

# **DISPERSIONES SÓLIDAS COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA EFICACIA DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS**

---

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS COOPERATIVO**

**Tesis doctoral Analia Simonazzi**

**JULIO 2019**

**Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias Químicas - Unidad de  
Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica - Universidad Nacional  
de Córdoba (UNC) - CONICET**

**Instituto de Investigaciones para la Industria Química - Universidad Nacional  
de Salta (UNSa) - CONICET**



# DISPERSIONES SÓLIDAS COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA EFICACIA DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

Comisión Asesora:

Director por UNC: Dr. Santiago D. Palma

Director por UNSa: Dr. José María Bermúdez

Comisión de Seguimiento:

Dr. Daniel Allemandi.

Dra. Marisa Martinelli.

Evaluador Externo:

Dr. Guillermo Castro.

## Agradecimientos

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que me han acompañado durante este trabajo de tesis:

Al Dr. Santiago Palma y al Dr. José Bermúdez por haber confiado en mí, por haberme guiado en todo el desarrollo de esta Tesis, por sus consejos y aportes sobre mi trabajo, pero por sobre todo, por el cariño brindado todos estos años.

A mi comisión de seguimiento, Dr. Daniel Allemandi y Dra. Marisa Martinelli por haber escuchado los avances de mi trabajo y por sus valiosos aportes durante la corrección de la Tesis. Al Dr. Guillermo Castro, evaluador externo, quien ha aceptado evaluar esta tesis.

Al Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias Químicas - Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica de la UNC y al Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI-UNSa-CONICET) por permitirme desarrollar mi trabajo de Tesis. A las Instituciones e investigadores que formaron parte de este Doctorado: al Instituto de Patología Experimental (IPE) y a la Dra. Carolina Davies, a la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) de Tandil y al Dr. Sergio Sánchez Bruni y al Médico Veterinario Laureano Schofs del centro de investigación veterinaria de Tandil (CIVETAN), y al Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata y a la Dra. María Celina Elissondo y la Dra. Julia Fabbri. Al Ingeniero Elio Gonzo por sus aportes en el desarrollo y explicación del modelado matemático utilizado para analizar los datos de mi trabajo de Tesis.

A mis compañeras del laboratorio del INIQUI (Alicia, Mercedes, Analía, Jime, Luz) pero principalmente a Sofi y a Cin por tener que escucharme todos los días y por todos los mates y desayunos compartidos juntas. A Emilce y María Antonia por los almuerzos de todos los días. A Caro Davies por la paciencia para enseñarme a trabajar con material con el que no tenía experiencia, y por los mates de "descarga" cuando eran necesarios. A todos los integrantes del laboratorio 209 y 210 del Departamento de Farmacia por recibirme siempre con los brazos abiertos y dispuestos a ayudarme en mis estadías en Córdoba.

A mis padres y a mis hermanos por estar siempre para ayudarme y, sobre todo, disponibles para mí, por las horas de niños con Delfi para que pueda realizar mi trabajo sin tanta preocupación.

A Javi y a Delfi por ser mi pilar día a día, por apoyarme en todas mis decisiones, y porque sin ustedes nada tendría sentido. Gracias por todo. Los amo!

Y por último, también quiero agradecer a todas aquellas personas que ayudaron de manera positiva a realizar mi trabajo.

## Resumen

La investigación realizada en este Trabajo de Tesis Doctoral comprende la preparación y caracterización fisicoquímica, biofarmacéutica y la evaluación *in vivo* de dispersiones sólidas (DS) de los antiparasitarios albendazol (ABZ) y benznidazol (BZL), utilizando poloxamer 407 como portador. Estos sistemas farmacéuticos fueron diseñados para lograr un aumento en la biodisponibilidad mediante una mejora en sus respectivas cinéticas de disolución. Tanto ABZ como BZL se caracterizan por presentar solubilidad limitada, afectando la velocidad de disolución, lo que podría conducir a una disminución de la eficacia terapéutica. Estos fármacos son ampliamente utilizados para tratar la hidatidosis y la enfermedad de Chagas, respectivamente, enfermedades consideradas desatendidas u olvidadas, que tienen una alta incidencia en las regiones más postergadas del noroeste argentino.

El manuscrito está organizado de la siguiente manera: Introducción; 4 capítulos: 1- Descripción de los materiales; 2- Descripción de la metodología, caracterización fisicoquímica, caracterización biofarmacéutica y ensayos *in vitro e in vivo*; 3- Caracterización de DS de ABZ y, 4- Caracterización de DS de BZL; y finalmente las Conclusiones generales.

La caracterización fisicoquímica de las DS tanto de ABZ como de BZL demostró que la vehiculización de los fármacos mediante la tecnología de dispersiones sólidas produjo una disminución de la cristalinidad de los fármacos lo que se correlaciona con un aumento notable de la velocidad de disolución. Además, no se observaron interacciones químicas entre los fármacos y el polímero utilizado para la preparación de las DS.

Los datos experimentales de la cantidad acumulada de ABZ o BZL disuelto se analizaron mediante un modelo matemático denominado "*modelo Lumped*", que fue desarrollado y validado por nuestro grupo de investigación. El modelo considera tanto los fenómenos de difusión como los de transferencia, y permitió un muy buen ajuste en todos los análisis de las pruebas de disolución realizadas en el transcurso de la Tesis. Además, permitió calcular diversos parámetros de relevancia farmacéutica valiosos para los estudios comparativos. Mediante el análisis basado en el *modelo Lumped*, se pudo observar que las DS de ABZ como así también las de BZL, presentaron velocidades de disolución inicial superiores a las demás preparaciones con las que fueron comparadas. Además, se pudo

concluir que todas las DS preparadas resultaron de liberación inmediata de acuerdo a las especificaciones de farmacopeas.

Los resultados obtenidos mediante los estudios *in vitro* permitieron diseñar adecuadamente los ensayos *in vivo*. En el modelo murino de hidatidosis (echinococcosis quística) todos los tratamientos generaron una disminución en el peso medio de los quistes desarrollados en los animales. Sin embargo, sólo el tratamiento con la DS de ABZ evidenció una disminución estadísticamente significativa del peso de los quistes en comparación con los grupos control. Además, los quistes de todos los grupos tratados mostraron alteraciones en la capa germinativa, con disminución del número de células siendo la extensión del daño mayor en los tratados con la DS.

En los ensayos de farmacocinética de ABZ en ratones no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el de la DS, sin embargo, en el ensayo del modelo de hidatidosis si hubo diferencias. Esto puede deberse a que el tracto gastrointestinal de los ratones no es adecuado para este tipo de formulaciones, en comparación, por ejemplo, con el de los caninos. Con lo cual podemos concluir que debería explorarse otra alternativa para extrapolar estos resultados en un animal con un TGI más extenso.

Al analizar la susceptibilidad a BZL de los diferentes linajes de *T. cruzi* empleados (TcI, TcV y TcVI) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero el dato más relevante fue la susceptibilidad a BZL de la cepa de mayor prevalencia en el NOA argentino (TcV).

Por otra parte, en un modelo de infección aguda en ratones infectados con *T. cruzi* tratados durante 30 días los resultados evidenciaron que la administración de BZL en una formulación comercial o en DS era igual de efectiva para reducir la parasitemia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se pudo concluir que las DS constituyen una estrategia muy prometedora ya que se observa una mejora notable en la velocidad de disolución de ABZ y el BZL, lo que produciría un aumento en la biodisponibilidad total del fármaco. Sin embargo, es necesario mencionar que se requieren estudios adicionales para poder continuar con el desarrollo de estas formulaciones para lograr una transferencia efectiva al sector productivo.

## Abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
BD	(Biodisponibilidad)
SCB	(Sistema de Clasificación Biofarmacéutica)
CIVIV	(Correlación <i>in vivo-in vitro</i> )
GI	(Gastrointestinal)
LADME	(Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación)
HTS	(High Throughput Screening)
pKa	(Constante de ionización)
CD	(Ciclodextrina)
CMC	(Concentración Micelar Crítica)
PEG-PLA	(Polietilenglicol- Poliacido láctico)
PLA-PEG-PLA	(Poliácido láctico- Polietilenglicol- Poliacido láctico)
DS	(Dispersión sólida)
ABZ	(Albendazol)
BZL	(Benznidazol)
BZD	(Benzimidazoles)
NFX	(Nifurtimox)
OMS	(Organización Mundial de la Salud)
CP450	(Citocromo P450)
DNDi	(Drugs for Neglected Diseases initiative)
ANMAT Médica)	(Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
Tg	(Temperatura de transición vítrea)
OE	(Óxido de etileno)
OP	(Óxido de propileno)
POE	(Polióxido de etileno)
POP	(Polióxido de propileno)
GRAS	(Generally Recognized As Safe)
FDA	(Food and Drug Administration)
P407	(Poloxamer 407)
HLB	(Balance hidrofílico-lipofílico)
NTR	(Nitroreductasas)

BZL-p	(Benznidazol con pureza del 97%)
BZL-e	(Benznidazol extraído de comprimidos comerciales de Abarax®)
ABZ-FC	(Formulación comercial de albendazol)
BZL-FC	(Formulación comercial de benznidazol)
PEG	(Polietilenglicol)
MF	(Mezcla física)
MEB	(Microscopía electrónica de barrido)
CDB	(Calorimetría diferencial de barrido)
TF-IR	(Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier)
D-RX	(Difracción de rayos X)
$\delta a$	(Densidad aparente)
$\delta e$	(Densidad empaquetada)
IC	(Índice de Carr o índice de compresibilidad)
IH	(Índice de Hausner)
VDI	(Velocidad de disolución inicial)
ED	(Eficiencia de disolución)
TMD	(Tiempo medio de disolución)
CI <sub>50</sub>	(Concentración inhibitoria cincuenta)
LIT	(Liver Infusion Tryptose)
MTT	(Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)
PMS	(Metosulfato de fenazina)
DMSO	(Dimetilsulfóxido)
ABZSO	(Albendazol sulfóxido)
ABZSO <sub>2</sub>	(Albendazol sulfona)
AXB	(Oxibendazol)
ACN	(Acetonitrilo)
p-i	(Post infección)
NT	(No tratado)
NA	(No alcanzado)
VDII	(Velocidad de disolución intrínseca inicial)
EI	(Estándar interno)
QL	(Límite de cuantificación)
VDEI	(Velocidad de disolución específica inicial)



## Índice de contenidos

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	3
Abreviaturas .....	5
Índice de contenidos.....	7
Introducción .....	13
1. La vía oral para la administración de fármacos.....	15
2. Consideraciones farmacocinéticas para la vía oral.....	19
3. Las parasitosis.....	23
3.1 Hidatidosis.....	23
3.2 Enfermedad de Chagas.....	26
4. Dispersiones sólidas (DS) como estrategia tecnológica farmacéutica. ....	30
5. Modelado matemático .....	32
Objetivo general .....	36
Objetivos específicos.....	36
Hipótesis de trabajo.....	37
Referencias.....	39
1. Materiales.....	47
1.1 Polímero portador.....	47
1.2 Fármacos .....	50
1.2.1 Albendazol.....	50
1.2.2 Benznidazol .....	53
1.2.2.1 Extracción de benznidazol desde los comprimidos comerciales.....	56
1.3 Formulaciones comerciales.....	57
1.3.1 Vermizole® .....	57

1.3.2 Abarax® .....	57
Referencias.....	59
2. Métodos .....	62
2.1 Preparación de dispersiones sólidas por el método de fusión .....	62
2.1.1 Preparación de dispersiones sólidas de albendazol utilizando Poloxamer 407 como portador.....	63
2.1.2 Preparación de dispersiones sólidas de Benznidazol utilizando Poloxamer 407 como portador.....	65
2.2 Caracterización de las dispersiones sólidas .....	66
2.2.1 Caracterización físico-mecánica .....	66
2.2.2 Ángulo de reposo.....	67
2.2.1.2 Medición de densidad de polvos.....	70
2.2.1.3 Índice de Carr o de compresibilidad ( <i>IC</i> ).....	72
2.2.1.4 Índice de Hausner ( <i>IH</i> ).....	73
2.2.2 Caracterización físico-química .....	74
2.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	75
2.2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB). .....	75
2.2.2.3 Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (TF-IR). .....	76
2.2.2.4 Difracción de rayos X (D-RX). .....	77
2.2.3 Estudios de solubilidad y saturación.....	77
2.2.3.1 Estudio de solubilidad de fases. ....	77
2.2.3.2 Estudio de solubilidad en saturación .....	78
2.3 Caracterización biofarmacéutica.....	78
2.3.1 Ensayos de disolución.....	78
2.3.2 Interpretación de los datos del ensayo de disolución. Modelado matemático..	80

2.4 Pruebas <i>in vitro</i> : ensayos de bioactividad.....	84
2.5 Estudios <i>in vivo</i> .....	85
2.5.1 Ensayos farmacocinéticos en ratones.....	85
2.5.1.1 Ensayo con animales.....	88
2.5.2 Modelo de hidatidosis.....	89
<b>A)</b> Preparación de las suspensiones.....	90
<b>B)</b> Determinación de la eficacia de los tratamientos .....	90
<b>C)</b> Análisis estadístico.....	90
2.5.3 Modelo de infección con <i>T. cruzi</i> .....	90
2.5.3.1 Modelo de infección por <i>T. cruzi</i> y tratamiento en fase aguda.....	90
<b>A)</b> Infección por <i>T. cruzi</i> .....	91
Tratamientos.....	92
<b>B)</b> Tratamientos.....	92
Referencias.....	94
3. Caracterización de las dispersiones sólidas de Albendazol .....	98
3.1. Caracterización físico-mecánica .....	98
3.1.1 Ángulo de reposo .....	98
3.1.2 Medición de densidad de polvos.....	99
3.1.3 Índice de Carr.....	100
3.1.4 Índice de Hausner .....	100
3.2 Caracterización físico-química.....	101
3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	101
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB).....	102
3.2.3 Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (TF-IR).....	103
3.2.4 Difracción de rayos X (D-RX).....	105

3.3 Estudios de solubilidad y saturación .....	107
3.3.1 Estudio de solubilidad de fases.....	107
3.3.2 Estudio de solubilidad en saturación.....	107
3.4 Caracterización biofarmacéutica .....	108
3.4.1 Ensayos de disolución.....	108
3.5 Estudios <i>in vivo</i> .....	112
3.5.1 Ensayos farmacocinéticos en ratones.....	112
3.5.2 Modelo de hidatidosis.....	114
3.6 Conclusiones parciales.....	116
Referencias.....	118
4. Caracterización de las dispersiones sólidas de Benznidazol.....	120
4.1 Caracterización físico-química.....	120
4.1.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	120
4.1.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB).....	121
4.1.3 Difracción de rayos X (D-RX) .....	122
4.2 Estudios de solubilidad y saturación.....	123
4.2.1 Estudio de solubilidad de fases.....	123
4.2.2 Estudio de solubilidad en saturación.....	124
4.3 Caracterización biofarmacéutica.....	125
4.4 Pruebas <i>in vitro</i> : ensayos de bioactividad.....	128
4.5 Modelos de infección con <i>T. cruzi</i> .....	129
4.6 Conclusiones parciales .....	131
Referencias.....	133
Conclusiones generales.....	135
Producción científica y tecnológica.....	137

Producción científica y tecnológica relacionada a esta Tesis Doctoral.....	137
Trabajos publicados.....	137
Presentaciones a congresos.....	138
Otras publicaciones del autor .....	139

# INTRODUCCIÓN

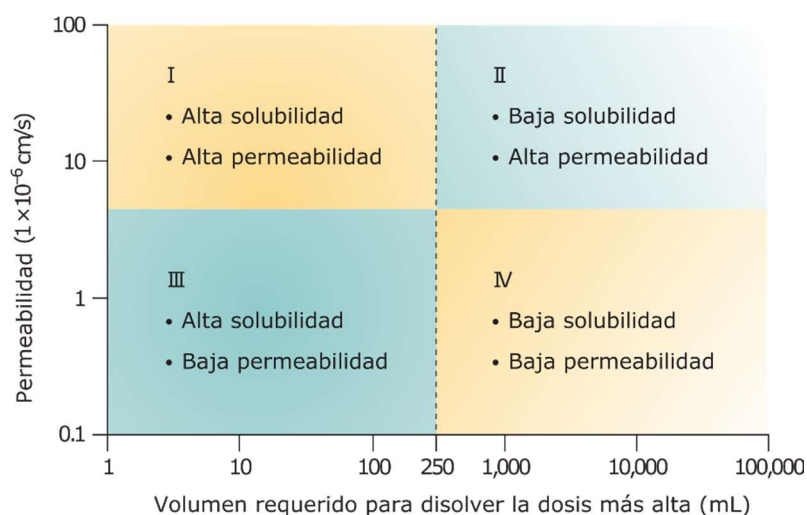
## Introducción

Para el diseño y la fabricación de medicamentos a nivel industrial es necesario un profundo conocimiento de las características fisicoquímicas del principio activo, así como de los excipientes utilizados y los aspectos terapéuticos que condicionan su aplicación clínica. Sumado a esto, y para maximizar el confort y la adherencia al tratamiento del paciente, siempre que sea posible se intentará desarrollar formulaciones de fácil administración, siendo la vía oral una de las principales elecciones. La respuesta farmacológica está condicionada por la cantidad/tiempo de fármaco presente en el lugar de acción, lo que depende de las características fisicoquímicas del compuesto, de las particularidades de la formulación y del entorno biológico. En ese marco el concepto de biodisponibilidad (BD) adquiere un rol preponderante. La BD se define como la cantidad de fármaco que llega en forma activa a la circulación sistémica y la velocidad a la que accede a ésta, es decir, la fracción de medicamento capaz de llegar al lugar de acción.

Uno de los parámetros que se puede evaluar *in vitro* es la velocidad de disolución del fármaco y/o liberación y extensión del fármaco que está disponible para su absorción. La disolución del fármaco o la velocidad de liberación determinarán directamente la velocidad de absorción en los casos en que este sea el paso limitante en el proceso de absorción. La importancia y la necesidad de estudiar estos factores se incrementa si el ingrediente activo presenta problemas de absorción, o si el objetivo es desarrollar una formulación avanzada, como un producto de liberación modificada o controlada, o si la forma farmacéutica afecta a las propiedades biofarmacéuticas de cualquier otra manera. Dentro de los factores limitantes de la absorción podemos encontrar aquellos que afectan la disgregación de la forma farmacéutica, la liberación o la disolución del principio activo en el medio fisiológico, o a la absorción a través de las membranas biológicas, afectando todo ello de forma directa a la biodisponibilidad del fármaco. Siguiendo esa línea de análisis, cabe destacar que una de las características más relevantes de un compuesto es su solubilidad, de la que va a depender en gran medida su BD y por ende su eficacia farmacéutica. La solubilidad se define generalmente como la concentración del compuesto en una solución que está en contacto con una cantidad en exceso del compuesto sólido, cuando la concentración y la forma sólida no cambian con el tiempo (Sugano, Okazaki et al. 2007). La solubilidad está estrechamente relacionada con la velocidad de disolución, proceso cinético que implica el

desprendimiento de moléculas de fármaco de la superficie sólida y la posterior difusión a través de la capa que rodea la partícula sólida.

La importancia de la velocidad de disolución y, por lo tanto, de la solubilidad acuosa al actuar como un determinante de la absorción oral se reconoció formalmente con el establecimiento del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) realizado en 1995 por Amidon y colaboradores. Este sistema clasifica a los fármacos dentro de cuatro categorías de acuerdo a su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. De esta forma, los fármacos se clasifican en 4 clases (Fig. 1) (Amidon, Lennernäs et al. 1995). Se considera que un fármaco es altamente soluble si su dosis de concentración más alta es soluble en menos de 250 ml de agua, de acuerdo a pruebas realizadas en un rango de pH de 1 a 7,5.



**Figura 1.** Clasificación de los fármacos según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

Por otro lado, un fármaco se considera altamente permeable si la absorción oral se compara favorablemente (es decir, más del 90%) con una inyección intravenosa del fármaco. Se puede utilizar esta clasificación como base para establecer las especificaciones de disolución *in vitro* y también puede proveer una base para predecir la probabilidad de lograr una adecuada correlación *in vivo-in vitro* (CIVIV). Los fármacos de *clase I* presentan CIVIV si la velocidad de disolución es menor que la velocidad de vaciamiento gástrico. Por el contrario la correlación es limitada o puede no existir. Para los fármacos *clase II* se espera CIVIV si la velocidad de disolución *in vitro* es similar a la velocidad *in vivo*, exceptuando los



casos en que la dosis sea muy elevada. Para los de *clase III* la absorción (permeabilidad) es el paso determinante y la CIVIV es limitada o no por la etapa de disolución. En los fármacos *clase IV* la CIVIV es limitada o simplemente puede no existir (Amidon, Lennernäs et al. 1995).

Existe un consenso general en la industria farmacéutica de que los fármacos candidatos poco solubles en agua son cada vez más prevalentes. La formulación juega un papel importante en la determinación de la velocidad y el grado de absorción de los fármacos desde el tracto gastrointestinal (GI). Como se mencionó anteriormente, la eficacia terapéutica de un fármaco depende de su BD, que está directamente correlacionada con su solubilidad. Muchos fármacos, tanto en desarrollo como en el mercado, son poco solubles en medios acuosos, a velocidades de disolución variables. Para conseguir la concentración de fármaco deseada en la circulación sistémica para provocar una respuesta farmacológica, mejorar este aspecto es primordial.

## 1. La vía oral para la administración de fármacos.

A mediados del siglo XX se empezaron a plantear nuevas formas farmacéuticas en función de los conocimientos que generó el estudio de la farmacocinética del principio activo. A partir de entonces, un fármaco ya no se caracteriza únicamente por su acción sobre el organismo, es decir, por su farmacodinamia, sino también por procesos farmacocinéticos (LADME: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción). De este modo, la investigación galénica se deriva hacia la obtención de formas farmacéuticas que, además de desarrollar las funciones clásicamente definidas, logren que el fármaco se libere en el lugar adecuado y de tal forma que asegure la correcta absorción con el fin de obtener una curva de concentración plasmática que resulte óptima en cuanto a efecto y tolerancia en el organismo (Salas 2011). En este sentido, el objetivo principal del diseño de las preparaciones es lograr una respuesta terapéutica predecible a un fármaco que es parte de una formulación y que pueda producirse a gran escala con una calidad reproducible.

Por otro lado, debido a los avances tecnológicos tales como el cribado de alto rendimiento (HTS, acrónimo en inglés *high throughput screening*) y la química combinatoria, se observó un aumento significativo de nuevos compuestos candidatos que tienen actividad terapéutica aceptable pero solubilidad limitada. Consecuentemente, el número

de fármacos con escasa solubilidad acuosa ha aumentado considerablemente y, por lo tanto, existe un gran número de agentes activos potencialmente útiles que tienen una BD pobre. La solubilidad del fármaco es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes que condicionan el perfil farmacológico y biofarmacéutico.

En este contexto, los fármacos con baja solubilidad acuosa representan un desafío importante para los científicos farmacéuticos. Este ha sido uno de los problemas más críticos en la industria farmacéutica porque las estimaciones actuales indican que el 60-70% de los compuestos en desarrollo son poco solubles en agua. Además, recientemente se ha señalado que el porcentaje puede ser aún mayor, hasta del 90%, para ciertas categorías de fármacos (Williams III, Watts et al. 2012). De hecho, los compuestos poco solubles representan el 40% de los 200 mejores fármacos orales comercializados en los Estados Unidos, y más de un tercio de los fármacos enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos caen en las categorías poco solubles en agua o insolubles en agua (Mayol, Quaglia et al. 2008).

La pobre solubilidad y las bajas velocidades de disolución son los factores limitantes más comunes para la absorción oral de fármacos, especialmente para fármacos con alta permeabilidad (Ku 2008). Esto ha sido identificado como una parte importante del elevado fracaso clínico debido a una farmacocinética deficiente. Para superar estos problemas, se desarrollaron diversas estrategias de formulación que incluyen las descritas en la Tabla 1 (Tang, Sun et al. 2007).

*Tabla 1. Mecanismos para aumentar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua.*

ESTRATEGIA	EJEMPLO
A. Modificación física o química	Ultra micronización o nanometrización Nanopartículas
b. Obtención de cristales	Formación de sales
c. Enfoques de formulación	Composición de solvente Co-solventes y solubilización por surfactantes Modificación de pH
	Dispersiones sólidas amorfas
	Complejos de inclusión

---

Sistemas coloidales
Micelas
Sistemas de administración de fármacos auto-emulsionantes

---

Liposomas
-----------

---

### A. Modificación física:

**A.1 Ultra-micronización/nanometrización de sólidos:** Las nanopartículas permiten superar los desafíos asociados con la formulación de fármacos insolubles. Las nanopartículas de fármacos pueden producirse mediante diversas tecnologías. Los métodos de homogeneización y molienda a alta presión, junto a la técnica de fluidos supercríticos, son las tecnologías alternativas que se utilizan con frecuencia para producir las nanopartículas de fármacos (Kalepu and Nekkanti 2015).

**A.2 Nanopartículas lipídicas sólidas:** Son elaboradas con excipientes lipídicos que son biocompatibles y biodegradables, y la mayoría de ellos son componentes fisiológicos que generalmente se consideran seguros (Müller, Radtke et al. 2002). Mediante estos sistemas se puede lograr una liberación controlada de fármacos en el tracto GI en donde la BD se vea mejorada al disminuir la variabilidad en la absorción.

### B. Obtención de cristales:

**B.1 Formación de sales:** las sales han sido durante mucho tiempo la primera opción para mejorar los problemas de solubilidad y de velocidad de disolución. La formación de sales de un fármaco ofrece varias estrategias al cambiar su disolución, absorción y otros aspectos fisicoquímicos y farmacocinéticos. En los últimos 60 años, la industria farmacéutica ha utilizado cada vez más el proceso de salificación para mejorar las propiedades de los productos farmacéuticos, y en la actualidad más del 50% de los fármacos en el mercado se venden como sales (Vioglio, Chierotti et al. 2017).

### C. Enfoques de formulación:

**C.1 Co-solventes y solubilización por surfactante:** La formulación de fármacos insolubles usando co-solventes es también una de las técnicas más antiguas y ampliamente utilizadas. La reducción de la constante dieléctrica es posible mediante la adición de co-solventes, lo que facilita una mayor solubilización de moléculas no polares de fármaco. Con el fin de

maximizar la solubilidad y evitar la precipitación tras la dilución, los co-solventes se usan junto con surfactantes y modificadores de pH (Kawakami, Oda et al. 2006).

**C.2 Modificación de pH:** Se estima que aproximadamente el 70% de los fármacos son ionizables, de los cuales la mayoría son débilmente básicos. Los fármacos ionizables exhiben una solubilidad dependiente del pH, en los que los fármacos débilmente ácidos son más solubles a  $\text{pH} > \text{pKa}$  (constante de ionización) y los fármacos débilmente básicos son solubles a  $\text{pH} < \text{pKa}$ . Esta solubilidad dependiente del pH se estudió ampliamente para formular fármacos insolubles, y la mayoría de estas formulaciones se encuentran disponibles en el mercado (Kalepu and Nekkanti 2015).

**C.3 Formas amorfas y dispersiones sólidas:** Las formas cristalinas estables de los fármacos presentan problemas de solubilización debido a su elevada energía reticular. Por lo tanto, las formas amorfas desordenadas ofrecen una ventaja sobre las formas cristalinas con respecto a la solubilidad. Consecuentemente, el cambio de las características del estado sólido del fármaco hace que la molécula sea más soluble en agua (Yu 2001). Por otro lado, la tecnología de dispersión sólida fue ampliamente explorada en las últimas décadas para la administración de fármacos insolubles. Las dispersiones sólidas se consideran mezclas monofásicas de un fármaco y un polímero soluble en agua destinadas a producir una mayor disolución acuosa y BD oral (Newman, Knipp et al. 2012).

**C.4 Complejos de inclusión:** Las ciclodextrinas (CD) son excipientes versátiles estudiados extensivamente para aplicaciones farmacéuticas. Las CD tienen una estructura de cono truncado con un interior hidrofóbico y un exterior hidrófilo. La naturaleza hidrofóbica de la cavidad permite atrapar moléculas hidrófobas y la superficie hidrófila de la CD hace que el complejo sea soluble en agua. Además de la solubilización, las CD también se usan para la estabilización del fármaco, la protección del fármaco frente a la luz, el estrés térmico y oxidativo, el enmascaramiento del sabor de los fármacos y la reducción de la irritación dérmica, ocular o GI (Kalepu and Nekkanti 2015).

**C.5 Micelas poliméricas:** Los fármacos insolubles en agua a menudo tienen una mayor afinidad por los disolventes hidrófobos y también tienen afinidad por la región hidrofóbica de las micelas. Por lo tanto, la encapsulación de esos fármacos en micelas permite su formulación en vehículos acuosos. Las micelas poliméricas se forman a partir de polímeros di bloques tales como PEG-PLA (polietilenglicol -poliácido láctico) o polímeros tribloque

PLA-PEG-PLA (poliácido láctico- polietilenglicol -poliácido láctico). Debido a la baja CMC, las micelas poliméricas permanecen estables a baja concentración de polímero después de la dilución con fluidos corporales (Rios-Doria, Carie et al. 2012).

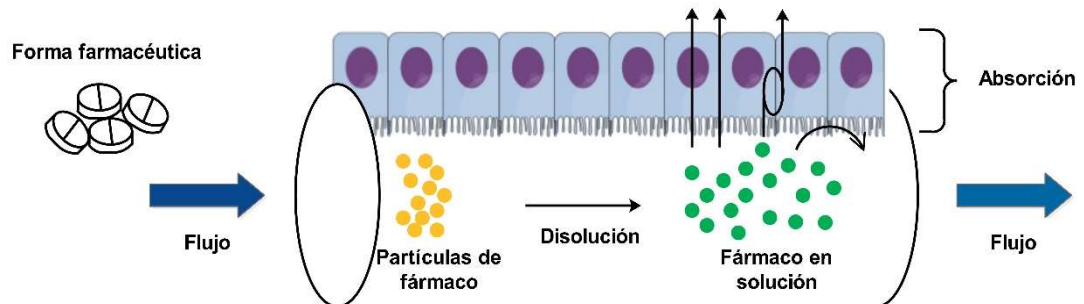
**C.6 Microemulsiones y sistemas de administración de fármacos auto-emulsionantes:** Los sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes han ganado importancia debido a su capacidad para potenciar la solubilidad y la BD de fármacos insolubles. Después de la dilución por el entorno acuoso en el tracto GI, estos sistemas experimentan una autoemulsión rápida produciendo glóbulos de tamaño nanométrico de gran área superficial que dan como resultado una velocidad y cantidad de absorción mejorada (Kalepu and Nekkanti 2015).

**C.7 Liposomas y proliposomas:** Los liposomas son vesículas esféricas cerradas de bicapas de fosfolípidos con una fase acuosa interna, y pueden consistir en una o más bicapas. Una posible ventaja de los liposomas es la encapsulación de fármacos hidrófobos e hidrófilos, ya sea en la bicapa de fosfolípidos, en la interfaz de la bicapa o en el volumen acuoso interno. Los proliposomas son polvos secos de flujo libre que pueden formar vesículas multilamelares al hidratarse con agua. Los beneficios terapéuticos de los proliposomas incluyen BD mejorada, protección de los fármacos frente a la degradación en el tracto GI, toxicidad reducida y enmascaramiento del sabor (Nekkanti, Venkatesan et al. 2015).

## 2. Consideraciones farmacocinéticas para la vía oral.

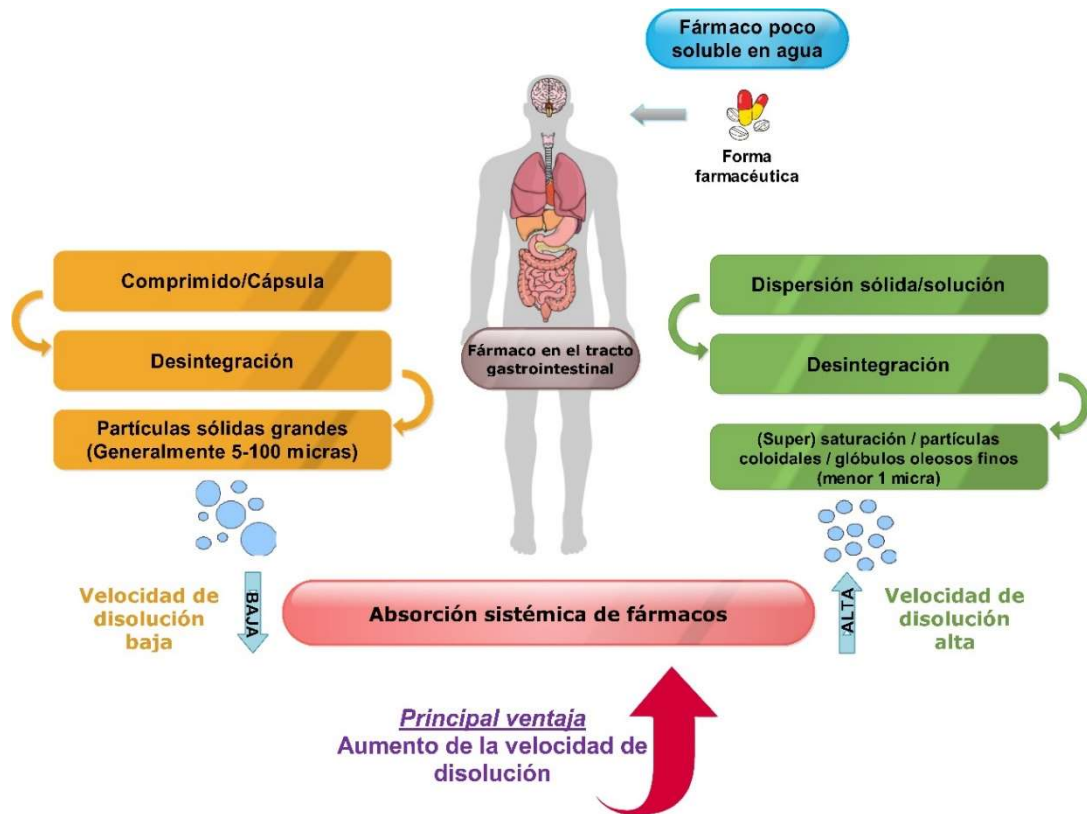
Para que un fármaco administrado por vía oral tenga un efecto terapéutico, las moléculas del fármaco deben disolverse en los fluidos GI para posteriormente pasar a través de la membrana GI al sistema circulatorio y alcanzar el tejido diana en cantidad suficiente. Es decir que, para tener algún efecto terapéutico, las moléculas del fármaco deben disolverse en fluidos GI de base acuosa en cantidad suficiente (Fig. 2). Si la solubilidad del fármaco en los fluidos GI no es suficiente, la BD se verá comprometida ya que la absorción será "limitada por la solubilidad". Es bastante común que los compuestos poco solubles también se disuelvan lentamente. Si la velocidad de disolución del fármaco es demasiado lenta en el intervalo de tiempo de absorción, la BD volverá a verse comprometida ya que

la absorción será "limitada por disolución". Cabe destacar que el mecanismo de absorción requiere que el fármaco esté en solución.



*Figura 2. Representación esquemática de los procesos de absorción de fármacos.*

La absorción del principio activo, y por lo tanto su BD, depende, en consecuencia, de las características de liberación de la forma farmacéutica en que se administre el fármaco (en la que puede estar implicada la disgregación), de la velocidad de disolución del principio activo y de las cualidades de absorción de las membranas en las que se debe producir la absorción del mismo (Jato 2001). Entre las diferentes estrategias mencionadas para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, las dispersiones sólidas (DS) han ganado importancia en los últimos 10 años y se han investigado intensamente durante el último medio siglo por dos razones principales: proporcionan una mejora significativa en la velocidad de disolución y retardan la recristalización/aglomeración de moléculas de fármaco o agrupaciones debido a las interacciones moleculares y el impedimento estérico dentro de las matrices portadoras. En la Fig. 3 se presenta un esquema de las diferencias que hacen ventajoso el uso de DS en comparación con una formulación convencional como cápsulas o comprimidos.



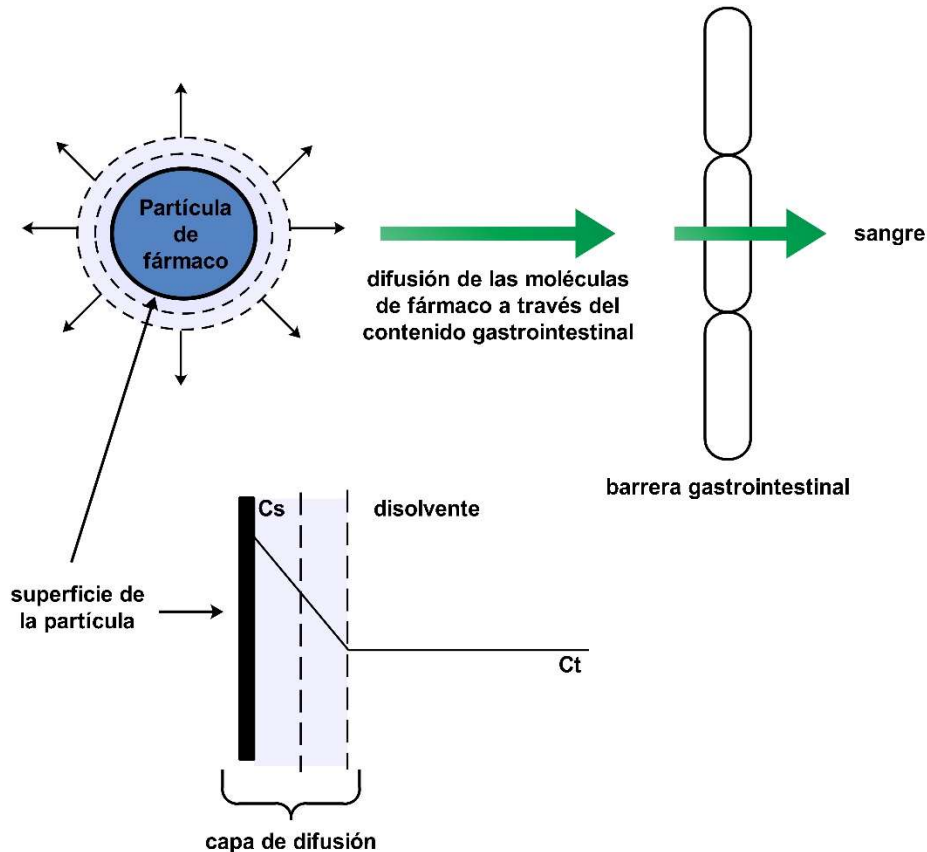
*Figura 3. Ventajas de una formulación basada en una dispersión sólida, en comparación con formulaciones de cápsulas o comprimidos convencionales, para mejorar la velocidad de disolución y la consiguiente biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua*

Las moléculas de fármaco en la superficie de una partícula son las primeras en entrar en solución, creando una capa saturada que envuelve la superficie de la partícula sólida de fármaco. Esta capa saturada es la capa de difusión. Desde esta capa, las moléculas del fármaco pasan a través del medio de disolución y entran en contacto con las membranas biológicas, y se produce la absorción. A medida que las moléculas de fármaco continúan saliendo de la capa de difusión, la capa se repone con fármaco disuelto de la superficie de la partícula, y el proceso de absorción continúa (Fig. 4) (Allen and Ansel 2013).

La velocidad de disolución de un fármaco se ve directamente influenciada por su solubilidad acuosa, lo cual se ve reflejado en el análisis de la siguiente ecuación de Noyes-Whitney modificada:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DA(C_s - C_t)}{h} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

donde  $dM/dt$  es la velocidad de transferencia de masa o velocidad de disolución,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $A$  es el área disponible para la disolución,  $C_s$  es la concentración de saturación,  $C_t$  es la concentración del fármaco en el medio de disolución a tiempo  $t$  y  $h$  es el espesor de la capa de difusión (Fig. 4) (Noyes and Whitney 1897).



**Figura 4.** Disolución de una partícula de fármaco.  $C_s$ : concentración de saturación.  $C_t$ : concentración en la solución a un determinado tiempo

La ecuación de Noyes-Whitney (Ec. 1) muestra que la velocidad de disolución está influenciada por las características fisicoquímicas del fármaco, la formulación y el disolvente. Además, la temperatura del medio también afecta la solubilidad del fármaco y la velocidad de disolución (Swarbrick and Boylan 2000). La velocidad de disolución se rige por la velocidad de difusión de las moléculas de soluto a través de la capa de difusión en el cuerpo de la solución. La ecuación revela que la velocidad de disolución de un fármaco puede incrementarse aumentando el área superficial (reduciendo el tamaño de partícula) del fármaco, aumentando la solubilidad del fármaco en la capa de difusión y mediante factores incorporados en la constante de velocidad de disolución,  $k$ , incluyendo la intensidad de la



agitación del disolvente y el coeficiente de difusión del fármaco que se disuelve (Allen and Ansel 2013).

### 3. Las parasitosis

Desde el punto de vista sanitario, las enfermedades parasitarias han producido a través del tiempo más muertes y daño económico a la humanidad que todas las guerras juntas. Generalmente, estas enfermedades se presentan en los países con poco o nulo desarrollo socioeconómico. Uno de los factores más críticos y determinantes que impacta en la salud de las poblaciones es la pobreza. Es en estas condiciones en donde se ve aumentada la vulnerabilidad a las enfermedades que se ven agravadas por no poder acceder a asistencia sanitaria de calidad, a una buena vivienda y a alimentos seguros. Entre las infecciones más frecuentes, aquellas provocadas por parásitos son endémicas en los países en desarrollo, constituyendo buenos indicadores de las condiciones sanitarias y ecológicas del entorno de sus hospedadores (Gamboa, Zonta et al. 2010).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado dos fármacos antiparasitarios ampliamente utilizados para tratar diferentes patologías como la hidatidosis y la enfermedad de Chagas que se caracterizan por presentar problemas de solubilidad afectando entonces su BD. Estos fármacos son el albendazol (ABZ) y el benznidazol (BZL), respectivamente.

#### 3.1 Hidatidosis

La hidatidosis es una zoonosis producida por cestodos del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthus*, de los cuales los dos primeros son los más importantes (Baruch and Louis 2014). Se trata de un parásito helminto que tiene su ciclo natural en las áreas rurales donde afecta simultáneamente a la salud de las personas y a la economía ganadera. La infección con la forma adulta del parásito se denomina equinococosis. Según la especie, los hospedadores definitivos pueden ser perros, zorros, lobos, coyotes, perros salvajes, especies de algunos felinos como puma, ocelote, etc. La infección con la forma larval o metacestodo se llama hidatidosis, enfermedad hidatídica o equinococosis hidatídica; son hospedadores intermediarios animales herbívoros y el hombre. En el hombre puede comprometer diferentes órganos, en especial hígado y

pulmón, y fuera de los caracteres generales en cada localización tiene además cualidades especiales (Baruch and Louis 2014).

Esta parasitosis es prevalente en poblaciones donde la ganadería constituye una de las principales actividades económicas del hombre, como en algunos países de Oceanía y del litoral del Mediterráneo. En América es más frecuente en Argentina, Chile, Brasil, Uruguay, Paraguay y Perú.

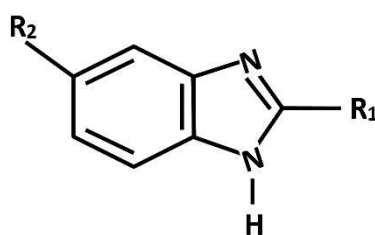
En Argentina, el parásito de la especie *E. granulosus* se presenta como el helminto zoonótico más prevalente. Además, en nuestro país la hidatidosis está difundida en todo el territorio nacional, y tiene mayor prevalencia en las zonas rurales, especialmente en donde se crían ovinos y caprinos. Se calcula que aproximadamente el 30% del territorio nacional es asiento del ciclo zoonótico del *E. granulosus*, lo que representa un área endémica de aproximadamente 1.211.912 km<sup>2</sup>. La superficie comprometida no es uniforme a lo largo del territorio nacional, existiendo provincias contaminadas en toda su extensión y otras en forma parcial.

El quiste hidatídico en cualquier localización puede originar trastornos locales y generales, pero de manera habitual durante años no causa síntomas ni signos, evolucionando de modo silencioso; a veces se evidencia en personas asintomáticas que se hacen exámenes de imágenes por motivos no relacionados con esta enfermedad. El cuadro clínico es variable, no característico; es semejante al de cualquier tumoración, pudiendo originar aumento de tamaño del órgano, síndrome doloroso casi siempre leve (Baruch and Louis 2014).

El tratamiento de la afección, hasta la década de 1970, era exclusivamente cirugía. Se intentó el uso de diversos fármacos hasta hace un tiempo, con resultados no satisfactorios; en 1974 los estudios experimentales realizados por Heath y Chevis demostraron la eficacia del mebendazol en el tratamiento de la hidatidosis (Heath and Chevis 1974), luego, en 1977, Bekhti y colaboradores, usando este compuesto benzimidazólico, el mebendazol (5-benzoil benzimidazol-2-metil carbamato), señalaron la actividad antiparasitaria para el quiste hidatídico en el hombre (Bekhti, Schaaps et al. 1977). En 1983, Morris usó el ABZ (metil-5-propiltio-1-4-benzimidazol), que constituye actualmente el fármaco de primera elección solo o asociado a cirugía, según sea el caso (Morris, Dykes et al. 1983). De todos estos antiparasitarios nombrados, los benzimidazoles

(BZD) son uno de los grupos con mayor espectro de actividad, con una elevada efectividad y seguridad que poseen un anillo bicíclico en que el benceno se fusiona a la posición 4 y 5 del imidazol (Fig. 5). De acuerdo con los sustituyentes, los BZD antihelmínticos se pueden clasificar en 4 grupos (Capece 2002, Lanusse 2009):

- BZD tiazoles: tiabendazol.
- BZD metil-carbamatos: ABZ y su metabolito activo albendazol sulfóxido (también conocido como ricobendazol), fenbendazol y su metabolito activo fenbendazol sulfóxido, oxibendazol y mebendazol.
- pro-BZD: carecen de actividad farmacológica, por lo cual deben ser metabolizados en el organismo para generar moléculas activas.
- BZD halogenados: triclabendazol.



*Figura 5. Estructura química básica de los benzimidazoles.*

Dentro del grupo de los BZD, el ABZ es ampliamente utilizado tanto en medicina veterinaria (Torrado 1994) como en medicina humana (Jesús 1997, Rang 2012) para tratar infecciones causadas por nematodos, cestodos y trematodos.

El ABZ es relativamente insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, propiedades que influyen en su absorción y comportamiento en el cuerpo. En el ratón y la rata, la absorción oral de ABZ es aproximadamente del 20 - 30% y en el ganado es de aproximadamente el 50%, en comparación con aproximadamente el <5% en los seres humanos. A medida que experimenta un metabolismo de primer paso muy rápido en todas las especies, el fármaco inalterado no se detecta en el plasma. Los niveles plasmáticos de los metabolitos oxidados (sulfóxido y sulfona) en todas las especies son mucho más altos que los del fármaco inalterado. El sulfóxido generalmente se considera que es el metabolito activo responsable de la actividad terapéutica del ABZ. La absorción en animales y en

humanos es rápida, aunque la administración de una comida rica en grasas mejora la absorción hasta 5 veces en humanos y animales. El ABZ sulfóxido, también conocido como ricobendazol, se distribuye ampliamente en todo el cuerpo ya que se encuentra unido en un 70% a proteínas plasmáticas. La eliminación del fármaco inalterado es muy rápida en todas las especies, pero la de los metabolitos (sulfóxido y sulfona) es más lenta. La excreción ocurre en gran proporción como metabolitos en la bilis. Solo los metabolitos de ABZ se excretan en animales y en humanos (Dayan 2003). Como el ABZ es prácticamente insoluble en agua, pero bien absorbido en el tracto digestivo, la escasa solubilidad en los fluidos del tracto digestivo limita la disponibilidad biológica del principio activo. Por esto se puede decir que el ABZ presenta una absorción limitada por la velocidad de disolución (Kalaiselvan, Mohanta et al. 2006).

Actualmente el ABZ está disponible como comprimidos o suspensiones con altas dosis de fármaco y su eficacia terapéutica se ve comprometida debido a su baja solubilidad en agua (Rockville 2007). Para superar estos inconvenientes, es importante aumentar la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución del ABZ. Por lo tanto, el desafío para este fármaco de amplio espectro radica en el desarrollo de nuevas formulaciones, que muestren mayor solubilidad y velocidad de disolución en medio ácido. Siguiendo esta línea, se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar la BD de ABZ, como la formulación de dispersiones sólidas (Torrado, Torrado et al. 1996, Castro, Bruni et al. 2010, Martínez-Marcos, Lamprou et al. 2016), formación de complejos con ciclodextrina (Palomares-Alonso, Jung-Cook et al. 2009, García, Leonardi et al. 2016), co-molienda (Vogt, Kunath et al. 2008), la síntesis de nuevos análogos con mayor solubilidad (Rivera, Yépez-Mulia et al. 2007, Mavrova, Vuchev et al. 2010), microcristales (Priotti, Codina et al. 2017), nanocristales (Paredes, Llabot et al. 2016), y más recientemente, varias formulaciones basadas en nanopartículas (Naseri, Akbarzadeh et al. 2016, Jelowdar, Rafiei et al. 2017, Kang, Choi et al. 2017, Kudtarkar, Shinde et al. 2017). Sin embargo, la necesidad de contar con enfoques reproducibles, económicos, escalables y sin disolventes orgánicos para transportar ABZ sigue siendo un desafío.

### 3.2 Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana, también llamada Enfermedad de Chagas en honor al médico brasileño Carlos Chagas quien la describiera por primera vez en 1909, es causada

por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). Las vías de transmisión del parásito son: vectorial (a través de insectos triatomíneos, o vinchucas), congénita (de madre a hijo durante el embarazo), por transfusiones o donación de órganos, y accidentes de laboratorio. La Enfermedad de Chagas representa uno de los problemas de salud más importantes en el continente americano en términos de salud humana (es decir, el número de personas infectadas y que mueren a causa de la infección), impacto socioeconómico y distribución geográfica (Bermudez, Davies et al. 2016). En Argentina se calcula que un millón y medio de personas tienen Chagas, es decir, un 4% de la población del país y representa uno de los principales problemas de salud pública.

El parásito *T. cruzi* presenta tres estadios principales: epimastigote, tripomastigote, y amastigote. Durante el ciclo biológico de *T. cruzi*, los tripomastigotes son ingeridos por el insecto vector cuando éste se alimenta de la sangre de un mamífero infectado. En el tracto digestivo de las vinchucas los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes, que se multiplican por mitosis y en el intestino posterior se transforman en tripomastigotes metacíclicos. En la siguiente alimentación, estos tripomastigotes metacíclicos son expulsados junto a las heces de las vinchucas, y cuando el mamífero picado se rasca, los parásitos entran al torrente sanguíneo. Una vez en la circulación, los tripomastigotes infectan células de la sangre, y una vez dentro de las células hospedadoras se transforman en amastigotes. Los amastigotes son los estadios replicativos en el hospedador mamífero, al igual que los epimastigotes en el vector. Una vez que los amastigotes se multiplicaron en las células infectadas, éstas se rompen y se liberan tripomastigotes al torrente sanguíneo, que vuelven a infectar a otras células en un ciclo que se repite durante semanas o meses. Debido a estas características del ciclo biológico de *T. cruzi*, se pueden distinguir dos fases en la enfermedad de Chagas: (1) fase aguda, con parásitos circulantes en sangre y síntomas inespecíficos, con una duración de 4 a 8 semanas; y (2) fase crónica que dura toda la vida, con baja cantidad de parásitos circulantes en sangre, y presencia de amastigotes en tejidos como músculo esquelético y cardíaco, y tejido hepático. Además, la fase crónica se puede presentar en forma indeterminada, caracterizada por la ausencia de síntomas. Aproximadamente 70% de los pacientes permanecen en esta forma durante toda su vida. Solo entre el 20 y el 40% de las personas infectadas, 10-30 años después de la infección aguda original, desarrollarán una forma cardíaca, digestiva o mixta de la enfermedad

(González, Azzato et al. 2013). La forma más frecuentemente diagnosticada es la cardiopatía chagásica crónica, caracterizada por arritmia del ventrículo izquierdo.

Entre 1960 y 1970 se desarrollaron las dos moléculas bioactivas empleadas para el tratamiento antichagásico: nifurtimox (NFX) y BZL. El NFX fue aprobado para su uso en 1965, mientras que el BZL fue lanzado al mercado en 1971. Estos fármacos, los únicos aprobados hasta la fecha por las agencias reguladoras internacionales como indicación en la infección por *T. cruzi*, son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En Argentina, se indica y se provee el tratamiento etiológico con BZL, el cual es suministrado por el Ministerio de Salud Pública. A pesar de los efectos secundarios, el tratamiento de la enfermedad de Chagas con BZL se reconoce como efectivo si se administra durante la fase aguda, con un 65 a 80% de recuperación. Sin embargo, el tratamiento durante la fase crónica promueve la recuperación en solo el 37% de los casos (Perin, da Silva et al. 2017).

La distribución tisular del BZL no ha sido muy bien estudiada, y los datos disponibles en la literatura solo están para algunos órganos (Perin, da Silva et al. 2017). Tras la administración oral, el BZL se absorbe de forma rápida y completa, alcanzándose las concentraciones plasmáticas máximas en 3-4 horas. El BZL parece ser ampliamente metabolizado, con solo 5% de fármaco inalterado excretado en la orina. La vida media de eliminación es aproximadamente de 12 horas (Page 2008). La evidencia hasta el presente indica que el BZL puede detener la síntesis de ARN y ADN así como dañar el ADN nuclear (Trochine, Creek et al. 2014). Los principales efectos secundarios están relacionados con la generación de radicales libres. La menor incidencia de efectos secundarios en niños y adultos jóvenes se cree que puede deberse a que todas las enzimas de la familia CP450 no se encuentran funcionando. Estas enzimas son las que detoxifican xenobióticos en el hígado, y por tal ausencia no detoxifican BZL.

Desde 2012, se han realizado tres avances importantes en el tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas: I) el aumento de la producción de BZL después de una escasez mundial que duró 1 año y medio; II) el anuncio de nuevas presentaciones de BZL y NFX, y III) la actualización de la lista de medicamentos esenciales para niños de la OMS. En Argentina, la producción de BZL es realizada por Laboratorio ELEA a través de una asociación privada-pública. El propósito de la producción argentina fue (a) asegurar un

suministro nacional y (b) responder a la demanda internacional. De hecho, el BZL se está prescribiendo con mayor frecuencia para el tratamiento antiparasitario en fase crónica, con una mayor demanda tanto en países endémicos como no endémicos (Dias, Coura et al. 2014). Actualmente, en Argentina, el BZL está disponible en comprimidos de 50 y de 100 mg bajo el nombre comercial de ABARAX®. Debido a que el BZL no se comercializa en una dosificación líquida que sea cómoda y fácil para administrar, los pacientes que no son capaces de deglutir medicamentos sólidos, como por ejemplo la población pediátrica - grupo en el cual se ha demostrado la mayor eficacia, seguridad y confiabilidad de la farmacoterapia antichagásica (Tarragona Sonia, Salomón Claudio et al. 2013), necesitan una formulación líquida que les facilite el cumplimiento del régimen terapéutico. Por lo tanto, es necesario desarrollar formulaciones alternativas con el fin de suministrar las dosis pediátricas de forma segura y fiable. En este contexto, la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi acrónimo en inglés de *Drugs for Neglected Diseases initiative*) colaboró con el Laboratorio Federal de Pernambuco (LAFEPE) en el desarrollo de una fórmula pediátrica de BZL (12,5 mg), registrada en Brasil en 2011. El producto consiste en comprimidos dispersables de 12,5 mg adaptados para su uso en bebés y niños pequeños, de fácil disolución en líquidos para facilitar la administración. Esta formulación fue autorizada por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica) en abril de 2018 pero todavía no está disponible para la población.

Algunas innovaciones tecnológicas para mejorar la solubilidad del BZL reportadas en bibliografía (de Moura Ferraz, Alves et al. 2018) son el uso de emulsiones y microemulsiones (Streck, Santos et al. 2011, Streck, de Araújo et al. 2014), soluciones (Manarin, Lamas et al. 2013, Souza, Fernando et al. 2017), formulaciones parenterales (de Moura Ferraz, Alves et al. 2018), reducción del tamaño de partícula (Maximiano, de Paula et al. 2011), nanopartículas (de Moura Ferraz, Alves et al. 2018), complejación con ciclodextrinas (Soares-Sobrinho, Santos et al. 2012, Leonardi, Bombardiere et al. 2013, Pápay, Sebestyén et al. 2016) y dispersiones sólidas (Fonseca-Berzal, Palmeiro-Roldán et al. 2015, Simonazzi, Davies et al. 2018).

#### 4. Dispersiones sólidas (DS) como estrategia tecnológica farmacéutica.

Como fue mencionado previamente, los fármacos con escasa solubilidad acuosa representan un desafío importante porque tienden a mostrar baja BD oral. Una de las estrategias más importantes para lograr una disolución más rápida y una mayor solubilidad aparente es convertir el fármaco cristalino en amorfo (Leuner and Dressman 2000). Las formas amorfas muestran una mayor energía libre, entalpía y entropía en comparación con los estados cristalinos y, por lo tanto, su solubilidad en el tracto GI puede ser mayor, lo que resultaría en una BD del fármaco potencialmente mayor (Shah, Sandhu et al. 2014).

El término dispersión sólida (DS) fue introducido por Chiou y Riegelmann en 1971 quienes las definieron como una dispersión de uno o más principios activos en un carrier (portador/vehículo) o matriz inerte en estado sólido preparado por el método de disolución en disolvente orgánico, método de fusión o por una combinación de ambos métodos (Chiou and Riegelman 1971).

Las dispersiones sólidas presentan numerosas ventajas, como ser:

- La reducción del tamaño de partícula y, por lo tanto, mayor área de superficie consiguiendo de esta manera mayor velocidad de disolución (Leuner and Dressman 2000, Kang, Lee et al. 2004);

- La mejora en la humectabilidad resultando en un aumento de la solubilidad (Sekiguchi, Obi et al. 1964, Ghebremeskel, Vemavarapu et al. 2007);

- Mayor porosidad, característica que depende de las propiedades del polímero portador, dando como resultado una mayor velocidad de disolución. El aumento en la porosidad de las partículas de las DS también acelera el perfil de liberación de los principios activos (Vasconcelos and Costa 2007);

- La mejora en la liberación del principio activo, por lo general, se puede lograr utilizando el mismo en su estado amorfo, porque no se requiere energía para romper la red cristalina durante el proceso de disolución (Taylor and Zografi 1997).

En las dispersiones sólidas, el polímero sirve como un vehículo en el que el fármaco se dispersa. La selección de polímeros es muy importante ya que influye en la fabricación, la BD y la estabilidad de las dispersiones. La evaluación inicial de los excipientes



potencialmente "útiles" debe basarse en las propiedades fisicoquímicas básicas de los polímeros, como la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la higroscopicidad, la capacidad de solución sólida y la capacidad de solubilización, entre otros. Dentro de los tensioactivos no iónicos con buenas propiedades solubilizantes están los copolímeros de bloque de óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP) conocidos como poloxámeros.

Los poloxámeros, con nombre comerciales tales como Supronic<sup>®</sup>, Pluronic<sup>®</sup> o Tetronic<sup>®</sup>, se han introducido en 1950 y están constituidos por copolímeros tribloque no iónico de poli (óxido de etileno) (POE) -poli (óxido de propileno) (POP). Desde entonces, fueron ampliamente utilizados en diversas aplicaciones farmacéuticas como agentes tensioactivos, emulsionantes, solubilizantes, dispersantes y potenciadores de absorbancia *in vivo*. A menudo se consideran como "excipientes funcionales" porque son componentes esenciales y juegan un papel importante en la formulación.

Todos los poloxámeros tienen estructuras químicas similares, pero con diferentes pesos moleculares y composición del bloque de POE (hidrófilo) y del bloque de POP (hidrofóbico). A pesar de su amplia gama de aplicaciones, se han publicado técnicas analíticas limitadas en la literatura para caracterizar poloxámeros y pocas están destinadas a cuantificar los contenidos de poloxámero en formulaciones con la sensibilidad y precisión deseadas. El poloxámero está disponible en diferentes grados según sus parámetros físicos, como el peso molecular, el porcentaje en peso de oxietileno, etc. La longitud variable de los bloques de polímero da lugar a diferentes polímeros identificados como 124, 188, 237, 338 y 407 que muestran una ligera diferencia en sus propiedades (Patel, Patel et al. 2009, Devi, Sandhya et al. 2013).

Los poloxámeros no son tóxicos y no son irritantes, por lo que también se usan como agentes humectantes en ungüentos, bases para supositorios y geles. Han sido reconocidos como un producto GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA) (Johnston and Palmer 1993, Mayol, Quaglia et al. 2008).

Una propiedad de los copolímeros tribloques es la capacidad de sus moléculas individuales, denominadas "unímeros", de autoensamblarse en micelas en soluciones acuosas. Los "unímeros" forman soluciones moleculares en agua a concentraciones del copolímero por debajo de la CMC. A concentraciones del copolímero por encima de la

CMC, las moléculas de unímeros se agregan y forman micelas en un proceso llamado "micelización". Las micelas pueden ser esféricas, en forma de varillas o laminares, según sea la longitud de los bloques de OE y OP, y según la temperatura. Todos estos tipos de micelas tienen un núcleo hidrofóbico formado por las cadenas de OP y una cubierta hidrofílica formada por las cadenas OE (Kabanov, Batrakova et al. 2002).

La naturaleza polimérica de los poloxámeros los hace adecuados para muchos de los procedimientos estándar utilizados para preparar DS. Además, presentan una miscibilidad mejorada debido a su estructura en comparación con tensioactivos no poliméricos con muchos activos farmacéuticos. Es por este motivo que se seleccionó a este polímero portador para la realización del presente trabajo de Tesis.

Las DS son, por lo tanto, una herramienta extremadamente útil en la mejora de las propiedades de disolución de fármacos poco solubles en agua. A pesar de que algunos inconvenientes relacionados con la inestabilidad y la escalabilidad siguen estando presentes; se están introduciendo técnicas de elaboración nuevas y optimizadas con alto potencial para superar estos problemas.

Por todo esto, una estrategia para incrementar la BD oral es aumentar la concentración del fármaco disuelto en los fluidos GI. Esto se puede lograr aumentando la velocidad de disolución, aumentando la solubilidad del fármaco o mediante una combinación de ambas.

## 5. Modelado matemático

El modelado matemático en los sistemas de liberación de fármacos es de suma importancia en su desarrollo y optimización. Su importancia radica en predecir las velocidades de liberación del fármaco, así como su difusión desde la matriz del polímero y para dilucidar los mecanismos de transporte físico involucrados. El beneficio práctico de un modelo matemático adecuado es la posibilidad de prever los efectos de los parámetros de diseño en los perfiles de liberación de fármacos. Además, los estudios *in vitro* pueden proporcionar información valiosa sobre la interacción polímero-fármaco y podrían ser útiles como etapa preliminar para predecir el comportamiento *in vivo*.

Se han desarrollado varios modelos empíricos y semiempíricos, así como los denominados realistas-mecanicistas (Siepmann, Kranz et al. 1999, Siepmann and Siepmann 2012). Los primeros son ecuaciones explícitas de la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo, mientras que los últimos deben resolverse numéricamente para obtener la cantidad y la velocidad de liberación del fármaco. Sin embargo, por lo general, los modelos empíricos no pueden describir todo el perfil de liberación del fármaco. Además, la capacidad predictiva de los modelos empíricos/semiempíricos suele ser baja debido a que el tratamiento matemático es descriptivo, a diferencia de las teorías matemáticas mecanicistas que consideran fenómenos reales como la difusión, la disolución y la erosión, entre otros (Romero, Villegas et al. 2017).

Los modelos matemáticos reportados en la literatura científica son diversos. Entre ellos podemos mencionar los considerados más importantes. El primer modelo matemático es el de Higuchi, que fue inicialmente concebido para geometrías planas, luego se extendió a diferentes geometrías y sistemas porosos. El modelo se basa en las hipótesis de que a) la concentración inicial del fármaco en la matriz es mucho mayor que la solubilidad del fármaco, b) la difusión del fármaco tiene lugar solo en una dimensión, c) las partículas sólidas del fármaco son mucho más pequeñas que el espesor del sistema, d) el hinchamiento de la matriz y la disolución son despreciables, e) la difusividad del fármaco es constante, y f) las condiciones "sink" siempre se alcanzan en el medio de liberación.

La ecuación de Higuchi, que describe la liberación cuando se trata de un proceso controlado por difusión, establece una relación directa entre la cantidad liberada de fármaco y la raíz cuadrada del tiempo (Ecuación 2):

$$M_t = A\sqrt{D(2C_0 - C_s) \times C_s \times t} \quad C_0 > C_s \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde  $M_t$  es la cantidad del fármaco liberado hasta que un determinado tiempo,  $A$  es el área de liberación,  $D$  es el coeficiente de difusión del fármaco en la matriz polimérica,  $C_0$  es la concentración inicial del fármaco en la matriz, mientras que  $C_s$  es la solubilidad del fármaco en la matriz polimérica. Curiosamente, este modelo muestra que  $M_t$  depende de la raíz cuadrada del tiempo y coincide con la solución matemática de la segunda ley de Fick

cuando se libera menos del 60% del fármaco (Higuchi 1961, Crank 1975, Siepmann and Siepmann 2008, Siepmann and Peppas 2012).

Por otra parte, Ritger & Peppas describieron una ecuación empírica y simple adecuada para el primer 60% de la curva de liberación, y de acuerdo con el valor del exponente difusional se puede dilucidar qué mecanismo de liberación tuvo lugar (Ecuación 3) (Korsmeyer, Gurny et al. 1983, Ritger and Peppas 1987).

$$M_t = a x t^n \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde  $a$  es una constante y  $n$  es el exponente difusional relacionado con el mecanismo de liberación del fármaco. Debe notarse que esta ecuación generalmente se presenta como la relación de  $M_t/M_\infty$ , donde  $M_\infty$  es la cantidad de fármaco liberado en un tiempo infinito.

Según la geometría, el valor  $n$  en la Ecuación 3 es igual a 0,5 para una película delgada; 0,45 para un cilindro y 0,43 para una esfera, cuando se produce la difusión tipo Fick (molecular) (Siepmann and Peppas 2012). Si el valor de  $n$  es mayor, se produce una liberación del tipo no Fickiana.

Cuando el exponente  $n$  es igual a 0,5 se obtiene una ecuación (Ecuación 4) equivalente a la de Higuchi (Ecuación 2):

$$M_t = a x t^{0,5} \quad (\text{Ecuación 4})$$

La llamada ley de potencia o ecuación de Korsmeyer-Peppas (Ecuación 3) es una ecuación semiempírica simple que describe la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos (Korsmeyer, Gurny et al. 1983). Según el valor que adopte uno de los exponentes de la ecuación, se puede suponer dos tipos de mecanismos: (a) liberación del fármaco controlada por difusión; (b) liberación de fármacos controlada por hinchamiento (swelling). Sin embargo, para ciertos valores de este parámetro, se puede indicar

superposición de ambos fenómenos (transporte anómalo). Además, la ecuación de Korsmeyer-Peppas posee restricciones ya que solo se puede aplicar para una cantidad total de fármaco liberado inferior al 60%.

Un modelo que tiene en cuenta el efecto acoplado de la difusión tipo Fick y la contribución de la relajación del polímero, es el basado en la ecuación de Peppas-Sahlin (Peppas and Sahlin 1989) (Ecuación 5).

$$M_t = a x t^n + b x t^{2n} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde  $a$  y  $b$  son las constantes cinéticas relacionadas con la contribución de difusión tipo Fick y la contribución debida a la relajación de las cadenas del polímero, respectivamente.

Una expresión más simple de la Ecuación 5, es aquella donde el exponente  $n$  se establece en 0,5 (Peppas and Sahlin 1989, Siepmann and Peppas 2012).

$$M_t = a x t^{0,5} + b x t \quad (\text{Ecuación 6})$$

Basándonos en esta problemática, nuestro grupo de investigación desarrolló y validó un modelo matemático derivado de una expresión cinética de segundo orden. Esta cinética puede agrupar las etapas principales involucradas en los procesos de liberación. Este nuevo modelo ajusta los datos experimentales desde  $t=0$  a  $t \rightarrow \infty$ . El modelo matemático propuesto se denominó "*Lumped*" y describe satisfactoriamente los procesos en los que están presentes los fenómenos de difusión y transferencia al medio de disolución, o cuando solo existe una transferencia externa a un medio fluido en el que la concentración del fármaco aumenta constantemente.

La deducción del modelo matemático "*Lumped*" el cual es utilizado para analizar todos los datos de disolución que se realizaron en el marco de este Tesis se encuentra descrito en el capítulo 2 sección 3.2.

## Objetivo general

En base a lo expuesto, el **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo de Tesis consiste en aplicar estrategias tecnológicas farmacéuticas para mejorar la bioperformance de antiparasitarios con solubilidad limitada utilizados como terapia de primera línea en enfermedades con alto impacto social. Para alcanzar este objetivo se propone el diseño y desarrollo de nuevas formulaciones de antiparasitarios, con propiedades mejoradas en cuanto a solubilidad y velocidad de disolución. Estas características permitirán incrementar la absorción y posterior biodisponibilidad de los mismos, impactando directamente en el sector social y sanitario, al producir una mejora en las terapias basadas en estos fármacos, y en la calidad de vida del paciente. Es importante destacar que los resultados generados en esta Tesis se encuentran en buen acuerdo con la Ley 26688/2011 que declara de interés nacional la investigación y producción pública de medicamentos.

## Objetivos específicos

Este trabajo de Tesis estuvo orientado a desarrollar DS basadas en polímeros tipo GRAS (acrónimo en inglés de "*generalmente reconocidos como seguros*") para mejorar la bioperformance de fármacos antiparasitarios de solubilidad limitada. En este marco, cuatro **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** son planteados:

1. Desarrollar la ingeniería de producto y proceso para la obtención de las DS con el fin de mejorar la solubilidad y la velocidad de disolución de los principios activos, utilizando excipientes de formulación aprobados por autoridad sanitaria nacional que sean económicos. La formulación desarrollada deberá ser segura, estable y permitir una administración cómoda, fácil y confiable durante el tratamiento.
2. Caracterizar físico-químicamente los sistemas obtenidos y evaluar su performance biofarmacéutica *in vitro* mediante ensayos de disolución codificados en Farmacopea Nacional Argentina.
3. Realizar ensayos *in vitro* para evaluar la eficacia sobre parásitos e *in vivo* en animales de laboratorio utilizando placebos y distintas formulaciones para determinar el rango de variables de formulación que posibiliten obtener un sistema estable.

4. Desarrollar un modelo matemático que permita obtener un buen ajuste de los datos de disolución experimentales que involucre los fenómenos de transferencia y difusión. Calcular parámetros de relevancia farmacéutica con el fin de predecir y caracterizar el comportamiento de las DS. Realizar un análisis basado en el método de modelo independiente para comparar los perfiles de disolución de las diferentes DS obtenidas.

### Hipótesis de trabajo

La hipótesis del presente trabajo de Tesis se basa en un esquema racional de Investigación, Desarrollo e innovación (*I+D+i*) para este tipo de sistemas donde se pueden discernir cuatro niveles que retroalimentan las actividades previstas: I) el diseño, desarrollo y caracterización de la plataforma tecnológica propiamente dicha (sistema portador), II) la optimización de procesos con base tecnológica racional, III) la evaluación de las propiedades *in vitro* de los sistemas desarrollados incluyendo los estudios de estabilidad de formulaciones, y IV) el estudio *in vivo* en modelos de animales de laboratorio para evaluar la eficacia de la formulación desarrollada.

En ese marco, se ha establecido como hipótesis primaria que es posible obtener una formulación oral del antiparasitario con propiedades mejoradas en cuanto a su solubilidad y velocidad de disolución, lo que ocasionará una mayor absorción y consecuentemente una mayor BD oral. Así mismo, el desarrollo contemplará que esta formulación sea económicamente accesible y que cumpla con los requisitos de seguridad y eficacia durante el tratamiento.

Un diseño racional de las formulaciones antiparasitarias para uso oral debe incluir los siguientes ejes centrales de complejidad creciente:

- 1.- Los excipientes deben ser ampliamente utilizados y aprobados por autoridad sanitaria nacional.
- 2.- Desarrollar formulaciones con alta velocidad de disolución y una solubilidad mejorada, utilizando la técnica de las DS.

3.- El diseño de este tipo de formulaciones estará dirigido a disponer de formulaciones para uso oral con propiedades mejoradas de solubilidad y velocidad de disolución del fármaco.

Es necesario destacar que las fórmulas líquidas (jarabes/suspensiones) permiten una dosificación más exacta y no necesitan diluirse antes de su toma, mientras que la producción de una formulación sólida (comprimidos/cápsulas) es más fácil y representa una ventaja en términos de envase, almacenamiento y costos de distribución.

Las investigaciones se centrarán inicialmente en la caracterización *in vitro* y de la cinética de disolución de las formulaciones para dilucidar el efecto de las variables de formulación en la velocidad de disolución. La información generada en este paso debería permitir una revisión preliminar de las formulaciones con respecto a las características de flujo, compresibilidad y disolución, además de determinar las variables más sensibles, caracterizar física y morfológicamente las estructuras resultantes, y brindar información sobre las propiedades farmacéuticas de relevancia.



## Referencias

Allen, L. and H. C. Ansel (2013). Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, Lippincott Williams & Wilkins.

Amidon, G. L., et al. (1995). "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." Pharmaceutical research **12**(3): 413-420.

Baruch, A. and W. Louis (2014). Parasitología humana, McGraw Hill Mexico.

Bekhti, A., et al. (1977). "Treatment of hepatic hydatid disease with mebendazole: preliminary results in four cases." Br Med J **2**(6094): 1047-1051.

Bermudez, J., et al. (2016). "Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease." Acta Tropica **156**: 1-16.

Capece, B. P. S. (2002). Caracterización farmacológica del albendazol sulfóxido y de sus enantiómeros en ovejas y ratas análisis del metabolismo ruminal, Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària.

Castro, S. G., et al. (2010). "Improved Albendazole Dissolution Rate in Pluronic 188 Solid Dispersions." AAPS PharmSciTech **11**(4): 1518-1525.

Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **1**(2): 159-218.

Chiou, W. L. and S. Riegelman (1971). "Pharmaceutical applications of solid dispersion systems." Journal of pharmaceutical sciences **60**(9): 1281-1302.

Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion (Clarendon, Oxford, UK).

Dayan, A. (2003). "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics." Acta Tropica **86**(2): 141-159.

de Moura Ferraz, L. R., et al. (2018). "Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole." Acta Tropica.

Devi, D. R., et al. (2013). "Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy." J Pharm Sci Res **5**(8): 159-165.

Dias, J. C. P., et al. (2014). "The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **47**(1): 123-125.

Fonseca-Berzal, C., et al. (2015). "Novel solid dispersions of benznidazole: Preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system." Experimental Parasitology **149**: 84-91.

Gamboa, M. I., et al. (2010). "Parásitos intestinales y pobreza: la vulnerabilidad de los más carenciados en la Argentina de un mundo globalizado." Journal of the Selva Andina Research Society **1**: 23-37.

García, A., et al. (2016). "Promising applications in drug delivery systems of a novel  $\beta$ -cyclodextrin derivative obtained by green synthesis." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **26**(2): 602-608.

Ghebremeskel, A. N., et al. (2007). "Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: Selection of polymer-surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability." International Journal of Pharmaceutics **328**(2): 119-129.

González, J., et al. (2013). Pathogenesis of chronic chagasic myocarditis. Diagnosis and Treatment of Myocarditis, InTech.

Heath, D. and R. Chevis (1974). "Mebendazole and hydatid cysts." The Lancet **304**(7874): 218-219.

Higuchi, T. (1961). "Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension." Journal of pharmaceutical sciences **50**(10): 874-875.

Jato, V. (2001). Tecnología farmacéutica Volumen II: Formas farmacéuticas.

Jelowdar, A., et al. (2017). "Efficacy of combined albendazol and praziquantel and their loaded solid lipid nanoparticles components in chemoprophylaxis of experimental hydatidosis." Asian Pacific journal of tropical biomedicine **7**(6): 549-554.

Jesús, F. (1997). "Farmacología humana." Edición **3**: 1273.

Johnston, T. P. and W. K. Palmer (1993). "Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat." Biochemical pharmacology **46**(6): 1037-1042.

Kabanov, A. V., et al. (2002). "Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." Journal of Controlled Release **82**(2-3): 189-212.

Kalaiselvan, R., et al. (2006). "Preparación de la fase sólida y la caracterización de la dispersión sólida de albendazol." Ars Pharmaceutica **47**(1): 91-107.

Kalepu, S. and V. Nekkanti (2015). "Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects." Acta Pharmaceutica Sinica B **5**(5): 442-453.

Kang, B.-S., et al. (2017). "Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles." Carbohydrate polymers **159**: 39-47.

Kang, B. K., et al. (2004). "Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs." International Journal of Pharmaceutics **274**(1): 65-73.

Kawakami, K., et al. (2006). "Solubilization behavior of a poorly soluble drug under combined use of surfactants and cosolvents." European Journal of Pharmaceutical Sciences **28**(1-2): 7-14.

Korsmeyer, R. W., et al. (1983). "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers." International Journal of Pharmaceutics **15**(1): 25-35.

Ku, M. S. (2008). "Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development." The AAPS journal **10**(1): 208-212.

Kudtarkar, A., et al. (2017). "Solid Lipid Nanoparticles of Albendazole for Treatment of Toxocara Canis Infection: In-Vivo Efficacy Studies." Nanoscience & Nanotechnology-Asia **7**(1): 80-91.

Leonardi, D., et al. (2013). "Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats." International journal of biological macromolecules **62**: 543-548.

Leuner, C. and J. Dressman (2000). "Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **50**(1): 47-60.

Manarin, R., et al. (2013). "Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*." Parasitology international **62**(1): 79-81.

Martinez-Marcos, L., et al. (2016). "A novel hot-melt extrusion formulation of albendazole for increasing dissolution properties." International Journal of Pharmaceutics **499**(1-2): 175-185.

Mavrova, A. T., et al. (2010). "Synthesis, antitrichinellosis and antiprotozoal activity of some novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ones containing benzimidazole ring." European Journal of Medicinal Chemistry **45**(12): 5856-5861.

Mayol, L., et al. (2008). "A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties." Eur J Pharm Biopharm **70**(1): 199-206.

Mayol, L., et al. (2008). "A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **70**(1): 199-206.

Morris, D., et al. (1983). "Albendazole in hydatid disease." British medical journal (Clinical research ed.) **286**(6359): 103.

Müller, R., et al. (2002). "Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs." International Journal of Pharmaceutics **242**(1-2): 121-128.

Naseri, M., et al. (2016). "Scolicidal and apoptotic activities of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide-loaded PLGA-PEG as a novel nanopolymeric particle against *Echinococcus granulosus* protoscoleces." Parasitology Research **115**(12): 4595-4603.

Nekkanti, V., et al. (2015). "Proliposomes for oral delivery: progress and challenges." Current pharmaceutical biotechnology **16**(4): 303-312.

Newman, A., et al. (2012). "Assessing the performance of amorphous solid dispersions." Journal of pharmaceutical sciences **101**(4): 1355-1377.

Noyes, A. A. and W. R. Whitney (1897). "The rate of solution of solid substances in their own solutions." Journal of the American Chemical Society **19**(12): 930-934.

Page, S. W. (2008). Chapter 10 - Antiparasitic drugs. Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition). Edinburgh, W.B. Saunders: 198-260.

Palomares-Alonso, F., et al. (2009). "Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives." European Journal of Medicinal Chemistry **44**(4): 1794-1800.

Pápay, Z. E., et al. (2016). "Comparative evaluation of the effect of cyclodextrins and pH on aqueous solubility of apigenin." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis **117**: 210-216.

Paredes, A. J., et al. (2016). "Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by high pressure homogenization and spray-drying." Drug development and industrial pharmacy **42**(10): 1564-1570.

Patel, H. R., et al. (2009). "Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors." International Journal of PharmTech Research **1**(2): 299-303.

Peppas, N. A. and J. J. Sahlin (1989). "A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation." International Journal of Pharmaceutics **57**(2): 169-172.

Perin, L., et al. (2017). "Pharmacokinetics and tissue distribution of benzimidazole after oral administration in mice." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **61**(4): e02410-02416.

Priotti, J., et al. (2017). "Albendazole microcrystal formulations based on chitosan and cellulose derivatives: physicochemical characterization and in vitro parasitocidal activity in *Trichinella spiralis* adult worms." AAPS PharmSciTech **18**(4): 947-956.

Rang, H. (2012). *Farmacología de Rang & Dale*, Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil.

Rios-Doria, J., et al. (2012). "A versatile polymer micelle drug delivery system for encapsulation and in vivo stabilization of hydrophobic anticancer drugs." Journal of drug delivery **2012**.

Ritger, P. L. and N. A. Peppas (1987). "A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs." Journal of Controlled Release **5(1)**: 23-36.

Rivera, J. C., et al. (2007). "Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives." International Journal of Pharmaceutics **343(1-2)**: 159-165.

Romero, A. I., et al. (2017). "Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes." Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Rockville, M. (2007). "The United States Pharmacopoeia 30, the National Formulary 25 US Pharmacopeial Convention." Electronic version.

Salas, F. L. V. (2011). Evaluación de un agente dispersante y una dispersión sólida, sobre la liberación de albendazol desde sistemas matriciales lipídicos Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas. Santiago de Chile, Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas: 71.

Sekiguchi, K., et al. (1964). "Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits." CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN **12(2)**: 134-144.

Shah, N., et al. (2014). "Amorphous Solid Dispersions." Theory and practice: Springer.

Siepmann, J., et al. (1999). "HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics." Pharmaceutical research **16(11)**: 1748-1756.

Siepmann, J. and F. Siepmann (2008). "Mathematical modeling of drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **364(2)**: 328-343.

Siepmann, J. and F. Siepmann (2012). "Modeling of diffusion controlled drug delivery." Journal of Controlled Release **161(2)**: 351-362.

Siepmann, J. and N. Peppas (2012). "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)." Advanced drug delivery reviews **64**: 163-174.

Siepmann, J., et al. 2012 "Chapter 6-Diffusion controlled drug delivery systems." Fundamentals and applications of controlled release drug delivery.

Simonazzi, A., et al. (2018). "Preparation and characterization of Poloxamer 407 solid dispersions as an alternative strategy to improve benznidazole bioperformance." Journal of pharmaceutical sciences.

Soares-Sobrinho, J. L., et al. (2012). "Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers." Carbohydrate polymers **89**(2): 323-330.

Souza, S., et al. (2017). "Development and in vitro/in vivo evaluation of a novel benznidazole liquid dosage form using a quality-by-design approach." Tropical Medicine & International Health **22**(12): 1514-1522.

Streck, L., et al. (2014). "Surfactant-cosurfactant interactions and process parameters involved in the formulation of stable and small droplet-sized benznidazole-loaded soybean O/W emulsions." Journal of Molecular Liquids **196**: 178-186.

Streck, L., et al. (2011). "Validação de método analítico por espectrofotometria UV para sistema emulsionado lipídico contendo benznidazol." Química Nova: 1459-1463.

Sugano, K., et al. (2007). "Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery." Drug metabolism and pharmacokinetics **22**(4): 225-254.

Swarbrick, J. and J. C. Boylan (2000). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Volume 20-Supplement 3, CRC Press.

Tang, J.-I., et al. (2007). "Self-emulsifying drug delivery systems: strategy for improving oral delivery of poorly soluble drugs." Current drug therapy **2**(1): 85-93.

Tarragona Sonia , et al. (2013). Design and Preparation of Pharmaceutical Solid Dosage Forms of Benznidazole for the Treatment of Chagas Disease. Rev Argent Salud Pública. **4**.

Taylor, L. S. and G. Zografi (1997). "Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions." Pharmaceutical research **14**(12): 1691-1698.

Torrado, S. (1994). "Estudio Farmacéutico de Nuevas Formulaciones Galénicas de Albendazol." Memoria de Doctorado. Madrid, Universidad Complutense de Madrid: 18-52.

Torrado, S., et al. (1996). "Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions." International Journal of Pharmaceutics **140**(2): 247-250.

Trochine, A., et al. (2014). "Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in Trypanosoma cruzi Revealed by Metabolomics." PLoS Neglected Tropical Diseases **8**(5): e2844.

Vasconcelos, T. and P. Costa (2007). Development of a rapid dissolving ibuprofen solid dispersion. PSWC–Pharmaceutical Sciences World Conference, DD-W-103.

Vioglio, P. C., et al. (2017). "Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges." Advanced drug delivery reviews **117**: 86-110.

Vogt, M., et al. (2008). "Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **68**(2): 330-337.

Williams III, R. O., et al. (2012). Formulating poorly water soluble drugs, Springer.

Yu, L. (2001). "Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization." Advanced drug delivery reviews **48**(1): 27-42.

# CAPÍTULO 1: MATERIALES



## 1. Materiales

Las dispersiones sólidas son una estrategia de formulación valiosa para mejorar la BD de los fármacos poco solubles al mejorar su velocidad de disolución en entornos biorrelevantes. Los polímeros son los componentes críticos en la producción de las DS, ya que actúan como portadores del fármaco e inhiben la cristalización tanto en la forma farmacéutica como en la fase in vivo. Las propiedades más importantes de los polímeros, tales como la Tg, la solubilidad en solventes orgánicos y la higroscopicidad deben ser cuidadosamente consideradas para lograr que una DS sea estable y reproducible a fin de lograr perfiles de disolución y farmacocinéticos adecuados para mejorar la BD del fármaco.

### 1.1 Polímero portador

El polímero seleccionado como portador fue el Poloxamer 407 (P407). El mismo se encuentra disponible comercialmente como Pluronic F127® y Synperonic F127®. Los Poloxamer se empezaron a utilizar en 1950 como un copolímero tribloque no iónico. Son desde entonces muy utilizados en diversas aplicaciones farmacéuticas. Químicamente son dos cadenas hidrófilas de óxido de etileno (OE) que intercalan una cadena de óxido de propileno (OP) hidrófobo, los cuales originan la siguiente fórmula química  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ . La longitud variable de los bloques da lugar a diferentes polímeros identificados como 124, 188, 237, 338 y 407 que muestran una ligera diferencia en sus propiedades (Tabla 1.1). La representación común de los Poloxamer es con la letra 'P' seguida por tres dígitos donde los dos primeros multiplicados por 100 resulta igual a la masa molecular del OP hidrófobo y el último dígito multiplicado por diez da como resultado el contenido en porcentaje de OE hidrófilo. Los poloxámeros generalmente tienen una propiedad termorreversible eficiente con una temperatura de transición sol-gel característica que se usa ampliamente en los sistemas de termogelificación. Por debajo de la temperatura de transición, está presente como una solución y por encima de esta temperatura, la solución da como resultado la interacción del segmento de copolímero que conduce a la gelificación. Los poloxámeros son incorporados a formas farmacéuticas destinadas a las vías oral, parenteral, tópica, entre otras. Por otro lado, se utilizan como solubilizantes, emulsionantes y estabilizantes. Los poloxámeros no son tóxicos ni irritantes,

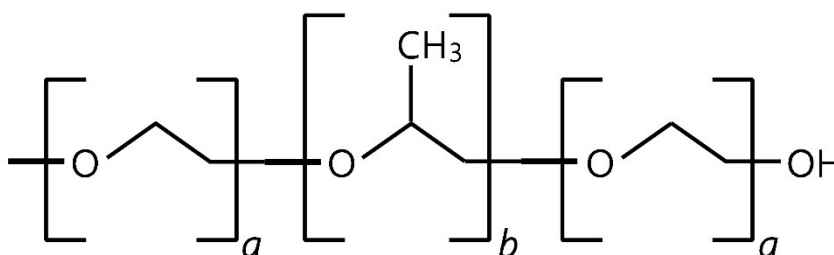
por lo que también se los emplean como agentes humectantes en ungüentos, bases de supositorios y geles (Devi, Sandhya et al. 2013).

**Tabla 1.1.** Especificaciones farmacopeicas de diferentes poloxamer. Extraído de Kabanov 2002 y Dumortier 2006.

Poloxamer	Pluronic	Estado físico	Masa molecular media	HLB	CMC	Punto de fusión
124	L 44	Líquido	2090-2360	16	$3,6 \times 10^{-3}$	16°C
188	F 68	Sólido	7680-9510	29	$4,8 \times 10^{-4}$	52-57°C
237	F 87	Sólido	6840-8830	24	$9,1 \times 10^{-5}$	49°C
338	F 108	Sólido	12700-17400	27	$2,2 \times 10^{-5}$	57°C
407	F 127	Sólido	9840-14600	22	$2,8 \times 10^{-6}$	52-57°C

(Kabanov, Batrakova et al. 2002, Dumortier, Grossiord et al. 2006)

Tal como fue previamente mencionado, los poloxámeros son copolímeros tribloque sintéticos con la siguiente fórmula (Fig. 1.1):



**Figura 1.1.** Estructura química del poloxamer, el segmento "a" corresponde al bloque de POE hidrófilo y el "b" al bloque de POP hidrofóbico.

Estos copolímeros tienen propiedades anfífilas caracterizadas por sus valores de HLB (balance hidrofílico-lipofílico), que dependen en gran medida de  $a$  y  $b$ . Al variar los valores de estos parámetros, el tamaño, la lipofilidad y la hidrofiliidad se pueden modificar fácilmente.

En el caso del P407, sus características químicas le confieren propiedades específicas que le permiten ser utilizado como tensioactivo y como portador polimérico en las DS, además de actuar como un dispersante y un agente emulsionante para el fármaco incorporado. Su presencia en la formulación asegura una mayor solubilidad del fármaco debido al aumento del área de contacto entre el fármaco y el solvente. Además, hace que

las moléculas del fármaco se dispersen y emulsionen, y como resultado se disuelvan rápidamente. El parámetro que debe tenerse en cuenta al elegir un surfactante como portador en las DS es su temperatura de fusión y la solubilidad del fármaco en el portador (Karolewicz, Górnjak et al. 2012). La FDA presenta el P407 como un ingrediente inactivo de tipo GRAS para diferentes tipos de aplicaciones y vías de administración (por ejemplo, intravenosa, inhalación, solución oral, suspensión, formulaciones oftálmicas o tópicas) (Rowe, Sheskey et al. 2009).

El P407 presenta propiedades de gelificación térmica reversa que está caracterizada por una temperatura de transición de sol-gel. No está claramente establecido el proceso de termogelación, pero lo más aceptado postula que resulta de las interacciones hidrofóbicas entre diferentes segmentos del copolímero. A medida que aumenta la temperatura, las moléculas de P407 se autoensamblan en micelas. Esta micelización se debe a la deshidratación de los bloques de OP hidrófobos, lo que representa el primer paso en el proceso de gelificación. Estas micelas son esféricas con un núcleo de poli OP deshidratado con una cubierta externa de cadenas de poli OE hidratadas. La micelización es seguida por gelificación para muestras suficientemente concentradas. Esta gelificación se atribuye al empaquetamiento ordenado de las micelas. Se pueden observar diferentes estructuras con P407 en agua o en solventes mixtos. Por ejemplo, se obtiene una estructura cúbica centrada para las concentraciones de P407 en agua que oscilan entre 20 y 40% (p/p). A concentraciones más altas (50% p/p), se observa un empaquetamiento cúbico de micelas. Estas estructuras cúbicas micelares producen alta viscosidad, rigidez parcial y disolución lenta de los geles. Tales propiedades facilitan la incorporación de fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos. Esto es debido a que los copolímeros existen en solución como monómeros pero se autoensamblan cuando están en concentraciones por encima de la CMC. Las micelas que se forman pueden ser esféricas, en forma de varillas o lamelares, según la longitud de los bloques de OE y de OP, la concentración del poloxamer y la temperatura. Todos estos tipos de micelas tienen un núcleo hidrófobo correspondiente formado por las cadenas de OP y la cubierta hidrófila formada por las cadenas OE (Kabanov, Batrakova et al. 2002, Dumortier, Grossiord et al. 2006). El núcleo hidrofóbico de OP puede incorporar moléculas insolubles en agua y luego protege los agentes frágiles de los componentes exteriores.

El Poloxamer 407 utilizado para realizar el trabajo de Tesis fue adquirido a BASF® (Buenos Aires, Argentina).

## 1.2 Fármacos

### 1.2.1 Albendazol

Químicamente el ABZ es el carbamato de metil 5- (propiltio) -2 bencimidazol (Fig. 1.2) (Wisher 2012). Este fármaco pertenece al grupo de los BZD. Aunque BZD es el nombre más común del compuesto original de la serie, a menudo se usan otros nombres como 1,3-benzodiazol. Los BZD son compuestos de naturaleza bicíclica que consisten en la fusión de benceno e imidazol. Los BZD poseen importantes propiedades farmacológicas como por ejemplo: analgésicas, antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antihelmínticas, anticonvulsivantes, anticancerígenas, antiulcerosas y antihipertensivas. El compuesto de BZD más prominente en la naturaleza es el N-ribosil-dimetilbencimidazol, que sirve como un ligando axial para el cobalto en las vitaminas (Srestha, Banerjee et al. 2014). El mecanismo de acción antiparasitario no está claramente definido. Se supone que los BZD actúan inhibiendo la polimerización de la  $\beta$ -tubulina del helminto, de forma que interfieren las funciones dependientes de los microtúbulos, como la captación de glucosa. Tienen una acción inhibitoria selectiva sobre la función de los microtúbulos del helminto y son entre 250-400 veces más potentes en los helmintos que en el tejido de los mamíferos. Sin embargo, es necesario un período de tiempo para que aparezca este efecto, por lo que los helmintos no se eliminan en varios días. Particularmente, el ABZ inhibe de forma selectiva e irreversible la polimerización de la tubulina bloqueando la absorción de glucosa y llevando a la depleción de los depósitos de glucógeno en los microtúbulos de las células tegumentarias e intestinales. De esta manera, inicialmente inmoviliza y luego mata al parásito. Otra de las acciones farmacológicas del ABZ es la de inhibir a la fumarato reductasa del parásito, enzima que participa activamente en la síntesis de ATP, fuentes de energía indispensable para que la célula pueda llevar a cabo sus múltiples funciones (Jesús 1997, Rang 2012). Se absorbe mal a nivel del tracto GI, pero se puede mejorar el proceso de absorción con comida, sobre todo grasa. Este fármaco sufre un elevado efecto de primer paso hepático, originando metabolitos de tipo sulfóxido y sulfona, los cuales son activos a nivel farmacológico (Rang 2012).

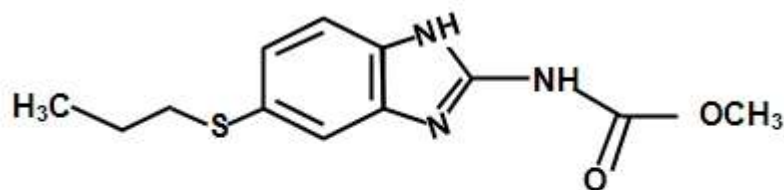


Figura 1.2. Estructura química del albendazol.

Los BZD con nitrógeno imidazólico son generalmente solubles en solventes polares y menos solubles en solventes orgánicos. La introducción de otros sustituyentes no polares en varias posiciones del anillo de BZD, aumenta la solubilidad en solventes no polares. A la inversa, la introducción de grupos polares en la molécula aumenta la solubilidad en solventes polares. Los BZD son débilmente básicos, siendo algo menos básicos que los imidazoles y, en general, son solubles en ácidos diluidos. Particularmente, el ABZ es totalmente soluble en ácido fórmico anhidro; muy poco soluble en éter y cloruro de metileno y prácticamente insoluble en alcohol y agua (Farmacopea 2012). Según el SCB se encuentra clasificado como un fármaco clase II (baja solubilidad/alta permeabilidad) (Amidon, Lennernäs et al. 1995).

Entre las principales propiedades fisicoquímicas de albendazol se puede mencionar (Tabla 1.2):

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas del Albendazol, adaptado de Wisher 2012.

Nombre químico	carbamato de metil -N- (6-propilsulfanil-1H-bencimidazol-2-il)
Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S
Número de CAS	54965-21-8
Peso molecular	265,331 g/mol
Descripción física	polvo blanco o levemente amarillento
Punto de fusión	208 – 210°C

(Wisher 2012)

El ABZ se administra por vía oral, preferentemente con las comidas. Los comprimidos se pueden masticar, tragar enteros o aplastar y mezclar con alimentos. Las

suspensiones deben agitarse bien antes de usar. La posología recomendada se muestra en la Tabla 1.3.

*Tabla 1.3. Posología de ABZ para diferentes patologías, tomado de la disposición 5231/13 de ANMAT.*

Indicaciones	Edad	Dosis	Período
Ascariasis	Adultos y niños	400 mg	Dosis única
Tricocefalosis	mayores de 2 años	1 comprimido de 400 mg	
Enterobiasis*		20 ml de la suspensión al 2%	
Uncinariasis	Niños de 1 a 2 años	200 mg 10 ml de la suspensión al 2%	Dosis única
Estrongiloidosis	Adultos y niños	400 mg	Una vez al día durante
Teniasis	mayores de 2 años	1 comprimido de 400 mg	3 días
intestinal		20 ml de la suspensión al 2%	
Himenolepiasis**			
Giardiasis	Niños de 2 a 12 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Una vez al día por 5 días
Triquinosis	Niños mayores de 2 años	15 mg/kg/día (dosis máxima diaria: 800 mg)	Dos veces al día (1 toma a la mañana y otra a la tarde) durante
	Adultos	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	10 a 15 días en función de la severidad de la sintomatología
Neurocisticercosis (larva de <i>T. solium</i> )***	Niños mayores de 2 años y personas con menos de 60 kg de peso	15 mg/kg/día (dosis máxima diaria: 800 mg)	Dos veces al día (1 toma a la mañana y otra a la tarde) durante
	Adultos	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	14 a 30 días dependiendo de la respuesta al tratamiento
Hidatidosis****	Niños mayores de 2 años y personas con menos de 60 kg de peso	15 mg/kg/día (dosis máxima diaria: 800 mg)	Dos veces al día (1 toma a la mañana y otra a la tarde) durante
	Adultos	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	28 días.
Capilariasis	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Una vez al día durante 10 días

<b>Larva migrans cutánea</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Una vez al día por 1 a 3 días
<b>Toxocariasis</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	200 mg 10 ml de la suspensión al 2%	Tres veces al día por 5 días
<b>Tricostrogiliasis</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Dosis única
<b>Filariasis linfática*****</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Dosis única (asociada a ivermectina o dietilcarbamazina)
<b>Gnathostomiasis</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Una vez al día durante 12 a 14 días
<b>Clonorquiasis Opistorquiasis</b>	Adultos y niños mayores de 2 años	400 mg 1 comprimido de 400 mg 20 ml de la suspensión al 2%	Dos veces al día durante 3 días

\* Para lograr una cura completa de los casos de infestación por enterobios, se sugiere estrictas medidas de higiene y el mismo tratamiento a los familiares y personas que convivan con el paciente.

\*\* Es recomendable la repetición del tratamiento 10 a 21 días después, dado el ciclo vital de los parásitos.

\*\*\* Administrar con las comidas. Se recomienda el uso oral o intravenoso de corticosteroides para prevenir eventos de hipertensión cerebral durante la primera semana de tratamiento. Asimismo, se debe tener en cuenta la administración de anticonvulsivantes en caso de ser necesario.

\*\*\*\* Administrar con las comidas. En la hidatidosis quística, esta tanda de 28 días se puede repetir después de 14 días de descanso, hasta un total de 3 ciclos de tratamiento. En la equinocosis alveolar es posible que los ciclos de 28 días de tratamiento, separados por 14 días de descanso, tengan que repetirse durante meses o años.

\*\*\*\*\* Si la filariasis coexiste con loiasis u oncocercosis, la dosis de ABZ se debe asociar con una dosis única de 6 mg/kg de peso de dietilcarbamazina. Estas dosis se administran una vez al año durante 4 o 6 años.

Si la parasitosis no revierte después de tres semanas, está indicado un segundo tratamiento. No son necesarios procedimientos especiales como el ayuno o el uso de laxantes. En indicaciones diferentes, el uso de este medicamento no ha sido estudiado en niños menores de 2 años.

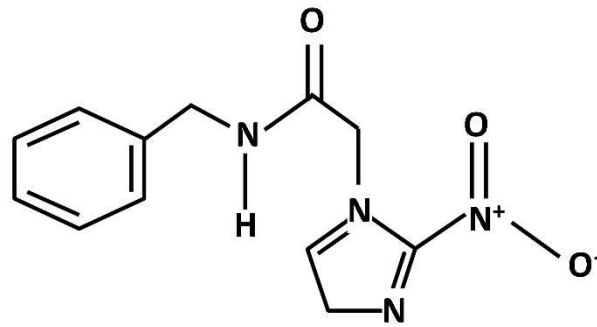
El fármaco antiparasitario ABZ utilizado en el presente trabajo de Tesis fue adquirido a Todo Droga® (Córdoba, Argentina).

## 1.2.2 Benznidazol

Químicamente el BZL es el N-bencil-2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida (Fig. 1.3). Es un derivado del 2-nitroimidazol utilizado como el tratamiento de primera línea para la enfermedad de Chagas (Maximiano, Hideki Yoshizane Costa Guilherme et al. 2010). Los

nitroimidazoles pertenecen al grupo de compuestos nitroheterocíclicos que desempeñan un papel importante como fármacos en quimioterapia. Dependiendo de las posiciones disponibles en el heterociclo del imidazol, los nitroimidazoles se han clasificado como 2-nitro, 4-nitro y 5-nitroimidazoles. De ellos, los 5-nitroimidazoles se caracterizan por ser agentes terapéuticos con propiedades antiprotozoarias y antibacterianas (Kapoor, Chadha et al. 2003). El primer compuesto heterocíclico que se utilizó en medicina humana fue la nitrofurazona, un derivado del nitrofurano. El descubrimiento de las propiedades antibacterianas de los nitrofuranos aumentó el interés en los compuestos nitroheterocíclicos como agentes quimioterapéuticos. En particular, los nitroimidazoles ganaron importancia debido a su actividad antiprotozoaria. Al igual que con cualquier inhibidor de molécula pequeña, los compuestos nitroaromáticos pueden ejercer sus efectos biológicos al unirse a una o más dianas moleculares (generalmente proteínas), y como resultado producen el fenotipo de interés, que es la muerte celular en el caso de antiparasitarios. Si este es el caso, el grupo nitro actúa como cualquier otro grupo funcional al contribuir directa o indirectamente a una o más interacciones de unión entre la molécula diana y el ligando. Además, el hecho de que los agentes nitroaromáticos se pueden reducir enzimáticamente les permite ejercer toxicidad celular a través de mecanismos adicionales. Se cree que la bioactivación del BZL está mediada por enzimas nitroreductasas (NTR) de tipo I. Los parásitos de *T. cruzi* son inusuales porque poseen una NTR tipo I de tipo bacteriano para la cual no existe un homólogo en mamíferos. Por lo tanto, la toxicidad selectiva observada para estos inhibidores puede deberse a la presencia de una enzima bioactivadora específica en el parásito que está ausente en el huésped. El BZL sirve como sustrato para las NTR de *T. cruzi*. El grupo nitro experimenta reducciones secuenciales para dar un intermedio de hidroxilamina. Una serie de transformaciones no enzimáticas convierten el intermedio de hidroxilamina en un 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol. En solución acuosa, estos dihidro-dihidroxiimidazoles existen en equilibrio con glioxal y un producto de guanidina sustituida. El glioxal es un dialdehído reactivo altamente tóxico que es capaz de modificar químicamente proteínas, lípidos y nucleótidos. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la formación de glioxal es responsable en parte de la acción tripanocida del BZL. Sin embargo, la producción de glioxal a partir de dihidro-dihidroxiimidazoles es extremadamente lenta, lo que significa que es poco probable que la producción de glioxal sea el único mecanismo citotóxico (Patterson and Wyllie 2014).





*Figura 1.3. Estructura química del benznidazol.*

La posología recomendada para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es de 5-7 mg/kg/día (para todas las edades), administrados en dos tomas diarias (cada 12 horas) luego de las comidas. Se sugiere una dosis máxima de 400 mg/día. En prematuros o niños de bajo peso se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas de BZL que puede administrarse en una sola toma diaria. Luego se puede aumentar la dosis cada 48 a 72 horas, realizando control de hemograma hasta alcanzar la dosis terapéutica. La duración del tratamiento recomendada es de 60 días. Ante el caso de intolerancia al medicamento que impida completar los dos meses, se puede considerar aceptable si cumplió al menos 30 días. En caso de suspender el tratamiento por la presencia de eventos adversos antes de los 30 días, y luego de controlados los mismos, se recomienda comenzar un nuevo tratamiento. El tratamiento tripanocida en la fase aguda reduce la gravedad de los síntomas y acorta el curso clínico y la duración de la parasitemia detectable. La cura parasitológica (demostrable por negativización de la parasitemia y de la serología) es superior al 80% en fase aguda vectorial (transmitida por la vinchuca) y más del 90% en los casos congénitos tratados durante el primer año de vida. En niños y adolescentes con infección crónica el tratamiento tripanocida es en general bien tolerado y ha demostrado una alta tasa de curación de la infección, demostrable por la negativización de la serología. Todas las guías y recomendaciones actuales coinciden en indicar que los niños y adolescentes con Chagas deben ser tratados lo más precozmente posible dado que presentan menos efectos adversos y mejor respuesta terapéutica. En adultos con infección crónica el tratamiento etiológico también ha demostrado asociarse a negativización de la serología sugiriendo la curación de la infección, aunque la tasa observada es menor que en niños y adolescentes,

y el tiempo requerido hasta la seroconversión es mucho mayor (de la Nación, DE KIRCHNER et al.).

Particularmente, el BZL es moderadamente soluble en acetona, poco soluble en metanol, muy poco soluble en etanol y prácticamente insoluble en agua (Gutteridge 1985). Entre las principales propiedades fisicoquímicas de BZL podemos mencionar (Tabla 1.4):

*Tabla 1.4. Propiedades físico-químicas del benznidazol, adaptado de Wisner 2012.*

Nombre químico	N-bencil-2- (2-nitroimidazol-1-il) acetamida
Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
Número de CAS	22994-85-0
Peso molecular	260,253 g/mol
Descripción física	polvo blanco amarillento
Punto de fusión	190 – 192°C
(Wisher 2012)	

El principio activo puro no está comercialmente disponible en Argentina. Por este motivo para realizar los trabajos experimentales de esta Tesis, se desarrolló un proceso de extracción del BZL presente en los comprimidos de la formulación comercial (Abarax®). Por otra parte, para realizar estudios comparativos en el proceso de identificación, fue adquirido BZL con una pureza del 97% (Sigma Aldrich -EE. UU). Este compuesto será denominado en adelante BZL-p.

#### 1.2.2.1 Extracción de benznidazol desde los comprimidos comerciales.

El BZL fue extraído de la formulación comercial adaptando el protocolo descrito por García et al (García, Ponce et al. 2016). Los comprimidos fueron triturados y disueltos en etanol, con agitación constante a 45°C. La suspensión obtenida se filtró en caliente, recibiendo el filtrado en un baño con hielo. Los sólidos fueron descartados y al líquido filtrado se le añadió agua destilada fría, produciéndose de esta manera la recristalización del BZL. La suspensión acuosa obtenida fue filtrada al vacío, y el BZL obtenido se secó a 45°C en una estufa hasta peso constante. El producto obtenido mediante este procedimiento se nombrará como BZL extraído (BZL-e) (Fig. 1.4).

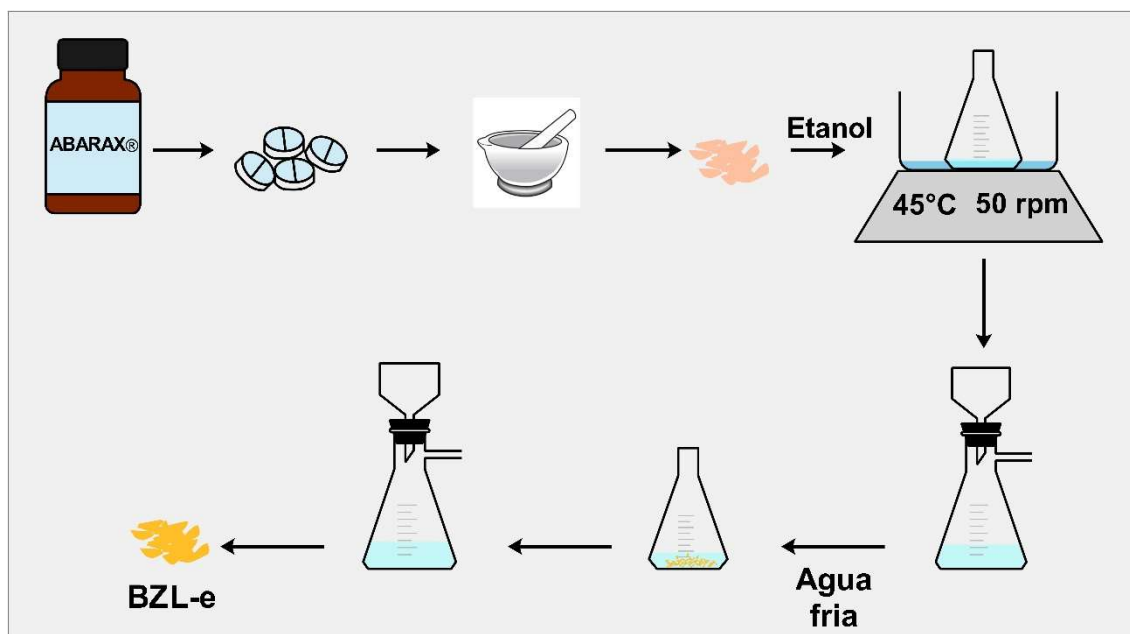


Figura 1.4. Esquema de obtención de BZL-e desde comprimidos comerciales.

El material extraído fue caracterizado mediante espectroscopia infrarroja y calorimetría diferencial de barrido.

### 1.3 Formulaciones comerciales.

#### 1.3.1 Vermizole®

La formulación comercial de ABZ utilizada fue Vermizole® 200 mg (Laboratorio Lafedar, Argentina). Los comprimidos de 200 mg se pulverizaron y tamizaron. La fracción 420-210  $\mu\text{m}$  se utilizó en los ensayos de la presente Tesis. El polvo se almacenó en un vial con tapa de rosca hasta su uso. El producto utilizado se identificó como ABZ-FC. En nuestro país está aprobado comercialmente de acuerdo a la Disposición de ANMAT 8855 de fecha 26/10/15.

#### 1.3.2 Abarax®

Los comprimidos comerciales de BZL (Abarax® Laboratorios Elea) fueron gentilmente donados por el Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Salta (Argentina). Los comprimidos fueron pulverizados, tamizados, y la fracción de tamaño 420-210  $\mu\text{m}$  se utilizó

en los ensayos de la presente Tesis. El producto utilizado se identificó como BZL-FC. En nuestro país está aprobado comercialmente de acuerdo a la Disposición de ANMAT 5855 de fecha 04/10/12.

## Referencias

Amidon, G. L., et al. (1995). "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." Pharmaceutical research **12**(3): 413-420.

de la Nación, P., et al. "enfermedades infecciosas| Chagas."

Devi, D. R., et al. (2013). "Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy." J Pharm Sci Res **5**(8): 159-165.

Dumortier, G., et al. (2006). "A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics." Pharmaceutical research **23**(12): 2709-2728.

Farmacopea, A. (2012). Farmacopea Argentina 8va Edición. 2012. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Argentina [citado 14-05-2012].

García, M. C., et al. (2016). "Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental Chagas disease: In vivo and in vitro assessments." Antimicrobial Agents and Chemotherapy: AAC. 00404-00416.

Gutteridge, W. E. (1985). "Existing chemotherapy and its limitations." British Medical Bulletin **41**(2): 162-168.

Jesús, F. (1997). "Farmacología humana." Edición **3**: 1273.

Kabanov, A. V., et al. (2002). "Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." Journal of Controlled Release **82**(2-3): 189-212.

Kapoor, V., et al. (2003). "Medicinal significance of nitroimidazoles—some recent advances."

Karolewicz, B., et al. (2012). "Solid dispersions in pharmaceutical technology. Part I. Classification and methods to obtain solid dispersions." Polim. Med **42**(1): 17-27.

Maximiano, F. P., et al. (2010). "Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol." Quim. Nova **33**: 1714-1719.

Patterson, S. and S. Wyllie (2014). "Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects." Trends in Parasitology **30**(6): 289-298.

Rang, H. (2012). Farmacologia de Rang & Dale, Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil.

Rowe, R. C., et al. (2009). Handbook of pharmaceutical excipients, Pharmaceutical press London.

Srestha, N., et al. (2014). "A review on chemistry and biological significance of benzimidazole nucleus." IOSR J. Pharma **4**: 28-41.

Wisher, D. (2012). "Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed." Journal of the Medical Library Association : JMLA **100**(1): 75-76.

# CAPÍTULO 2: MÉTODOS

## 2. Métodos

### 2.1 Preparación de dispersiones sólidas por el método de fusión

Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis las DS de los diferentes fármacos con distinta proporción fármaco/portador fueron obtenidas por el método de fusión/solidificación. Este método consiste básicamente en calentar los componentes (fármaco y portador) hasta que se funden. La mezcla fundida luego endurece rápidamente mientras se agita vigorosamente a baja temperatura. La masa sólida formada se tritura, se pulveriza y luego se tamiza para estandarizar el tamaño de las partículas obtenidas (Karolewicz, Górnaiak et al. 2012).

En el método de fusión predominan dos consideraciones. En primer lugar, el fármaco debe ser lo suficientemente termoestable para no sufrir ninguna alteración debido a la acción de la temperatura, y segundo, el fármaco tiene que ser miscible en la matriz polimérica que se somete al proceso de fusión (la elección de los polímeros está, por supuesto, también limitada por la misma consideración respecto a termoestabilidad). Las principales ventajas de este método son su simplicidad, su bajo costo y, además, que no requiere ningún solvente. Un pre-requisito importante de este método es la miscibilidad del fármaco y el portador en el estado fundido para obtener una mezcla homogénea. Algunos portadores comúnmente empleados para preparar DS por el método de fusión son polietilenglicol (PEG) y Poloxamer (Jiménez de los Santos, Pérez-Martínez et al. 2017, Simonazzi, Cid et al. 2018, Simonazzi, Davies et al. 2018). El polímero fundido proporciona un medio en el que el fármaco se solubiliza o dispersa. Por lo tanto, además de mejorar el rendimiento (disolución y estabilidad) del producto, el polímero también sirve como un facilitador para su procesamiento. Existen algunos enfoques, como el parámetro de interacción, que permiten predecir si un determinado fármaco y polímero son miscibles o no. Sin embargo, no contienen información cuantitativa sobre cuánto de un fármaco es miscible o soluble en el polímero. Desde una perspectiva farmacéutica, esta información es de importancia para el desarrollo de una solución vítrea con la carga máxima de fármaco, pero evitando la recristalización del mismo debido a la sobresaturación dentro del polímero. Esto es de especial interés ya que las soluciones vítreas son un medio para mejorar la escasa solubilidad, de fármacos clase II y IV del SCB. El conocimiento de la solubilidad fármaco-polímero es ventajoso para la formulación y producción de soluciones



vítreas estables. Algunas características del polímero que deben considerarse para la fabricación de las DS por el método de fusión incluyen la viscosidad del polímero fundido, el punto de fusión/ $T_g$  y la miscibilidad/solubilidad. En este contexto, podemos mencionar:

- La *viscosidad del polímero fundido* determina el grado de miscibilidad con el fármaco, así como la eficiencia del proceso. Los polímeros con viscosidades bajas y alta conductividad térmica exhiben un proceso de fusión más eficiente. En contraste, si la viscosidad del polímero fundido es demasiado alta, puede limitar la miscibilidad entre el fármaco y el polímero.
- Teniendo en cuenta el punto de fusión, como regla general se puede establecer que la temperatura de procesamiento debe ser más baja que la temperatura de fusión del fármaco cristalino pero mayor que la temperatura de fusión o la  $T_g$  del polímero.
- Para formar un sistema monofásico, los dos componentes fundidos (fármaco y polímero) deben ser miscibles o dispersables (Shah, Sandhu et al. 2014).

Los tensioactivos como el P407 en las DS pueden desempeñar el papel de un portador, así como un dispersante y un agente emulsionante para el fármaco incorporado. Su presencia en la formulación asegura una mayor solubilidad del fármaco debido al aumento del área de contacto entre el fármaco y el solvente. Además, promueve que las moléculas del fármaco se dispersen y emulsionen, y como resultado se disuelvan rápidamente. El parámetro que debe tenerse en cuenta al elegir un surfactante como portador en las DS es su temperatura de fusión y la solubilidad del fármaco en el sistema (Karolewicz, Górnjak et al. 2012).

### 2.1.1 Preparación de dispersiones sólidas de albendazol utilizando Poloxamer 407 como portador.

Se prepararon cuatro DS en diferentes proporciones (5, 10, 25 y 50% p/p denominadas DS1, DS2, DS3 y DS4, respectivamente) mediante el método de fusión/solidificación (Tabla 2.1). Este método consiste en dispersar el fármaco homogéneamente en el polímero portador fundido a 63°C mediante agitación continua. Esta temperatura se seleccionó debido a que el punto de fusión del polímero es de aproximadamente 54°C, con lo cual aseguramos la fusión del mismo (el punto de fusión del fármaco es de 214°C), reduciendo de esta manera la temperatura del proceso de

obtención de la DS y logrando una dispersión homogénea del fármaco. Las preparaciones homogéneas resultantes se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido y luego se pulverizaron. La fracción de tamaño de partícula de 420-210  $\mu\text{m}$  se obtuvo por tamizado y se mantuvo en un vial de vidrio con tapón de rosca hasta su uso (Fig. 2.1).

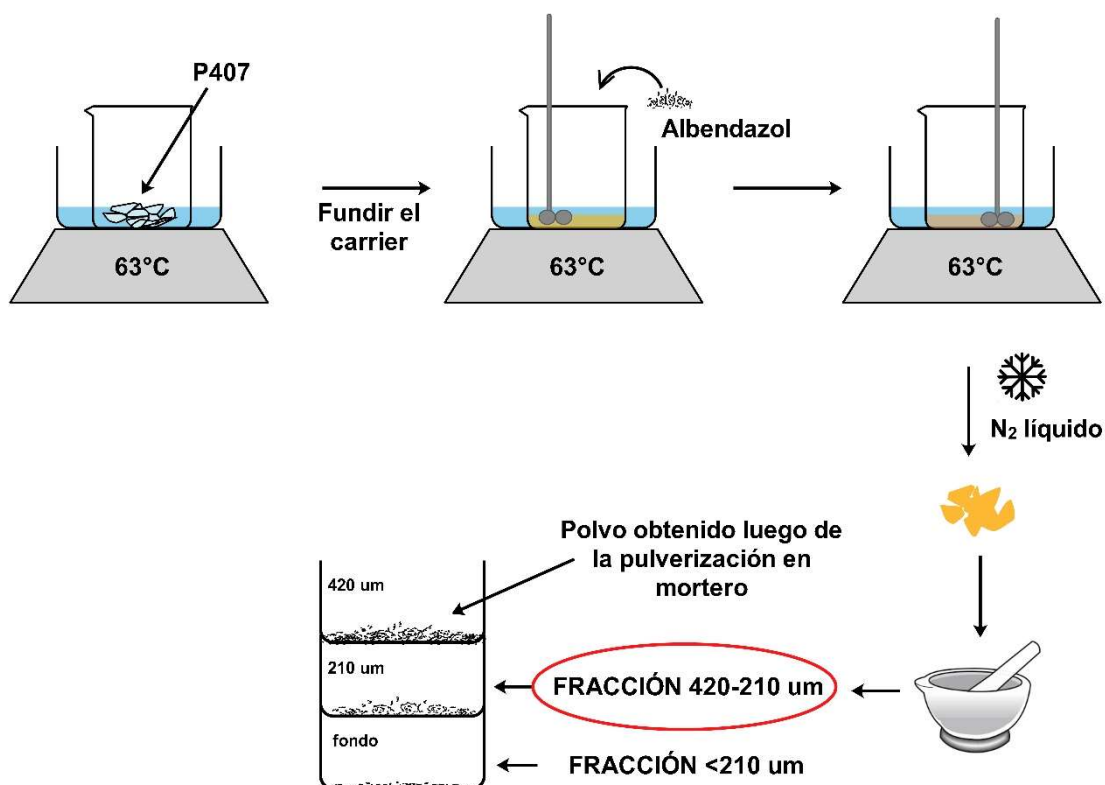


Figura 2.1. Método de preparación de dispersiones sólidas de albendazol.

También se prepararon mezclas físicas (MF) mezclando los componentes en las mismas proporciones (5, 10, 25 y 50% p/p de ABZ, denominadas MF1, MF2, MF3 y MF4, respectivamente), usando las fracciones de tamaño de partícula de 420-210  $\mu\text{m}$  de ABZ y P407 tamizados (Tabla 2.1). Los polvos se almacenaron en un vial con tapa de rosca hasta su uso.

**Tabla 2.1.** Proporción albendazol/poloxamer 407 utilizada en la obtención de las diferentes DS y MF.

Dispersión sólida	Mezclas física	% p/p	ABZ	P407
DS1	MF1	5	5	95
DS2	MF2	10	10	90
DS3	MF3	25	25	75
DS4	MF4	50	50	50

### 2.1.2 Preparación de dispersiones sólidas de Benznidazol utilizando Poloxamer 407 como portador.

Se prepararon cuatro DS en diferentes proporciones (5, 10, 20 y 32% p/p denominadas DS5, DS6, DS7 y DS8, respectivamente) mediante el método de fusión (Tabla 2.2) dispersando homogéneamente el BZL-e en el P407 fundido a 63°C, mediante agitación constante. Esta temperatura se seleccionó debido a que el punto de fusión del polímero es de aproximadamente 54°C, con lo cual aseguramos la fusión del mismo (el punto de fusión del fármaco es de 192°C), reduciendo de esta manera la temperatura del proceso de obtención de la DS y logrando una dispersión homogénea del fármaco. La mayor carga de fármaco en el vehículo que se pudo alcanzar mediante esta técnica fue de 32% p/p. La preparación homogénea resultante se enfrió rápidamente en nitrógeno líquido y luego se pulverizó. La fracción de tamaño de partícula de 420-210 µm se obtuvo mediante tamizado de modo similar a lo descrito en la Fig. 2.1., y se mantuvo en un vial de vidrio con tapón de rosca hasta su uso.

También se prepararon MF (denominadas MF5, MF6, MF7 y MF8, respectivamente) mezclando homogéneamente los componentes en la misma proporción, usando la fracción tamizada de tamaño de partícula de 420-210 µm de BZL-e y de P407. El polvo se almacenó en un vial con tapa de rosca hasta su uso.

**Tabla 2.2.** Proporción benznidazol/poloxamer 407 utilizada en la obtención de las diferentes DS y MF.

Dispersión sólida	Mezclas física	% p/p	BZL	P407
DS5	MF5	5	5	95
DS6	MF6	10	10	90
DS7	MF7	20	20	80
DS8	MF8	32	32	68

## 2.2 Caracterización de las dispersiones sólidas

Se aplicaron diferentes técnicas con el objetivo de realizar una caracterización de las DS:

- Físico-mecánica: propiedades de flujo como cálculo de ángulo de reposo, densidad a granel, densidad empaquetada, índice de Carr, índice de Hausner;
- Físico-química: mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), Espectroscopia Infrarroja (IR) y Difracción de Rayos X (D-RX).
- Biofarmacéutica: mediante los ensayos de disolución, solubilidad y saturación.

Además, se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la bioactividad de las DS y pruebas *in vivo* para estudiar la farmacocinética y distintos modelos de enfermedad.

Para realizar la caracterización de las DS en la mayoría de los ensayos se seleccionó la DS de mayor carga de fármaco porque de esta manera la forma farmacéutica final tendrá menor peso y tamaño.

### 2.2.1 Caracterización físico-mecánica

Comprender y controlar el comportamiento reológico de una sustancia pulverulenta puede ayudar a formular principios activos, a diseñar procesos más eficientes y, así, a conseguir la fabricación de productos de alta calidad, lo que es fundamental en la industria farmacéutica.

La fluidez se refiere a la facilidad con que un polvo fluirá bajo un conjunto específico de condiciones. Es un fenómeno complejo, que se refiere tanto a las propiedades físicas que afectan el flujo de polvo y el equipo requerido para su manipulación, almacenamiento y procesamiento. La fluidez del polvo es una propiedad esencial, que tiene un gran impacto en muchos procesos farmacéuticos, como en el proceso de mezcla, transferencia, almacenamiento, compresión y manipulación, así como en la calidad de las formas farmacéuticas (Felton 2013). Sin embargo, es muy difícil predecir la fluidez de los sólidos pulverulentos debido a que existen numerosos factores que afectan a las propiedades reológicas como ser el tamaño, forma y estructura de las partículas, porosidad,

granulometría y dureza de las mismas, y factores externos como ser la compactación, humedad, vibración, aireación, transporte, entre otros.

Los estudios de fluidez en la etapa de preformulación permiten conocer de forma cuantitativa las modificaciones debidas a la incorporación de cada nuevo componente y también sirven para orientar los tratamientos a efectuar con el fin de que el flujo sea óptimo (Vila Jato 2001).

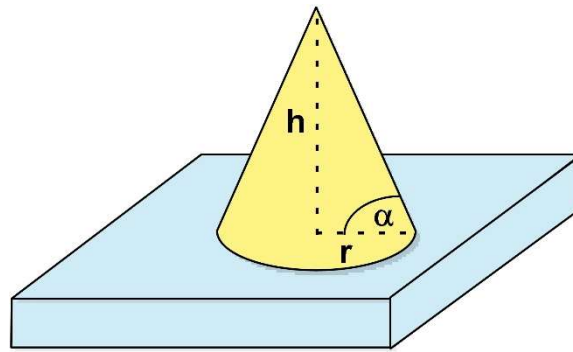
Existen diversos métodos para caracterizar el flujo de polvos. En general, no hay un método sencillo para caracterizar el flujo de polvos de manera adecuada y es posible emplear diferentes procedimientos que se caracterizan por suministrar información parcial acerca de las propiedades de flujo; es decir, con la aplicación de un único método no es posible definir globalmente el comportamiento reológico de un determinado producto (Vila Jato 2001, Lozano, Córdoba et al. 2012).

Algunos métodos de caracterización reológica de sólidos pulverulentos aplicados en este trabajo de Tesis son los siguientes:

### 2.2.2 Ángulo de reposo.

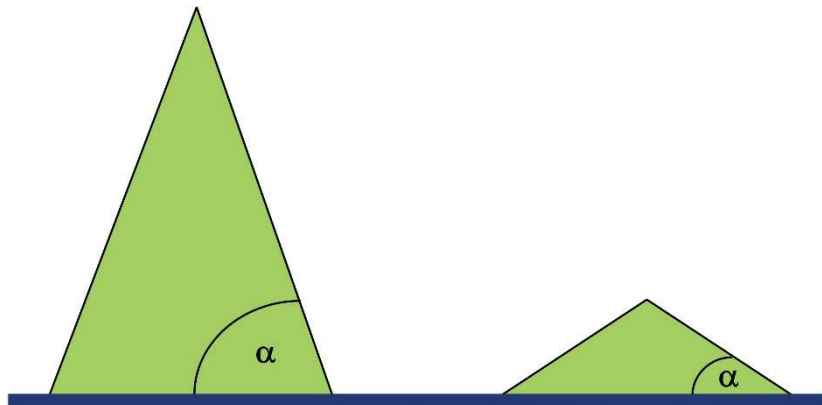
El ángulo de reposo se utiliza como método indirecto para cuantificar la fluidez de un sólido pulverulento debido a su relación con la cohesión y fricción entre las partículas. Sin embargo, las determinaciones del mismo tienden a ser variable y no siempre es representativo del flujo en determinadas condiciones. El ángulo de reposo constituye, junto con la densidad, una de las medidas más habituales para conocer la capacidad de flujo de los sólidos pulverulentos (Vila Jato 2001). El fundamento de este método es el siguiente: al dejar caer una determinada cantidad de sólido pulverulento sobre una superficie horizontal, se formará un cono cuyas dimensiones están relacionadas con las propiedades de flujo del material (Vila Jato 2001).

El ángulo de reposo se determina dejando caer el polvo y midiendo el ángulo formado entre la altura del cono del polvo ( $h$ ) y el plano horizontal ( $r$ ) (Fig. 2.2) (Aulton 2004).



*Figura 2.2.* Ángulo  $\alpha$  formado entre la altura del cono del polvo ( $h$ ) y el plano horizontal ( $r$ ).

Lógicamente, cuanto mejores sean las propiedades de flujo del sólido pulverulento; es decir, cuanto menor sea la intensidad de las fuerzas que impiden el desplazamiento entre las capas contiguas de partículas, menor será el valor del ángulo de reposo (Fig. 2.3).



*Figura 2.3.* Cuanto menor sea el ángulo de reposo, mayor será el flujo del material, y viceversa.

El ángulo de reposo se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{h}{r} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Donde  $h$  es la altura del cono formado por el sólido pulverulento (valor medio de varias medidas), y  $r$ , el radio de la base del cono (Fig. 2.3) (Vila Jato 2001).

El flujo libre del sólido pulverulento no sólo depende de la fuerza gravitacional a que está sometido, sino que también influyen sobre él las fuerzas derivadas de la fricción interparticular, por lo que existe una estrecha relación entre ángulo de reposo, flujo y forma de partícula. En general, se establece que los sólidos pulverulentos con un ángulo de reposo menor de 30° fluyen fácilmente, si el ángulo de reposo está comprendido entre 30° y 50° el flujo es difícil, y si el ángulo es mayor de 50° no hay flujo libre (Vila Jato 2001).

Las principales ventajas de los métodos angulares son su sencillez y el hecho de que no requieren equipos sofisticados para su aplicación. Al lado de estas ventajas presentan toda una serie de inconvenientes. La primera limitación se refiere a que son métodos útiles solamente para sólidos poco cohesivos, ya que para su evaluación es necesario que el producto adopte una forma cónica, para lo cual es imprescindible que fluya adecuadamente. En caso contrario, es decir, si el polvo es muy cohesivo, cabe la posibilidad de que no se forme un cono perfectamente definido, con lo que resulta problemático asignar un valor de ángulo de reposo. Otra limitación importante de los métodos angulares es su falta de reproducibilidad. El origen de este problema reside en la clara influencia de las condiciones experimentales sobre los resultados obtenidos (Vila Jato 2001).

**Procedimiento:** Se dejó caer el polvo sobre una base de diámetro conocido, a través del orificio de un embudo ubicado a una altura determinada (Fig. 2.4). El ángulo de reposo se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$\alpha = \arctg \frac{h}{r} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

El valor obtenido del ángulo de reposo corresponde al promedio de 8 mediciones.

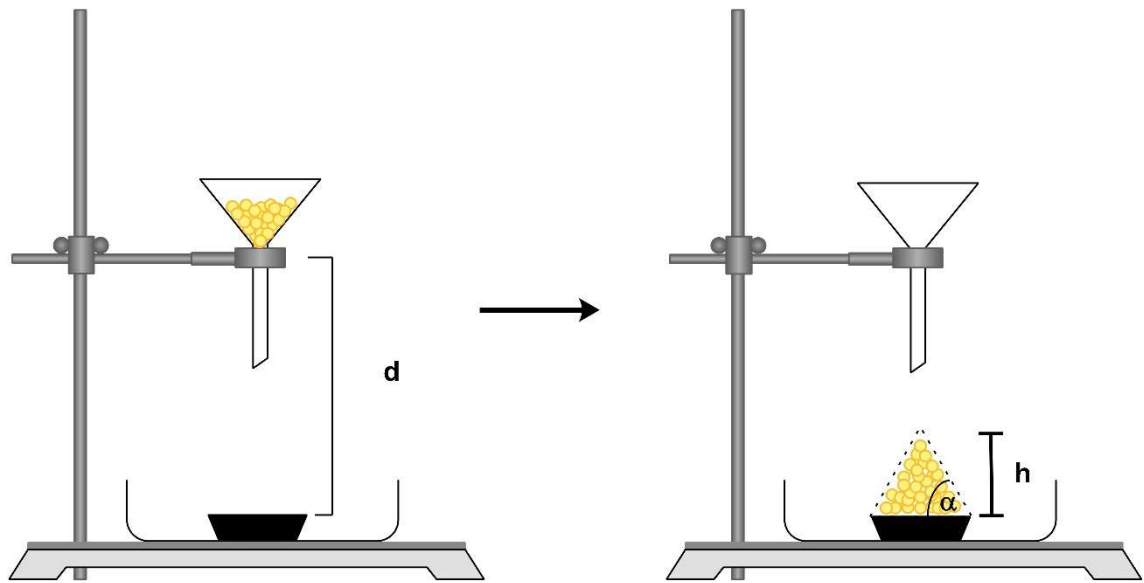


Figura 2.4. Procedimiento para determinar el ángulo de reposo.

### 2.2.1.2 Medición de densidad de polvos.

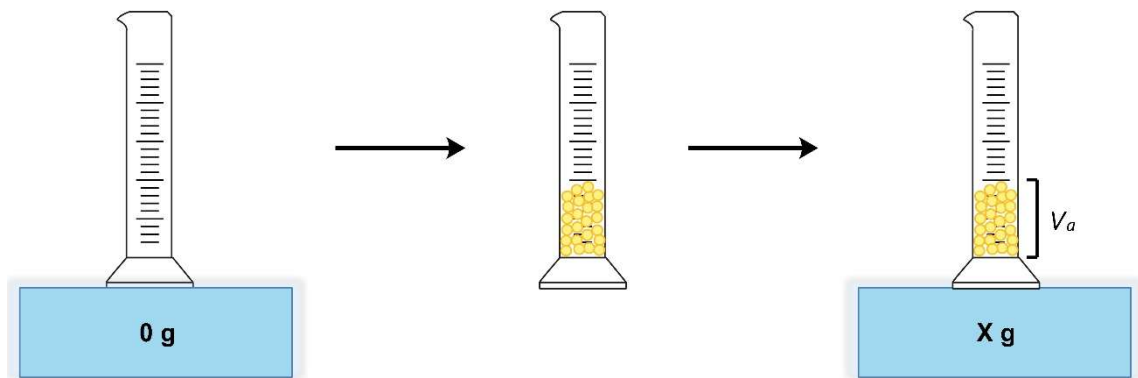
La densidad se define como la relación entre la masa y el volumen que ocupa dicha masa. Sin embargo, para la mayoría de los sólidos pulverulentos esta propiedad puede ser un parámetro variable que depende de la forma y tamaño de las partículas, así como de su capacidad de empaquetamiento. El grado de empaquetamiento se ve afectado por la vibración, el confinamiento y la consolidación. Las partículas se pueden agrupar de diferentes formas, dependiendo de su forma, tamaño y de los puntos de contacto entre ellas. Una densidad constante indicaría que el comportamiento del flujo es independiente de cómo se maneje el material. Para caracterizar este comportamiento se obtienen dos tipos de densidades: densidad aparente y densidad empaquetada (Lozano, Córdoba et al. 2012).

- a) Densidad aparente ( $\delta_0$ ): se define como la relación existente entre una cantidad determinada del sólido pulverulento y el volumen aparente que ocupa dicha cantidad. El volumen aparente incluye los espacios que existen entre las partículas y las burbujas de aire que existen entre estas. El volumen del sólido pulverulento viene determinado, fundamentalmente, por el tamaño, forma y textura de las partículas, las películas que las rodean (gases) y la presencia de cargas electrostáticas (Vila Jato 2001, Lozano, Córdoba et. al. 2012).



**Procedimiento:** Se colocó el polvo bajo estudio suavemente en el interior de un recipiente calibrado (probeta) previamente tarado y se pesó para determinar el peso del polvo (Fig. 2.5). La densidad se calculó como la relación entre el peso del polvo ( $m$ ) y el volumen ocupado ( $V_a$ ).

$$\delta a = m/V_a \quad (\text{Ecuación 2.3})$$



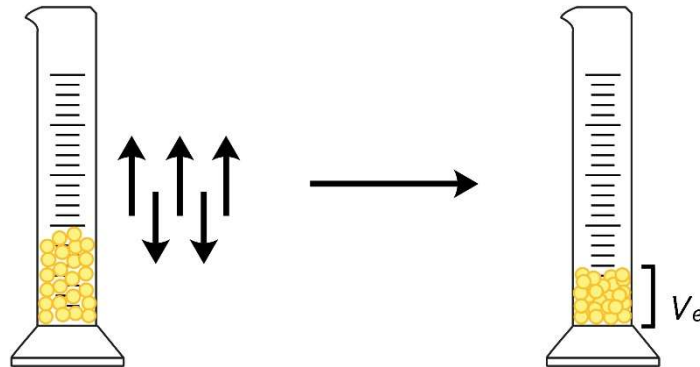
**Figura 2.5.** Determinación de densidad aparente.

- b) Densidad empaquetada ( $\delta_e$ ): este parámetro es una extensión de la densidad aparente. Con el tiempo, y debido a las vibraciones a que se ve sometido el sólido pulverulento durante el procesado y transporte, el volumen puede modificarse significativamente; por ello, debe realizarse una prueba que determine la relación entre los volúmenes del sólido pulverulento aireado y vibrado, con objeto de prevenir modificaciones importantes en el volumen, lo que reviste especial importancia en el momento de seleccionar la capacidad de la matriz que debe ser llenada para la compresión (Vila Jato 2001). La densidad empaquetada puede ser definida como la densidad del material particulado luego de ser sometido a sucesivos impactos suaves. Aquellos sólidos cuyas partículas dieron lugar a espacios vacíos grandes entre ellas, se van a compactar más que aquellos sólidos con partículas pequeñas que producen un empaquetamiento más cerrado.

**Procedimiento:** El recipiente calibrado con el polvo en su interior se sometió a una serie de suaves impactos verticales hasta que el volumen final ocupado por el polvo no presentó

variaciones (Fig. 2.6). La densidad se calculó como la relación entre el peso del polvo ( $m$ ) y el volumen ocupado después de los impactos ( $V_e$ ).

$$\delta e = m/V_e \quad (\text{Ecuación 2.4})$$



*Figura 2.6. Determinación de densidad empaquetada.*

La densidad aparente de un polvo no es un número definido como lo es la densidad real, pero sí es una medida indirecta que depende de muchos factores, como el tamaño, la forma y la distribución de partícula. Se utilizan principalmente dos parámetros para definir la relación entre estas densidades: el índice de Carr y el índice de Hausner.

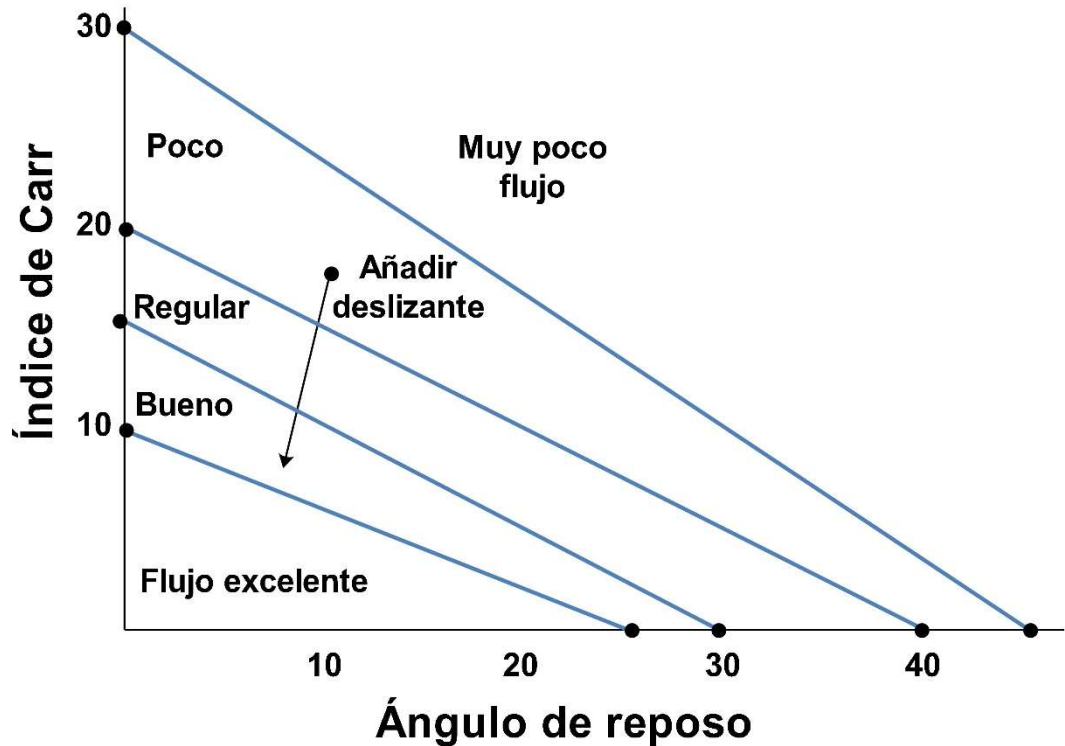
### 2.2.1.3 Índice de Carr o de compresibilidad ( $IC$ ).

Es un método indirecto para medir el flujo de polvo relacionado con la fuerza de cohesión y el tamaño de las partículas. El índice de compresibilidad es la relación entre densidades aparente y empaquetada. Cuanto mayor sea la diferencia, mayor será la tendencia del material a empaquetarse y peor será el flujo. El  $IC$  se calcula matemáticamente mediante la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{(\delta e - \delta a)}{\delta e} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Donde  $\delta_e$  es la densidad empaquetada y  $\delta_a$  la densidad aparente.

La Fig. 2.7 muestra la relación gráfica entre los valores de  $IC$  y los de ángulo de reposo, indicativos de la fluidez del material (Jato 2001, Lozano, Córdoba et al. 2012).



*Figura 2.7. Relación entre el índice de Carr y el ángulo de reposo para diferentes comportamientos reológicos de los lechos de partículas.*

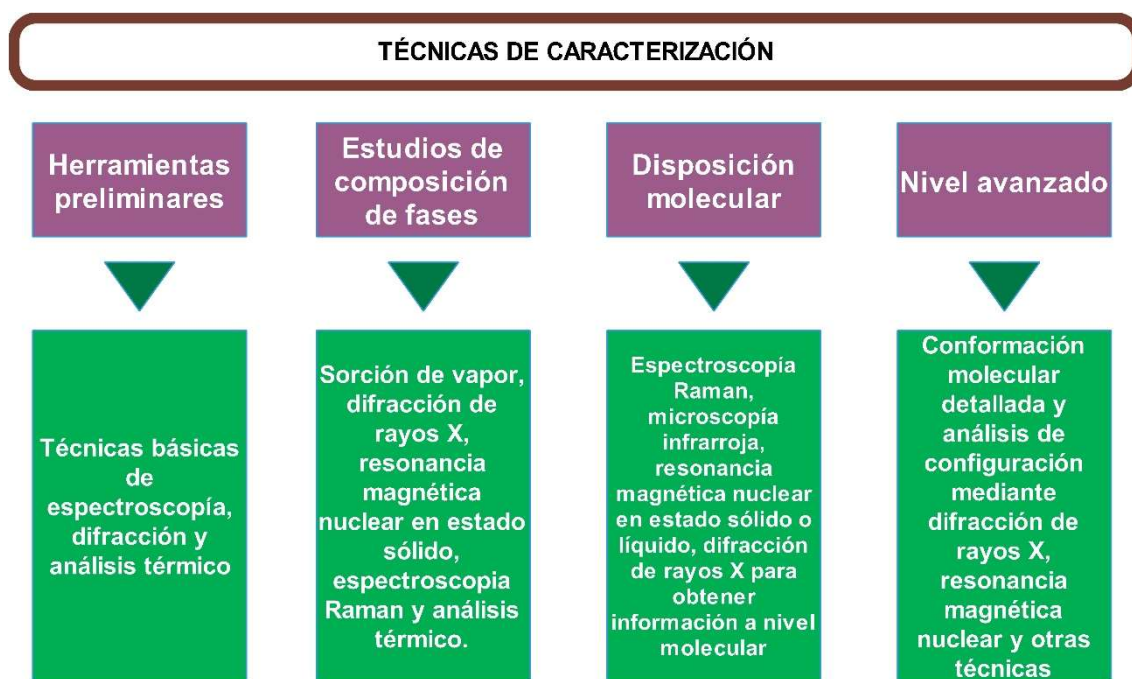
#### 2.2.1.4 Índice de Hausner ( $IH$ )

El cociente  $\delta_e/\delta_a$  está relacionado con la fricción entre las partículas, por lo que podría utilizarse para predecir las propiedades de flujo del polvo (Aulton 2004). El  $IH$  se define como la relación existente entre la densidad empaquetada y la aparente. Este índice relaciona las condiciones de fricción inter-partícula durante el movimiento de la masa de polvo y la cohesividad del material en relación con su fluidez. En un material poco cohesivo apenas se verá modificada su densidad con el empaquetamiento y el  $IH$  se aproximará a 1. Como norma general, valores de  $IH$  superiores a 1,5 son indicativos de fluidez deficiente (Lozano, Córdoba et al. 2012). Matemáticamente se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$IH = \delta e / \delta a \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

## 2.2.2 Caracterización físico-química

El objetivo principal de la caracterización de DS es detectar la presencia de formas cristalinas que pueden alterar la BD del fármaco. Estas formas cristalinas se pueden formar durante el proceso de formulación o durante el almacenamiento de la preparación. Se pueden usar varias técnicas de caracterización para determinar los factores que inducen este fenómeno, ayudando así a prevenir esta cristalización (Fig. 2.8) (Baghel, Cathcart et al. 2016).



*Figura 2.8. Herramientas de caracterización de estado sólido para dispersiones sólidas poliméricas.*

Algunos de los métodos utilizados para la caracterización de las DS obtenidas se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Técnicas de caracterización de las dispersiones sólidas

Estado amorfo/cristalino	Calorimetría diferencial de barrido Difracción de rayos X
Interacción fármaco-portador	Calorimetría diferencial de barrido Espectroscopia Infrarroja
Miscibilidad fármaco-portador	Calorimetría diferencial de barrido Difracción de rayos X
Estructuras físicas/morfología superficial	Microscopía electrónica de barrido
Estabilidad	Estudios de solubilidad de saturación

### 2.2.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el desarrollo del presente trabajo de Tesis se utilizó un microscopio electrónico de barrido que permitió crear una imagen ampliada de la superficie de las distintas muestras. Esta técnica proporciona información primaria del sistema sobre la naturaleza amorfa o cristalina de las DS y además se utiliza para determinar la morfología externa de la muestra. La desaparición de grandes cristales de fármaco indica disminución de la cristalinidad o conversión a forma amorfa.

**Procedimiento:** Las muestras se metalizaron con oro (Denton Vacuum metalizer, LLC, Desk-IV) y se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6480LV, Japón).

### 2.2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El principio básico de los enfoques analíticos térmicos son los cambios dinámicos en las propiedades del estado sólido del material debido a procesos de calentamiento o enfriamiento. La CDB es la técnica termoanalítica más comúnmente utilizada para la caracterización de DS. Proporciona información precisa sobre el punto de fusión, la temperatura de transición vítrea y los cambios de energía asociados con las transiciones de fase, incluidos los procesos de cristalización y fusión. La falta de un pico de fusión del fármaco en el termograma de la CDB de una DS es indicativo que el fármaco existe en forma amorfa. En esta técnica la endoterma de transición vítrea, la exoterma de cristalización y la endoterma de fusión también se pueden cuantificar y utilizar para calcular el grado de cristalinidad (Vo, Park et al. 2013). La CDB se utiliza como técnica de detección primaria para evaluar formulaciones de DS.

Con los termogramas obtenidos por esta técnica se puede detectar la temperatura a la que ocurren los diferentes eventos térmicos. Se obtuvieron termogramas de las muestras usando un equipo Q200 (TA-instruments) provisto con software específico TA Universal Analysis.

**Procedimiento:** Las muestras fueron pesadas con precisión y colocadas y selladas en recipientes herméticos de aluminio. Fue utilizada una rampa de calentamiento de 10°C/min bajo purga constante de nitrógeno seco (20ml/min). Un recipiente de aluminio hermético vacío, sellado en la misma forma que la muestra, fue utilizado como referencia.

### 2.2.2.3 Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (TF-IR).

La espectroscopia infrarroja (IR) es de gran importancia en análisis de fármacos porque puede aplicarse como técnica analítica cualitativa y cuantitativa, siendo la primera la de mayor aplicación. Puede detectar grupos funcionales cuya presencia sería imposible de determinar por ensayos químicos convencionales.

El espectro IR de una sustancia es característico de ella, por lo tanto la técnica de IR resulta útil para determinar la identidad de una sustancia. La frecuencia de cada banda del espectro de vibración-rotación molecular depende de la constante de fuerza de cada enlace intraatómico, por ello es que el espectro de absorción en una determinada región del IR depende del conjunto de enlaces que constituyen la estructura molecular y es distintivo y característico de cada molécula. A través de esta técnica es posible relacionar las frecuencias de ciertas bandas de absorción en IR con la presencia de determinados enlaces o grupos funcionales en la molécula (Valls, García et al. 2003).

Con el fin de identificar interacciones en los sistemas bajo estudio se realizaron estudios de TF-IR utilizando un espectrofotómetro Spectrum GX-Perkin Elmer en la región 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

**Procedimiento:** para realizar las mediciones, se utilizó como soporte de las muestras bromuro de potasio (grado espectroscópico) y se comprimieron en discos de 10 mm usando una prensa hidráulica con punzones planos.

#### 2.2.2.4 Difracción de rayos X (D-RX).

Es el método más utilizado para identificar y caracterizar el estado cristalino de los fármacos en DS. Se utiliza para determinar cualitativamente el material. El fármaco puro presenta picos agudos, muy intensos y menos difusos que indican su naturaleza cristalina. La falta de picos agudos en los difractogramas de DS indica que el fármaco se encuentra en forma amorfa en las dispersiones (Vo, Park et al. 2013).

Las muestras se analizaron por difracción de rayos X utilizando un difractómetro DRX Philips PW1800. Los ensayos se realizaron a 40 KV y 30 mA en un rango de 5-70 ° 2θ a una velocidad de 0,02 ° 2θ /s.

### 2.2.3 Estudios de solubilidad y saturación

#### 2.2.3.1 Estudio de solubilidad de fases.

**Procedimiento:** Para realizar este estudio se siguió el método descrito por Higuchi y Connors (Higuchi 1965). Para llevar a cabo el estudio al fármaco ABZ, se añadió un exceso del mismo a 5 ml de HCl 0,1 N con concentraciones crecientes de P407 (1, 3, 5, 10 y 15% p/v) en tubos de vidrio con tapa a rosca. Luego se colocaron en un baño de agua con agitación a temperatura ambiente durante 96 horas para alcanzar el equilibrio de solubilidad. Las suspensiones obtenidas se filtraron a través de una membrana de éster de celulosa mixta de 0,45 μm. Se determinó espectrofotométricamente la concentración de ABZ a  $\lambda = 302$  nm, usando la curva de calibración correspondiente construida con soluciones estándar de ABZ en HCl 0,1 N por triplicado.

Para realizar los estudios de solubilidad de fase a 25°C y 37°C para el BZL, se añadió un exceso de BZL-e a 5 ml de HCl 0,1 N con concentraciones crecientes de P407 (5, 10, 15 y 20% p/v) en tubos de vidrio con tapa a rosca. Se colocaron en un baño de agua con agitación a una temperatura predeterminada durante 96 horas para alcanzar el equilibrio de solubilidad. Después, las suspensiones se filtraron y se realizó el análisis espectrofotométrico a  $\lambda = 324$  nm. La concentración de BZL se calculó usando la curva de calibración correspondiente realizada con soluciones estándar de diferente concentración de BZL en HCl 0,1 N por triplicado.

### 2.2.3.2 Estudio de solubilidad en saturación

**Procedimiento:** Para los estudios de solubilidad en saturación, se añadió una cantidad en exceso de ABZ, de todas las DS y de las correspondientes MF en tubos de vidrio con tapa a rosca con 10 ml de HCl 0,1 N. Se mantuvieron en un baño de agua con agitación a 37°C durante 4 días. Después, las muestras se filtraron a través de una membrana de éster de celulosa mixta de 0,45 µm, y el filtrado se analizó espectrofotométricamente a 302 nm para determinar la concentración de ABZ.

Para los estudios de solubilidad de saturación de BZL, se colocaron cantidades en exceso de BZL-e, de la DS8 y la MF8 correspondiente, en tubos de vidrio con tapa a rosca con 5 ml de HCl 0,1 N, para alcanzar la misma cantidad de BZL en todas las muestras. Se mantuvieron en un baño de agua con agitación a 25°C y 37°C durante 4 días. Después, las muestras se filtraron y se analizaron espectrofotométricamente a 324 nm para determinar la concentración de BZL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 2.3 Caracterización biofarmacéutica

### 2.3.1 Ensayos de disolución

La velocidad a la que los principios activos poco solubles en agua se disuelven en el tracto gastrointestinal a partir de la forma farmacéutica se correlaciona con su velocidad de absorción sistémica. Es por ello que el ensayo de disolución es la prueba *in vitro* de elección para estudiar el comportamiento que tendrán los fármacos *in vivo*, y se ha convertido en un requisito farmacopeico y regulatorio para la evaluación de formas farmacéuticas. Este ensayo se emplea para determinar el comportamiento de la disolución de los principios activos contenidos en una forma farmacéutica sólida de uso oral, estableciendo un criterio de evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas del producto.

Existen distintos equipos codificados en libros oficiales para realizar este tipo de estudio. De manera general, consisten en un vaso de vidrio esférico de 1 L de capacidad que se encuentra inmerso en un baño termostático a 37°C. Además, contienen un vástago que en su extremo inferior presenta un canastillo (Aparato 1) o una Paleta (Aparato 2) que permite mantener la velocidad de agitación constante durante todo el experimento. El aparato que se utiliza para el ensayo corresponde al aparato 2 según Farmacopea (Fig. 2.9).



## APARATO 2

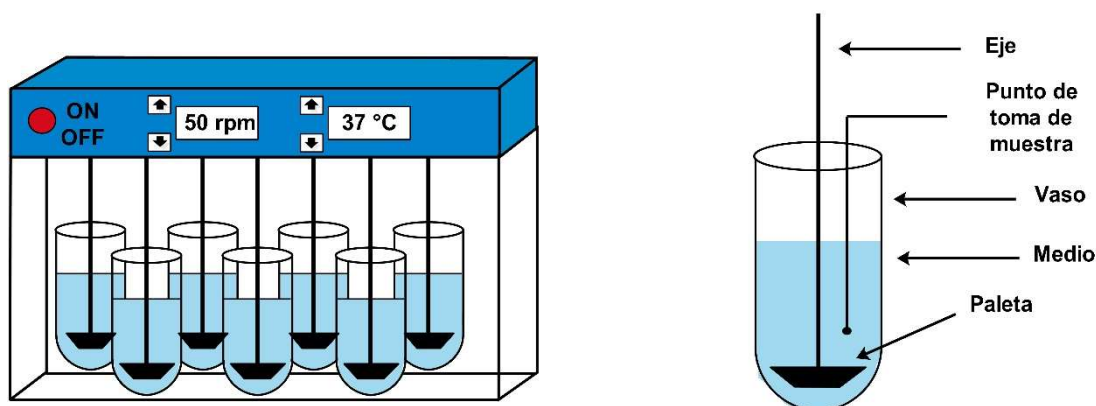


Figura 2.9. Aparato 2 de disolución.

Consta de un vaso transparente provisto de una tapa, construido de vidrio u otro material inerte, un eje metálico y una paleta. El vaso debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua que permita mantener la temperatura dentro del vaso a  $37,0 \pm 0,5$  °C durante el ensayo. Ninguna parte del aparato, ni el área donde está instalado, debe producir movimiento significativo, agitación o vibración más allá de la debida al elemento de agitación. El vaso es cilíndrico con fondo semiesférico y puede tener una tapa para retardar la evaporación. La paleta se coloca de tal modo que su eje vertical no se separe más de 2 mm, en cualquier punto, del eje vertical del vaso y rote sin desviarse significativamente. El aparato posee, además, un dispositivo que permite seleccionar la velocidad de rotación de los ejes y mantenerla dentro de  $\pm 4$  %. El medio de disolución fue HCl 0,1 N. El volumen empleado fue de 900 ml. Los gases disueltos pueden producir burbujas que pueden modificar los resultados del ensayo. En esos casos los mismos fueron eliminados antes del ensayo mediante filtración al vacío (Farmacopea 2012).

**Procedimiento:** Los ensayos de disolución de los fármacos (ABZ y BZL-e), y las dispersiones sólidas (DS1, DS2, DS3 y DS4 de ABZ y la DS8 de BZL), las MF (MF1, MF2, MF3 y MF4 de ABZ y la MF8 de BZL) y las formulaciones comerciales (ABZ-FC y BZL-FC) se realizaron usando un aparato de disolución USPXXIV 2 (SOTAX AT 7 smart) a  $37 \pm 0,5$ °C y bajo agitación a 50 rpm. Se pesó con precisión la cantidad necesaria de muestras en polvo que tenían 50 mg de ABZ y 100 mg de BZL respectivamente. Estas muestras se añadieron a 900

ml de HCl 0,1 N filtrado y desgasificado utilizado como medio de disolución. A intervalos de tiempo predeterminados, se extrajeron cuatro mililitros de alícuotas filtradas y se sustituyeron por medio nuevo para mantener constante el volumen. La concentración de fármaco disuelto se determinó espectrofotométricamente. Los datos de disolución fueron analizados de acuerdo a un modelo matemático desarrollado por nuestro grupo de investigación. El modelo matemático denominado "*Lumped*" se describe en detalle en la siguiente sección.

### 2.3.2 Interpretación de los datos del ensayo de disolución. Modelado matemático

El modelo matemático "*Lumped*" propuesto está basado en una cinética de segundo orden. Este modelo describe satisfactoriamente los procesos en los que están presentes los fenómenos de difusión y transferencia al medio de disolución, o cuando solo existe una transferencia externa a un medio fluido en el que la concentración del fármaco aumenta constantemente. El modelo "*Lumped*" (Fernández-Colino, Bermudez et al. 2016, Romero, Bermudez et al. 2016, Romero, Villegas et al. 2017) se representa mediante la Ecuación 2.7:

$$M\% = \frac{a \times t}{1 + b \times t} \quad (\text{Ecuación 2.7}).$$

Donde  $M\%$  es el porcentaje de fármaco disuelto en el tiempo  $t$ , y los parámetros  $a$  y  $b$  se dan en  $(\% \text{ min}^{-1})$  y  $(\text{min}^{-1})$ , respectivamente.

El valor del parámetro  $a$  es la velocidad de disolución inicial ( $VDI$ ), ya que la velocidad de disolución en cualquier momento viene dada por:

$$\frac{dM\%}{dt} = \frac{a}{(1 + b \times t)^2} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

de este modo, cuando  $t = 0$ , la  $VDI$  es:

$$VDI = \left. \frac{dM\%}{dt} \right|_{t=0} = a \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

El parámetro  $a$  es importante ya que la mejora en la velocidad de disolución inicial de las DS también desempeñaría un papel fundamental en el aumento de la biodisponibilidad del fármaco. El parámetro  $b$  es un parámetro de ajuste del modelo.

El *modelo Lumped* permite calcular otros parámetros de relevancia farmacéutica interesantes, como ser  $t_{Xmin}$ ,  $t_{X\%}$ ,  $t_{80\%}$ . Mientras que  $t_{Xmin}$  corresponde al porcentaje de fármaco disuelto en un momento dado,  $t_{X\%}$  es el tiempo necesario para disolver un cierto porcentaje de fármaco (Ec. 2.10). Por ejemplo, el  $t_{80\%}$  es el tiempo necesario para alcanzar un 80% de fármaco disuelto. Este valor se puede usar como un límite de aceptación, de acuerdo con varias Farmacopeas (Costa and Lobo 2001) para considerar que estamos en presencia de un sistema de liberación inmediata de fármaco, si dicho valor es inferior a 45 min.

$$t_{X\%} = \frac{X\%}{(a-b \times X\%)} \quad (\text{Ecuación 2.10})$$

Por otro lado, la eficiencia de disolución ( $ED$ ) se define como la relación entre el área bajo la curva del perfil de disolución hasta un cierto tiempo  $t_F$  y el área del rectángulo correspondiente al 100% disuelto al mismo tiempo. La importancia de la  $ED$  reside en considerar tanto la cantidad disuelta como la velocidad de disolución. Usando este modelo, la  $ED$  para un tiempo final  $t_F$ , viene dado por:

$$ED = \frac{\int_0^{t_F} M\% dt}{100 \times t_F} = \frac{\frac{a}{b^2} [b \times t_F - \ln(1 + b \times t_F)]}{100 \times t_F} \quad (\text{Ecuación 2.11})$$

Por otra parte, para comparar los perfiles de disolución entre las DS con diferentes proporciones de fármaco/portador, se utilizan métodos de análisis estadísticos

independientes (Costa and Lobo 2001). Los procedimientos por pares incluyen los factores de diferencia y similitud ( $f_1$  y  $f_2$ , respectivamente) (Moore, Croy et al. 2000, Mathur, Nagpal et al. 2013, Diaz, Colgan et al. 2016). El primero de ellos describe el error entre dos curvas de disolución sobre todos los puntos de tiempo, y se define como:

$$f_1 = \frac{\sum_1^n |R_i - D_i|}{\sum_1^n R_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

Donde  $R_i$  y  $D_i$  son el porcentaje disuelto de la referencia y la muestra de prueba en cada punto de tiempo  $i$ , y  $n$  es el número de muestras experimentales. Este porcentaje es igual a cero cuando los perfiles de la muestra de prueba y la referencia son iguales.

Por otro lado,  $f_2$  se define como la transformación logarítmica de la sumatoria de las diferencias entre la muestra de prueba y la experimental al cuadrado en todos los puntos de tiempo:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_1^n (R_i - D_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

El "Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos" (FDA, EEUU) y la "Unidad de Evaluación de Medicina Humana de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales" han establecido como un criterio para considerar dos perfiles de disolución similares, valores de  $f_1$  inferior a 15 (0-15) y de  $f_2$  superior a 50 (50-100).

Los métodos de análisis estadísticos independientes también incluyen pruebas de relación entre parámetros obtenidos a partir de los ensayos de disolución de diferentes formulaciones. Entre estos parámetros, el valor del tiempo medio de disolución ( $TMD$ ) es uno de los más utilizados (Ec. 2.14).

$$TMD_{X\%} = \frac{\sum_{j=1}^n t_{jm} \times \Delta M\%}{\sum_{j=1}^n \Delta M\%} \quad (\text{Ecuación 2.14})$$

Donde  $t_{jm} = (t_j + t_{j-1})/2$  es el tiempo medio entre dos muestras y  $\Delta M\%$  es la cantidad adicional de fármaco liberado entre  $t_j$  y  $t_{j-1}$ .  $TMD_{X\%}$  se puede calcular como:

$$TMD_{X\%} = \frac{\int_0^{M\%_j} t \times dM\%_j}{\int_0^{M\%_j} dM\%_j} \quad (\text{Ecuación 2.15})$$

Considerando la ecuación 2.8:

$$TMD_{X\%} = \frac{\int_0^{t_{X\%}} \frac{a \times t}{(1+b \times t)^2} dt}{M\%(t_{X\%})} \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

Finalmente:

$$TMD_{X\%} = \frac{a}{b^2} \frac{\left[ \ln(1+b \times t_{X\%}) - \frac{b \times t_{X\%}}{(1+b \times t_{X\%})} \right]}{M\%(t)} \quad (\text{Ecuación 2.17})$$

$M\%(t_{X\%})$  es el porcentaje de fármaco acumulado en  $t = t_{X\%}$ , y el valor de  $t_x$  se obtiene de la Ecuación 2.10.

Finalmente, es importante enfatizar que los estudios de solubilidad y disolución *in vitro* representan un vínculo importante entre el diseño de la formulación y su bioperformance. Esto es especialmente cierto en el caso de formulaciones sobresaturadas como las DS desarrolladas y evaluadas en este trabajo.

## 2.4 Pruebas *in vitro*: ensayos de bioactividad

Los ensayos *in vitro* para determinar la  $CI_{50}$ , es decir, medir la potencia de las DS para inhibir una función biológica o bioquímica específica, se llevaron a cabo en conjunto con la Dra. Carolina Davies perteneciente al Instituto de Patología Experimental (IPE).

Para evaluar el efecto de la DS de BZL preparada (DS8) sobre la viabilidad del parásito, se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de los linajes de menor y mayor prevalencia en el norte argentino (TcI y TcV respectivamente) (Monje-Rumi, Brandán et al. 2015) y la cepa de referencia Tulahuén (TcVI) (Zingales, Andrade et al. 2009), amablemente otorgada por el Dr. Walter Rivarola (Departamento de Física Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Argentina). Los epimastigotes se cultivaron en condiciones estándar a 28°C en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% de penicilina-estreptomicina.

La viabilidad de los epimastigotes se determinó mediante un ensayo colorimétrico usando bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT). El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que al ser reducido por las mitocondrias de células vivas produce cristales de formazán de color violeta. El color púrpura final se puede detectar espectrofotométricamente a 570 nm (Mosmann 1983, Berridge and Tan 1993). Se siguió un protocolo modificado para epimastigotes de *T. cruzi*, añadiendo metosulfato de fenazina (phenazine methosulphate, PMS, 0,22 mg por ml de MTT) a la solución de MTT. El PMS es un transportador intermedio de electrones que disminuye el tiempo de incubación para obtener los cristales de formazán purpúreos (Muelas-Serrano, Nogal-Ruiz et al. 2000).

**Procedimiento:** se llevaron a cabo diluciones en serie 1:2 de BZL-e o DS8 en placas de 96 pocillos (Fig. 2.10). El BZL-e se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) en concentración 1 M; mientras que la DS8 se disolvió en H<sub>2</sub>O estéril a 15,4 mM. Tanto BZL-e como la DS8 se diluyeron en medio LIT a 4 mM, comenzando el ensayo a 2 mM. Los parásitos se sembraron a  $4 \times 10^7$  células/ml en un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo. Después de 48 horas, se añadieron 20  $\mu$ l de MTT con PMS a cada pocillo, seguido de 30 min de incubación a 28°C. La reacción de MTT se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de solubilizador (dodecilsulfato sódico al 10%, dimetilformamida al 45%, pH 4,5 en ácido acético) (Wilmes, Bargh et al.

2007). Las placas se leyeron en un lector de placas Tecan a 570 nm. Los ensayos se repitieron 3 veces y cada concentración por duplicado.



*Figura 2.10. Esquema del armado de la placa de 96 pocillos.*

## 2.5 Estudios *in vivo*

### 2.5.1 Ensayos farmacocinéticos en ratones

Para que un fármaco produzca un efecto terapéutico, debe alcanzar un intervalo preciso de concentraciones en el sitio de acción. Debajo de este intervalo, no se observará ningún efecto farmacológico y por encima de este, pueden aparecer efectos tóxicos o no deseados. La concentración que un fármaco alcanza en su lugar de acción dependerá de los siguientes procesos:

- a) Liberación: proceso por el cual el fármaco, con una velocidad determinada, abandona la forma farmacéutica.
- b) Absorción: definida como la entrada del fármaco en el organismo mediante un proceso de permeación a través de las membranas biológicas especializadas. Para que este paso se lleve a cabo el fármaco debe estar disuelto en los fluidos biológicos.
- c) Distribución: una vez que el fármaco se absorbe, ingresa en la circulación sistémica y es distribuido hacia los tejidos. Generalmente, una fracción del fármaco se fija a proteínas del

plasma y solo las moléculas libres difunden hacia los tejidos siendo esta responsable del efecto terapéutico.

d) Eliminación: finalmente, el fármaco es eliminado del organismo, para lo cual, generalmente es metabolizado a nivel hepático a un compuesto más polar que luego es excretado por bilis, orina, etc. En algunos casos, este proceso puede producir metabolitos activos cuya presencia también deberá tenerse en cuenta.

La intensidad de los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación varían con el tiempo. Por este motivo, la cantidad de fármaco presente en el organismo no permanece estática, sino que se presenta como un parámetro variable. Por lo tanto, se hace necesario tener conocimiento de estos procesos como así también, de los factores que los alteran para poder realizar una adecuada selección de la forma farmacéutica, la vía de administración, la dosis y la pauta de administración, para conseguir la máxima eficacia con el menor riesgo para el paciente.

Entonces, la actividad de un fármaco depende de una secuencia de eventos fisicoquímicos que comienzan cuando la molécula bioactiva ingresa al organismo y culmina cuando dicha molécula alcanza su sitio de acción y desencadena la respuesta biológica adecuada.

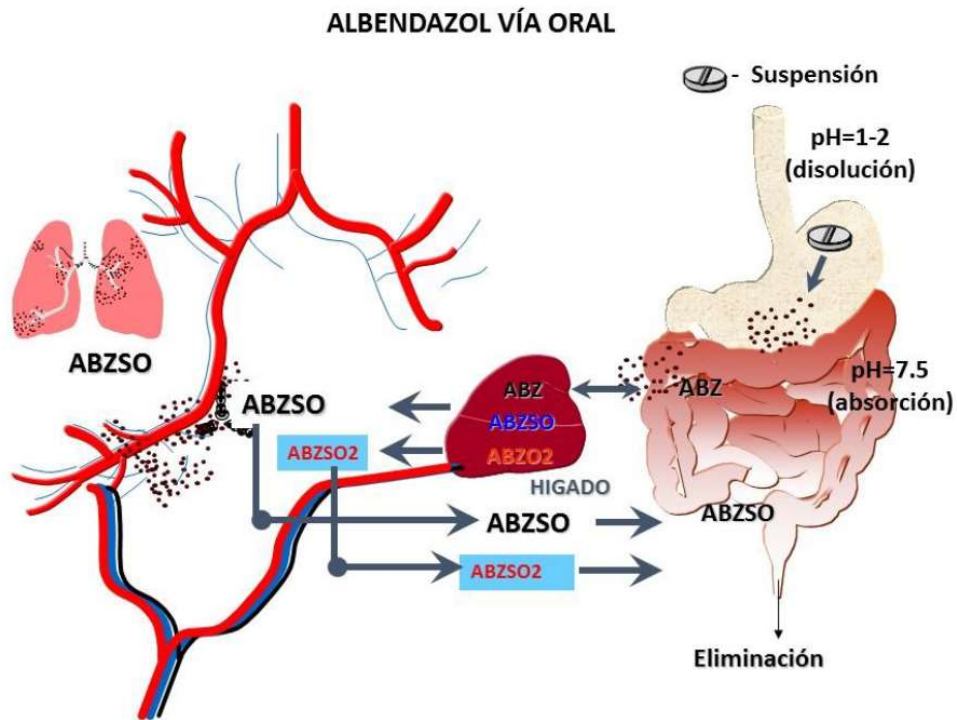
Los BZD se distribuyen al sitio donde se localiza el parásito (tejido / fluido) en un grado variable, de acuerdo con el tejido en cuestión. Una vez allí, deben penetrar en el parásito para reconocer y unirse al receptor de tubulina para lograr su efecto farmacológico.

Particularmente, el ABZ es relativamente insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, propiedades que influyen en su absorción y comportamiento en el cuerpo. La absorción por vía oral del ABZ en ratones es de aproximadamente 20-30% en comparación con el 1 - <5% en humanos. ABZ contiene un átomo de azufre como un sulfuro en la posición 5 de la molécula. Estos sulfuros se someten, principalmente en el hígado, a reacciones de oxidación, catalizadas por la flavina monooxigenasa y los sistemas enzimáticos del CP450 para formar albendazol sulfóxido (ABZSO), principal metabolito farmacológicamente activo, y en una segunda reacción de sulfonación, catalizada por el sistema CP450, el ABZSO se transforman en una sulfona inactiva (ABZSO<sub>2</sub>) (Sanchez Bruni, Jones et al. 2006).



Como puede observarse en la Fig. 2.11, cuando el ABZ es administrado por vía oral en una forma farmacéutica sólida, al tomar contacto con el contenido del estómago, ésta deberá desintegrarse para dar lugar a la disolución del fármaco, proceso que se verá favorecido en las condiciones de pH de este órgano. En la primera porción del intestino delgado, el ABZ se absorbe y por circulación portal llega al hígado donde es ampliamente metabolizado (metabolismo de primer paso muy rápido) a ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>. Los niveles plasmáticos de los metabolitos en todas las especies son mucho más altos que los de la droga madre. Una comida con alto contenido graso aumenta la absorción hasta 5 veces en humanos y animales. El aumento se ha atribuido a una mayor disolución del fármaco insoluble en agua en los alimentos (Dayan 2003). El metabolismo oxidativo es muy rápido y por lo tanto el ABZ no se detecta en plasma como droga madre. Una vez en circulación sistémica, ABZSO se distribuye ampliamente (se une a proteínas plasmáticas en un 70%) alcanzando entre otros órganos al pulmón, un órgano de gran relevancia ya que muchos parásitos adultos se alojan en él. ABZSO puede alcanzar a los parásitos hematófagos alojados en la luz del intestino, como así también llegar a aquellas especies que se alimentan del contenido gastrointestinal. Finalmente, Los metabolitos del ABZ son extensamente eliminados por la bilis. La eliminación de la droga madre es muy rápida, pero la de los metabolitos sulfóxido y sulfona es más lenta.

El ABZSO tiene un centro quiral y se cree que la formación del (-) ABZSO depende de las enzimas del CP450, mientras que la del (+) ABZSO depende de las enzimas que contienen flavina. La oxidación subsiguiente a ABZ sulfona depende de las isozimas P450. En el hombre la forma (+) ABZSO es la forma predominante en plasma (Dayan 2003).



**Figura 2.11.** Eventos que suceden a la administración oral de ABZ. Gráfico elaborado por el Dr. Sergio Sánchez Bruni.

### 2.5.1.1 Ensayo con animales

Todos los procedimientos y protocolos de manejo de animales fueron sometidos a evaluación por la Comisión de Bienestar animal de acuerdo con la Política de Bienestar Animal (Ley 087/02) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. El ensayo de farmacocinética fue realizado en colaboración con el Médico Veterinario Laureano Schofs del centro de investigación veterinaria de Tandil (CIVETAN).

Se utilizaron 50 ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad, libres de patógenos convencionales y con un peso promedio de 20 g. Los animales fueron alojados en temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), en una habitación con ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas. Los alimentos y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

Los animales fueron divididos en 10 grupos (n=5): un grupo control sin tratamiento y 9 grupos experimentales a los que se les realizó una extracción de sangre por punción mandibular a las 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas pos administración de una dosis oral de

25 mg/kg tanto de la formulación de ABZ (fracción 420-210  $\mu\text{m}$ ) como de la muestra de DS4 (fracción 420-210  $\mu\text{m}$ ). La sangre fue recolectada en tubos heparinizados y procesada mediante centrifugación a 2500 rpm, durante 15 minutos a 4°C para la obtención del plasma. El plasma fue almacenado a -20°C para su posterior análisis.

Una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de cada plasma de ratón fue colocada en tubos a los cuales se les adicionó 15  $\mu\text{l}$  de estándar interno (Oxibendazol (OXB) 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se realizó una extracción líquida de ABZ y sus metabolitos adicionando a la muestra 750  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo (ACN) con un posterior ciclo de agitación, centrifugación (15 min a 3500 rpm) y evaporación. Luego se procedió a la re-suspensión de la muestra en 150  $\mu\text{l}$  de fase móvil (27% ACN y 73% agua), agitación, centrifugado e inyección del sobrenadante para posterior cuantificación y análisis mediante HPLC- UV.

### 2.5.2 Modelo de hidatidosis

Los ensayos *in vivo* realizados para evaluar la eficacia del tratamiento con la DS4 de ABZ en un modelo murino de hidatidosis se llevó a cabo en conjunto con la Dra. María Celina Elissondo y la Dra. Julia Fabbri perteneciente al Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata, CONICET.

Para el ensayo se utilizaron ratones hembras CF-1 (n = 50) fueron infectados por vía intraperitoneal con 0,3 ml de material homogeneizado de *E. multilocularis*. A las 6 semanas post-infección, los ratones fueron divididos en 5 grupos experimentales (10 animales/grupo) para empezar los tratamientos:

- a) Grupo control agua, los animales recibieron agua destilada como placebo.
- b) Grupo control P407, los animales recibieron P407 disuelto en agua desionizada.
- c) Grupo ABZ-CMC, los animales fueron tratados con una suspensión de ABZ en agua desionizada con CMC.
- d) Grupo MF, los animales recibieron la MF4 suspendida en agua desionizada.
- e) Grupo ABZ:P407, los animales fueron tratados con la DS4.

Los tratamientos se realizaron por vía oral mediante cánula intragástrica, cada 24 horas, durante 30 días. La dosis de ABZ utilizada en todos los grupos fue de 25 mg/kg. Las

suspensiones fueron vigorosamente agitadas previo a la dosificación. Finalizado el tratamiento a las 10 semanas post infección (p-i), los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical, previa anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), y se procedió inmediatamente a la necropsia.

- A)** Preparación de las suspensiones. Para el estudio de eficacia *in vivo*, la suspensión de ABZ (3,08 mg/ml) fue preparada suspendiendo el fármaco puro en agua desionizada (pH= 7,0) con CMC (0,5 % p/v, pH= 6,0) bajo agitación durante (5 h) y sonicación (1 h). La DS de ABZ:P407 (DS4) (6,16 mg/ml) fue preparada disolviendo DS4 en agua desionizada (pH= 7,0) bajo agitación (1 h). La MF4 (6,16 mg/kg) y el P407 (3,08 mg/ml) fueron preparados en agua desionizada (pH= 7,0) bajo agitación (1 h).
- B)** Determinación de la eficacia de los tratamientos. Durante la necropsia de los animales pertenecientes al estudio de eficacia clínica, se abrió la cavidad peritoneal y se procedió a recuperar cuidadosamente las masas quísticas presentes. La eficacia de los tratamientos fue calculada mediante la media del peso de los quistes y el estudio ultraestructural al MEB de los mismos.
- C)** Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en el estudio de eficacia clínica sobre el modelo murino, fueron reportados como la media ( $\pm$  DE). Para todas las comparaciones estadísticas realizadas, un valor de P menor a 0,05 ( $P < 0,05$ ) fue considerado estadísticamente significativo.

### 2.5.3 Modelo de infección con *T. cruzi*

Los ensayos *in vivo* realizados para evaluar la eficacia del tratamiento con la DS8 de BZL en un modelo murino de infección aguda de *T. cruzi* se llevó a cabo en conjunto con la Dra. Carolina Davies perteneciente al Instituto de Patología Experimental (IPE).

#### 2.5.3.1 Modelo de infección por *T. cruzi* y tratamiento en fase aguda

La cepa de *T. cruzi* empleada para el ensayo del modelo de infección *in vivo* fue Tulahuén (TcVI). Se eligió esta cepa porque es susceptible a BZL y se ha utilizado previamente en modelos de ratones (Davies, Cardozo et al. 2010, Davies, Poma et al. 2014).

Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo a la Guía de los Institutos Nacionales de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (Council 2010) y la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Católica de Salta. Se eligieron ratones Swiss porque permiten representar parte de la variabilidad encontrada en las poblaciones humanas en términos de respuesta a la exposición a la infección por *T. cruzi* y al tratamiento en áreas endémicas. Los animales se criaron y se mantuvieron en las instalaciones para animales del Instituto de Patología Experimental en condiciones estándar (21°C, alimentos y agua *ad libitum*, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas).

Se utilizó un total de 25 ratones hembras (21 días de edad, peso promedio de 20 g al comienzo del experimento). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado en todo el experimento, imitando los programas de dosificación y administración utilizados en humanos.

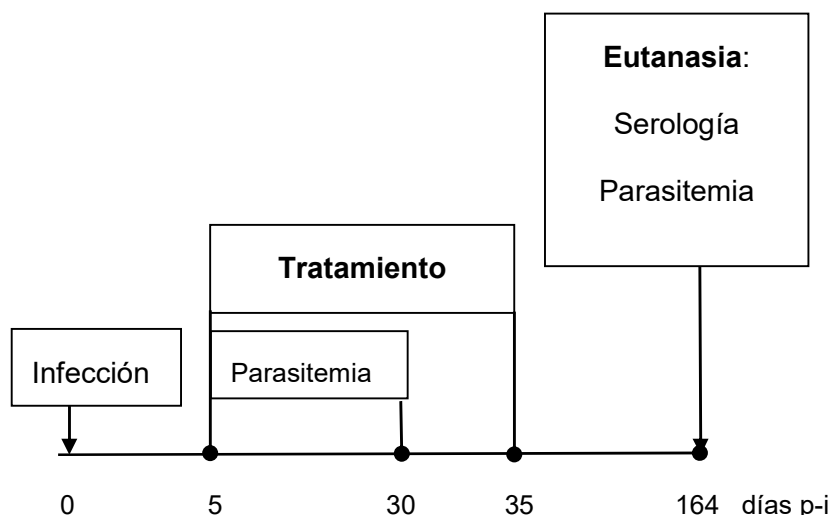
- A)** Infección por *T. cruzi*. Los 25 ratones se dividieron al azar en cinco grupos (n = 5 animales por grupo) y se inocularon intraperitonealmente (Fig. 2.12) con 300 tripomastigotes/ratón.



**Figura 2.12.** Inoculación intraperitoneal.

El tratamiento con las diferentes formulaciones de BZL comenzó cuando cada ratón cumplió con los criterios de inclusión, es decir, la presencia de parasitemia detectable en el día 10 p-i. Los tratamientos consistieron en 30 dosis que se administraron una vez al día,

durante 6 días a la semana. Cada ratón recibió su dosis diaria en un volumen de 0,1 ml administrado por vía oral con una cánula intraesofágica (Fig. 2.13).



**Figura 2.13.** Diseño experimental de la infección aguda de *T. cruzi* en modelos de ratones swiss.

**B) Tratamientos.** Se ensayaron tres formulaciones diferentes: la DS8 de BZL, la BZL-FC utilizada como control y el grupo no tratado (NT) que recibió el vehículo (0,1 % poloxamer en agua). Se comprobó que 100 mg/Kg/día es efectivo para curar las infecciones por *T. cruzi* en modelos murinos (Araújo, Martins-Filho et al. 2000, Bustamante, Craft et al. 2013, Cevey, Mirkin et al. 2016), pero también se encontraron reportes de altas tasas de curación a dosis más bajas (Bustamante, Craft et al. 2013, Cevey, Mirkin et al. 2016, Scalise, Arrúa et al. 2016, Santos Souza, Real et al. 2017), el control fue fijado en 50 mg/Kg/día con el objetivo de recopilar información sobre la eficacia de disminuir la dosis de BZL. La primera dosis de la DS8 de BZL se fijó en 60 mg/Kg/día, una dosis que ha demostrado ser efectiva en la formulación comercial (Davies, Cardozo et al. 2010). Bustamante y colaboradores (2013) informaron que la administración intermitente de BZL fue tan efectiva como la administración diaria para curar infecciones experimentales de *T. cruzi* murinos, por lo tanto, uno de los grupos experimentales recibió 60 mg/Kg/día cada 3 días (dos veces por semana) (Bustamante, Craft et al. 2013). La última dosis se fijó a la cuarta parte de la dosis más alta (15 mg/Kg/día), administrada diariamente. La Tabla

2.4 muestra las dosis y los esquemas de administración, diseñados teniendo en cuenta el trabajo previo.

- C)** Desde el día 5 hasta el día 40 p-i, se controló la parasitemia directa cada 2-4 días en los ratones del experimento. La muestra de sangre fresca se examinó bajo un microscopio óptico Zeiss a 400X para contar los tripomastigotes en sangre, registrando el número de parásitos en 100 campos microscópicos.

*Tabla 2.4. Esquema de tratamientos.*

Tratamientos	Días por semana	Duración del tratamiento (días)
		Fase aguda
<b>BZL-DS8-15: 15 mg/Kg/día</b>	6	30
<b>BZL-DS8-60: 60 mg/Kg/día</b>	6	30
<b>BZL-DS8-60-2x: 60 mg/Kg/día</b>	2	11
<b>BZL-FC: 50 mg/Kg/día</b>	6	30
<b>NT (No Tratado): 0.1 % poloxamer en agua</b>	6	30

## Referencias

Araújo, M., et al. (2000). "A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **45**(6): 819-824.

Aulton, M. E. (2004). Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas.

Baghel, S., et al. (2016). "Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs." Journal of pharmaceutical sciences **105**(9): 2527-2544.

Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." Archives of biochemistry and biophysics **303**(2): 474-482.

Bustamante, J. M., et al. (2013). "New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice." The Journal of infectious diseases **209**(1): 150-162.

Cevey, Á. C., et al. (2016). "Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain." International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance **6**(1): 12-22.

Costa, P. and J. M. S. Lobo (2001). "Modeling and comparison of dissolution profiles." European Journal of Pharmaceutical Sciences **13**(2): 123-133.

Council, N. R. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals, National Academies Press.

Davies, C., et al. (2010). "Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas' disease." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**(9): 3584-3589.

Davies, C., et al. (2014). "Detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real." Acta bioquímica clínica latinoamericana **48**(4): 421-428.

Dayan, A. (2003). "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics." Acta Tropica **86**(2): 141-159.

Diaz, D. A., et al. (2016). "Dissolution similarity requirements: how similar or dissimilar are the global regulatory expectations?" The AAPS journal **18**(1): 15-22.



Farmacopea, A. (2012). *Farmacopea Argentina 8va Edición*. 2012. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Argentina [citado 14-05-2012].

Felton, L. A. (2013). Remington-essentials of pharmaceutics, Pharmaceutical Press.

Fernández-Colino, A., et al. (2016). "Development of a mechanism and an accurate and simple mathematical model for the description of drug release: Application to a relevant example of acetazolamide-controlled release from a bio-inspired elastin-based hydrogel." Materials Science and Engineering: C **61**: 286-292.

Higuchi, T. (1965). "A phase solubility technique." Adv. Anal. Chem. Instrum. **4**: 117-211.

Jiménez de los Santos, C. J., et al. (2017). "Enhancement of albendazole dissolution properties using solid dispersions with Gelucire 50/13 and PEG 15000." Journal of Drug Delivery Science and Technology **42**: 261-272.

Karolewicz, B., et al. (2012). "Solid dispersions in pharmaceutical technology. Part I. Classification and methods to obtain solid dispersions." Polim. Med **42**(1): 17-27.

Lozano, M. d. C., et al. (2012). "Manual de tecnología farmacéutica." Fotoletra SA: Elsevier España, SL.

Mathur, V., et al. (2013). "Comparative release profile of sustained release matrix tablets of verapamil HCl." International journal of pharmaceutical investigation **3**(1): 60.

Monje-Rumi, M. M., et al. (2015). "Trypanosoma cruzi diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI." Infection, Genetics and Evolution **29**: 53-59.

Moore, T., et al. (2000). "Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic® F127 gel dissolution: drug release in stirred systems." Journal of Controlled Release **67**(2): 191-202.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1-2): 55-63.

Muelas-Serrano, S., et al. (2000). "Setting of a colorimetric method to determine the viability of Trypanosoma cruzi epimastigotes." Parasitology Research **86**(12): 999-1002.

Romero, A. I., et al. (2016). "Modeling of Progesterone Release from Poly (3-Hydroxybutyrate)(PHB) Membranes." AAPS PharmSciTech **17**(4): 898-906.

Romero, A. I., et al. (2017). "Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes." Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Sanchez Bruni, S., et al. (2006). "Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals." Journal of veterinary pharmacology and therapeutics **29**(6): 443-457.

Santos Souza, H. F., et al. (2017). "Development and in vitro/in vivo evaluation of a novel benznidazole liquid dosage form using a quality-by-design approach." Tropical Medicine & International Health **22**(12): 1514-1522.

Scalise, M. L., et al. (2016). "Promising efficacy of benznidazole nanoparticles in acute *Trypanosoma cruzi* murine model: in-vitro and in-vivo studies." The American journal of tropical medicine and hygiene **95**(2): 388-393.

Shah, N., et al. (2014). "Amorphous Solid Dispersions." Theory and practice: Springer.

Simonazzi, A., et al. (2018). "Development and in vitro evaluation of solid dispersions as strategy to improve albendazole biopharmaceutical behavior." Therapeutic delivery **9**(9): 623-638.

Simonazzi, A., et al. (2018). "Preparation and characterization of Poloxamer 407 solid dispersions as an alternative strategy to improve benznidazole bioperformance." Journal of pharmaceutical sciences.

Valls, O., et al. (2003). Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Vila Jato, J. L. (2001). Tecnología farmacéutica. Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. José Luis Vila Jato (ed).

Vo, C. L.-N., et al. (2013). "Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **85**(3): 799-813.

Wilmes, A., et al. (2007). "Peloruside A synergizes with other microtubule stabilizing agents in cultured cancer cell lines." Molecular pharmaceutics **4**(2): 269-280.

Zingales, B., et al. (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104**: 1051-1054.

CAPÍTULO 3: ABZ.  
CARACTERIZACIÓN  
Y ESTUDIOS *IN*  
*VITRO/IN VIVO*

### 3. Caracterización de las dispersiones sólidas de Albendazol

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito en cuanto a las propiedades biofarmacéuticas de ABZ, en esta sección se muestran los resultados obtenidos en la preparación y caracterización de DS de este fármaco utilizando como portador Poloxamer 407, un copolímero en bloque con propiedades surfactantes.

En forma general, para las DS obtenidas y sus correspondientes MF (controles) se realizaron diversas determinaciones con el objeto de caracterizar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de relevancia, como así también otros ensayos que permiten avanzar en la caracterización biofarmacéutica de los sistemas entre los que se incluyen los ensayos de disolución. Además se realizaron pruebas *in vivo* para estudiar la farmacocinética y distintos modelos animales para describir eficacia.

#### 3.1. Caracterización físico-mecánica

Comprender y controlar el comportamiento reológico de una sustancia pulverulenta puede ayudar a formular principios activos, a diseñar procesos más eficientes y, así, a conseguir la fabricación de productos de alta calidad, lo que es fundamental en la industria farmacéutica, donde la mayoría de los principios activos se presentan como sólidos pulverulentos (Lozano, Córdoba et al. 2012).

En el estudio de preformulación de una forma farmacéutica sólida es importante conocer las propiedades de flujo de las mezclas y sus propiedades de compresibilidad y compactabilidad.

Se determinó el ángulo de reposo, densidad aparente y empaquetada y el índice de Carr y de Hausner, tanto para las DS como para las MF, para estudiar cómo la inclusión del fármaco en una DS o MF influye en sus propiedades de flujo.

##### 3.1.1 Ángulo de reposo

Los valores de ángulo de reposo obtenidos para las diferentes DS y las MF se muestran en la Tabla 3.1. Como norma general se establece que un ángulo de reposo bajo indica menores fuerzas de fricción y mayor fluidez. Para un polvo que fluye libremente, el ángulo de reposo es igual o menor a 30°; los polvos con un ángulo de reposo igual o

inferior a 40° tienen una fluidez satisfactoria; y, cuando el ángulo de reposo es mayor que 40°, el polvo no fluye libremente (Felton 2013).

**Tabla 3.1.** Valores de ángulo de reposo y tipo de flujo para las diferentes dispersiones sólidas y mezclas físicas obtenidas

	Ángulo de reposo	Tipo de flujo		Ángulo de reposo	Tipo de flujo
DS1	27,36° ± 0,855	Bueno	MF1	31,38° ± 1,059	Aceptable
DS2	32,94° ± 0,493	Aceptable	MF2	34,71° ± 0,930	Aceptable
DS3	27,25° ± 1,058	Bueno	MF3	41,05° ± 1,379	Malo
DS4	27,42° ± 0,715	Bueno	MF4	49,45° ± 0,873	Malo

Cabe mencionar que la reproducibilidad de este método es muy baja por lo que el ángulo de reposo no siempre se considera una representación perfecta para la fluidez del polvo. Se necesitan otros parámetros para definir el flujo de una muestra (Felton 2013).

### 3.1.2 Medición de densidad de polvos

La densidad aparente de un granulado viene determinado, fundamentalmente, por el tamaño, forma y textura de las partículas, las películas que las rodean (gases) y la presencia de cargas electrostáticas. Con el tiempo, y debido a las vibraciones a que se ve sometido durante su procesado y transporte, el volumen puede modificarse significativamente, por ello, debe realizarse una prueba que determine la relación entre los volúmenes del granulado aireado (densidad aparente) y vibrado (densidad empaquetada), con objeto de prevenir modificaciones importantes en el volumen (Vila Jato 2001).

Los valores de densidad aparente y densidad empaquetada de las diferentes DS y MF obtenidas se observa en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Valores de densidad aparente y densidad empaquetada para las diferentes dispersiones sólidas y mezclas físicas obtenidas

	Densidad aparente (g/ml)	Densidad empaquetada (g/ml)		Densidad aparente (g/ml)	Densidad empaquetada (g/ml)
DS1	0,5176 ± 0,030	0,6265 ± 0,045	MF1	0,4491 ± 0,011	0,5150 ± 0,035
DS2	0,5187 ± 0,092	0,5713 ± 0,032	MF2	0,4582 ± 0,030	0,5379 ± 0,033
DS3	0,5104 ± 0,041	0,5679 ± 0,043	MF3	0,3925 ± 0,072	0,5791 ± 0,042
DS4	0,4850 ± 0,060	0,5548 ± 0,023	MF4	0,3342 ± 0,053	0,5569 ± 0,053

### 3.1.3 Índice de Carr

También llamado índice de compresibilidad. Es la relación entre densidades aparente y empaquetada. Cuanto mayor sea la diferencia, mayor será la tendencia del material a apelmazarse y peor será el flujo (Lozano, Córdoba et al. 2012).

### 3.1.4 Índice de Hausner

Es la relación entre las densidades aparente y empaquetada. Está relacionada con la fracción interparticular y, como tal, puede utilizarse para predecir las propiedades del flujo de polvos (Vila Jato 2001).

La relación entre la fluidez del polvo, la compresibilidad y el índice de Hausner se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Relación entre la fluidez del polvo, compresibilidad e índice de Hausner

Índice de Carr (porcentaje de compresibilidad)	Índice de Hausner	Tipo de flujo
5 – 15	-	Excelente
12 – 16	< 1,25	Bueno
18 – 21	1,25	Aceptable
23 - 35	1,50	Malo
33-38	> 1,50	Muy malo
> 40	-	Extremadamente malo

Los valores de índice de Carr e índice de Hausner obtenidos para las diferentes DS y las MF se muestran en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Valores de índice de Carr e índice de Hausner y tipo de flujo para las diferentes dispersiones sólidas y mezclas físicas obtenidas

	Índice de Carr	Índice de Hausner	Tipo de flujo		Índice de Carr	Índice de Hausner	Tipo de flujo
DS1	17,38	1,21	Excelente	MF1	12,79	1,15	Bueno
DS2	9,20	1,10	Excelente	MF2	14,81	1,17	Bueno
DS3	10,12	1,11	Excelente	MF3	35,90	1,47	Malo
DS4	12,58	1,14	Bueno	MF4	39,98	1,67	Extremadamente malo

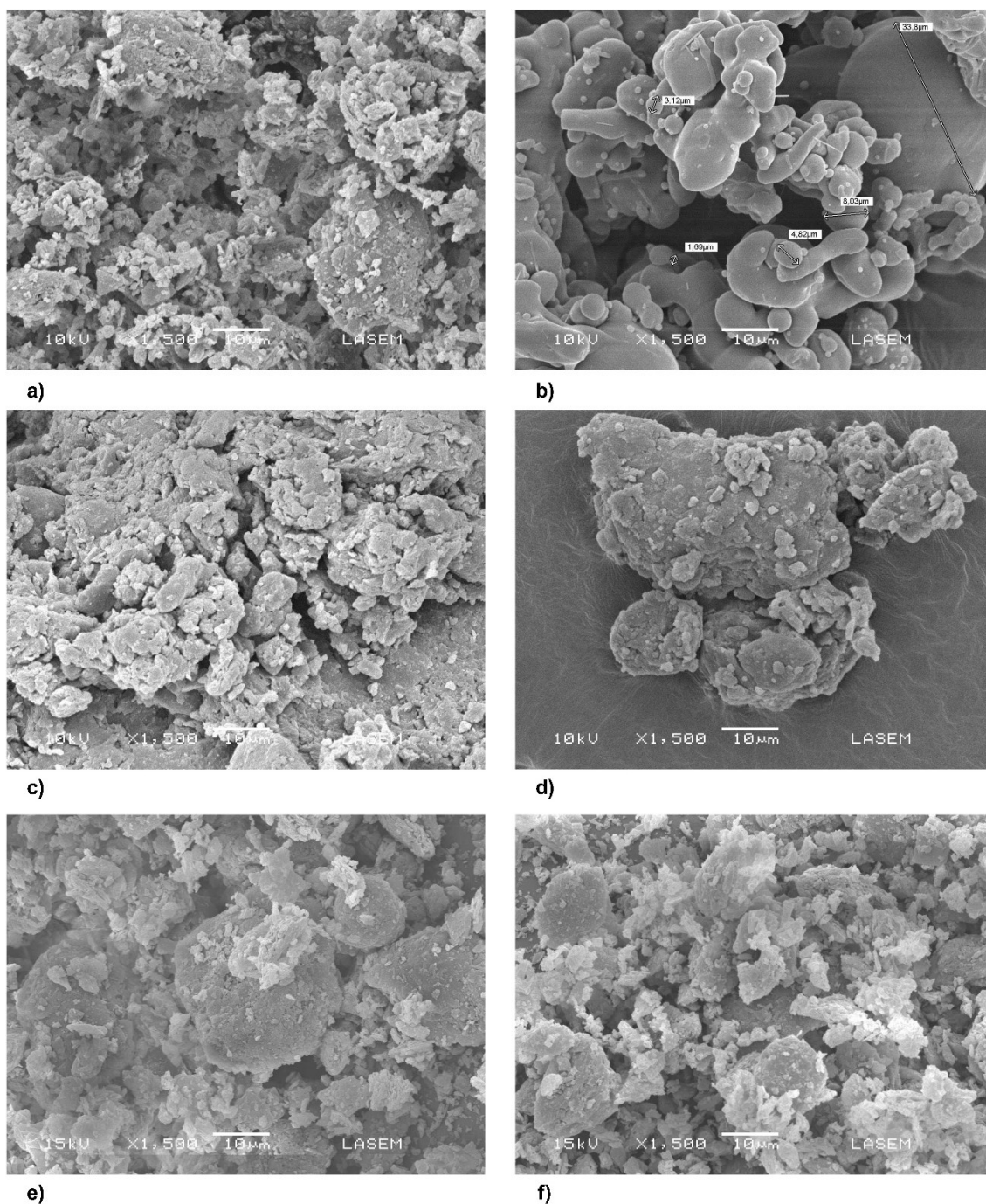
Según los resultados de la Tabla 3.1 y 3.4 se puede decir que las MF presentan malas propiedades de flujo en comparación con las DS. Por otra parte, para determinar las propiedades de flujo de una formulación se deben tener en cuenta además del ángulo de reposo, el índice de compresibilidad y el índice de Hausner. En este estudio en particular, se observó que según el índice de Carr y el índice de Hausner, las DS poseen un flujo de polvos excelente mientras que las MF presentan un flujo de polvos regular.

Estos resultados son relevantes porque presuponen un aporte adicional de las DS relacionado a la obtención de un material pulverulento apropiado para las operaciones de compresión en relación y en contraste con sus respectivas MF. Las DS al demostrar mejor flujo podrán ser incorporadas más fácilmente en formas farmacéuticas sólidas sin necesidad de operaciones adicionales como por ejemplo una granulación.

## 3.2 Caracterización físico-química

### 3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras que se caracterizaron por MEB para determinar la morfología del fármaco dentro de la matriz polimérica fueron el ABZ puro, P407, DS3, DS4, MF3 y MF4. En las imágenes de MEB se puede observar al ABZ como pequeñas partículas de forma irregular y superficie rugosa (Fig. 3.1 a). El P407 se presenta como grandes esferas de superficie lisa y forma irregular de diferentes tamaños (Fig. 3.1 b). Las Fig. 3.1 c y 3.1 d muestran que las DS3 y DS4 presentan partículas de superficie rugosa de diferentes tamaños, donde las partículas esféricas del P407 y las irregulares de ABZ no pueden distinguirse. En las Fig. 3.1 e y 3.1 f, correspondientes a las MF3 y MF4, respectivamente, se observa que el ABZ está distribuido sobre la superficie del P407 manteniendo su estructura.



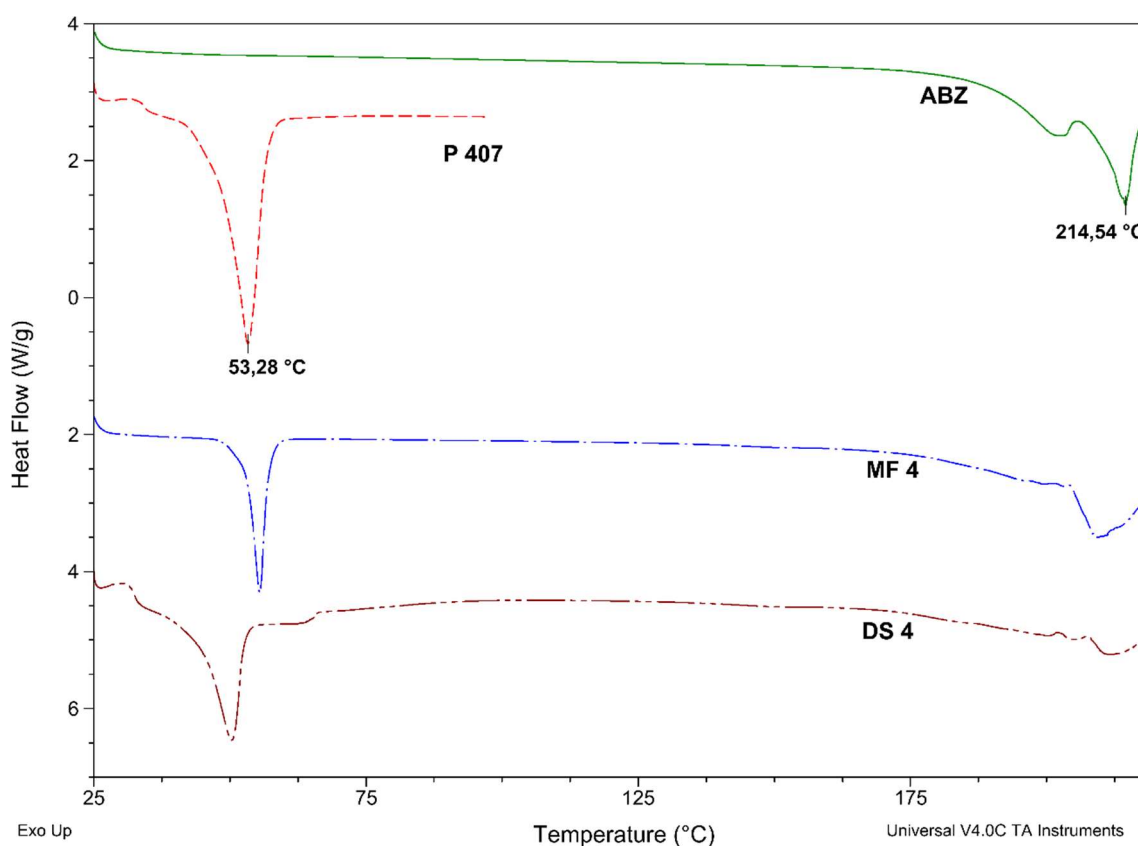
**Figura 3.1.** Microscopía electrónica de barrido de: a) ABZ; b) P407; c) DS3; d) DS4; e) MF3 y f) MF4.

### 3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

El análisis por CDB de ABZ puro, P407, DS4 y MF4 se llevó a cabo para determinar el comportamiento térmico de las muestras y además comprobar la formación de DS amorfas, lo que estaría indicado por la atenuación o desaparición del pico de fusión del fármaco en el termograma. En el termograma (Fig. 3.2) se puede observar un pico



endotérmico a 214,54° C y 53,28°C, correspondientes al punto de fusión de ABZ y P407 respectivamente (Wisher 2012). Al analizar el termograma de la DS4, se observa que el pico característico del fármaco aparece muy atenuado, probablemente debido a la disminución de la cristalinidad del ABZ. En la MF4, el pico correspondiente a la temperatura de fusión del portador no sufrió un cambio importante, revelando probablemente la existencia de P407 en estado cristalino. Sin embargo, el termograma de la DS4 muestra el pico correspondiente al P407 como una amplia endoterma difusa, probablemente debido a que parte del ABZ se disolvió en la matriz polimérica durante el ensayo.



**Figura 3.2.** Termogramas correspondientes a ABZ puro, P407, MF4 y DS4.

### 3.2.3 Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (TF-IR)

Los espectros de TF-IR del ABZ puro, P407, MF4 y DS4 (Fig. 3.3) se compararon para evaluar posibles interacciones entre el fármaco y el polímero o cambios en la frecuencia de vibración de los grupos funcionales del fármaco.

El ABZ posee un grupo uretano N-aril secundario que presenta un pico de intensidad media a  $3322\text{ cm}^{-1}$  atribuido al estiramiento N-H (Socrates 2004). La banda que se produce debido a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo, denominada banda amida I de uretanos, se produce en la región de  $1740\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, la banda presente en  $1711\text{ cm}^{-1}$  se debe a la vibración de amida I del grupo carbamato (Gunasekaran and Uthra 2008). Los uretanos también exhiben una banda de amida III igual que las amidas, pero en la región de  $1260\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ . La banda presente en  $1271\text{ cm}^{-1}$  se debe a la combinación de deformación N-H y movimiento de vibración de estiramiento C-N. En el espectro TF-IR del ABZ, las señales correspondientes al estiramiento del enlace C=C del anillo aromático aparecen a  $1630\text{ cm}^{-1}$ . El espectro TF-IR correspondiente al P407 muestra las bandas de absorción principales a  $1343\text{ cm}^{-1}$  y  $1110\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la variación de estiramiento del enlace O-H en el plano y el estiramiento de C-O, respectivamente, coincidiendo con lo informado para P407 (Garala, Joshi et al. 2013). Todas las señales mencionadas anteriormente permanecieron prácticamente inalteradas para la DS4 y la MF4 en la misma longitud de onda. Las diferencias que se observan en los espectros de la DS4 y la MF4 indicarían que las interacciones entre fármaco y polímero son diferentes. Probablemente en la DS4 están presentes interacciones más fuertes (del tipo puente hidrógeno) que no están presentes en la MF4. Estas interacciones no están presentes en toda la muestra, por lo tanto, es posible que se generen más bandas. Por este motivo, se puede concluir que si bien no se observan diferencias marcadas entre los espectros de la DS4 y la MF4, si es posible observar diferencias en las intensidades relativas de algunas bandas correspondientes a la vibración del enlace N-H, lo que podría indicar que estos grupos están comprometidos de manera diferente en la DS4 y en la MF4.

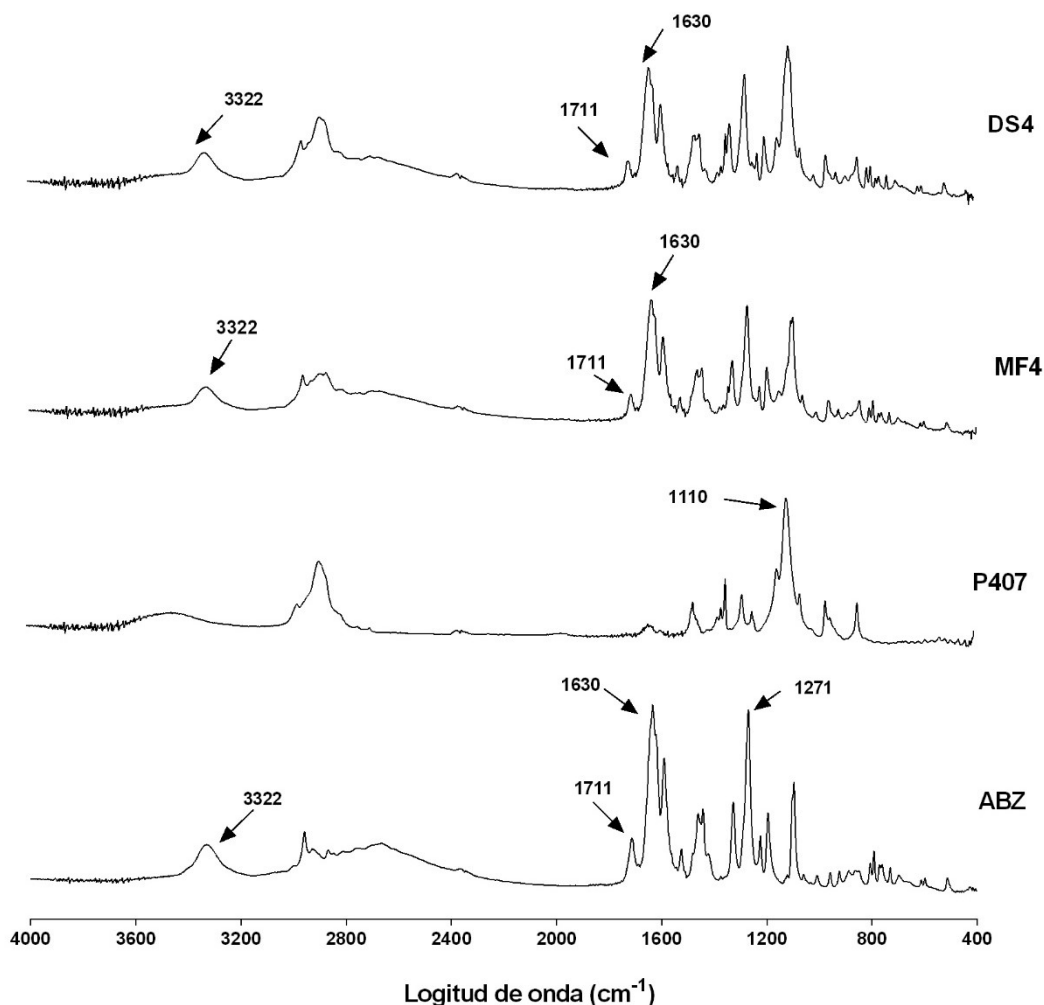
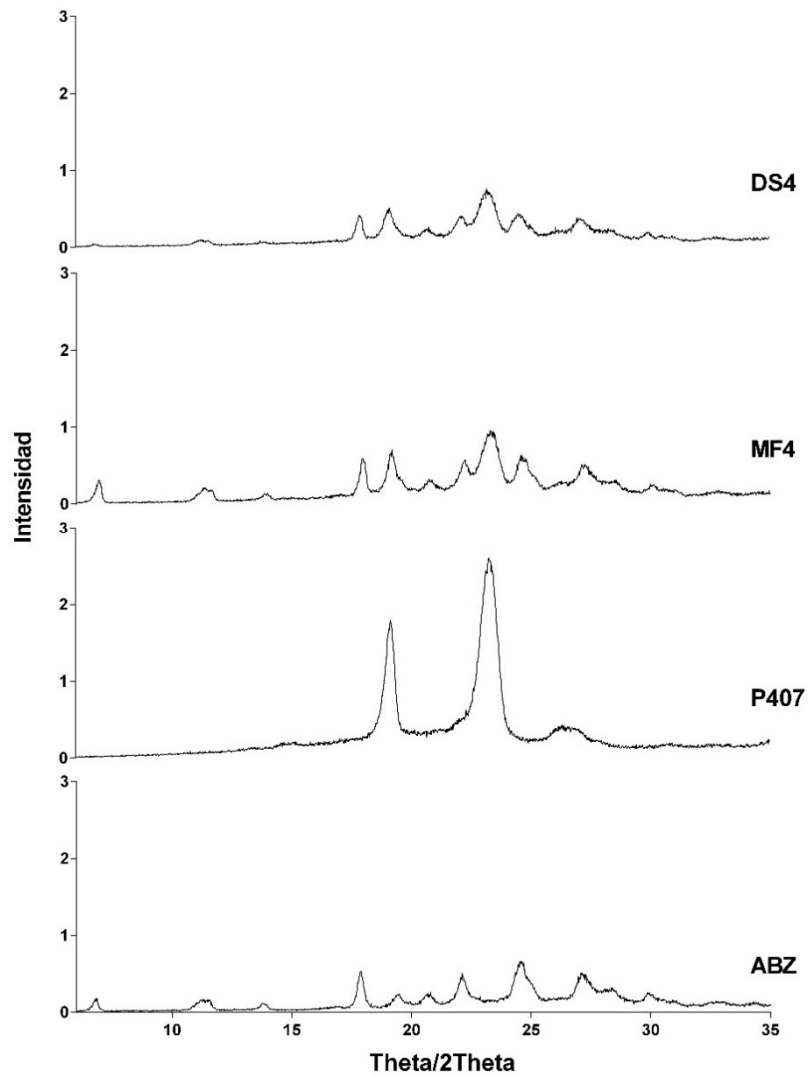


Figura 3.3. Espectros de FT-IR de ABZ puro, P407, MF4 y DS4

### 3.2.4 Difracción de rayos X (D-RX)

Para evaluar el estado cristalino de las muestras, se analizaron por D-RX el ABZ puro, P407, DS4 y MF4. Como se muestra en la Fig. 3.4, el perfil de difracción de ABZ demostró su naturaleza cristalina, mostrando numerosos picos de difracción en 6,80°; 11,30°; 13,8°; 17,9°; 19,5°; 20,8°; 22,1°; 24,43°; 24,6°; 27,2°; 28,4° y 29,9°, coincidiendo con lo informado por otros autores (Pranzo, Cruickshank et al. 2010, Martínez-Marcos, Lamprou et al. 2016). En el difractograma de D-RX, los picos característicos de P407 se observaron a 19,2° y 23,2°, de igual manera que los informados en bibliografía (Ei-Badry, Hassan et al. 2013). Tanto para la MF4 como para la DS4, los patrones de RX no mostraron cambios significativos en las señales asignadas al fármaco y al polímero. Sin embargo, se observó

que algunos de los picos característicos de ABZ estaban reducidos o incluso ausentes en la DS4, lo que podría sugerir una ligera reducción en la cristalinidad en comparación con la MF4. Esto podría llevar a una mejora en la solubilidad porque las formas amorfas se solubilizan más fácilmente que las formas cristalinas.



**Figura 3.4.** Difractogramas D-RX de ABZ puro, P407, DS4 y MF4.

### 3.3 Estudios de solubilidad y saturación

#### 3.3.1 Estudio de solubilidad de fases

Como se mencionó anteriormente, P407 tiene propiedades surfactantes con una CMC de 2,8  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, se esperaba un aumento en la solubilidad ABZ al usar este polímero como portador.

Los resultados indican que la solubilidad del ABZ a temperatura ambiente aumentó linealmente (de 0,23 a 0,91 mg/ml) junto con las concentraciones del polímero surfactante en la solución desde el 0% al 15% (p/v) (Fig. 3.5). Este resultado es similar al reportado por Torrado y colaboradores (Torrado, Torrado et al. 1996).

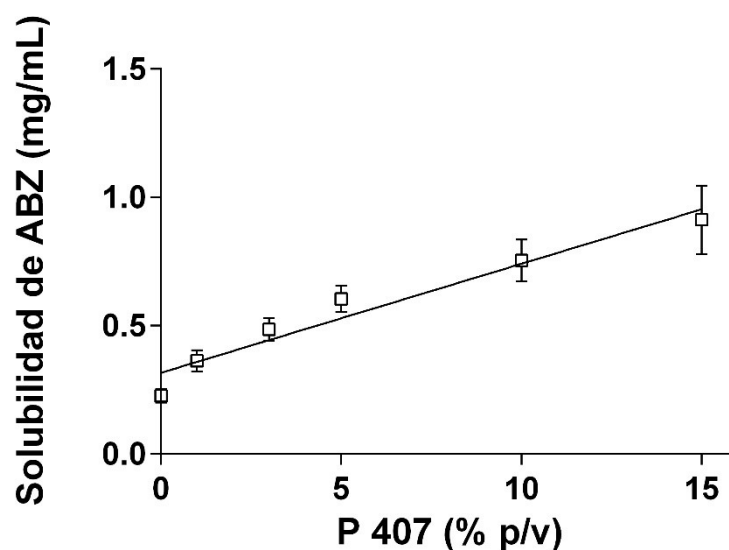


Figura 3.5. Solubilidad del ABZ en HCl 0,1 N con concentraciones crecientes de P407.

#### 3.3.2 Estudio de solubilidad en saturación

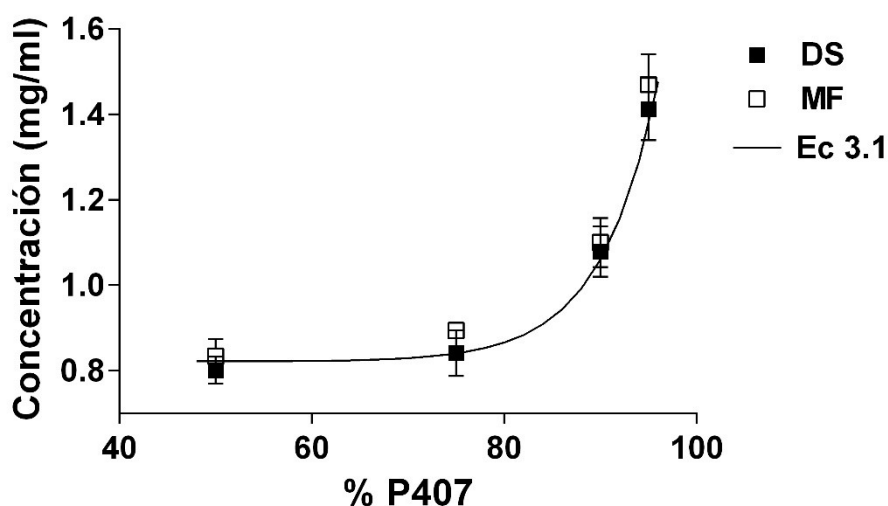
El estudio de solubilidad en saturación del ABZ en función de la proporción de P407 siguió una curva única (desviación estándar por debajo del 6%), independientemente del tipo de mezcla binaria (DS o MF). La solubilidad en saturación demostró un crecimiento exponencial cuando la concentración del polímero aumentó. Cuando la concentración del polímero es de 95% p/p se produce un aumento en la solubilidad de ABZ de aproximadamente 4 veces con respecto a la solubilidad en ausencia del mismo. Sin

embargo, para proporciones de Poloxamer inferiores al 50% en las mezclas, la solubilidad en saturación alcanzó una meseta con un valor dos veces mayor que el correspondiente al ABZ (0,398 mg/ml).

Los datos se obtuvieron utilizando la Ec. 3.1 con un índice de correlación de  $R^2=0,9842$  (Fig. 3.6).

$$SS = 0,821 + 6,43 \cdot 10^{-8} \times \exp(0,168 \times P\%) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde  $SS$  es la solubilidad en saturación de ABZ en mg/ml y  $P\%$  es el porcentaje de Poloxamer en la mezcla (% p/p).



**Figura 3.6.** Concentración de saturación de ABZ en HCl 0,1 N en presencia de proporciones crecientes de P407. Las barras de error no se pueden distinguir, ya que son más pequeñas que los símbolos utilizados para el promedio de los datos experimentales.

## 3.4 Caracterización biofarmacéutica

### 3.4.1 Ensayos de disolución

El aumento de la velocidad de disolución de un fármaco puede conducir a una mejora en su cinética de absorción, lo que lleva a una mejora en su biodisponibilidad. En este

contexto, se estudiaron los perfiles de disolución de las diferentes DS en HCl 0,1 N y se compararon con las MF, la ABZ-FC y ABZ puro (Fig. 3.7).

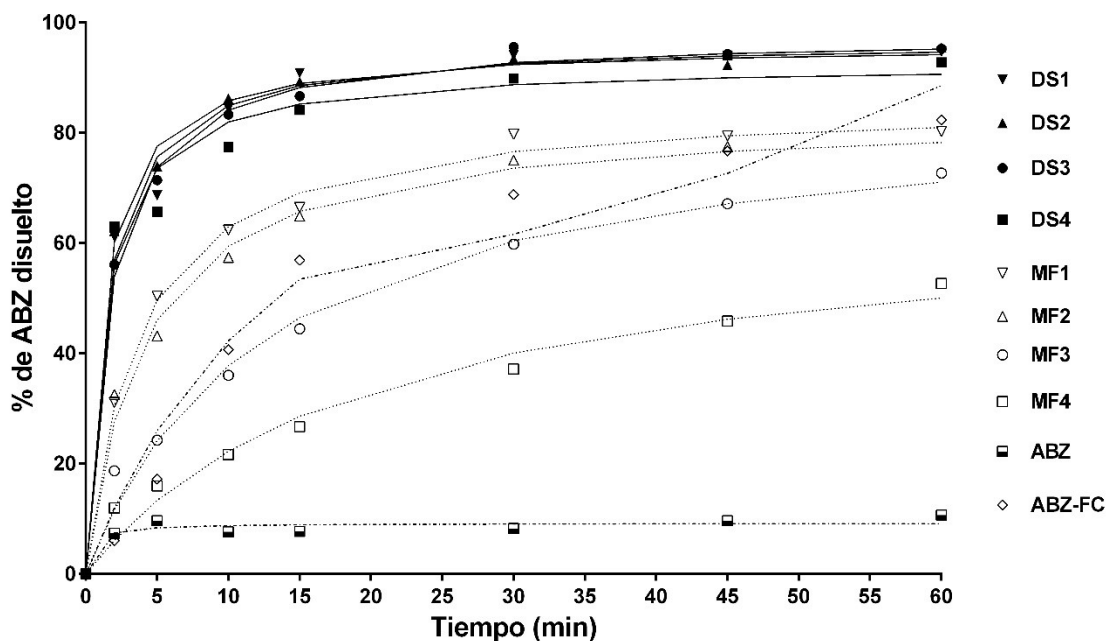


Figura 3.7. Perfiles de disolución de ABZ en HCl 0,1 N

Los datos experimentales de la cantidad acumulada de ABZ disuelto se correlacionaron bien con un modelo previamente desarrollado y validado por nuestro grupo de investigación. La Tabla 3.5 muestra los valores de los parámetros  $a$  y  $b$  y el coeficiente de correlación correspondiente para las DS, MF, ABZ puro y ABZ-FC.

Teniendo en cuenta que el valor del parámetro  $a$  no cambia con el tiempo para una dada muestra, y que cuando  $t = 0$  el parámetro  $a$  es igual a la velocidad de disolución inicial ( $VDI$ ), y según los datos de la Tabla 3.5, se observaron diferencias significativas en la velocidad de disolución inicial entre las DS y las muestras de ABZ-FC, ABZ y MF (de 3 a 20 veces). Aunque los valores de la solubilidad en saturación fueron similares para las mismas proporciones de P407 para las DS y las MF, la  $VDI$  fue notablemente diferente. Si bien todas las DS presentaron valores superiores al  $60\% \text{ min}^{-1}$ , ninguna de las MF alcanzó el  $25\% \text{ min}^{-1}$ . Por otro lado, la  $VDI$  de la ABZ-FC fue casi 10 veces más baja que para las DS.

**Tabla 3.5.** Parámetros del modelo, tiempos de muestreo, tiempo de disolución del 80% y eficiencia de disolución para DS, MF, ABZ puro y ABZ-FC.

Muestra	Parámetros del modelo			$t_{tmin}$ (%)					$t_{80\%}$ (min)	ED (%)
	$a$ (% min <sup>-1</sup> )	$b$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	5	10	15	30	60		
DS1	69,155	0,714	0,998	75,6	84,9	88,6	92,5	94,6	1,56	88,3
DS2	80,616	0,839	0,997	77,5	85,8	89,0	92,4	94,1	1,37	88,5
DS3	60,127	0,615	0,997	73,8	84,1	88,2	92,7	95,2	2,11	88,1
DS4	71,622	0,774	0,977	73,5	82,0	85,2	88,7	90,6	1,69	84,9
MF1	23,640	0,275	0,996	49,7	63,0	69,1	76,6	81,0	49,66	70,9
MF2	20,604	0,246	0,992	46,1	59,4	65,7	73,6	78,2	NA*	67,9
MF3	6,722	0,077	0,987	24,2	37,8	46,5	60,4	71,1	NA*	54,2
MF4	3,341	0,050	0,978	13,4	22,3	28,6	40,0	50,0	NA*	35,9
ABZ	19,640	2,140	0,904	8,4	8,8	8,9	9,0	9,1	NA*	8,8
ABZ-FC	6,744	0,059	0,983	26,0	42,3	53,5	72,7	84,5	40,31	65,1

NA\*: No alcanzado

Aunque la *VDI* del ABZ puro fue mayor o igual que la de la MF3, MF4 y ABZ-FC, también se debe tener en cuenta el porcentaje de fármaco disuelto en diferentes momentos ( $t_{tmin}$ ). Cuando la cantidad acumulada de ABZ puro disuelto alcanzó cerca del 9%, la disolución casi se detuvo, al menos durante los 60 minutos que duró el ensayo. Además de las diferencias encontradas en la *VDI* entre las muestras de las DS y las MF mencionadas previamente, se observaron diferencias significativas en el  $t_{30min}$  (entre 20% y 40% aproximadamente). Con respecto al  $t_{80\%}$ , todas las DS presentaron valores inferiores a 2,5 min, lo que significa que el sistema se corresponde con uno de entrega inmediata. Solo la MF1 alcanzó un 80% de disolución del fármaco durante el período de tiempo evaluado, mientras que el  $t_{80\%}$  de la ABZ-FC estuvo justo por debajo del límite de aceptación. Los valores correspondientes a la *ED* fueron más altos para todas las DS que para las MF, la ABZ-FC y el ABZ puro, resaltando claramente que estos productos son la mejor opción debido a su alta velocidad de disolución y por el porcentaje de ABZ disuelto.

Para comparar los perfiles de disolución de las diferentes DS se utilizaron los factores de diferencia y similitud ( $f_1$  y  $f_2$ , respectivamente). Como no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de disolución de las DS, todos los datos se ajustaron mediante una curva única, cuyos parámetros de modelo  $a$  y  $b$  fueron 70,4% min<sup>-1</sup> y 0,7 min<sup>-1</sup>, respectivamente. Para comparar los perfiles de disolución entre las diferentes DS,  $f_1$  y  $f_2$



se calcularon utilizando el perfil de curva único como referencia. Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6.** Valores de  $f_1$  y  $f_2$  para las diferentes DS.

	$f_1$	$f_2$
DS1	0,9	95,0
DS2	1,8	85,9
DS3	1,6	87,3
DS4	2,7	80,6

Estos resultados sugieren que los perfiles de las diferentes DS fueron similares. Esto es importante desde un punto de vista práctico al desarrollar una formulación, ya que se podría diseñar un comprimido con una cantidad adecuada de fármaco y un peso final aceptable.

El valor del parámetro *TMD* es uno de los más utilizados, y su cálculo para las DS confirmó lo que se encontró anteriormente a partir del análisis de  $f_1$  y  $f_2$ . Los valores de  $TMD_{80\%}$  fueron 6,7; 6,0; 7,3 y 8,2 min para DS1, DS2, DS3 y DS4, respectivamente, y 6,9 min para la curva única. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos, lo que confirma la similitud en los perfiles de disolución de las DS.

Finalmente, la velocidad de disolución intrínseca inicial (*VDII*) de ABZ se calculó en función del contenido de ABZ para las DS (Ecuación 3.2) y las MF (Ecuación 3.3), y en comparación con el ABZ puro (Fig. 3.8).

$$VDII_{DS} \left( \frac{\mu g}{ml.min} \right) = -0,036 \times ABZ\% + 40,38 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$VDII_{MF} \left( \frac{\mu g}{ml.min} \right) = 15,9 \times \exp(-0,045 \times ABZ\%) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

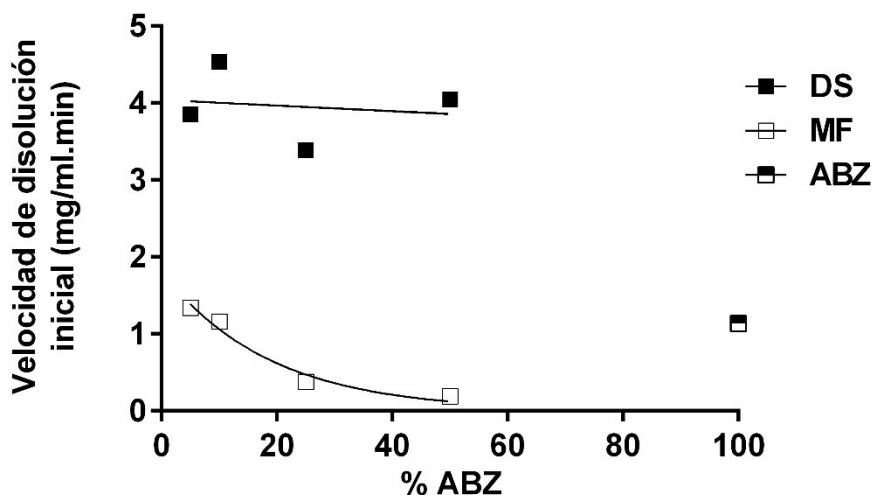


Figura 3.8. Velocidad de disolución intrínseca inicial (VDII) de ABZ

La VDII fue casi independiente en el rango de concentración de fármaco entre 5% a 50% p/p para las DS. La VDII fue mejor para las DS en comparación con el ABZ puro. El mecanismo por el cual se disuelve el fármaco probablemente comience con la formación de una capa de difusión rica en polímeros entre la DS y el medio de disolución. Después de la difusión en esta fase rica en polímeros, el fármaco alcanza el medio de disolución ya sea como moléculas solvatadas o como partículas amorfas a una velocidad controlada por el portador. Por otro lado, la VDII para las MF está fuertemente influenciada por la velocidad de disolución del ABZ (disolución controlada por el fármaco). Los datos fueron ajustados adecuadamente para una ecuación exponencial.

Es importante enfatizar que los estudios de solubilidad y disolución *in vitro* representan un vínculo importante entre el diseño de la formulación y su bioperformance.

### 3.5 Estudios *in vivo*

#### 3.5.1 Ensayos farmacocinéticos en ratones

Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y fueron construidas graficando la relación entre el Área de ABZSO/Área de estándar interno (EI) en función de la concentración del metabolito ( $\mu\text{g/ml}$ ). El intervalo de concentraciones utilizado estuvo entre 0,025 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . ABZ y su metabolito fueron identificados en los siguientes tiempos

de retención en base a la comparación con estándares puros de cada molécula: 4,1 min. (ABZSO), 8,8 min (OXB) y 10,6 min (ABZ).

Las curvas de calibración fueron construidas mediante análisis de regresión lineal de cuadrados mínimos, lo cual estimó un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9960 (ABZ), 0,9977 (ABZSO) y 0,9935 (ABZSO<sub>2</sub>). Los límites de cuantificación (QL) fueron 0,01 µg/ml (ABZ y ABZSO) y 0.03 µg/ml (ABZSO<sub>2</sub>).

No se observaron interferencias de sustancias endógenas en las determinaciones cromatográficas.

La curva de concentración vs. tiempo para ABZSO en el plasma, fue calculada procesando los datos experimentales mediante un programa de hojas de cálculo (Microsoft Excel v16.0). Los datos de concentración máxima (C<sub>máx</sub>), tiempo máximo (T<sub>máx</sub>) y área bajo la curva (ABC<sub>0-24hs</sub>) se obtuvieron por integración de las curvas plasmáticas en un programa de cálculo y estadística (OriginPro 9.1 64-bit).

Previo al análisis y cuantificación de ABZ en plasma hay que considerar que este fármaco no va a ser detectado debido a que sufre una importante metabolización hepática, por lo tanto es de esperarse que, en plasma solo se encuentren los correspondientes metabolitos: ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>. Si bien el método cromatográfico utilizado en esta tesis permite cuantificar ambos metabolitos de ABZ, se informan solo los datos del metabolito activo para facilitar la interpretación de los resultados.

La Fig. 3.9 representa los perfiles de concentración plasmática en función del tiempo de ABZSO luego de la administración de una única dosis de ABZ y de DS4. Se puede observar que el nivel plasmático máximo de ABZSO para la formulación control (ABZ fracción 420-210 µm) fue a las 2 horas con una concentración máxima de 3,17 µg/ml, mientras que para la DS4 fue de 2,33 µg/ml en la primer hora del ensayo. No se observan diferencias significativas entre el grupo control y el de la DS4 ensayada.

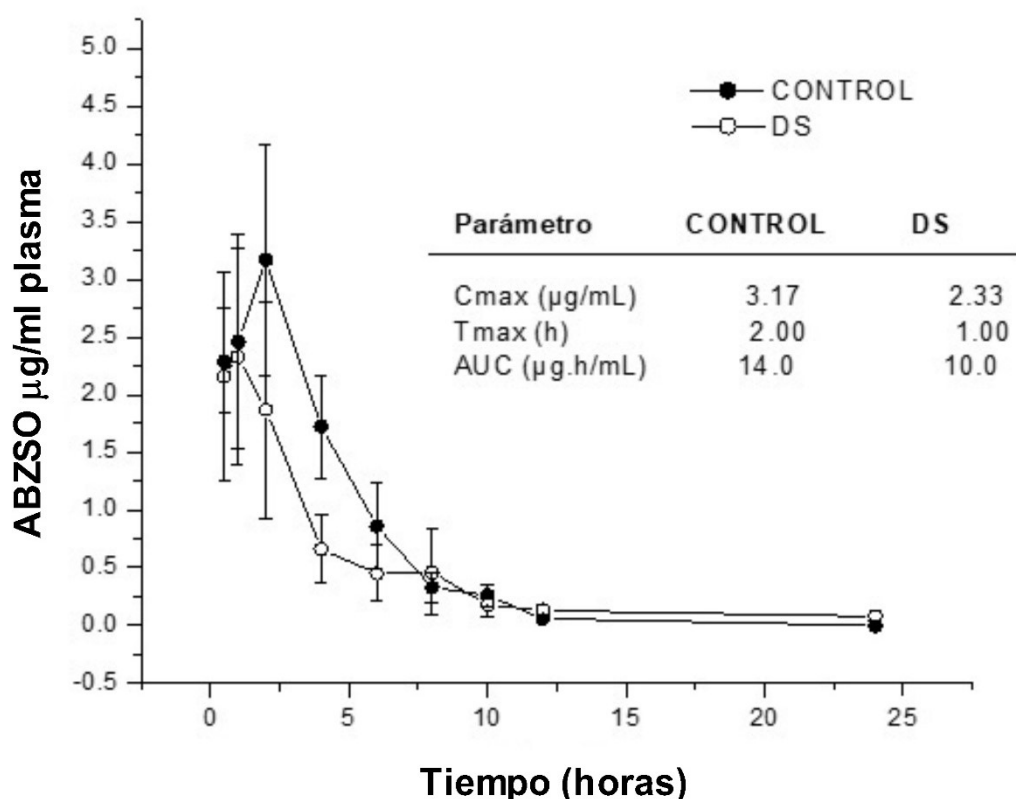


Figura 3.9. Perfil farmacocinético de Albendazol sulfóxido (ABZSO)

Estos resultados obtenidos van en línea con lo que se observó previamente en nuestro grupo de investigación donde se prepararon DS del mismo fármaco pero utilizando Poloxamer 188 como polímero portador. En estas DS se observaron mejoras en la velocidad de disolución *in vitro* (Castro, Bruni et al. 2010) pero no impactó marcadamente la farmacocinética en ratones (Castro, Sanchez Bruni et al. 2013). Sin embargo, si se observaron diferencias significativas importantes en la farmacocinética en caninos (Castro, Dib et al. 2013). Esto puede atribuirse a que el tracto GI de los caninos permite determinar perfiles farmacocinéticos de manera más eficiente que en los modelos murinos.

### 3.5.2 Modelo de hidatidosis

Para evaluar la eficacia de los tratamientos se toman como referencia dos parámetros: peso de quistes recuperados y ultraestructura al MEB. El comportamiento y la apariencia de los animales fueron normales durante todo el período del experimento. No se evidenciaron diferencias significativas entre el peso de los quistes recuperados de los

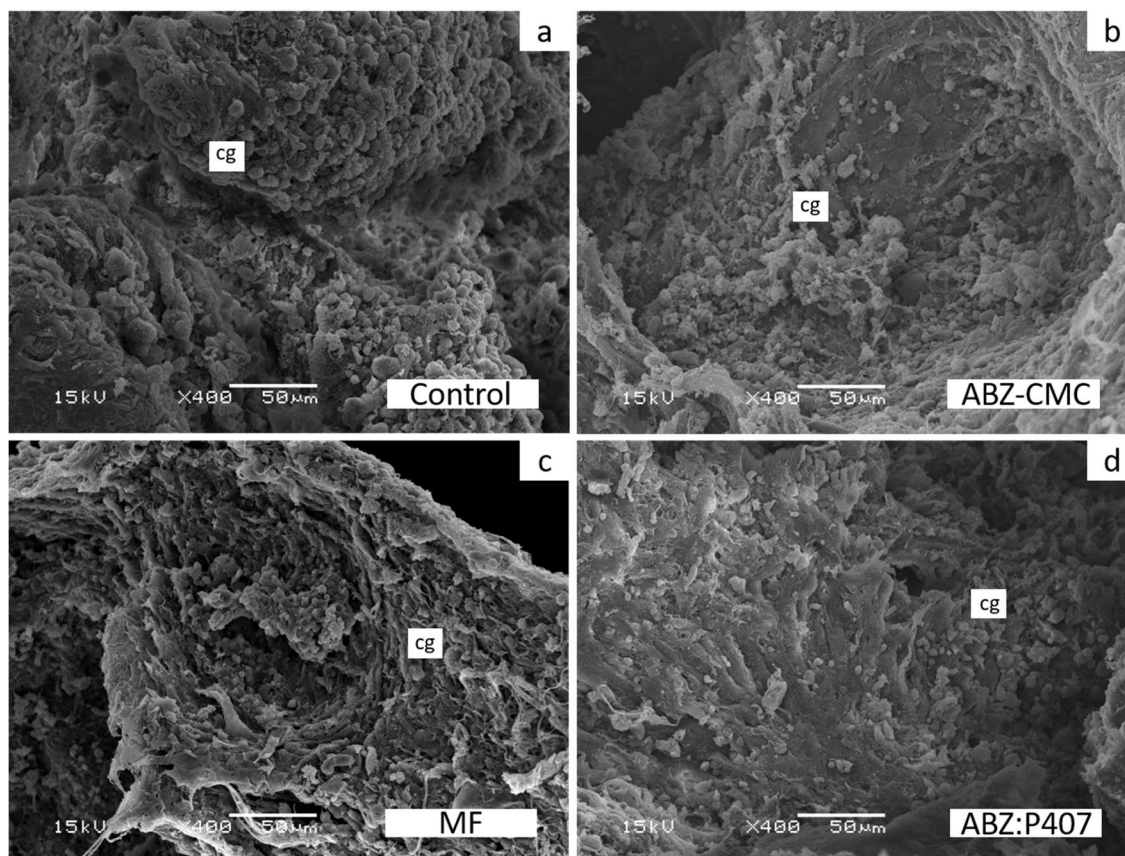
ratones de ambos grupos control (control agua  $4,19 \pm 2,4$  g; control P407  $3,77 \pm 2,6$  g). Todos los tratamientos generaron una disminución en el peso medio de los quistes desarrollados en los animales. Si bien no hubo diferencias estadísticas entre los 3 tratamientos (ABZ, MF y DS), sólo los ratones tratados con la DS de ABZ evidenciaron una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) del peso de los quistes ( $0,57 \pm 0,6$  g) en comparación con los grupos control (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7.** Estudio de eficacia clínica. Peso medio ( $g \pm DE$ ) de quistes recuperados (10 semanas post infección) de ratones infectados con *E. multilocularis* de los grupos control agua, control P407, ABZ-CMC, MF4 y DS4. En todos los casos la dosis de ABZ utilizada fue de 25 mg/kg y el tratamiento se realizó durante 30 días cada 24 horas. .

Grupos	Peso (g) de los quistes Media $\pm$ DE
Control agua	$4,19 \pm 2,4$
Control P407	$3,77 \pm 2,6$
ABZ-CMC	$0,95 \pm 0,7$
MF4	$0,61 \pm 0,3$
ABZ:P407 (DS4)	$0,57 \pm 0,6^*$

\*Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo ABZ:P407 y ambos grupos control ( $P < 0,05$ ).

Al analizar la ultraestructura de la capa germinativa de los quistes recuperados de los ratones pertenecientes a los grupos del estudio de eficacia clínica, los quistes control mostraron la ultraestructura característica de los metacestodes de *E. multilocularis* (Fig. 3.10 a). Por el contrario, los quistes de todos los grupos tratados evidenciaron algunas áreas de la capa germinativa con disminución del número de células (Figs. 3.10 b, 3.10 c y 3.10 d), siendo la extensión del daño mayor en los metacestodes recuperados de los ratones tratados con la DS4. En este último caso, las alteraciones ultraestructurales fueron muy evidentes, las zonas sin células de la capa germinativa de los quistes recuperados de los ratones tratados con la DS4 son muy extensas, como se observa en la Fig. 3.10 d.



**Figura 3.10.** Microscopía electrónica de barrido de quistes de *E. multilocularis* obtenidos de ratones tratados con ABZ-CMC, MF4 y ABZ:P407 durante el estudio de eficacia clínica. a) Grupo control, observar la capa germinativa compuesta por diferentes tipos celulares. b) Capa germinativa de quiste recuperado de ratones luego del tratamiento con la suspensión de ABZ-CMC. c) Quiste perteneciente al grupo de MF4. d) Metacestode recuperado de animales del grupo ABZ:P407. Observar las extensas áreas de la capa germinativa con pérdida de células.

### 3.6 Conclusiones parciales

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de las muestras ensayadas no se observan diferencias significativas entre la MF4 y la DS4, sin embargo, se observó una notable diferencia en los ensayos de disolución y en el estudio de eficacia clínica. En este marco, los resultados obtenidos revelaron que el uso de P407 como portador en las DS de ABZ mejoró notablemente su solubilidad y velocidad de disolución en comparación con el ABZ puro y la ABZ-FC. El polímero mantuvo un nivel deseable de un estado de sobresaturación en el medio de disolución al evitar la cristalización mediada por solvente durante el período de tiempo necesario para el proceso de absorción. Sin embargo, las DS mostraron un mejor comportamiento que las MF con la

misma proporción de P407, observados en su mayor velocidad de disolución inicial y valores de tiempo de muestreo y menores tiempos de disolución.

Los resultados de la farmacocinética llevados a cabo en ratones no fueron concluyentes debido a que el modelo murino para este tipo de sistemas no es adecuado. El ratón posee un tracto GI muy pequeño y no tiene condiciones hidrodinámicas para marcar diferencias entre DS y MF sin embargo en modelos de infección los resultados suelen ser marcados.

En el estudio de eficacia clínica, aunque todos los tratamientos produjeron una disminución del desarrollo de quistes, el ABZ formulado como DS presentó diferencias estadísticamente significativas con los grupos control, demostrando una eficacia del 86 %. Al analizar la ultraestructura de los quistes, todos los tratamientos generaron alteraciones en las células de la capa germinativa. Sin embargo, la extensión del daño producida por la DS fue mayor en comparación a los otros grupos tratados.

Estos enfoques hacen que las DS sean una estrategia alternativa muy prometedora porque la mejora de estas propiedades podría resultar en una tasa de absorción más rápida y, por lo tanto, en una mayor biodisponibilidad de compuestos poco solubles en agua como ABZ. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para avanzar en el desarrollo de estas formulaciones considerando la inestabilidad termodinámica inherente asociada a las DS, lo que podría conducir a la relajación, la nucleación y la cristalización durante el almacenamiento. Sin lugar a dudas, comprender los límites de las DS y considerarlos al desarrollar los sistemas de administración de fármacos será una decisión clave para la aplicación exitosa de estos materiales.

## Referencias

- Castro, S. G., et al. (2010). "Improved Albendazole Dissolution Rate in Pluronic 188 Solid Dispersions." AAPS PharmSciTech **11**(4): 1518-1525.
- Castro, S. G., et al. (2013). "Comparative Plasma Exposure of Albendazole after Administration of Rapidly Disintegrating Tablets in Dogs." BioMed Research International **2013**: 920305.
- Castro, S. G., et al. (2013). "Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions." Pharmaceutical development and technology **18**(2): 434-442.
- Ei-Badry, M., et al. (2013). "Performance of poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide." Farmacia **61**(6): 1137-1150.
- Felton, L. A. (2013). Remington-essentials of pharmaceuticals, Pharmaceutical Press.
- Garala, K., et al. (2013). "Formulation and evaluation of periodontal in situ gel." International journal of pharmaceutical investigation **3**(1): 29.
- Gunasekaran, S. and D. Uthra (2008). "Vibrational spectra and qualitative analysis of albendazole and mebendazole." Asian Journal of Chemistry **20**(8): 6310.
- Lozano, M. d. C., et al. (2012). "Manual de tecnología farmacéutica." Fotoletra SA: Elsevier España, SL.
- Martinez-Marcos, L., et al. (2016). "A novel hot-melt extrusion formulation of albendazole for increasing dissolution properties." International Journal of Pharmaceutics **499**(1-2): 175-185.
- Pranzo, M. B., et al. (2010). "Enantiotropically Related Albendazole Polymorphs." Journal of pharmaceutical sciences **99**(9): 3731-3742.
- Socrates, G. (2004). Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts, John Wiley & Sons.
- Torrado, S., et al. (1996). "Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions." International Journal of Pharmaceutics **140**(2): 247-250.
- Vila Jato, J. L. (2001). Tecnología farmacéutica. Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. José Luis Vila Jato (ed).
- Wisher, D. (2012). "Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed." Journal of the Medical Library Association : JMLA **100**(1): 75-76.



CAPÍTULO 4: BZL.  
CARACTERIZACIÓN  
Y ESTUDIOS *IN*  
*VITRO/IN VIVO*

## 4. Caracterización de las dispersiones sólidas de Benznidazol

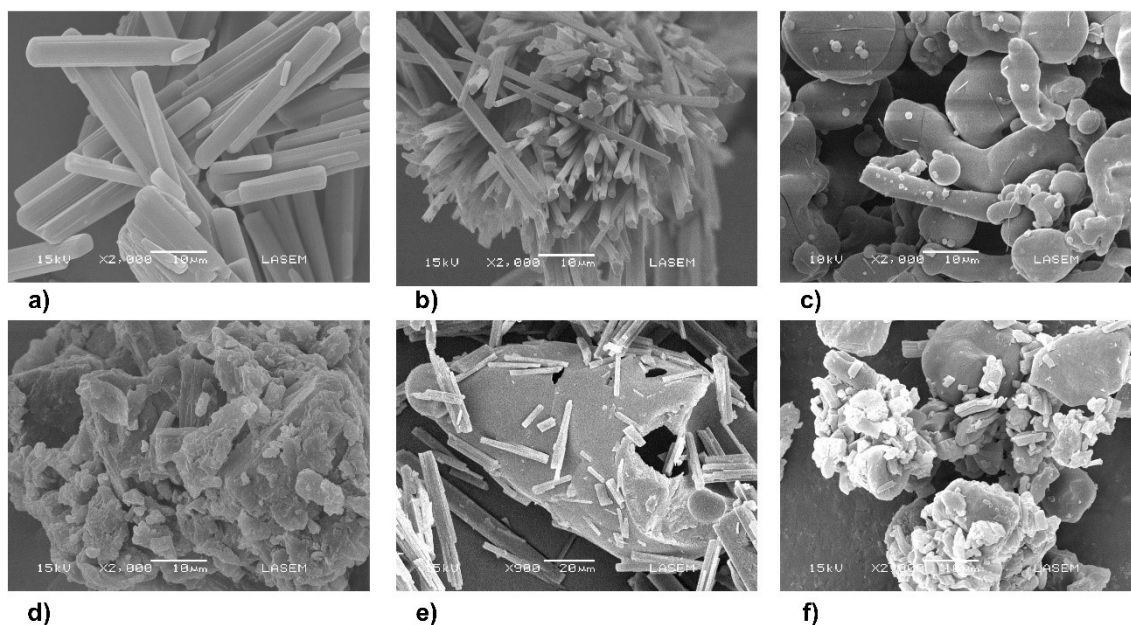
Tomando en consideración lo anteriormente expuesto sobre las propiedades biofarmacéuticas del BZL, a continuación se muestran los resultados obtenidos en la preparación y caracterización de las DS de BZL utilizando como portador Poloxamer 407.

En forma general, para las DS obtenidas y sus correspondientes MF (controles) se realizaron diversas determinaciones con el objeto de caracterizar las propiedades fisicoquímicas de relevancia, como así también otros ensayos que permiten avanzar en la caracterización biofarmacéutica de los sistemas entre los que se incluyen los ensayos de disolución. Además se realizaron pruebas *in vitro* para determinar la  $CI_{50}$ , es decir, medir la potencia de las DS para inhibir una función biológica o bioquímica específica en el parásito, y ensayos *in vivo* para estudiar los modelos de infección.

### 4.1 Caracterización físico-química

#### 4.1.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica se utilizó para determinar la morfología de BZL-p, BZL-e, P407, DS8, MF8 y BZL-FC. Tanto BZL-p como BZL-e se observan como cristales irregulares en forma de agujas de diferentes tamaños (Fig. 4.1a y 4.1b). P407 se presenta como esferas de superficie lisa y forma irregular de diferentes tamaños (Fig. 4.1c). La Fig. 4.1d muestra que la DS8 está compuesta por partículas de diferentes tamaños con superficie irregular, en las que los componentes, P407 y BZL, no pudieron distinguirse morfológicamente. Este resultado podría indicar la formación de una nueva estructura en la DS debido a la miscibilidad del fármaco en el polímero. Por el contrario, en la MF8, el BZL se distribuye en la superficie del P407, y se observa que cada compuesto mantiene su propia estructura (Fig. 4.1e). La Fig. 4.1f corresponde al análisis microscópico de la BZL-FC y muestra que los cristales de BZL estaban en baja proporción, ya que representan alrededor del 20% p/p de la formulación comercial. Esto podría deberse a que el BZL fue adsorbido en los excipientes de la formulación durante el proceso de manufactura.



**Figura 4.1.** Microscopía electrónica de barrido de: a) BZL-p, b) BZL-e, c) P407, d) DS8, e) MF8 y f) FC-BZL.

#### 4.1.2 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Para determinar el comportamiento térmico, se obtuvieron termogramas para el BZL-e, P407, DS8 y MF8 por CDB (Fig. 4.2). Tanto el BZL-e y P407 presentaron un pico endotérmico a 191,8°C (126 J/g) y a 53,31°C (127 J/g), respectivamente, correspondientes a sus puntos de fusión (Lima, Soares-Sobrinho et al. 2011, Leonardi, Bombardiere et al. 2013, Palmeiro-Roldán, Fonseca-Berzal et al. 2014). También se pudo detectar que el pico endotérmico correspondiente al BZL se atenuó en la MF8 (60 J/g), mientras que casi desapareció en la DS8, probablemente porque el BZL se disolvió en el portador fundido a lo largo del ensayo. El pico correspondiente a la temperatura de fusión del P407 no experimentó un cambio importante ni en la MF8 (45 J/g) ni en la DS8 (77 J/g), revelando un estado ordenado en ambas preparaciones. Sin embargo, el pico de P407 se desplazó ligeramente tanto en la DS8 como en la MF8, lo que indicaría la formación de una mezcla eutéctica entre los 2 componentes (fármaco y polímero) durante el ensayo. La ausencia de un pico de fusión correspondiente al fármaco en el termograma de la DS8 se puede deber a la formación de una mezcla monofásica debido a la total solubilidad del BZL durante el ensayo, impidiendo la visualización de un pico endotérmico. En el caso de la MF8, el punto de fusión del fármaco se redujo debido a una solubilización parcial del BZL. Estos resultados coinciden con lo observado por Lima y colaboradores (Lima, Soares-Sobrinho et al. 2011).

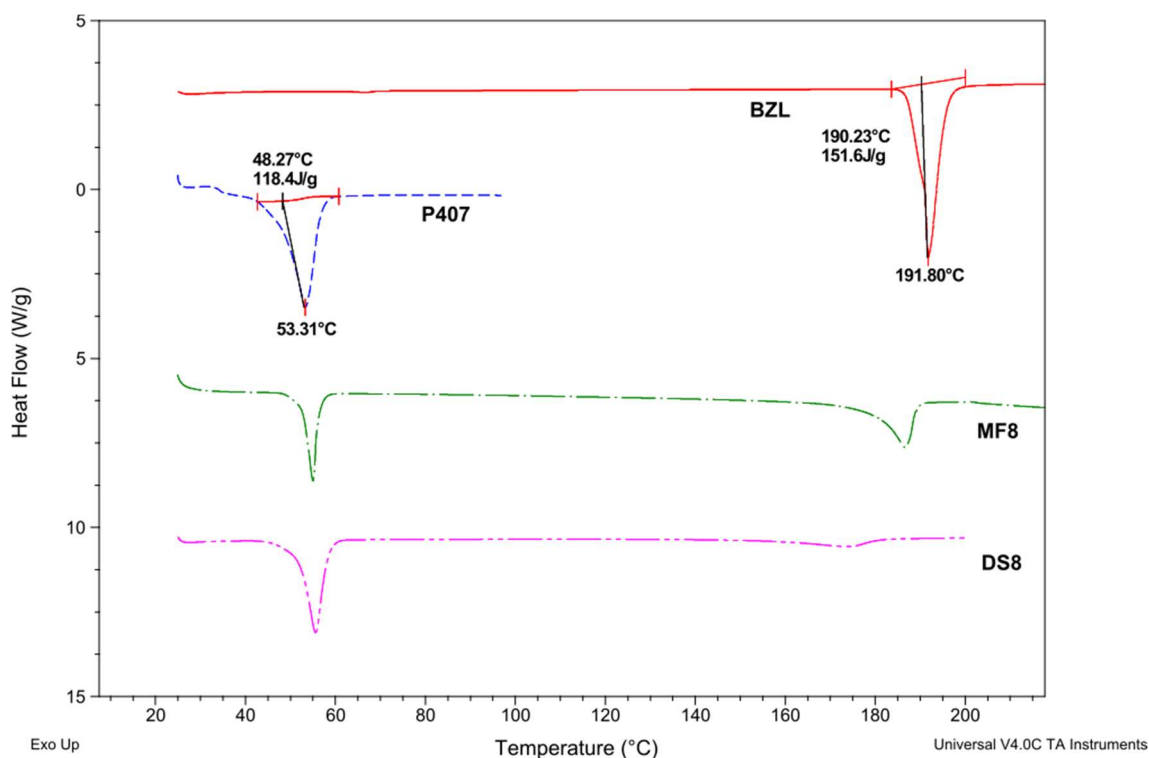


Figura 4.2. Termogramas correspondientes a BZL-e, P407, MF8 y DS8.

#### 4.1.3 Difracción de rayos X (D-RX)

Las muestras de BZL-e, P407, DS8 y MF8 se analizaron mediante D-RX para determinar el estado cristalino del fármaco en los materiales. Como se muestra en la Fig. 4.3, el perfil de difracción de BZL-e se observa su naturaleza cristalina, mostrando picos de difracción a 7,41°; 10,9°; 16,9°; 22°; 23,7° y 25,4°, en concordancia con lo informado para el BZL por otros autores (Lima, Soares-Sobrinho et al. 2011, Soares-Sobrinho, Santos et al. 2012). En bibliografía se reportan 2 picos característicos para el P407 a 19,2° y 24,0° (Ei-Badry, Hassan et al. 2013) que en la Fig. 4.3 se observan a 19,2° y 23,2°. Los espectros de la MF8 y la DS8 mostraron que algunos picos de BZL se atenuaron, lo que indica una pérdida parcial del estado cristalino de BZL en la DS8, probablemente debido a la solubilización de parte del fármaco en la matriz del polímero, según lo informado por otros autores (Lima, Soares-Sobrinho et al. 2011, Soares-Sobrinho, Santos et al. 2012). Esta atenuación en los picos del BZL puede contribuir a la mejora de la solubilidad ya que las formas amorfas son más fácilmente solubles que las formas cristalinas (Lima, Soares-Sobrinho et al. 2011).

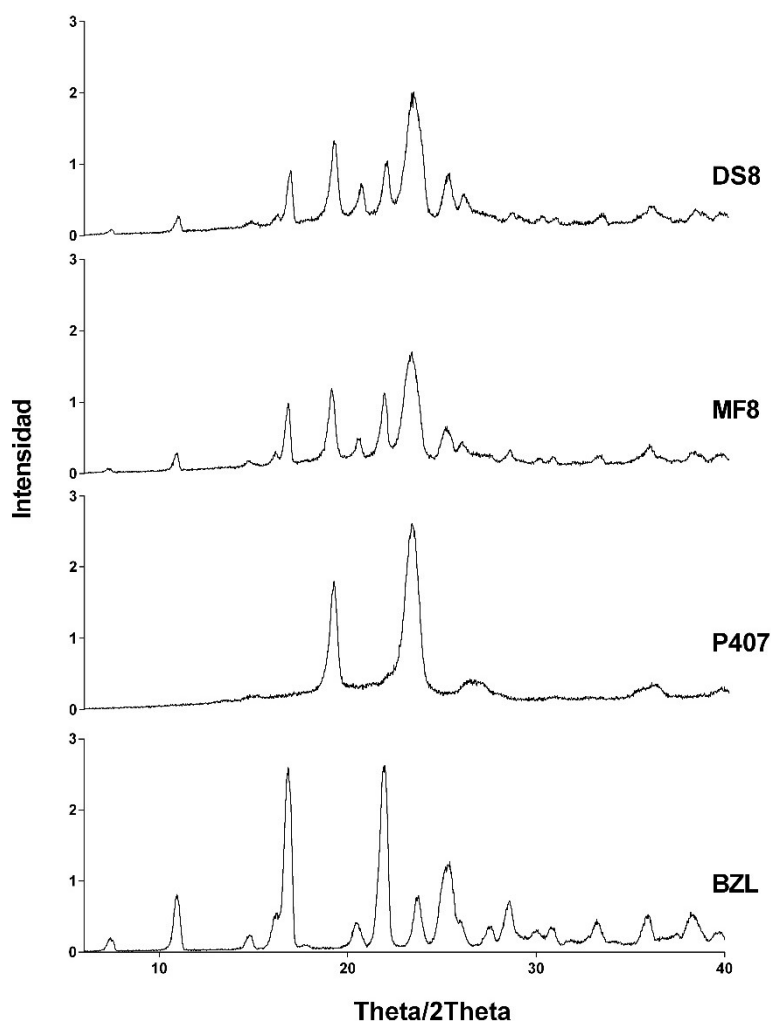


Figura 4.3. Difractogramas de Rayos X para BZL-e, P407, MF8 y DS8.

## 4.2 Estudios de solubilidad y saturación

### 4.2.1 Estudio de solubilidad de fases

Se estudió el efecto del P407 sobre la solubilidad del BZL-e mediante ensayos de disolución en HCl 0,1 N (pH = 1,2) a 25°C y 37°C (Fig. 4.4). Se seleccionaron dos temperaturas debido a que el BZL al ser específico para una enfermedad desatendida, no hay disponible en bibliografía suficientes datos. Se observa que la solubilidad de BZL aumenta linealmente conforme aumenta la concentración del polímero. Para ambas temperaturas ensayadas, se observa un aumento de casi 2 veces cuando el contenido de P407 fue del 20% p/p en comparación con el 5% p/p. Este comportamiento era esperado ya que las concentraciones de P407 en este ensayo estaban por encima de su CMC,

reportada a  $2,8 \times 10^{-6}$  M (Kabanov, Batrakova et al. 2002). A medida que la concentración de P407 aumenta llegando a la CMC, las cadenas del polímero se asocian para formar micelas con un núcleo hidrófobo que incorpora moléculas insolubles en agua, como BZL, promoviendo su solubilidad. El aumento de la solubilidad del BZL también podría explicarse por la disminución de la tensión interfacial entre el fármaco y el medio de disolución provocado por el P407 (SHARMA, JAIN et al. 2013).

Al extrapolar las líneas a 0% p/p de P407, los valores de solubilidad de BZL se estimaron en  $0,266 \pm 0,013$  mg/ml a 25°C y  $0,486 \pm 0,027$  mg/ml a 37°C. Estos valores coinciden con los obtenidos experimentalmente para BZL en HCl 0,1 N ( $0,248$  mg/ml y  $0,410$  mg/ml, a 25°C y 37°C, respectivamente). Con estos resultados se puede concluir que la solubilidad del BZL está fuertemente influenciada por la temperatura.

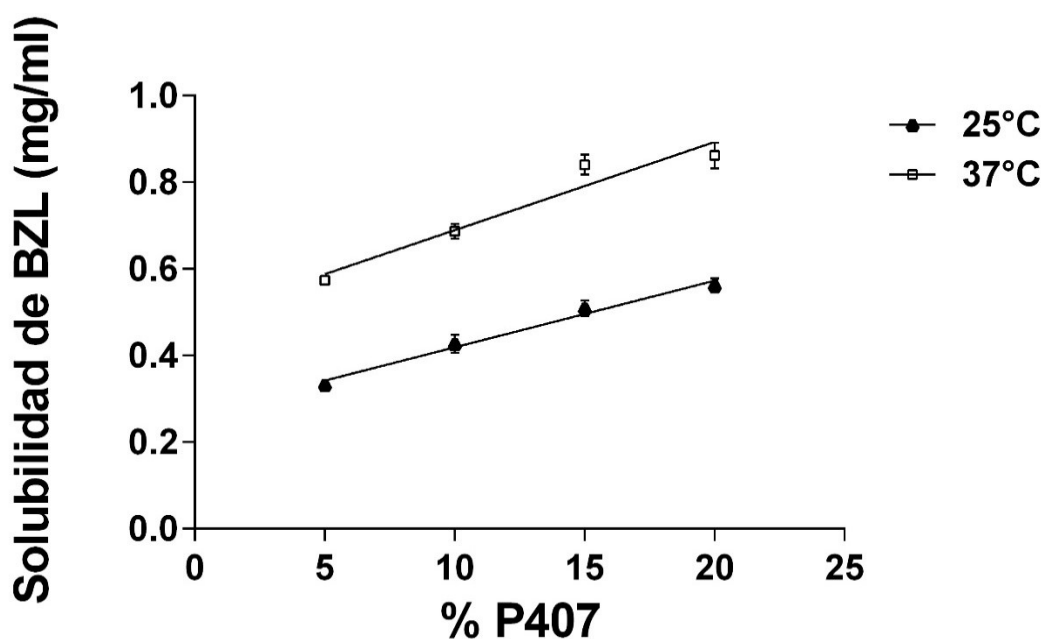


Figura 4.4. Influencia del contenido de P407 en la solubilidad de BZL en HCl 0,1N.

#### 4.2.2 Estudio de solubilidad en saturación

La solubilidad en saturación del BZL también aumentó significativamente con la temperatura, tanto para la DS8 como para la MF8, siendo de  $0,260 \pm 0,001$  y  $0,274 \pm 0,010$  mg/ml a 25°C; y  $0,420 \pm 0,012$  y  $0,428 \pm 0,007$  mg/ml a 37°C, respectivamente.

### 4.3 Caracterización biofarmacéutica

La biodisponibilidad a menudo está directamente relacionada con la extensión y el mantenimiento del estado de sobresaturación generado por una DS (Newman, Knipp et al. 2012), por lo tanto, el rendimiento de la disolución se puede usar para predecir el comportamiento *in vivo*. Es por este motivo que las pruebas de disolución en todas las etapas de desarrollo, desde los estudios de selección hasta la evaluación de la forma de dosificación final, pueden proporcionar información sobre cómo la formulación y los parámetros del proceso pueden afectar el rendimiento *in vivo*.

La Fig. 4.5 muestra los resultados de los estudios de disolución *in vitro* para la BZL-FC, BZL-e y sus mezclas binarias (DS8 y MF8) en HCl 0,1 N. Los datos experimentales se ajustaron utilizando nuestro modelo de perfil de disolución de fármacos, deducido por un análisis teórico que considera una expresión cinética de segundo orden para el proceso.

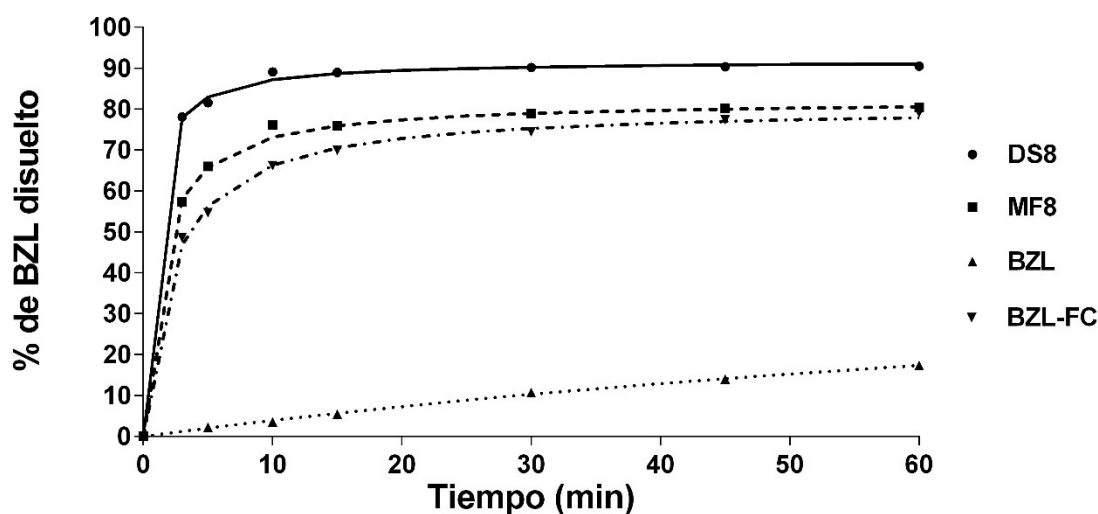


Figura 4.5. Perfiles de disolución de BZL en HCl 0,1 N

La Tabla 4.1 muestra los valores de los parámetros del modelo, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) para cada caso.

Tabla 4.1. Parámetros del modelo cinético

Muestra	Parámetros del modelo				VDEI ( $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$ )
	$a$ ( $\% \text{ min}^{-1}$ )	$b$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$s$ (%)	
DS8	170,2272	1,85281	0,9991	0,95	195,6804
MF8	66,0302	0,80385	0,9964	1,63	73,1025
BZL-e	0,4225	0,00764	0,9983	0,27	0,4694
BZL-FC	37,2440	0,46137	0,9983	1,08	48,6703

Los valores del coeficiente de correlación (de 0,9964 a 0,9991) y las desviaciones estándar (de 0,27 a 1,63) sugirieron un buen ajuste de los datos experimentales y respaldaron la precisión del modelo.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que el valor del parámetro  $a$  no cambia con el tiempo para una dada muestra, y que cuando  $t = 0$  el parámetro  $a$  es igual a la velocidad de disolución inicial ( $VDI$ ), y según los datos de la Tabla 4.1, se pudo observar que la velocidad de disolución inicial de la DS8 es cerca de 3, 4 y aproximadamente 400 veces más rápida que la MF8, BZL-CF y BZL-e, respectivamente. Esto es importante ya que aunque el polímero aumenta la solubilidad del BZL tanto en la DS8 como en la MF8, la mejora en la velocidad de disolución inicial de las DS también desempeñaría un papel fundamental en la biodisponibilidad del fármaco, teniendo en cuenta que se desea una administración oral. De manera similar, a partir de los valores del parámetro  $a$ , y considerando que el volumen del ensayo es de 900 ml y que 100 mg corresponden a 100% p/p de BZL, se puede calcular un parámetro absoluto llamado velocidad de disolución específica inicial (VDEI) ( $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$ ) (Tabla 4.1). Este parámetro es la VDI por unidad de volumen del medio de disolución. Este valor muestra el mismo comportamiento que la velocidad de disolución inicial entre las diferentes preparaciones evaluadas. Estos resultados permiten concluir que el P407 utilizado como portador para la preparación de las DS produce un aumento significativo en la velocidad de liberación inicial del BZL en comparación con las otras preparaciones.

Otros parámetros como el tiempo de muestreo ( $t_{min}$ ),  $ED$  y el tiempo de disolución ( $t_{x\%}$ ), se utilizaron para evaluar el comportamiento de las diferentes preparaciones. Cabe destacar que la  $ED$  considera los efectos de la cantidad de fármaco disuelto, así como la



velocidad de disolución en el proceso de disolución. Además, dado que la  $ED$  está relacionada matemáticamente con la integral del perfil de disolución del fármaco, el efecto del error experimental y las desviaciones de correlación se minimizan. Por estas razones,  $ED$  podría ser el mejor parámetro para comparar diferentes formulaciones de fármacos.

La Tabla 4.2 muestra el  $t_{tmin}$  a 5, 10, 15 y 30 min;  $ED$  a los 30 min y  $t_{80\%}$ . En todos los tiempos de muestreo, la DS8 mostró un mayor porcentaje de BZL disuelto en comparación con las otras preparaciones. El tiempo necesario para una disolución del 80% de BZL para la DS8 fue casi 13 veces menor que el de la MF8 y aproximadamente 66 veces menor que el necesario para la BZL-FC. Las farmacopeas utilizan este parámetro para establecer un límite de aceptación en los ensayos de disolución (Costa and Lobo 2001), por ejemplo, un  $t_{45min} \geq 80\%$ , que es lo mismo que un  $t_{80\%} \leq 45$  min, indica que la liberación es inmediata. Se observó que este límite de aceptación solo es alcanzado completamente por la DS8. Aunque el  $t_{80\%}$  de la MF8 es casi aceptable, el valor de BZL-FC está lejos del deseado y no se alcanzó matemáticamente para BZL-e.

**Tabla 4.2.** Parámetros para el método de análisis estadístico independiente

Muestra	Tiempo de muestreo				$ED_{30}$ (%)	$t_{80\%}$ (min)	$TMD_{65\%}$ (min)	$TMD_{75\%}$ (min)
	$t_5$	$t_{10}$	$t_{15}$	$t_{30}$				
DS8	81,6	89,1	90,2	90,3	85,2	3,6	0,40	0,58
MF8	65,9	76,2	75,9	79,9	71,2	46,4	1,22	2,08
BZL-e	2,3	3,6	5,5	10,7	5,5	NA*	NA*	NA*
BZL-FC	54,7	66,2	69,90	74,5	65,0	238,7	2,24	4,01

NA\*: No alcanzado

Entre los diferentes métodos disponibles para comparar los perfiles de liberación de fármacos (Costa and Lobo 2001), se eligieron los métodos estadísticos independientes del modelo, los que incluyen tests que relacionan los parámetros obtenidos a partir del ensayo de disolución con los de una formulación de referencia. Una de las pruebas más utilizadas es el  $TMD$ . Para comparar el perfil de disolución de DS8 con los de MF8 y BZL-FC, se calcularon  $TMD_{65\%}$  y  $TMD_{75\%}$  y se presentan en la Tabla 4.2. En ambos casos, DS8 presentó el  $TMD$  más bajo, seguido de la MF8 y la BZL-FC, mientras que BZL-e se mantuvo

fuera del análisis debido a su baja solubilidad en agua. Se desea un *TMD* bajo cuando se diseña una nueva formulación para su liberación inmediata mediante administración oral.

Siguiendo el método de análisis independiente y considerando la relación entre todos los parámetros determinados a partir de los perfiles de disolución, la DS8 se destacó como una alternativa prometedora para una rápida disolución de BZL en el fluido gástrico. Se observaron diferencias significativas (nivel de confianza del 95%) en cada parámetro estimado para las diferentes formulaciones de BZL. Estos resultados mostraron que la DS8 tuvo el mejor rendimiento según el tiempo de muestreo, la *DE*, el tiempo de disolución y el *TMD*.

#### 4.4 Pruebas *in vitro*: ensayos de bioactividad

Dado que la DS8 mostró el mejor desempeño en las determinaciones *in vitro*, se realizó el ensayo de bioactividad para tener una indicación de su comportamiento en los parásitos de *T. cruzi*. Los valores de *CI*<sub>50</sub> se determinaron para DS8 y BZL-e, en los diferentes linajes de *T. cruzi*, y se observan en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Valores de *CI*<sub>50</sub> para los diferentes linajes de *T. cruzi*

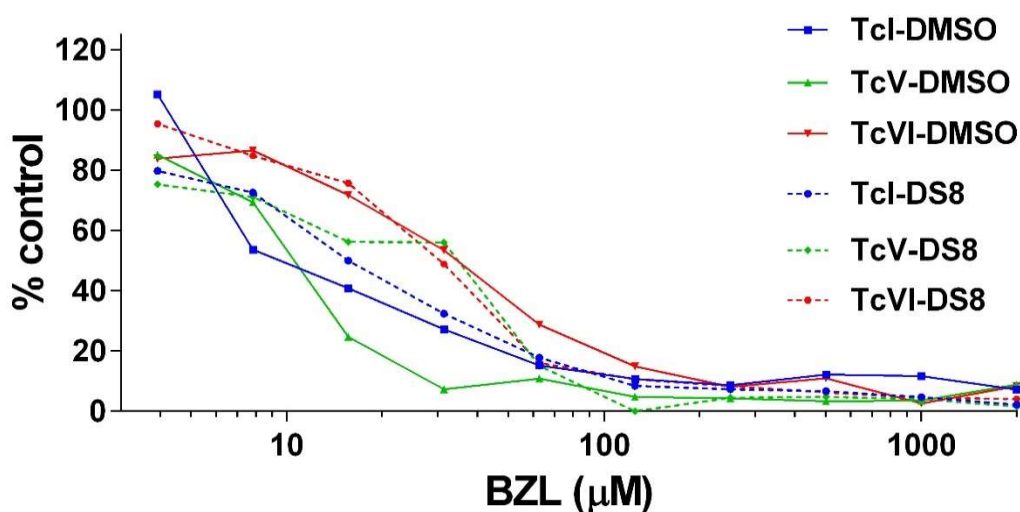
Linaje	BZL-e en DMSO	DS8 en agua
TcI	5,4 ± 0,9 μM	10,2 ± 1,9 μM
TcV	8,3 ± 3,5 μM	25,3 ± 11,3 μM
TcVI	26,1 ± 0,9 μM	33,1 ± 3,8 μM

Debido a que la DS8 no se preparó en condiciones estériles, se detectó una concentración baja de bacterias en la formulación, que fue disminuyendo en paralelo a las diluciones sucesivas. Las bacterias, al tener mitocondrias activas pueden metabolizar el MTT, causando un incremento en la absorbancia y afectando el ensayo colorimétrico. Por esta razón no fue posible determinar con exactitud la capacidad tripanomicida de la DS8, siendo necesario modificar el proceso de obtención de la misma y evitar la contaminación bacteriana. Cabe mencionar que para las pruebas *in vitro* generalmente se emplea DMSO para disolver compuestos con baja solubilidad en agua, como el BZL. Para el ensayo con la DS8, se evitó el uso del DMSO porque la formulación se resuspendió fácilmente en el medio

de cultivo, lo cual representa una ventaja de la nueva formulación. Sin embargo, el ANOVA, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $CI_{50}$  de DS8 vs. BZL-e en DMSO, justificadas por la mayor absorbancia de las bacterias presentes en DS8.

La susceptibilidad de los diferentes linajes a BZL se determinó por ANOVA empleando los resultados de BZL-e en DMSO. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los linajes TcI y TcV vs. TcVI ( $p = 0,001$ ). Estos resultados indicaron que TcI y TcV tuvieron una mayor susceptibilidad hacia BZL en comparación con TcVI. En este sentido, fue un hallazgo importante establecer que el linaje TcV, de mayor prevalencia en el NOA, es susceptible a BZL.

La Fig. 4.6 muestra la curva de supervivencia para cada formulación utilizando los datos obtenidos de todos los ensayos. Las diferencias encontradas en los valores de  $CI_{50}$  y las curvas de supervivencia no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados indican que el uso de P407 como portador no alteró la actividad tripanocida de BZL.

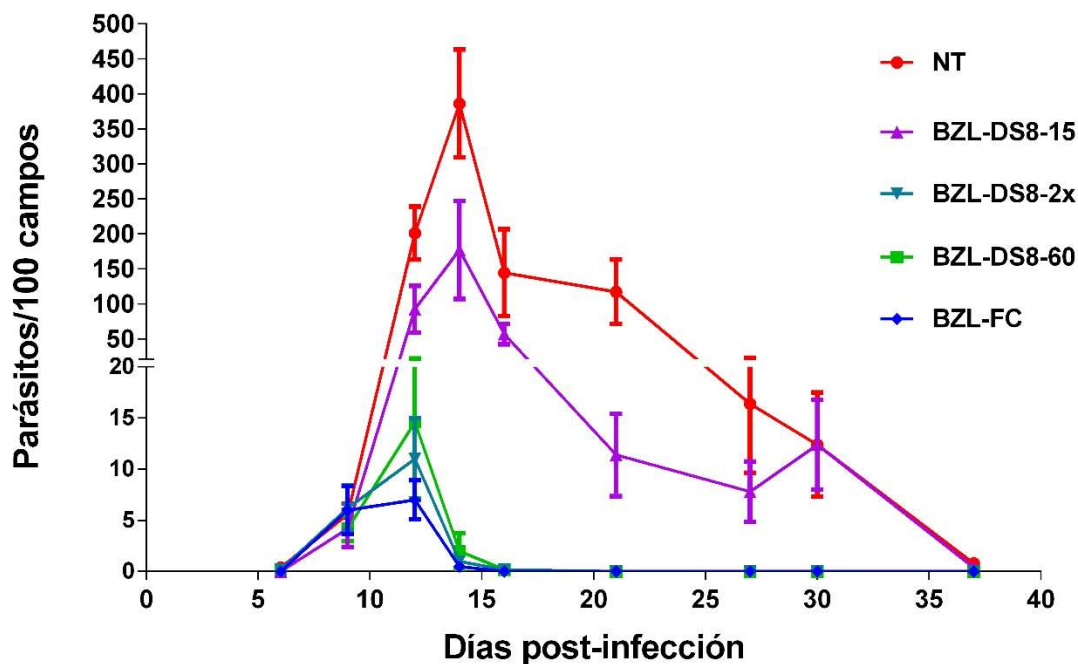


**Figura 4.6.** Curvas de supervivencia de epimastigotes de diferentes linajes de *T. cruzi* tratados con BZL-e (línea continua) y DS8 (línea de puntos) para 48 hs ( $n = 3$  determinaciones). Los valores fueron referidos como % de parásitos control (no tratados).

#### 4.5 Modelos de infección con *T. cruzi*

La Fig. 4.7 muestra las curvas de parasitemia de ratones sometidos a un breve programa de tratamiento durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. La cantidad de

parásitos que circulan en la sangre periférica alcanzó el valor máximo a los 14 días p-i en ratones no tratados. Después del pico, se detectó una disminución gradual de la parasitemia en la sangre a medida que los animales superaban la fase aguda. Los ratones sometidos al tratamiento con BZL-DS8-15 mostraron un aumento de la parasitemia similar al observado en el grupo no tratado, pero el aumento de la parasitemia general fue menos pronunciado. Entre los otros esquemas de tratamiento, BZL-FC fue el más eficaz para prevenir el aumento de la carga parasitaria, así como para reducir los niveles de parasitemia después de la infección. Los tratamientos con BZL-DS8-60 y BZL-DS8-60-2x fueron igual de efectivos que los tratamientos con BZL-FC, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de parasitemia y en el pico de máxima parasitemia entre BZL-DS8-60, BZL-DS8-60-2x y BZL-FC en los ratones tratados. Sobre la base de las diferencias estadísticamente significativas en la carga parasitaria en el día 14 p-i (ANOVA de una vía,  $p = 0.05$ ), se observaron dos grupos. El grupo con parasitemia alta incluyó ratones infectados pertenecientes al grupo no tratado y aquellos tratados con BZL-DS8-15. El otro grupo con parasitemia baja incluyó ratones tratados con BZL-FC, BZL-DS8-60 y BZL-DS8-60-2x. En conjunto, estos resultados sugieren que BZL-DS8 a una dosis de 15 mg/kg no fue lo suficientemente eficaz, mientras que BZL-DS8 a 60 mg/ Kg/día todos los días o dos veces a la semana fue tan eficaz como BZL-FC para controlar la parasitemia aguda en ratones.



**Figura 4.7.** Parasitemia en sangre de ratones tratados durante 30 días con BZL-FC, y la DS8 en tres esquemas diferentes (BZL-DS8-15, BZL-DS8-60 y BZL-DS8-60-2x), y sin tratar (NT) durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

#### 4.6 Conclusiones parciales

Las DS de BZL con P407 como portador puede ser una plataforma efectiva para la liberación inmediata por administración oral, ya que permite una mayor solubilidad en agua y una velocidad de disolución más rápida. Esto podría resultar en una mejor absorción y mayor biodisponibilidad, mejorando así el comportamiento biofarmacéutico de BZL. Además, la DS8 mantuvo la efectividad de BZL en relación con su actividad tripanocida. Aunque las DS son de particular interés debido que mejoran la BD oral de fármacos poco solubles, estos son sistemas desafiantes considerando su inestabilidad termodinámica inherente debido a su estado de alta energía en comparación con sus contrapartes cristalinas.

También es posible concluir que en un modelo de infección aguda en ratones hembras Swiss infectadas con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* tratada durante 30 días mostró que el BZL a 50 o 60 mg/Kg/ día en formulaciones comerciales o en DS era igual de efectivo para reducir la parasitemia.

Una nueva formulación líquida de BZL sería útil ya que permitirá una mejor dosificación, facilitando la frecuencia de administración y, por lo tanto, mejorando la adherencia al tratamiento. Estas ventajas beneficiarían a los pacientes chagásicos, en particular a la población pediátrica.

## Referencias

Costa, P. and J. M. S. Lobo (2001). "Modeling and comparison of dissolution profiles." European Journal of Pharmaceutical Sciences **13**(2): 123-133.

Ei-Badry, M., et al. (2013). "Performance of poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide." Farmacia **61**(6): 1137-1150.

Kabanov, A. V., et al. (2002). "Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." Journal of Controlled Release **82**(2-3): 189-212.

Leonardi, D., et al. (2013). "Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats." International journal of biological macromolecules **62**: 543-548.

Lima, Á. A. N., et al. (2011). "The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benznidazole solubility." Journal of pharmaceutical sciences **100**(6): 2443-2451.

Newman, A., et al. (2012). "Assessing the performance of amorphous solid dispersions." Journal of pharmaceutical sciences **101**(4): 1355-1377.

Palmeiro-Roldán, R., et al. (2014). "Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease." International Journal of Pharmaceutics **472**(1): 110-117.

SHARMA, A., et al. (2013). "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID DISPERSIONS OF CARVEDILOL WITH POLOXAMER 188." Journal of the Chilean Chemical Society **58**: 1553-1557.

Soares-Sobrinho, J. L., et al. (2012). "Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers." Carbohydrate polymers **89**(2): 323-330.

# CONCLUSIONES



## Conclusiones generales

En el presente trabajo de Tesis doctoral se diseñaron y obtuvieron DS de albendazol y de benznidazol utilizando como portador el poloxamer 407, un polímero sintético con propiedades surfactantes.

Los resultados obtenidos revelaron que el uso del P407 como portador polimérico de las DS de albendazol mejoró notablemente su solubilidad y velocidad de disolución en comparación con el albendazol puro y la formulación comercial. Además, todas las DS obtenidas mostraron mayor velocidad de disolución inicial (de 3 a 20 veces) que las formulaciones convencionales. Por otra parte, todas las DS pueden ser consideradas sistemas de liberación inmediata.

Los resultados de la farmacocinética del Albendazol llevados a cabo en modelos murinos no fueron concluyentes. Esto podría deberse a que el modelo no sería el adecuado para este tipo de dispersiones sólidas de Poloxamer. Una posible explicación sería debido a que el tracto gastrointestinal del ratón no presenta condiciones hidrodinámicas para marcar diferencias entre los sistemas estudiados. Sin embargo, en modelos de infección los resultados suelen ser marcados por lo que sería necesario explorar otras alternativas para obtener resultados confiables.

En el modelo de hidatidosis, si bien todos los tratamientos produjeron una disminución del desarrollo de quistes, la DS de albendazol presentó diferencias estadísticamente significativas mostrando una eficacia del 86%. Al analizar la ultraestructura de los quistes, la extensión del daño producida por la DS fue mayor en comparación a los otros grupos tratados.

Con respecto a la evaluación de las DS de benznidazol basadas en poloxamer 407, se observó una marcada mejora en la solubilidad del fármaco y, por consiguiente, un notable aumento en la velocidad de disolución. Además, la DS obtenida mantiene la actividad tripanocida del fármaco.

El nuevo modelo matemático *Lumped*, desarrollado para procesos de liberación de fármacos y derivado de una expresión cinética de segundo orden, es simple; solo tiene dos parámetros y puede describir todo el perfil de liberación del fármaco, incluso para  $t = 0$ , a diferencia de la clásica expresión de ley de potencia, ajustando con un excelente índice de

correlación los resultados experimentales. Por otra parte, el modelo *Lumped* permite determinar parámetros de relevancia farmacéutica fundamentales para realizar estudios comparativos entre formulaciones farmacéuticas.

En un modelo de infección aguda en ratones infectados con *T. cruzi* tratados durante 30 días, se demostró que el benznidazol administrado como dispersión sólida o en una formulación comercial era igual de efectivo para reducir la parasitemia.

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida y actualmente representa uno de los mayores desafíos terapéuticos en la medicina tropical. En este contexto, la mejora de las propiedades biofarmacéuticas del benznidazol conducirá a un mejor manejo clínico para los pacientes.

Estos enfoques hacen que las dispersiones sólidas sean una estrategia alternativa muy prometedora porque ya que se observa una mejora de la velocidad de disolución de los fármacos estudiados. Sin embargo, a pesar de las muchas ventajas de las DS, el desarrollo de una forma farmacéutica con las DS sigue siendo un desafío debido a la tendencia intrínseca que poseen de volver espontáneamente a un estado cristalino más estable debido a las fuerzas motrices tanto termodinámicas como cinéticas. Es por este motivo que se requieren estudios adicionales para poder continuar con el desarrollo de estas formulaciones considerando otros factores inherentes a su estabilidad y otros aspectos farmacéuticos. Sin lugar a dudas, comprender los límites de las DS y considerarlos al desarrollar los sistemas de administración de fármacos será una decisión clave para la aplicación exitosa de estos materiales.

## Producción científica y tecnológica

### Producción científica y tecnológica relacionada a esta Tesis Doctoral

Trabajos publicados

1. **Dispersiones sólidas: Una estrategia tecnológica para aumentar la velocidad de disolución de fármacos en formas farmacéuticas sólidas.**

Autores: Simonazzi, Analía; Bermúdez, J. María; Palma, Santiago.

Revista: PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY.: Ediciones V.R. S.A.

Datos bibliográficos: 2015 vol. n°137. p64 - 70. ISSN 0147-8087.

2. **Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease.**

Autores: José Bermúdez, Carolina Davies, Analía Simonazzi, Juan Pablo Real, Santiago Palma.

Revista: Acta Tropica.

Datos bibliográficos: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>

3. **Development and *in vitro* evaluation of solid dispersions as strategy to improve albendazole biopharmaceutical behavior.**

Autores: Analía Simonazzi, Alicia Graciela Cid, Alejandro Javier Paredes, Laureano Schofs, Elio Emilio Gonzo, Santiago Daniel Palma y José María Bermúdez.

Revista: Therapeutic Delivery.

Datos bibliográficos: doi: 10.4155/tde-2018-0037

4. **Preparation and characterization of Poloxamer 407 solid dispersions as an alternative strategy to improve benznidazole bioperformance.**

Autores: Analía Simonazzi, Carolina Davies, Alicia G. Cid, Elio Gonzo, Luis Parada, José M. Bermúdez.

Revista: Journal of Pharmaceutical Sciences.

Datos bibliográficos: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.06.027>

5. **Solid dispersion technology as a strategy to improve the bioavailability of poorly soluble drugs.**

Autores: Alicia Graciela Cid‡, Analía Simonazzi‡, Santiago Daniel Palma y José María Bermúdez.

‡ Autores contribuyeron igualmente.

Revista: Therapeutic Delivery.

Datos bibliográficos: <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0007>

Presentaciones a congresos

1. **Preparation and preformulation studies of albendazole solid dispersions using poloxamer 407 as carrier polymer.**

Autores: Simonazzi Analía, Bermúdez José M, Cid Alicia y Palma Santiago.

Nombre del evento: 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas - RICiFa 2014.

Fecha y lugar del evento: 18 y 19 de septiembre de 2014, Córdoba, Argentina.

2. **Evaluation of novel solid dispersions with thermosensitive Poloxamer 407 as carrier for veterinary use.**

Autores: Analía Simonazzi, José María Bermúdez y Santiago Palma.

Nombre del evento: VI International Conference on Science and Technology of Composite Materials (COMAT 2015).

Fecha y lugar del evento: 7 y 8 de mayo de 2015, Buenos Aires, Argentina.

3. **Preparación de dispersiones sólidas utilizando poloxamer 407 como estrategia farmacéutica para vehiculizar principios activos poco solubles.**

Autores: Simonazzi, Analía; Bermúdez, José M. y Palma, Santiago.

Nombre del evento: X Jornadas de Ciencia y Tecnología de Facultades de Ingeniería del NOA.

Fecha y lugar del evento: 21 y 22 de mayo de 2015, Salta, Argentina.

4. **Tratamiento de la infección experimental aguda de *Trypanosoma cruzi* con dispersiones sólidas de benznidazol en un modelo murino.**

Autores: Davies Carolina; Simonazzi Analía; Sánchez-Negrette Olga; Ramos Federico; Mora M. Celia; Basombrío M. Angel; Bermúdez J. María; Parada L. Antonio.

Nombre del evento: VII Congreso Argentino de Parasitología.

Fecha y lugar del evento: 1 al 5 de noviembre de 2015, San Carlos de Bariloche, Argentina.

5. **Estudios farmacéuticos *in vitro* y evaluación de la eficacia *in vivo* de dispersiones sólidas para el tratamiento de la enfermedad de chagas.**

Autores: Analía Simonazzi, Carolina Davies, Olga Sanchez Negrette, Federico Ramos, Verónica Virgili, María Celia Mora, Miguel A Basombrío, Luis Parada, José Bermúdez.

Nombre del evento: VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas – XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) – III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética.

Fecha y lugar del evento: 4, 5 y 6 de noviembre de 2015, Córdoba, Argentina.

6. **Dispersiones sólidas de benznidazol: una nueva formulación para el antiguo tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi*.**

Autores: Davies Carolina, Simonazzi Analía, Ragone Paula, Cid Alicia, Sánchez Negrette Olga, Mora M. Celia, Ramos Federico, Bermúdez J. María, Parada L. Antonio.

Nombre del evento: Reunión conjunta de sociedades de biociencias. XXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP).

Fecha y lugar del evento: 13 al 17 de noviembre de 2017, Buenos Aires. Argentina.

**7. Dispersiones sólidas binarias como una estrategia para mejorar la disolución de fármacos de baja solubilidad acuosa.**

Autores: Simonazzi Analía, Cid Alicia G, Villegas Mercedes, Gonzo Elio Emilio, Palma Santiago, Bermúdez José María.

Nombre del evento: IV Congreso Argentino de Ingeniería – X Congreso Argentino de Enseñanza de la Ingeniería.

Fecha y lugar del evento: 19 al 21 de septiembre de 2018, Córdoba. Argentina

**8. Solid Dispersions based on poloxamer 407 as a strategy to improve benznidazol bioperformance against *Trypanosoma cruzi*.**

Autores: Simonazzi, Analía; Davies, Carolina; Campos, Santiago; Ramos, Federico; Mora, María Celia; Parada, Luis A; Bermúdez, José María.

Nombre del evento: Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018 4th Scientific Meeting of ResNet NPND.

Fecha y lugar del evento: 4 al 6 de diciembre de 2018, Buenos Aires. Argentina.

**9. Comparación de formulaciones de BZL como fármaco tripanocida.**

Autores: Analía Simonazzi, José Bermúdez, Mercedes Méndez, Carolina Davies.

Nombre del evento: I Jornadas de Estadística Aplicada.

Fecha y lugar del evento: 5 y 6 de diciembre de 2018, Salta. Argentina.

Otras publicaciones del autor

**1. Chapter 3: Nanotechnology applications in drug controlled release.**

Autores: Analía Simonazzi, Alicia Cid, Mercedes Villegas, Analía Romero, Santiago Daniel Palma, Jose María Bermudez.

Libro: Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems.

Datos bibliográficos: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00003-3>

**2. Challenges and opportunities in polymer technology applied to veterinary medicine**

Autores: José M Bermúdez, Alicia G Cid, M. V. Ramirez Rigo, Daniela Quinteros, Analía Simonazzi, Sergio Sanchez Bruni, Santiago Palma.

Revista: Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics

Datos bibliográficos: doi:10.1111/jvp.12079.