, and the control group were conducted. These data and the AUC values obtained were statistically compared by means of an ANOVA, followed by a post-hoc test (Scheffe method). Statistical analysis was performed using SPSS® package v. 15.0 (SPSS Inc., USA).  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all cases.

## Results and discussion

#### Validation of the analytical method

The analytical technique, validated inter-day ( $n = 6$ ), was linear according to the statistics applied ( $p = 0.243$ ) and with the correlation coefficients of the calibration curves (ranging from 0.993 to 0.999); precise, with a percentage variation coefficient (CV %)

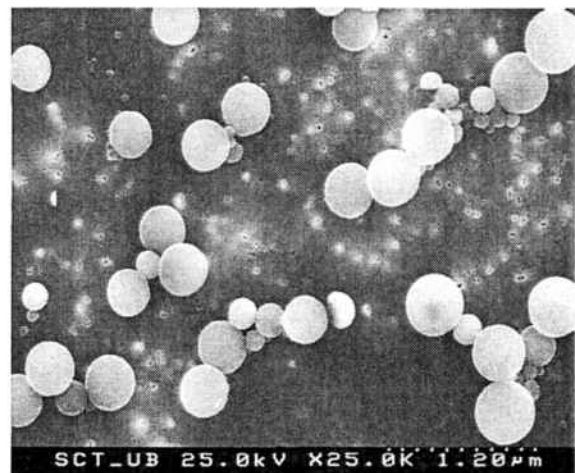
between 0.80 and 10.16%, and accurate, with a relative error (%E) between  $-8.58$  and  $4.44\%$ .

No interfering substances were eluting at the same retention time than the analyte. The limits of detection and quantification of the method were 0.94 and 1.88  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

#### Characterization of the nanoparticles

Drug loading and encapsulation efficiency results obtained,  $45.06 \pm 0.001$  and  $82.10 \pm 0.001\%$ , respectively, were in agreement or even higher than other authors (Le Corre et al. 1994; Panyam et al. 2004). The Z potential value obtained for this formulation was  $-5.51 \pm 0.67$  mV. The Z potential of PLGA nanoparticles depends on the end groups of the PLGA, the type of drug encapsulated and the type of stabilizing agent used during preparation. It is also very much influenced by the ions present in the medium. The negative charge obtained is due to the ionization of the carboxyl end-groups of the polymer chains in presence of water. This value is in accordance with values found by other authors (Betancourt et al. 2007), but not as large as other ones, probably due to its determination in water and not in a solution with an ionic strength (Gref et al. 2001). The value obtained ensures the stability of the formulation during the time the drug takes to release from the nanoparticles, avoiding major agglomeration of the particles.

The particle size of the PLGA nanoparticles obtained was of  $453 \pm 29$  nm (PI = 0.3). Figure 1 shows the morphological features of the loaded



**Fig. 1** SEM image of the PLGA-bupivacaine nanoparticles

bupivacaine nanoparticles. The particles were spherical with a smooth surface, and no holes could be seen, which is advantageous to minimize the initial burst and assures the uniformity of the nanoparticles and, therefore, the reliability of the release studies performed. No drug crystals of the surface were observed. With these characteristics, we would be able to reach a controlled and relatively slow diffusion of the drug from a biocompatible formulation. The mean residence time of the drug in the organism will be prolonged, diminishing the phagocytic activity of the reticuloendothelial system.

In vitro release studies

Figure 2 shows the in vitro release profile of bupivacaine from the PLGA-loaded nanoparticles. A solution of bupivacaine was used as a reference, to investigate the role of the polymeric matrix on drug release. As observed in Fig. 2, the totality of drug was diffused through the membrane to the receptor chamber within the first 5 h. At the same time period, only around 50% of bupivacaine was diffused from the nanoparticles formulation.

The nanoparticles formulation presented a low burst effect: only  $4.60 \pm 0.60\%$  was released in the first 30 min. It is known that the burst effect is generally increased when the drug/PLGA ratio is also increased. In our experimental conditions, a relatively high drug:PLGA mass ratio (1:1) was used, but the burst effect was lower than that obtained by other authors in the first 30 min of the experiment: 4.6 vs.

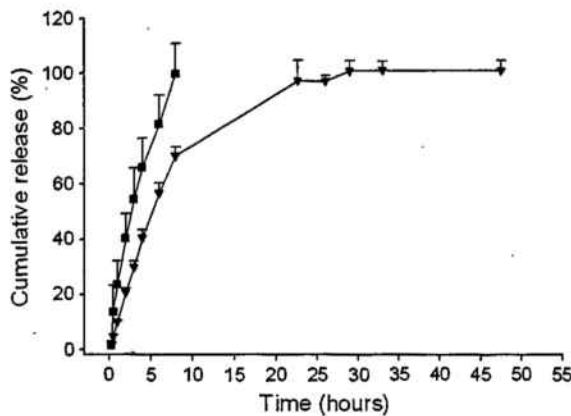


Fig. 2 Cumulative percent bupivacaine (filled square) solution and (inverted filled triangle) nanoparticles release as a function of time. Bars indicate SD

58.23% (Zhang et al. 2008), probably due to the different method of preparation employed; or 4.6 vs. 17–20% (Lee et al. 2006), probably due to the different encapsulation technique and also to the type of polymer (poly(L-lactic acid)) used. Therefore, the amount of encapsulated drug is quite high, and a small amount of bupivacaine remained on the surface of the nanoparticles.

As shown in Fig. 2, a higher release rate was observed in the initial 8 h. In spite of the lack of experimental data from 8 to 24 h, it seems that this initial phase could last for 12–15 h of experimental time, approximately. From here onward, the drug release rate was relatively constant. Compared to bupivacaine in solution, prolonged release of the drug from the nanoparticles was observed since longer time was needed to release 90% of bupivacaine from the nanoparticles (12–18 h) than from the solution (around 7 h). However, the high stirring speed (600 rpm) used in the study, could have accelerated the release process from the nanoparticles.

As shown in Table 1, after fitting several release models (zero order, first order, Higuchi and Korsmeyer–Peppas) to the observed data, Korsmeyer–Peppas was the best model that fitted to our release data. For this model, the coefficient of determination ( $R^2$ ) ranged between 0.909 and 0.999 for all six replicates assayed, and the release rate constant ( $k$ ) was  $0.118 \text{ h}^{-n}$ . Taking into account the value of the diffusional exponent obtained ( $n = 0.95$ ), a non-Fickian mechanism (case-II transport) seems to be involved in the release mechanism of bupivacaine from the PLGA-nanoparticles. Thus, polymer relaxation and consecutively erosion and degradation of the PLGA matrix was the main mechanism of bupivacaine release from our nanoparticles in our experimental conditions. The degradation of PLGA in PBS occurred by hydrolysis of the ester bonds. As a result, the generated protons from the liberation of

Table 1 Mean parameters obtained after fitting the release data from the PLGA-loaded bupivacaine nanoparticles to different models

Drug	Parameter	First order	Zero order	Higuchi	Korsmeyer
Bupivacaine	$k$	0.165	0.031	0.193	0.118
	$n$	–	–	–	0.95
	AIC	–27.82	5.74	–16.84	–46.50

lactic and glycolic acids could lead to autocatalytic effects and the subsequent acceleration of polymer degradation. At a critical timepoint, the polymeric structure became unstable and led to the breakdown of the macromolecular network (Faisant et al. 2002).

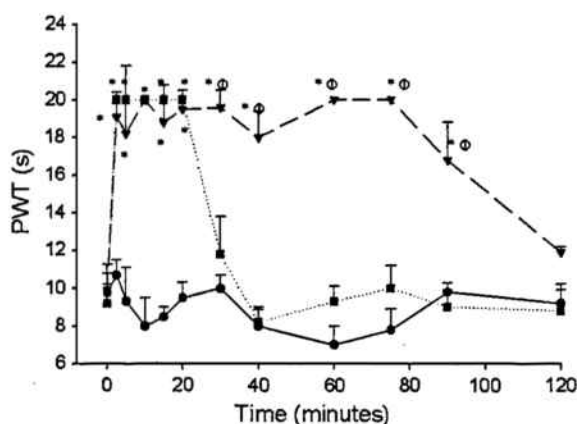
The release mechanism obtained could be explained by the hydrophobicity and low solubility of the encapsulated drug (bupivacaine base) since the water entering the particle is not able to solubilize enough the drug to allow a relevant diffusion. In the case of polydisperse spherical systems, the value of  $n$  would be lower than expected (up to 0.45 for case II transport) (Lee et al. 2006). In our case, a PI of 0.3 was not enough to decrease the  $n$  exponent to that value. This aspect also confirms the case II-transport mechanism.

The MDT value obtained for the nanoparticles ( $9.44 \pm 0.56$  h) is a relatively prolonged time, which proves that the drug is released from the nanoparticles by a sustained release process. The DE% value obtained ( $84.10 \pm 1.01\%$ ) is similar to the maximum percentage of drug released (close to 100%).

#### Analgesic effect in front of nociceptive pain

After administration of saline, the bupivacaine solution, or nanoparticles, no inflammatory response was appreciated in the injection site of any rat.

Figure 3 shows that the local infiltration of bupivacaine as a solution and as PLGA-nanoparticles at the



**Fig. 3** Time course of the mean analgesic effect (PWT) after infiltration of saline (filled circle), bupivacaine (filled square) solution, and bupivacaine nanoparticles (filled inverted triangle). Bars represent SD. \*  $p < 0.05$  compared with saline (control);  $\Phi$ ,  $p < 0.05$  compared with solution

dose-level of 1.25 mg, significantly increases the PWT ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the control group up to 20- and 90-min post injection, respectively. Therefore, it is proven that the nanoencapsulation of the drug considerably increases the duration of its analgesic effect. At the 120-min time point, a recovery in the latency of the paw withdrawal was seen in all the groups.

The administration of bupivacaine (in either solution or nanoparticles) did not produce any systemic analgesia, since no differences with respect to the control group could be observed in the not administered paw (contralateral) of the animals.

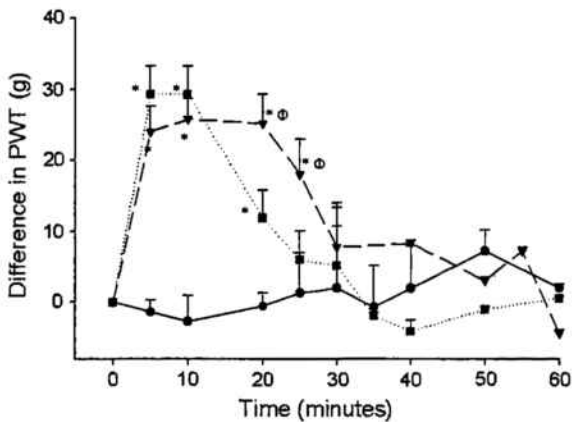
The mean  $\pm$  SD AUC values obtained for the control group (saline), the group of animals administered with a solution of bupivacaine and the group of animals given the PLGA nanoparticles were  $946.7 \pm 14.82$ ,  $1233 \pm 65.41$ , and  $2054 \pm 75.59$  min/s, respectively. These values represent a significant increase, 67% ( $p < 0.05$ ), when comparing the encapsulated versus the non-encapsulated drug and corroborate the ability of the nanoencapsulation to increase the pharmacodynamic effect of this drug.

The current results suggest that the nanoencapsulation of bupivacaine prolongs and increases the analgesic properties of the drug after local administration in rats. Previous tests with the same drug but in different and larger sustained release systems support our findings. The beneficial effects of a 1.1–2.4  $\mu\text{m}$  liposomal formulation of bupivacaine were tested in vitro (Grant et al. 2004) and in vivo (Grant et al. 2001; Yu et al. 2002). In all cases the intensity and duration of drug analgesia was increased in a dose-dependant manner. A recent application of pegylated liposomes has been found to be useful for the treatment of bupivacaine toxicity (Howell and Chauhan 2009). Liposomes are well established colloidal drug delivery systems, but they have some limitations such as difficulty in storage, stability and rapid drug leakage. Biodegradable polymeric nanoparticles could avoid such limitations and reach higher intracellular drug concentrations, protect the drug from degradation by lysosomes and help to control drug release rate (Wang et al. 2006).

#### Anti-allodynic effect in front of nerve injury

There was no difference in the PWT among any of the tested groups at pretest in both animal paws.





**Fig. 4** Time course of the mean anti-allodynic effect (PWT) after infiltration of saline (filled circle), bupivacaine solution (filled square), and bupivacaine nanoparticles (filled inverted triangle). Bars represent SD. \*  $p < 0.05$  compared with saline (control);  $\Phi$ ,  $p < 0.05$  compared with solution

Constriction injury of sciatic nerve lowered the threshold on the ipsilateral paw, indicating that the tactile allodynia was developed.

After administration of saline, the bupivacaine solution, or nanoparticles, no inflammatory response was appreciated in the injection site of any rat.

A higher anti-allodynic activity was observed when bupivacaine was given as PLGA nanoparticles, since at 20- and 25-min post injection the mean PWT values obtained were two and threefold higher, respectively, than those obtained for the animals administered with the drug solution (Fig. 4). No differences in the PWT ( $p > 0.05$ ) were observed within the administered (with either the solution or nanoparticles) and the control animals from the 30-min time point onwards.

The mean  $\pm$  SD AUC values obtained for the control group, the group of animals administered with a solution of bupivacaine and the group of animals given the PLGA nanoparticles were  $95.86 \pm 19.87$ ,  $578.2 \pm 107.7$ , and  $788.8 \pm 80.22$  min/g, respectively. These values represent a significant increase, 36% ( $p < 0.05$ ), when comparing the encapsulated versus the non-encapsulated drug. This increase is lower than that found in the antinociceptive experiments (67%), which led us to think that the two kinds of pain tested in this study do not appear to share a common pattern. Noxious thermal stimuli are thought to be mediated through high-threshold, thin unmyelinated primary afferent C-fibers; non-noxious tactile stimulation is believed to be mediated through

large diameter, low-threshold A $\beta$  afferent fibers, and processed at supraspinal sites receiving input through the dorsal column (Tian et al. 2009).

The current results suggest that bupivacaine could be effective in preventing mechanical allodynia. Recent reports also corroborate this result, thus bupivacaine reduced the development of allodynia in different animal models of chronic neuropathic pain: intercostal neuropathic pain (Shin et al. 2008), postincisional hairy skin pain (Duarte et al. 2005), and paw incision model of postoperative pain (Ririe et al. 2004). The nanoencapsulation of bupivacaine prolongs and increases the anti-allodynic properties of the drug in rats and would probably allow to use lower dose levels to reach an important pharmacodynamic activity, in comparison to non encapsulated bupivacaine.

Controlled release of bupivacaine was previously tested in rats but using delivery systems larger than nanoparticles used in this study. Subcutaneous bio-roditable PLGA/bupivacaine (milled to  $280 \times 500$   $\mu$ m minipellets) reduced inflammatory hyperalgesia, edema, and hyperthermia in a temporal and dose-related fashion and had a prolonged inhibitory effect on the tissue levels of substance P and bradykinin in the inflamed hindpaws (Garry et al. 1999). The time course of anti-nociception was performed at dose level of 60 mg, and there was a lag time in the onset of anti-nociception of 36 h. The tests performed in our study at a lower dose level (1.25 mg) showed an important decrease in the onset time, and complemented these investigations giving information about the increase in the duration of the effect comparatively to a solution of the same drug, and studying the anti-allodynic effect. A microsphere formulation of bupivacaine was previously tested in a nerve injury model (Kissin and Lee 2004; Wen et al. 2007) after its direct application around or above the nerve. In contrast, formulation used in this study was able to exert the pharmacodynamic action after its subcutaneous administration. Finally, some other research study found that PLGA cylindrical rods (10-mm length, 1-mm diameter) combining bupivacaine and hydromorphone provided a significant increase in the paw withdrawal latency in rats (Hasirci et al. 2003). In comparison, besides the difference in shape and particle size of the formulation, we demonstrated in this study the feasibility of using a delivery system containing bupivacaine alone.

## Conclusions

The emulsion-solvent evaporation method was used to obtain bupivacaine-loaded biodegradable PLGA nanoparticles with a particle size of  $427 \pm 29$  nm. The relative high drug loading ( $45.06 \pm 0.001\%$ ) allows the administration of the desired dose of drug with a relative low amount of loaded nanoparticles. The release profile and the MDT parameter value obtained showed a prolonged release of the drug from the nanoparticles. The dissolution efficiency obtained is in accordance to the high percentage of bupivacaine released. In the same way, the model that best fitted the data (Korsmeyer-Peppas), with an exponent value of  $n = 0.95$ , explained a non-Fickian release mechanism according to the lipophilic nature of the drug.

The pharmacological results obtained after local infiltration in rats are promising, because the nano-encapsulated drug was able to maintain in vivo their prolonged release, giving longer and higher analgesic and anti-allodynic activity in comparison to a solution of the drug.

Although not tested in this study, these in vivo and in vitro data suggested that with this formulation, a sustained analgesic and anti-allodynic effect could be reached, avoiding high bupivacaine plasma levels and, thereby limiting undesirable effects of the drug. Therefore, this drug delivery system could be a possible candidate to improve the application of bupivacaine as local anesthetic by infiltration.

## References

- Al Malyan M, Becchi C, Nikkola L, Viitanen P, Boncinelli S, Chiellini F, Ashammakhi N (2006) Polymer-based biodegradable drug delivery systems in pain management. *J Craniofac Surg* 17(2):302–313
- Arky R, Charles S (2003) Physician Desk's Reference. Medical Economics, Montvale, pp 642–644
- Avgoustakis K (2004) Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv* 1:321–333
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87–107
- Betancourt T, Brown B, Brannon-Peppas L (2007) Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine* 2(2):219–232
- Buxton DB (2009) Nanomedicine for the management of lung and blood diseases. *Nanomedicine* 4(3):331–339
- Costa P, Lobo JMS (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13:123–133
- Couvreux P, Fattal E, Alphandary H, Puisieux F, Adremont A (1992) Intracellular targeting of antibiotics by means of biodegradable nanoparticles. *J Control Release* 19:259–268
- De Jong WH, Borm PJA (2008) Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomed* 3(2):133–149
- Debbage P (2009) Targeted drugs and nanomedicine: present and future. *Curr Pharm Des* 15(2):153–172
- Duarte AM, Pospisilova E, Reilly E, Mujenda F, Hamaya YM, Strichartz GR (2005) Reduction of postincisional allodynia by subcutaneous bupivacaine: findings with a new model in the hairy skin of the rat. *Anesthesiology* 103(1):113–125
- Faisant N, Siepmann J, Benoit JP (2002) PLGA-based micro-particles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur J Pharm Sci* 15:355–366
- Fonseca C, Simoes S, Gaspar R (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physico-chemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release* 83:273–286
- Franz TJ (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64:190–195
- Garry MG, Jackson DL, Geier HE, Southam M, Hargreaves KM (1999) Evaluation of the efficacy of a bioerodible bupivacaine polymer system on antinociception and inflammatory mediator release. *Pain* 82(1):49–55
- Grant GJ, Barenholz Y, Piskoun B, Bansinath M, Turndorf H, Bolotin EM (2001) DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation in mice. *Pharm Res* 18:336–343
- Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, Davidson EM (2004) A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology* 101:133–137
- Gref R, Quellec P, Sanchez A, Calvo P, Dellacherie E, Alonso MJ (2001) Development and characterization of CyA-loaded poly(lactid acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 51:111–118
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88
- Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MNV (2006) Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm Res* 23(1):184–195
- Hasirci V, Bonney I, Goudas LC, Shuster L, Carr DB, Wise DL (2003) Antihyperalgesic effect of simultaneously released hydromorphone and bupivacaine from polymer fibers in the rat chronic constriction injury model. *Life Sci* 73(26):3323–3337
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Prous JE, Benoit JP (2003) Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24:4283–4300
- Hoffart V, Lamprecht A, Maincent P, Lecompte T, Vigneron C, Ubrich N (2006) Oral bioavailability of a low molecular

- weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release* 113(1):38–42
- Howell BA, Chauhan A (2009) Bupivacaine binding to pegylated liposomes. *Anesth Analg* 109(2):678–682
- Kalaria DR, Sharma G, Beniwal V, Ravi Kuman MNV (2008) Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin. In vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharm Res* 26(3):492–501
- Khalil NM, Mainardes RM (2009) Colloidal polymeric nanoparticles and brain drug delivery. *Curr Drug Deliv* 6(3):261–273
- Khan KA (1975) The concept of dissolution efficiency. *J Pharm Pharmacol* 27:48–49
- Kissin I, Lee SS (2004) Effects of long-term nerve blockade in the spared nerve injury model. *Anesthesiology* 101(3):806–807
- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker EM, Buri P, Peppas NA (1983) Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 15:25–35
- Le Corre P, Le Guevello P, Gajan V, Chevanne F, Le Verge R (1994) Preparation and characterization of bupivacaine-loaded poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* 107:41–49
- Le Corre P, Estebe JP, Clement R, Du Plessis L, Chevanne F (2002) Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: in vitro evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep. *Int J Pharm* 238:191–203
- Lee S, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Woo JS, Lee BC, Hwang SJ (2006) Controlled delivery of a hydrophilic drug from a biodegradable microsphere system by supercritical anti-solvent precipitation technique. *J Microencapsul* 23:741–749
- Matsumoto A, Matsukawa Y, Suzuki T, Yoshico H (2005) Drug release of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide). *J Control Release* 106:172–180
- Mistry A, Stolnik S, Illum L (2009) Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm* 379(1):146–157
- Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V (2004) Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci* 53:1804–1814
- Peppas NA (1985) Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 60:110–111
- Ririe DG, Barclay D, Prout H, Tong C, Tobin JR, Eisenach JC (2004) Preoperative sciatic nerve block decreases mechanical allodynia more in young rats: is preemptive analgesia developmentally modulated? *Anesth Analg* 99(1):140–145
- Ritger PL, Peppas NA (1987) A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release* 5:37–42
- Sanchez A, Tobío M, Gonzalez L, Fabra A, Alonso MJ (2003) Biodegradable micro- and nanoparticles as long term delivery vehicles for interferon- $\alpha$ . *Eur J Pharm Sci* 18:221–229
- Sawynok J, Esser MJ, Reid AR (2001) Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci* 23(1):21–29
- Shin JW, Pancaro C, Wang CF, Garner P (2008) Low-dose systemic bupivacaine prevents the development of allodynia after thoracotomy in rats. *Anesth Analg* 107:1592–1597
- Singh R, Lillard JW Jr (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86(3):215–223
- Tian J, Gu Y, Su D, Wu Y, Wang X (2009) Effects of intrathecal lidocaine on hyperalgesia and allodynia following chronic constriction injury in rats. *Eur J Pain* 13:130–137
- Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP (2009) Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. *Curr Pharm Des* 15(23):2724–2750
- Wang P, Sanders BG, Kline K (2006) A comparison of anti-cancer properties of  $\alpha$ -TEA when formulated in nanoparticles or liposomes and delivered by gavage. In: *Proc Am Assoc Cancer Res* 47. April 2006. AACR Meeting Abstracts, 284
- Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, Huang J, Pertin M, Kohno T, Berde CB, Decosterd I, Ji RR (2007) Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. *Anesthesiology* 107(2):312–321
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T (1978) Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 6:165–175
- Yu H-Y, Li S-D, Sun P (2002) Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *J Pharm Pharmacol* 54:1221–1227
- Zhang H, Lu Y, Zhang G, Gao S, Sun D, Zhong Y (2008) Bupivacaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix and modeling of drug release. *Int J Pharm* 35:244–249
- Zhao Y, Brown MB, Jones SA (2009) Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? *Nanomedicine* 6(2):227–236
- Zimmerman N (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109–110

### 3.3 TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS-LOADED BIODEGRADABLE PLGA NANOPARTICLES: IN VITRO CHARACTERIZATION AND IN VIVO ANALGESIC AND ANTI-ALLODYNIC EFFECT

[*Current Nanoscience 2011; 7(3): pending pages assignment*]

*Received: 05 March 2010 / Accepted: 04 January 2011*

El objetivo de este trabajo fue la obtención de un sistema de liberación modificada que permitiera un control persistente del dolor nociceptivo y neuropático. Para ello, se usaron antidepresivos tricíclicos con actividad analgésica probada como amitriptilina, doxepina e imipramina, para ser encapsuladas en nanopartículas de PLGA mediante la técnica de nanoprecipitación. Tras su caracterización e investigación acerca del mecanismo de liberación *in vitro*, se estudió su actividad farmacológica *in vivo* tras su administración por vía subplantar en rata sana frente a un estímulo nociceptivo térmico y frente a alodinia (en animales inducidos con lesión constrictiva crónica del nervio ciático).

Se obtuvieron nanopartículas de  $420\pm 13$ ,  $480\pm 73$  y  $373\pm 25$  nm de tamaño para amitriptilina, doxepina e imipramina, respectivamente, y con cargas de fármaco de  $40.46\pm 4.11$ ,  $31.09\pm 3.02$  y  $32.20\pm 3.20\%$ , respectivamente. La ecuación de Korsmeyer-Peppas fue la que mejor ajustó los datos experimentales de cantidad liberada/disuelta en función del tiempo en todos los casos. La liberación de doxepina fue controlada por un proceso de difusión mientras que en el caso de la amitriptilina y la imipramina, una combinación de difusión Fickiana y relajación del polímero junto con la erosión de la matriz de PLGA (transporte anómalo) rigió la liberación del fármaco.

Tras infiltración local de las nanopartículas en la rata, se observó un importante aumento temporal y en magnitud de la actividad analgésica y antialodínica respecto a una solución del fármaco en cada caso.

Por tanto, las nanopartículas obtenidas de PLGA conteniendo amitriptilina, doxepina e imipramina pueden considerarse formulaciones novedosas con un tamaño de partícula no obtenido previamente para estos fármacos y con una elevada carga de principio activo (entre 31-40%), teniendo en cuenta la técnica de obtención de las mismas, aspecto que podría permitir un prolongado efecto farmacológico, especialmente en el caso de la doxepina.



# Tricyclic Antidepressants-loaded Biodegradable PLGA Nanoparticles: *In Vitro* Characterization and *In Vivo* Analgesic and Anti-Allodynic Effect

Xavier Garcia<sup>\*a</sup>, Elvira Escribano<sup>a</sup>, Helena Colom<sup>a</sup>, Josep Domenech<sup>a</sup> and Josep Queralt<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona. E-08028 Barcelona, Spain. Member of the Institute of Nanoscience and Nanomedicine of University of Barcelona, <sup>b</sup>Department of Physiology, School of Pharmacy, University of Barcelona. E-08028 Barcelona, Spain. IN2UB member. Member of the Institute of Nanoscience and Nanomedicine of University of Barcelona

**Abstract:** Tricyclic antidepressants (TCAs) have potent local pain blockade properties that could be of interest in relieving chronic pain states as neuropathic pain. The aim of this work was to reach a persistent control of nociceptive and neuropathic pain by means of an injectable controlled release system using lower than usual doses of TCAs. To address this issue, amitriptyline, doxepin and imipramine were encapsulated using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) as polymer. Nanoparticles were characterized and evaluated *in vitro* studying their drug release profile and mechanism, and *in vivo* testing its analgesic and anti-allodynic activity in front of heat-induced nociceptive pain and sciatic nerve chronic constriction injury, respectively. The mean±SD particle size and drug loadings (%) of the nanoparticles obtained were 420±13, 480±73 and 373±25nm, and 40.46±4.11, 31.09±3.02 and 32.20±3.20 % for amitriptyline, doxepin and imipramine, respectively. Korsmeyer-Peppas was the best model that fitted the release *in vitro* data. The release mechanism of doxepin was diffusion controlled, while a combination of Fickian diffusion and polymer relaxation/erosion of the PLGA matrix was involved for amitriptyline and imipramine. After local infiltration of nanoparticles in rats, the antinociceptive and anti-allodynic activity of the encapsulated drugs were long-lasting and higher than that observed from the solutions. Amitriptyline elicited the lower analgesic effect. Doxepin showed the most outstanding results and its encapsulation led to a 62% and 229% increase in antinociceptive and anti-allodynic activity, respectively. So, this drug could be considered as a therapeutical alternative in pain relieving treatments.

**Keywords:** Anti-allodynia, antinociception, *in vitro* release, Korsmeyer-Peppas, PLGA nanoparticles, tricyclic antidepressants.

## 1. INTRODUCTION

Pain feeling is mostly nociceptive, caused by a somatic or visceral injury and being sensitive to conventional analgesics. However, when a peripheral nerve is injured, neuropathic pain comes out. This pain could be associated to abnormal sensations like allodynia (a perception of a non-noxious stimulus, such as light touch, that becomes painful) and for which standard analgesics are in some cases ineffective. In animals, tricyclic antidepressants (TCAs) exhibit long-lasting local analgesic properties in nociceptive, inflammatory and neuropathic pain [1,2,3]. In humans, given locally or even systemically, they are widely used for the treatment of various chronic and neuropathic pain conditions [4]. Low doses of TCAs have been shown to be effective for symptomatic relief of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy [5]. Recently, the first antidepressant (Duloxetine), administered as a capsule comprising enteric coated pellets, has been approved for the management of diabetic peripheral neuropathic pain [6]. Amitriptyline, doxepin and imipramine (drugs that nonselectively block the reuptake of monoamines) appear to express the most potent analgesic effect [4], and its chronic use seems to be safe and effective [7], even more than other local anesthetics like bupivacaine or lidocaine [1, 8, 9, 10]. Intrathecal amitriptyline reverses thermal hyperalgesia induced by carrageenan in a dose-dependent manner [11] and given systemically, the drug is effective in alleviating thermal hyperalgesia induced by spinal nerve ligation [12]. Topical amitriptyline and doxepin provide cutaneous analgesia [8, 13], while intrathecally administered doxepin produces dose-related spinal anesthetic effects on motor activity, proprioception and nociception [14]. Imipramine modulates hyperalgesia and allodynia in the partial sciatic nerve transection model of neuropathy [15].

However, as important as the pharmacological efficiency of the drug is to choose an adequate pharmaceutical form able to improve the drug clinical therapeutic margin. An adequate pain control is associated with key clinical benefits and contributes to reducing the cost of treatments, thanks to shorter hospital stays and improved rehabilitation after surgery [16]. In this sense, a modified delivery system, such as nanoparticles could be a good choice. Nanoparticles present a lot of advantages: passing through most of the capillary or lymphatic epitheliums, leading to a slower uptake of the drug in the systemic circulation and avoiding high plasma concentrations [17, 18], drug targeting and reduction of associated adverse effects [19] or protecting the compounds from inactivation before reaching their site of action [20, 21], among others. Their small size (10-1000 nm) [22], customized surface, improved solubility and multifunctionality are opening doors and creating new medical applications.

The polymers used for the preparation of nanoparticles can be biodegradable or non-biodegradable. PLGA is a well known and widely used biodegradable copolymer [23] that has been approved by the FDA to be used in various drug delivery systems, some of them related to clinical pain management [24]. It degrades by hydrolysis of its ester bonds into lactic and glycolic acids, both of which are further metabolized into carbon dioxide and water through the Krebs' cycle [25, 26].

Based on these considerations, the aims of the present study were: (i) to obtain PLGA-nanoparticles of amitriptyline, doxepin and imipramine; (ii) to study the *in vitro* release profile and identify the best release mathematical model for each formulation in order to elucidate the mechanisms involved in the process; and (iii) to evaluate *in vivo* its antinociceptive and anti-allodynic effect after local infiltration in rats.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50; Resomer® RG503 MW 9000), was obtained from Boehringer-Ingelheim, Spain. Amitriptyline hydrochloride (99%), doxepin hydrochloride

Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona. E-08028 Barcelona, Spain. Member of the Institute of Nanoscience and Nanomedicine of University of Barcelona; Tel: +34934024578; Fax: +34934024563; E-mail: xavier.garcia@ipsen.com

(≥ 98%), imipramine hydrochloride (≥99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Chemical structures are shown in Figure 1. Lutrol® F127 (poloxamer 407) was obtained from BASF (Barcelona, Spain). HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (AcN), and other chemicals of analytical grade (n-methyl-2-pyrrolidone PAL, ammonium acetate PA ACS, potassium dihydrogen phosphate PRS and disodium hydrogen phosphate anhydrous PA ACS) were purchased from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Sodium chloride sterile saline 0.9% (P/W) was obtained from Braun (Rubí, Spain).

## 2.2. Nanoparticles Preparation

Nanoparticles of amitriptyline, doxepin and imipramine were prepared by the nanoprecipitation technique [27, 28] and using the drugs in the hydrochloride form. Acetonitrile and purified water (with 1% Lutrol® F127 as surfactant) were selected as the solvent and non-solvent, respectively. Briefly, the methodology used was the following: PLGA (250 mg) and the selected drug (250 mg) were dissolved in 5 mL of acetonitrile. The organic phase was then added dropwise into the aqueous phase (100 mL of purified water with 1% Lutrol® F127) using magnetic moderate stirring (Selecta Asincro stirrer, Spain), and the solvent was eliminated by rotaevaporation at 37°C for one hour.

Nanoparticles were recovered by filtration in Amicon Ultra 100K tubes (Millipore Iberica, Spain) after washing with deionized water three times and centrifugation at 8640 g (Sigma, 4K10, Germany) for 30 min. The end of the washes was determined after measuring by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) the absence of drug in the supernatant. An aliquot of the supernatant was injected into a HPLC system with UV detection (Waters Cromatografía S.A, Barcelona, Spain). The chromatographic conditions for the different drugs assayed are described in Table 1.

The calibration curves were prepared in a concentration range of 100 to 1.5625 µg/mL in all cases. The correlation coefficients of the calibration curves (n=6) ranged from 0.997 to 0.999 in all cases.

## 2.3. Particle Size Distribution and Zeta Potential

Particle size analysis of nanoparticles was performed by Dynamic Light Scattering (DLS), which measures the fluctuation of the intensity of scattered light caused by particle movement, and

yields the Z-average and the polydispersity index (PI), a dimensionless measure of the broadness of the particle size distribution, were obtained. Zeta potential was evaluated by Laser Doppler Anemometry.

All measurements were carried out by triplicate by a Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Malvern, UK).

## 2.4. Drug Loading and Encapsulation Efficiency

In order to evaluate the drug loading and encapsulation efficiency, an aliquot of loaded nanoparticles were dissolved in n-methyl-2-pyrrolidone. The resulting solution was injected onto the chromatograph, following the analytical conditions mentioned before.

The drug loading and the encapsulation efficiency were calculated as follows:

$$\text{- Drug loading (\%)} = (M_{\text{drug}}/M_{\text{np}}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{- Encapsulation efficiency (\%)} = (M_{\text{drug}} / M_{\text{theo.drug}}) \times 100 \quad (2)$$

where  $M_{\text{drug}}$  is the mass of drug determined in the dissolution sample with n-methyl-2-pyrrolidone (encapsulated drug),  $M_{\text{np}}$  is the mass of nanoparticles weighted, and  $M_{\text{theo.drug}}$  is the theoretical amount of drug used in the preparation of the nanoparticles.

## 2.5. In vitro Release Study

Comparative *in vitro* release study of the encapsulated drugs vs. non-encapsulated was performed by means of Franz-diffusion cells [29] (0.7854 cm<sup>2</sup> surface area) at 37°C and stirred at 600 rpm using a previously hydrated cellophane membrane MWCO: 12,00-14,00 (Cellu Sep T3®, Membrane Filtration Products Inc., USA) and sorenson's phosphate buffer 1/15M pH 7.4 (PBS) in the receptor compartment, assuring sink conditions. The donor compartment was filled with 0.2 mL of 50 µg/mL solution of the tested drugs in PBS or with a suspension of drugs encapsulated in the nanoparticles. Experiments were made in 6 replicates per drug. Samples from the receptor compartment were taken periodically and the same volume of PBS was replaced. The drug concentration in PBS was measured by HPLC, as described above.

The burst effect of the nanoparticles released was calculated according to Lee *et al.* [30] and Zhang *et al.* [31]:

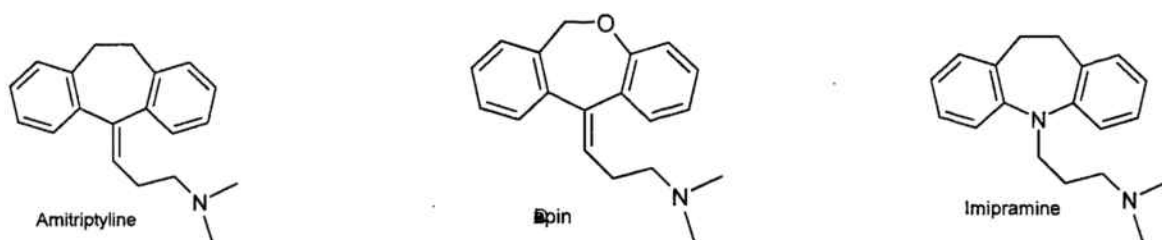


Fig. (1). Chemical structures of the drugs.

Table 1. Chromatographic Conditions for the Different Drugs

Drug	Chromatographic conditions		
	Amitriptyline	Doxepin	Imipramine
Column	C18 5µ 25x0.46	C18 5µ 15x0.46	C18 5µ 15x0.46
Flow (mL/min)	1	0.6	0.6
Mobile phase	Acetonitrile:phosphate buffer pH7 (70:30)	Metanol:actetate buffer pH6 (70:30)	Metanol:actetate buffer pH6 (70:30)
λ (nm)	215	235	235

-Burst effect (%) = (cumulative amount released in the first 30 minutes/total amount of drug in the nanoparticles) x 100 (3)

The release data, expressed as fractional release ( $M_t/M_\infty$ ) vs time, was fitted to zero order, first order and Higuchi models to investigate the release rate; and to Korsmeyer-Peppas model in order to find out the release mechanism of drug from the nanoparticles:

$$\text{Zero order kinetics: } M_t/M_\infty = k \cdot t \quad (4)$$

$$\text{First order kinetics: } M_t/M_\infty = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (5)$$

$$\text{Higuchi (square root) model: } M_t/M_\infty = k \cdot t^{1/2} \quad (6)$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas model: } M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (7)$$

Where  $M_t$  is the amount of drug released at time  $t$ ,  $M_\infty$  is the total amount released;  $M_t/M_\infty$  is the fraction of drug released at time  $t$ ;  $k$  is the release rate constant; and  $n$  is the diffusional exponent indicative of the drug release mechanism. Several mechanisms could be involved in the release processes of spherical matrices: drug diffusion from nanoparticles (or Fickian mechanism;  $n \leq 0.43$ ), non-Fickian transport (or Case-II transport, zero order;  $n \geq 0.85$ ) or the combination of both processes (anomalous transport;  $0.43 \leq n < 0.85$ ). To fit the Korsmeyer-Peppas empirical model only the initial 60% of drug released was used [32, 33, 34].

Zero order and Higuchi models are obtained when  $n=1$  or  $n=0.5$ , respectively.

The best model was chosen by examination of the fitness of the predicted curve to the data by comparison of the Akaike information criterion (AIC) determined for each model [35] and by examination of the validity of the final parameter estimates (including magnitude and confidence intervals).

Some additional amodelistic parameters (dissolution efficiency and mean dissolution time) were also calculated for the encapsulated drugs.

The Dissolution Efficiency (D.E. %) of the nanoparticles was calculated as follows [36]:

$$D.E. \% = \frac{\int_0^t M_t \cdot dt}{C_{100} \cdot t} \times 100 \quad (8)$$

where the numerator represents the area under the dissolution curve up to a certain time,  $t$ , and the denominator is the rectangular area between the total amount of drug released and the last experimental time point,  $t$ .

The Mean Dissolution Time (MDT) is defined as the mean residence time of a drug in solid state in the formulation [37]. It is a useful parameter to characterize drug release rate from a dosage form and, in this case, indicates the drug release retarding properties of the polymer. It was calculated by means of the following expression:

$$MDT = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot \Delta M_i}{\sum_{i=1}^n \Delta M_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot \Delta M_i}{M_\infty} \quad (9)$$

where  $i$  is the sample number,  $n$  is the number of dissolution sample times,  $t_i$  is the time at midpoint between  $t_i$  and  $t_{i-1}$  (calculated with the expression  $(t_i + t_{i-1})/2$ ),  $\Delta M_i$  is the increase in the amount of drug released at each time interval and  $M_\infty$  is the asymptote of the dissolved amount of drug.

Both amodelistic parameters were reliably calculated because the maximum percentage of drug released was  $\geq 90\%$  [36].

## 2.6. Animal Experiments

The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain. The animals were treated in accordance with the Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals as issued by the International Association for the Study of Pain [38].

A total of 84 adult male Sprague-Dawley rats (330-350 g) were purchased from Harlan Interfauna Ibérica (St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) and were subjected to a quarantine period of seven days at arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to controlled diet and tap water ad libitum. The room temperature was kept at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  with a relative humidity at 50-60%. Artificial lighting was used to provide 12-hours light and 12-hours dark every 24 hours.

Experiments were conducted on animals that had been handled daily to get familiarized with the experimenter, the experimental environment, and the testing equipment for 3 days.

### 2.6.1. Analgesic Effect in Front of Nociceptive Pain

Pain to thermal stimulation was determined using a Plantar Test (Ugo Basile, Comerio, Italy) based on that described by Hargreaves et al [39]. Rats were placed individually in plexiglas cubicles over a glass surface and maintained at a room temperature of  $25^\circ\text{C}$ . Radiant heat, emitted from a focused projection bulb, was applied to the mid-plantar surface of each hind paw. The current stimulus was maintained at 4.5 A and the maximum time of exposure was set to 20 s to limit possible tissue damage. The elapsed time to the brisk withdrawal of the hind paw from the thermal stimulus was recorded automatically using photodiode motor sensors.

Only the animals with a basal reaction time lower than 11 s were selected for the study. For each drug, animals were randomly allocated into two groups of 6 rats: a group of animals administered with 0.3 mL of drug solution and a group of animals administered with 0.3 mL of the corresponding PLGA nanoparticles at the same dose-level. Nanoparticles suspensions were prepared in 0.9% sterile saline in a sterile container, just before injection. The injections were done in the subplantar region of the left paw. The dose-levels were different for the three assayed drugs: 0.125 mg for amitriptyline, 0.075 mg for doxepin and 0.09 mg for imipramine. An additional group of six animals were injected with 0.3 mL of sterile saline (control group).

At selected times after administration, the paw withdrawal latency (paw withdrawal threshold-PWT-) was measured in both paws at different time points until this latency came back to the basal (pretreatment) value. Two determinations were performed at each time point.

The Area Under the Curve (AUC) was calculated from the curve between the PWT vs. the different time points of measurement by means of the trapezoidal rule. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

### 2.6.2. Anti-allodynic Effect in Front of Nerve Injury

The chronic constriction injury model of painful mononeuropathy, described by Bennett and Xie [40] was used. Nerve or sham surgery was performed in all rats under isoflurane (Inbisa, S.A., Spain) anesthesia (4% induction and 3% maintenance) and oxygen. Surgery was always performed in the left hind leg. The common sciatic nerve was exposed at the level of the middle of the thigh by blunt dissection through the biceps femoris. Proximal to the sciatic trifurcation, about 7 mm of nerve was freed of adhering tissue, and four ligatures (Ethicon Mersilk 4.0, Johnson-Johnson Intl., Scotland) were loosely tied around it with about 1 mm spacing. The muscle and the skin were closed in two layers with 4.0 Ethicon Mersilk 4.0. Sham controls were performed for each surgery by exposing the nerve without inducing any ligature. All surgical



procedures were carried out under sterile conditions and were performed by the same experimenter.

Four days after surgery rats that developed tactile allodynia were randomly allocated into two groups of 6 animals for each drug: a group of animals administered with 0.3 mL of drug solution and a group of animals administered with 0.3 mL of the corresponding PLGA nanoparticles at the same dose-level. Nanoparticles suspensions were prepared in 0.9% sterile saline in a sterile container, just before injection. The injections were done in the sub-plantar region of the left paw. As in the previous experiment, the dose-levels were different: 0.125 mg for amitriptyline, 0.075 mg for doxepin and 0.09 mg for imipramine, and an additional group (control) of six animals was used. The left sciatic nerve of these latter animals was exposed but left unaffected (sham control rats). They were injected with 0.3 mL of sterile saline.

Threshold for tactile sensitivity was measured in both hind paws, using an automated apparatus for applying reproducible light touch (Dynamic plantar Aesthesiometer 37400, Ugo Basile, Comerio, Italy). Animals were placed in their compartments on the metal mesh surface. After a short period, in which they showed exploratory behavior, they remained still in a resting position. With the help of an adjustable angled mirror, the tactile stimulator unit was placed beneath the selected hind paw to position the filament below the plantar surface of the animal. When the unit was started, the electrodynamic actuator lifts the stainless steel filament, which touched the plantar surface and began to exert an upward force below the threshold of feeling. The force was increased until the animal moved its paw or until a maximum of 50 g was applied for 20 s.

Allodynia degree was defined as the difference between the g of force required to elicit paw withdrawal at selected times after vehicle or drug treatment, and the g of force required before treatment or basal value (paw withdrawal threshold-PWT-). Mean of two determinations were recorded at each time point.

The AUC was calculated from the curve between the differences in the PWT vs. the different time points of measurement. Data are expressed as mean±standard deviation (SD).

### 2.7. Statistical Analysis

All statistical analyses were undertaken using the ANOVA test followed by a post hoc test (Scheffe method) when necessary and using SPSS® package v. 15.0 (SPSS Inc., USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant in all cases.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Nanoparticles Characterization

PLGA-nanoparticles were obtained by a simple and highly reproducible method developed by Fessi et al [27] (nanoprecipitation or solvent displacement) instead of the commonly used emulsion process. This method is particularly useful for the encapsulation of lipophilic substances [41], but we have encapsulated amitriptyline, doxepin and imipramine in their hydrochloride forms (the commercially available form) with good results in terms of

morphology, particle size, Z potential, drug loading and encapsulation efficiency. Results are shown in Table 2. Particle sizes, ranging between 373 and 480 nm, are probably small enough to present the advantages mentioned in the introduction section, that is, to be transported across epithelial barriers, lymphatic vessels, and prolong the mean residence time of the drug in the organism, diminishing the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. The Z potential of the nanoparticles depends on the end groups of the PLGA, the type of drug encapsulated and the type of stabilizing agent used during nanoparticle preparation. It is also very influenced by the ions present in the medium. As observed in Table 2, the Z potential values obtained are positive instead of negative as usual when PLGA is used as polymer. This could be due to the neutralization of the negative charge of the carboxylic acid end groups of the polymer by the protonated amino group of the drugs [42]. However, the presence of the surfactant Lutrol® F127 could compensate the missing electrostatic repulsion by acting as steric stabilizer [43]. So, the values obtained ensure electrostatic stabilization of the formulation during the time the drug takes to be released from the nanoparticles, avoiding major agglomeration.

Amitriptyline, doxepin and imipramine hydrochloride were encapsulated with a quite considerable drug content (from 31.09 to 40.46%) and encapsulation efficiency (from 44.60 to 56.19%). The major constrain of the nanoprecipitation method lays on the difficulty of finding a compatible mixture of drug, polymer and solvent blends that allow the formation of the particles and achieve an efficient drug entrapment. According to Barichello et al [44] when a drug has a low affinity for the polymer, it tends to diffuse from the organic phase to the external aqueous medium during the nanoparticle formation process, leading to low drug encapsulation efficiencies. In this sense, this technique is often used with lipophilic drugs when PLGA is used, but some works attempted to incorporate hydrophilic drugs reaching drug loadings up to 12 % [44, 45]. Zou et al. [46] prepared PLGA-nanoparticles by nanoprecipitation method but the active (in that case, DNA) was adsorbed onto the surface of the before obtained nanoparticles and not dispersed in the matrix. In the present work, the preparation technique was optimized in order to increase drug contents in comparison with previous works using this method [26, 45, 47]. The use of surfactant Poloxamer (Lutrol® F127) was a good alternative to PVA, since it is known that the residual amount of PVA is strongly adsorbed on the nanoparticulate surface, being resistant to moderate washing, and could influence the physical properties of the nanoparticles and potentially cause carcinogenic toxicity [48, 49].

### 3.2. *In vitro* Release Studies

The *in vitro* mean release profile of each assayed drug from the PLGA-loaded nanoparticles in comparison with a solution of the same drug is displayed in Figure 2. In our experimental conditions (37°C and 600 rpm), the time needed to release 60% of the drug from the nanoparticles was around 4, 20 and 23 h for imipramine, amitriptyline and doxepin, respectively. These values were considerably higher than that obtained for the respective solutions (from 1 to 2 h in all cases).

Table 2. Characteristics of the PLGA Nanoparticles Obtained for the Drugs Assayed. Values are Expressed as mean±SD

Drug	Particle size	PI	Z potential	Drug loading	Encapsulation efficiency
	nm		mV	%	%
Amitriptyline	420±13	0.28	4.3±0.3	40.46±4.11	56.19±3.62
Doxepin	480±73	0.26	4.7±0.4	31.09±3.02	44.60±7.91
Imipramine	373±25	0.24	4.8±0.1	32.20±3.20	46.67±4.51



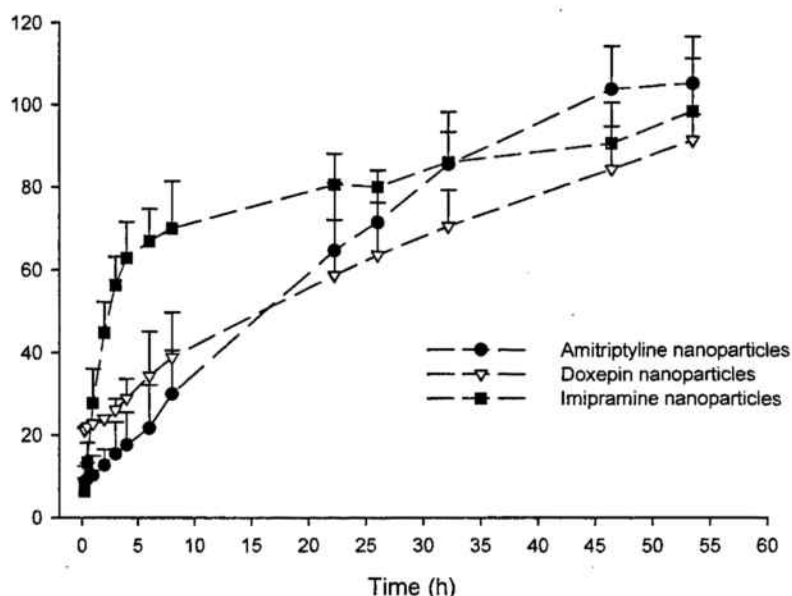


Fig. (2). Mean cumulative drug release from loaded nanoparticles. Bars indicate SD.

The release profiles of the nanoparticles were similar for amitriptyline and doxepin but different for imipramine. Amitriptyline and doxepin showed a slower and constant release process while imipramine displayed a biphasic pattern (a higher release rate in the first 4 hours but from here onwards the rate was relatively constant up to the end of the experiment). The burst effect obtained for amitriptyline ( $9.36 \pm 3.81\%$ ) and imipramine ( $14.08 \pm 4.97\%$ ) was statistically lower than that obtained for doxepin ( $21.98 \pm 0.38\%$ ). The burst effect—considered a drawback for any sustained release—is a parameter that generally increases when increasing the drug/PLGA ratio. In our experimental conditions, a relatively high drug:PLGA mass ratio (1:1) was used and the burst effect was similar or even lower than those reported by other authors using the same encapsulation technique [50, 51, 52]. So, the amount of encapsulated drug was therefore quite high and, only a small amount of drug remained on the surface of the nanoparticles.

After fitting several release models (zero order, first order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas) to the observed release amount vs. time, Korsmeyer-Peppas was the best model that fitted our data, according to AIC values (Table 3). For this model, the coefficient

of determination ( $R^2$ ) ranged between 0,884 and 0,999 for all replicates and drugs. Taking into account the different values of the diffusional exponents obtained ( $n = 0.63, 0.29$  and  $0.49$  for amitriptyline, doxepin and imipramine, respectively), the release of doxepin seemed to be diffusion controlled, while a combination of Fickian diffusion and polymer relaxation followed by erosion of the PLGA matrix (anomalous transport) appeared to be involved in the release mechanism of amitriptyline and imipramine. The release of the drug from the nanoparticles is influenced by factors related to the physicochemical properties of the drug (hydrophilic) and the polymer (hydrophobic). We hypothesized that the higher solubility of amitriptyline and imipramine with respect to doxepin could facilitate the water penetration into the matrix allowing the simultaneous diffusion of the dissolved drug out of the nanoparticles and the erosion of the polymer by hydrolytic degradation of ester linkages. Moreover, in case of doxepin, the higher burst effect obtained with respect to amitriptyline and imipramine could reinforce this process since according to Faisant et al [53], the presence of a burst effect could be attributed to a normal diffusion-controlled drug release. Finally, another factor influencing the release of drugs from

Table 3. Mean Parameters Obtained After Fitting the Release Data from the PLGA-loaded Nanoparticles to Different Models.

Drug	Parameter	First order	Zero order	Higuchi	Korsmeyer
Amitriptyline	k	0.065 ( $h^{-1}$ )	0.023 (%/h)	0.140 ( $h^{-1/2}$ )	0.099 ( $h^{-n}$ )
	n	-	-	-	0.63
	AIC	-29.93	-23.21	-21.19	-35.50
Doxepin	k	0.061 ( $h^{-1}$ )	0.020 (%/h)	0.128 ( $h^{-1/2}$ )	0.217 ( $h^{-n}$ )
	n	-	-	-	0.29
	AIC	-21.23	-8.64	-27.19	-34.36
Imipramine	k	0.225 ( $h^{-1}$ )	0.029 (%/h)	0.175 ( $h^{-1/2}$ )	0.289 ( $h^{-n}$ )
	n	-	-	-	0.49
	AIC	-21.64	7.38	-11.19	-22.59

the particles could be the interaction of the encapsulated drug with the polymer. Amitriptyline and imipramine have similar structures and, therefore the same type of drug/polymer interaction, whereas the presence of an oxygen atom in the structure of doxepin could make this interaction stronger, thanks to the formation of hydrogen bonds with the PLGA. This could explain the slower release process observed for this drug from 60% cumulative drug release up to the end of the experiment.

The highest values of mean dissolution time were obtained for amitriptyline and doxepin ( $21.42 \pm 4.90$  h and  $17.59 \pm 6.68$  h respectively). Imipramine showed a statistically lower release rate (MDT =  $9.38 \pm 2.88$  h). These values match with a sustained release process of the drugs from the nanoparticles in all cases. The D.E. % values obtained ( $61.09 \pm 8.36\%$ ,  $69.73 \pm 10.38\%$  and  $80.77 \pm 3.49\%$  for amitriptyline, doxepin and imipramine, respectively) were similar to the maximum percentage of drug released for each drug.

### 3.3. *In vivo* Experiments

#### 3.3.1. Analgesic Effect in Front of Nociceptive Pain

After administration of the different drug solutions or nanoparticles and saline, no inflammatory response was appreciated in the injection site of any rat.

The effect of the local infiltration of amitriptyline, doxepin and imipramine as solution and as PLGA-nanoparticles at the dose-levels of 0.125, 0.075 and 0.09 mg, respectively, and after the injection of saline (control group) is shown in Figure 3. As observed in the figure, there was an increase in the PWT ( $p < 0.05$ ) when the drug was administered as nanoparticles with regard to its respective solution. These increases were of 110 min (from 10 to 120 min) for amitriptyline, of 115 min (from 5 to 120 min) for doxepin and of 40 min (from 20 to 60 min) for imipramine (Figs. 3a, 3b and 3c, respectively). Therefore, the nanoencapsulation of these drugs considerably increased the duration of its analgesic effect, especially in the first two drugs.

The drugs tested, either as solution or nanoparticles, did not modify the heat-induced withdrawal of the contralateral paw, thus no systemic analgesia appeared at the dose-levels assayed.

The mean  $\pm$  SD AUC values obtained after administration of imipramine, amitriptyline and doxepin nanoparticles were, in all cases, higher than those obtained from the respective solutions, resulting in a significant increase ( $p < 0.05$ ) of 34, 55 and 62%, respectively. So, the encapsulation of these drugs enhanced their pharmacodynamic effect due to a slower release of the drug from

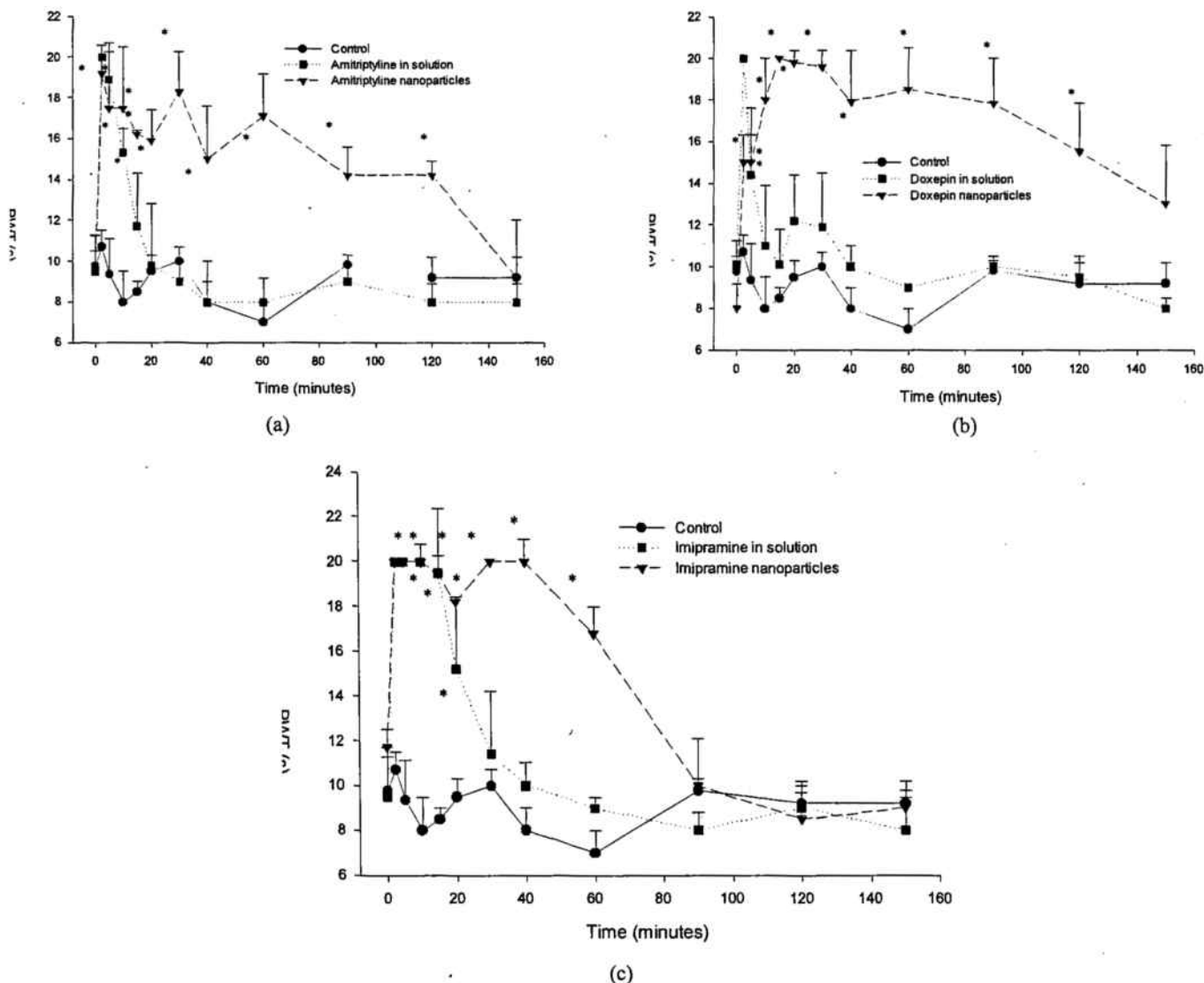


Fig. (3). Time course of the mean analgesic effect (PWT) after infiltration of: (●) saline, (■) solution and (▼) nanoparticles of (a) amitriptyline at 0.125 mg, (b) doxepin at 0.075 mg and (c) imipramine at 0.09 mg. Bars represent SD. \*:  $p < 0.05$  compared with saline (control); Φ:  $p < 0.05$  compared with solution.

the nanodevice and by a better spreading of the dose when compared to the administration of the drug in the free form.

3.3.2. Anti-Allodynic Effect in Front of Nerve Injury

Constriction injury of sciatic nerve reached the pain threshold on the ipsilateral paw, indicating that the tactile allodynia was developed in all animals.

After administration of saline and the different drug solutions or nanoparticles, no inflammatory response was appreciated in the injection site of any rat.

Figures 4a and 4b show that an anti-allodynic activity was observed when amitriptyline and doxepin were given as PLGA-nanoparticles, since the mean PWT values obtained were higher than those obtained for the control group ( $p < 0.05$ ). The duration of the effect was up to 20 and 30 minutes post injection, respectively, which was significantly higher than those observed after its administration at the same dose-levels but in solution (up to 5 and 20 minutes, respectively). No anti-allodynic effect was observed when imipramine was administered at 0.09 mg neither in solution (probably because the dose-level assayed was not effective enough to attenuate allodynia) or in nanoparticles (maybe due to the relatively rapid release profile obtained for this formulation, which did not allow the absorption of enough amount of drug).

The mean  $\pm$ SD AUC values obtained after administration of amitriptyline and doxepin nanoparticles were higher than those obtained for its respective solutions, resulting in a significant increase ( $p < 0.05$ ) of 77 and 229%, respectively. These increases were

higher than that found in the antinociceptive experiments, specially for doxepin, which make us think that the two kinds of pain tested in this study do not appear to share a common pattern. Noxious thermal stimuli is thought to be mediated through high-threshold, thin unmyelinated primary afferent C-fibers; non-noxious tactile stimulation is believed to be mediated through large diameter, low-threshold A $\beta$  afferent fibers, and processed at supraspinal sites receiving input through the dorsal column [54]. Maybe this latter path is being more potently blocked by increasing in time the presence of these drugs in the organism.

Table 4 shows the mean  $\pm$ SD AUC values normalized by dose administered (AUC/D) obtained for the drugs (in both solution and nanoparticles) and the AUC value obtained for the control group (after infiltration of the vehicle). From these results and at the dose-levels assayed, amitriptyline seemed to elicit the lower analgesic effect. Doxepin was the most potent drug in both types of pain tested, as previously pointed out by other authors [55, 56, 57], but the great interest lays on the fact that its potency was considerably increased (62% and 229% in both pharmacodynamic experiments) when the drug was encapsulated. These outstanding results obtained for doxepin suggest that this drug should be considered as a therapeutic alternative in pain relieving.

Some attempts to obtain sustained release forms containing the drugs assayed in this study have been previously tested, but with different objectives (for depressive illnesses [58], to mask the taste of salts [59]) or using different delivery systems such as OROS formulations [60], pellets coated with Eudragit RS100 [61] or

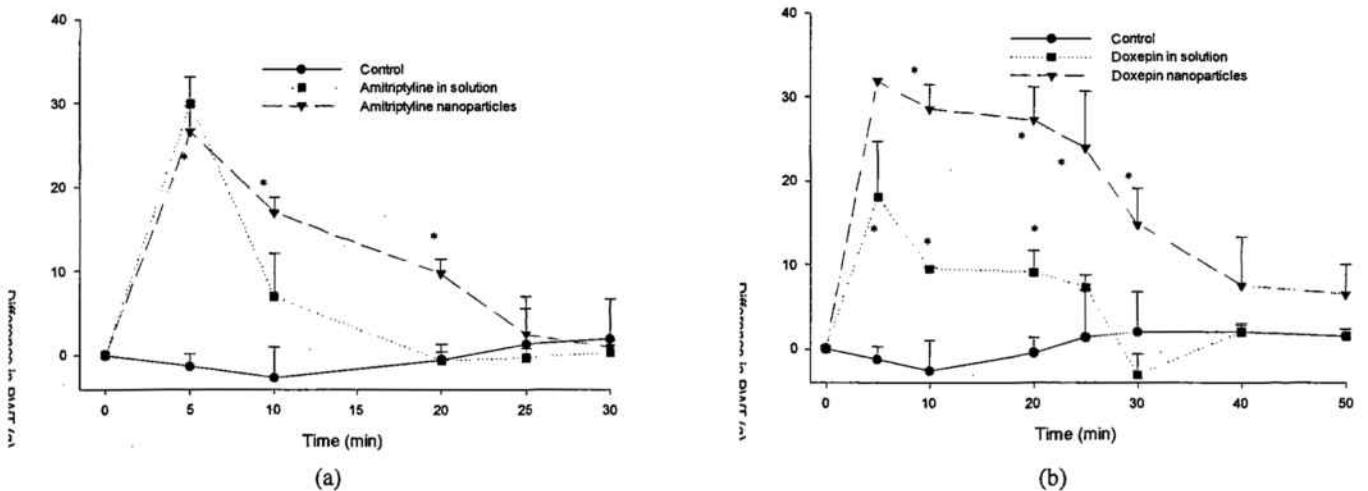


Fig. (4). Time course of the mean anti-allodynic effect (PWT) after infiltration of: (●) saline, (■) solution and (▼) nanoparticles of (a) amitriptyline at 0.125 mg and (b) doxepin at 0.075 mg. Bars represent SD. \*:  $p < 0.05$  compared with saline (control);  $\Phi$ :  $p < 0.05$  compared with solution.

Table 4. Summary of the mean  $\pm$ SD AUC Values Normalized by Dose, Obtained in Analgesia and Anti-allodynia Experiments After Local Infiltration of a Solution and a Suspension of PLGA-loaded Nanoparticles to Rats. AUC Values from Control Groups are Also Included. \*:  $p < 0.05$  Compared with Saline (control);  $\Phi$ :  $p < 0.05$  Compared with Solution

Drug	AUC/D (min·s/mg)		AUC/D (min·s/mg)	
	Analgesia		Anti-allodynia	
	Solution	Nanoparticles	Solution	Nanoparticles
Amitriptyline	11404 $\pm$ 566*	17683 $\pm$ 682* $\Phi$	1581 $\pm$ 314*	2797 $\pm$ 146* $\Phi$
Doxepin	21161 $\pm$ 340*	34276 $\pm$ 3063* $\Phi$	3704 $\pm$ 717*	12197 $\pm$ 798* $\Phi$
Imipramine	17207 $\pm$ 1029*	23100 $\pm$ 1237* $\Phi$	-	-
Control	1183 $\pm$ 25.2*	-	44.7 $\pm$ 28.7	-

liposomes [62, 63]. Liposomes are well established colloidal drug delivery systems, but they have some limitations such as difficulty in storage, stability and rapid drug leakage. Biodegradable polymeric nanoparticles could avoid such limitations, protecting the drug from degradation by lysosomes and help to control drug release rate [64]. In this sense, PLGA nanoparticles of amitriptyline, doxepin and imipramine could bring advantages in the field of pain, specially reducing the administered drug and getting a long-lasting pharmacological effect.

## CONCLUSIONS

The simple method of nanoprecipitation was used to obtain PLGA nanoparticles of amitriptyline, doxepin and imipramine. The particle size ranged between 373 to 480 nm, probably small enough to give advantages in their transport across epithelial barriers and to prolong its mean residence time in the organism. The drug loadings obtained (from 31.09 to 40.46 %) allow the administration of the desired dose of drug with a relative low amount of nanoparticles. The release profiles, controlled by drug diffusion in case of doxepin but by a combination of Fickian diffusion and polymer relaxation/erosion of the PLGA matrix in case of amitriptyline and imipramine (anomalous transport), and the mean dissolution time values obtained showed, as expected, a prolonged release of the drugs from the nanoparticles. The nanoencapsulated drugs were able to maintain *in vivo* their sustained release, giving longer and higher analgesic and anti-allodynic activity in comparison to the respective drug solutions. Doxepin nanoparticles showed the most outstanding *in vivo* results and could be considered as a therapeutic alternative in pain relieving.

## REFERENCES

- Oatway, M.; Reid, A.; Sawynok, J. Peripheral antihyperalgesic and analgesic actions of ketamine and amitriptyline in a model of mild thermal injury in the rat. *Anesth. Analg.*, 2003, 97, 168-173.
- Strumper, D.; Durieux, D.E. Antidepressants as long-lasting anesthetics. *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2004, 29(3), 277-285.
- Sung, B.; Wang, G.K. Peripherally administered amitriptyline derivatives have differential anti-allodynic effects in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, 2004, 357, 115-118.
- Sansone, R.A.; Sansone, L.A. Pain, pain, go away: antidepressants and pain management. *Psychiatry*, 2008, 5(12), 16-19.
- Zin C.S.; Nissen, L.M.; Smith, M.T.; O'Callaghan, J.P.; Moore, B.J. An update on the pharmacological management of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *CNS Drugs*, 2008, 22(5), 417-442.
- Fishbain, D.A.; Detke, M.J.; Wernicke, J.; Chapell, A.S.; Kajdasz, D.K. The relationship between antidepressant and analgesic responses: findings from six placebo-controlled trials assessing the efficacy of duloxetine in patients with major depressive disorder. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2008, 24(11), 3105-3115.
- Da Cunha, R.J. Jr.; Barrucand, L.; Verçosa, N. A study on electrocardiographic changes secondary to use of tricyclic antidepressants in patients with chronic pain. *Rev. Bras. Anestesiol.*, 2009, 59(1), 50-55, 46-50.
- Haderer, A.; Gerner, P.; Kao, G.; Srinivasa, V.; Wang, G.K. Cutaneous analgesia after transdermal application of amitriptyline versus lidocaine in rats. *Anesth. Analg.*, 2003, 96(6), 1707-1710.
- Abdel-Salam, O.M.W.; Nofal, M.S.; El-Shenawy, M. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol. Res.*, 2003, 48, 157-165.
- Sudoh, Y.; Cahoon, E.E.; De Girolami, U.; Wang, G.K. Local anesthetic properties of a novel derivative N-methyl doxepin, versus doxepin and bupivacaine. *Anesth. Analg.*, 2004, 96(3), 672-676.
- Eisenach J.C.; Gebhart, G.F. Intrathecal amitriptyline acts as an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. *Anesthesiology*, 1995, 83, 1046-1054.
- Esser M.J.; Sawynok, J. Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects. *Pain*, 1999, 80, 643-653.
- Besson, M.; Desmeules, J.; Piguet, V. What is the place of topical analgesia in neuropathic pain?. *Rev. Med. Suisse*, 2008, 4(162), 1498, 1500, 1502-1504.
- Cheng, B.C.; Chan, B.R.; Chen, T.W.; Cheng, K.I.; Wang, J.J.; Chu, C.C. Doxepin has a potent and long-acting spinal anesthetic effect in rats. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2006, 22(2), 68-74.
- Hota, D.; Bansal, V.; Pattanaik, S. Evaluation of ketamine, nimodipine, gabapentine and imipramine in partial sciatic nerve transection model of neuropathic pain in rat: an experimental study. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2007, 29 (7), 443-446.
- Couvreux P.; Vauthier, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.*, 2006, 23(7), 1417-1450.
- Hariharan, S.; Bhardwaj, V.; Bala, I.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Ravi Kumar, M.N.V. Design of Estradiol Loaded PLGA Nanoparticulate Formulations: A Potential Oral Delivery System for Hormone Therapy. *Pharmaceut. Res.*, 2006, 23(1), 184-195.
- Kalaria, D.R.; Sharma, G.; Beniwal, V.; Ravi Kuman, M.N.V. Design of biodegradable Nanoparticles for oral delivery of doxorubicin. *In vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. Pharm. Res.*, 2008, 26(3), 492-501.
- De Jong, W.H.; Borm, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine*, 2008, 3(2), 133-149.
- Lowe P.J.; Temple, C.S. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46, 547-552.
- Alonso, M.J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.*, 2004, 58, 168-172.
- Roney, C.; Kulkarni, P.; Arora, V.; Antich, P.; Bonte, F.; Wu, A.; Mallikarjuna, N.N.; Manohar, S.; Liang, H.-F.; Kulkarni, A.R.; Sung, H.-W.; Sairam, M.; Aminabhavi, T.M. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J. Control. Release*, 2005, 108, 193-214.
- Avgoustakis, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug. Deliv.*, 2004, 1, 321-333.
- Al Malyan, M.; Becchi, C.; Nikkola, L.; Viitanen, P.; Boncinelli, S.; Chielini, F.; Ashammakhi, N. Polymer-based biodegradable drug delivery systems in pain management. *J. Craniofac. Surg.*, 2006, 17(2), 302-313.
- Shive M.S.; Anderson, J.M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1997, 20(2), 5-24.
- Betancourt, T.; Brown, B.; Branon-Peppas, L. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and *in vitro* evaluation. *Nanomedicine*, 2007, 2(2), 219-232.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devisaguet, J.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, 1989, 55, R1-R4.
- Bilati, U.; Allemán, E.; Doelker, E.; Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24, 67-75.
- Franz, T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Dermatol.*, 1975, 64, 190-195.
- Lee, S.; Kim, M.S.; Kim, J.S.; Park, H.J.; Woo, J.S.; Lee, B.C.; Hwang, S.J. Controlled delivery of a hydrophilic drug from a biodegradable microsphere system by supercritical anti-solvent precipitation technique. *J. Microencaps.*, 2006, 23, 741-749.
- Zhang, H.; Lu, Y.; Zhang, G.; Gao, S.; Sun, D.; Zhong, Y. Bupivacaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix and modeling of drug release. *Int. J. Pharm.*, 2008, 35, 244-249.
- Korsmeyer, R.W.; Gurny, R.; Doelker, E.M.; Buri, P.; Peppas, N.A. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, 1983, 15, 25-35.
- Peppas, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 1985, 60, 110-111.
- Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release*, 1987, 5, 37-42.
- Yamaoka, K.; Nakagawa, T.; Uno, T. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equations. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 1978, 6, 165-175.
- Khan, K.A. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1975, 27, 48-49.
- Dokoumetzidis, A.; Papadopoulou, V.; Macheras, P. Analysis of dissolution data using modified versions of Noyes-Whitney equation and the Weibull function. *Pharm. Res.*, 2006, 23, 256-261.
- Zimmerman, N. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983, 16(2), 109-110.
- Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32, 77-88.
- Bennet, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33, 87-107.



- [41] Teixeira, M.; Alonso, M.J.; Pinto, M.M.M.; Barnosa, C. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2005, 59, 491-500.
- [42] Murugesan, S.; Mishra, P.; Kumar Jain, N. Development of folate-conjugated PEGylated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticulate carrier for docetaxel. *Curr. Nanosci.*, 2010, 4, 402-408.
- [43] Benoit, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Heurtault, B. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 2003, 24, 4283-4300.
- [44] Barichello, J.M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999, 25(4), 471-476.
- [45] Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M.C.; Illum, L.; Davis, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release*, 1999, 57, 171-185.
- [46] Zou, W.; Liu, C.; Chen, Z.; Zhang, N. Studies on bioadhesive PLGA nanoparticles: a priming gene delivery system for efficient gene therapy to lung cancer. *Int. J. Pharm.*, 2009, 370, 187-195.
- [47] Gomez-Gaete, C.; Tsapis, N.; Besnard, M.; Bochot, A.; Fattal, E. Encapsulation of examethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharm. Nanotechnol.*, 2007, 331, 153-159.
- [48] Sahoo, S.K.; Panyam, J.; Prabha, S.; Labhasetwar, V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release*, 2002, 82, 105-114.
- [49] McCarron, P.A.; Donnelly, R.F.; Marouf, W. Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *J. Microencapsul.*, 2006, 23(5), 480-498.
- [50] Gao, H.; Wang, Y.-H.; Fan, Y.-G.; Ma, J.-B. Conjugates of poly(DL-lactide-co-glycolide) on amino cyclodextrins and their nanoparticles as protein delivery system. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2007, 80(1), 111-122.
- [51] Dalpiaz, A.; Vighi, E.; Pavan, B.; Leo, E. Fabrication via a nonaqueous nanoprecipitation method characterization and *in vitro* biological behavior of N6-cyclopentyladenosine-loaded nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98(11), 4272-4284.
- [52] Madaswamy, S.M.; Rawat, M.K.; Mishra, A.; Singh, S. PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine*, 2009, 5(3), 323-333.
- [53] Faisant, N.; Siepmann, J.; Benoit, J.P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanism and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002, 15, 355-366.
- [54] Tian, J.; Gu, Y.; Su, D.; Wu, Y.; Wang, X. Effects of intrathecal lidocaine on hyperalgesia and allodynia following chronic constriction injury in rats. *Eur. J. Pain*, 2009, 13, 130-137.
- [55] Wordliczeck, J.; Banach, M.; Labuz, D.; Przewlocka, B. Intrathecal administration of doxepin attenuated development of formalin-induced pain in rats. *J. Neural. Transm.*, 2005, 112(10), 1321-1329.
- [56] Gerner, P.; Srinivasa, V.; Zizza, A.M.; Zhuang, Z.Y.; Luo, S.; Zurakowski, D.; Eappen, S.; Wang, G. Doxepin by topical application and intrathecal route in rats. *Anesth. Analg.*, 2006, 102(1), 283-287.
- [57] Epstein, J.B.; Epstein, J.D.; Epstein, M.S.; Oien, H.; Truelove, E.L. Doxepin rinse for management of mucositis pain in patients with cancer: one week follow-up of topical therapy. *Spec. Care Dentist.*, 2008, 28(2), 73-77.
- [58] Gido, C.; Langguth, P.; Mutschler, E. Predictions of *in vivo* plasma concentrations from *in vitro* release kinetics: application to doxepin parenteral (I.M.) suspensions in lipophilic vehicles in dogs. *Pharm. Res.* 1994, 11(6), 800-808.
- [59] Hashimoto, Y.; Tanaka, M.; Kishimoto, H.; Shiozawa, H.; Hasegawa, K.; Matsuyama, K.; Uchida, T. Preparation, characterization and taste-masking properties of polyvinylacetal diethylaminoacetate microspheres containing trimebutine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2002, 54(10), 1323-1328.
- [60] Gupta, S.K.; Shah, J.C.; Hwang, S.S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterisation of OROS and immediate-release amitriptyline. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1999, 48(1), 71-78.
- [61] Park, E.S.; Lee, D.S.; Kwon, S.Y.; Chi, S.C. A new formulation of controlled release amitriptyline pellets and its *in vivo/in vitro* assessments. *Arch. Pharm. Res.*, 2003, 26(7), 569-574.
- [62] Nii, T.; Ishii, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int. J. Pharm.*, 2005, 298(1), 198-205.
- [63] Ahlyayach, H.; Gohi, F.M.; Bennouna, M. Interaction of electrically neutral and cationic forms of imipramine with liposome and erythrocyte membranes. *Int. J. Pharm.*, 2004, 279(1-2), 51-58.
- [64] Wang, P.; Sanders, B.G.; Kline, K. A comparison of anticancer properties of  $\alpha$ -TEA when formulated in nanoparticles or liposomes and delivered by gavage. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2006, 47.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Actividad analgésica de los antidepresivos tricíclicos (ADTs) en solución

#### 4.1.1 Efecto antinociceptivo

La Figura 6 muestra las curvas Dosis (mg/pata) - Respuesta (minutos de analgesia) de los diferentes fármacos ensayados, acompañados de la ecuación que mejor ajusta los datos. La Tabla 4 muestra los valores de ED<sub>120</sub> (dosis necesaria para alcanzar una analgesia de 120 min) calculados a partir de estas ecuaciones.

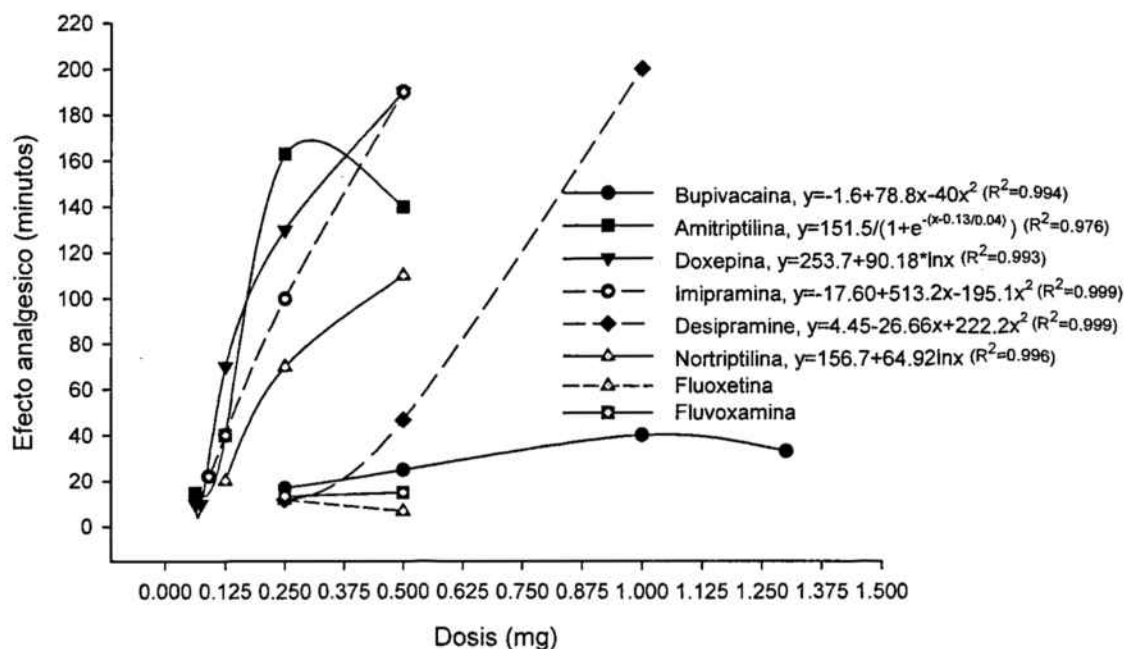


Figura 6. Curvas Dosis-Respuesta obtenidas para los diferentes fármacos

Tabla 4. ED<sub>120</sub> calculados para los diferentes fármacos

Fármaco	ED <sub>120</sub> mg
Amitriptilina	0.17
Doxepina	0.23
Imipramina	0.30
Desipramina	0.79
Nortriptilina	0.57

De estos resultados se observó que los ADTs amitriptilina, doxepina e imipramina son los que presentaron una acción analgésica más potente. Estas observaciones concuerdan con las realizadas por otros autores (Korzeniewska-Rybicka y Plaznik, 1998; Sansone y Sansone, 2008). La nortriptilina, la desipramina, la fluoxetina y la fluvoxamina mostraron menor potencia y su bloqueo nervioso no fue satisfactorio, incluso a dosis altas. A pesar de las pequeñas diferencias en su estructura, los ADTs no difieren de una manera muy significativa en la IC<sub>50</sub> para el bloqueo de los canales de sodio, según datos *in vitro* (Sudoh y col., 2003; Dick y col., 2007). Todos los ADTs bloquean la corriente de sodio de una manera relativamente efectiva, aspecto que sugiere que son capaces de unirse a los canales de sodio con una buena afinidad. Pero, a la vista de los resultados

obtenidos en el presente estudio, debe haber un factor adicional dependiente de la relación estructura/actividad que determina su efectividad analgésica: las aminas terciarias (amitriptilina, doxepina e imipramina) poseen estructuras y características físico-químicas distintas a las aminas secundarias (nortriptilina, desimpramina, en realidad metabolitos de la amitriptilina e imipramina, respectivamente) que pueden marcar la diferencia en su potencia de acción (Sansone y Sansone, 2008).

A pesar que algunos trabajos muestran un efecto más potente de la fluoxetina respecto a la fluvoxamina, basado en la inhibición de las corrientes de proteína G potasio rectificadora y de los canales de sodio (Kobayashi y col., 2003), en el presente trabajo no se ha observado actividad a las dosis administradas para ninguno de los dos fármacos.

En referencia a la vía de administración, la ruta intratecal parece ser la más utilizada por otros autores. La administración intratecal de amitriptilina alivia la hiperalgesia inducida por carragenina de manera dosis dependiente a partir de 60 µg (Eisenach y Gebhart, 1995). Wordliczek y col. (2005) pusieron de manifiesto que la administración intratecal en ratas de doxepina a 62.5 µg incrementaba el umbral nociceptivo en el test de presión de la pata, reducía el dolor inducido por formalina y era capaz de potenciar el efecto de la morfina en este mismo test, mientras que Cheng y col., (2006) observaron un efecto anestésico satisfactorio en la actividad motora, propiocepción y nocicepción a una dosis de 86 µg. En el presente estudio, se ha administrado doxepina por una vía diferente (subcutánea) y los resultados obtenidos mostraron que la inyección subcutánea del fármaco a dosis bajas provoca una prolongada analgesia en la especie animal ensayada ( $ED_{120}=0.23$  mg). Devulder en 1998, trabajando con morfina, ya observó unos resultados mas óptimos tras una administración subcutánea que tras una inyección intratecal.

Oatway y col. (2003) demostraron que la inyección local de amitriptilina 15 minutos antes de una lesión por exposición al calor (52°C durante 45 segundos) producía analgesia a unas dosis entre 0.08 y 0.28 mg. De los resultados obtenidos en la presente experiencia y de la curva dosis-respuesta para este fármaco, se deduce que dosis más altas no prolongan el efecto farmacológico y producen edema plantar. De ahí el perfil sigmoide de la curva. Los resultados mostraron que una dosis de alrededor de 0.19 mg asegura una analgesia prolongada en esta especie animal, sin edema plantar aparente. El mecanismo de formación del edema no está claro, pero parece que la lesión se produce independientemente del efecto analgésico y ambos efectos coexisten (Oatway y col., 2003). Finalmente, otros autores (Barnet y col., 2005) estudiaron la toxicidad local de la amitriptilina en rata usando dosis unas 10 veces más altas y una técnica de inyección distinta (cerca del trocánter) y ya observaron que los animales que recibían concentraciones altas de fármaco desarrollaban una lesión tisular espontánea.

#### **4.1.2 Efecto antialodínico**

En animales inducidos con lesión constrictiva crónica del nervio ciático, la doxepina y, en menor grado la amitriptilina y la imipramina, mostraron una importante protección frente a la alodinia a la dosis de 0.5 mg. La bupivacaína a 1 mg resultó inefectiva (ver Figura 7).

Otros autores ensayaron para la amitriptilina otras vías de administración. La vía intraperitoneal a dosis hasta 30 mg resultó inefectiva en respuesta al test de von Frey (Bomholt y col., 2005), mientras que la administración intravenosa a 4.7 mg/kg no dio

buenos resultados en ratas con ligadura de nervio (Wang y col., 1999). Sung y Wang (2004) publicaron que la administración periférica de amitriptilina a dosis de entre 0.028 y 0.28 mg suprime la alodinia en un modelo de dolor neuropático. Por tanto, dosis incluso inferiores a las que se han usado en el presente estudio (0.5 mg) podrían ser efectivas para este fármaco. De esta manera y, teniendo en cuenta el edema plantar observado a dosis superiores, resulta de gran interés el ajustar la dosis de amitriptilina.

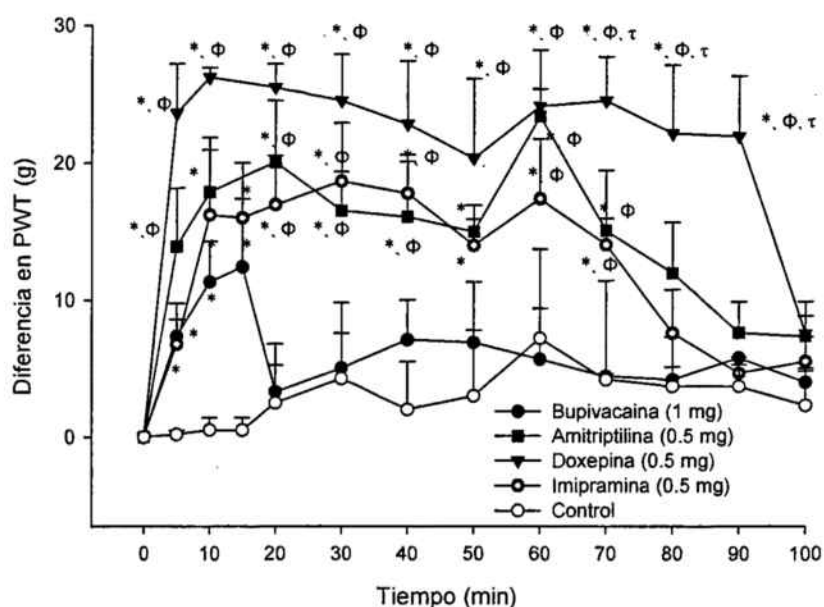


Figura 7. Evolución temporal del efecto antialodínico, expresado como diferencia en PWT (latencia retardada de la pata), tras administración de bupivacaína (1 mg), amitriptilina, doxepina e imipramina (0,5 mg). Las barras representan la desviación estándar. \*:  $p < 0.05$  respecto al grupo control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a bupivacaína;  $\tau$ :  $p < 0.05$  respecto a amitriptilina e imipramina.

En referencia a la imipramina, trabajos previos muestran que la administración diaria del fármaco durante 21 días a 3 mg/kg logra controlar la hiperalgesia en un modelo de dolor neuropático en rata (Hota y col., 2007). Sin embargo, y de acuerdo los resultados del presente trabajo, la administración subcutánea de una única dosis fue suficiente para producir un efecto farmacológico relativamente prolongado (70 min a dosis de 0.5 mg).

En la práctica clínica, la doxepina aplicada por vía tópica al 3.3% resulta ser moderadamente efectiva en la reducción del dolor neuropático con alodinia (McCleane, 2000a, McCleane, 2000b, Besson y col., 2008), así como en el dolor producido por mucositis oral derivada del cáncer y en terapia anticancerígena (Epstein y col., 2006). Los resultados obtenidos en las experiencias descritas en este trabajo confirman su efecto antialodínico. Este efecto se encuentra probablemente localizado en el lugar de inyección y puede resultar de la combinación de diversos mecanismos de acción, tales como el aumento de la actividad sináptica adrenérgica causada por la desactivación de la recaptación de norepinefrina en la fibras del sistema inhibitorio descendente, o incluso por su alta afinidad a los receptores H1 de histamina.

De acuerdo con los resultados globales obtenidos en el presente trabajo, la duración del efecto antialodínico resultó ser inferior a la obtenida previamente para los mismos fármacos en los estudios de antinocicepción. En ambos casos, las dosis efectivas fueron menores que las necesarias para producir un efecto antidepresivo. Los resultados obtenidos para la doxepina indican la posibilidad de utilizar este fármaco como una alternativa farmacológica en el tratamiento del dolor.



## 4.2 Bupivacaína en nanopartículas

### 4.2.1 Obtención, caracterización y estudio de liberación de la bupivacaína en nanopartículas

Las nanopartículas de bupivacaína obtenidas mediante el método de emulsificación y evaporación del disolvente presentaron un tamaño de partícula de  $453\pm 29$  nm. La Figura 8 muestra una imagen SEM de las partículas, donde se puede observar su forma esférica, su superficie lisa y la ausencia de poros y cristales de fármaco adheridos en la superficie, características ventajosas para minimizar el efecto *burst*. La carga de principio activo obtenida fue de  $45.06\pm 0.001\%$ , la tasa de encapsulación de  $82.10\pm 0.001\%$  y el valor de potencial Z fue de  $-5.51\pm 0.67$  mV.

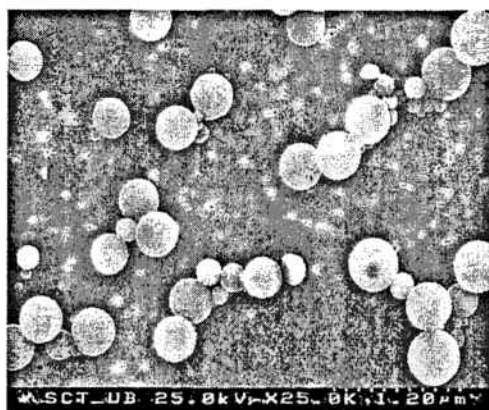


Figura 8. Nanopartículas de bupivacaína (SEM).

El estudio de liberación *in vitro* del principio activo a partir de las nanopartículas mostró una liberación sostenida del fármaco en comparación con la solución del mismo. Se observó un perfil de liberación bifásico (Figura 9), con un efecto *burst* a los 30 min considerablemente bajo (menor al 5%). De acuerdo con el valor del exponente difusional obtenido de la ecuación de Korsmeyer-Peppas ( $n= 0.95$ ), el mecanismo no Fickiano (o transporte caso II) fue el que reguló la liberación del fármaco. Probablemente la matriz polimérica sufre una relajación de su estructura y una posterior erosión y degradación del PLGA por hidrólisis de los enlaces éster. Como resultado, los protones generados de la liberación de los ácidos láctico y glicólico provocan un efecto autocatalítico que acelera la degradación del polímero (Faisant y col., 2002). Este mecanismo fue el predominante para esta formulación seguramente debido a la hidrofobicidad y poca solubilidad de la bupivacaína en forma base que haría que el agua que va penetrando en la partículas no sea capaz de solubilizar suficiente cantidad de fármaco para conseguir una liberación por difusión.

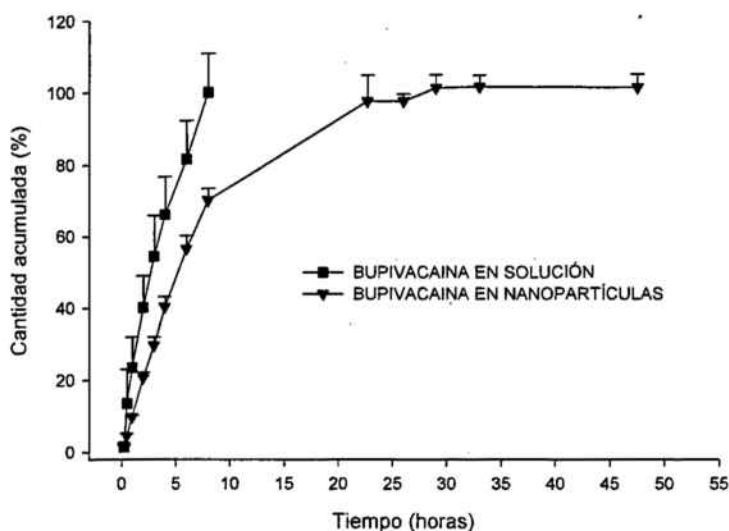


Figura 9. Perfiles de liberación medios $\pm$ SD de bupivacaína a partir de las nanopartículas de PLGA y de una solución del fármaco

#### 4.2.2 Actividad antinociceptiva y antialodínica de las nanopartículas de bupivacaína

Tras la infiltración local de nanopartículas de bupivacaína a una dosis de 1.25 mg en rata, se obtuvo un incremento del efecto antinociceptivo y del antialodínico respecto a la administración de una solución del fármaco a la misma dosis. Los valores de área bajo la curva (AUC) de las curvas respuesta vs. tiempo mostraron un 67 y un 36% de incremento en las nanopartículas, para los test de actividad antinociceptiva y antialodínica, respectivamente. La evolución temporal de la actividad farmacológica se expone en las Figuras 10 y 11.

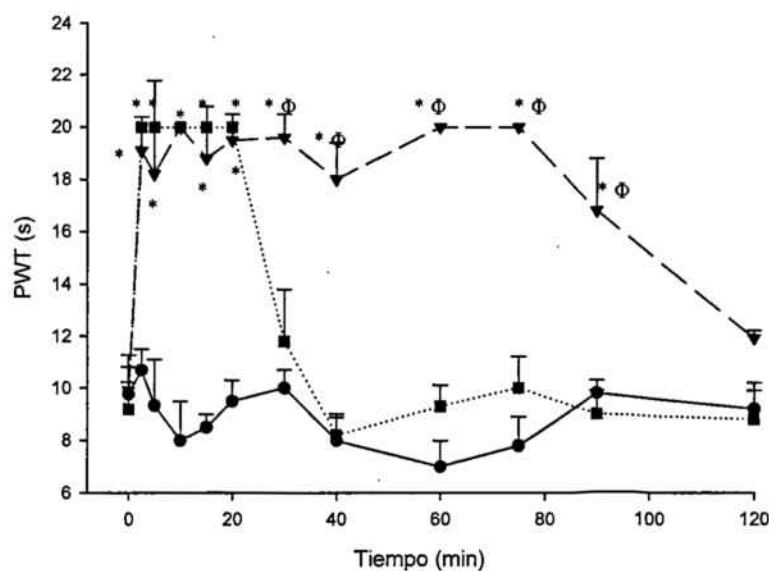


Figura 10. Curvas promedio $\pm$ SD de la evolución temporal del efecto analgésico, expresado como Pawt (latencia retardada de la pata) tras infiltración de (●) solución salina (grupo control), (■) solución y (▼) nanopartículas de bupivacaína a 1.25 mg. \*:  $p < 0.05$  respecto al control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a la solución.

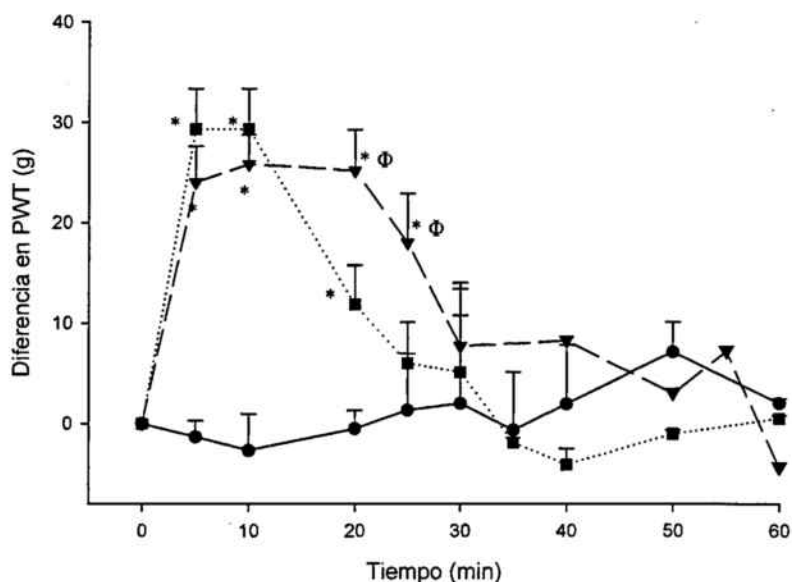


Figura 11. Curvas promedio $\pm$ SD de la evolución temporal del efecto antialodínico, expresado como diferencia en PWT (latencia retardada de la pata) tras infiltración de (●) solución salina (grupo control), (■) solución y (▼) nanopartículas de bupivacaína a 1.25 mg. \*:  $p < 0.05$  respecto al control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a la solución.

Garry y col., (1999) pusieron de manifiesto que la administración de minipellets de PLGA y bupivacaína reducían la hiperalgesia, el edema y la hipertermia tras administración de 60 mg de dosis y con un 'lag time' de 36 horas. En el presente trabajo experimental se redujo este tiempo, administrando a su vez dosis más bajas. Otros investigadores formularon el fármaco en microesferas y probaron su actividad tras administración directa en el nervio (Kissin y Lee, 2004; Wen y col., 2007) o lo combinaron con hidromorfona (Hasirci y col., 2003), obteniendo un aumento significativo en el tiempo de latencia retardada de la pata. Las nanopartículas de bupivacaína obtenidas en el presente trabajo permitieron obtener un efecto farmacológico mediante una administración más simple (como es la vía subcutánea) sin necesidad de administrar otro fármaco simultáneamente.

### 4.3 Antidepresivos tricíclicos en nanopartículas

#### 4.3.1 Obtención y caracterización de las nanopartículas de ADTs

La encapsulación de ADTs en nanopartículas se realizó mediante una técnica simple y reproducible desarrollada por Fessi y col. (1989): la nanoprecipitación o desplazamiento del solvente. Esta técnica resulta especialmente útil para la encapsulación de fármacos lipófilos (Teixeira, 2005); sin embargo, en el presente trabajo se encapsuló amitriptilina, doxepina e imipramina en forma de hidrocloreuro (forma comercial) con unos buenos resultados por lo que se refiere a morfología, tamaño de partícula, potencial Z, carga de fármaco y eficiencia de encapsulación. La Tabla 5 resume estos resultados.

Tabla 5. Caracterización de las nanopartículas de PLGA obtenidas para los fármacos ensayados. Los valores se expresan en media  $\pm$ DE.

Fármaco	Tamaño partícula nm	Pi	Potencial Z mV	Carga fármaco %	Eficiencia encapsulación %	Efecto <i>burst</i> %
Amitriptilina	420 $\pm$ 13	0.28	4.3 $\pm$ 0.3	40.46 $\pm$ 4.11	56.19 $\pm$ 3.62	9.30 $\pm$ 3.81
Doxepina	480 $\pm$ 73	0.26	4.7 $\pm$ 0.4	31.09 $\pm$ 3.02	44.60 $\pm$ 7.91	21.98 $\pm$ 0.38
Imipramina	373 $\pm$ 25	0.24	4.8 $\pm$ 0.1	32.20 $\pm$ 3.20	46.67 $\pm$ 4.51	14.08 $\pm$ 4.97

La mayor dificultad de esta técnica reside en encontrar la proporción más óptima de fármaco, polímero y solvente que permita la formación de las partículas con una encapsulación relativamente alta. Según Barichello y col. (1999), los fármacos con poca afinidad por el polímero tienden a difundir de la fase orgánica a la fase acuosa externa durante el proceso de formación de las partículas, disminuyendo el % de fármaco encapsulado. Se han publicado algunos trabajos con el objetivo de incorporar fármacos hidrofílicos mediante esta técnica y se han llegado a obtener cargas de fármaco de hasta el 12% (Barichello y col., 1999; Govender y col., 1999). En el presente trabajo y, tras la realización de numerosas pruebas utilizando diferentes porcentajes de solventes y no-solventes, se consiguió optimizar la fórmula aumentando el % de encapsulación obtenido previamente por otros autores (Teixeira y col., 2005; Gomez-Gaete y col., 2007; Betancourt y col., 2008). También cabe destacar la utilización de Poloxamer (Lutrol® F127) como alternativa al uso del alcohol polivinílico (PVA), estabilizante usado muy frecuentemente en la elaboración de nanopartículas. El interés reside en evitar la presencia de una cantidad residual de PVA adsorbida fuertemente a la superficie de las nanopartículas, resistente incluso después de varios lavados, y que puede modificar la propiedades físicas de la partículas, además de ser un potencial carcinógeno (Sahoo y col., 2002; McCarron y col., 2006).

#### 4.3.2 Estudios de liberación de las nanopartículas de ADTs

En los estudios comparativos de liberación *in vitro* de los fármacos a partir de las nanopartículas respecto a una solución del fármaco, la liberación del fármaco fue, en todos los casos, notablemente más retardada en el caso del nanosistema. La liberación del 60% del fármaco se produjo alrededor de las 4, 20 y 23 h para imipramina, amitriptilina y doxepina, respectivamente (Figura 12), mientras que a partir de la solución este tiempo osciló entre 1 y 2 horas. Los perfiles de liberación resultaron similares para la amitriptilina y la doxepina, pero diferente para la imipramina. En los dos primeros casos, amitriptilina y doxepina mostraron un perfil de liberación más lento y constante, mientras que la imipramina siguió un modelo bifásico (una liberación más rápida durante las primeras 4 horas seguido de una liberación más constante). El efecto *burst* a los 30 min fue relativamente pequeño en todos los casos (<22%),



comparativamente a otros valores publicados por otros autores: entre un 20 y un 60% aproximadamente (Gao y col., 2007; Dalpiaz y col., 2009; Madaswamy y col., 2009). El valor de este parámetro aumenta a medida que aumenta la proporción fármaco:polímero. La proporción (1:1) utilizada en el presente trabajo fue relativamente alta y, sin embargo el efecto *burst* no resultó muy elevado.

Tras el ajustado de los diferentes modelos de liberación (orden zero, orden uno, Higuchi y Korsmeyer-Peppas) a los datos experimentales (cantidad disuelta acumulada vs. tiempo), la ecuación de Korsmeyer-Peppas fue la que representó mejor los datos observados. Los valores de los exponentes difusionales obtenidos ( $n=0.63$ ,  $0.29$  y  $0.49$  para amitriptilina, doxepina e imipramina, respectivamente) indican que la liberación de doxepina vino controlada por un proceso de difusión mientras que, en el caso de la amitriptilina y la imipramina, una combinación de difusión Fickiana y relajación del polímero junto con la erosión de la matriz de PLGA (también llamado transporte anómalo) rigió la liberación del fármaco. La causa por la que los mecanismos de liberación son distintos podría atribuirse a las diferentes características físico-químicas de los fármacos. La amitriptilina y la imipramina presentan mayor solubilidad respecto a la doxepina, lo cual podría facilitar la penetración de agua en la matriz polimérica permitiendo simultáneamente la difusión del fármaco disuelto hacia fuera de las nanopartículas y la erosión del polímero por degradación hidrolítica de los enlaces éster. Faisant y col. (2002) reportaron que la presencia de un elevado efecto *burst* se puede atribuir a una liberación controlada por difusión. El mayor efecto *burst* obtenido en este trabajo para la doxepina reforzaría esta hipótesis. Por otro lado, también debe considerarse la interacción entre el fármaco encapsulado y el polímero: amitriptilina e imipramina tienen estructuras similares y por tanto, el mismo tipo de interacción fármaco/polímero, mientras que la presencia de un átomo de oxígeno en la estructura de la doxepina puede hacer esta interacción más fuerte por la formación de puentes de hidrógeno con el PLGA. Ésto podría explicar que la liberación de la doxepina desde el 60% hasta el final del experimento sea más lenta, sobretodo en comparación con la amitriptilina.

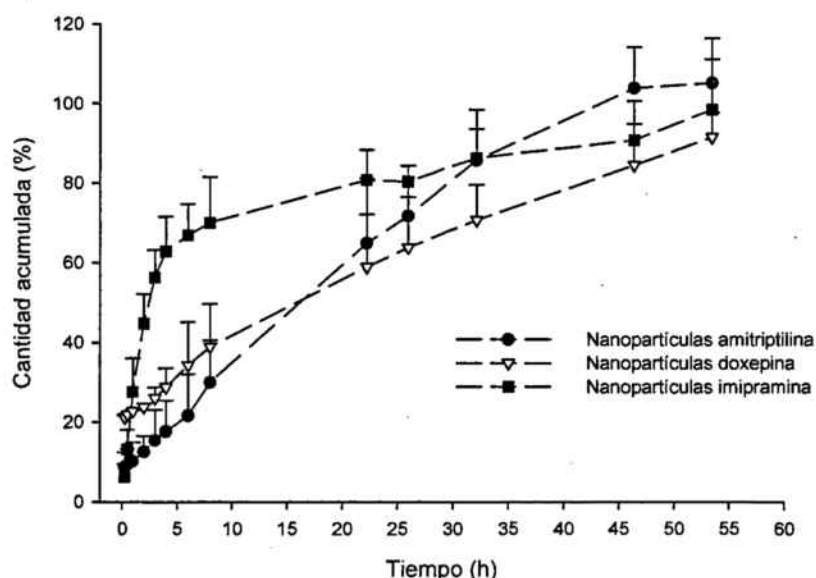
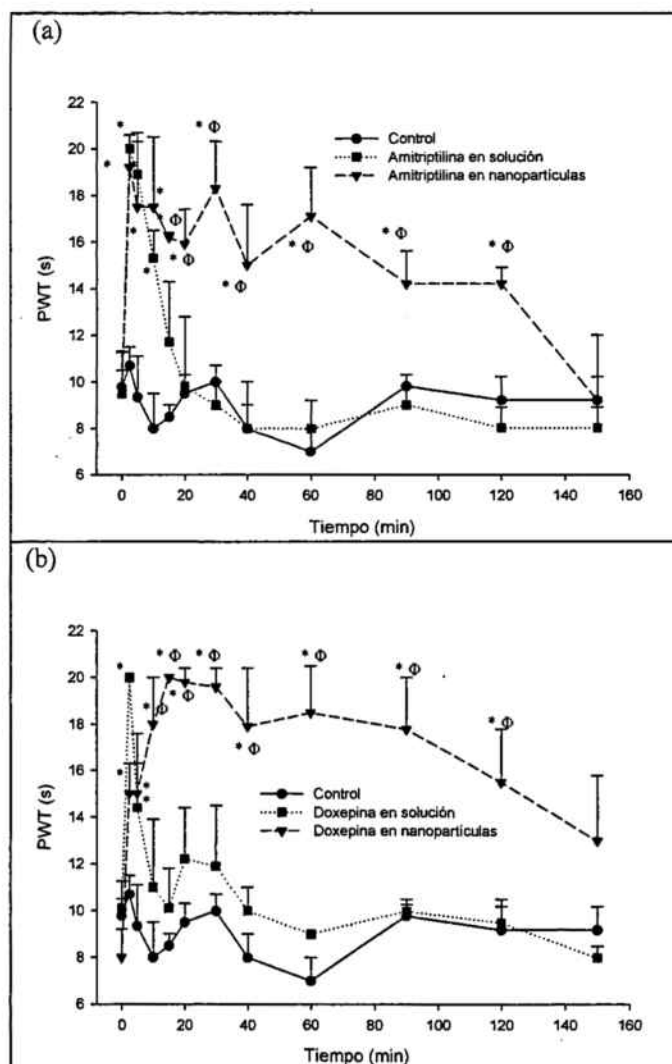


Figura 12. Perfiles de liberación medios $\pm$ SD de amitriptilina, doxepina e imipramina a partir de las nanopartículas de PLGA

### 4.3.3 Actividad antinociceptiva y antialodínica de las nanopartículas de ADTs

Los resultados de los experimentos de actividad analgésica en rata sana frente a un estímulo nociceptivo térmico tras la administración subplantar de las nanopartículas de amitriptilina, doxepina e imipramina a las dosis de 0.125, 0.075 y 0.09 mg, respectivamente, se pueden observar en la Figura 13. En todos los casos, se observó un aumento temporal de la latencia retardada de la pata ( $p \leq 0.05$ ) cuando los fármacos se administraron en nanopartículas respecto a la administración de los mismos en solución. Estos aumentos resultaron de 110, 115 y 40 minutos para la amitriptilina, doxepina e imipramina, respectivamente (Figuras 13a, 13b y 13c, respectivamente). Por tanto, la encapsulación de los fármacos aumentó considerablemente la duración de su efecto analgésico, especialmente en los dos primeros casos. A su vez, los valores de AUC de los perfiles de las nanopartículas resultaron muy superiores a los obtenidos para las respectivas soluciones (aumento estadísticamente significativo [ $p < 0.05$ ] de un 62, 55 y 34% para amitriptilina, doxepina e imipramina, respectivamente). La lenta liberación del fármaco del nanosistema es la principal razón de este incremento, aspecto que permite un mejor aprovechamiento de la dosis.



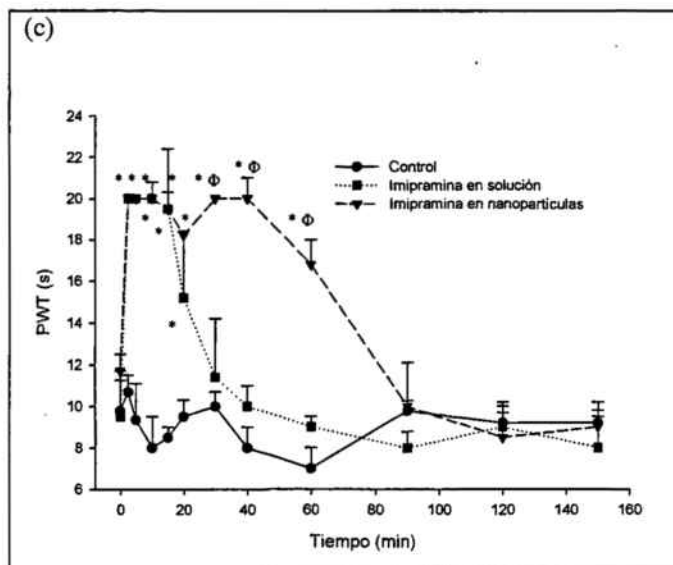


Figura 13. Curvas promedio  $\pm$  SD de la evolución temporal del efecto analgésico, expresado como PWT (latencia retardada de la pata) tras infiltración de (●) solución salina (control), (■) solución y (▼) nanopartículas de (a) amitriptilina a 0.125 mg, (b) doxepina a 0.075 mg y (c) imipramina a 0.09 mg. \*:  $p < 0.05$  respecto al control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a la solución.

La actividad antialodínica también se vio significativamente ( $p < 0.05$ ) aumentada tras la administración de nanopartículas de amitriptilina y doxepina respecto a sus respectivas soluciones (Figura 14). No se observó, sin embargo, ningún efecto tras la administración de imipramina tanto en solución (probablemente porque la dosis administrada no fue suficientemente alta) como en nanopartículas (probablemente debido a la relativamente rápida liberación del principio activo que observamos para esta formulación).

Los incrementos en AUC de las curvas respuesta vs. tiempo calculadas en este caso nos informan acerca de la ventaja que puede suponer la incorporación del fármaco en nanopartículas ya que los valores del área aumentan significativamente en un 77 y 229% para la amitriptilina y la doxepina, respectivamente. Estos aumentos fueron mayores que los encontrados en los experimentos de antinocicepción, y especialmente para la doxepina, aspecto que parece indicar que los dos tipos de dolor no comparten un patrón farmacodinámico común. Parece ser que los estímulos nocivos térmicos están mediados por fibras aferentes primarias de tipo C no mielinizadas y con un alto umbral, mientras que los estímulos táctiles no nocivos irían mediados por las fibras aferentes mielínicas ( $A\beta$ ) de bajo umbral y se procesarían a un nivel supraespinal (Tian y col., 2009). Es posible que este último camino se vea más potentemente bloqueado debido a la presencia más prolongada del fármaco en el organismo. Sin embargo, la duración del efecto antialodínico de los fármacos ensayados fue menor que la duración del efecto antinociceptivo, probablemente debido a que la intensidad del dolor neuropático es mayor que la del dolor somático.

En la bibliografía se pueden encontrar investigaciones previas de formulaciones de liberación modificada con los fármacos ensayados en este trabajo, pero con objetivos distintos [tratamiento antidepresivo (Gido y col., 1994), enmascarar el sabor de las sales (Hashimoto y col., 2002)], o con formulaciones distintas a las nanopartículas [sistemas OROS (Gupta y col., 1999), pellets recubiertos con Eudragit RS100 (Park y col., 2003) o liposomas (Nii y Ishii, 2005; Ahyayauch y col., 2004)]. Los liposomas son sistemas de liberación de fármacos ampliamente estudiados pero presentan ciertas limitaciones

tales como la dificultad de almacenamiento, problemas de estabilidad y rápida liberación del fármaco, aspectos que, con las nanopartículas se pueden mejorar ya que se protege el principio activo de la degradación por lisosomas y se controla la velocidad de liberación más adecuadamente (Wang y col. 2006).

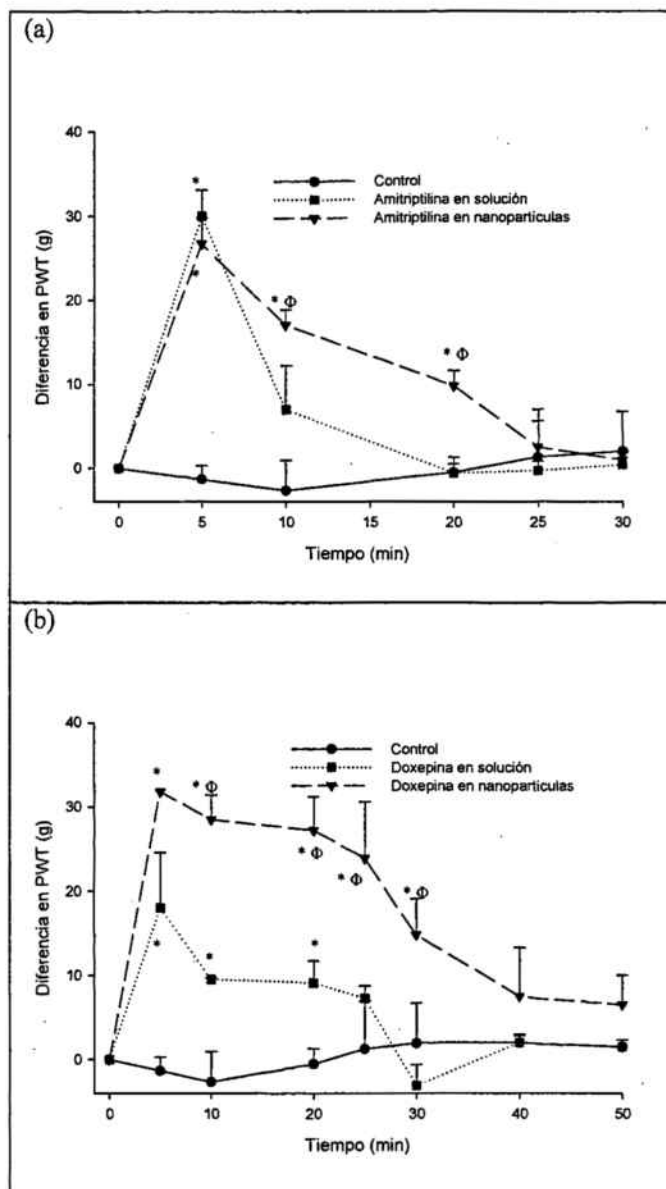
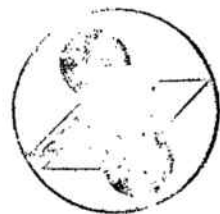


Figura 14. Curvas promedio $\pm$ SD de la evolución temporal del efecto antialodínico expresado como diferencia en PWT (latencia retardada de la pata) tras infiltración de (●) solución salina (control), (■) solución y (▼) nanopartículas de (a) amitriptylina a 0.125 mg y (b) doxepina a 0.075 mg. \*:  $p < 0.05$  respecto al control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a la solución.



A modo de resumen, en la Tabla 6 se exponen los valores de AUC normalizados por la dosis para los diferentes fármacos ensayados, tanto en solución como en nanopartículas, y para los dos tipos de dolor. De acuerdo con estos resultados, puede observarse como las nanopartículas aumentaron estadísticamente ( $p < 0.05$ ) la actividad del fármaco en todos los casos y como la potencia anestésica de los ADTs fue mayor que la del anestésico local bupivacaína. La doxepina resultó ser el fármaco que ha presentó un mayor efecto analgésico para los dos tipos de dolor ensayados. Otros autores destacaron previamente esta característica del fármaco (Wordliczeck, 2005; Gerner, 2006; Epstein



y col., 2008) pero en el presente estudio se observó un considerable aumento de su potencia cuando el fármaco se encapsula.

Tabla 6. Valores de las áreas bajo la curva promedio normalizadas por las dosis (AUC/D) obtenidos en los experimentos de analgesia y alodinia tras administración local de las soluciones y las nanopartículas de los fármacos ensayados. Se incluye el valor obtenido para el grupo control. \*:  $p < 0.05$  respecto al control;  $\Phi$ :  $p < 0.05$  respecto a la solución.

- Fármaco	AUC/D (min·s/mg)		AUC/D (min·s/mg)	
	Analgesia		Antialodinia	
	Solución	Nanopartículas	Solución	Nanopartículas
Amitriptilina	11404±566*	17683±682* $\Phi$	1581±314*	2797±146* $\Phi$
Doxepina	21161±340*	34276±3063* $\Phi$	3704±717*	12197±798* $\Phi$
Imipramina	17207±1029*	23100±1237* $\Phi$	-	-
Control	1183±25.2	-	44.7±28.7	-
Bupivacaína	986.4±52.0*	1643.2±66* $\Phi$	462.4±52.0*	630.4±50.2* $\Phi$
Control	946.7±14.8	-	95.86±19.9	-

Nota: se usó un grupo control para los ADTs y otro diferente para la bupivacaína

Los resultados pusieron de manifiesto que las nanopartículas de PLGA obtenidas conteniendo ADTs pueden considerarse formulaciones novedosas, con un tamaño de partícula nanométrico, no obtenido previamente para estos fármacos y con una elevada carga de principio activo. Estas características tradujeron en ventajas desde el punto de vista terapéutico, que sería el objetivo final de la administración de cualquier sistema de liberación.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se exponen a continuación:

- (1) Tras administración subplantar en rata de los diferentes antidepresivos ensayados y, de acuerdo con los valores de ED<sub>120</sub> obtenidos, amitriptilina, doxepina e imipramina resultaron ser los fármacos más potentes respecto a actividad antinociceptiva. Fluoxetina y fluvoxamina no mostraron actividad analgésica en el modelo experimental utilizado.
- (2) Dosis de amitriptilina mayores de 0.25 mg administradas subplantarmente a la rata no prolongaron el efecto farmacológico y produjeron edema plantar.
- (3) Doxepina y, en menor grado amitriptilina e imipramina, mostraron actividad antialodínica en ratas con inducción de lesión constrictiva crónica del nervio ciático, tras administración de 0.5 mg. La duración del efecto antialodínico fue de 70 a 90 minutos. El anestésico local usado como referencia, bupivacaína, resultó ser inefectivo a 1 mg.
- (4) Las técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizadas en la presente Memoria para la valoración de los fármacos en las muestras de trabajo resultaron ser lineales, exactas y precisas en el rango de concentraciones ensayado (100 a 1.5625 µg/mL). Los coeficientes de correlación de las rectas e calibración fueron >0.999. Los errores relativos y los coeficientes de variación oscilaron entre -8.58 y 4.44% y entre 0.11 y 14.89%, respectivamente, en todos los casos.
- (5) Se han obtenido nanopartículas de PLGA conteniendo bupivacaína base por una técnica de emulsificación y evaporación del disolvente usando alcohol polivinílico como tensioactivo, diclorometano como fase orgánica y agua purificada. El tamaño de partícula promedio obtenido fue de 453±29 nm, con un índice de polidispersión de 0.30, un potencial zeta de -5.5±0.67 mV y una carga de fármaco de 45.06±0.001%.
- (6) El estudio de liberación de la bupivacaína a partir de las nanopartículas desarrolladas puso de manifiesto un efecto *burst* inferior al 5%. De acuerdo con el valor del exponente difusional de la ecuación de Korsmeyer-Peppas obtenido (n=0.95), el mecanismo de liberación resultó ser no Fickiano (o transporte caso II).
- (7) Tras la administración de las nanopartículas de bupivacaína por vía subplantar en rata y, de acuerdo con los valores de AUC de las curvas efecto vs. tiempo, las actividades antinociceptiva y antialodínica se incrementaron en un 67% y un 36%, respectivamente, en comparación con la administración del mismo fármaco en solución.
- (8) Se han obtenido nanopartículas de PLGA conteniendo amitriptilina, doxepina e imipramina en forma clorhidrato mediante la técnica de

nanoprecipitación con unas cargas de fármaco relativamente elevadas de acuerdo con los datos habitualmente obtenidos con dicha técnica ( $40.46 \pm 4.11\%$ ,  $31.09 \pm 3.02\%$  y  $32.20 \pm 3.20\%$ , respectivamente). Los tamaños de partícula (e índices de polidispersión) fueron  $420 \pm 13$  nm (0.28),  $480 \pm 73$  nm (0.26) y  $373 \pm 25$  nm (0.24) para los mismos fármacos, respectivamente.

- (9) De acuerdo con los perfiles de liberación obtenidos para los ADTs a partir de las nanopartículas, se puso de manifiesto una liberación prolongada de los fármacos respecto a las soluciones. El efecto *burst* resultó ser inferior al 22% en todos los casos. Tras el ajustado de distintos modelos a los datos experimentales (cantidad disuelta vs. tiempo), la función de Korsmeyer-Peppas fue la que mejor representó el perfil de la curva obtenido. De acuerdo con los valores del exponente difusional obtenidos para los distintos fármacos ( $n=0.63$ , 0.29 y 0.49 para amitriptilina, doxepina e imipramina, respectivamente), la doxepina se liberó de las nanopartículas por difusión fickiana, mientras que la amitriptilina y la imipramina lo hicieron por transporte anómalo.
- (10) La administración de amitriptilina, doxepina e imipramina encapsuladas en nanopartículas produjo un aumento de la duración del efecto analgésico obtenido tras su inyección subplantar en la rata en comparación con la administración de los mismos fármacos en solución. Este aumento fue de 110, 115 y 40 minutos, respectivamente para los tres fármacos anteriores.
- (11) La administración subplantar de amitriptilina y doxepina encapsuladas en nanopartículas produjo un aumento muy significativo en el efecto antialodínico. Los valores de AUC de la curva respuesta vs. tiempo aumentaron un 77 y un 229%, respectivamente en comparación con las soluciones.
- (12) La doxepina encapsulada en nanopartículas de PLGA resultó la formulación que mostró los resultados más destacables en cuanto a la actividad antinociceptiva y a la actividad antialodínica.

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58: 1688-1713.
- Alonso, M.J., 1996. Nanoparticulate Drug Carrier Technology. *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*. S. Cohen, H. Bernstein eds. Marcel Dekker, New York, pp. 203-242.
- Amelin A.V., Tarasova, S.V., Ignatov, IuD., Skoromets, A.A., Miatleva, M.I., 2007. Antidepressants with different action mechanisms in the treatment of chronic daily headache. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova*, 107(9): 38-44.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Ed, 2001. Validación de métodos analíticos, pp 86-94. Barcelona. España.
- Astete, C. E. and Sabliov, C. M., 2006. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17(3): 247-289.
- Baron, R., Binder, A., Wasner, G., 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.*, 9(8): 807-819.
- Bergsman, J.E., de Bruijin, W.C., Rozema, F.R., Bos, R.R., Boering, G., 1995. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*, 16: 25-31
- Bucolo, C., Maltese, A., Plugisi, G., Pignatello, R., 2002. Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an Eudragit RS100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic. Res.*, 34: 319-323
- Calvo, P., Alonso, M.J., Vila-Jato, J.L., Robinson, R., 1996. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug Carriers. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 1147-1152.
- European Technology Platform: Nanomedicine. [Cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.html](http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.html) (Diciembre 2010).
- Florez, J., 2007. El tratamiento farmacológico del dolor. *Ars Medica*, Barcelona, pp. 523-548: 647-662.
- Gaspar, M.M., Cruz, A., Fraga, A.G., Castro, A.G., Cruz, M.E., Pedrosa, J., 2008. Developments on drug delivery Systems for the treatment of mycobacterial infections. *Curr. Top. Med. Chem.*, 8: 579-591
- Gaumet, M., Vargar, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69: 1-9.
- Gómez-Barríos, J.V. y Tortorici, V., 2009. Mecanismos del dolor neuropático: Del laboratorio a la clínica. *Arch. Ven. Farm. Ter.*, 28(1): 2-11.
- Grant, S.A., 2002. The holy grail: long acting local anesthetics and liposomes. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 16: 345-352.
- Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., 1995. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.*, 12: 1545-1547
- Hans, M.L., and Lowman, A.M., 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State and Materials Science*, 6: 319-327



- Jin, C., Bai, L., Wu, H., Liu, J., Guo, G., Chen, J., 2008. Paclitaxel-loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for radiotherapy in hypoxic human tumor cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.*, 7: 911-916
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210
- Katzung, Bertram G. , 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill, pp 671-90.
- Kim, S.Y., Lee, Y.M., 2001. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials*, 22: 1697-1704
- Lamprecht, A., Saumet, J.L., Roux, J., Benoit, J.P., 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.*, 278: 407-414
- Li, X., Xu, Y., Chen, G., Wei, P., Ping, Q., 2008. PLGA nanoparticles for the oral delivery of 5-Fluorouracil using high pressure homogenization-emulsification as the preparation method and in vitro/in vivo studies. *Drug Dev. Ind.Pharm.*, 34: 107-115
- Lima, G., Aldana, L., Casanova S, P., Casanova C, P., Casanova, C., 2003. Inducción y medición del dolor experimental. *Rev. Cubana Med. Milit.*, 32(1): 49-56.
- Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q., Xu, J., 2006. Formation and stability of paraffin oil-in-water nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J. Colloid Interface Sci.*, 303: 557-563.
- Llabot, J.M., Palms, S.D., Allemandi, D.A., 2008. Nanoparticulas poliméricas sólidas. *Farmacotecnia* 53: 40-47.
- Matsuura, N., Rowlands, J.A., 2008. Towards new functional nanostructures for medical imaging. *Med. Phys.*, 35: 4474-4487.
- McCleane, G., 2003. Pharmacological Management of Neuropathic Pain. *CNS Drugs* 17(14):1031-1043.
- McCleane G., 2004. Pharmacological strategies in relieving neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother.*, 5(6):1299-1312.
- McCleane, G., 2008 Antidepressants as analgesics. *CNS Drugs*, 22(2):139-156.
- Moebus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2009. Alginate-ploxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72(1): 42-53.
- Morales, M.E., Ruiz, M.A., López, G., Gallardo, V., 2010. Development of oral suspensions of microparticles of ethylcellulose with tramadol. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 36(8): 885-892.
- Mudargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Rel.*, 125: 193-209.
- Nossaman, V.E., Ramadhyani, U., Kadowitz, P.J., Nossaman, B.D., 2010. Advances in perioperative pain management: use of medications with dual analgesic mechanisms, tramadol & tapentadol. *Anesthesiol Clin.*, 28(4): 647-666.
- Pandey, R., Khuller, G.K., 2007. Nanoparticle-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic-streptomycin. Evaluation in a murine tuberculosis model. *Chemotherapy*, 53: 437-441.

- Peghini, P., Katz, P., Castell, D., 1998. Imipramine decreases oesophageal pain perception in human male volunteers. *Gut*, 42: 807-813.
- Scrivani, S., Wallin, D., Moulton, E.A., Cole, S., Wasan, A.D., Lockerman, L., Bajwa, Z., Upadhyay, J., Becerra, L., Borsook, D., 2010. A fMRI evaluation of lamotrigine for the treatment of trigeminal neuropathic pain: pilot study. *Pain Med.*, 11(6): 920-941.
- Shenoy, D.B., Amiji, M.M., 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.*, 293: 261-270
- Thomas, C.B., Burg, K.J.L., 2004. Tissue engineering systems. In: *Absorbable and biodegradable polymers*. Eds WS Shalaby, KJL Burg. CRC Oress LLC, Boca Raton, Florida.
- Tuncel, D. and Demir, H.V., 2010. Conjugated polymer nanoparticles *Nanoscale.*, 2(4): 484-494.
- Vila Jato, J.L., 2009. *Nanotecnología farmacéutica. Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXVIII. Madrid, pp 10-63.
- Viscusi, E.R., 2004. Emerging techniques in the treatment of postoperative pain. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 61: S11-S14
- Vrethem, M., Boivie, J., Arnqvist, H., Holmgren, H., Lindström, T., Thorell, L.H., 1997. A comparison of amitriptyline and maprotiline in the treatment of painful neuropathy in diabetic and nondiabetics. *Clin. J. Pain.*, 13: 313-323.
- Wasungu, L., Hoekstra, D., 2006. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release*, 116: 255-264
- Yadav, A.K., Mishra, P., Mishra, A.K., Mishra, P., Jain, S., Agrawal, G.P., 2007. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine*, 3: 246-257
- Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M.J., Labrude, P., Vigneron, C., 1998. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control., Release*, 50: 31-40.

## 7 ANEXO:VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 7.1 Condiciones cromatográficas

La valoración cuantitativa de los diferentes fármacos en las muestras de trabajo se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (Waters Cromatografía, Barcelona, Spain). Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para los diferentes fármacos ensayados

Condiciones cromatográficas				
Fármaco	Amitriptilina	Doxepina	Imipramina	Bupivacaína
Columna	C18 5 $\mu$ 25x0.46	C18 5 $\mu$ 15x0.46	C18 5 $\mu$ 15x0.46	C18 5 $\mu$ 15x0.46
Flujo (mL/min)	1	0.6	0.6	1
Fase móvil	Acetonitrilo:tampón fosfato pH7 (70:30)	Metanol:tampón acetato pH6 (70:30)	Metanol:tampón acetato pH6 (70:30)	Metanol/acetonitrilo [50/50]:tampón fosfato pH7 (70:30)
$\lambda$ (nm)	215	235	235	213

### 7.2 Linealidad

En el ámbito de concentraciones ensayado (100 a 1.5625  $\mu$ g/mL), las cuatro técnicas analíticas resultaron ser lineales. Tras aplicar un test de comparación de medias (ANOVA,  $p=0.05$ ) entre la relación de las áreas cromatográficas y su concentración teórica correspondiente, se obtuvieron valores de  $p = 0.650, 0.981, 0.942$  y  $0.243$  para amitriptilina, doxepina, imipramina y bupivacaína, respectivamente (Tabla 8). Los coeficientes de correlación de las curvas de calibrado oscilaron entre 0.993 y 0.999 (Tabla 9).

Tabla 8. Estudios de linealidad de las metodicas analíticas. Relaciones entre el valor del área cromatográfica y la concentración correspondiente (R). Se exponen los valores medios, desviaciones estándar (DE) y resultado del estudio estadístico (p) para (a) bupivacaína, (b) amitriptilina, (c) doxepina y (d) imipramina.

(a)

Concentración teórica $\mu$ g/mL	Area/Concentración						Media	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
100	830.3	820.4	830.4	784.8	817.6	851.6	822.5	22.0
50	819.3	819.1	769.0	658.5	796.5	864.7	787.9	70.8
25	867.3	823.4	879.6	808.4	908.0	848.2	855.8	36.8
12.5	816.1	778.9	773.3	753.9	878.6	832.6	805.6	46.0
6.25	826.1	837.4	800.2	781.6	834.7	884.8	827.5	35.5
3.125	779.2	841.3	779.2	856.6	692.8	891.2	806.7	71.2
1.5625	801.9	748.8	842.9	821.8	646.4	803.8	777.6	71.5

p (ANOVA)=0.243

(b)

Concentración teórica $\mu$ g/mL	Area/Concentración						Media	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
100	31647	28874	30753	28688	29678	29603	29874	1134
50	31640	29815	30593	29593	30010	30310	30327	734
25	32099	29900	29579	29142	30709	30785	30369	1061
12.5	30182	29320	29404	28243	30416	30220	29631	818
6.25	30520	28888	31269	28917	30244	30022	29977	933
3.125	31204	28794	31284	28770	30516	30511	30180	1131
1.5625	31033	29832	31645	28783	29274	28854	29904	1189

p (ANOVA)=0.650

(c)

Concentración teórica µg/mL	Area/Concentración						Media	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
100	17557	17949	17444	17405	17588	17306	17541	225
50	17587	17989	17399	17309	17387	17224	17482	276
25	17555	17976	17492	17495	17293	17236	17508	262
12.5	17593	17824	17401	17312	17269	17243	17440	227
6.25	17584	17836	17416	17352	17331	17232	17458	219
3.125	17537	17802	17467	17482	17455	17290	17505	167
1.5625	17529	17816	17345	17303	17331	17290	17436	206

p (ANOVA)=0.981

(d)

Concentración teórica µg/mL	Area/Concentración						Media	DE
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
100	13324	13415	13228	13699	13609	13739	13503	210
50	13415	13634	13215	13527	13620	13804	13536	203
25	13434	13614	13384	13635	13601	13822	13582	157
12.5	13350	13513	13445	13517	13535	13679	13507	109
6.25	13329	13600	13350	13513	13608	13723	13520	155
3.125	13472	13549	13475	13617	13565	13869	13591	147
1.5625	13357	13697	13382	13549	13603	13834	13570	183

p (ANOVA)=0.942

Tabla 9. Curvas de calibrado y coeficientes de correlación (r) obtenidos para (a) bupivacaina, (b) amitriptilina, (c) doxepina y (d) imipramina.

(a)

Recta	Ecuación	r
R1	$y = -0.0164 + 0.00121x$	0.9999
R2	$y = -0.104 + 0.00122x$	0.9998
R3	$y = -0.324 + 0.00121x$	0.9991
R4	$y = -0.638 + 0.00130x$	0.9968
R5	$y = -0.337 + 0.00123x$	0.9993
R6	$y = -0.0419 + 0.00117x$	0.9999

(b)

Recta	Ecuación	r
R1	$y = 0.131 + 0.0000315x$	0.9999
R2	$y = -0.281 + 0.0000345x$	0.9998
R3	$y = 0.231 + 0.0000325x$	0.9999
R4	$y = -0.129 + 0.0000347x$	0.9998
R5	$y = -0.273 + 0.0000337x$	0.9995
R6	$y = -0.309 + 0.0000337x$	0.9999

(c)

Recta	Ecuación	r
R1	$y = -0.011 + 0.0000569x$	0.9999
R2	$y = -0.022 + 0.0000556x$	0.9999
R3	$y = 0.0069 + 0.0000573x$	0.9998
R4	$y = 0.0143 + 0.0000575x$	0.9996
R5	$y = 0.180 + 0.0000569x$	0.9999
R6	$y = 0.047 + 0.0000578x$	0.9997

(d)

Recta	Ecuación	r
R1	$y = -0.068 + 0.0000750x$	0.9999
R2	$y = -0.188 + 0.0000743x$	0.9999
R3	$y = -0.115 + 0.0000757x$	0.9997
R4	$y = 0.120 + 0.0000731x$	0.9998
R5	$y = 0.016 + 0.0000735x$	0.9999
R6	$y = -0.035 + 0.0000727x$	0.9998

### 7.3 Exactitud y precisión

En el ámbito de concentraciones ensayado (100 a 1.5625 µg/mL), las cuatro técnicas analíticas resultaron ser precisas y exactas. Los valores de los coeficientes de variación porcentuales (CV%) y errores relativos porcentuales (%E) para cada nivel de concentración fueron inferiores al 15% en todos los casos (ver Tabla 10)



Tabla 10. Precisión y exactitud de las metodías analíticas para (a) bupivacaína, (b) amitriptilina, (c) doxepina y (d) imipramina. Concentraciones teóricas y concentraciones experimentales obtenidas a partir de las seis rectas. Se exponen valores medios, desviaciones estándar (DE), coeficientes de variación porcentuales (CV%) y errores relativos porcentuales (%E).

(a)

Recta	Concentración teórica (µg/mL)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563
R1	100.119	49.410	26.163	12.321	6.247	2.958	1.533
R2	99.811	49.778	24.969	11.755	6.272	3.099	1.322
R3	100.543	46.407	26.425	11.465	5.801	2.686	1.329
R4	101.936	42.524	25.939	11.871	5.951	3.071	1.254
R5	100.818	49.300	28.263	13.867	6.784	3.034	1.615
R6	99.856	50.716	24.897	12.242	6.526	3.309	1.516
Media	100.514	48.023	26.109	12.253	6.263	3.026	1.428
DE	0.800	3.057	1.228	0.852	0.361	0.204	0.145
%CV	0.80	6.37	4.70	6.95	5.76	6.73	10.16
%E	0.51	-3.95	4.44	-1.97	0.21	-3.16	-8.58

(b)

Recta	Concentración teórica (µg/mL)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625
R1	99.672	49.761	25.178	11.769	5.887	2.946	1.400
R2	99.344	51.151	25.503	12.357	5.940	2.815	1.319
R3	99.750	49.501	23.813	11.721	6.126	2.951	1.380
R4	99.677	51.478	25.416	12.386	6.407	3.256	1.697
R5	100.267	50.831	26.142	13.085	6.644	3.488	1.816
R6	100.124	51.410	26.263	13.051	6.641	3.530	1.835
Media	99.806	50.689	25.386	12.395	6.274	3.164	1.574
DE	0.336	0.854	0.880	0.592	0.338	0.304	0.234
%CV	0.34	1.68	3.47	4.78	5.39	9.60	14.89
%E	-0.19	1.38	1.54	-0.84	0.39	1.26	0.76

(c)

Recta	Concentración teórica (µg/mL)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625
R1	99.992	50.088	25.004	12.534	6.270	3.132	1.571
R2	99.916	50.057	25.001	12.383	6.185	3.075	1.528
R3	100.016	49.877	25.068	12.465	6.235	3.123	1.547
R4	100.296	50.013	25.133	12.494	6.245	3.125	1.544
R5	99.867	49.272	24.413	12.100	5.983	2.924	1.362
R6	99.987	49.732	24.860	12.412	6.178	3.076	1.515
Media	100.012	49.840	24.913	12.398	6.183	3.076	1.511
DE	0.150	0.308	0.261	0.156	0.104	0.078	0.076
%CV	0.15	0.62	1.05	1.26	1.68	2.55	5.00
%E	0.01	-0.32	-0.35	-0.81	-1.08	-1.57	-3.29

(d)

Recta	Concentración teórica (µg/mL)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625
R1	100.025	50.389	25.264	12.586	6.317	3.226	1.634
R2	99.979	50.884	25.484	12.729	6.486	3.312	1.754
R3	100.251	50.136	25.444	12.838	6.431	3.303	1.698
R4	99.948	49.285	24.781	12.224	6.050	2.990	1.428
R5	99.977	50.019	24.968	12.415	6.233	3.099	1.546
R6	99.957	50.233	25.166	12.471	6.273	3.187	1.607
Media	100.023	50.158	25.184	12.544	6.298	3.186	1.611
DE	0.115	0.523	0.273	0.222	0.155	0.124	0.115
%CV	0.11	1.04	1.08	1.77	2.45	3.90	7.15
%E	0.02	0.32	0.74	0.35	0.77	1.95	3.10

#### **7.4 Límites de detección y cuantificación**

Los límites de detección calculados de acuerdo con AEFI (2001) para la bupivacaína, amitriptilina, doxepina, e imipramina fueron 0.22, 0.032, 0.071 y 0.033  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Los límites de cuantificación fueron 0.59, 0.10, 0.24 y 0.096  $\mu\text{g/mL}$  para los mismos fármacos, respectivamente.