

**NANOCRISTALES DE ALBENDAZOL OBTENIDOS POR  
HOMOGENEIZACIÓN DE ALTA PRESIÓN Y SECADO POR  
ASPERSIÓN: DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* / *IN VIVO***

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Alejandro J. Paredes**

**Diciembre 2016**

**Departamento de Farmacia**

**Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba**

**Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica - CONICET**

**Córdoba - República Argentina**



**NANOCRISTALES DE ALBENDAZOL OBTENIDOS POR HOMOGENEIZACIÓN  
DE ALTA PRESIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN: DISEÑO, OPTIMIZACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* / *IN VIVO***

**Comisión Asesora:**

**Director:**

Prof. Dr. Santiago D. Palma

**Comisión de Seguimiento:**

Prof. Dr. Fabio Cerbán.

Prof. Dr. Rafael Oliveira.

Prof. Dra. María Eugenia Olivera.

**Evaluador Externo:** Prof. Dra. Fátima Nader.



## **Agradecimientos**

El primer agradecimiento es para el Dr. Santiago Palma, Director de esta Tesis, por haberme abierto las puertas a la investigación, por enseñarme que la Ciencia se hace con libertad y por fomentar algo que ambos compartimos: nunca está demás pensar en grande.

Al Departamento de Farmacia y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC y a CONICET por permitirme desarrollar mi profesión en un área tan particular como es la Investigación. Al Dr. Daniel Allemandi, Director de UNITEFA por tenerme siempre en cuenta y por hacerme sentir parte de la Unidad. A las Instituciones e investigadores que formaron parte de este Doctorado: Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro la Provincia de Buenos Aires (Dr. Sergio Sánchez Bruni y Dr. Carlos Lanusse), Universidad Nacional de Mar del Plata (Dra. Celina Elisondo y Dra. Patricia Pensel) y Universidad de la República, Uruguay (Dra. Alicia Dib). Mis agradecimientos a la Comisión de Tesis por haber escuchado y aportado sus ideas durante el desarrollo del trabajo, a la Dra. Fátima Nader por aceptar la evaluación de esta Tesis y especialmente a la Dra. Olivera por su ayuda en la preparación del manuscrito.

Amigas del 209 y 210, siempre gracias, ha sido un placer compartir todo este tiempo con ustedes. Nacho, Franco y Juampi, amigos que me dio el doctorado, muchísimas gracias por su amistad sincera. Dr. Juan Llabot, gracias por compartir conmigo la pasión de armar, desarmar y reparar cualquier cosa.

Amigos de la vida, pandilla querida, 25 años de amistad nos han hecho pasar por muchísimos momentos buenos y malos, gracias por estar y por recibirme siempre como si nunca me hubiera ido.

Finalmente, a mi padre por enseñarme el valor del trabajo duro y a mi madre por haberme heredado su inquietud en la búsqueda de lo nuevo. Hermanos, les agradezco porque crecer juntos aportó en parte las herramientas que me hicieron llegar hasta acá.

## Resumen

La investigación realizada en este Trabajo de Tesis Doctoral comprende el diseño, la obtención, la caracterización tanto físico-química como biofarmacéutica y la evaluación *in vivo* de nanocristales de albendazol (ABZ), un fármaco antiparasitario de amplio espectro que presenta una eficacia condicionada relacionada a una pobre y errática BD.

El trabajo realizado está organizado en 5 bloques principales: 1- obtención y caracterización *in vitro* de nanocristales redispersables de ABZ, 2- ensayos de farmacocinética en ratones y perros, 3- eficacia en un modelo murino de hidatidosis, 4- eficacia clínica en caninos naturalmente parasitados y 5- desarrollo de una técnica innovadora para la producción de nanosuspensiones de ABZ.

La caracterización fisicoquímica/biofarmacéutica del sistema demostró que los materiales obtenidos presentaban tamaños de partícula submicrométricos (~450 nm), una alta capacidad de redispersión luego del secado, un incremento en la velocidad de disolución y un aumento de la concentración de saturación del fármaco en el medio de disolución sin cambios en los patrones de difracción de rayos-X de polvos.

Los ensayos farmacocinéticos realizados en ratones y perros, demostraron aumentos en la cantidad de fármaco absorbido (área bajo la curva) y concentraciones máximas (C<sub>máx.</sub>), como así también un notable acortamiento en los tiempos máximos (T<sub>máx.</sub>).

En el modelo murino de hidatidosis (echinococosis quística) se obtuvo un aumento significativo tanto de la eficacia clínica como de la quimioprolifáctica cuando los animales fueron tratados con nanocristales de ABZ. Estos datos se evidenciaron mediante la disminución de la viabilidad de los protoescolices provenientes de los quistes extraídos de la cavidad abdominal de los ratones. Además, el análisis del parásito por microscopía electrónica permitió observar los severos daños producidos a nivel de la ultraestructura de la capa germinal de los quistes y en la morfología de los protoescolices.

La eficacia en perros se realizó en un refugio canino ubicado en el Departamento de Canelones, Uruguay. De un total de 200 perros, se identificaron a los animales naturalmente parasitados con *Ancylostoma Caninum* y se realizó un ensayo en el cual nuestra formulación optimizada de nanocristales de ABZ fue probada a diferentes niveles de dosificación en condiciones reales de trabajo, utilizando como control una formulación comercial. Una característica remarcable a tener en cuenta, es que el perro es una especie potencialmente destinataria para nuestro producto, lo que aumenta su potencial transferencia al sector productivo. El análisis estadístico realizado sobre los datos obtenidos del recuento de huevos del parásito por gramo de materia fecal a diferentes días post-tratamiento, permitió arribar a la conclusión de que ABZ es un fármaco muy potente contra el agente etiológico de la anquilostomiasis. Los grupos tratados con nanocristales de ABZ a un cuarto de la dosis utilizada tradicionalmente (6,25 mg/kg), presentaron una eficacia del 100% sin diferencias significativas con el grupo control, que fue tratado con ABZ comercial a 25 mg/kg. También se pudo concluir que el tratamiento que se realiza con

ABZ comercial podría reducirse a la mitad de la dosis ya que los grupos tratados con este medicamento a 12,5 y 25 mg/kg no presentaron diferencias significativas entre sí.

Finalmente, debido a que la plataforma desarrollada presentó resultados prometedores en las instancias de caracterización *in vitro* e *in vivo*, y debido a una necesidad de producción en mayor escala de nanocristales de ABZ, se puso a punto una técnica de Nanomolienda Asistida por Microesferas (NAM), que posee menores costos y tiempos de producción. En el último capítulo de esta Tesis se estudió la influencia de parámetros de proceso y formulación en la nanometrización de ABZ mediante NAM, utilizando un molino diseñado en UNITEFA. El dispositivo utilizado permitió alcanzar tamaños de partícula cercanos a los 350 nm, menores a los obtenidos por homogeneización de alta presión (Capítulo 1). El diámetro y la cantidad de microesferas utilizadas influyeron de gran manera el proceso de molienda, mientras que un aumento en la cantidad de sólidos procesados, fue en detrimento de la eficiencia de nanometrización. La caracterización físico-química/biofarmacéutica permitió demostrar la ausencia de cambios polimórficos en el fármaco y un aumento notable en su velocidad de disolución.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se pudo concluir que los nanocristales redispersables de ABZ constituyen una plataforma tecnológica simple, cuyas técnicas de producción son altamente reproducibles, escalables y no poseen limitaciones relacionadas a las características del fármaco. Los ensayos realizados *in vivo* demostraron un aumento claro en el desempeño de ABZ como agente antiparasitario con potencial aplicación en medicina humana y veterinaria. La potencial utilización de este producto podría tener consecuencias positivas en la terapéutica de las parasitosis, ya que se disminuirían los riesgos de toxicidad y los costos del tratamiento asociados a una menor dosis del fármaco.

## Abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
ABC	Área bajo la curva
ABZ	Albendazol
BD	Biodisponibilidad
BZD	Benzimidazólicos
C <sub>máx</sub>	Concentración Máxima
DDL	Dispersión dinámica de la luz
DE	Desviación estándar
EI	Estándar interno
FF	Forma Farmacéutica
F	Fármaco
HAP	Homogeneización por alta presión
HPG	Huevos por gramo
IP	Índice de Polidispersidad
LSS	Lauril sulfato de sodio
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MF	Mezcla física
MOI	Microscopio Óptico Invertido
NAM	Nanomolienda Asistida por Microesferas
NC	Nanocristales
NCABZ	Nanocristales de albendazol
NS	Nanosuspensiones
P188	Poloxamer 188
P407	Poloxamer 407
PE	Presión Estática
PRCH	Porcentaje de reducción del conteo de huevos
PZB	Prazibek®
PV	Presión de Vapor
RPM	Revoluciones por minuto
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SD	<i>Spray drying</i>
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
TGI	Tracto gastrointestinal
T <sub>máx</sub>	Tiempo en que se obtiene la C <sub>máx</sub>

## Índice de contenidos

Resumen	1
Abreviaturas	3
Índice de contenidos	4
<b>Introducción general</b>	6
La vía oral para la administración de fármacos	7
Albendazol: Generalidades de un antiparasitario de amplio espectro	10
Mecanismo de acción de albendazol	13
Nanocristales: una estrategia para la formulación de activos poco solubles	13
Hipótesis general de trabajo	15
Objetivo General	15
Referencias	16
<b>Capítulo I: Obtención y caracterización de nanocristales redispersables de albendazol</b>	20
Introducción	21
Técnicas de producción de nanocristales	21
Homogeneización por alta presión	22
Secado por aspersión	22
Objetivo específico del Capítulo	24
Materiales y metodología	24
Resultados y discusión	27
Conclusiones	43
Referencias	44
<b>Capítulo II: Ensayos farmacocinéticos en modelos animales.</b>	46
Introducción	47
Objetivo específico del Capítulo	49
Ensayo farmacocinético en ratones	50
Diseño experimental	50
Resultados y discusión	53
Ensayo farmacocinético en caninos	57
Diseño experimental	57



Resultados y discusión	59
Conclusiones	62
Referencias	63
<b>Capítulo III: Estudio de eficacia en un modelo murino de hidatidosis</b>	65
Introducción	66
Objetivo específico del Capítulo	69
Materiales y metodología	72
Resultados	75
Discusión	82
Conclusiones	83
Referencias	85
<b>Capítulo IV: Ensayo de eficacia clínica en caninos naturalmente parasitados</b>	88
Introducción	89
Objetivo específico del Capítulo	91
Materiales y metodología	91
Resultados y Discusión	93
Conclusiones	95
Referencias	96
<b>Capítulo V: Obtención de nanocristales de albendazol por una técnica <i>top-down</i> innovadora</b>	97
Introducción	98
Objetivo específico del Capítulo	101
Materiales y métodos	101
Resultados y Discusión	102
Conclusiones	109
Referencias	110
<b>Conclusiones generales</b>	111
<b>Proyecciones de esta Tesis</b>	113
<b>Producción científica y tecnológica</b>	114

# Introducción

### ***La vía oral para la administración de fármacos***

La vía de administración peroral de medicamentos ha sido tradicionalmente la más utilizada con respecto a otras debido a que es la más accesible, segura y goza de gran aceptación por parte del paciente. Sin embargo, también presenta ciertos inconvenientes, tales como, comienzo de acción farmacológica relativamente lento, posibilidad de una absorción irregular y degradación de determinados fármacos (F) por enzimas y secreciones del aparato digestivo.

Para que un F ejerza su efecto terapéutico debe alcanzar el sitio de acción a una velocidad y magnitud apropiada que depende de los procesos de liberación y absorción (Aulton M. ed, 2007). Entonces, en el caso de una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata, los procesos que deben ocurrir son: i) disgregación de la forma farmacéutica (FF) y liberación del F; ii) disolución en el medio fisiológico esencialmente acuoso y iii) absorción a través de las membranas biológicas y llegada a circulación sistémica.

Por definición, la biodisponibilidad (BD) de un F es “la cantidad y la velocidad con la cual éste alcanza la circulación sistémica quedando disponible para alcanzar su sitio de acción” (Ashford M., 2007).

Para F con baja solubilidad en medio acuoso, la disolución es generalmente el factor limitante para su BD, mientras que, para F muy hidrosolubles el factor limitante puede ser la absorción ya que, para que ésta ocurra, es necesario un cierto carácter lipofílico que facilite la difusión a través de la membrana del tracto gastrointestinal (TGI).

De esta manera, la solubilidad y permeabilidad del F son los parámetros más importantes que definen el perfil biofarmacéutico de un F.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) agrupa a los F dentro de cuatro categorías de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad (Amidon y cols. 1995), como se observa en la tabla 1:

***Tabla 1: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.***

<b>Clase</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>Permeabilidad</b>
<b>I</b>	Alta	Alta
<b>II</b>	Baja	Alta
<b>III</b>	Alta	Baja
<b>IV</b>	Baja	Baja

Este sistema puede tener connotaciones regulatorias ya que aquellos medicamentos conteniendo F con alta permeabilidad pueden requerir estudios de BD dependiendo de su solubilidad. De este modo,

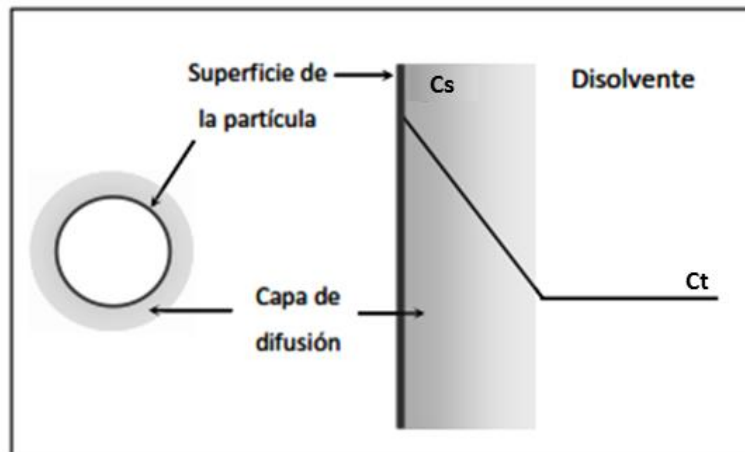
mientras que para F de clase I no se requiere este tipo de estudios, si es necesario para los que son de clase II (Leuner & Dressman 2000, Lindenberg y cols. 2004).

La disolución de un F se ve directamente influenciada por su solubilidad acuosa. Esto responde al análisis de la ecuación 1, de Noyes – Whitney (Noyes & Whitney 1987) en donde se describe la velocidad de disolución de partículas esféricas:

$$dc/dt = (AD (Cs - Ct))/h \text{ Ecuación 1.}$$

Donde  $dc/dt$  es la velocidad de disolución del F a través de una capa de difusión estática formada en la superficie de la partícula cuando ésta entra en contacto con el medio,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) es el área disponible para la disolución,  $D$  ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) es el coeficiente de difusión del F,  $C_s$  ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) es la concentración de saturación,  $C_t$  ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) es la concentración del F en el medio de disolución a tiempo  $t$  y  $h$  es el espesor de la capa de difusión.

En la figura 1 se puede observar el diagrama de las capas limítrofes y el cambio de concentración alrededor de una partícula en el proceso de disolución:



**Figura 1.** Disolución de una partícula de fármaco según Noyes-Withney.  $C_s$ : concentración de saturación.  $C_t$ : Concentración en la solución a un determinado tiempo.

La eficacia de un F administrado por la vía oral se encuentra condicionada de gran manera, principalmente por una gran cantidad de factores fisiológicos y físico-químicos que afectarán su disolución y llegada al torrente sanguíneo. En la tabla 2 se describen los parámetros que afectarán la BD del F (Dressman y cols., 1998).

**Tabla 2.** Factores fisicoquímicos y fisiológicos que influyen en la disolución de fármacos en el TGI (adaptado de Dressman y cols., 1998).

<b>Propiedad</b>	<b>Parámetro fisicoquímico</b>	<b>Parámetro fisiológico</b>
Superficie específica de la partícula del fármaco	Tamaño de partícula, humectabilidad	Surfactantes del jugo gástrico y la bilis
Solubilidad	Hidrofilicidad, estructura cristalina, solubilización,	pH, capacidad buffer, presencia de sales biliares, componentes de los alimentos
Difusividad del fármaco a través de la capa de difusión	Tamaño molecular	Viscosidad del contenido luminal, patrón de motilidad y velocidad de flujo intestinal
Volumen de disolvente disponible	-	Secreciones gastrointestinales, líquidos coadministrados

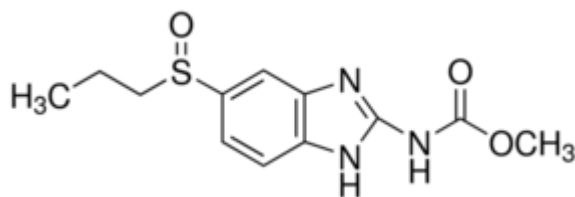
La baja solubilidad acuosa de los F es un problema de gran importancia en la industria farmacéutica. Se ha reportado que el 40% de los candidatos obtenidos y aislados mediante química combinatoria son escasamente solubles en agua (Merisko-Liversidge y cols. 2003). Cuando estos F son administrados por vía oral, presentan una BD baja o errática y por lo tanto acarrear problemas de eficacia clínica. La creciente cantidad de F altamente lipofílicos requiere el desarrollo de nuevas formulaciones que sean capaces de aumentar su BD oral o, al menos, lograr que los mismos puedan ser administrados por vía parenteral, aunque esto último no siempre es posible o conveniente. A tal fin, durante décadas han sido desarrollados algunos abordajes tecnológicos como por ejemplo la inclusión en complejos con ciclodextrinas, la formulación de emulsiones aceite en agua para la vía inyectable y el uso de cosolventes, entre otros (Keck & Müller 2006). Sin embargo, estas formulaciones se encuentran condicionadas por propiedades físico-químicas del F, como por ejemplo, características de carga y tamaño (para “ajustar” en el anillo de las ciclodextrinas), o bien tener una solubilidad adecuada en aceites para la formulación de emulsiones. El éxito limitado de estas estrategias puede verse reflejado en la baja cantidad de productos que alcanzaron la fase de comercialización basados en estas plataformas (Keck & Müller 2006). Se plantea entonces la necesidad de encontrar un abordaje universal que permita formular principios activos con baja solubilidad acuosa.

### ***Albendazol: Generalidades de un antiparasitario de amplio espectro.***

La repercusión económica producida por las infecciones por helmintos, ha sido valorada y reconocida desde hace tiempo en el ámbito ganadero. Como consecuencia de esto, el mercado de F antihelmínticos ha crecido desde la década del 70 a partir del descubrimiento de tiabendazol, un F de amplio espectro de acción frente a parásitos gastrointestinales. Esto constituyó el punto de partida para una nueva era en el tratamiento de las helmintosis parasitarias permitiendo el desarrollo e investigación de un nuevo grupo químico y terapéutico: los benzimidazoles.

Dentro de este grupo, albendazol (ABZ) es ampliamente utilizado tanto en medicina veterinaria [tabla 3 (Torrado S.; 1994)], como en medicina humana [tabla 4 (Flórez J, 2005, Martindale; 2002, Wen H. y col; 1993, Del Brutto Sotelo O.H. y col. 1993)] para tratar infecciones causadas por nematodos, cestodos y trematodos.

ABZ es el metil 5-(propiltio)-2benzimidazolcarbamato, derivado del benzimidazol que comprende a un sistema de 2 anillos, en el cual un grupo benceno es fusionado a las posiciones 4 y 5 del anillo imidazol. Las modificaciones que presenta este sistema de anillos bicíclicos es lo que da origen a los diferentes derivados del grupo de los benzimidazoles. ABZ se caracteriza por presentar en la posición 5 un átomo de azufre el cual le confiere un mayor efecto terapéutico.



***Figura 2. Estructura química de albendazol***

El uso de ABZ, ha mostrado efectividad sistémica en infecciones como la hidatidosis (Al Karawi & Yasawy Mohamed 1992, Sari y cols. 2014, Kumar A. y col; 1993, Bondiau P. y cols. 1993) y la neurocisticercosis (Sánchez M. y col; 1993; Suri W y col; 1994 y Bauer TM y col; 1994).

Luego de su administración, ABZ se disuelve a nivel del estómago (es una base débil) siendo más favorable este proceso cuando el F se acompaña con una dieta rica en grasas. Esto último ha sido descrito principalmente para humanos (Edwards G. y col; 1988) y no pudo ser extrapolado fehacientemente en caninos (McKellar y cols. 1993).

**Tabla 3:** Clasificación de los agentes etiológicos que provocan helmintosis en diferentes especies animales y que son tratadas con ABZ.

<b>Rumiantes</b>	<b>Equinos</b>	<b>Felinos y caninos</b>	<b>Conejos</b>
<p><b>- De localización Intestinal:</b></p> <p>Formas maduras e inmaduras de <i>Haemonchus</i> spp.  <i>Ostertagia</i> spp.  <i>Trichostrongylus</i> spp.  <i>Cooperia</i> spp.  <i>Nematodirus</i> spp.</p> <p><b>- De localización Pulmonar:</b></p> <p><i>Dictyocaulus viviparus</i>  <i>Cestodes</i>  <i>Moniezia</i> spp.  <i>Trematodes</i>  <i>Fasciola hepatica: adultos</i></p>	<p><i>Strongylus</i>  <i>Larvas de Oxiurus equi</i>  <i>Trichostrongylus axei.</i></p>	<p><i>Ascarideos,</i>  <i>Ancylostoma</i> spp.  <i>Uncinaria</i> spp.  <i>Trichuris</i> spp,  <i>Dipillidium</i> spp.</p>	<p><i>Cisticercus psiciformis</i></p>

**Tabla 4:** Clasificación de las principales helmintosis y sus tratamientos en humanos.

	Tratamiento de elección	Tratamiento alternativo	
<b>Nematodos</b>	<b>De localización intestinal</b>		
	<b>a) Lombrices humanas:</b> <i>Ascaris Lumbricoides</i> <i>Enterobius vermicularis</i> (oxiuro) <i>Trichuris trichiura</i>	- Mebendazol  - <b>Albendazol</b>	- Piperazina  - Pirantel
	<b>b) Uncinariasis:</b> <i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Necator americanus</i>	- Mebendazol	- Befenio  - Tetracloroetileno
	<b>De localización Tisular</b>		
	<b>a) Larva migratoria cutánea:</b> <i>Ancylostoma braziliense</i>	- Tiabendazol	-
	<b>b) Larva migratoria visceral:</b> <i>Toxocara canis</i> y <i>T. cati</i>	- Mebendazol - Tiabendazol + Corticosteroides	- Dietilcarbamecina - Ivermectina
	<b>c) Triquinosis:</b> <i>Trichinella spiralis</i>	- Tiabendazol + Corticosteroides - Mebendazol	-Mebendazol  -Pirantel
	<b>d) Filariasis:</b> Onchocerca volvulus Filariasis linfática: <i>Wuchereria bancrofti</i> y <i>W. malayi</i>	- Ivermectina - Dietilcarbamecina	- Dietilcarbamecina - Mebendazol - Ivermectina
	<b>Cestodos</b>	<b>De localización Intestinal</b>	
		<i>Taenia saginata</i> <i>Taenia solium</i> <i>Diphyllobothrium Batum</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Dipylidium caninum</i>	- Niclosamida - Praziquantel
<b>De localización Tisular</b>			
<i>Cysticercus cellulosae</i> <i>Echinococcus granulosus</i> <i>Echinococcus multilocularis</i>	-Praziquantel - Mebendazol -Cirugía	- <b>Albendazol</b>	



### ***Mecanismo de acción***

El primer mecanismo de acción propuesto para los antihelmínticos benzimidazólicos (BZD) fue la inhibición de la enzima fumarato-reductasa en nemátodos (Prichard, 1973). Esta enzima juega un rol fundamental en el metabolismo anaeróbico de los hidratos de carbono en los helmintos, estando directamente implicada en los mecanismos de generación de energía (Behm & Bryant, 1979; Tielens, 1994). Más adelante se demostró que los benzimidazoles inhiben la captación de glucosa en diferentes parásitos (Lacey, 1988; Jasra y cols., 1990; Petersen & Friis, 1998). Otros mecanismos propuestos fueron el desacople de la fosforilación oxidativa (McCracken & Lipkowitz, 1990), la inhibición de la captación de nutrientes de bajo peso molecular (Sarwal y cols., 1992) y la inhibición de la secreción de acetil-colinesterasa (Lacey, 1988).

El principal mecanismo de acción de los antihelmínticos BZD se basa en su unión a la tubulina, proteína soluble que constituye la estructura básica de los microtúbulos. Diferentes estudios han demostrado que los benzimidazoles se unen en forma reversible al sitio de unión de colchicina en la subunidad  $\beta$  de la tubulina (Lacey, 1990). Los dímeros de tubulina unidos a la molécula de un F BZD no pueden polimerizarse para formar los microtúbulos, alterándose de esta forma el equilibrio microtúbulos-tubulina. Existe un gran número de funciones celulares que son dependientes de la integridad de los microtúbulos. La mayor afinidad de los benzimidazoles por la tubulina de los parásitos helmintos, explica su baja toxicidad en mamíferos. La disrupción del equilibrio microtúbulos-tubulina bloquea la absorción y la excreción de nutrientes por el parásito. *In vivo*, la acción antihelmíntica de los benzimidazoles no es inmediata y se requieren concentraciones sostenidas en el tiempo para asegurar la modificación de ciertas funciones vitales que faciliten el desprendimiento de los helmintos de sus sitios predilectos de localización.

Como se mencionó anteriormente ABZ es un F escasamente soluble en agua y ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos científicos para contrarrestar esta propiedad específica. Algunas de estos comprenden la formulación de dispersiones sólidas (Castro y cols. 2012), emulsiones aceite/agua (Shuhua y cols. 2002), incorporación del F en liposomas (Wen y cols. 1996), formación de complejos con ciclodextrinas (Kata M y cols. 1991, Moriwaki y cols. 2008), comolienda (Vogt y cols. 2008) y síntesis de nuevos análogos con mayor solubilidad acuosa (Rivera y cols. 2007, Palomares-Alonso y cols. 2009). ABZ también demostró BD incrementada cuando fue coadministrado con comidas ricas en grasas (Lange y cols. 1988), jugo de pomelo (Nagy y cols. 2002), cosolventes (Torrado y cols. 1997) y surfactantes (del Estal y cols. 1994). Además, algunos ensayos clínicos demostraron que un aumento en la BD del F logrado por una absorción incrementada en el TGI se correlacionó con una mayor eficacia clínica (Shuhua y cols. 2002, Wen y cols. 1996, Torrado y cols. 1997).

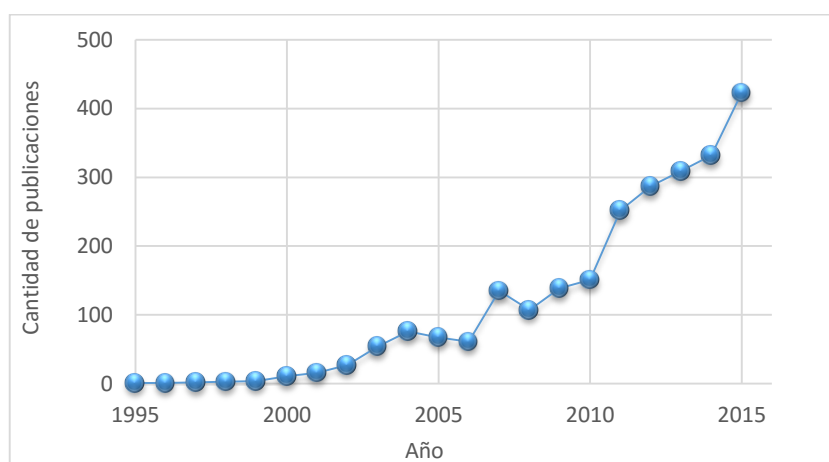
### ***Nanocristales: una estrategia para la formulación de fármacos poco solubles.***

La reducción del tamaño de las partículas del F a escala micrométrica incrementa significativamente su relación superficie/volumen, aumentando la velocidad de disolución y,

subsecuentemente, su absorción gastrointestinal. Sin embargo, para aquellos F de hidrosolubilidad especialmente reducida como el ABZ, el incremento de la velocidad de disolución no es suficiente para optimizar su BD oral (Gao y cols. 2008).

La nanometrización, es la reducción del tamaño de partícula del F a un rango menor de una micra. Por definición, los nanocristales (NC) son nanopartículas compuestas en un 100% por el F, generalmente acompañadas por agentes surfactantes o estabilizantes estéricos poliméricos, y que poseen un tamaño de partícula entre 10 y 1000 nm, típicamente cerca de los 500 nm. Los NC se producen generalmente en un medio acuoso como nanosuspensiones (NS) y luego, opcionalmente, puede eliminarse el agua para obtener polvos reconstituibles (Müller y cols. 2011).

Como puede verse en la figura 3, el interés científico e industrial en la temática de la nanometrización de F se ha visto incrementado desde la década del 90 hasta la actualidad. Este hecho se encuentra respaldado por una gran cantidad de patentes, un total de 9 productos en fase de comercialización y otros 21 en diferentes fases de estudios clínicos (Shegokar 2010, Möschwitzer 2013).



**Figura 3.** Cantidad de publicaciones relacionadas a los términos “drug” y “nanocrystals” en el buscador Scopus.

Actualmente el desarrollo industrial de los NC se concentra en productos orales, seguido por los inyectables. No obstante, los NC poseen un gran potencial para su uso en otras vías de aplicación, tales como dérmica, ocular, pulmonar, entre otras, con potencial interés en lograr acción en sitios específicos (*target drug delivery*) y aplicación en cosmética y nutracéuticos (Kayser & Lemke 2010).

### **Características diferenciales de los nanocristales**

La reducción del tamaño de las partículas a escala nanométrica cambia sus propiedades físico-químicas, otorgándoles características adicionales como el aumento de la concentración de saturación, la velocidad de disolución y la mucoadhesividad:

- ✓ **Aumento de la concentración de saturación:** de acuerdo con las ecuaciones de Kelvin y Ostwald–Freundlich, la disminución del tamaño de las partículas a un rango nanométrico incrementa la concentración de saturación (Böhm y cols. 1999). Según la ecuación de Kelvin, la presión de disolución se incrementa con el aumento de la curvatura de la partícula, la cual a su vez es función del tamaño de la misma. Dado que la curvatura de las nanopartículas es enorme, la presión de disolución es alta favoreciéndose el proceso de disolución. Por otra parte, la ecuación de Ostwald–Freundlich plantea una relación inversa entre la concentración de saturación y el tamaño de la partícula
- ✓ **Incremento de la velocidad de disolución:** según la ecuación de Noyes–Whitney (Noyes & Whitney 1987), el incremento de la velocidad de disolución de los NC es atribuido a la reducción en el tamaño de la partícula, al aumento de la concentración de saturación y al incremento del gradiente de concentración.
- ✓ **Aumento de la adhesividad:** el incremento de área superficial de los NC proporciona mayor cantidad de puntos de contacto entre las partículas y la superficie, incrementado su mucoadhesividad (Müller y cols. 2011).

### **HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO**

ABZ formulado como NC presentaría una mayor velocidad de disolución y concentración de saturación; consecuentemente, el F con tamaño de partícula submicrométrico, administrado por vía oral, se absorbería en mayor cantidad produciendo así una mejora en el desempeño terapéutico.

### **OBJETIVO GENERAL DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

Desarrollar una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de las parasitosis en humanos y animales utilizando la tecnología de nanocristales como herramienta para aumentar la biodisponibilidad y la eficacia de ABZ.

## Referencias

- Amidon, G.L. y cols., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, 12(3), pp.413–420.
- Ashford Marianne. Introducción a la biofarmacia. En: Aulton M. E. Editor. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Churchill-Livington: London, UK; 2007.
- Aulton M. Disolución y Solubilidad. En: Aulton M. E. Editor. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Churchill-Livington: London, UK; 2007.
- Bauer TM., Bruhwiler J., Aschwanden M., Wagner S., Schwander J. Neurocysticercosis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1994; 119(6): 175-179.
- Behm C. and Bryant C. 1979. Anthelmintic action: a metabolic approach. *Vet. Parasitol.* 5, 39-49.
- Böhm, B.H.L., & Müller, R.H., 1999. Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. *PSTT* 2(8), pp.336–339.
- Bondiau PY., Pevrade F., Birswitle I., Thyss A., Bruneton JN., Marcy PY., Mondain V. Bone hydatidosis. Pseudosarcomatous aspect. *Presse Med.* 1993; 22(29): 1367.
- Castro, S.G. y cols., 2012. Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions. *Pharm. Dev. Technol.*, 18(2), pp.1–9.
- Del-Brutto Sotelo OH., Roman GC. Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal. *Clin Infect Dis.* 1993; 17:730-735.
- Del Estal, J.L. y cols., 1994. Increased systemic bioavailability of albendazol when administered with surfactants in rats. *Int. J. Pharm.*, 102(1–3), pp.257–260.
- Dressman, J.B. y cols., 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharm. Res.*, 15(1), pp.11–22.
- Edwards G. and Breckenridge A. Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 1988; 15, 67-93.
- Florez J. Fármacos antiparasitarios II. Helmintos y artrópodos. En Farmacología Humana. 4ta edición Ed. Masson. 2005. Barcelona.
- Gao, L., Zhang, A.D. & Chen, A.M., 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J. Nanop. Res.*, 10 (5) pp.845–862.
- Al Karawi, M.A. & Yasawy Mohamed, M.I.A.R.E., 1992. Combination of praziquantel and albendazole in the treatment of hydatid disease [2]. *Saudi Medical Journal*, 13(5), p.468.
- Kumar A., Lal BK., Chattopadhyay TK. Hydatid disease of the liver - non surgical options. *J. Assoc. Phys. India.* 1993; 41(7): 437-438.
- Jasra, N., Sanyal, S., Khera, S. 1990. Effect of thiabendazole and febendazole on glucose uptake and carbohydrate metabolism in *Trichuris globulosa*. *Vet. Parasitol.* 35: 201-209.
- Kasim, N. a y cols., 2004. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutic classification. *Mol. Pharm.*, 1(1), pp.85–96.
- Kata, M. & Schauer, M., 1991. Increasing the solubility characteristics of albendazole with dimethyl-

- beta-cyclodextrin. *Acta pharmaceutica Hungarica*, 61(1), pp.23–31.
- Kayser, O. & Lemke, A., 2010. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6 (1), pp.3–5.
- Keck, C.M. & Müller, R.H., 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62(1), pp.3–16.
- Lacey, E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of amechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18: 885-93
- Lacey, E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today*, 6: 112-115.
- Lange, H., Eggers, R. & Bircher, J., 1988. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *Eur J Clin Pharmacol*, 34(3), pp.315–317.
- Lawrence, M.J. & Rees, G.D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.*, 45(1), pp.89–121.
- Leuner, C. & Dressman, J., 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 50(1), pp.47–60.
- Lindenberg, M., Kopp, S. & Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 58(2), pp.265–278.
- Mahesh, K.V., Singh, S.K. & Gulati, M., 2014. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide. *Powder Technol.*, 256, pp.436–449.
- Martindale. The complete drug reference. Pharmaceutical Press. 33rd ed. Sweetman CS editors. London 2002; 30-32.
- Mauludin, R., Müller, R.H. & Keck, C.M., 2009. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int. J. Pharm.*, 370(1–2), pp.202–209.
- McCracken, R., Lipkowitz, K. 1990. Structure- activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. *J. Parasitol.* 76: 853-864.
- McKellar, Q. a, Galbraith, E. a & Baxter, P., 1993. Oral absorption and bioavailability of fenbendazole in the dog and the effect of concurrent ingestion of food. *J. Vet. Pharm. and Ther.*, 16(2), pp.189–98.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G. & Cooper, E.R., 2003. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 18(2), pp.113–120.
- Moriwaki, C. y cols., 2008. Enhancement of solubility of albendazole by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Braz. J. of Chem. Eng.*, 25(2), pp.255–267.
- Möschwitzer, J.P., 2013. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int. J. Pharm.* 453(1), pp.142–56.

- Müller, R.H., Gohla, S. & Keck, C.M., 2011. State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 78(1), pp.1–9.
- Nagy, J. y cols., 2002. Effect of grapefruit juice or cimetidine coadministration on albendazole bioavailability. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(3), pp.260–263.
- Noyes, A.A. & Whitney, W.R., 1897. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 19(12), pp.930–934.
- Palomares-Alonso, F. y cols., 2009. Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *Eur. J. of Med. Chem.*, 44(4), pp.1794–1800.
- Petersen, M., Friis, C. 1998. Glucose uptake in *Oesophagostomum dentatum* and the effect of oxfendazole. *Vet. Parasitol.* 80: 159-166.
- Prichard, R. 1973. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* 3: 409-417.
- Rivera, J.C. y cols., 2007. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl) carboxamide derivatives. *Int. J. Pharm.* 343(1-2), pp.159–65.
- Sanchez M., Suastegui R., Gonzalez Esquivel D., Sotelo J., Jung H. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin. Neuropharmacol.* 1993; 16(1): 77-82.
- Sari, T.P. y cols., 2014. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, pp.540–546.
- Sarwal, R., Sanyal, P., Khera, S. 1992. Effect of benzimidazole drugs on the uptake of low molecular weight nutrients in *Tricuris globulosa*. *Int. J. Parasitol.* 22: 9-14.
- Shegokar, R. & Müller, R.H., 2010. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.* 399(1-2), pp.129–139.
- Shuhua, X. y cols., 2002. Augmented bioavailability and cysticidal activity of albendazole reformulated in soybean emulsion in mice infected with *Echinococcus granulosus* or *Echinococcus multilocularis*. *Acta Trop.*, 82(1), pp.77–84.
- Suri W., Kalra V. Neurocysticercosis. *Med. J. Aust.* 1994; 160(4): 231-232.
- Tielens, A. 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today.* 10: 346-352.
- Torrado S., 1994. Estudio Farmacéutico de Nuevas Formulaciones Galénicas de Albendazol. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
- Torrado, S. y cols., 1997. A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. *Int. J. Pharm.*, 156(2), pp.181–187.
- Vogt, M., Kunath, K. & Dressman, J.B., 2008. Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. *Eur. J. of Pharm. Biopharm.*, 68, pp.330–337.

Wen H., New RRC., Craig PS., 1993. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. *Br. J. Clin. Pharm.*; 35:565-574.

Wen, H. y cols., 1996. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. *Parasitol.*, 113 ( Pt 2, pp.111-21.

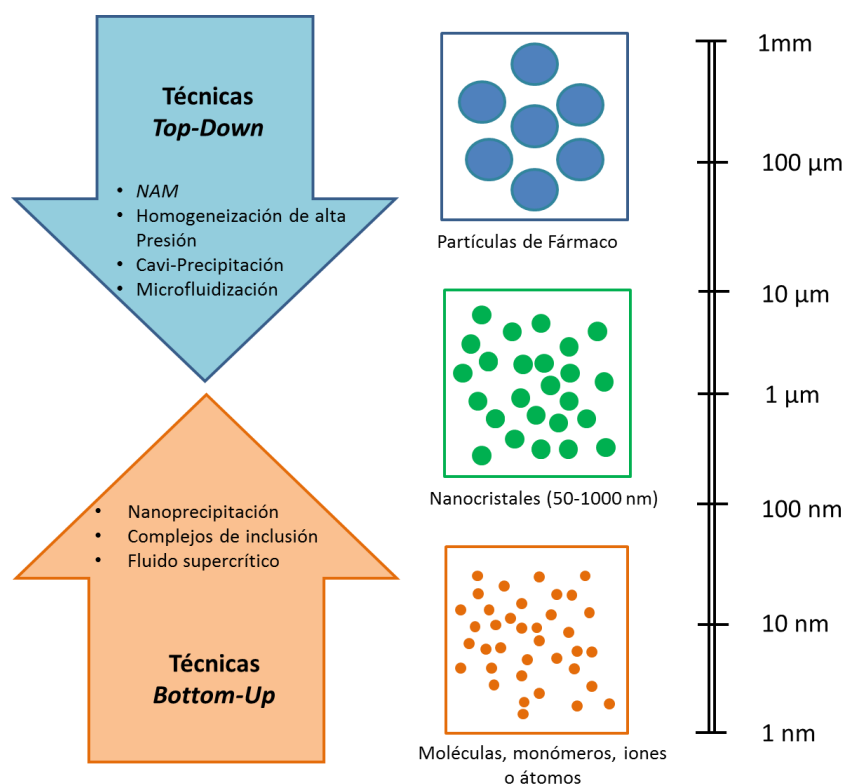
# **Capítulo I. Obtención y caracterización de nanocristales redispersables de albendazol**



## 1. Introducción

### 1.1. Técnicas de Producción de Nanocristales

Existen dos técnicas principales para la obtención de NC, las “*bottom-up*” y las “*top-down*”. En las primeras, se parte una solución del F en un determinado solvente, se agregan agentes precipitantes y se controla el crecimiento de las partículas mediante la manipulación de parámetros físico-químicos o la aplicación de energía. Este conjunto de técnicas tiene la gran ventaja de permitir la obtención de NC con tamaños de partícula cercanos a los 100 nm, sin embargo, a pesar de los reportes en los que se utiliza esta metodología, (Shegokar y Müller 2010, Mahesh y cols. 2014, Shete y Banzal 2016), la misma resulta poco escalable y es utilizada en menor grado por la industria farmacéutica debido a que requiere el uso de solventes orgánicos. Por otra parte, en las técnicas “*top-down*” se parte de una suspensión del F y se aplican grandes cantidades de energía para lograr la nanometrización del sistema. Dentro de estas últimas, las más utilizadas son la homogeneización por alta presión (HAP) y la nanomolienda asistida por microesferas (NAM), ambas altamente escalables de gran reproducibilidad. Otras técnicas menos comunes para la producción de NC pueden observarse en la figura 1.



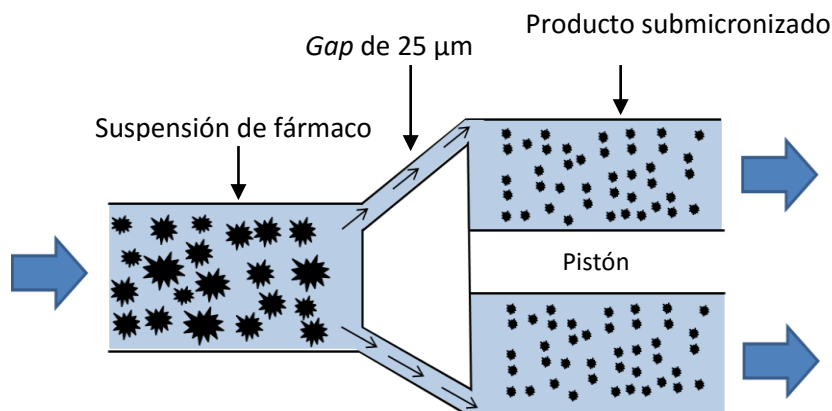
**Figura 1.** Obtención de NC mediante técnicas bottom up y top down.

Ambos grupos de técnicas de nanometrización se caracterizan por permitir una gran homogeneidad en el tamaño de partícula de las muestras procesadas. Este factor puede ser evaluado

mediante el Índice de Polidispersidad (IP), este es un parámetro que se obtiene mediante dispersión dinámica de la luz (DDL) e indica cuanto se ajusta una población de partículas a la distribución normal, variando entre 0,1 (para los sistemas más homogéneos) y 1 (para sistemas heterogéneos). Generalmente, los NC obtenidos mediante técnicas *top-down* presentan valores de IP entre 0,25 y 0,35.

### 1.2. Homogeneización de Alta Presión

Dentro de las técnicas de nanometrización de F, la homogeneización de alta presión (HAP) es una de las más utilizadas, tanto a escala laboratorio como a escala industrial. La muestra (una suspensión o emulsión) es impulsada por una bomba a través de un conducto con diámetros descendientes hasta llegar a una ranura o “*gap*” (~25  $\mu\text{m}$ ), a través de la cual, la muestra pasa a gran velocidad. En este punto se produce un aumento dramático en la presión dinámica del líquido y simultáneamente una disminución de la presión estática (PE), dando lugar al fenómeno de cavitación. El principio de Bernoulli que describe el citado fenómeno, indica que la PE disminuye por debajo de la presión de vapor del solvente, entonces, luego de atravesar el *gap* se produce la ebullición del mismo y se crean burbujas cuya implosión genera fuerzas de cizalla y colisión entre partículas del F y con las paredes del equipo (Keck & Müller 2006, Gao y cols. 2008). Este proceso es determinante en la disminución del tamaño de partícula en los homogeneizadores de alta presión y ha sido descrito como el responsable de generar la energía necesaria para transformar micro-partículas en sistemas nanometrizados (Liedtke y cols. 2000). En la figura 2 puede observarse un esquema del principio de funcionamiento de un HAP de tipo *piston-gap* como el utilizado en este Trabajo de Tesis.

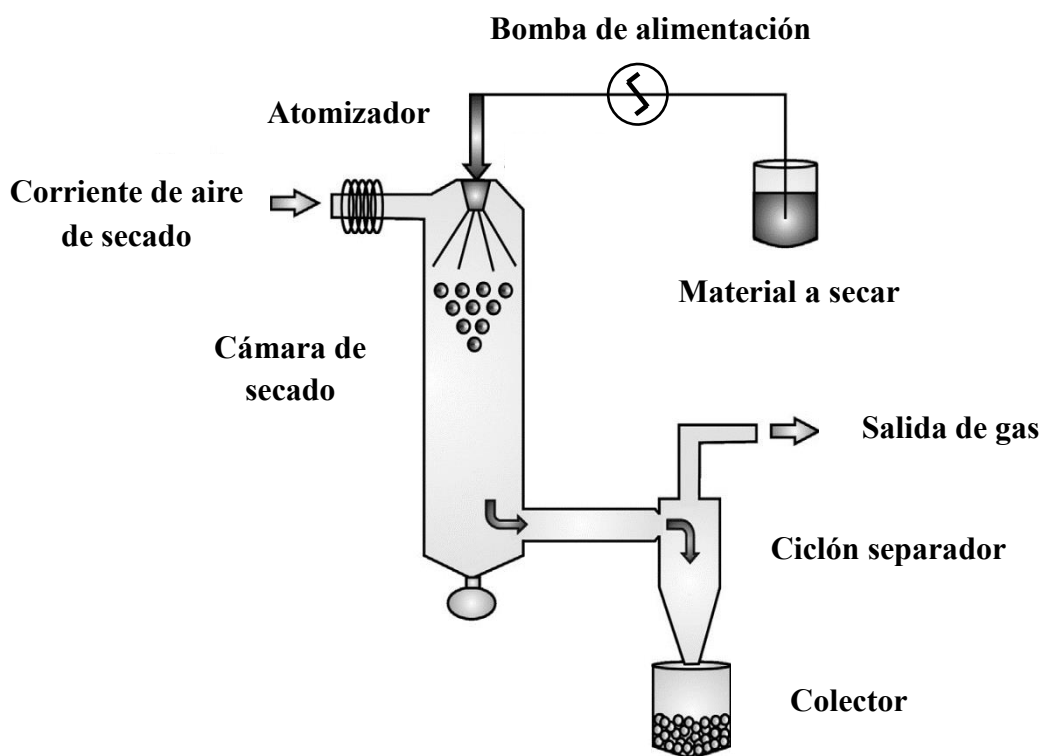


**Figura 2.** Esquema de funcionamiento de un homogeneizador de alta presión tipo *piston-gap*. Las partículas del F disminuyen su tamaño de debido al fenómeno de cavitación y fuerzas de choque ocurridas luego de atravesar una ranura muy pequeña a alta velocidad.

### 1.3. Secado por aspersión

La tecnología de secado por aspersión o *spray drying* (SD) es una técnica utilizada para la obtención de productos en polvo a partir de una muestra líquida. El SD es ampliamente aceptado en la

industria farmacéutica debido a su alta escalabilidad, versatilidad, reproducibilidad, rapidez y bajo costo. El principio fundamental del secado por aspersión es la evaporación rápida del solvente al atomizar un líquido en condiciones de vacío y calor. El aumento repentino en el área de contacto entre el líquido y una corriente de aire cuya temperatura puede ser regulada, sumado a las condiciones de vacío, permiten la evaporación del solvente y la formación de una partícula de polvo en un mismo paso (Sosnik & Seremeta 2015). En la figura 3 puede verse de manera esquemática el funcionamiento de un secador por aspersión típicamente usado a escala de laboratorio. Se compone de tres partes principales: un atomizador (generalmente neumático), una cámara de secado y un ciclón que separa las partículas formadas de la corriente de aire de secado.



**Figura 3.** Esquema de un secador por atomización mediante co-corriente de aire de secado (adaptado de Sosnik & Seremeta 2015).

Generalmente, durante el proceso de secado las muestras expuestas al calor pueden sufrir transiciones en el estado sólido, y si la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es superada, generar un sólido gomoso que se adhiere a las paredes del equipo disminuyendo así el rendimiento del proceso. Para contrarrestar este fenómeno se agregan auxiliares de secado o *carriers* que son materiales sólidos solubles/dispersables en la muestra y que aumentan la  $T_g$  del material final, los agentes más utilizados son lactosa, manitol, maltodextrina y dióxido de Silicio Coloidal, entre otros. Este último además es un material altamente poroso que aumenta la superficie de contacto aumentando la eficiencia de secado.

## **2. Objetivo específico de este capítulo**

Obtener y caracterizar NC de ABZ en forma de polvos redispersables mediante una técnica optimizada de homogeneización de alta presión y secado por aspersión.

## **3. Materiales y Metodología**

### **3.1. Materiales**

ABZ, lauril sulfato de Sodio (LSS), dióxido de Silicio Coloidal (Aerosil®) y lactosa anhidra de grado farmacéutico: Todo Droga (Argentina), Poloxamer 407 (P407) y Poloxamer 188 (P188): RUMAPEL, Argentina. Todos los demás reactivos fueron de grado pro-análisis. En todos los ensayos se utilizó Agua MilliQ.

### **3.2. Metodología**

#### **3.2.1. Obtención de nanosuspensiones de ABZ por HAP**

Se mezclaron el F y el agente estabilizante (P188, P407 o LSS) con la ayuda de un mortero. Luego de obtener una composición de aspecto homogéneo, se agregó agua MilliQ malaxando enérgicamente hasta obtener un núcleo pastoso. Se adicionó el resto del agua de manera gradual hasta observar la formación de una suspensión, la que fue transferida a un vaso de precipitados y agitada con barra magnética por 5 minutos. A continuación, con el objetivo de eliminar grumos que pudieran obstruir las válvulas del equipo homogeneizador, la muestra fue sometida a 5 minutos de ultrasonido y 3 ciclos de pre-molienda a 500 bar (Avestin C5 Emulsiflex®). Luego se aplicaron 20 y 30 ciclos de HAP a 1000 y 1200 bar. Se tomaron alícuotas cada 5 ciclos para medición de tamaño de partícula e IP por DDL. El sistema se refrigeró a través de un intercambiador de calor por contracorriente con agua fría (5°C).

#### **3.2.2. Tamaño de Partícula e Índice de Polidispersidad**

El tamaño de partícula e IP fueron determinados a través de la técnica de DDL (Delsa™ Nano C Particle Analyzer, Beckman and Coulter, Inc.). Previo a las mediciones, las muestras fueron diluidas (~20µL de nanosuspensión en 5 mL de agua MilliQ) hasta obtener la intensidad adecuada. El equipo se configuró para realizar 3 ciclos de 70 mediciones en cada muestra.

#### **3.2.3. Efecto de la presión de homogeneización**

Se evaluó el efecto de la presión de homogeneización en la disminución del tamaño de partícula e IP, para ello las formulaciones conteniendo P188 0,25%, 0,5%, 1% y 2,5% p/v (NS<sub>4</sub>, NS<sub>5</sub>, NS<sub>6</sub>, NS<sub>7</sub> respectivamente) se sometieron a 20 ciclos de 1000 y 1200 bar (tabla 1).

**Tabla 1.** Composición y parámetros de proceso de las NS obtenidas por HAP.

Formulación	ABZ	LSS	P407	P188	Agua	Ciclos-Presión (bar)
NS <sub>1</sub>	2.5	2.5	-	-	95	30-1000
NS <sub>2</sub>	2.5	-	2.5	-	95	30-1000
NS <sub>3</sub>	2.5	-	-	2.5	95	30-1000
NS <sub>4</sub>	2.5	-	-	0.25	97.25	20-1000 y 1200
NS <sub>5</sub>	2.5	-	-	0.5	97	20-1000 y 1200
NS <sub>6</sub>	2.5	-	-	1	96.5	20-1000 y 1200
NS <sub>7</sub>	2.5	-	-	2.5	95	20-1000 y 1200
NS <sub>8</sub>	2,5	-	-	2,5	45	20-1200
NS <sub>9</sub>	2,5	-	-	2,5	25	20-1200
NS <sub>10</sub>	5	-	-	5	25	20-1200

#### **3.2.4. Efecto de la concentración de ABZ en la suspensión**

Las suspensiones NS<sub>7</sub>, NS<sub>8</sub>, NS<sub>9</sub> y NS<sub>10</sub> conteniendo cantidades crecientes de ABZ (2,5; 5, 10 y 20% p/v respectivamente) se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.2.1.

#### **3.2.5. Solución sobresaturada de ABZ**

Se obtuvo una solución sobresaturada de ABZ. Para ello se agregó un exceso de una nanosuspensión de ABZ:P188 (1:1) a 1000 mL de agua MilliQ. El sistema se dejó en reposo por 48 horas y el sobrenadante se filtró por una membrana de filtración de 100 nm (Sartorius Stedim® Biotech, Alemania).

#### **3.2.6. Estabilidad física pre-secado**

Con el fin de evaluar la estabilidad física antes del secado, 25 mL de cada nanosuspensión fueron almacenados a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas a 0, 2, 5 y 7 días. Previamente a la medición de tamaño de partícula e IP, los tubos se agitaron por 30 segundos en un *vórtex*.

#### **3.2.7. Secado por aspersión**

Primeramente, 15 minutos antes del secado, las NS fueron adicionadas con concentraciones variables de *carriers* (lactosa y Aerosil®). Durante todo el proceso, el sistema se mantuvo bajo agitación magnética para favorecer la homogeneidad de las muestras; la velocidad del agitador fue seleccionada de manera tal que se formara un *vórtice* en la suspensión. Luego, las NS fueron secadas por aspersión en un Secador (Büchi B-290, Suiza) equipado con un módulo deshumidificador (Büchi B-296, Suiza) y

una tobera de doble fluido con un orificio de 1,5 mm. Las condiciones de trabajo fueron: aire de atomización 50 mmHg (819 L/h), temperatura de entrada 45°C, aspiración 75% (30 m<sup>3</sup>/h) y bomba 5% (2 mL/min). El proceso de secado se realizó en todos los casos inmediatamente después de la HAP.

### **3.2.8. Cálculo de rendimiento**

Una vez finalizado el proceso de secado, el polvo depositado en el vaso colector se recogió cuidadosamente con una espátula de goma y se pesó. El rendimiento porcentual del proceso fue calculado en base al contenido inicial de polvos en el material de partida.

### **3.2.9. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Se tomaron fotomicrografías de ABZ, y de NC de ABZ. Por otra parte, una gota de la nanosuspensión original y del material resuspendido se colocaron sobre portamuestras de aluminio y se dejaron secar en una estufa a 30°C. Las muestras fueron recubiertas con oro y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido (ZEISS, Sigma).

### **3.2.10. Microscopía óptica**

Una gota de nanosuspensión (NS<sub>3</sub>) y del material redisperso fueron observadas con un microscopio óptico (Olympus BX41) equipado con una cámara fotográfica (Infinity® 1).

### **3.2.11. Difractometría de rayos X de polvos**

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente en un Difractómetro de Rayos X (PANalytical X'Pert Pro), usando radiación Cu Ka ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), un tubo de voltaje de 40 kV con corriente de 40 mA. Las muestras fueron colocadas en porta muestras de Al y los datos tomados en un intervalo angular de 5° a 50° en 2 $\theta$ , con un paso de 0.04° y una velocidad de medida de 1°/min.

### **3.2.12. Disolución**

Para los ensayos de disolución (Sotax AT7 Smart®) se utilizaron las siguientes condiciones según Farmacopea Argentina 7° edición. Método de paleta a 50 rpm, en cada vaso se colocaron 900 mL HCl 0,1 M previamente filtrado y desgasificado. Se termostató el sistema a 37,0±0,5°C. Se tomaron muestras a 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos. Los controles utilizados fueron ABZ y una mezcla física (MF) de ABZ y P188 (1:1), en todos los casos, la dosis (50 mg) se colocó en cápsulas de gelatina rígida transparente. Los ensayos se realizaron por triplicado y la cuantificación de las muestras se realizó por espectrofotometría UV-Vis.

### **3.2.13. Espectrofotometría**

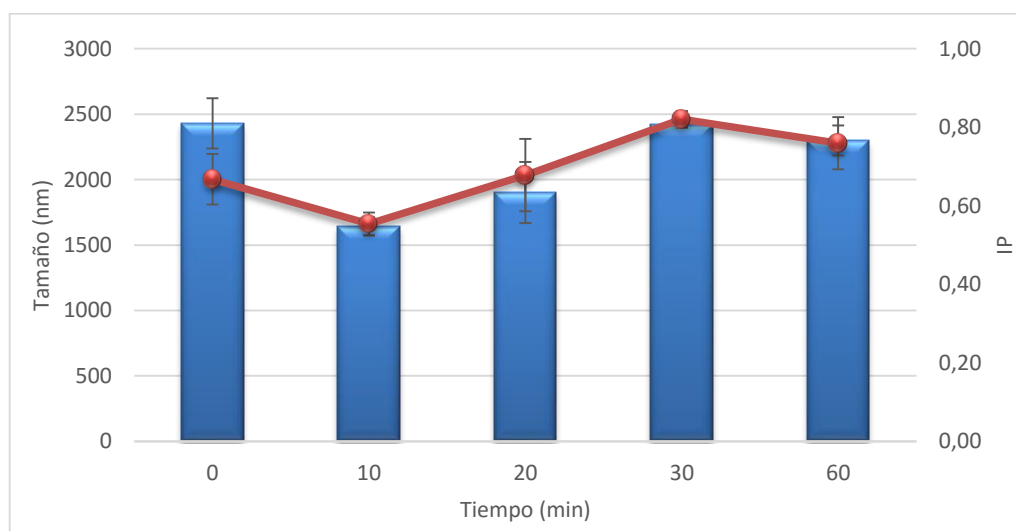
La concentración de ABZ fue determinada por espectrofotometría ultravioleta-visible. Para ello se realizó una curva de calibrado en HCl 0,1 M. Se prepararon tres soluciones madres de ABZ en etanol pro análisis y se realizaron diluciones con HCl 0,1 M abarcando siguientes concentraciones: 1,24; 2,48; 3,72; 4,96; 6,2; 7,44 y 9,92 ( $\times 10^{-5}$ M). La longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de 299 nm con un  $r^2$  de 0,9997 y un coeficiente de extinción molar (épsilon) de 16560 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### 4. Resultados y Discusión

Las suspensiones procesadas por HAP deben ser sometidas en todos los casos a procesos previos de dispersión y pre-molienda con el objetivo de eliminar partículas aglomeradas que pudieran obstaculizar las válvulas del homogeneizador. La pre-molienda se realiza mediante el uso de ultrahomogeneizadores de turbina (tipo Ultraturrax®) y sonicadores. Además, se ha reportado el uso del ultrasonido en la formulación de NC de F (Moorthi & Kathiresan 2013), sólidos inorgánicos (Moghtada y Ashiri 2016, Wang y cols. 2014) y celulosas nanometrizadas (Qin y cols. 2011, Guo y cols. 2016). Por lo tanto, en la primera etapa de este Capítulo, se evaluó el potencial efecto que estos procesos tenían en la disminución del tamaño de partícula.

##### 4.1. Ultrasonido

De acuerdo a lo observado en la figura 4, no se evidenció una tendencia clara de disminución del tamaño de partícula cuando se aplicó ultrasonido, si bien a la muestra de los 10 minutos presentó un tamaño menor al de la suspensión inicial, en las muestras subsiguientes se puede observar un incremento en tamaño, como así también en los índices de polidispersidad. Este fenómeno, puede ser asociado al agregado y desagregado reversible de las partículas del F en suspensión (Keck 2010). Cabe destacar que el equipamiento utilizado para estas mediciones pierde precisión cuando las muestras se encuentran por encima de los 2 micrómetros, por lo tanto no fue posible recabar información concluyente sobre la técnica.

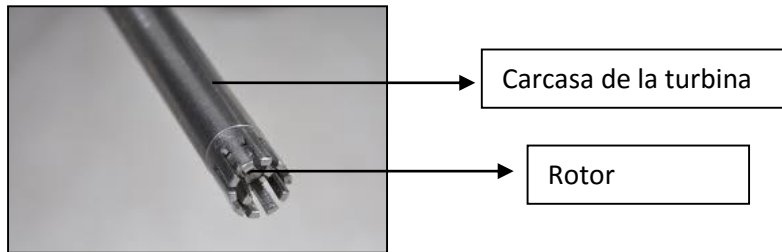


**Figura 4.** Tamaño de partícula e índice de polidispersidad de una suspensión de ABZ y P188 (1:1) procesada por ultrasonido.

##### 4.2. Ultrahomogeneizador

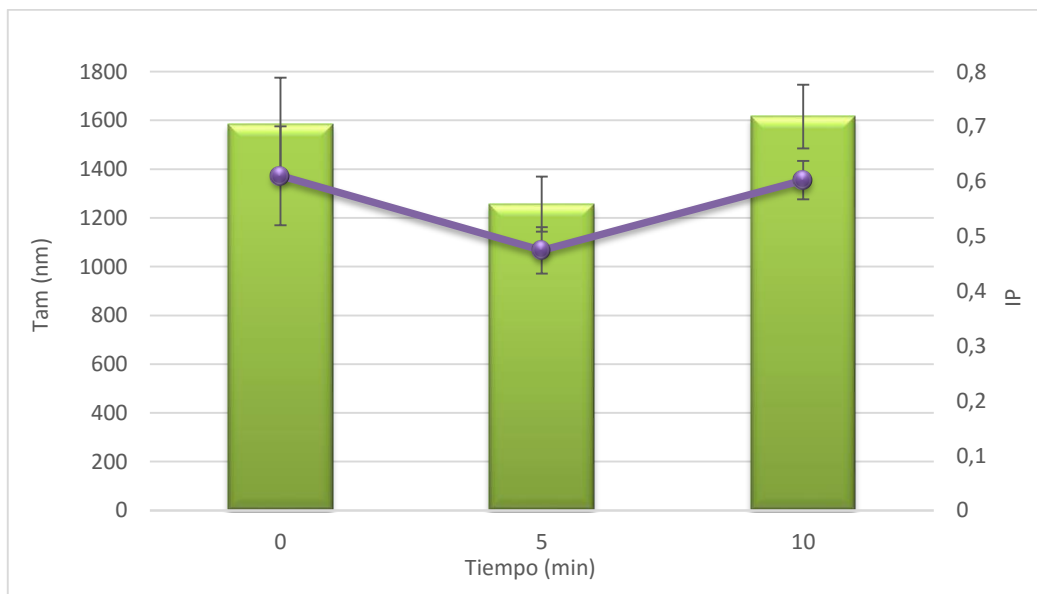
El ultrahomogeneizador está compuesto por una pequeña turbina acoplada a un motor que puede alcanzar hasta 20.000 rpm. Dicha turbina consta de una carcasa estática y un rotor (parte móvil), este

equipo ha sido diseñado para homogeneizar y dispersar sólidos en líquidos, además de otras funciones como la preparación de emulsiones y homogenatos de tejidos (figura 5). Las fuerzas de corte y cizalla que se generan entre el cuerpo y el rotor de la turbina generan la disminución del tamaño de partícula, generalmente a tiempos cortos de proceso.



**Figura 5.** Turbina de un Ultraturrax T18® IKA, ambas partes de la turbina son dentadas.

Sin embargo, como puede observarse en la figura 6, este proceso no generó una disminución en el tamaño de las partículas de ABZ en suspensión. Siguiendo la tendencia observada en el ensayo de ultrasonido, las partículas del F sufrieron un agregado y desagregado reversible a lo largo del proceso. Por otra parte, los altos valores de IP se relacionan con la presencia de múltiples poblaciones de tamaños de partícula en concordancia con lo descrito por Gao y cols. 2008.



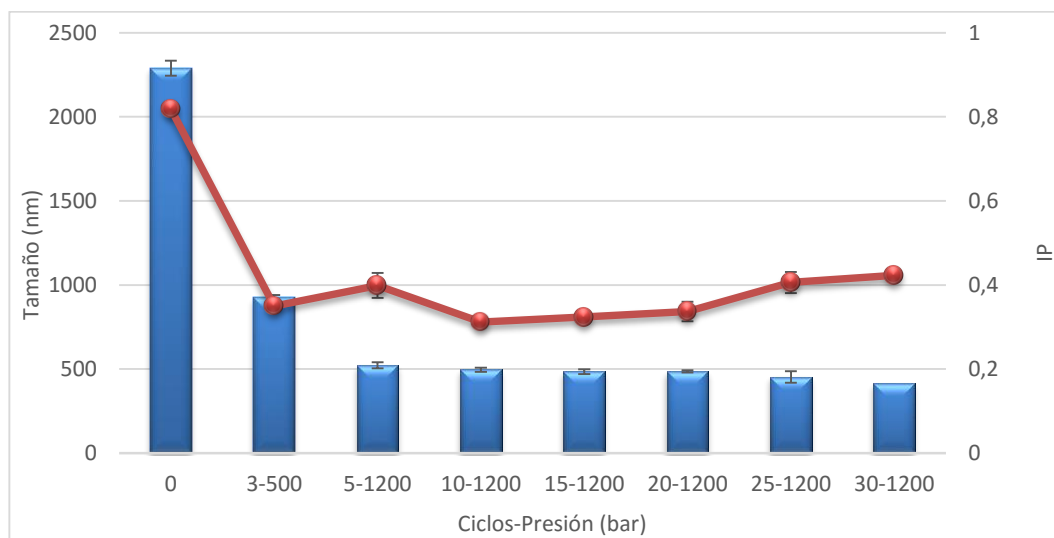
**Figura 6.** Tamaño e IP de una suspensión de ABZ:P188 (1:1) procesada en Ultrahomogeneizador.

#### 4.3. Homogeneización por Alta Presión

En la figura 7 se observa la disminución del tamaño de partícula y la evolución del IP de una suspensión de ABZ (NS<sub>7</sub>) procesada por HAP. Puede verse que luego de este período la suspensión presenta un tamaño cercano a la micra, mientras que el IP se acerca a los 0,35. Posteriormente, cuando la presión se aumenta a 1200 bar, la reducción en el tamaño de partícula se consigue rápidamente, y si



bien la tendencia de disminución se mantiene, la muestra permanece en un rango cercano a los 500 nm luego de los primeros ciclos de homogeneización. El IP también disminuye drásticamente luego de la pre-homogeneización, pero luego presenta variaciones inconsistentes con el proceso de molienda. Este factor fue atribuido al aumento de la temperatura que se produjo durante el proceso. Este incremento en la temperatura interfiere en el equilibrio adsorción-desorción de la capa de agua y surfactante que rodea a la partícula generando así su desestabilización y por lo tanto una variación del IP.

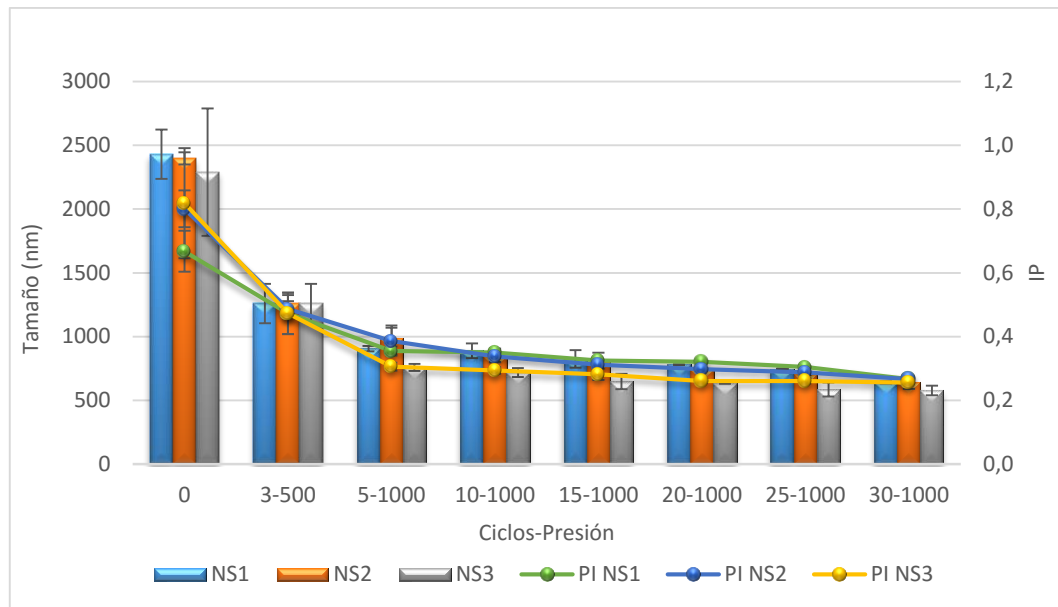


**Figura 7.** Disminución del tamaño de partícula a través de los ciclos de homogeneización sin la refrigeración del sistema.

Cuando la muestra se procesó sin refrigeración, la temperatura en el vaso contenedor alcanzó los 53°C. Debido a esto, se decidió proceder con la formulación de NS utilizando un intercambiador de calor provisto por el fabricante del equipo. Este dispositivo permitió mantener la temperatura de la muestra por debajo de los 10°C mediante el flujo por contracorriente de agua a 5°C contenida en un recipiente aislado térmicamente. En la figura 8 puede observarse que, en las 3 formulaciones estudiadas NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub> y NS<sub>3</sub> (conteniendo LSS, P407 y P188 respectivamente), los valores de tamaño de partícula y especialmente los IP disminuyeron durante todo el proceso, alcanzando el rango submicrométrico luego de 10 ciclos de homogeneización. NS<sub>1</sub> y NS<sub>2</sub> presentaron un comportamiento similar durante la HAP, mientras que NS<sub>3</sub> presentó en todos los ciclos evaluados, tamaños de partícula inferiores con una diferencia aproximada de 80 nm respecto a NS<sub>1</sub> y NS<sub>2</sub>.

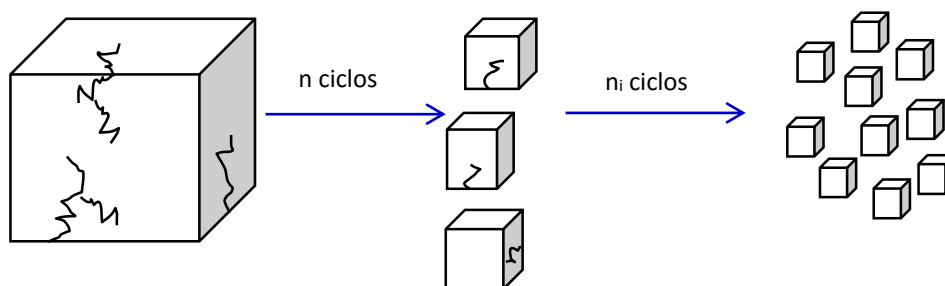
Por otra parte, P188 posee antecedentes de compatibilidad con ABZ y se demostró un aumento de la performance *in-vitro* e *in-vivo* de este F cuando se lo combinó con P188 en dispersiones sólidas (Castro y cols. 2010, Castro 2011, Castro y cols. 2012, Pensel y cols. 2014). Debido a lo observado en

nuestros experimentos y a los reportado previamente, P188 fue seleccionado para realizar estudios más profundos en la formulación de NCABZ.



**Figura 8.** Disminución del tamaño de partícula de NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub> y NS<sub>3</sub> conteniendo LSS, P407 y P188 respectivamente se procesaron a 30 ciclos de 1000 bar con refrigeración del sistema.

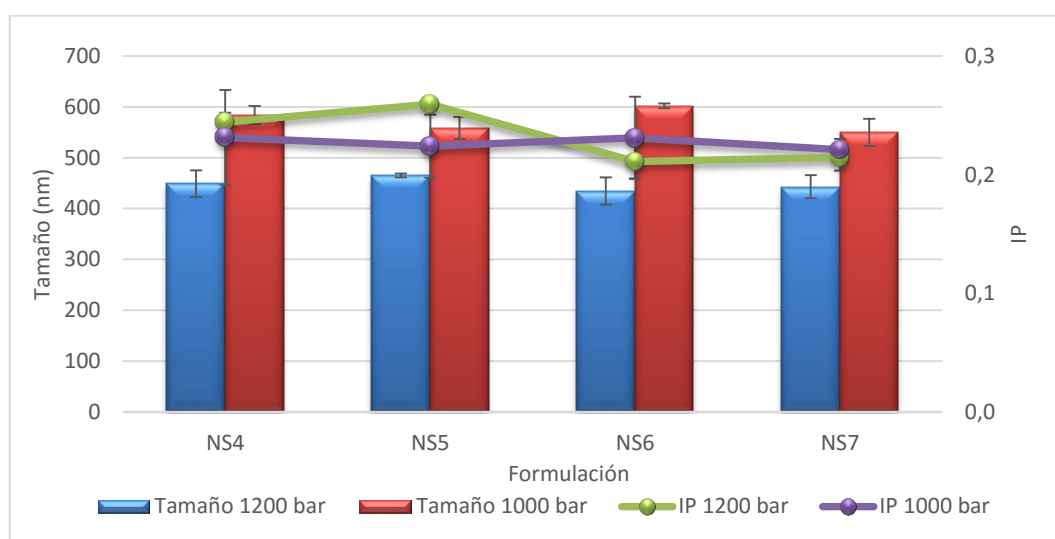
En la figura 9, puede observarse un fenómeno descrito en bibliografía (Keck & Müller 2006); durante el proceso de molienda, las partículas del F comienzan a romperse en sus puntos más débiles hasta que los mismos se agotan y no es posible continuar el proceso de nanometrización. Debido a esto, en las fases iniciales de la molienda se produce un descenso marcado en el tamaño de partícula, mientras que por encima de los 20 ciclos no se observan mayores modificaciones. Entonces, las muestras subsiguientes fueron procesadas a 20 ciclos, evitando de esta manera un desgaste innecesario de las piezas del homogeneizador y la pérdida de tiempo y energía.



**Figura 9.** Esquema del fenómeno de fractura de las partículas de un fármaco durante el proceso de homogeneización por alta presión. Los puntos débiles disminuyen con la cantidad de ciclos aplicados.

#### 4.3.1. Efecto de la presión de homogeneización y concentración de tensioactivo

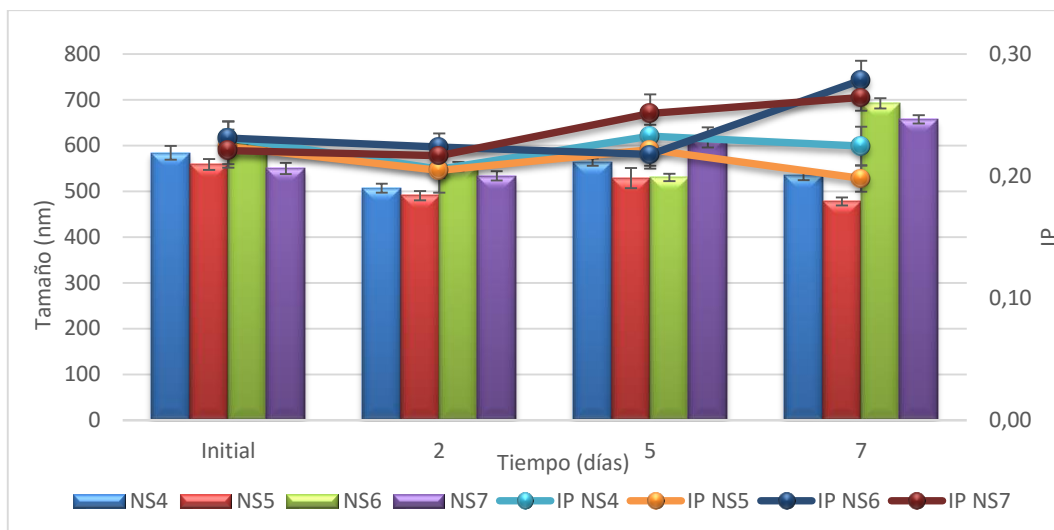
Las formulaciones NS<sub>4</sub>, NS<sub>5</sub>, NS<sub>6</sub> y NS<sub>7</sub> conteniendo 0,25, 0,5, 1 y 2,5% de P188 respectivamente fueron procesadas a 1000 y 1200 bar (20 ciclos). En la figura 10, puede observarse que independientemente de la concentración de tensioactivo, la presión juega un rol preponderante en la nanometrización del F con una diferencia de 150 nm entre las fórmulas tratadas a 1000 y 1200 bar. Respecto a la presión de homogeneización, se ha descrito que un aumento de la misma produce partículas más pequeñas en general, sin embargo se llega a un máximo de presión por encima del cual ya no se produce una disminución de tamaño de partícula (Keck & Müller 2006). Como puede apreciarse nuestros resultados son concordantes con lo anteriormente mencionado.



**Figura 10.** Efecto de la presión de homogeneización en 4 formulaciones conteniendo cantidades crecientes de P188 (0,25; 0,5; 1 y 2,5%).

#### 4.4. Estabilidad física pre-secado

Si bien las nanosuspensiones fueron diseñadas para ser convertidas en sólidos redispersables, fue necesario corroborar que previo al secado de las mismas, el tamaño de partícula e IP permanezcan constantes. Como se puede ver en la figura 11, ambos parámetros se mantienen estables por al menos 2 días, el cuál es un período aceptable hasta el proceso de secado. Luego de un lapso de tiempo de 5 días aparecen algunas oscilaciones y se observó la aparición de un precipitado en las muestras que pudo ser revertido mediante agitación manual.



**Figura 11.** Estabilidad física de nanosuspensiones de ABZ con diferentes concentraciones de P188.

#### 4.5. Secado por aspersión

Una vez optimizada la composición de las nanosuspensiones y del proceso de obtención, se procedió a realizar un estudio exhaustivo de secado por aspersión. Las NS<sub>4-7</sub> con concentraciones crecientes de P188 (0,25; 0,5; 1 y 2,5%) y procesadas a 1200 bar fueron secadas por aspersión bajo diferentes condiciones de trabajo y con el agregado de auxiliares de secado con dos objetivos principales:

- ✓ La obtención de altos rendimientos (>65%).
- ✓ Lograr que las muestras puedan re-dispersarse a un tamaño de partícula lo más cercano posible a la NS original.

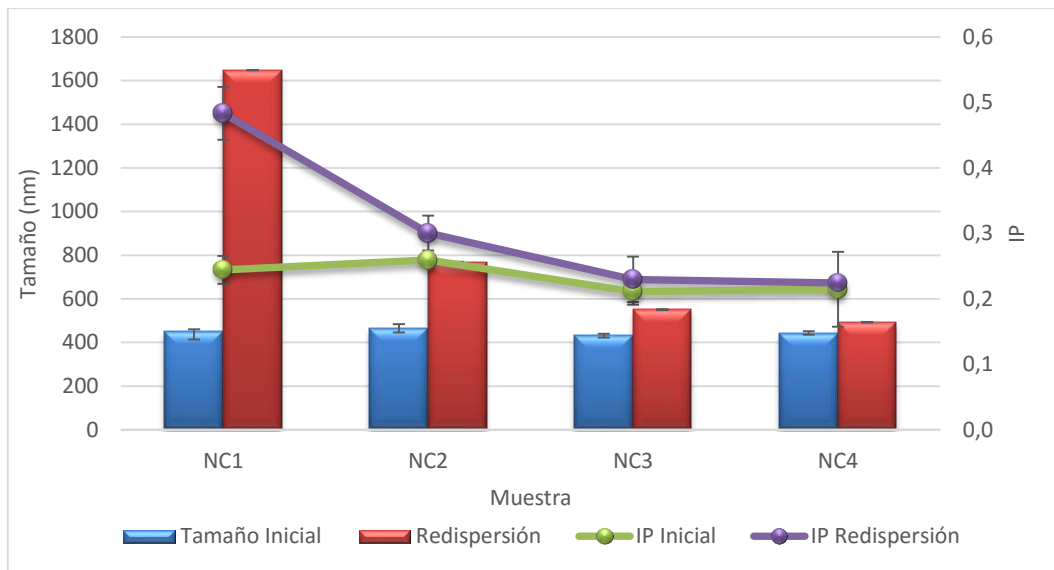
En la tabla 2 se muestran las variantes de NC obtenidos partiendo de NS con diferentes concentraciones de P188, auxiliares de secado, concentración de sólidos totales y su influencia en la redispersión, rendimiento del proceso y contenido de humedad.

**Tabla 2.** NC de ABZ obtenidos a partir de NS de diferente composición. La cantidad de P188, el agregado de diferentes cantidades de auxiliares de secado y la cantidad de sólidos totales condicionan la redispersión y el rendimiento del proceso. L: lactosa, SiO<sub>2</sub>: Dióxido de Silicio Coloidal, Rend.: rendimiento del proceso de SD. \* Los porcentajes de correspondientes a lactosa y Aerosil® correspondiente al 7,5% de los sólidos totales en la NS original.

Muestra	NS	L (%)	SiO <sub>2</sub> (%)	Tamaño Redispersión (nm)	IP	Rend. (%)	Humedad (%)
NC <sub>1</sub>	NS <sub>4</sub>	-	-	1648,0 ± 245,3	0,483 ± 0,103	< 10	2,21
NC <sub>2</sub>	NS <sub>5</sub>	-	-	769,5 ± 85,2	0,300 ± 0,041	< 10	1,96
NC <sub>3</sub>	NS <sub>6</sub>	-	-	550,6 ± 12,1	0,230 ± 0,022	21,28	1,83
NC <sub>4</sub>	NS <sub>7</sub>	-	-	493,0 ± 10,2	0,224 ± 0,004	72,30	2,20
NC <sub>5</sub> *	NS <sub>6</sub>	100	0	550,6 ± 7,0	0,211 ± 0,006	21,28	2,51
NC <sub>6</sub> *	NS <sub>6</sub>	75	25	563,5 ± 15,9	0,227 ± 0,007	47,96	1,79
NC <sub>7</sub> *	NS <sub>6</sub>	60	40	641,0 ± 22,4	0,239 ± 0,003	53,52	1,52
NC <sub>8</sub> *	NS <sub>6</sub>	50	50	919,2 ± 35,2	0,312 ± 0,010	67,52	1,34
NC <sub>10</sub>	NS <sub>7</sub>	-	-	465,3 ± 11,7	0,256 ± 0,009	71,30	1,87
NC <sub>11</sub>	NS <sub>8</sub>	-	-	750,1 ± 24,3	0,321 ± 0,012	52,41	2,31
NC <sub>12</sub>	NS <sub>9</sub>	-	-	1012,5 ± 48,3	0,335 ± 0,052	57,08	2,78
NC <sub>13</sub>	NS <sub>10</sub>	-	-	1018,5 ± 37,1	0,366 ± 0,061	53,52	3,53

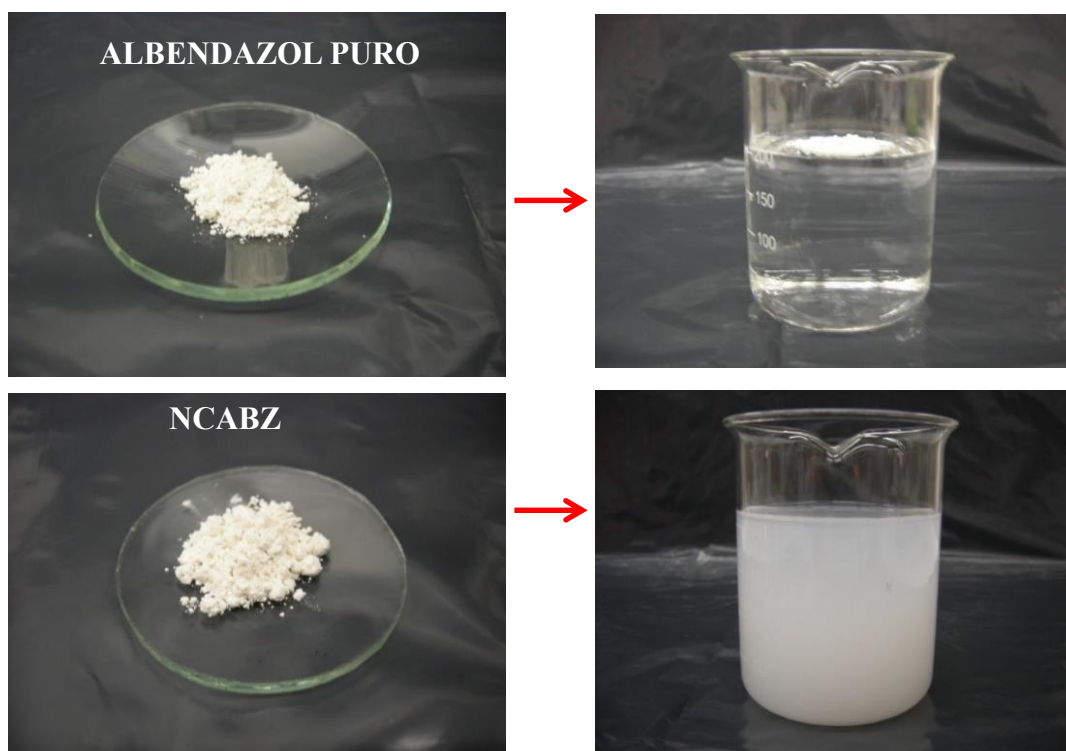
#### 4.5.1. Concentración de P188 en la redispersión de los nanocristales

Partiendo de las NS<sub>4-7</sub> conteniendo cantidades crecientes de P188 (0,25; 0,5; 1 y 2,5%), se obtuvieron diferentes polvos correspondientes a NC de ABZ (NC<sub>1-4</sub>). La concentración de P188 influyó fuertemente la redispersión (figura 12) y el rendimiento del proceso (tabla 2). Las muestras conteniendo mayor cantidad de P188 se redispersan fácilmente cuando entran en contacto con el medio acuoso, esto se atribuye a la disolución de los puentes solubles que dicho polímero forma entre las partículas de F, dejando a las nanopartículas de ABZ suspendidas nuevamente. Cuando una suspensión es atomizada, en la boquilla de aspersión se generan fuerzas de corte y un aumento de la energía cinética de las partículas. Si la energía con la que colisionan es lo suficientemente alta, la capa de tensioactivo que las rodea podría dañarse y generar un agregado irreversible de los NC (Freitas & Müller 1998). Por este motivo, sumado a la capacidad de formar puentes solubles entre los cristales, la concentración de P188 juega un rol preponderante en la capacidad estabilizante cuando la muestra está en estado líquido.



**Figura 12.** Redispersión (tamaño e IP) a concentraciones crecientes de P188.

En la figura 13 se observan fotografías de ABZ en agua y de la redispersión de NCABZ (luego de 10 minutos). El F puro, altamente hidrófobo permanece flotando en la superficie del líquido por tiempo indefinido mientras que los NC se dispersan fácilmente en el entorno acuoso.



**Figura 13.** Redispersión de ABZ y NCABZ:P188 (1:1) en agua a 25°C luego 5 minutos.

#### **4.5.2. Concentración de P188 en el rendimiento del proceso**

Como puede observarse en la tabla 2 (NC<sub>1-4</sub>), el incremento de P188 en la NS produce aumentos drásticos en el rendimiento del proceso, para las muestras NC<sub>1</sub> y NC<sub>2</sub> (P188 0,25 y 0,5% respectivamente) sólo una pequeña porción de material pudo ser recogida en el vaso colector (<10%). Por otra parte, la muestra NC<sub>3</sub> (P188 1%) presentó un rendimiento cercano al 20%, mientras que NC<sub>4</sub> (2,5% de P188) fue procesada con un rendimiento superior al 70%. En un equipo de secado por aspersión, las partículas recién formadas son separadas de la corriente de aire en el ciclón, aquí el flujo de gases genera una fuerza centrífuga en forma de espiral que separa las partículas por gravedad para que sean recogidas en el vaso colector. En idénticas condiciones de trabajo, las gotas de NS formadas en el atomizador poseen el mismo tamaño, pero al contener cantidades crecientes de sólidos, la partícula final presentará una mayor densidad. De este modo, aquellas fórmulas con mayor cantidad de sólidos, generarán partículas que podrán ser separadas más eficientemente en el ciclón y por lo tanto se obtienen rendimientos más elevados. Sumado a esto, ha sido descrito que aquellas partículas con tamaños cercanos a los 2 micrómetros no son separadas en el ciclón y son eliminadas con la corriente de gases, este hecho abona lo comentado anteriormente ya que a menores concentraciones de sólidos las partículas generadas poseerán menor tamaño (Sosnik & Seremeta 2015). Cabe destacar además que en las condiciones de trabajo seleccionadas (aire de atomización elevado: 50 mmHg y bomba de alimentación baja 2 mL/min) se generan gotas extremadamente finas.

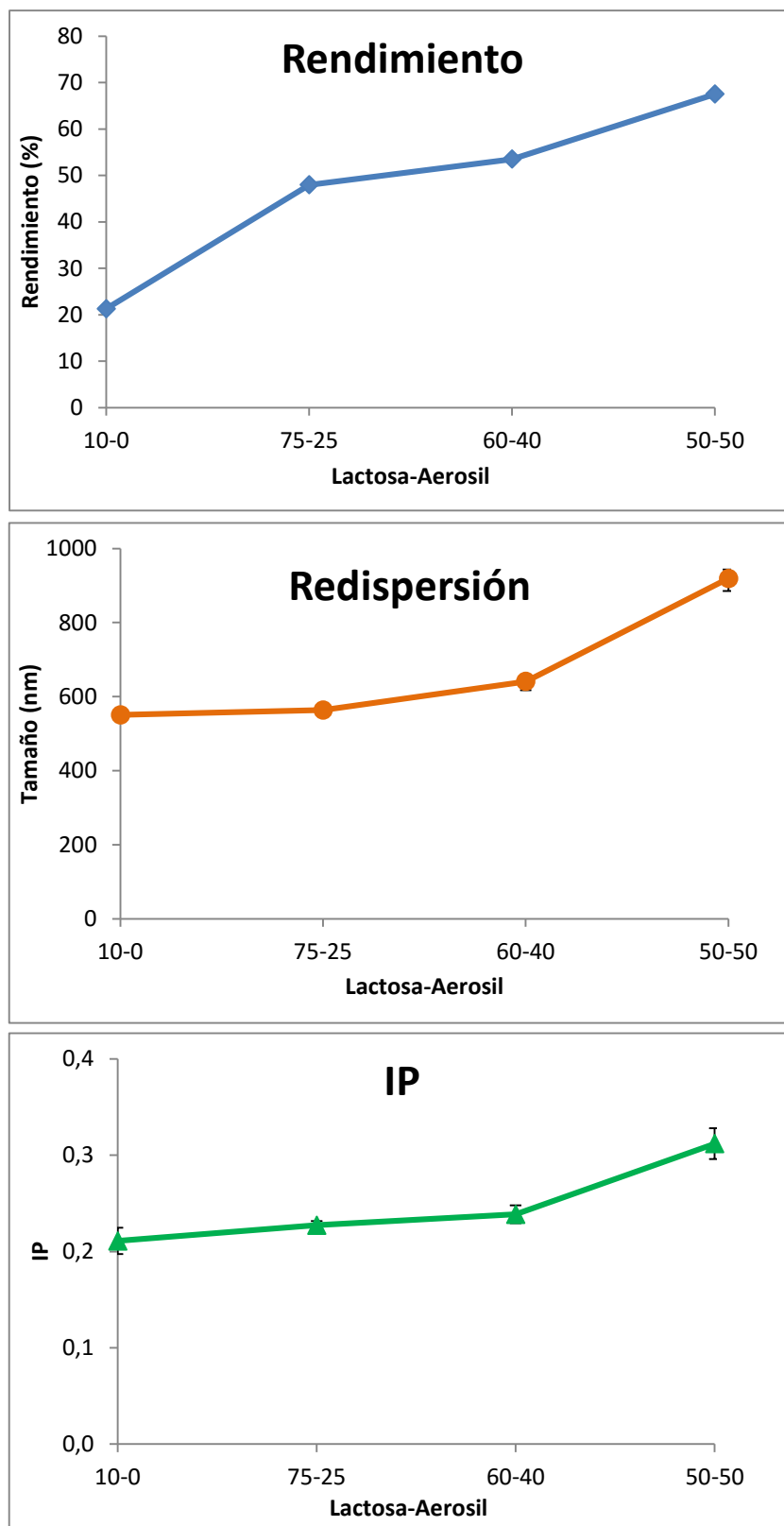
A modo de conclusión, y como resultado del análisis de la figura 12, puede deducirse que las muestras NC<sub>3</sub> y NC<sub>4</sub> poseen una alta capacidad de redispersión. Particularmente NC<sub>3</sub> cuenta con la ventaja de que no se necesita una alta proporción de P188, esto es un beneficio para una potencial formulación basada en esta plataforma ya que sería necesario una menor cantidad de material en la FF final. A pesar de esto NC<sub>3</sub> presentó un rendimiento de proceso muy bajo, y debido a esto en la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos en un estudio de optimización de la fórmula para el secado.

#### **4.5.3. Auxiliares de secado: optimización de la formulación NC<sub>3</sub>**

Con el objetivo de lograr un aumento en el rendimiento de secado de NC<sub>3</sub> (21,28%) manteniendo sus propiedades de redispersión, se evaluó el agregado de un 7,5% de auxiliares de secado (respecto a la cantidad de sólidos originales). Para ello, se utilizaron lactosa y SiO<sub>2</sub> en diferentes combinaciones.

En la figura 14 puede observarse que el agregado sólo de lactosa no produce modificaciones respecto a los resultados originales, pero cuando se combina con SiO<sub>2</sub> en cantidades crecientes, el rendimiento del proceso aumenta notablemente. Sin embargo, la redispersión de la muestra se ve seriamente afectada y los beneficios logrados en cuanto a rendimiento van en detrimento del tamaño e IP final del material obtenido.

Por lo citado anteriormente se decidió continuar los estudios de esta tesis con la formulación NC<sub>4</sub> (ABZ:P188 en relación 1:1) que presentó muy buenos valores de redispersión y un alto rendimiento de proceso.

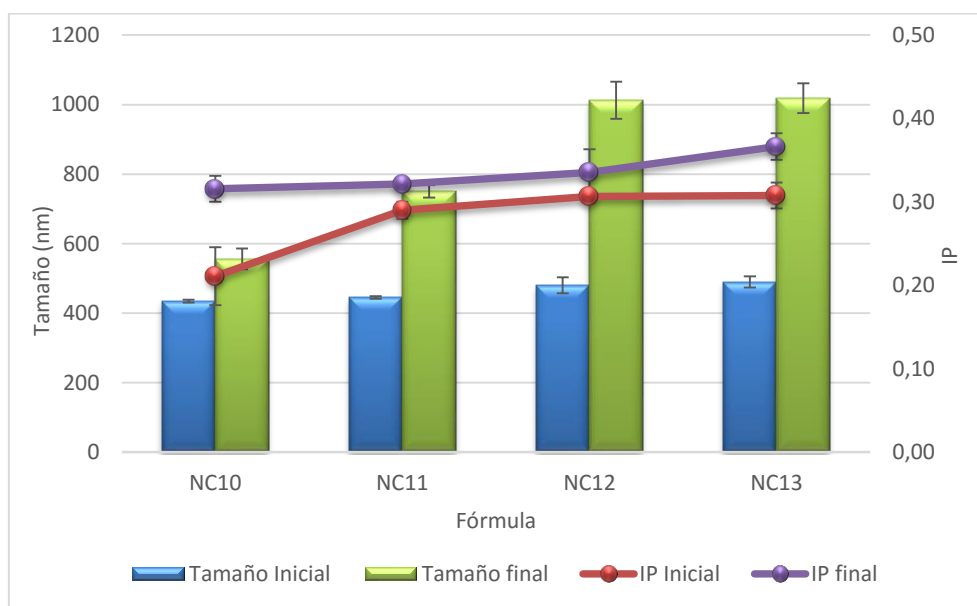


**Figura 14.** Rendimiento, redispersión e IP para diferentes relaciones de lactosa:SiO<sub>2</sub> partiendo de NS<sub>6</sub>. La cantidad total de auxiliar se fijó en 7,5% sobre el total de sólidos iniciales.



#### 4.5.4. Concentración de sólidos dispersos en la suspensión original

Con el objetivo de producir una mayor cantidad de producto en menor tiempo, se realizaron pruebas incrementando la cantidad de sólidos en la suspensión original, respetando la proporción 1:1 entre ABZ y P188. Las NS<sub>7-10</sub> con concentraciones crecientes de ABZ (2,5; 5, 10 y 20% respectivamente) fueron procesadas satisfactoriamente por HAP alcanzando tamaños de partícula cercanos a los 400 nm en todos los casos, y luego fueron secadas para obtener los polvos NC<sub>10-13</sub>. Sin embargo, los tamaños de partícula del material redisperso no fueron satisfactorios, con incrementos entre 300 y 500 nm (figura 15). De acuerdo a lo citado en la sección 4.5.2, durante el secado por aspersión, un aumento en la cantidad de partículas en suspensión por unidad de volumen, podría generar un mayor número de colisiones con el consecuente agregado irreversible de las partículas del F que afecta luego la redispersión de los polvos obtenidos. La fórmula NC<sub>11</sub> con un 10% de ABZ, podría haber permitido duplicar la cantidad de material por unidad de tiempo, sin embargo, se decidió descartar esta opción debido a la diferencia observada entre la NS original y la muestra resuspendida (444,9 nm y 750,9 nm respectivamente).



**Figura 15.** Efecto de la concentración de ABZ (2,5; 5, 10 y 20 %) en el tamaño de partícula e IP de la suspensión original y el material redisperso.

#### 4.6. Solución sobresaturada de ABZ

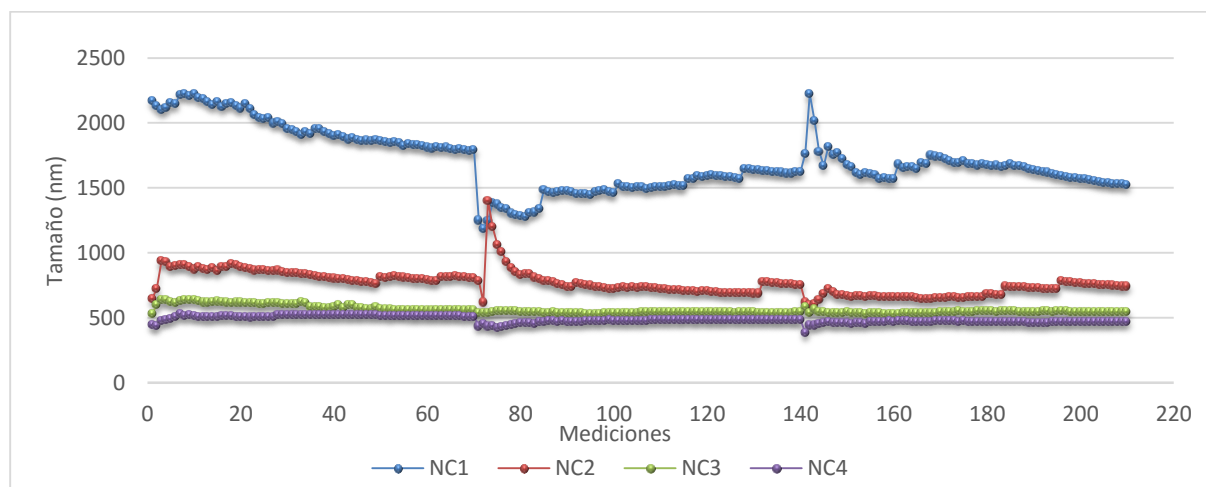
Cuando una muestra de NC en polvo se redispersa en un medio acuoso para realizar la medición del tamaño de partícula, parte del F en suspensión podría disolverse y generar una determinación errónea (Keck 2010). Para evaluar este fenómeno se realizaron pruebas suspendiendo los polvos en agua MilliQ, solución fisiológica y una solución sobresaturada de ABZ. Los NC presentan concentraciones de saturación incrementada de acuerdo a lo descrito por Böhm y cols. 1999 y Mauludin y cols. 2009.

Cuando una nanosuspensión de ABZ alcanza el equilibrio de solubilidad (ver sección materiales y métodos 3.2.7), la concentración de F disuelto será la máxima posible, de esta manera se impedirá que el F pase desde el estado sólido (NC) al soluble y los valores obtenidos en la medición de tamaño e IP serán más confiables. Sin embargo, como puede verse en la tabla 3, los valores de tamaño de partícula e IP son similares para todos los medios de redispersión.

**Tabla 3.** Tamaño de partícula e IP para NC resuspendidos en diferentes medios acuosos.

MEDIO	TAMAÑO	IP
Agua MilliQ	550,5±31,09	0,228±0,009
Solución fisiológica	535,43±12,45	0,241±0,005
Super-saturada	525,63±10,45	0,220±0,001

En la figura 16 se puede corroborar lo descrito anteriormente, se muestran 210 mediciones en agua a tiempo real (3 ciclos de 70) obtenidas mediante *dynamic light scattering* para las muestras NC<sub>1-4</sub>. Específicamente en las muestras con alta redispersión (NC<sub>3</sub> y NC<sub>4</sub>) los valores se mantienen constantes en torno a los 500 nm descartando de esta manera la posibilidad de una disolución del F.

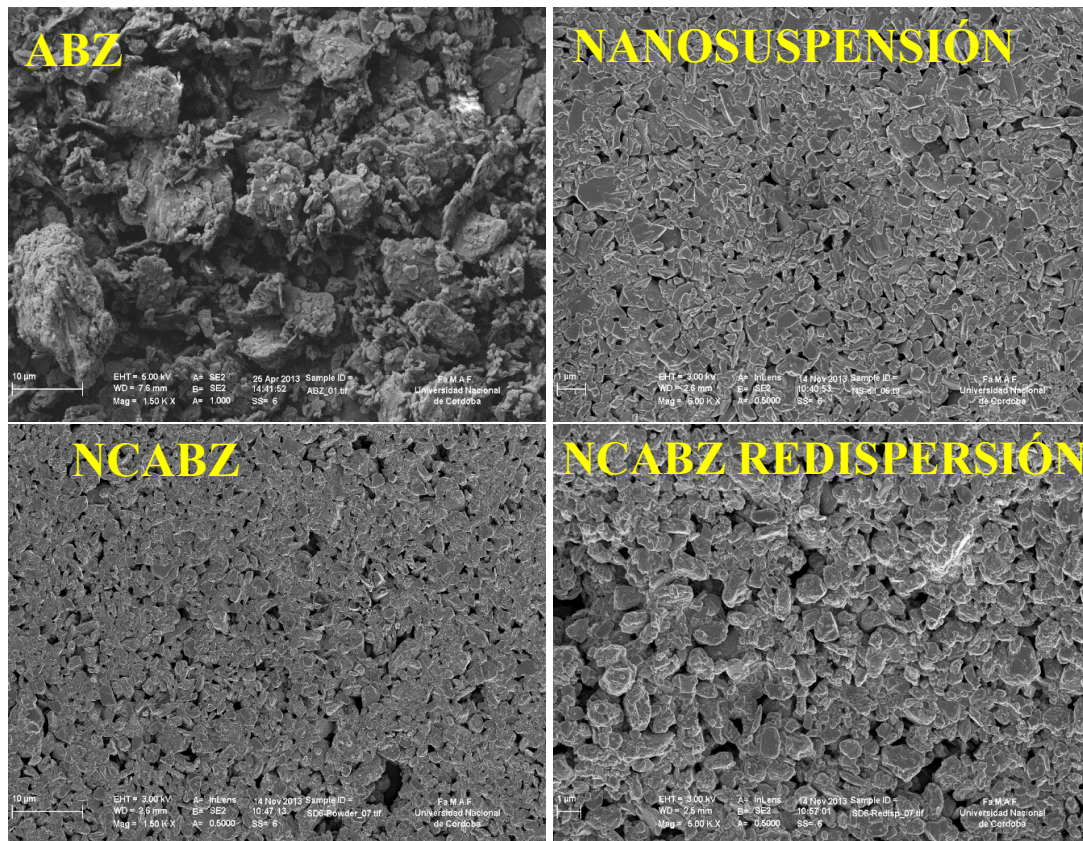


**Figura 16.** Variación de las mediciones en tiempo real obtenidas por DLS para NC<sub>1-4</sub> en agua.

## 4.7. Microscopía

### 4.7.1. Microscopía electrónica de barrido

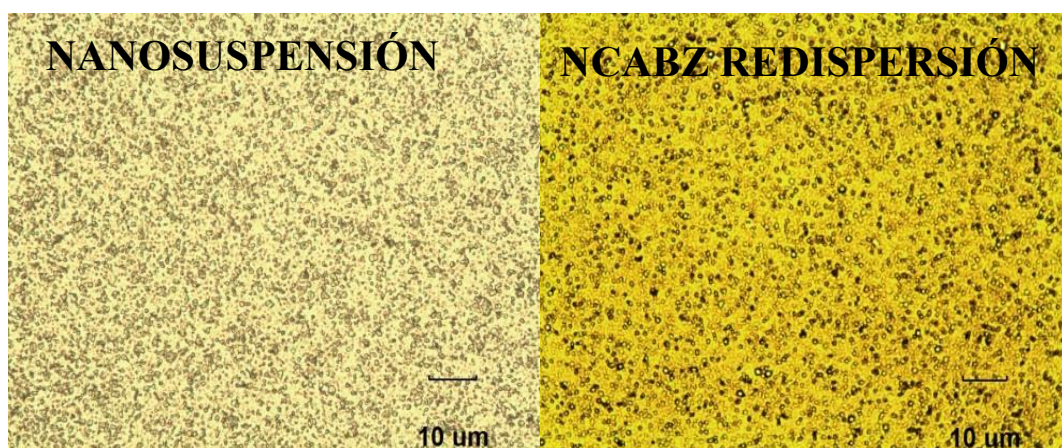
Las fotomicrografías obtenidas por MEB (fig. 17) revelaron grandes diferencias de tamaño de partícula y morfología entre F puro y el material procesado. Tanto la NS como el material secado por spray presentaron partículas de tamaño uniforme, dentro del rango sub-micrométrico y con forma de escamas.



**Figura 17.** Microscopía electrónica de barrido de ABZ y en las diferentes etapas del proceso.

#### 4.7.2. Microscopía óptica

La característica clave de los NC es su superficie de contacto y velocidad de disolución incrementada, ambas características aumentan exponencialmente en el rango nanométrico. La microscopía óptica fue utilizada para descartar la presencia de partículas agregadas en suspensión, tanto en la NS como en los NC redispersos. Como puede verse en la microfotografía de ambas muestras, no se observaron cúmulos de partículas en ninguno de los casos.



**Figura 18.** Microscopía óptica de una NS y NCABZ redispersos en agua.



#### 4.8. Solubilidad

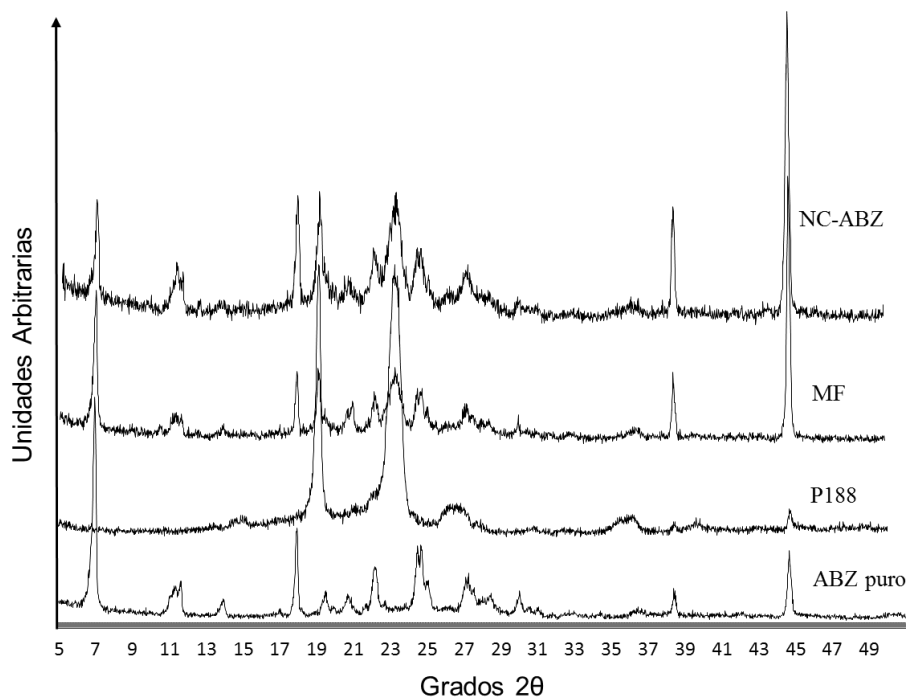
Como puede observarse en la tabla 4, la solubilidad aparente de ABZ en agua no sufre cambios significativos entre el F puro y la MF (~5 mg.L<sup>-1</sup>), sin embargo, ABZ formulado como NC presenta un incremento notable de la solubilidad (~20 mg.L<sup>-1</sup>). En HCl 0,1 M se observó la misma tendencia, pero los valores de solubilidad son más elevados debido a que ABZ tiene grupos básicos que lo hacen más soluble a pH ácido. La concentración de saturación alcanzada por un F tiene una estrecha relación con el tamaño de partícula, su curvatura y la presión de disolución. Por debajo del micrómetro, la curvatura de las partículas aumenta de manera exponencial y lo mismo ocurre con la presión de disolución, como resultado la cantidad de F disuelto es mayor (Mauludin y cols. 2009, Böhm y cols. 1999).

**Tabla 4.** Solubilidad de ABZ, MF de ABZ:P188 (1:1) y NCABZ (NC<sub>4</sub>) en agua y HCl 0,1 M.

Medio	ABZ	MF	NCABZ
Agua (mg.L <sup>-1</sup> )	5,41±0,65	5,18±1,02	20,85±2,81
HCl 0,1 M (mg.L <sup>-1</sup> )	420,04±28,85	412,94±32,65	609,26±65,17

#### 4.9. Difractometría de rayos X de polvos

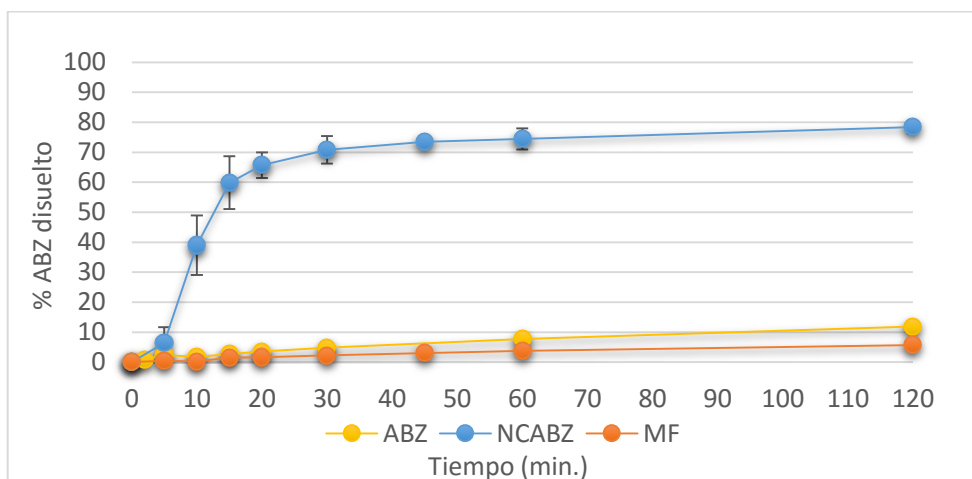
Se conoce que pueden existir transformaciones en la forma cristalina, amorfización o polimorfismo cuando se aplican proceso de alta energía a un F, más específicamente en el proceso de molienda (Kluge y cols. 2012). Para evaluar dicho fenómeno se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X de ABZ, de P188, MF y NCABZ. De acuerdo a lo observado en la figura 19, varios de los picos cristalinos característicos de ABZ (11°, 18°, 27°, 38° y 44° de 2θ) se conservan tanto en la MF como en los NC.



**Figura 19.** Patrones de difracción de rayos X de polvos de ABZ, P188, MF y NCABZ.

#### 4.10. Disolución

En la figura 20 se observan los perfiles de disolución de ABZ, de la MF y de NCABZ. La desintegración de las cápsulas de gelatina rígida generó un tiempo retardo de 5 minutos. La muestra de NC presentó una alta velocidad de disolución (80,54% a los 30 minutos) en comparación con las muestras control que no superaron un 10% a lo largo de todo el ensayo.



**Figura 20.** Disolución de NCABZ, MF y ABZ. HCl 0,1 M, canastillo a 75 rpm.

Una de las características más notables de los NC es su concentración de saturación y velocidad de disolución ( $dc/dt$ ) incrementadas. De acuerdo a la ecuación de Noyes-Whitney (Ecuación 1),  $dc/dt$  es proporcional al factor A de superficie, el cual se ve incrementado de manera exponencial cuando un F posee un tamaño de partícula inferior a la micra (figura 21).

$$\frac{dC}{dt} = AD \times \frac{(C_s - C_x)}{h}$$

Ecuación 1 (Noyes y Withney).

$dC/dt$ : velocidad de disolución

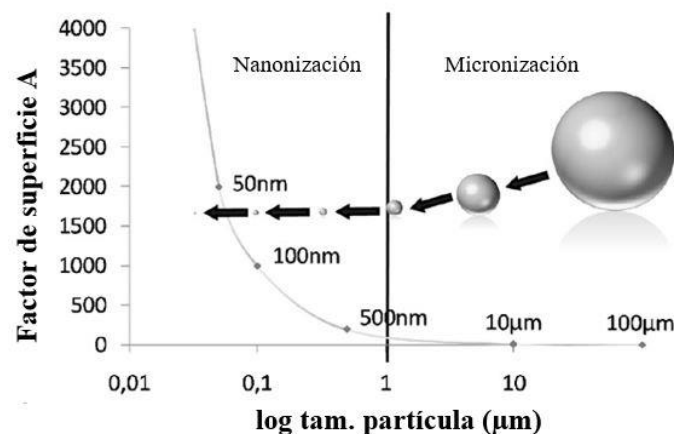
A: Factor de superficie

D: coeficiente de difusión del fármaco

$C_s$ : Concentración de saturación

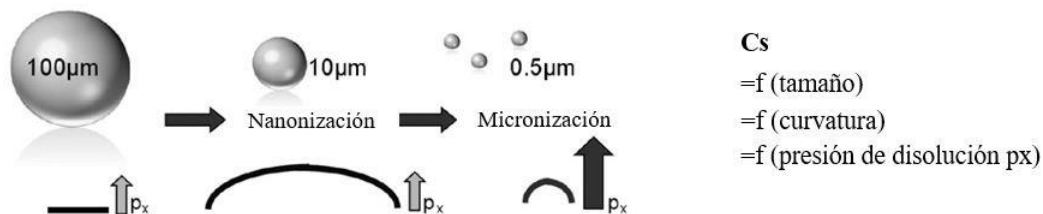
$C_x$ : concentración del fármaco en el medio de disolución

h: espesor de la capa de difusión



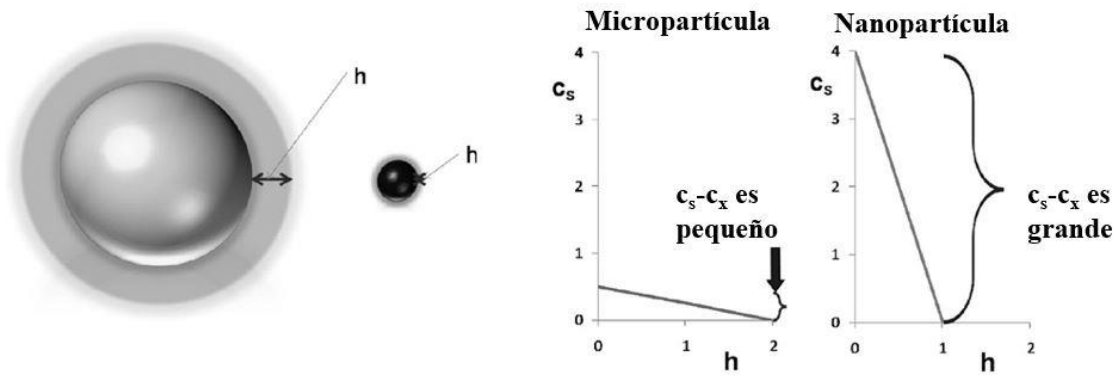
**Figura 21.** Aumento en el coeficiente de superficie A. El factor de superficie A aumenta exponencialmente por debajo de la micra (adaptado de Mauludin 2009).

Por otra parte, y de acuerdo a lo descrito por el principio de Kelvin (Simonelli y cols. 1970), la presión de vapor (PV) de un compuesto será mayor en una superficie curva respecto a una superficie plana. Análogamente a lo descrito para la PV, la presión de disolución de un F aumentará cuando disminuya su tamaño de partícula debido a que la curvatura también se verá incrementada. De esta manera, el equilibrio que se produce alrededor de la partícula entre la fase sólida y la fase disuelta (recristalización) se verá favorecido en favor de la disolución del F (figura 22).



**Figura 22.** Aumento en la concentración de saturación  $C_s$ . La curvatura de una partícula nanométrica puede ser muy grande, entonces la presión de disolución ( $p_x$ ) se ve incrementada. La  $C_s$  es función (f) del tamaño, la curvatura y de  $p_x$ . Adaptado de Mauludin 2009.

Adicionalmente, de acuerdo a la ecuación de Prandtl (Mosharraf & Nyström 1995), la distancia difusional ( $h$ ) disminuye cuando decrece el tamaño de partícula. Entonces, el incremento simultáneo en la  $c_s$  y la disminución en  $h$  produce un aumento en el gradiente  $c_s-c_x/h$  y por lo tanto un incremento en la velocidad de disolución (figura 23).



**Figura 23.** Descenso en la distancia de difusional  $h$  y consiguiente aumento en el gradiente de concentración  $(c_s-c_x)/h$  en la concentración de saturación  $C_s$ . Adaptado de Mauludin 2009.

Todo lo mencionado anteriormente concuerda con los datos obtenidos en el presente ensayo, ya que se observó un incremento en la velocidad de disolución y también una mayor concentración de saturación de ABZ en el medio. Esto podría tener un efecto potencialmente positivo en una administración *in vivo* ya que habría más ABZ disuelto en estómago, disponible para ser absorbido en duodeno y, por lo tanto, podría esperarse un aumento en la eficacia del F.

## 5. Conclusiones

Durante la primera etapa del presente Trabajo de Tesis se propuso la obtención de NC de ABZ como estrategia para aumentar su velocidad de disolución. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que la HAP es una estrategia válida para la obtención de nanosuspensiones de ABZ, y que la técnica de secado por aspersión puede ser utilizada para la obtención de polvos redispersables. La concentración de P188 jugó un rol preponderante en el rendimiento del proceso y la capacidad de redispersión de las muestras. Con un tamaño final cercano a los 500 nm, ABZ presentó una concentración de saturación y velocidad de disolución elevada, manteniendo las características cristalinas del material de partida.

## 6. Referencias

- Böhm, B.H.L., & Müller, R.H., 1999. Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. *PSTT* 2(8), pp.336–339.
- Castro, S. y cols., 2010. Improved Albendazole Dissolution Rate in Pluronic 188 Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech*, 11(4), pp.1518–1525.
- Castro, S.G., 2011. “Diseño y Evaluación de Dispersiones Sólidas Poloxamer 188/ Albendazol. Aspectos Farmacotécnicos y Biofarmacéuticos”. , Tesis Doctoral.
- Dib, a. y cols., 2011. Albendazole sulphoxide kinetic disposition after treatment with different formulations in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 34(2), pp.136–141.
- Freitas, C. & Müller, R.H., 1998. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46(2), pp.145–151.
- Gao, L., Zhang, A.D. & Chen, A.M., 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J. Nanop. Res.*, 10 (5) pp.845–862.
- Guo, J. y cols., 2016. Effects of ultrasonic treatment during acid hydrolysis on the yield, particle size and structure of cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.* 135, pp.248–255.
- Junyaprasert, V.B. & Morakul, B., 2015. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), pp.13–23.
- Keck, C.M., 2010. Particle size analysis of nanocrystals: Improved analysis method. *Int. J. Pharm.*, 390(1), pp.3–12.
- Keck, C.M. & Müller, R.H., 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62(1), pp.3–16.
- Kluge, J., Muhrer, G. & Mazzotti, M., 2012. High pressure homogenization of pharmaceutical solids. *J. Supercrit. Fluids*, 66(0), pp.380–388.
- Liedtke, S. y cols., 2000. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. *Int. J. Pharm.*, 196(2), pp.183–185.
- Mahesh, K.V., Singh, S.K. & Gulati, M., 2014. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide. *Pow. Tech.*, 256, pp.436–449.
- Mauludin, R., Müller, R.H. & Keck, C.M., 2009. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int. J. Pharm.*, 370(1–2), pp.202–209.
- Moghtada, A. & Ashiri, R., 2016. Enhancing the formation of tetragonal phase in perovskite nanocrystals using an ultrasound assisted wet chemical method. *Ultrason.s Sonochem.*, 33, pp.141–149.



- Moorthi, C. & Kathiresan, K., 2013. Fabrication of highly stable sonication assisted curcumin nanocrystals by nanoprecipitation method. *Drug Inv. Today*, 5(1), pp.66–69.
- Mosharraf, M. & Nyström, C., 1995. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int. J. Pharm.*, 122(1–2), pp.35–47.
- Noyes, A.A. & Whitney, W.R., 1897. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 19(12), pp.930–934.
- Pensel, P.E. y cols., 2014. Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy of albendazole formulated as solid dispersions in experimental cystic echinococcosis. *Veterinary parasitology*, 203(1–2), pp.80–6.
- Qin, Z.Y. y cols., 2011. Preparation of ultrasonic-assisted high carboxylate content cellulose nanocrystals by tempo oxidation. *BioResources*, 6(2), pp.1136–1146.
- Rowe R, Sheskey PJ and Owen SC. Poloxamer. Handbook of Pharmaceutical Excipients. ed. 5ta. Editorial: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. USA.2006.
- Shegokar, R. & Müller, R.H., 2010. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int. J. Pharm.*, 399(1–2), pp.129–139.
- Shete, G. y Bansal, A.K., 2016. NanoCrySP technology for generation of drug nanocrystals: translational aspects and business potential. *Drug Delivery and Translational Research*.
- Suri, G.S. y Sen, T., 2016. A recent trend of drug-nanoparticles in suspension for the application in drug delivery. , 11, pp.2861–2876.
- Simonelli, A.P., Mehta, S.C. & Higuchi, W.I., 1970. Inhibition of sulfathiazole crystal growth by polyvinylpyrrolidone. *Journal of pharmaceutical sciences*, 59(5), pp.633–638.
- Sosnik, A. & Seremeta, K.P., 2015. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.*
- Wang, W. y cols., 2014. Preparation and properties of Cu<sub>2</sub>FeSnS<sub>4</sub> nanocrystals by ultrasound-assisted microwave irradiation. *Mater. Lett.*, 125, pp.183–186.

## **Capítulo II. Ensayos farmacocinéticos en ratones y perros**

## **1. Introducción**

### **1.1. Farmacocinética**

Para que un F ejerza su/s efecto/s terapéutico/s, debe alcanzar un intervalo preciso de concentraciones en la biofase, es decir, en su 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 F alcanza en su lugar de acción dependerá de los siguientes procesos:

- a) *Liberación*: proceso por el cual el F, con una velocidad determinada, abandona la FF.
- b) *Absorción*: definida como la entrada del F en el organismo mediante un proceso de permeación a través de las membranas biológicas especializadas. Para que este paso se lleve a cabo el F debe estar disuelto en los fluidos biológicos.
- c) *Distribución*: una vez que el F se absorbe, ingresa en la circulación sistémica y es distribuido hacia los tejidos. Generalmente, una fracción del F 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 F 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 (LADME) varían con el tiempo. Por este motivo, la cantidad de F 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 FF, la vía de administración, la dosis y la pauta de administración, para conseguir la máxima eficacia con el menor riesgo para el paciente.

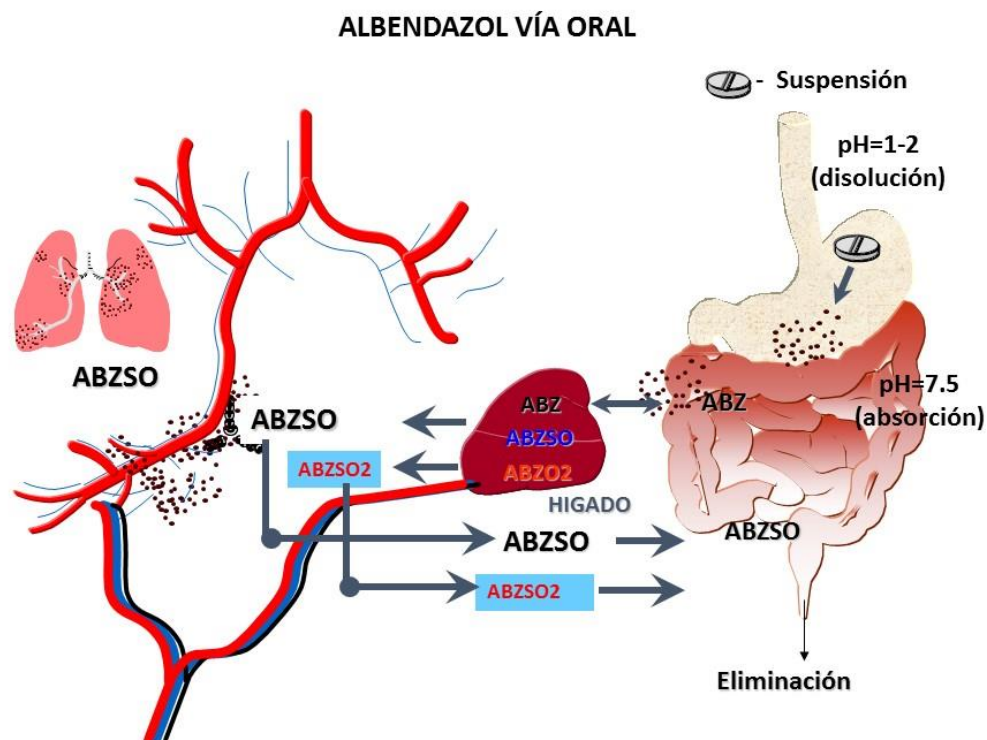
Entonces, la actividad de un F depende de una secuencia de eventos fisicoquímicos que comienzan cuando la molécula bioactiva ingresa al organismo y culmina cuando dicha molécula alcanza su sitio de acción (biofase) y desencadena la respuesta biológica adecuada. Estos eventos pueden dividirse en tres fases: la fase farmacéutica, la fase farmacocinética y la fase farmacodinámica, como se indica en la tabla 1, adaptada de Galbis Perez JA, 2000.

**Tabla 1.** Fases que comprenden la acción medicamentosa.

<b>Fase</b>	<b>Acciones involucradas</b>	<b>Objetivos</b>
<b>Farmacéutica o Biofarmacéutica</b>	Selección de la vía de administración. Preparación de la forma farmacéutica más apropiada. Modificación de los parámetros de liberación.	Facilitar la absorción. Eliminar propiedades organolépticas indeseadas. Cambios en los perfiles farmacocinéticos (liberación rápida o sostenida) o en el sitio de liberación.
<b>Farmacocinética</b>	Destino de fármaco en el organismo: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME)	Biodisponibilidad, ej: relación de la dosis administrada con la concentración en la biofase, como función del tiempo.
<b>Farmacodinámica</b>	Cualidad de la interacción Fármaco-Receptor. Naturaleza e intensidad de la respuesta biológica.	Maximizar la actividad biológica. Maximizar la selectividad. Minimizar la toxicidad.

### **1.2. Albendazol administrado por vía oral**

Como puede observarse en la figura 1, cuando ABZ es administrado por la vía oral en una FF sólida, al tomar contacto con el contenido del estómago, ésta deberá desintegrarse para dar lugar a la disolución del F, proceso que se verá favorecido en las condiciones de pH de este órgano. En la primera porción del intestino delgado, ABZ se absorbe y por circulación portal llega al hígado donde es ampliamente metabolizado a albendazol sulfóxido (ABZSO), el metabolito activo responsable de la actividad antiparasitaria (Gotschall y cols., 1990), también se ha reportado la sulfoxidación de ABZ en la pared del intestino en humanos y animales (Dollery, 1999). Una segunda oxidación da lugar a un metabolito sulfona sin actividad (ABZSO<sub>2</sub>). El metabolismo oxidativo es muy rápido y por lo tanto ABZ no se detecta en plasma como droga madre (Dayan, 2003). Una vez en circulación sistémica, ABZSO se distribuye ampliamente 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 de ABZ son extensamente eliminados por la bilis.



**Figura 1.** Eventos que suceden a la administración oral de ABZ en una forma farmacéutica sólida.

La baja solubilidad de los derivados BZD en general, y de ABZ en particular, es el factor limitante de su absorción durante el tránsito gastrointestinal (McKellar & Scott 1990), que puede verse comprometida en mayor medida en especies con tractos gastrointestinales relativamente cortos como por ejemplo los caninos (McKellar y cols. 1993). De esta manera, la velocidad de disolución de un derivado BZD en el estómago de las diferentes especies animales es extremadamente importante para alcanzar una adecuada absorción y por consiguiente una alta BD y elevada eficacia clínica. La baja absorción gastrointestinal y la falta de solubilidad acuosa son limitantes claves para la formulación, BD y eficacia de los antihelmínticos BZD.

Como puede apreciarse en el Capítulo I del presente Trabajo de Tesis, la obtención de NC redispersables permitió aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución de ABZ. Siguiendo esta línea de trabajo, se decidió avanzar en estudios farmacocinéticos para establecer si la mejora de los parámetros *in vitro* repercutía favorablemente en la fracción de F absorbido.

### **Objetivo específico**

Evaluar el comportamiento farmacocinético de ABZ formulado como NC utilizando dos modelos animales diferentes, *ratón* y *perro*.

## 2. Estudio farmacocinético en ratones

### 2.1. Diseño Experimental

#### 2.1.1. Animales

Se utilizaron 112 ratones machos Balb-c sanos (56 para cada formulación estudiada). Los mismos presentaron un peso de  $25\pm 2$ g y fueron provistos de agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en un ambiente con temperatura y humedad relativa controlada en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil.

Los protocolos de manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la UNCPBA. Los experimentos fueron realizados adhiriendo a las normas de buenas prácticas internacionales de manejo de animales ([www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/) doi: 10.17226/12910).

#### 2.1.2. Formulaciones estudiadas

Para el estudio se seleccionó una nanosuspensión de ABZ: P 188 (1:1) tamaño de partícula ~ 450 nm, IP: ~0,259 obtenida de acuerdo a los métodos 2.2.1 (HAP) y 2.2.10 (SD) del Capítulo I. Estos ensayos se realizaron en forma comparativa con una suspensión control de ABZ y P188 obtenida en un mortero, y con la misma composición de la nanosuspensión a ensayar.

#### 2.1.3. Organización de los grupos de animales y administración del fármaco.

Los animales experimentales utilizados en el ensayo fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (4 animales por punto) a los cuales se le administró con cánula por vía intragástrica una dosis equivalente a 25 mg/kg de peso de la formulación correspondiente según se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Diseño experimental del ensayo farmacocinético en ratones. Se realizó una cinética comparativa entre una NS de ABZ y una suspensión control preparada en un mortero, ambas con idénticas proporciones de ABZ, P188 y agua. Se tomaron muestras de plasma de 4 ratones en cada tiempo evaluado.

Grupo 1	Formulación
Grupo 1 n= 56	Suspensión de ABZ:P188 (1:1). 5g de sólidos en 95g de agua.
Grupo 2 n=56	Nanosuspensión de ABZ:P188 (1:1). 5g de sólidos en 95g de agua.

#### **2.1.4. Manipulación de las muestras de plasma**

Luego de la administración se recolectaron muestras de sangre (500 µl) en tubos tipo Eppendorff® heparinizados a los siguientes intervalos de tiempo: 0 (blanco); 0,08; 0,25; 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 24 hs. Posteriormente se obtuvieron los respectivos plasmas mediante centrifugación a 2000 rpm (4°C) durante 15min, luego la muestra fue almacenada a -18°C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

### **2.2. Análisis de ABZ y su metabolito (Sulfóxido de albendazol)**

#### **2.2.1. Método de extracción de los metabolitos del plasma**

ABZ y sus metabolitos fueron extraídos mediante un método de extracción doble (liquido-liquido) con acetonitrilo y hexano según se detalla a continuación:

**a)** A cada muestra de plasma de 100 µl se le adicionó 10 µl de estándar interno (EI) OBZ (Oxibendazol, 5 µg /mL).

**b)** Luego se realizó la primera extracción con acetonitrilo: en este caso 1 mL del mismo fue agregado a la muestra, posteriormente ésta fue mezclada en vortex (IKA® Vibrax VXR basic) y centrifugada a 4 °C por 15 min.

**c)** El sobrenadante fue recolectado y trasvasado a un tubo de vidrio rotulado.

**d)** La segunda extracción fue llevada a cabo mediante el agregado de 1 mL de hexano a la muestra. Posteriormente se homogenizó en vortex (VWR™ 160 VX-2500 Multi-tube Vortexer) a baja velocidad y centrifugada (Centrifuge CL30R-Thermo Electron Corporation- IEC CL30R centrifuge) a 4 °C por 15min. Una vez finalizado este procedimiento, el sobrenadante fue descartado.

**e)** Por último, se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno (Thermo electron Corporation-Savant SPD 2010- SpeedVac Concentrator) y los extractos secos fueron reconstituidos con 150 µl de fase móvil (30/70 ACN/ buffer) para su posterior análisis por HPLC.

#### **2.2.2. Análisis y cuantificación de ABZ y sus metabolitos por HPLC**

Previo al análisis y cuantificación de ABZ en plasma hay que considerar que este F no va a ser detectado debido a que sufre una importante metabolización en hígado como se describió previamente.

Para el análisis de ABZ y albendazol sulfóxido (ABZSO) se utilizó un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC Shimadzu. Corporation, Kyoto, Japón), equipado con una bomba de gradiente LC-10AS; Autoinyector (SIL-10A); Termostatizador de columna (Eppendorf TC-45, Eppendorf, Madison, WI, USA) fijado a 30°C; Detector UV-V y un integrador CBM-10A. Los datos fueron analizados utilizando el programa Class LC10 (SPD-10A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Para la separación de los metabolitos de ABZ se utilizó una columna C18 de fase reversa (Kromasil®100 Å; 250 x 4,6 mm; 5 µm). Se inyectó un volumen de muestra de 50 µl y los analitos fueron detectados por UV-Vis a una longitud de máxima absorción de 292 nm. Las muestras plasmáticas fueron eluidas a una velocidad de flujo de 1,2 mL/min, utilizando una fase móvil de acetonitrilo/ acetato

de amonio 0,025 M (pH 6,6) en forma de gradiente con las siguientes proporciones: 28/72 (0 -2 minutos) y 45/55 (2-16 minutos) (Sánchez Bruni, S. y col.; 1995).

### **2.2.3. Curva de calibración de ABZSO**

Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y fueron construidas graficando la relación entre el Área de ABZ SO/Área de estándar interno (EI) en función de la concentración del metabolito ( $\mu\text{g/mL}$ ). El intervalo de concentraciones fue 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 para cada analito fueron construidas mediante análisis de regresión lineal de cuadrados mínimos, lo cual estimó un coeficiente de correlación (r) de 0,9960 (ABZ), 0,9977 (ABZSO) y 0,9935 (ABZ SO<sub>2</sub>). Los límites de cuantificación (QL) fueron 0.01  $\mu\text{g/mL}$  (ABZ y ABZSO) y 0.03  $\mu\text{g/mL}$  (ABZ SO<sub>2</sub>).

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

## **2.3. Procesamiento de datos y construcción de curvas plasmáticas**

La curva de concentración vs. tiempo para ABZSO en el plasma de cada animal, fue calculada procesando los datos experimentales mediante un programa de hojas de cálculo (Microsoft Excel v16.0). Los datos de C<sub>máx</sub>, T<sub>máx</sub> y 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).

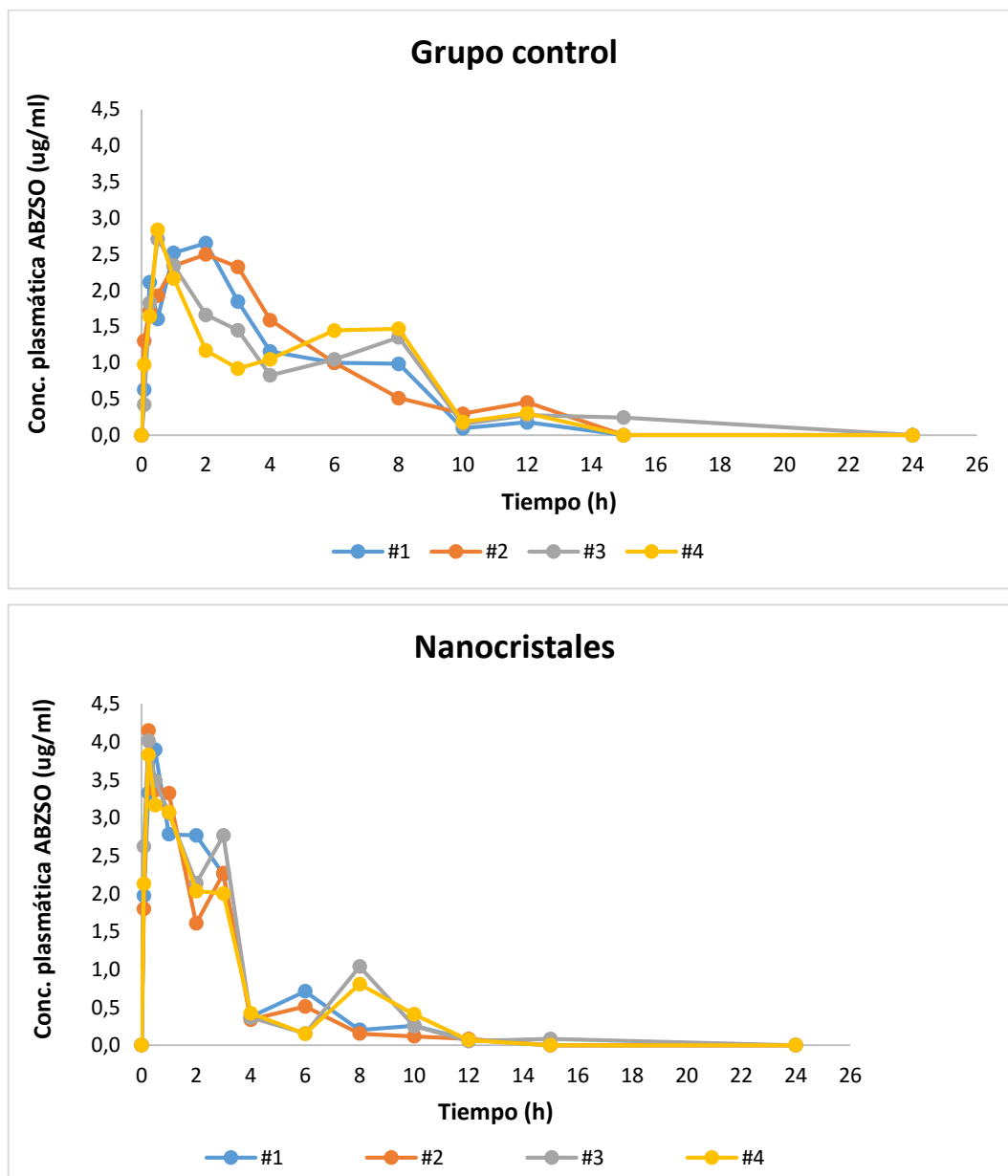
### **2.3.1. Análisis estadístico**

Los datos farmacocinéticos comparativos de ABC, T<sub>max</sub> y C<sub>max</sub> para ABZSO, fueron analizados mediante test de ANOVA para los diferentes grupos. El valor de (P <0.05) fue considerado estadísticamente significativo.



## 2.4. Resultados

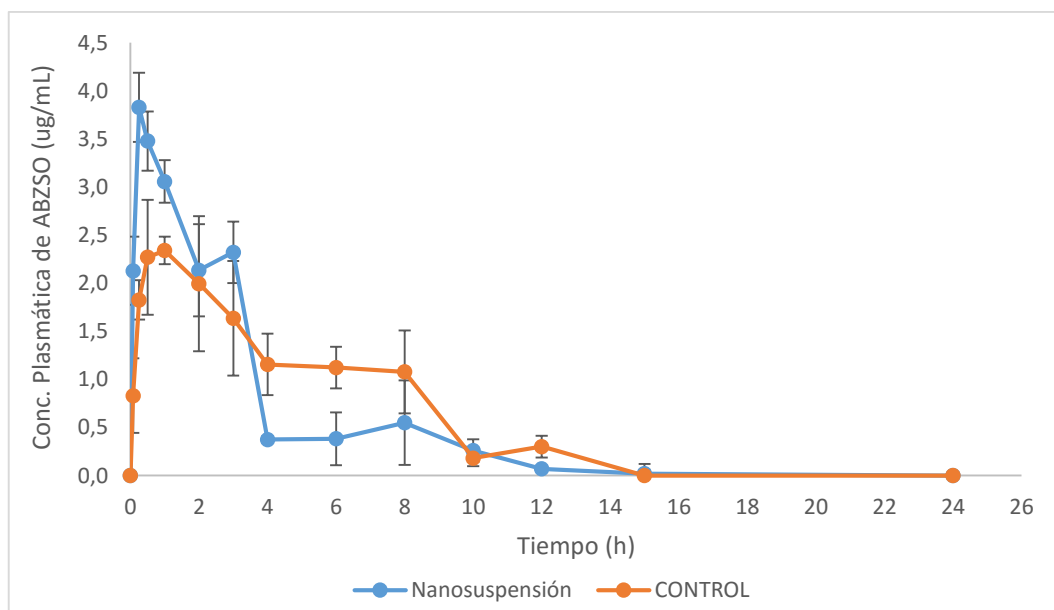
Si bien el método cromatográfico utilizado en esta tesis permite cuantificar ambos metabolitos de ABZ (ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>) se muestran los resultados sólo del metabolito activo para facilitar la interpretación de los resultados.



**Figura 2.** Curvas de concentración plasmática para ABZSO obtenidas con muestras tomadas de 4 ratones por cada punto.

En la figura 2 puede observarse lo ocurrido en cada punto del análisis farmacocinético. La nanosuspensión de ABZ y P188 presentó valores de  $C_{m\acute{a}x}$  mayores en todos los casos, la  $C_{m\acute{a}x}$  para el control no superó los 3  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, los valores de  $T_{m\acute{a}x}$  observados (15 minutos) también se ven mejorados respecto a la muestra control.

En la figura 3 se observan las curvas plasmáticas promedio para ambos grupos de estudio acompañados de sus desviaciones estándar. En figura puede verse más claramente la diferencia en  $C_{m\acute{a}x}$  y  $T_{m\acute{a}x}$  descrita en el punto anterior.



**Figura 3.** Curvas de concentración plasmática para ABZSO obtenidas promediando los valores obtenidos de 4 individuos por punto.

En la tabla 3 se observan los parámetros farmacocinéticos obtenidos. La mejora en los valores de  $T_{m\acute{a}x}$  (disminuyó 5 veces respecto al control) y  $C_{m\acute{a}x}$  (aumento ~70%) observada para la nanosuspensión, se confirmó mediante análisis estadístico ya que el mismo arrojó diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,05$  ANOVA). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de ABC.

**Tabla 3.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos para una nanosuspensión de ABZ y un control (suspensión control de ABZ). \*  $p < 0,05$  ANOVA.

	$T_{m\acute{a}x}$ (hs)	$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$ABC_{0-24\text{hs}}$ ( $\mu\text{gh}/\text{mL}$ )
<b>Nanosuspensión</b>	0,25	$3,97 \pm 0,14^*$	$12,38 \pm 1,14$
<b>Suspensión control</b>	1,25	$2,34 \pm 0,75$	$14,35 \pm 0,63$

Reportes previos de farmacocinética de ABZ en ratones pueden observarse en la tabla 4. Si bien las dosis estudiadas fueron dispares, se calculó un índice ( $ABC/\text{dosis}$ ) para poder comparar el comportamiento de las diferentes formulaciones. La curva plasmática de NCABZ presentó un pico de concentración ( $T_{m\acute{a}x}$ ) a los 15 minutos, este dato concuerda con la alta velocidad de disolución las formulaciones de ABZ caracterizadas en el capítulo I de la presente Tesis Doctoral. Comparativamente, nuestra fórmula presentó un  $T_{m\acute{a}x}$  destacablemente corto, superando incluso el desempeño de las

formulaciones en solución estudiadas por García y cols. 2003 y Daniel-Mwambete y cols. 2004 que presentaron  $T_{m\acute{a}x}$  de 1,25 y 1,3 hs respectivamente. Estas soluciones contenían cosolventes y puede inferirse que el F precipitó al mezclarse con el contenido del estómago, disminuyendo entonces la velocidad de absorción del mismo.

La  $C_{m\acute{a}x}$  y el ABC son parámetros estrechamente relacionados a las características físico-químicas y de permeabilidad del TGI. Se ha reportado que, en ratones, la absorción de F de clase II es mayor que en otras especies. Delatour y cols. 1991, estudiaron el comportamiento farmacocinético de ABZ en ratón, perro y humano, y observaron una gran variación. Tanaka y cols. 2013, describieron que el contenido de ácidos biliares y fosfolípidos, los cuales facilitan la formación de micelas que afectan la solubilidad, la velocidad de disolución y por lo tanto la absorción de F, se encuentran incrementados en ratones. En este contexto, y si bien el ABC observada para NCABZ es una de las menores, cuando se calculó el factor  $(ABC/dosis)$ , el valor obtenido estuvo en concordancia con los demás reportes cuyo promedio fue de  $0,57 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}/\text{mL}\cdot\text{mg}$ .

Cuando se analizan de manera comparativa NCABZ y el control utilizado en este ensayo, se observa que hay diferencias significativas tanto en  $C_{m\acute{a}x}$  como en  $T_{m\acute{a}x}$ , pero no en los valores de ABC. Ambas formulaciones poseían idéntica composición, variando únicamente su tamaño de partícula que fue de  $\sim 450$  nm para NCABZ y entre 50 y 100 micrómetros para el control (datos no disponibles). Takano y cols. establecieron un método para estimar el comportamiento de absorción oral de F poco solubles, dilucidando los pasos que limitan dicho proceso (Takano y cols. 2006, Takano y cols. 2008 y Takano y cols. 2010). Ellos sugirieron que si la concentración de fármaco en estómago es baja (condiciones *sink*), la condición limitante para la absorción de F es la velocidad de disolución, y por lo tanto la misma, puede aumentarse mediante una reducción en el tamaño de partícula. Contrariamente, a concentraciones más elevadas una reducción en el tamaño de partícula no influye en la absorción del F, incluso aumentando la dosis. Esta descripción podría ajustarse a lo observado en nuestro ensayo, donde no hubo diferencias significativas en los valores de ABC entre control y NC. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta primera etapa exploratoria con nanosuspensiones en ratones fueron prometedores de cara al desarrollo de un sólido redispersable que permitiera la posibilidad de realizar ensayos en una especie mayor.

**Tabla 4.** Reporte de estudios farmacocinéticos en ratones luego de una dosificación simple de ABZ.

<b>Autor</b>	<b>Formulación</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>T<sub>máx</sub> (hs)</b>	<b>C<sub>máx</sub> (µg/mL)</b>	<b>ABC (µgh/mL)</b>	<b>ABC/ Dosis</b>
<b>Mingjie y cols. 2002</b>	Emulsión con aceite de soja	300	2,6	9	79,6	0,26
<b>Castro y cols., 2012</b>	Dispersiones sólidas	25	0,75	8	19	0,76
<b>Castillo y cols. 1999</b>	Complejos con ciclodextrinas	50	0,33	7,6	26,17	0,52
<b>García y cols. 2003</b>	Solución	50	1,25	4,8	30,9	0,62
	Solución	100	1,75	7,9	57,2	0,57
<b>Daniel- Mwambete y cols. 2004</b>	Solución	100	1,3	12,6	65,7	0,66
<b>NCABZ</b>	<b>Nanocristales</b>	<b>25</b>	<b>0,25</b>	<b>3,97</b>	<b>12,38</b>	<b>0,50</b>

### 3. Estudio farmacocinético en caninos

#### 3.1. Diseño experimental

##### 3.1.1. Animales

Para este ensayo se utilizaron 6 perros mestizos (4 machos, 2 hembras) con una edad comprendida entre 5 y 7 años y un peso de  $16 \pm 3$  kg, desparasitados pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba. Dichos animales se encontraban alojados en caniles individuales, bajo techo y con piso de cemento. Los mismos dispusieron de agua *ad libitum* y recibieron dos raciones diarias de alimento balanceado.

##### 3.1.2. Organización de los grupos de animales y administración del fármaco

Los animales utilizados en el ensayo fueron divididos aleatoriamente en dos grupos a los cuales se le administró por vía oral una dosis equivalente a 25 mg/kg de peso de la formulación correspondiente siguiendo un diseño de bloque completo de acuerdo a la tabla 5.

**Tabla 5.** Esquema de dosificación para el estudio farmacocinético en caninos.

Tratamiento	MF	Nanocristales
Fase 1	Perros #1 # 2 # 3	Perros #4 #5 #6
Fase 2	Perros #4 #5 #6	Perros #1 # 2 # 3

Cada tratamiento experimental (NC y MF) fue administrado en dos fases. En la **Fase I** los animales asignados al Grupo I (perros #1 #2 #3) recibieron la formulación de ABZ control (MF ABZ:P188 1:1), los animales del Grupo II (Animales #4 #5 #6) recibieron la formulación experimental (NC de ABZ: P 188 1:1). En todos los casos, tanto la MF como los NCABZ fueron colocados en cápsulas de gelatina rígida transparentes de tamaño 00.

Luego de un periodo de espera equivalente a 15 días, el ensayo se repitió como **Fase II** reagrupando los animales de manera tal que todos los perros reciban un tratamiento diferente al de la fase anterior.

##### 3.1.3. Manipulación de las muestras de plasma

En ambas fases se extrajeron muestras sanguíneas de la vena safena de los animales antes (hora 0), y después de las administraciones de las formulaciones (0,25; 0,5; 0,75; 1, 1,5; 2, 3, 4, 6, 8, 16 y 24 h), mediante la utilización de un catéter 18G. Las muestras fueron transferidas a tubos heparinizados inmediatamente luego de su extracción. Posteriormente se obtuvieron los respectivos plasmas (centrifugación a 2000 rpm durante 15min a 4°C), los cuales fueron almacenados a -18°C para su posterior análisis por HPLC.

### **3.2. Análisis de ABZ y su metabolito Sulfóxido**

#### **3.2.1. Método de extracción de los metabolitos del plasma**

El metabolito ABZSO así como oxibendazol utilizado como estándar interno, fueron extraídos de los plasmas (Sánchez Bruni y cols, 2002) (Lanusse y cols, 1991), utilizando columnas C18 (carbono 18), (Strata Phenomenex) descartables siguiendo el método de extracción que se detalla a continuación:

**a)** Las columnas fueron previamente acondicionadas agregando 0,5 mL de metanol HPLC y 0,5 mL de agua MilliQ.

**b)** Luego, una muestra de plasma de 100 µl fue fortificada con 10 µl de estándar interno OBZ (Oxibendazol, 5 µg /mL) fue forzada a pasar mediante la aplicación de alta presión.

**c)** El cartucho se lavó con 2 mL de agua MilliQ

**d)** La muestra fue recolectada con 2 mL de metanol.

**e)** Por último, se evaporó el solvente bajo atmósfera de Nitrógeno (Thermo electron Corporation-Savant SPD 2010- SpeedVac Concentrator) y los extractos secos fueron reconstituidos con 150 µl de fase móvil (30/70 ACN/ agua) para su posterior análisis por HPLC.

#### **3.2.2. Análisis y cuantificación de ABZ y sus metabolitos por HPLC**

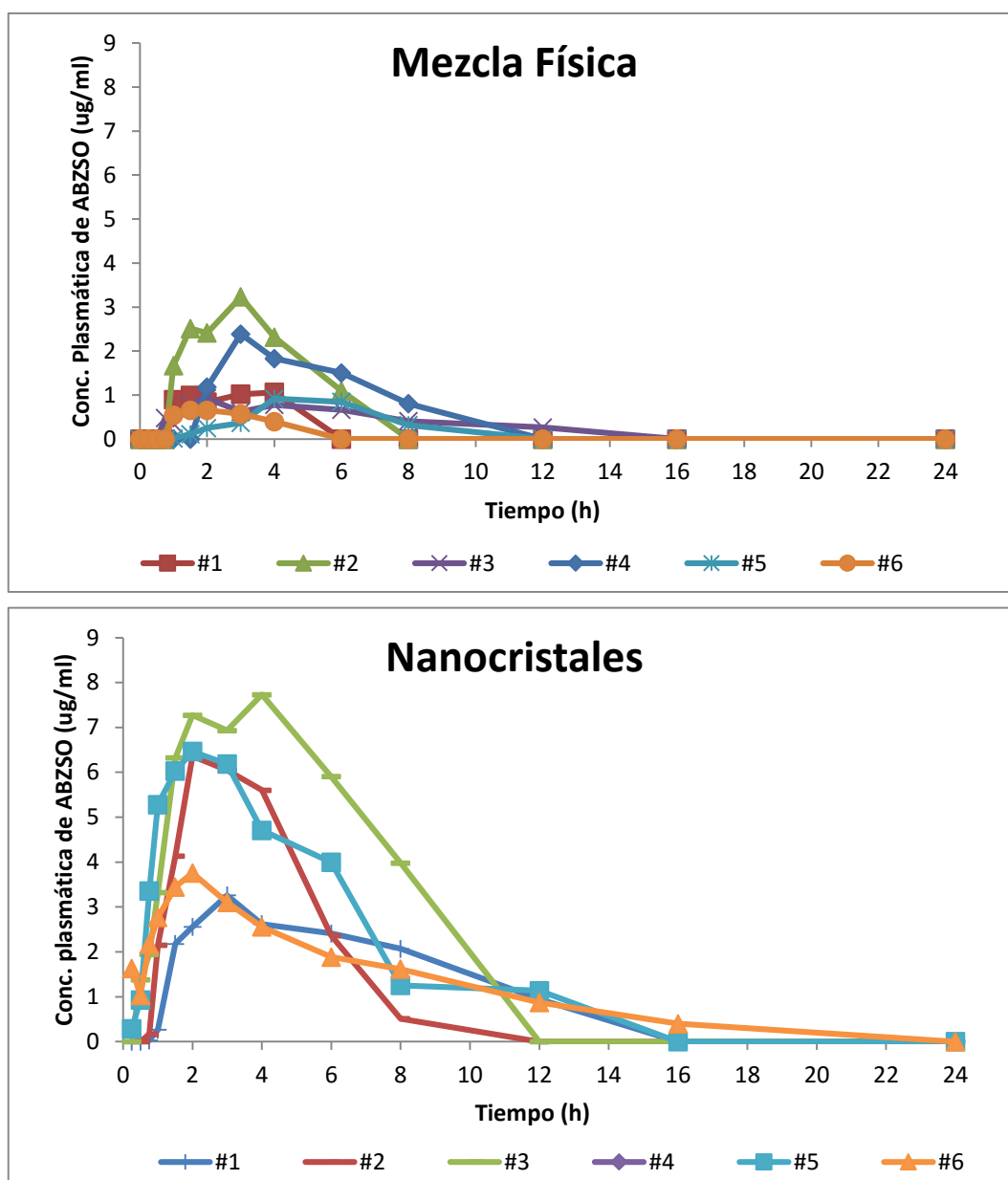
El análisis y cuantificación de ABZ y sus metabolitos se realizó siguiendo los lineamientos antes descriptos en el estudio farmacocinético en ratones, ver punto 2.3.2.

### **3.3. Procesamiento de los datos y construcción de las curvas plasmáticas**

Las curvas de concentración vs tiempo para los metabolitos ABZSO y ABZSO<sub>2</sub> en el plasma de cada animal, fueron calculadas utilizando combinando los dos programas de cálculos nombrados anteriormente (Microsoft Excel v16.0 y OriginPro 9.1 64-bit).

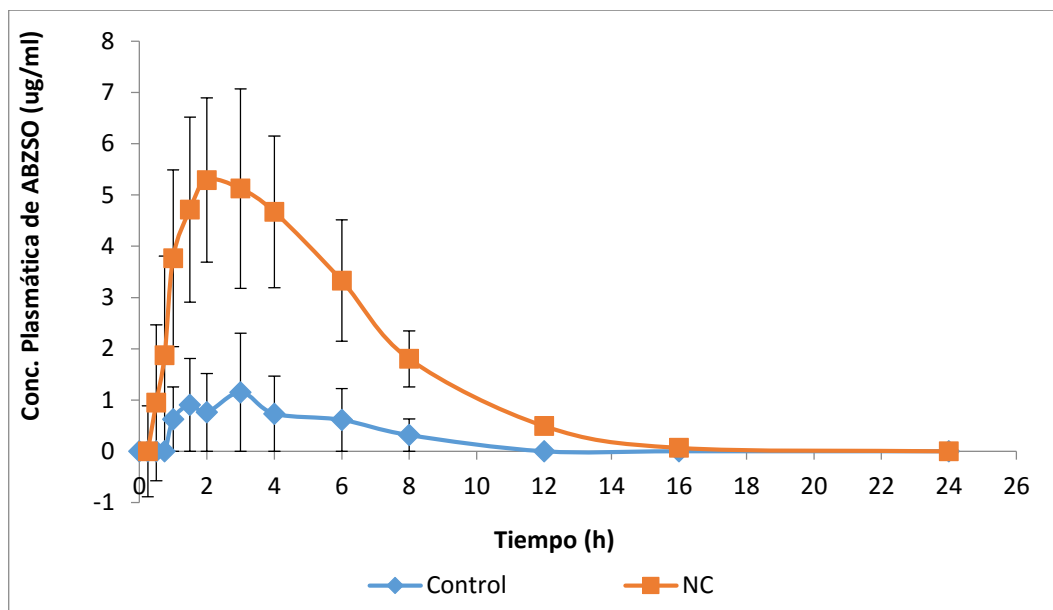
### 3.4. Resultados y discusión

De manera análoga a lo realizado en la sección de la farmacocinética en ratones se muestran los resultados del metabolito activo ABZSO.



**Figura 4.** Perfiles plasmáticos individuales de ABZSO para grupo control (MF) y NCABZ.

La figura 4 muestra los perfiles plasmáticos correspondientes a los 6 individuos tratados con MF y NCABZ. A pesar de observarse una alta varianza, la tendencia indica  $T_{m\acute{a}x}$  más cortos,  $C_{m\acute{a}x}$  mayores y valores de ABC más elevados para el grupo tratado con NC. En la figura 5, donde se muestran los promedios observados en la figura 4. Esta tendencia se confirma con un desempeño claramente mejorado en favor de ABZ formulado como NC.



**Figura 5.** Perfiles de cinética plasmática promedio de ABZSO después de administrar una dosis simple (25 mg/kg) de MF ABZ:P188 1:1) y NC de ABZ:P188 (1:1).

ABZ formulado como NC presentó un aumento significativo en el área bajo la curva y  $C_{m\acute{a}x}$ , en ambos casos los valores fueron 4 veces mayores respecto al grupo control, mientras que el  $T_{m\acute{a}x}$  disminuyó de 3 hs para el control a 1,5 hs para NCABZ.

**Tabla 6.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos para ABZSO post administración de NC de ABZ:P188 y una MF con la misma composición.

	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABC $\mu\text{gh/mL}$
<b>Nanocristales</b>	1,5	5,63 $\pm$ 1,74*	24,85 $\pm$ 7,40*
<b>Control (MF)</b>	3	1,53 $\pm$ 1,04	6,62 $\pm$ 4,30

La administración de NCABZ en perros produjo un perfil plasmático mejorado respecto al control utilizado (MF). Lo observado en este estudio se correlacionó con el incremento en la mucoadhesividad, velocidad de disolución y concentración de saturación descrito en la bibliografía para los F poco solubles formulados como NC (Gao y cols. 2008, Mauludin y cols. 2009, Zhai y cols. 2014).

En la tabla 7, se muestran de manera comparativa, los resultados obtenidos en este ensayo con reportes previos de estudios similares. Como puede verse, existe una gran variación en los parámetros farmacocinéticos, lo que puede asociarse a la diferencia entre formulaciones estudiadas. Aunque no se informa el contenido de la dieta de los animales utilizados, este factor puede generar una gran variación en farmacocinética de ABZ (Lange y cols. 1988). Sin embargo, NCABZ presentaron valores de  $T_{m\acute{a}x}$ ,

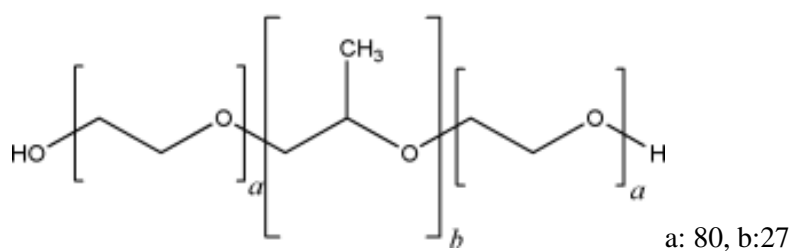


C<sub>máx</sub> y ABC notablemente mejorados en comparación. Es importante destacar que el perro es receptor del tratamiento con ABZ en medicina veterinaria por lo cual el resultado es doblemente auspicioso.

**Tabla 7.** Reportes de ensayos farmacocinéticos de ABZ en perros a dosis simples administradas oralmente.

Autor	Formulación	Dosis (mg/kg)	T <sub>máx</sub> (hs)	C <sub>máx</sub> (µg/mL)	ABC (µg h/mL)	ABC/Dosis
Gokbulut y cols. 2007	Comprimido disperso en agua	50	4,4	1,81	13,74	0,28
Khalil y cols. 2016	No informado	10	6,4	1,81	19,7	1,97
Sánchez y cols. 2000	Cápsulas de gelatina rígida	25	6	0,86	7,64	1,52
<b>NCABZ</b>	<b>Nanocristales</b>	<b>25</b>	<b>1,5</b>	<b>5,63</b>	<b>24,85</b>	<b>0,99</b>

Poloxamer (figura 6) es definido como un surfactante no iónico formado por copolímeros de polioxietileno (segmento hidrofílico) y polioxipropileno (segmento hidrofóbico) ampliamente utilizado como agente solubilizante y humectante (Rowe R, 2006). Además, en determinadas condiciones de concentración (>15%) y temperatura, éste polímero puede formar un gel, lo que ha permitido su utilización en el diseño de Sistemas de Liberación Modificada, particularmente en el campo de los geles termosensibles.



**Figura 6.** Estructura química de Poloxamer 188.

Previamente se reportó que ABZ formulado en dispersiones sólidas con P188 en proporción 1:1 y vehiculizadas en cápsulas rígidas no produjeron un aumento de la BD en un modelo canino (Dib y cols. 2011). Esto se atribuyó a la formación de un gel de P188 debido a la densificación del material dentro de la FF, lo que retardó la liberación del F en estómago. En el caso de NCABZ, este potencial efecto se descartó durante el proceso de caracterización (capítulo I), debido a la naturaleza del material que permitió una rápida redispersión en contacto con el medio de disolución.

#### **4. Conclusiones**

Los ensayos farmacocinéticos arrojaron resultados favorables en línea con la hipótesis de este trabajo: una disminución en el tamaño de partícula de ABZ podría generar un aumento en la velocidad de disolución y concentración de saturación, generando una mejora en el comportamiento farmacocinético del F.

Si bien la cinética de ABZSO en el modelo murino no arrojó resultados concluyentes respecto al parámetro ABC, esto se revirtió en el ensayo en caninos, observándose una gran diferencia entre ambos grupos ensayados. Los valores de  $T_{m\acute{a}x}$  y  $C_{m\acute{a}x}$  también fueron claramente superadores para la formulación de NCABZ tanto en ratones como en perros.

Cuando ambos resultados de farmacocinética (murino y canino) se analizaron de manera comparativa con estudios previos, NCABZ resultó ser una alternativa viable para la dosificación de ABZ.

En base a lo antes expuesto, la lógica experimental nos llevó a evaluar la eficacia de los sistemas obtenidos en modelos experimentales de parasitosis.

## 5. Referencias

- Castillo, J.A. y cols., 1999. Preparation and Characterization of Albendazole -Cyclodextrin Complexes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25(12), pp.1241–1248.
- Castro, S.G. y cols., 2013. Comparative plasma exposure of albendazole after administration of rapidly disintegrating tablets in dogs. *BioMed Res. Int.*, 2013(P 188).
- Daniel-Mwambete, K. y cols., 2004. The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *Int. J. Pharm.*, 272(1–2), pp.29–36.
- Dayan, A.D., 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.*, 86(2–3), pp.141–159.
- Delatour P, Benoit E, Besse S, Boukraa A. Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in man, dogs and rats. *Xenobiotica* [Internet]. 1991;21(2):217–21.
- Dib A., Palma S, Suárez G, Farías C, Cabrera P, Castro S, et al. Albendazole sulphoxide kinetic disposition after treatment with different formulations in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2011;34(2):136–41.
- Galbis Perez JA. Panorama actual de la química farmacéutica. Secretaria de publicaciones de Sevilla. Capítulo 4 Absorción, distribución y excreción de fármacos. 2000; 65:86. Madrid.1; 14: 101-108.
- Gao, L., Zhang, A.D. & Chen, A.M., 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J. Nanop. Res.*, 10 (5) pp.845–862.
- García, J.J., Bolás, F. & Torrado, J.J., 2003. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. *Int. J. Pharm.*, 250(2), pp.351–358.
- Gokbulut, C. y cols., 2007. Comparative plasma disposition of fenbendazole, oxfendazole and albendazole in dogs. *Vet. Parasitol.*, 148(3–4), pp.279–287.
- Khalil, Z. y cols., 2016. Comparative plasma disposition kinetics of albendazole and its new benzimidazol prodrug in dog. *Annales Pharm. Franc.*, 74(1), pp.21–26.
- Lanusse C., Trudeau C., Ranjan S., Prichard R. Pharmacokinetic profile of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. *J. Vet Pharmacol. Therap.*, 14(1):101-8
- Mauludin, R., Müller, R.H. & Keck, C.M., 2009. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int. J. Pharm.*, 370(1–2), pp.202–209.
- McKellar, Q. a, Galbraith, E. a & Baxter, P., 1993. Oral absorption and bioavailability of fenbendazole in the dog and the effect of concurrent ingestion of food. *J. Vet Pharmacol. Therap.* 16(2), pp.189–

- McKellar, Q. a & Scott, E.W., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents, a review. *J. Vet Pharmacol. Therap.*, 13(3), pp.223–247.
- Mingjie, W. y cols., 2002. Albendazole–soybean oil emulsion for the treatment of human cystic echinococcosis: Evaluation of bioavailability and bioequivalence. *Acta Trop.*, 83(2), pp.177–181.
- Sánchez Bruni, S. y cols., 2000. Comparative Availability of Two Oral Dosage Forms of Albendazole in Dogs. *Vet. J.*, 160(2), pp.153–156.
- Takano, R. y cols., 2006. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: Computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. *Pharm. Res.*, 23(6), pp.1144–1156.
- Takano, R. y cols., 2008. Rate-limiting steps of oral absorption for poorly water-soluble drugs in dogs; prediction from a miniscale dissolution test and a physiologically-based computer simulation. *Pharm. Res.*, 25(10), pp.2334–2344.
- Takano, R. y cols., 2010. Quantitative analysis of the effect of supersaturation on in vivo drug absorption. *Mol. Pharm.*, 7(5), pp.1431–1440.
- Tanaka, Y., Waki, R. & Nagata, S., 2013. Species Differences in the Dissolution and Absorption of Griseofulvin and Albendazole, Biopharmaceutics Classification System Class II Drugs, in the Gastrointestinal Tract. *Drug Met. Pharmacokin.*, 28(6), pp.485–90.
- Zhai, X. y cols., 2014. Nanocrystals of medium soluble actives - Novel concept for improved dermal delivery and production strategy. *Int. J. Pharm.*, 470(1–2), pp.141–150.

## **Capítulo III. Estudio de eficacia en un modelo murino de hidatidosis**

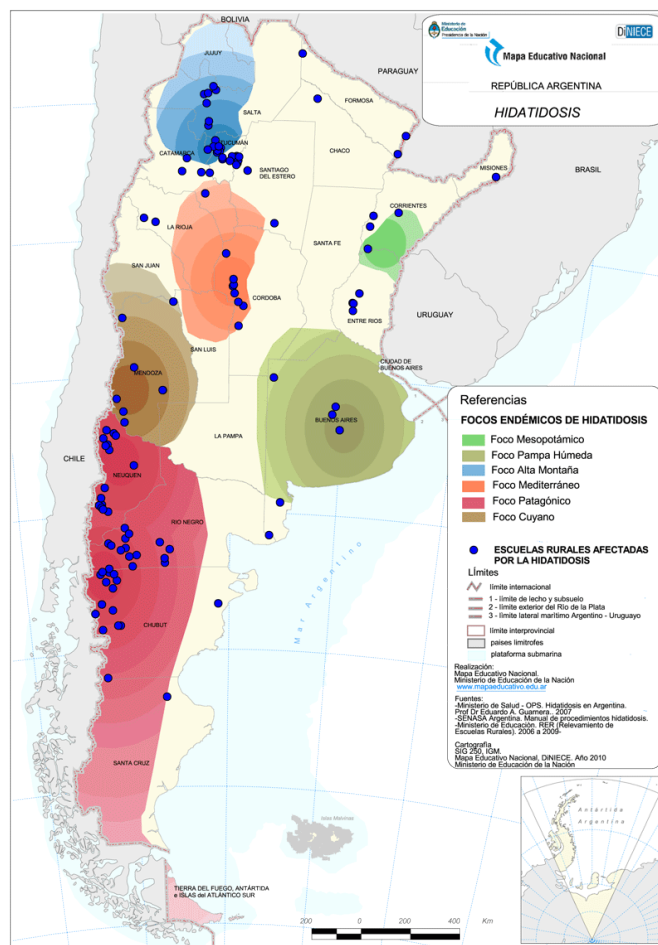
## **1. Introducción**

Las zoonosis comprenden aquellas enfermedades e infecciones que se transmiten, en forma natural, entre los animales vertebrados y el hombre (Chomel 2008). La hidatidosis, también conocida como enfermedad hidatídica o echinococcosis quística (EQ), es una zoonosis causada por la forma larval de los parásitos del género *Echinococcus Rudolphi*, 1801, y se caracteriza por el crecimiento de quistes hidatídicos en el hospedador intermediario, como herbívoros domésticos y el hombre. Esta infección parasitaria es una enfermedad crónica, compleja y es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales enfermedades desatendidas a nivel mundial (Brunetti & Junghanss 2009). Además, la hidatidosis es una de las parasitosis con mayor efecto sobre la economía debido a pérdidas significativas en la producción de carne, leche y en el valor de la lana (Eckert y cols. 2004).

### **1.1. Distribución de la EQ en Argentina**

En Argentina, la EQ es considerada de carácter endémico nacional y su prevalencia en humanos es de 1.4 por cada 100000 habitantes, si bien se registran valores más altos en las zonas endémicas (Moro & Schantz 2006). Los principales focos endémicos coinciden con los de mayor producción pecuaria: Patagonia, Pampa Húmeda, Mesopotamia, Cuyo, zona central y altas montañas del Noroeste (Remis y cols. 2009) (Figura 1). La región patagónica es el área endémica más importante del país incluyendo a las provincias de Neuquén, Chubut y Río Negro. En las regiones endémicas del país la EQ afecta al ganado vacuno (7%), ovino (12.5%), porcino (9.8%) y caprino (6%) (WHO/OIE 2002).

En el sudeste de la provincia de Buenos Aires se encuentra una región agrícola con abundante cría extensiva de ganado bovino y de ganado ovino. Los factores climáticos y socio-culturales tanto en las zonas rurales como urbanas contribuyen al mantenimiento del ciclo del parásito. En el período 2003-2011 se registró un total de 330 casos de hidatidosis humana según datos del SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) y en el período 2000-2010 se confirmaron 835 casos (Castiglione y cols., 2011).



**Figura 1.** Focos endémicos de hidatidosis en Argentina. Tomado de [www.mapaeducativo.edu.ar/Atlas/Hidatidosis](http://www.mapaeducativo.edu.ar/Atlas/Hidatidosis).

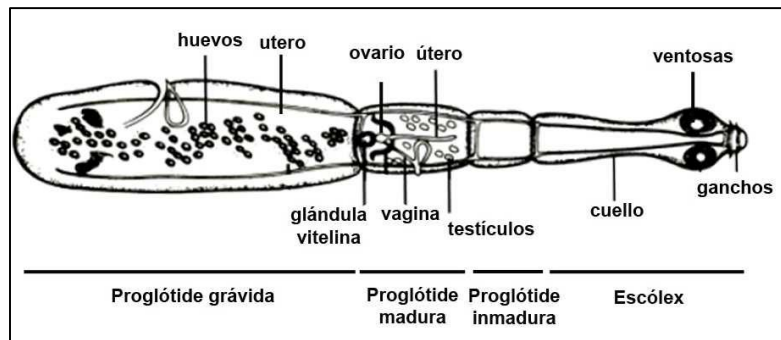
## 1.2. Ciclo del parásito

### 1.2.1. El parásito adulto

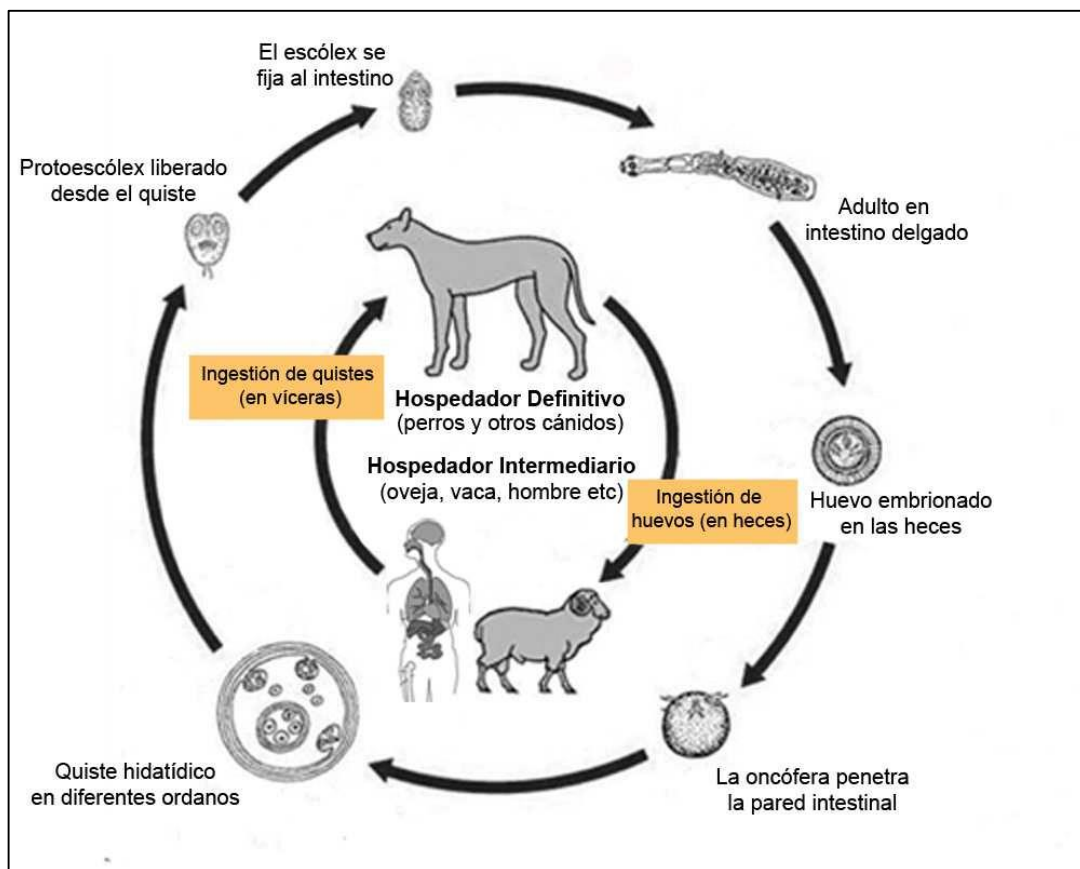
*Echinococcus granulosus* es un pequeño gusano que mide aproximadamente entre 3 y 5 milímetros y está cubierto por una epidermis sincicial o tegumento especialmente adaptado para la absorción de nutrientes, dado que carece de aparato digestivo. En su lado externo, el tegumento posee prolongaciones tegumentarias denominadas microtriquias que, entre otras funciones, ayudan a la fijación del parásito.

El cestode adulto se localiza en el intestino delgado de carnívoros domésticos y silvestres anclado en las criptas de Lieberkühn. Tiene un pequeño escólex piriforme provisto de cuatro ventosas y 30 a 40 ganchos dispuestos en doble corona (una exterior de ganchos pequeños y una interior de ganchos grandes) que le sirven para su fijación. El cuello o región proliferativa es corto y da lugar al cuerpo o estróbilo el cual está segmentado en 3 o 4 proglótidos (Figura 2). Cada proglótido es una unidad reproductiva hermafrodita que origina huevos fértiles (D'Alessandro, 2002). Los huevos son eliminados con las heces del hospedador definitivo y contaminan el pelaje, el suelo, las verduras y el agua de bebida

(Cabrera y cols. 2002). El hospedador intermediario adquiere la enfermedad por la ingestión de los huevos que contienen el embrión hexacanto u oncósfera infectante (Figura 3).



**Figura 2.** Representación esquemática del parásito adulto de *E. granulosus*. Adaptado de (Reuter & Kreshchenko 2004).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*. Adaptado de CDC (Center for disease control and prevention) [www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov).

Por la acción de las enzimas gástricas o del intestino delgado, la oncósfera se libera del embrióforo queratinizado. La bilis ayuda a activar la oncósfera que penetra en la pared del intestino delgado. La penetración es ayudada por los movimientos de los ganchos y posiblemente por las



secreciones de la oncósfera. Al llegar a una vénula o a un tubo quilífero, la oncósfera es transportada pasivamente hasta el hígado donde en general queda retenida (Eckert y cols. 1986). En caso de ser superado el filtro hepático, el embrión continúa su ruta de infección por el sistema circulatorio hasta el pulmón. Eventualmente puede continuar su migración alcanzando varias localizaciones como riñón, cerebro, tejido óseo, muscular, etc. Una vez que la oncósfera ha alcanzado su localización final, se desarrolla el metacestode o quiste hidatídico (Salvitti y cols., 2002).

### 1.2.2. *Metacestode*

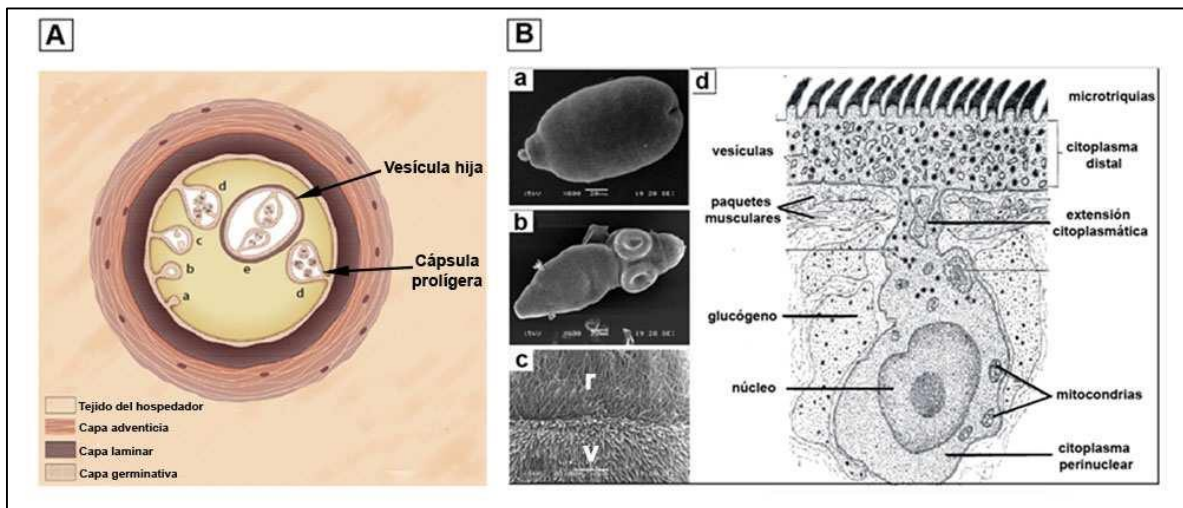
El metacestode de *E. granulosus* completamente desarrollado es unilocular, de forma típicamente esférica, si bien puede tener otras formas por adaptación a las condiciones particulares del órgano en que se encuentra y lleno de un líquido transparente denominado líquido hidatídico. Típicamente este parásito produce quistes en los cuales el crecimiento es concéntrico y expansivo por ensanchamiento, si bien puede ocurrir que la pared del quiste se embolse formando cámaras secundarias que se comunican con la cámara principal (Thompson & Geary, 1995).

El quiste se encuentra rodeado por tres capas (Figura 4A). La capa externa, denominada adventicia, es formada por el hospedador como producto de la reacción inflamatoria celular iniciada en los primeros estadios del desarrollo post oncosférico (Eckert y cols., 2004) y está compuesta por tejido conectivo fibroso denso de grosor variable. La segunda capa, denominada capa laminar, es una banda hialina elástica, acelular y laminada constituida mayormente por glicoproteínas del tipo de las mucinas (Díaz y cols., 2009). La capa laminar es de origen parasitario, siendo secretada por la capa germinativa.

Unida estrechamente a la capa laminar se encuentra la capa germinativa o prolígera, la cual es estructuralmente similar al tegumento del cestode adulto. Está constituida por dos regiones, una basal y una distal. La porción basal es un sincicio citoplasmático, anucleado, formado a partir de procesos citoplasmáticos externos de las células tegumentarias (localizadas en la región distal); esta región está unida a la capa laminar por proyecciones digitiformes (microtriquias) que penetran en la misma. La región distal de la capa germinativa contiene diferentes tipos celulares entre los que se incluyen células tegumentarias, musculares, excretoras, almacenadoras de glucógeno y células indiferenciadas con grandes núcleos y nucléolos (Thompson & Geary 1995). Las células indiferenciadas son proliferativas y responsables de la formación de las cápsulas prolígeras. Éstas se originan como pequeñas masas que proliferan hacia la cavidad quística, se agrandan, manteniéndose unidas a la pared del quiste mediante un pedicelo y se vacuolizan, formándose asexualmente en su interior un número variable de protoescólices por gemación (Galindo y cols., 2002, 2003) (Figura 4A).

El líquido hidatídico es claro y cristalino, contiene secreciones del parásito y del hospedador y todos los elementos de la pared interna del quiste, llamados arenilla hidatídica. Tiene la misma composición que el suero del hospedador (sodio, cloro, potasio, dióxido de carbono, densidad entre 1.008 y 1.015, pH alcalino) y algunas proteínas que le confieren propiedades antigénicas (Menezes da Silva, 2011).

Los protoescólices completamente desarrollados son estructuras ovoideas de unos 200  $\mu\text{m}$  en su diámetro mayor (Figura 4B a y b). El tegumento de los protoescólices es similar al de los adultos, presentando también microtriquias diferenciadas en la parte anterior, pero ausentes en la región posterior del animal (Figura 4B c y d). En la unión del tercio posterior con los dos tercios anteriores, presentan una hilera de ganchos refringentes más pequeños que los del gusano adulto. Dichos ganchos, junto con las ventosas, están normalmente invaginados en el cuerpo del protoescólex.



**Figura 4.** Estadio larval de *E. granulosus*. A. Diagrama ilustrativo de las diferentes estructuras del metacestode. a-d, diferentes estados de desarrollo de los protoescólices y la cápsula prolígera; e, vesícula hija. Adaptado de Thompson & Jenkins (2014). B. Protoescólices. (a) Protoescólex invaginado (800x). (b) Protoescólex evaginado (600x). (c) Microtriquias de la zona del róstelo (r) y de las ventosas (v) (5000x). (d) Esquema del tegumento de *E. granulosus*. Tomado de Morseth (1967).

Los protoescólices tienen la potencialidad de convertirse en cestodes adultos cuando toman contacto con el intestino delgado de los hospedadores definitivos y en los hospedadores intermediarios pueden diferenciarse en quistes secundarios cuando son liberados luego de una ruptura quística.

### 1.3. Estrategias de tratamiento

Las estrategias de tratamiento de la hidatidosis dependen en gran medida de diferentes factores tales como el tamaño y la localización del quiste, la viabilidad del mismo, la interacción de éste con los tejidos del hospedador, la presencia de contaminación bacteriana o fúngica y las complicaciones debidas a una ruptura quística y diseminación de protoescólices (Kern, 2003; 2006). En la actualidad existen cuatro alternativas de tratamiento en humanos: cirugía, PAIR (aspiración monitoreada por ecografía), quimioterapia con benzimidazoles (BZ) y la modalidad de observar y esperar (*watch and wait*, en inglés) para quistes inactivos, clínicamente silentes (Stojkovic y cols. 2009).

Si bien la cirugía es en muchos casos exitosa, principalmente en la hidatidosis primaria con quistes poco numerosos o de fácil acceso, está lejos de serlo cuando se trata de hidatidosis secundaria

diseminada o de presentaciones clínicas inoperables. El tratamiento de la hidatidosis basado en la cirugía como único método de cura ha cambiado sustancialmente en los últimos 30 años con la introducción del tratamiento médico con derivados BZD (Salvitti y cols., 2002), tales como ABZ y mebendazol (MBZ); y hasta incluso en algunos casos se utiliza el derivado heterocíclico isoquinolónico praziquantel (Hemphill y cols. 2007).

No obstante, los únicos antihelmínticos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) son MBZ, ABZ y su principal metabolito ABZ sulfóxido (ABZSO), con una efectividad que no supera el 50%. ABZ ha demostrado una mayor efectividad que MBZ dado que presenta una mayor absorción intestinal, logrando, por lo tanto, una mayor concentración plasmática en relación a la dosis administrada. Es por ello que en la actualidad ABZ es el F más utilizado para el tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis humana. Según las recomendaciones de la OMS, ABZ debe ser administrado en dosis de 10 a 15 mg/kg de peso corporal dividido en dos tomas diarias luego de la ingestión de alimentos por un período de entre 3 y 6 meses. No obstante, todavía no se ha definido adecuadamente la duración del tratamiento ni la eficacia del mismo.

Se ha reportado que entre un 20-40% de los pacientes no responden de manera favorable al tratamiento quimioterapéutico tanto con los BZ como con PZ (Hemphill y cols. 2007), produciendo en la mayoría de los casos la estabilización de la enfermedad en vez de su cura (Horton 1989). Más aun, a lo largo del tratamiento, es necesario un monitoreo riguroso de los potenciales efectos adversos a través de exámenes específicos tales como medición de las aminotransferasas y el recuento de células sanguíneas, cada dos semanas (para los primeros 3 meses), luego mensuales (para el primer año) y posteriormente cada 3 meses (Horton 1990, Horton 1989). Por todo lo expuesto anteriormente, se evidencia que, en lo que respecta al tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis en humanos, no existen al momento F que demuestren un 100% de eficacia sobre el estadio larval de este cestode.

Ya sea por la toxicidad de los compuestos empleados o por su falta de eficacia, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para optimizar el tratamiento en humanos. De esta manera se evitarían los riesgos de la cirugía y se abaratarían los costos que implica para el sistema de salud. La formulación de ABZ como NC podría ser una herramienta tecnológica simple y escalable para enfrentar esta problemática a nivel global.

Los estudios descriptos en este capítulo fueron llevados a cabo en estrecha colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Celina Elissondo de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

### ***Objetivo específico***

Realizar un estudio de eficacia quimioproláctica y preclínica de ABZ formulado como NC en un modelo murino de hidatidosis.

## **2. Materiales y metodología**

### **2.1. Materiales**

Para la preparación de los NCABZ se utilizaron los siguientes materiales: ABZ grado USP (Todo Droga, Argentina), Poloxamer 188 (BASF, USA). Todos los demás reactivos fueron calidad pro-análisis.

### **2.2. Preparación de las formulaciones de ABZ**

Los NCABZ fueron preparados de acuerdo a la metodología descrita en el método 3.2.1 y 3.2.10 del capítulo I. Brevemente, se preparó una suspensión conteniendo 5g de ABZ, 5g de P188 y 190g de agua. La misma se procesó por HAP (20 ciclos a 1200 bar) y se secó por aspersión. Los polvos obtenidos presentaron tamaños de redispersión cercanos a los 500 nm e índices de polidispersidad de ~0,270.

Para la preparación de la suspensión control de ABZ (0.5 mg/mL), el ABZ fue suspendido en agua desionizada bajo agitación (12 h). Los NCABZ (0.75 µg/mL) se prepararon en el momento de la administración dispersando los NC de ABZ en agua desionizada (pH=7.0) bajo agitación. Antes de proceder a la administración de los ratones, ABZ suspensión y NCABZ fueron vigorosamente agitados manualmente.

También se utilizó un control compuesto de una MF de ABZ y P188 (1:1) que fue dispersada en agua antes de ser administrada.

### **2.3. Obtención del material parasitario de *E. multilocularis***

El aislamiento 8065 de *E. multilocularis* fue proporcionado gentilmente por Klaus Brehm, Institute for Hygiene and Microbiology, University of Würzburg. Ratones CF-1 infectados con *E. multilocularis* durante 3 meses fueron eutanasiados y se procedió a la extracción de las masas quísticas de la cavidad peritoneal evitando la contaminación con el tejido del ratón, particularmente intestino, estómago, vejiga, esófago, o uretra.

Los quistes se colocaron en placas de Petri con una solución de antibióticos (60 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, and 50 µg/mL gentamicina en PBS 1X). Utilizando bisturí los metacestodes fueron punzados y cortados en fragmentos pequeños. El material fue pasado de manera fraccionada por un colador de metal colocado sobre un vaso de precipitado.

Se utilizó la parte de atrás del embolo de una jeringa plástica para aplastar el material contra la malla del colador. Una vez pasado todo el material, se colocó el contenido del vaso de precipitado en un tubo Falcon de 50 mL. El material aislado consiste en pequeñas vesículas, protoescólices y residuos de vesículas de metacestodes. Luego de sedimentar el material, se descartó el sobrenadante, se agregó solución de antibióticos y se mezcló por inversión. Los lavados se repitieron 3 veces. El material se mantuvo en solución de antibióticos a 4°C durante 24 hs antes de realizar la infección.

## **2.4. Diseño experimental.**

### **2.4.1. Estudio de eficacia quimioproláctica**

CF-1 hembras (n=40) fueron infestados por vía intraperitoneal con 0.7 mL de material homogeneizado de *E. multilocularis*. Un día post infección (p.i.) los animales se dividieron en 4 grupos experimentales (10 animales por grupo) y se comenzó con los tratamientos:

- a) Grupo control, los animales recibieron agua destilada como placebo.
- b) Grupo MF, los animales recibieron MF suspendida en agua destilada.
- c) Grupo ABZ-SUSP; los animales fueron tratados con una suspensión de ABZ.
- d) Grupo NCABZ, los animales fueron tratados con una nanosuspensión de ABZ.

Los tratamientos se realizaron por vía oral mediante una cánula intragástrica, cada 24 horas, durante 30 días. La dosis de ABZ utilizada fue 5 mg/kg. A las 11 semanas p.i., los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical previa anestesia y se procedió a la necropsia inmediatamente.

### **2.4.2. Estudios de eficacia clínica**

Ratones CF-1 hembras (n=40) fueron infestados por vía intraperitoneal con 0.7 mL de material homogeneizado de *E. multilocularis*. A las 7 semanas p.i., los ratones fueron divididos en 4 grupos experimentales (10 animales por grupo) y se comenzó con los tratamientos:

- a) Grupo control, los animales recibieron agua destilada como placebo.
- b) Grupo MF, los animales recibieron MF suspendida en agua destilada.
- c) Grupo ABZ-SUSP, los animales fueron tratados con una suspensión de ABZ.
- d) Grupo NCABZ, los animales fueron tratados con una nanosuspensión de ABZ.

Los tratamientos se realizaron por vía oral mediante una cánula intragástrica, cada 24 horas, durante 30 días. La dosis de ABZ utilizada fue 5 mg/kg. Finalizados los 30 días de tratamiento, los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical previa anestesia y se procedió a la necropsia inmediatamente.

## **2.5. Determinación de la eficacia de los tratamientos**

Al momento de la necropsia en los estudios de quimioproláxis y de eficacia clínica, se abrió la cavidad peritoneal y se procedió a recuperar cuidadosamente los quistes hidatídicos presentes. La eficacia de los tratamientos fue calculada mediante el peso promedio de los quistes, la vitalidad de los protoescólices y el estudio ultraestructural de los quistes y de los protoescólices.

### **2.5.1 Determinación del peso de los quistes y eficacia**

Al momento de la necropsia en los estudios de quimioproláxis y de eficacia clínica, se abrió la cavidad peritoneal y se procedió a recuperar cuidadosamente los quistes hidatídicos presentes. Se registró el peso de los quistes recuperados de cada animal mediante una balanza analítica. La eficacia (%) de cada tratamiento fue calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$Eficacia (\%) = \frac{X_{grupo\ control} - X_{grupo\ tratado}}{X_{grupo\ control}} \times 100 \quad Ecuación\ 1$$

Donde, X es el peso promedio de los quistes registrado de cada grupo experimental.

### **2.5.2. Extracción de protoescolices de los metacestodes y test de vitalidad**

Los metacestodes extraídos de cada individuo (animales de los grupos control y tratados) fueron pasados por un colador de metal y la suspensión obtenida fue lavada varias veces con PBS 1X suplementado con antibióticos. Luego la suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 min aproximadamente para liberar los protoescolices del material de los metacestodes. La suspensión fue pasada de manera fraccionada a través de un primer filtro de polyester (tamaño de poro de 150  $\mu\text{m}$ ) ubicado en la boca de un vaso de precipitado. Posteriormente, el material filtrado fue pasado por un segundo filtro de poliéster (tamaño de poro de 30  $\mu\text{m}$ ) con la ayuda de pipeta Pasteur nueva y PBS 1X. Los protoescolices retenidos sobre la malla fueron recolectados en un tubo Khan.

La vitalidad de los protoescolices fue evaluada mediante observación al microscopio óptico invertido (MOI) (considerando conservación de morfología, integridad de membranas, presencia de abundantes corpúsculos calcáreos y movilidad) y tinción vital con azul de metileno (dilución 1/10000 colorea los parásitos muertos) durante 5 min (Elisondo y cols., 2004).

### **2.5.3. Estudios morfológicos ultraestructurales**

El estudio de eficacia de los tratamientos se complementó con la observación de las posibles alteraciones ultraestructurales en la capa germinativa de los quistes al microscopio electrónico de barrido y transmisión (MEB y MET). Se tomaron muestras de quistes de cada uno de los grupos experimentales. Los quistes fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato de sodio al 0.1% durante 48 hs a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 min con tampón cacodilato.

Para los estudios al MEB, los quistes fueron deshidratados mediante concentraciones crecientes de etanol: 50% (10 min), 70% (10 min), 80% (10 min), 90% (10 min), 95% (10 min), 100% (10 min) 2 veces y luego una incubación con hexamethyl-disilazán (HMSD) (5 min) bajo campana. Finalmente, los especímenes fueron embebidos en HMSD durante 18 hs bajo campana y cubiertos con partículas de oro (100 Å de espesor) para su posterior observación a 15 KV en un microscopio JEOL JSM-6460 LV (Elisondo y cols., 2007).

Para el análisis al MET, las muestras fueron post-fijadas en OsO<sub>4</sub> al 2%. A continuación, se deshidrataron mediante incubaciones secuenciales en concentraciones crecientes de acetona y luego fueron embebidos en resina Spurr. La polimerización de la resina se llevó a cabo a 70°C durante la noche. Se realizaron cortes con un ultramicrotomo LKB con cuchilla de diamante en secciones (700-Å de espesor). Las muestras fueron teñidas con una solución saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinadas con un microscopio JEOL 100 de transmisión de electrones CXII (JEOL, EE.UU.) a 80 kV (Elisondo y cols., 2007).

## 2.6. Análisis estadístico

Los datos fueron reportados como la media aritmética ( $\pm$ DE). Los pesos de los quistes y los datos de vitalidad de los protoescólices obtenidos en los estudios de eficacia clínica y de quimioprofilaxis fueron comparados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn. Un valor de P menor a 0.05 ( $P < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo.

## 3. Resultados

### 3.1. Estudio de eficacia quimioprofiláctica

Todos los ratones incluidos en el estudio de eficacia quimioprofiláctica presentaron quistes en la cavidad peritoneal (Tabla 1). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre el peso medio de los quistes de los grupos control agua destilada ( $13.15 \pm 4.51$  g) y MF ( $15.05 \pm 5.31$  g). El tratamiento con ABZ suspensión no afectó el peso de los quistes recuperados ( $16.04 \pm 3.89$  g). Por el contrario, el peso promedio de los quistes recuperados de ratones tratados con la nanosuspensión de ABZ fue significativamente menor que el observado en los grupos control ( $P < 0.01$ ; NCABZ =  $7.84 \pm 2.15$  g).

**Tabla 1.** Estudio de eficacia quimioprofiláctica. Peso (g, media  $\pm$ DE) de metacestodes recuperados 11 semanas p.i. de ratones de los grupos control (agua destilada y MF), ABZ-SUSP y NCABZ. La administración de las drogas se inició un día post-infección. Los tratamientos se realizaron cada 24 hs durante 30 días a la dosis de 5 mg/kg de ABZ.

Estudio de eficacia quimioprofiláctica		
	Peso (g) de los quistes media $\pm$ DE	Eficacia (%)
Control agua destilada	$13.15 \pm 4.51$	
MF	$15.05 \pm 5.31$	
ABZ-SUSP	$16.04 \pm 3.89$	
NCABZ	$7.84 \pm 2.15^{**}$	50.89

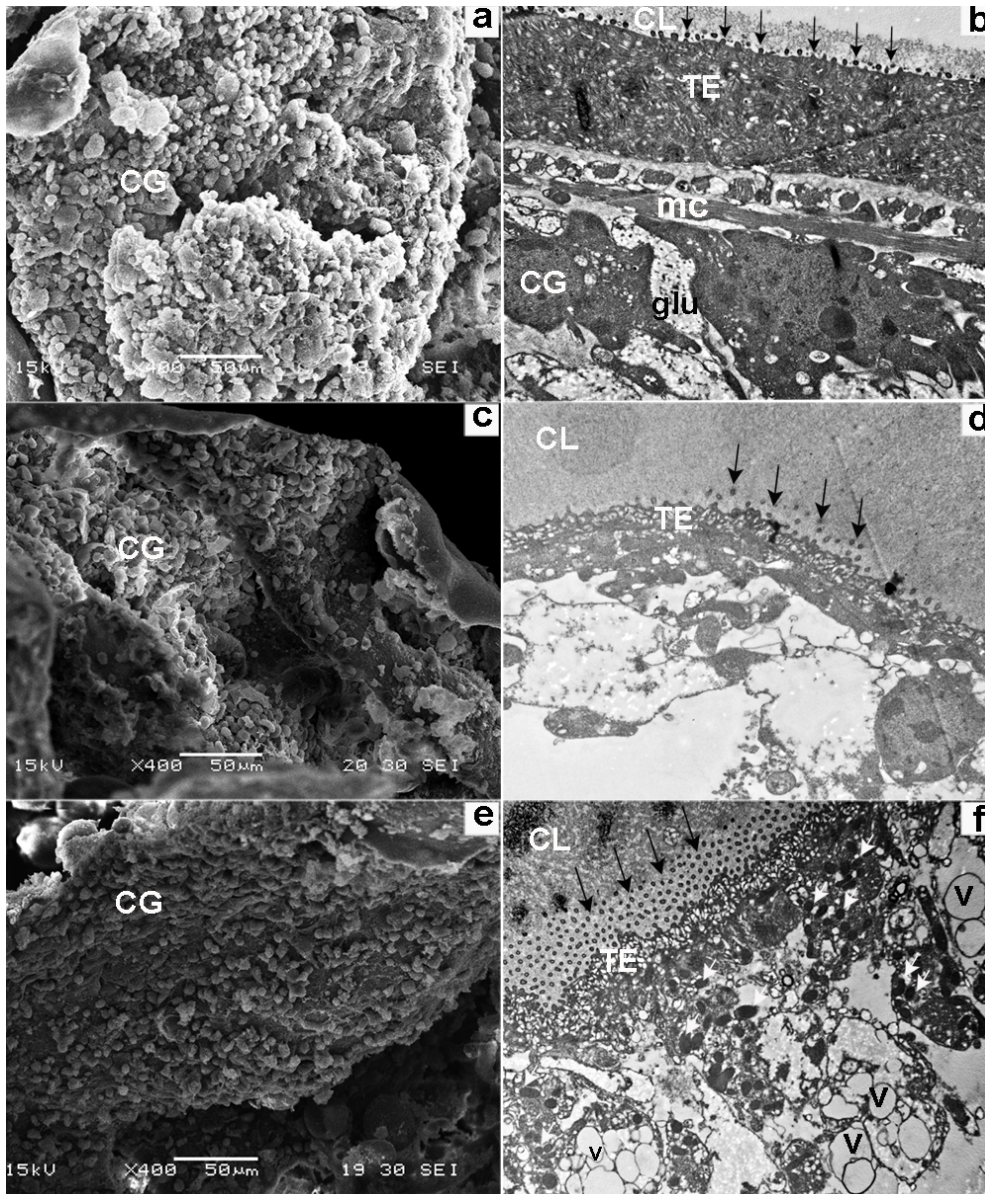
En la figura 5 puede observarse la apariencia del material extraído de los grupos control agua destilada y MF (a y b respectivamente) y NCABZ (c).  $^{**} P < 0.01$ , diferencia significativa entre los grupos NCABZ y control.  $^{**} P < 0.01$ , diferencia significativa entre los grupos NCABZ y ABZ suspensión.



**Figura 5.** Quistes de *E. multilocularis* obtenidos durante la necropsia de los grupos experimentales. (a) grupo control; (b) grupo ABZ-SUSP (5 mg/kg); (c) grupo NCABZ (5 mg/kg).

Todos los quistes extraídos de los grupos control se observaron turgentes sin colapso de la capa germinativa ni cambios ultraestructurales (Figura 6). Los análisis al MET revelaron las características típicas de los metacestodes de *E. multilocularis*, presentando por fuera la capa laminar acelular, más internamente la capa germinativa sin alteraciones, microtriquias claramente delineadas, células musculares y abundantes células almacenadoras de glucógeno (Figura 6b).





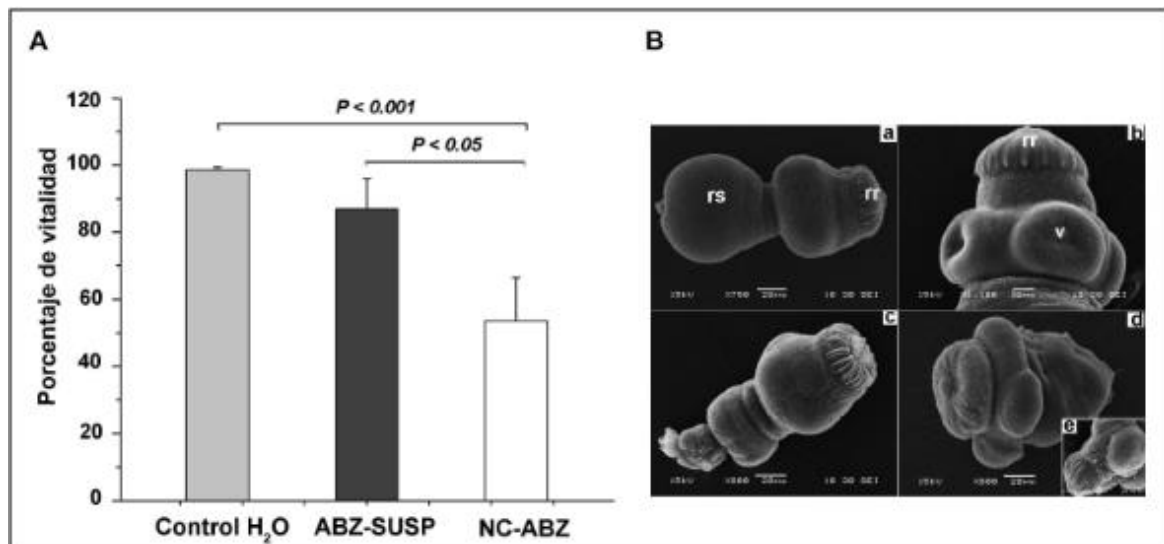
**Figura 6.** Imágenes al MEB y al MET de metacestodos extraídos de ratones infectados con *E. multilocularis* tratados con NCABZ o ABZ suspensión durante el estudio de quimiopprofilaxis. Ambos tratamientos fueron administrados a la dosis de ABZ de 5 mg/kg. (a y b) Muestras de ratones del grupo control. (a) Capa germinativa compuesta por diferentes tipos celulares (MEB 400×); (b) Metacestode presentando por fuera la capa laminar acelular rodeando la capa germinativa sin alteraciones (MET 12000×). (c y d) Metacestodos recuperados del grupo ABZ-SUSP. (c) La capa germinativa está alterada (MEB 400×); (d) El tejido interno se encuentra alterado. Reducción del número de microtriquias (MET 10000×). (e y f) Metacestodos obtenidos de grupo NCABZ. (e) Se observan pocas células en la capa germinativa (MEB 400×). (f) El tejido interno está marcadamente alterado. Notar la presencia de mitocondrias electro-densas (cabeza de flecha blancas) y numerosas vacuolas. Se observa una disminución del almacenamiento de glucógeno (MET 10000×). TE: tegumento; CG: capa germinativa; CL: capa laminar; glu: células almacenadoras de glucógeno; mc: células musculares; v: vacuolas; flechas: microtriquias.

Los estudios al MEB y al MET del tejido de los parásitos recuperados de los ratones tratados mostraron cambios en la capa germinativa (Figuras 6 c-f). Con respecto al estudio ultraestructural al MEB, la capa germinativa de los metacestodes perdió la estructura multicelular característica (Figuras 6 c y e). Los análisis al MET de los metacestodes obtenidos del grupo ABZ-SUSP mostraron la presencia de áreas con vacuolas y microtriquias distorsionadas (Figura 6 d). Los metacestodes obtenidos de ratones tratados con los NCABZ presentaron una marcada alteración de la capa germinativa con distorsión del tejido interno, incremento del número de vacuolas y reducción de las reservas de glucógeno de las células.

Además, se incrementó el número de mitocondrias en el tegumento las cuales se evidenciaron más electro-densas (Figura 6 f). La vitalidad de los protoescólices de *E. multilocularis* aislados de los diferentes grupos experimentales se muestra en la figura 7A. La vitalidad de los protoescólices obtenidos de los grupos control agua destilada y MF fue mayor al 99 % (% de vitalidad de MF no mostrados).

No se encontraron diferencias significativas en la vitalidad de los protoescólices aislados de ratones tratados con ABZ suspensión en comparación con los grupos control ( $P > 0.05$ ; ABZ-SUSP=  $87.1 \pm 8.9$  %). En cambio, la vitalidad de los protoescólices aislados del grupo NCABZ fue significativamente menor ( $53.84 \pm 12.81$ ) a la detectada en los grupos control ( $P < 0.001$ ) y ABZ-SUSP ( $P < 0.05$ ).

Los resultados de vitalidad coincidieron con el daño en el tejido del parásito determinados a nivel ultraestructural. Los protoescólices aislados de los grupos control se observaron sin alteraciones (Figuras 7B a y b). En algunos protoescólices aislados del grupo ABZ-SUSP se observó contracción del soma y pérdida de las microtriquias del rostelo (Figura 7B c). En todos los protoescólices extraídos del grupo tratado con los NCABZ se evidenció pérdida de la morfología característica, pérdida de microtriquias del róstelo y de las ventosas y desorganización rostelar (Figuras 7B d y e).



**Figura 7.** (A) Vitalidad de protoescólices (% , media±DE) obtenidos de ratones de grupos control agua destilada y tratados con NCABZ o ABZ suspensión a las 24 hs p.i. (B) Imágenes al MEB de protoescólices extraídos de quistes de ratones de los grupos control y tratados con NCABZ o ABZ suspensión. (a) Protoescólex del grupo control (750×). (b) Detalle de la región del escólex de un protoescólex obtenido del grupo control (1100×). (c) Protoescólex aislado quistes del grupo ABZ-SUSP. Desorganización rostelar y contracción del soma (800×). (d y e) Protoescólices aislado del grupo NCABZ. (d) Pérdida de la morfología (800×); (e) Región del escólex de protoescólex. Observar la desorganización rostelar y la pérdida de las microtriquias (1500×). rs: región del soma; rr: región rostelar; v: ventosa.

### 3.2. Estudio de eficacia clínica

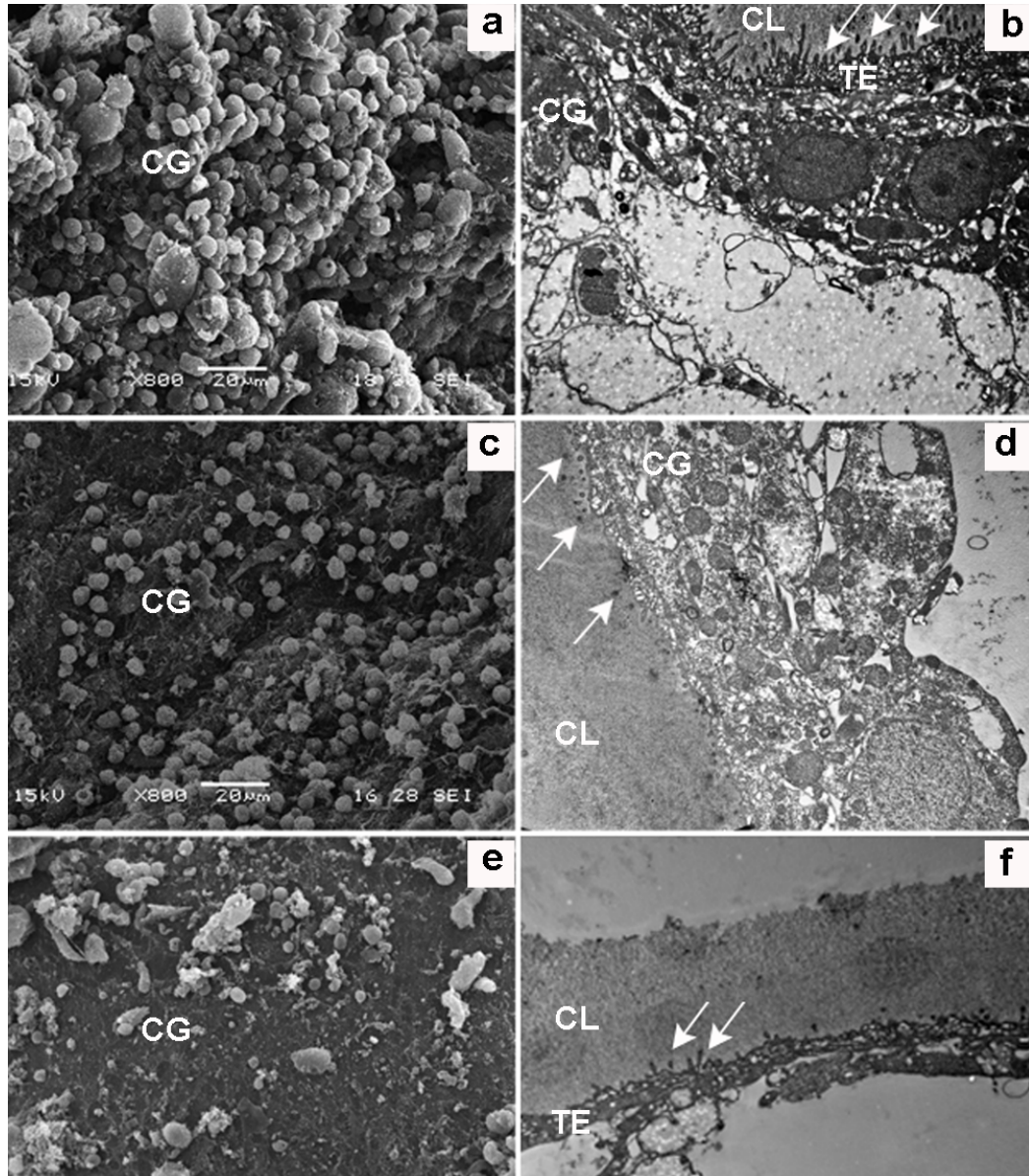
La tabla 2 muestra el peso de los quistes (media ± DE) registrado en los diferentes grupos experimentales. No se observó diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los grupos control (Control agua destilada=  $9.07 \pm 2.46$  g; MF=  $11.05 \pm 5.31$ ). Si bien el tratamiento con ABZ suspensión redujo el peso promedio de los quistes ( $4.9 \pm 2.2$  g), no se observaron diferencias significativas con respecto a los grupos control agua destilada y MF ( $P > 0.05$ ). Por el contrario, el peso de los quistes recuperados de los ratones tratados con los NCABZ fue significativamente menor ( $2.17 \pm 1.24$  g) que el obtenido en los 3 grupos control ( $P < 0.01$ ).

**Tabla 2.** Estudio de eficacia clínica. Peso (g, media  $\pm$ DE) de metacestodes recuperados de ratones a las 11 semanas p.i. de ratones de los grupos control, ABZ-SUSP y NCABZ. La administración de las drogas se inició 7 semanas p.i. Los tratamientos se realizaron cada 24 hs durante 30 días a la dosis de 5 mg/kg de ABZ. \*  $P < 0.01$ , diferencia significativa entre los grupos control (agua destilada, ABZ-SUSP y MF) y NCABZ.

	Estudio de eficacia clínica	
	Peso (g) de los quistes media ( $\pm$ DE)	Eficacia (%)
<b>Control agua destilada</b>	9,07 $\pm$ 2,46	
<b>MF</b>	11,05 $\pm$ 5,31	
<b>ABZ-SUSP</b>	4,9 $\pm$ 2.2	45,97
<b>NCABZ</b>	2,17 $\pm$ 1,24*	76,07

Los estudios a nivel ultraestructural de los metacestodes recuperados de los grupos control y tratados se muestran en la Figura 8. El daño producido por los NCABZ fue superior que ABZ suspensión. En la capa germinativa de los metacestodes obtenidos del grupo ABZ-SUSP se evidenció una reducción del número de células con morfología intacta, mientras que en los parásitos recuperados del grupo NCABZ sólo se pudieron observar residuos de células (Figuras 8 c y e). Además, el tratamiento con NCABZ provocó la destrucción del tejido interno de la mayoría de los quistes examinados al MET, mientras que con ABZ suspensión el tejido interno se encontró levemente alterado (Figuras 8 d y f).

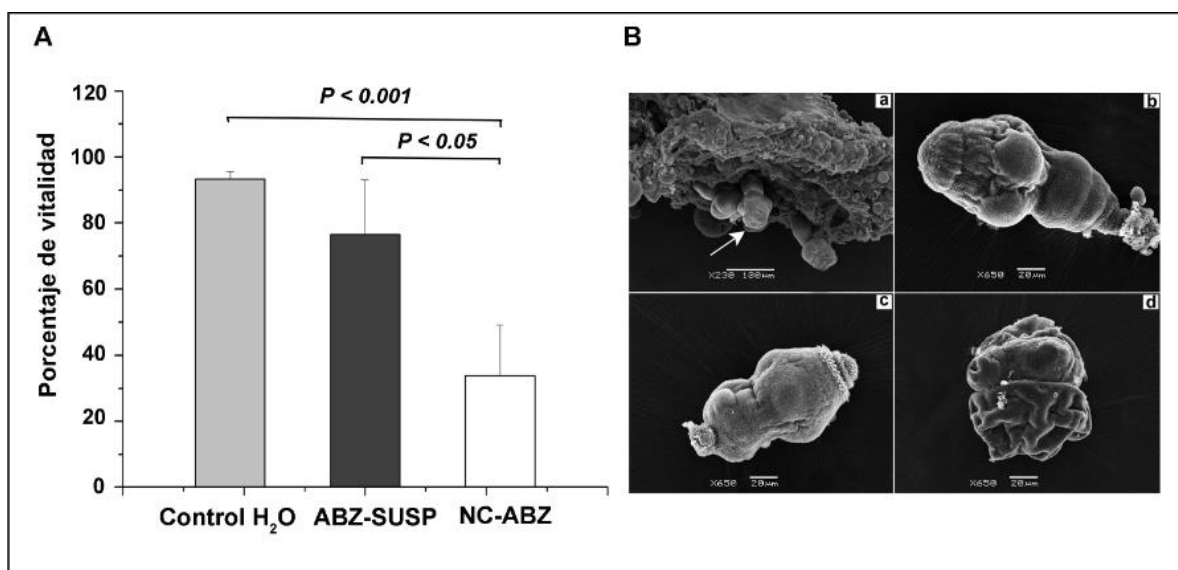




**Figura 8.** Imágenes al MEB y MET de quistes recuperados de ratones infectados con *E. multilocularis* tratados con ABZ suspensión (5 mg/kg) y NCABZ (5 mg/kg) durante el estudio de eficacia clínica. (a y b) Metacestodos recuperados del grupo control. (a) Se observa la capa germinativa con diferentes tipos celulares (MEB 800×). (b) Imagen al MET (10000×). (c y d) Quistes recuperados de ratones del grupo ABZ-SUSP. (c) Notar la disminución del número de células de la capa germinativa (MEB 800×); (d) Metacestode con el tejido interno alterado. Notar la reducción del número de microtriquias (MET 10000×). (e y f) Metacestodos recuperados del grupo NCABZ. (e) Observar la capa germinativa completamente alterada. Sólo se observan residuos de células (MEB 800×); (f) Tejido interno desintegrado y reducción del número de microtriquias (MET 10000×). CG: capa germinativa; CL: capa laminar; TE: tegumento; flechas: microtriquias.

El test de exclusión con azul de metileno reveló un 99% de protoescólices viables en los grupos control (% de vitalidad de MF no mostrados). Ambas formulaciones de ABZ mostraron efecto protoescolicida (Figura 9 A). El tratamiento con ABZ suspensión redujo la vitalidad de los protoescólices ( $74.65 \pm 16.5$ ), no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto de los grupos control. Por el contrario, la administración de NCABZ tuvo un claro efecto protoescolicida, disminuyendo significativamente ( $P < 0.001$ ) la vitalidad al 34%. Los resultados de vitalidad se correlacionaron con los estudios al MEB (Figura 9B).

Todos los protoescólices del grupo tratado con NCABZ presentaron alteraciones en el tegumento, contracción del soma y desorganización rostral (Figura 9B c). Las mismas alteraciones se detectaron sólo en algunos protoescólices del grupo ABZ-SUSP (Figura 9B d).



**Figura 9.** (A) Vitalidad de protoescólices (% , media±DE) extraídos de ratones de los grupos control y tratados a las 7 semanas p.i. con NCABZ o ABZ suspensión. B) Imagen al MEB de protoescólices extraídos de quistes de ratones infectados con *E. multilocularis* tratados con ABZ suspensión (5mg/kg) y NCABZ (5 mg/kg). (a y b) Protoescólices aislados del grupo control. (a) Protoescólices brotando (flecha) de la capa germinativa del quiste (230×). b) Protoescólice evaginado (650×). (c) Protoescólice aislado del grupo ABZ-SUSP. Notar la pérdida de ganchos (650×); d. Protoescólice aislado del grupo NCABZ. Pérdida de la morfología característica (650×).

#### 4. Discusión

El incremento en la concentración de saturación y en la velocidad de disolución del F en el medio gástrico provoca un importante gradiente de concentración entre el TGI y los vasos sanguíneos, mejorando su absorción y en consecuencia la disponibilidad plasmática y tisular (Gao y cols., 2008). La importante adhesividad de los NC a la pared intestinal es otra característica que contribuye al incremento de la BD oral, ya que el tiempo de residencia y de contacto de los NC de F en el TGI es

mayor (Gao y cols. 2008). De esta manera el aumento de la eficacia clínica y quimioproliférica de ABZ formulado como NC observado en este estudio podría atribuirse al incremento en la  $C_{m\acute{a}x}$  y el corto período en que ésta se alcanzó ( $T_{m\acute{a}x}$ ) como pudo observarse en los estudios de farmacocinética en ratones.

En los estudios de eficacia quimioproliférica, todos los ratones desarrollaron quistes en la cavidad peritoneal. El peso promedio de los metacistos recuperados del grupo NCABZ fue un 50% menor que el registrado en los grupos control, mientras que el tratamiento con ABZ suspensión no presentó efecto quimioproliférico. Las alteraciones ultraestructurales incluyeron la pérdida de la estructura multicelular de la capa germinativa, el incremento del número de vacuolas citoplasmáticas en el tejido interno y la reducción de las reservas de glucógeno de las células. Estos resultados coinciden con las alteraciones observadas en otros estudios de quimioprolifaxis realizados en el modelo de EQ (Urrea-París y cols. 2000, Ceballos y cols. 2010, Ahmadnia y cols. 2013, Pensel y cols. 2014, Maggiore y cols. 2015). Además, la vitalidad de los protoescólices extraídos del grupo NCABZ fue significativamente menor que la de los grupos control. Un efecto deletéreo del F sobre el estadio larval en el momento de la infección, explicaría el desarrollo de quistes y protoescólices aberrantes.

Con respecto a los estudios de eficacia clínica, ambas formulaciones de ABZ provocaron una reducción en el peso medio de los quistes obtenidos de los ratones; sin embargo, sólo el tratamiento con los NCABZ reveló diferencias significativas con los grupos control. Los estudios ultraestructurales mostraron un claro efecto de los NCABZ en la capa germinativa de los metacistos. Por otro lado, la vitalidad de los protoescólices determinada en cada grupo tuvo una correlación con el peso promedio de los quistes detectados en los mismos. La cantidad y el tiempo de permanencia del F en los metacistos obtenidos del grupo NCABZ (5 mg/kg) fueron lo suficientemente altos para reducir el peso de los quistes un 77% y la vitalidad de sus protoescólices un 34%. Por su parte, el tratamiento con la suspensión de ABZ a pesar de administrarse a la misma dosis, no produjo un efecto significativo sobre el peso de los quistes y la vitalidad de los protoescólices.

## **5. Conclusiones**

En los capítulos previos se pudo diseñar, obtener y caracterizar NC redispersables que presentaron una mejora marcada en la velocidad de disolución con respecto al F puro y una consiguiente mejora en los parámetros farmacocinéticos. En base a eso se diseñaron los estudios propuestos en este capítulo para determinar en un modelo murino de parasitosis, si las ventajas antes mencionadas se correlacionaban con una potencial mejora terapéutica.

La disminución en la viabilidad de los protoescólices y las observaciones realizadas por microscopía electrónica que evidenciaron el daño producido a nivel ultraestructural y morfológico de los parásitos, permitieron demostrar que los NCABZ produjeron un aumento significativo de la eficacia quimioproliférica y clínica del F.

En este sentido, la estrategia de nanometrización de ABZ puede traer claras ventajas terapéuticas y por lo tanto ser una alternativa a corto plazo en el diseño de nuevos medicamentos para el tratamiento de pacientes con hidatidosis.



## 6. Referencias

- Ahmadnia, S. y cols., 2013. In vivo evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst. *Exp. Parasitol.*, 135(2), pp.314–319.
- Brunetti, E. & Junghanss, T., 2009. Update on cystic hydatid disease. *Current Op. Infect. Dis.*, 22(5), pp.497–502.
- Cabrera, M. y cols., 2002. Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.*, 44(1), pp.29–34.
- Castiglione, N., Bolpe, J., Benitez, M., Vizcay, R. 2011. Hidatidosis en le provincia de Buenos aires: estimación de costos y características del área endémica. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes, VII Congreso Argentino de Zoonosis. 8 al 10 de Junio. Buenos Aires, Argentina. pp. 109.
- Ceballos, L. y cols., 2010. Chemoprophylactic activity of flubendazole in cystic echinococcosis. *Chemotherapy*, 56(5), pp.386–392.
- Chomel, B.B., 2008. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 38(11), pp.1211–1217.
- Díaz, A., Fontana, E., Todeschini, A., Soulé, S., González, H., Casaravilla, C., Portela, M., Mohana-Borges, R., Mendonça-Previato, L., Previato, J., Ferreira, F. 2009. The major surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures. *Biochem.* 48: 11678–11691.
- Eckert J, Deplazes P. 2004. Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):107.
- Eckert, J. y cols., 1986. Pautas para la vigilancia, prevención y control de la equinococosis-hidatidosis, Ministerio de Sanidad y Consumo, Secretaría General Técnica, Publicaciones, Documentación y Biblioteca.
- Elissondo, M. C., Dopchiz M. C., Brasesco M., Denegri, G. 2004. *Echinococcus granulosus*: First report of microcysts formation from protoscoleces of cattle origin using the *in vitro* vesicular culture technique. *Parasite.* 11: 415-418.
- Elissondo, M. C. y cols., 2007. *In vitro* and *in vivo* effects of flubendazole on *Echinococcus granulosus* metacestodes. *Parasitol. Res.* 100: 1003-1009.
- Galindo, M., González, M. J., Galanti, N. 2002. *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biol. Res.* 35: 365-371.
- Galindo, M., Paredes, R., Marchant, C., Miño, V., Galanti, N. 2003. Regionalization of DNA and Protein Synthesis in Developing Stages of the Parasitic Platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J. Cell Biochem.* 90: 294-303.
- Gao, L. y cols., 2012. Drug nanocrystals: In vivo performances. *J. Controlled Release*, 160(3), pp.418–430.

- Gao, L., Zhang, A.D. & Chen, A.M., 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J. Nanop. Res.*, 10 (5) pp.845–862.
- Hemphill, A y cols., 2007. Innovative chemotherapeutical treatment options for alveolar and cystic echinococcosis. *Parasitology*, 134(Pt 12), pp.1657–70.
- Horton, R.J., 1990. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitology today (Personal ed.)*, 6(4), p.106.
- Horton, R.J., 1989. Chemotherapy of echinococcus infection in man with albendazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), pp.97–102.
- Kern, P. 2003. *Echinococcus granulosus* infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. *Langenbecks Arch. Surg.* 388: 413-420.
- Kern, P. 2006. Medical treatment of echinococcosis under the guidance of Good Clinical Practice (GCP/ICH). *Parasitol. Int.* 55: 273-282.
- Maggiore, M. y cols., 2015. Parasitology International Chemoprophylactic and therapeutic efficacy of thymol in murine cystic echinococcosis. *Parasitol. Int.*, 64(5), pp.435–440.
- María, A.C. y cols., 2015. In vivo activity of albendazole in combination with thymol against *Echinococcus multilocularis*. *Vet. Parasitol.*
- Menezes da Silva, A. M. 2011. Hydatid cyst/cystic echinococcosis: anatomical and surgical nomenclature and method to quantify the cyst content solidification. *Chin. Med. J.* 124: 2806-2812.
- Moro, P. & Schantz, P.M., 2006. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol. Int.*, 55(SUPPL.), pp.181–186.
- Morseth, D. J. 1967. Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.*, 312-325.
- Pensel, P.E. y cols., 2014. Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy of albendazole formulated as solid dispersions in experimental cystic echinococcosis. *Vet. Parasitol.*, 203(1-2), pp.80–6.
- Remis, J., Guarnera, E., Parra, A. 2009. Impacto de la hidatidosis. Influencia de factores ambientales y socioculturales en Tucumán, Argentina. *RAR.* 73: 303-312.
- Reuter, M. & Kreshchenko, N., 2004. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can. J. Zool.*, 82(2), pp.334–356.
- Salvitti, J., Mercapide, C., Sustersic, J., Del Carpio, M., Odriozola, M., Pereyra, R., Pérez, A. 2002. Tratamiento de la hidatidosis humana. En: Situación de la hidatidosis-echinococcosis en la República Argentina. Denegri, G., Elissondo, M. C., Dopchiz, M. (eds.). Editorial Martín. Mar del Plata, Argentina, pp. 205-214.
- Spiliotis, M. & Brehm, K., 2009. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. *Methods. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 470(1), pp.245–262.
- Stojkovic, M. y cols., 2009. Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3(9).

- Thompson, D., Geary, T. 1995. The structure and function of helminth surfaces, in: Harr J., Muller, M. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of parasites*. Academic, London, UK; p. 203.
- Thompson RCA, Jenkins DJ. Echinococcus as a model system: Biology and epidemiology. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2014;44(12):865–77.
- Urrea-París, M. a y cols., 2000. In vitro effect of praziquantel and albendazole combination therapy on the larval stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.*, 86(12), pp.957–64.
- WHO/OIE, 2002. *Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern*.

## **Capítulo IV. Ensayo de eficacia clínica en caninos naturalmente parasitados**

## 1. Introducción

Como último paso para verificar la hipótesis de este Trabajo de Tesis se procedió a evaluar la eficacia terapéutica de los NCABZ en perros naturalmente parasitados.

Este tipo de ensayos no tienen la rigidez experimental de un trabajo con animales de experimentación circunscrito a un laboratorio, pero claramente permiten dilucidar en forma real y a “campo” si el abordaje terapéutico propuesto es superior al que se utiliza en forma convencional.

### 1.1. *Ancylostoma Caninum*

El tratamiento y el control de los parásitos internos en pequeños animales, es muy importante dado que afectan su normal desarrollo y crecimiento, pueden producir diarreas severas y disturbios metabólicos (Soulsby, 1987; Díez, 1999). *Ancylostoma caninum* es una de las especies parásitas más importantes de nematodos gastrointestinales del perro adulto. Además, es capaz de infectar accidentalmente al humano constituyendo una zoonosis de alta prevalencia, especialmente en países de clima cálido. Algunas especies de *Ancylostoma* (*braziliense* y *caninum*) pueden generar el síndrome de *larva migrans* cutánea en humanos (Soulsby, 1982; Díez y cols., 1999).

*Ancylostoma* deriva del griego *anchylos*: gancho y *stoma*: boca, (boca con ganchos). La enfermedad también se ha denominado clorosis de Egipto, Anemia de los Mineros, Anemia Tropical y «Hookworm Disease» (Enfermedad del Gusano de los Ganchos), ya que la principal sintomatología comprende la anemia crónica y la debilidad, agravadas por la desnutrición y otros parasitismos de las zonas endémicas (Alfaro 2011).

#### 1.1.1. Morfología de *Ancylostoma caninum*

El adulto es un gusano cilíndrico, de 8-11 mm el macho y 10-13 mm la hembra, por 0.3-0.4 mm de diámetro. El macho presenta en el extremo posterior una dilatación en forma de campana, conocida como bolsa copuladora, que es ancha y traslúcida, y presenta espículas para fijarse en el momento de la copulación. La hembra fértil (que puede poner entre 10.000 y 20.000 huevos al día) libera huevos de manera continua; estos son de 65-75  $\mu\text{m}$  de longitud por 35-40  $\mu\text{m}$  de anchura y poseen una membrana externa translúcida; aunque al principio no están segmentados, pronto aparecen 2, 4, u 8 blastómeros característicos en su interior.

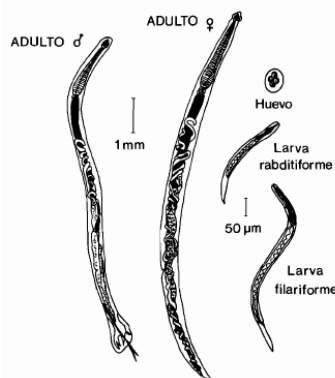
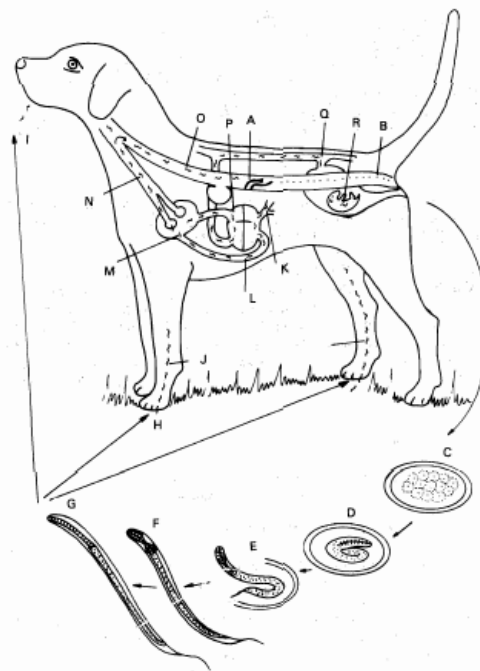


Fig. 1. Macho y hembra de *Ancylostoma caninum* adaptado de Alfaro 2011.

### 1.1.2. Ciclo de vida del parásito

Los huevos de *Ancylostoma caninum* son expulsados al ambiente con las heces. La primera larva se desarrolla en un día, se alimenta de bacterias y muda para llegar al segundo estado larvario. El tercer estado larvario conserva la muda de la segunda larva, ya no se alimenta y la muda le sirve de protección; esto sucede en 22 días a 15°C o en 2 días a 20 o a 30°C. La larva 3 logra infestar al huésped por vía cutánea o por vía oral, sigue la ruta linfática para llegar al corazón y pulmones, en donde a través de los capilares pasa a los alvéolos, sigue su migración por bronquiolos, bronquios, tráquea y faringe en donde es deglutida para llegar al intestino; esta migración tarda desde dos días hasta una semana. Las larvas que penetran por el intestino generalmente pasan por las glándulas de Lieberkhün del intestino delgado y luego de dos días regresan al lumen del intestino, mudan tres días después de la infestación y llegan a adultos; el periodo prepatente es de 15 a 18 días en perros jóvenes y de 15 a 26 en perros adultos, el período patente es de 6 a 12 meses (Quiroz, 1999).



**Fig. 2.** Esquema del ciclo evolutivo de *Ancylostoma caninum*. A. Parasito Adulto; B. Huevo; C. Huevo blastomero; D. Huevo con la primera larva; E. Eclosión de la primera larva; F. Segunda larva; G. Tercera larva; H. Infestación por vía subcutánea; I. Infestación por vía oral; J. Migración linfática; K. Larvas vía conducto torácico llegan al corazón; L. Larva en migración cardiovascular; M. Larva en migración pulmonar; N. Larva en migración traqueal; O. Larva en migración esofágica; P. Larva en corazón izquierdo; Q. Larva en migración trasplacentaria; R. Larva en feto. Las formas de transmisión pueden ser por vía cutánea, oral, placentaria o a través del calostro. Adaptado de Alfaro, 2011.

### **1.1.3. Tratamiento**

Actualmente, son muchos los medicamentos veterinarios disponibles para el combate de estos helmintos parásitos. Los derivados BZD, son F que han sido incluidos en formulaciones que se usan en todas las especies domésticas, tanto de producción como en animales de compañía (Campbell, 1990). En la clínica, el tratamiento para los parásitos intestinales en caninos se realiza con una dosis diaria de ABZ 25 mg/kg durante 3 días (Campbell 1990, Lacey 1990).

### **Objetivo específico**

Evaluar la eficacia clínica de ABZ formulado como NC redispersables en caninos naturalmente parasitados utilizando como control una formulación veterinaria utilizada en la práctica clínica habitual.

## **2. Materiales y metodología**

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a la normativa de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) (Jacobs y col., 1994). El manejo de los animales siguió las normas y protocolos de ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. ([www.fvet.edu.uy](http://www.fvet.edu.uy)) y los ensayos fueron llevados a cabo durante una pasantía AUGM en Montevideo, Uruguay durante los meses Junio y Julio de 2015.

### **2.2. Animales**

Los estudios fueron realizados con perros procedentes de un refugio canino del Departamento de Canelones, Uruguay que albergaba 96 animales. Éstos, estaban alojados en caniles individuales con piso de cemento y techo de lata, con una superficie de tierra a cielo abierto adicional. De acuerdo a las normas internas de funcionamiento del citado refugio, todos los animales estaban quirúrgicamente esterilizados. Los caniles fueron higienizados una vez por día mediante lavado con agua a presión.

### **2.3. Recolección de muestras**

Las muestras de materia fecal para este ensayo se recogieron del piso del canil utilizando guantes descartables, se rotularon y se colocaron en recipientes estériles y herméticos que fueron transportados al laboratorio en un bolso refrigerado. Allí el material fue almacenado en una heladera (4°C) hasta su procesamiento. Las muestras de materia fecal fueron analizadas por un método de flotación tradicional (Willis, 1921), de esta manera se identificaron los animales parasitados. Se encontró que un total de 42 perros estaban infectados con *Ancylostoma caninum* mediante el análisis de la morfología de los huevos (Thienpont y cols., 1979; Boch & Supperer, 1992). Los perros parasitados, no habían sido tratados con ningún antiparasitario interno antes del comienzo del ensayo.

### **2.4. Animales de ensayo**

Los animales que fueron encontrados parasitados con *Ancylostoma caninum* fueron elegidos como animales de experimentación para el presente estudio. Sus edades estaban comprendidas entre 1 y 10 años de edad, 27 machos y 15 hembras, el peso promedio fue de  $25,0 \pm 5,5$  kg. Los perros se

distribuyeron en forma aleatoria en 7 grupos de 6 animales cada uno. Todos los animales dispusieron de agua *ad-libitum* y fueron alimentados con comida de tipo balanceada dos veces por día.

## 2.5. Diseño experimental

Se evaluó la eficacia clínica comparativa de 2 formulaciones de administración oral: NCABZ vehiculizado en cápsulas transparentes de gelatina rígida (tamaño 00) y una presentación comercial de ABZ 300 mg disponible en Uruguay, Prazibek® (PZB). Ambas formulaciones fueron administradas durante tres días a tres dosis diferentes: 6.25, 12.5 y 25 mg/kg de acuerdo a lo descrito en la tabla 1. La conformación de los grupos (n=6) tratados se observa en la tabla 1.

**Tabla 1.** Grupos de ensayo en el estudio de eficacia clínica.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
NCABZ	NCABZ	NCABZ	PZB	PZB	PZB	Sin
25mg/kg	12,5 mg/kg	6,25 mg/kg	25 mg/kg	12,5 mg/kg	6,25 mg/kg	tratamiento

Los perros positivos incluidos en este trabajo, fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previo a la administración de los tratamientos farmacológicos. En la tabla I, se presentan las formulaciones y dosis administradas a cada grupo de animales.

Se recogió materia fecal de cada perro, el mismo día de su emisión desde el piso de su canil a los días 1, 2, 3, 4 y 30, luego de la administración de la última dosis de cada formulación.

Se utilizó la técnica de flotación de Willis (Willis, 1921) y un McMaster modificado (Morales & Pino, 1977), para el cálculo del porcentaje de reducción del conteo de huevos (PRCH). Los resultados se expresaron en huevos por gramo de materia fecal (hpg). El análisis de todas las muestras fecales, se realizó en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

El PRCH de cada especie de parásito en cada perro, fue determinado por la siguiente fórmula (Ec. 1):

$$PRCH = hpg (día 0) - (día x post tratamiento) \times 100 / [hpg (día 0)] \quad \text{Ecuación 1}$$

Los animales fueron rutinariamente observados por personal veterinario experimentado, durante varias horas post- tratamiento, para reportar la aparición de posibles reacciones adversas.

### 2.5.1. Análisis estadístico

Los datos estadísticos se examinaron utilizando el software libre InfoStat (v. 2008). Se utilizó un test t ( $p < 0,05$ ), para muestras pareadas para evaluar la eficacia clínica de ABZ administrado a 6 grupos de perros en tres dosis diferentes (6.25, 12.5 y 25 mg/kg). Se usó el test de Kruskal-Wallis – Test posthoc: Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), para comparar las eficacias clínicas entre las diferentes formulaciones utilizadas.



### 3. Resultados y discusión

En nuestro estudio, ABZ demostró un alto grado de eficacia contra *Ancylostoma caninum* en todos los tratamientos administrados. De acuerdo a lo observado en el recuento de huevos en el laboratorio, un alto porcentaje de animales tratados con ABZ, independientemente de la formulación utilizada, presentaron una gran disminución de la carga parasitaria. Ninguno de los animales involucrados en este estudio presentó síntomas de efectos adversos.

En la tabla 2 se observa de manera comparativa como disminuyó el conteo de huevos para los grupos tratados con PZB y NCABZ a las tres dosis correspondientes. Cuando se administró ABZ 25 mg/kg la eficacia observada fue del 100% a partir del día 1 y no se observaron diferencias significativas entre PZB y NCABZ ( $p > 0,05$ ). En el día 30 algunos animales habían sufrido una reinfestación. Cuando la dosis de ABZ se redujo a la mitad (12,5 mg/kg) el recuento de parásitos también demostró una fuerte caída alcanzando un 100% de eficacia que se mantuvo hasta el día 30, donde algunos animales presentaron recuentos positivos. Finalmente, cuando se trabajó con un cuarto de la dosis recomendada (6,25 mg/kg), se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la formulación de NCABZ y PZB. La formulación comercial, sólo logró disminuir un 45% la carga parasitaria y mantenerla en el tiempo hasta los 4 días, mientras que NCABZ eliminó el 100% de los parásitos, aunque como en el resto de los grupos se observó una reinfección en el día 30 dejando de ser significativa la diferencia observada previamente.

**Tabla 2.** Porcentajes de reducción del conteo de huevos expresados como porcentaje (DE). La única dosis en la que se observan diferencias significativas es 6,25 mg/kg. PZB: Prazibek.

Tratamientos									
Día	25 mg/kg			12,5 mg/kg			6,25 mg/kg		
	PZB	NCABZ	Valor p	PZB	NCABZ	Valor p	PZB	NCABZ	Valor p
<b>1</b>	98(5)	100(0)	0,999	100(0)	100(0)	0,999	55(22)	100(0)	<b>0,024</b>
<b>2</b>	98(5)	100(0)	0,999	100(0)	100(0)	0,999	55(22)	100(0)	<b>0,024</b>
<b>3</b>	99(3)	92(2)	0,876	100(0)	100(0)	0,999	55(22)	100(0)	<b>0,024</b>
<b>4</b>	98(4)	100(0)	0,685	100(0)	100(0)	0,999	55(22)	100(0)	<b>0,048</b>
<b>30</b>	78 (26)	93(15)	0,304	83(5)	85(19)	0,6286	46(13)	66(46)	0,5238

Si bien ABZ es un F altamente efectivo y de amplio espectro, ha sido relacionado con efectos adversos y toxicidad dosis dependiente en caninos (Stokol y cols. 1997). En este sentido, el presente estudio aporta un dato relevante, y es que cuando se administró el tratamiento comercial a la mitad de la dosis recomendada, se observó un alto porcentaje de eficacia, sin diferencias significativas con el tratamiento de referencia (25 mg/kg) tabla 3.

**Tabla 3.** Porcentaje de reducción del conteo de huevos (PRCH) expresado como media (DE). Los valores p son mayores a 0,05 en todos los casos (test t), lo cual indica que no hay diferencias significativas entre ambos grupos (PZB 2 5mg/kg y PZB 12,5 mg/kg).

Colecta de muestra (días)	PZB	PZB	p valor
	(25 mg/kg)	(12,5 mg/kg)	
<b>1</b>	98(5)	100(0)	0,3466
<b>2</b>	98(5)	100(0)	0,3466
<b>3</b>	99(3)	100(0)	0,3466
<b>4</b>	98(4)	100(0)	0,1839
<b>30</b>	78(26)	83(5)	0,7382

En la tabla 4 se muestran las diferencias de medias pareadas (días testeados contra día cero) para NCABZ y PZB correspondientemente. Los animales tratados con NCABZ, los valores p fueron menores a 0,05 hasta el día 30, donde la reinfección de los animales produjo la desaparición de la diferencia observada respecto al día cero. Contrariamente, los animales tratados con PZB no presentaron diferencias significativas en los días evaluados respecto al día cero ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 4.** Test t CI 95% ( $p < 0,05$ ) para muestras pareadas luego de la administración de una formulación oral de NCABZ (6,25 mg/kg) (A) y PZB® (6,25 mg/kg) (B). Diferencia de la media (hpg) ( $LOG_{10}$ ) desde el día 0 hasta el día 30.

<b>A</b>			
<b>NCABZ 6.25 mg/kg</b>			
Colecta de muestras (días)	Diferencia de Medias (hpg)	T	P
<b>1</b>	2,25	3,83	<b>0,012</b>
<b>2</b>	2,25	3,83	<b>0,012</b>
<b>3</b>	2,25	3,83	<b>0,012</b>
<b>4</b>	2,11	2,47	<b>0,039</b>
<b>30</b>	2,18	0,75	0,493

<b>B</b>			
<b>PZB 6.25 mg/kg</b>			
Colecta de muestras (días)	Diferencia de Media (hpg)	T	P
<b>1</b>	2,35	2,59	0,122
<b>2</b>	2,35	2,59	0,122
<b>3</b>	2,35	2,59	0,122
<b>4</b>	2,35	2,59	0,122
<b>30</b>	2,329	2,22	0,156

Por último, se realizó una prueba estadística comparativa entre el grupo de animales tratados con NC a un cuarto de la dosis (6,25 mg/kg) y el grupo tratado con PZB 25 mg/kg. De acuerdo a lo presentado en la tabla 5 no se observan diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ), ya que ambos alcanzaron altos niveles de reducción en el conteo de hpg. ABZ formulado como NC presenta una BD incrementada de acuerdo a lo discutido en el capítulo 2 de esta tesis.

**Tabla 5.** Porcentaje de reducción del conteo de huevos (PRCH) expresado como media (DE). Los valores *p* son mayores a 0,05 en todos los casos (test *t*), lo cual indica que no hay diferencias significativas entre ambos grupos (PZB® 25 mg/kg y NCABZ 6,25 mg/kg).

Colecta de muestra (días)	PZB (25 mg/kg)	NCABZ (6.25 mg/kg)	p valor
<b>1</b>	98(5)	100(0)	0,346
<b>2</b>	98(5)	100(0)	0,346
<b>3</b>	99(3)	100(0)	0,346
<b>4</b>	98(4)	100(0)	0,183
<b>30</b>	78(26)	66(46)	0,375

#### 4. Conclusiones

Los únicos antecedentes encontrados sobre la valoración de la eficacia clínica de ABZ y su metabolito ABZSO en perros, fueron los estudios hechos por Hollenweger y cols. (1987) y Saumell y cols. (2006) respectivamente. Por tanto, los resultados observados en este estudio experimental fueron de gran valor.

Los resultados indicaron que ABZ es altamente eficaz contra *Ancylostoma caninum* a la dosis utilizada en la práctica clínica, pero que sería factible una disminución a la mitad de la dosis utilizando la misma formulación comercial. Respecto al tratamiento con NC, los mismos presentaron resultados elevados de eficacia en todas las dosificaciones estudiadas, alcanzando niveles cercanos al 100%, lo que permitiría una reducción de la dosis en un 75% comparativamente con el tratamiento estándar. Esto podría traer aparejados una disminución en la cantidad del F que se utiliza, con la consecuente reducción de costos en el tratamiento y más importante aún, una reducción en los riesgos de aparición de efectos adversos.

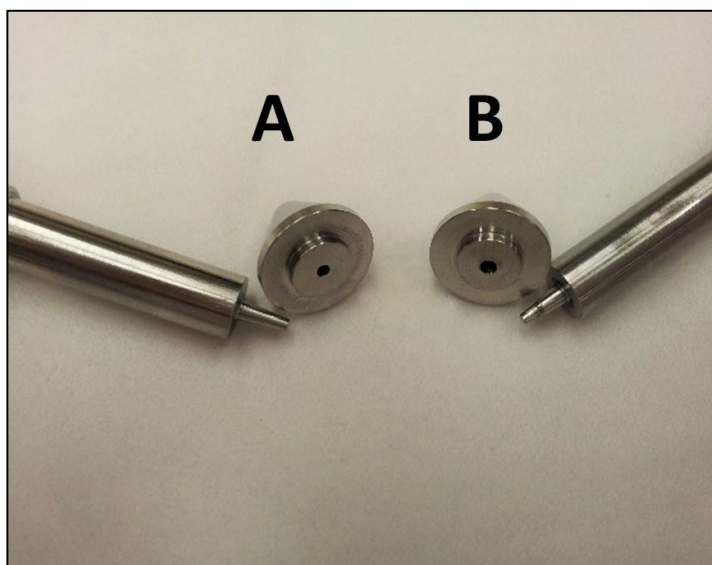
## 5. Referencias

- Alfaro Ayala ML 2011. Prevalencia de *Ancylostoma Caninum* en *canis lupus familiaris* en el área urbana y periurbana de la colonia zacamil, del municipio de mejicanos, san salvador. Tesis de grado, Universidad de El Salvador. p. 6.
- Boch J, Supperer R. 1982. Parasitología en Medicina Veterinaria. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. p 627.
- Campbell W. 1990. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol. Today*. 6: 130-133.
- Cordero del Campillo, M. 1999. Parasitología Veterinaria. 1 ed. Madrid, E. Editorial Mcgraw-hill-interamericana de España, S. A. U. 642 – 646. p.
- Díez P, Díez N, Morrondo M. 1999. Nematodosis: Toxocariosis, Toxascariosis, Ancilostomatidosis, Tricuriosis, Estrongiloidosis, Espirocercosis y Ollulanosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo F. Parasitología Veterinaria. Ed. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid. p 615-651.
- Holenwegger J, Wasserman A, Pérez R, Mato B. 1987. Estudio de la eficacia nematocida de Albendazol en los caninos. *Veterinaria Argentina* 4: 165-167.
- Jacobs D, Arakawab A, Courtney C, Gemmeld M, McCalle J, Myers G, Vanoarujsg O. (1994). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics for dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 52: 179-202.
- Lacey, E., 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today (Personal ed.)*, 6(4), pp.112–5.
- McKellar, Q. a & Scott, E.W., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents--a review. *J. Vet. Pharm. Ther.*, 13(3), pp.223–247.
- Morales G, Pino L. (1977). Manual de diagnóstico helmintológico en rumiantes. Caracas. Venezuela, p 99.
- Quiroz Romero, H. 1999. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México D. F. Editorial Limusa S. A de C. V. 483 – 490 p.
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. 1979. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica p 187.
- Saumell C, Fuse L, Monfrinotti A, Iglesias L, Steffan P, Fiel C. 2006. Evaluación de Ricobendazole vía oral en caninos. *Rev. Med. Vet.* 87: 160-165.
- Soulsby, E. J. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México D. F. Nueva editorial Interamericana S. A de C. V. 199 – 202 p.
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. 1979. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica p 187.
- Willis HH. 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med. J. Aust.* 2: 375-376.

**CAPÍTULO V. Obtención de nanocristales de  
albendazol por una técnica *top-down*  
innovadora**

## 1. Introducción

La producción de nanocristales a nivel industrial se realiza principalmente mediante técnicas *top-down*, las cuales consisten en la aplicación de energía al sistema para generar la ruptura de las partículas del F y la subsecuente nanometrización del sistema (Keck & Müller 2006). Dentro de estas técnicas, la homogeneización por alta presión (HAP) y la Nanomolienda Asistida por Microesferas (NAM) (Merisko-Liversidge y cols. 2003), son las que gozan de mayor aceptación. Si bien ambas técnicas son escalables y reproducibles, la HAP requiere de la aplicación de altas presiones para generar la energía suficiente para ser eficiente, y bajo esas condiciones puede ocurrir la contaminación de la muestra que se está procesando con los componentes del equipo, generalmente metálicos debido al desgaste de los materiales constitutivos del aparato. Por ese motivo, la cámara de homogeneización debe ser recubierta con materiales a prueba de desgaste, generalmente muy costosos como el diamante (Eskin y cols. 2005). Por otra parte, la producción de nanosuspensiones por HAP a escala laboratorio es muy costosa debido al alto desgaste de las piezas del equipo. Específicamente, el homogeneizador utilizado en este trabajo de tesis (Avestin C5 Emulsiflex®, Canadá), dispone de dos piezas metálicas (asiento y vástago) fundamentales para su funcionamiento que se desgastan rápidamente (figura 1). Además, posee una baja capacidad de proceso, con volúmenes pequeños de muestra (~200 mL) y la posibilidad de homogeneizar suspensiones con una baja concentración de sólidos (<5%) debido su delicado sistema de válvulas.



**Figura 1.** A- Juego de vástago y asiento nuevos. B- Juego de vástago y asiento desgastados luego de 20 horas de uso.

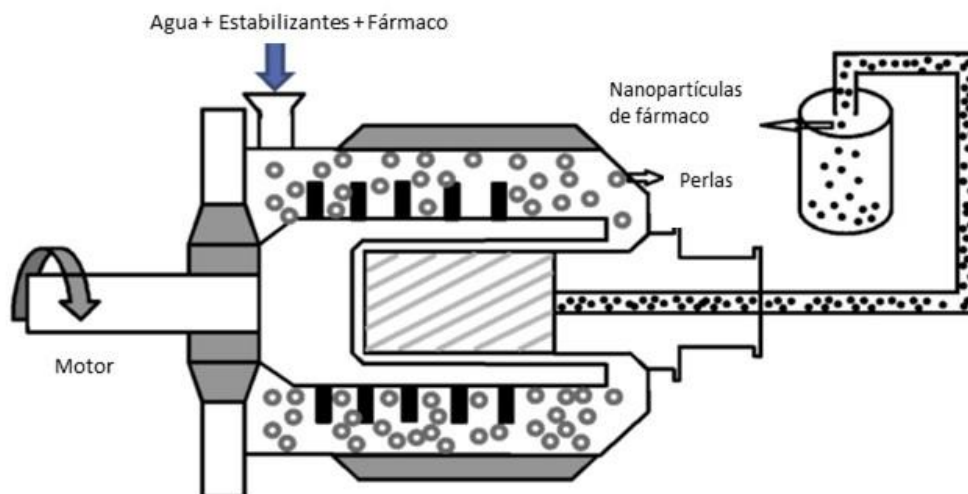
Basándonos en la experiencia adquirida y en las desventajas antes mencionadas se analizó poner a punto una técnica alternativa innovadora.

### 1.1. Nanomolienda Asistida por Microesferas (NAM)

En esta técnica se agrega a la suspensión del F un agente de molienda, generalmente perlas (*beads* en inglés) de zirconio, vidrio o cerámica y se aplica agitación al sistema. La colisión entre las partículas del F, el

material de molienda y las paredes del equipo producen la disminución del tamaño de partícula (Romero y cols. 2016, Afolabi y cols. 2014, Eskin y cols. 2005).

Los equipos de NAM están compuestos generalmente de una cámara donde se alojan el material de molienda (*beads*) y la suspensión del F. Dentro de la misma hay un agitador acoplado a un motor. Algunos equipos disponen de una malla que permite separar la suspensión que está siendo procesada del material de molienda; de esta manera la muestra puede circular aumentando la capacidad de procesamiento del molino (figura 2).



**Figura 2.** Esquema de un nanomolino asistido por microesferas adaptado de Loh y cols. 2014.

En el proceso de NAM existen numerosos parámetros que pueden influenciar la cinética de disminución del tamaño de partícula, algunos de ellos son; el tamaño, la cantidad y la densidad de las perlas que se utilizan, la concentración de sólidos en suspensión, la velocidad del agitador, temperatura, viscosidad del medio y la velocidad de flujo de la suspensión para aquellos molinos que poseen sistemas de recirculación (Afolabi y cols. 2014, Eskin y cols. 2005, Li y cols. 2015, Romero y cols. 2016, Yamamoto y cols. 2012).

Por otra parte, cabe destacar que, si bien la técnica de NAM posee numerosas ventajas respecto a la HAP, los equipos a escala laboratorio son importados y pueden alcanzar precios cercanos a los U\$S 80.000 (Molino PML2®, Bühler, Alemania). Además, estos equipos necesitan volúmenes elevados de muestra (~500 mL) lo cual es una gran desventaja si se desea procesar F muy costosos o productos de síntesis de los cuáles se dispone una pequeña cantidad. Romero y cols. (2016), desarrollaron un método de miniaturización a mini escala para la obtención de NC de diferentes F, si bien el método es altamente eficaz, el volumen de trabajo es muy pequeño (5 mL) ya que se realiza en viales herméticos con la ayuda de perlas de zirconio y agitación por barras magnéticas.

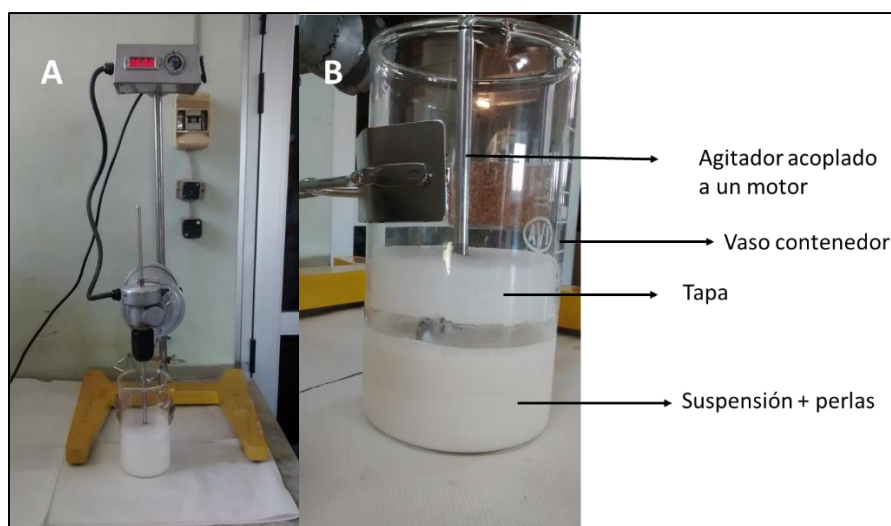
## 1.2. Nano-Molino

En el marco descrito anteriormente, se inició una línea de trabajo con el objetivo de diseñar y desarrollar un equipo capaz de producir nanosuspensiones por una técnica de NAM que permita procesar muestras de hasta 200 mL, que sea simple, económica y reproducible.

Esta etapa de la Tesis fue financiada por dos proyectos:

- ✓ Programa Universidad Diseño y Desarrollo Productivo (\$25.000).
- ✓ Innovación y Capital Humano, Agencia para el Desarrollo Económico de la Ciudad de Córdoba (ADEC) (\$60.000).

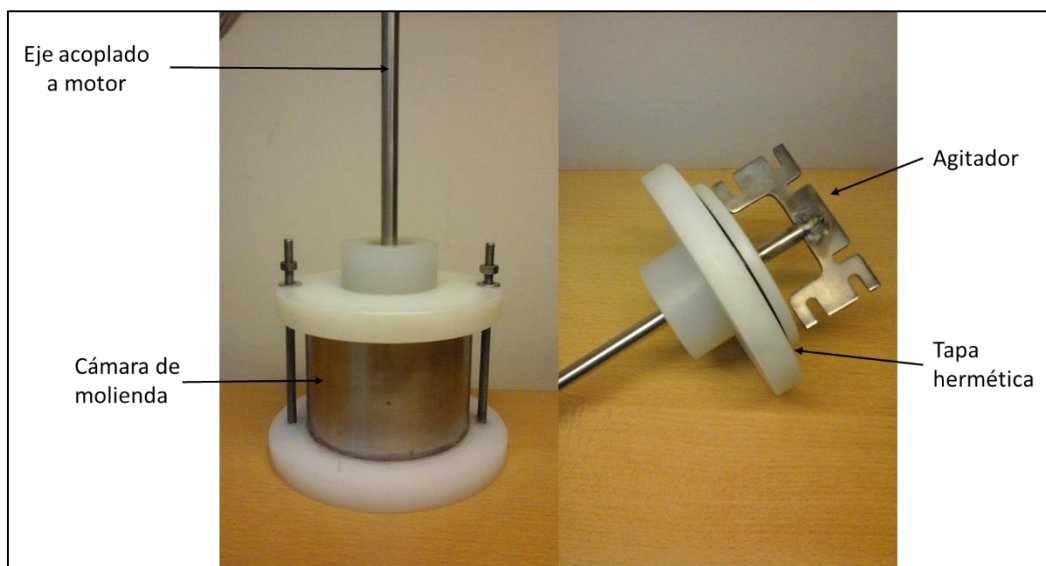
**Prototipo 1 (P1).** Se trabajó primeramente en un prototipo simple con la premisa de demostrar que el concepto de molienda planteado permitía alcanzar tamaños sub-micrométricos. Este sistema se construyó con un recipiente de vidrio, una paleta agitadora acoplada a un motor y una tapa de poliestireno especialmente adaptada al vaso contenedor. Dentro del vaso se colocaron la suspensión del F y el material de molienda (figura 3).



*Figura 3. A- prototipo 1 acoplado a un motor. B- componentes del prototipo 1.*

**Prototipo 2 (P2).** Un segundo diseño del molino se construyó en acero y resina acetálica. Este molino posee una tapa completamente hermética, que impide la fuga de la suspensión y la entrada de aire al sistema con la consecuente formación de espuma durante el proceso. Una evolución de este prototipo presenta una variante donde el agitador abarca toda la altura del molino, eliminando así puntos de menor energía. Además, posee un sistema de rulemanes y retenes en la tapa que permiten el giro del agitador sin intercambio de materia con el medio externo (figura 4).





**Figura 4.** Prototipo 2 del molino de perlas utilizado para la formulación de nanosuspensiones. Consta de un contenedor, una tapa hermética equipada con rulemanes, retenes y un agitador acoplado a un motor.

### **Objetivo específico**

Obtener NCABZ mediante la técnica de NAM y evaluar los principales factores que afectan el proceso de nanometrización en un nanomolino innovador.

## **2. Materiales y metodología**

### **2.1. Materiales**

Albendazol de calidad USP se adquirió en Todo Droga, Argentina y el estabilizante Poloxamer 188 (P188) en RUMAPEL, Argentina. Las perlas de zirconio (SiLi Beads®) de dos tamaños: 0,4-0,6 y 0,8-1,0 mm, fueron donadas por Sigmund Lindner GmbH, Argentina. También se utilizaron perlas de vidrio de 1 mm (Marienfeld, USA). Para todos los ensayos se utilizó agua MilliQ.

### **2.2. Obtención de nanosuspensiones**

Inicialmente, se prepararon suspensiones de ABZ y P188 en un mortero. En todos los casos se formuló un núcleo, añadiendo gradualmente agua MilliQ y malaxando hasta homogeneidad. Las suspensiones se procesaron en los prototipos descritos en la sección 1.2 del presente Capítulo. Se estudió la carga de material de molienda (50, 100 y 150 mL), la velocidad de agitación (500 y 750 rpm), el tamaño de perla (0,5 y 1 mm) y finalmente el porcentaje de sólidos (2,5; 5, 7,5 y 10%), utilizando en todos los casos iguales proporciones de ABZ y P188 (1:1) en lotes de 200g de suspensión. Para todos los ensayos realizados en esta sección, tanto P1 como P2 fueron sumergidos en un baño térmico con agua (~4°C) para evitar el calentamiento del sistema.

### **2.3. Mezcla física**

Para los ensayos de disolución se utilizó una MF de ABZ y P188, como control. La misma fue preparada en un mortero de Agatha colocando 500 mg de ABZ y 500 mg de estabilizante.

## **2.4. Caracterización físico-química y biofarmacéutica de los materiales obtenidos**

### **2.4.1. Tamaño de partícula e Índice de Polidispersidad**

Para determinar el tamaño de partícula de las nanosuspensiones y las redispersiones de los NC, se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (Zetasizer nanoZS®, Malvern, USA) en la que se incide a la muestra contenida en una celda, con un láser. Detectores colocados en la cara opuesta de la celda pueden medir el grado de dispersión de la luz y mediante un *software* calcular el radio hidrodinámico de las partículas. El ángulo de dispersión utilizado fue de 173°.

### **2.4.2. Microscopía electrónica de barrido**

Se tomaron fotomicrografías de ABZ, y de NC de ABZ. Los polvos se colocaron sobre una cinta de carbón en un portamuestras de aluminio y fueron recubiertas con oro para ser examinadas en un microscopio electrónico de barrido (ZEISS, Sigma).

### **2.4.3. Difractometría de rayos X de polvos**

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente en un Difractómetro de Rayos X (PANalytical X'Pert Pro), usando radiación Cu Ka ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), un tubo de voltaje de 40 kV con corriente de 40 mA. Las muestras fueron colocadas en portamuestras de Al y los datos tomados en un intervalo angular de 5° a 50° en  $2\theta$ , con un paso de 0.04° y una velocidad de medida de 1°/min.

### **2.4.4. Espectrofotometría UV-Visible**

La concentración de ABZ fue determinada por espectrofotometría ultravioleta-visible. Para ello se realizó una curva de calibrado en HCl 0,1 M. Se preparó una solución madre de ABZ en etanol y se realizaron diluciones con HCl 0,1 M abarcando siguientes concentraciones: 1,24; 2,48; 3,72; 4,96; 6,2; 7,44 y 9,92 ( $\times 10^{-5} \text{ M}$ ). La longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de 299 nm con un  $r^2$  de 0,9997.

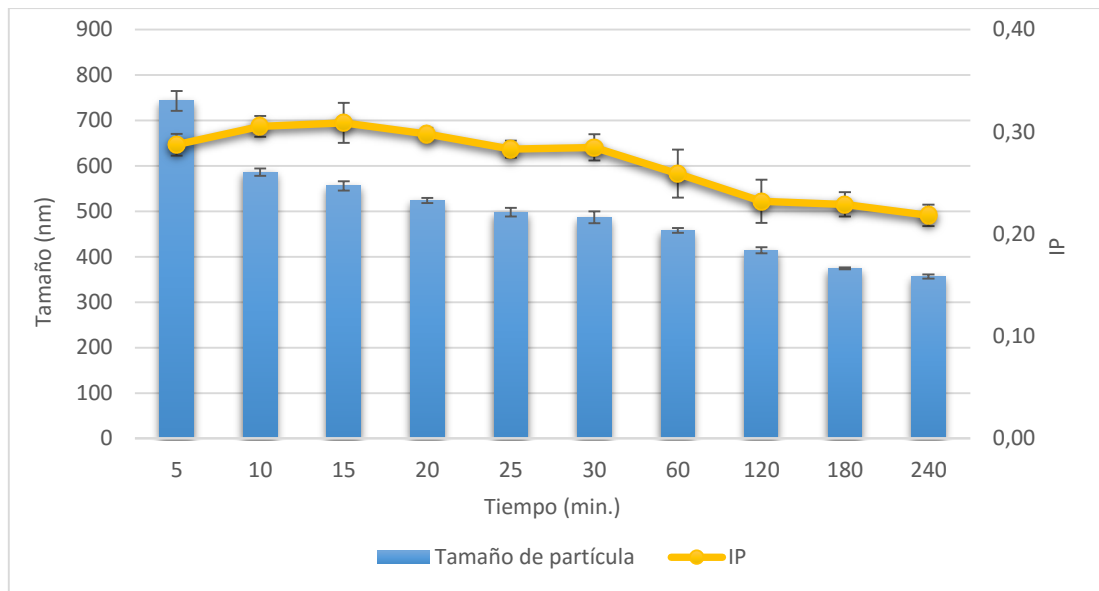
### **2.4.5. Disolución**

Para los estudios de disolución se colocaron las formulaciones optimizadas en cápsulas transparentes de gelatina rígida y luego en canastillos a una velocidad de rotación de 75 rpm y temperatura de 37°C. La cantidad de F dentro de las cápsulas fue de 50 mg. Para el medio de disolución se utilizaron 900 mL de HCl 0,1 M. Se realizaron dichos experimentos por 2hs tomando muestras del medio de disolución a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos).

## **3. Resultados y discusión**

### **3.1. Disminución del tamaño de partícula**

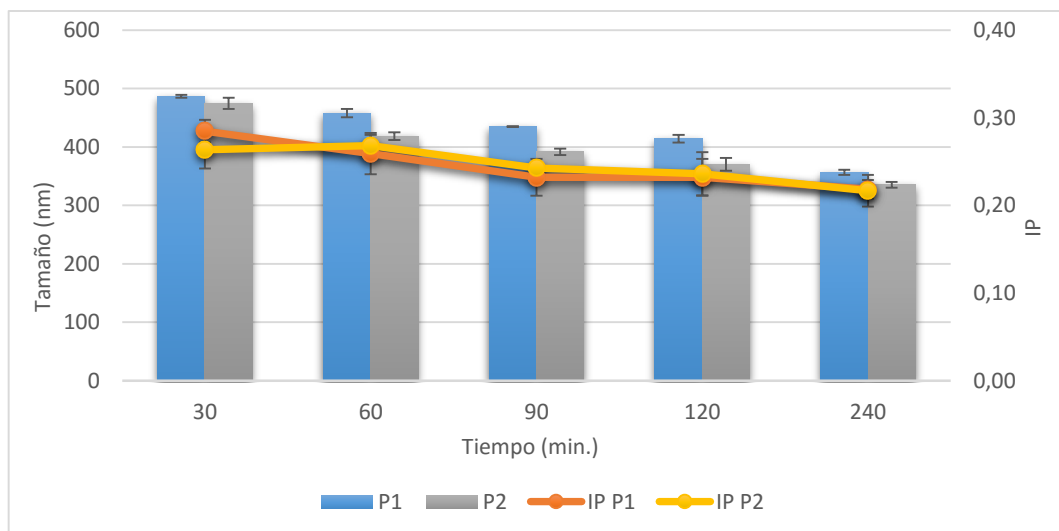
Este ensayo se llevó a cabo con el prototipo 1 para determinar si la técnica de laboratorio planteada permitía obtener nanosuspensiones. Como se observa en la fig. 5, el tamaño de partícula de la muestra alcanzó los 356 nm en 4 horas de proceso, logrando así un tamaño de partícula inferior al obtenido por HAP en el capítulo 1 (450 nm). El IP también disminuyó alcanzando un valor cercano a 0,2 lo cual es muy aceptable para una técnica *top-down*. De acuerdo a lo descrito previamente, la fricción y las fuerzas de colisión generadas entre las perlas y las paredes del equipo permitieron fracturar las partículas de ABZ hasta alcanzar tamaños sub-micrométricos.



**Figura 5.** Reducción del tamaño de partículas e IP a lo largo del proceso de molienda utilizando el prototipo 1 con 150 mL de perlas Zirconio (0,5 mm), 2,5% de sólidos y 500 rpm.

### 3.2. Comparación entre desempeño del prototipo 1 y el prototipo 2.

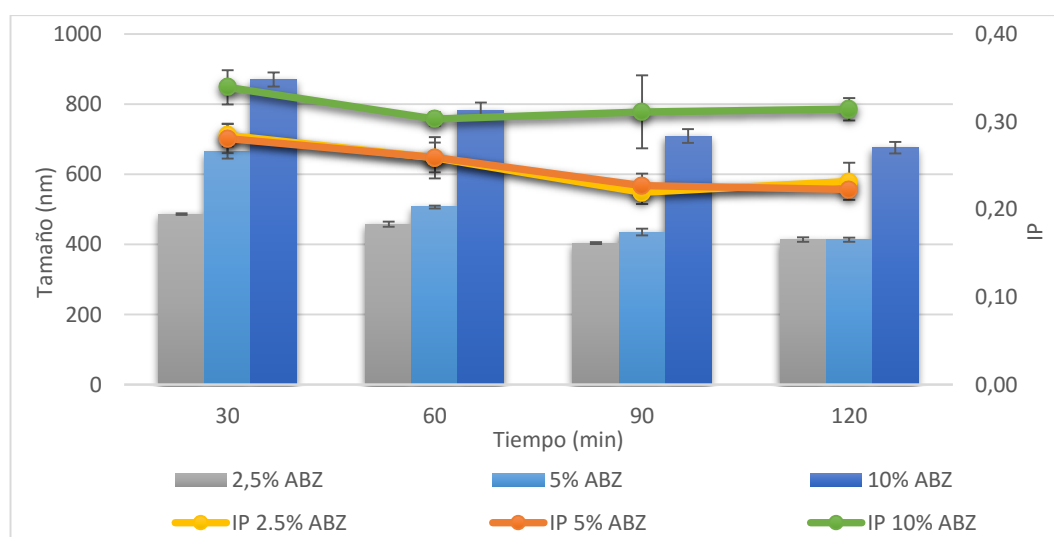
Como refleja la figura 6, se observó que ambos prototipos alcanzaron valores sub-micrométricos, siendo P2 el dispositivo que logró un tamaño de partícula menor. Esto fue asociado a la menor cantidad de espuma que generó este molino, aumentando la eficiencia del proceso. Aunque a mayores tiempos el tamaño de partícula continuó disminuyendo, los ensayos posteriores se realizaron durante 2 horas con el objetivo de optimizar los tiempos de producción y disminuir costos asociados al desgaste de los materiales y al consumo de energía.



**Figura 6.** Comparación de tamaño de partícula e IP en dos prototipos de molino (1 y 2) durante un proceso de molienda de 4hs con 150 mL de perlas Zirconio (0,5 mm), 2,5% de sólidos y 500 rpm.

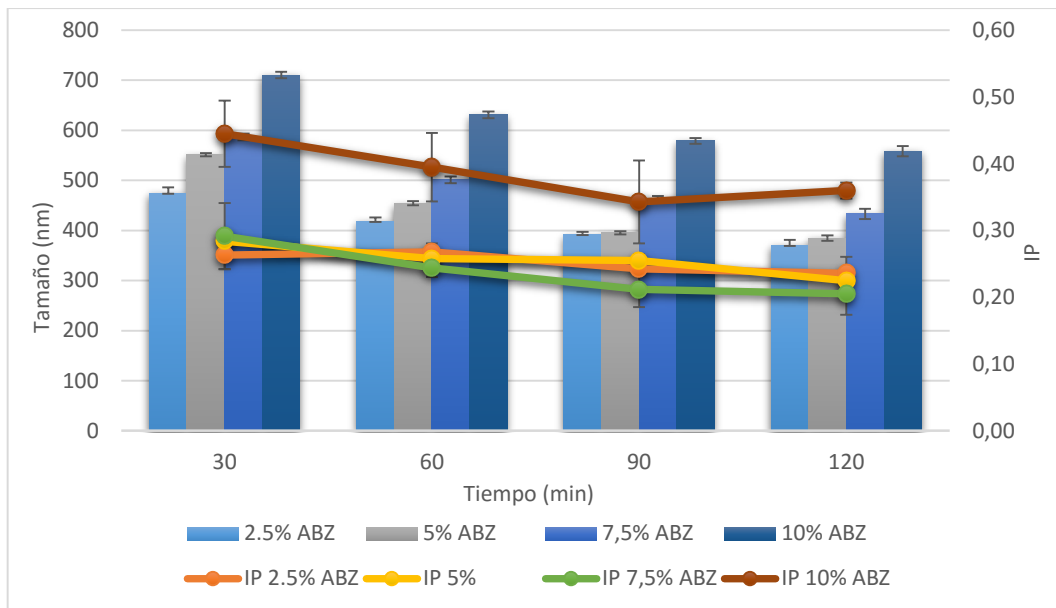
### 3.3. Concentración de fármaco en la suspensión para P1 y P2.

Con el objetivo de producir una mayor cantidad de producto en iguales tiempos de producción, se realizaron ensayos aumentando la cantidad de sólidos en la suspensión original, colocando cantidades crecientes de ABZ (5g, 10g y 20g). En la figura 7 se ve el comportamiento del sistema cuando se utilizó el P1. Independientemente de la cantidad de sólidos, el tamaño de partícula alcanzó valores nanométricos; sin embargo, a mayor cantidad de partículas en suspensión por unidad de volumen, los tamaños observados fueron mayores (400 nm para 2,5% y 5%; y 675 nm para 10% de ABZ). Las muestras de 2,5 y 5% de ABZ también presentaron valores similares de IP cercanos a 0,2 a diferencia de la muestra de 10% de ABZ que presentó un IP mayor a 0,3. A concentraciones crecientes de ABZ también se aumentó la concentración de P188 (soluble en agua), esto generó un aumento en la viscosidad del medio lo cual va en detrimento de la eficiencia de molienda (Afolabi y cols. 2014, Eskin y cols. 2005).



**Figura. 7.** Efecto en el tamaño de partículas e IP al variar la cantidad de albendazol (2,5; 5 y 10%), durante 2 hs. de molienda en el Prototipo 1 con 150 mL de perlas Zirconio (0,5 mm) y 500 rpm.

Este mismo ensayo se realizó con el prototipo 2, utilizando cantidades de ABZ de 5g, 10g, 15g y 20g respectivamente, como se muestra en la fig. 8. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el prototipo 1, siendo más eficiente la molienda con menor porcentaje de sólidos. En las fases más tempranas del proceso la diferencia entre las muestras es más evidente, pero a los 120 minutos se observa claramente que las muestras de 2,5 y 7,5% alcanzan tamaños de partícula e IP similares.

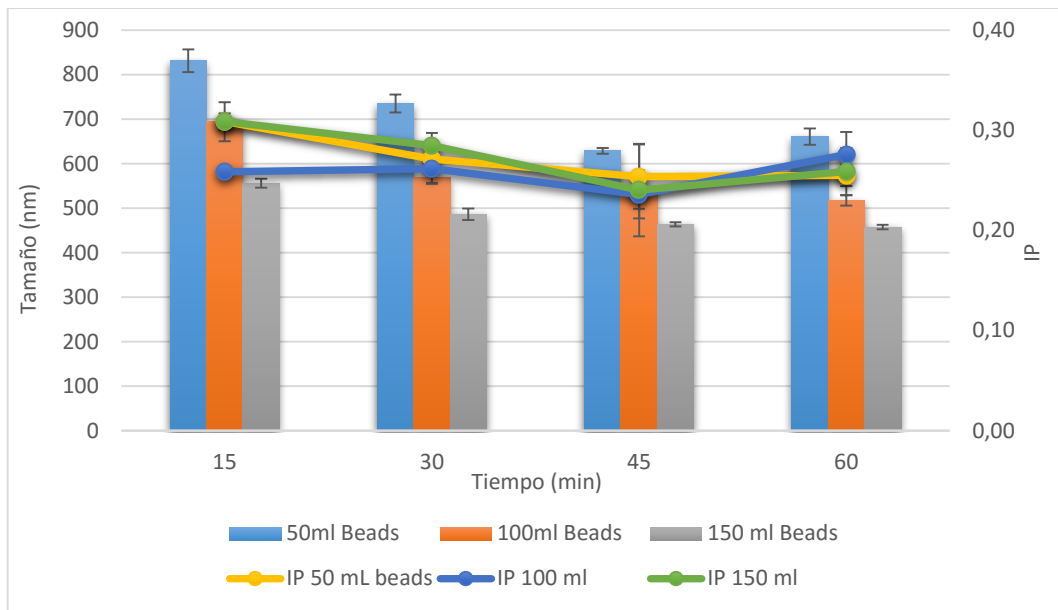


**Figura 8.** Efecto del tamaño de partículas e IP al variar la cantidad de albendazol (5gr, 10gr, 15gr y 20gr) durante un proceso de molienda de 2hs, en el **Prototipo 2** con 150 mL de perlas Zirconio (0,5 mm) y 500 rpm.

De manera comparativa, a las 2 hs. de proceso, utilizando 5% de ABZ, el P2 permitió alcanzar tamaños de partícula menores al P1 (370 nm y 414 nm respectivamente). Una vez evaluado el desempeño general de ambos diseños se decidió continuar los ensayos posteriores utilizando el Prototipo 2.

### 3.4. Efecto de la cantidad de material de molienda

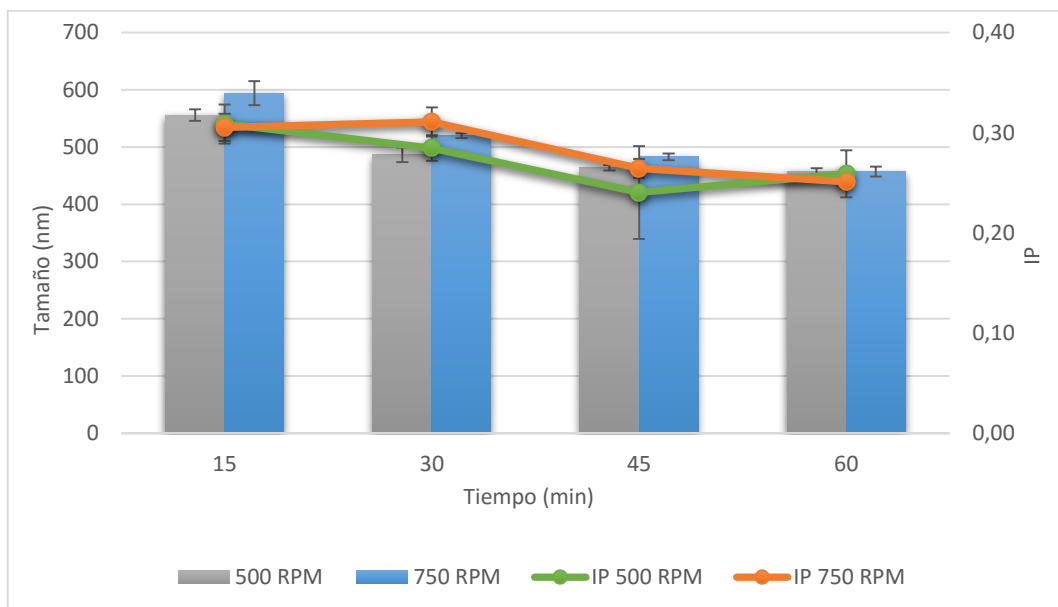
La figura 9 muestra la disminución en el tamaño de partícula e IP durante el proceso de molienda en los tres casos ensayados (50 mL, 100 mL y 150 mL de perlas de 0,5 mm). Al aumentar la cantidad de perlas dentro del molino, se observa una mayor eficiencia del método, ya que se alcanzan tamaños de partículas menores (660 nm para 50 mL de perlas, 457 nm para 150 mL de perlas, a la hora, respectivamente). Esto se debe a que hay una mayor cantidad de perlas colisionando entre sí y con las paredes del equipo. Por otra parte, también se ve incrementada la superficie de contacto disponible para la molienda aumentando la eficiencia del proceso. Este comportamiento ha sido descrito previamente por Afolabi y cols. 2014.



**Figura. 9.** Efecto en el tamaño de partículas e IP al variar la cantidad de Zirconio (50, 100 y 150 mL) al procesar una suspensión de ABZ al 5% y 500 rpm.

### 3.5. Influencia de la velocidad de homogeneización

La velocidad de agitación es uno de los parámetros más influyentes en el proceso de molienda ya que está estrechamente relacionado a la cantidad de energía que se le entrega al sistema, sin embargo, trabajando a 500 y 750 rpm se alcanzaron valores de tamaño e IP similares (figura 10). Los equipos para producción de nanosuspensiones disponibles en el mercado pueden alcanzar hasta las 4500 rpm y por lo tanto producir partículas con tamaños menores a los 200 nm. Un tercer prototipo con estas prestaciones se está construyendo.



**Figura 10.** Efecto en el tamaño de partícula e IP al variar la velocidad de agitación (500 rpm y 750 rpm), utilizando ABZ 5% y 150 mL de perlas Zirconio de 0,5 mm.

### 3.6. Influencia en el tipo y tamaño de perlas

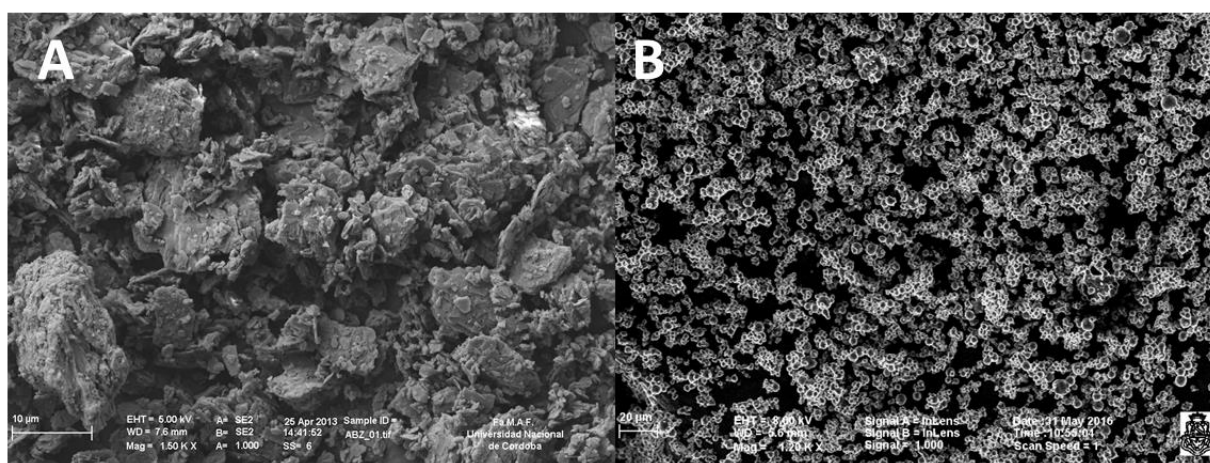
Como se observa en la tabla 1, el método alcanza tamaños de partículas nanométricos al utilizar 150 mL de perlas de vidrio (1 mm) y Zirconio (0,5 y 1 mm). Respecto a la muestra procesada con vidrio se observó un gran desgaste del material y fractura de las perlas, además de un cambio de color de la suspensión final, por lo tanto, se decidió descartar esta opción para futuros ensayos. Las muestras procesadas con Zirconio no presentaron este inconveniente y los tamaños de partícula fueron menores para las perlas de 0,5 mm. Cuanto menor es el diámetro de las perlas, en un volumen constante (150 mL), aumenta la cantidad de unidades disponibles para colisionar entre sí y la superficie de contacto. Por lo tanto, la eficiencia de molienda se verá aumentada cuando disminuya el tamaño de las perlas.

**Tabla 1.** Tamaño de partícula e IP de suspensiones de ABZ (5%) utilizando 150 mL de perlas de vidrio y zirconio.

Tiempo	Zirconio 0,5 mm		Zirconio 1 mm		Vidrio 1 mm	
	Tamaño (nm)	IP	Tamaño (nm)	IP	Tamaño (nm)	IP
30 min	474,3±11,4	0,263±0,021	607,9±2,3	0,229±0,014	586,7±6,5	0,292±0,05
60 min	418,3±7,9	0,268±0,013	555,4±13,7	0,225±0,015	501,2±6,5	0,244±0,014

### 3.7. Microscopía electrónica de barrido

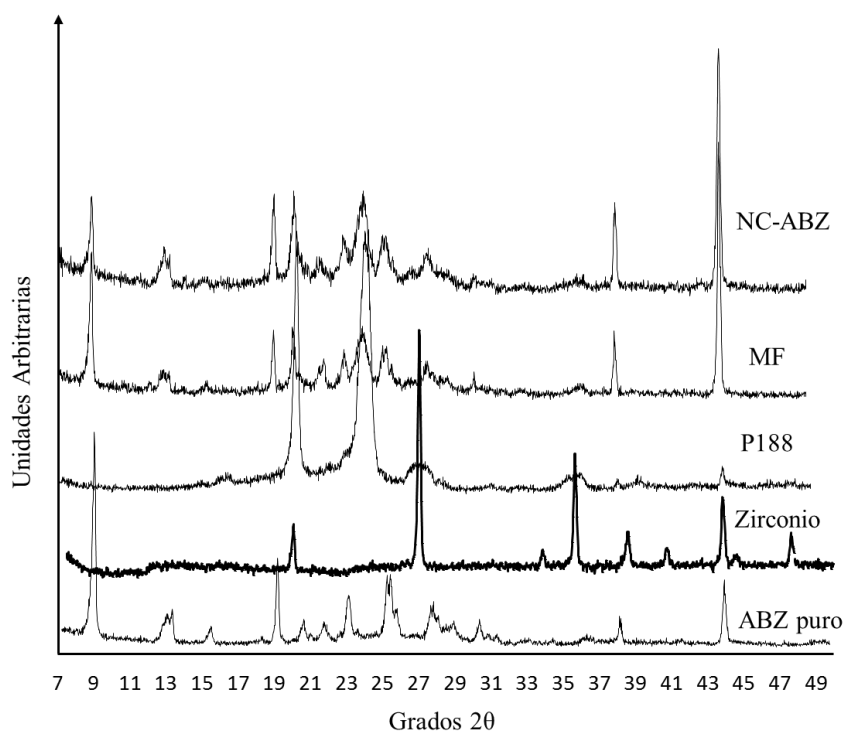
Las fotomicrografías obtenidas por MEB revelaron importantes diferencias de tamaño de partícula y morfología entre F puro y el material procesado (figura 11). Tanto la NS como el material secado por spray presentaron partículas de tamaño uniforme, dentro del rango sub-micrométrico y con forma esférica.



**Figura 11.** Fotomicrografías de A- ABZ y B- NC de ABZ obtenidos por NAM.

### 3.8. Difractometría de rayos-X

De manera análoga a lo observado en los patrones de difracción de rayos X para NCABZ obtenidos por HAP en el Capítulo I, las muestras procesadas por NAM no presentaron variaciones en los picos característicos del F puro ( $9^\circ$ ,  $19^\circ$ ,  $27^\circ$ ,  $28^\circ$  y  $44^\circ$  de  $2\theta$ ), tanto en la MF como en NCABZ. También se analizó una muestra del material de molienda, estas perlas cerámicas compuestas principalmente por óxido de Zirconio poseen una altísima dureza, lo que las hace aptas para la técnica de NAM, sin embargo, algunos autores (Keck & Müller, 2006; Li y cols. 2015) han cuestionado la posibilidad de transferencia de este material hacia la formulación debido a su desgaste durante el proceso de molienda. Como se muestra en la fig. 12, los picos característicos de Zirconio ( $27^\circ$ ,  $45^\circ$  y  $31^\circ$  de  $2\theta$ ) están ausentes en la muestra de NCABZ lo que podría dar un indicio de la ausencia de este material en el producto final, aunque no se realizaron estudios analíticos en mayor profundidad.

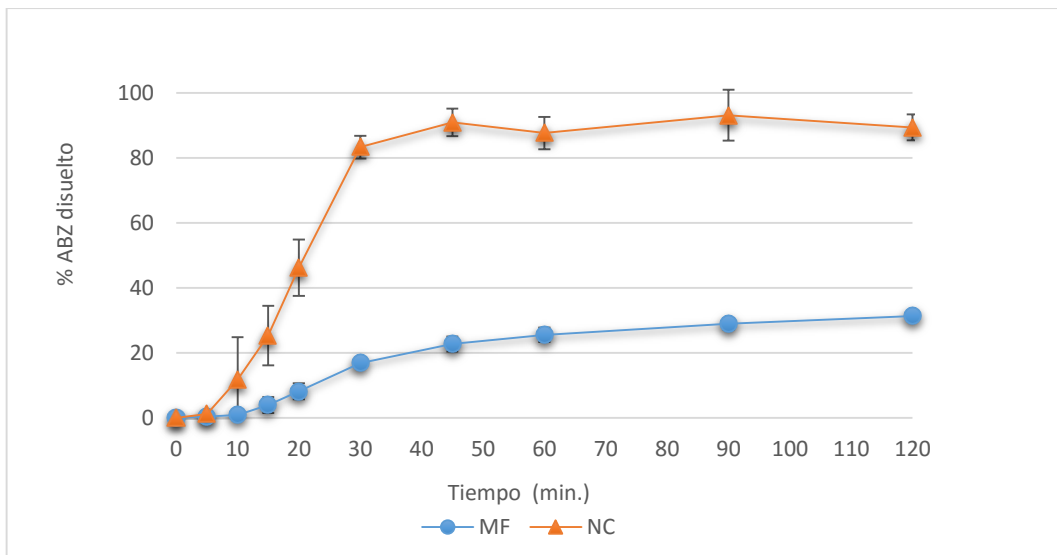


**Figura 12.** Patrones de difracción de rayos X para ABZ, el material de molienda (Zirconio), Poloxamer 188, MF y NCABZ.

### 3.9. Disolución

Como refleja la Fig. 13, las cápsulas de NCABZ mostraron una velocidad de disolución mayor (83% a los 30min) a aquella encontrada para la MF que no superó el 32% disuelto durante todo el ensayo. Este resultado está en concordancia con aquellos obtenidos en el capítulo 2 con los NC procesados por HAP.





**Figura 13.** Perfil de disolución de NCABZ y MF de ABZ:P188 (1:1). La dosis evaluada fue de 50 mg y el ensayo se realizó con 900 mL de HCL 0,1 M.

#### 4. Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la técnica desarrollada constituye una herramienta válida para la obtención de nanosuspensiones de ABZ.

Los estudios indicaron que la cantidad de perlas y el tamaño de las mismas influyen directamente en la eficiencia del proceso, mientras que, en lo referente a la formulación, la cantidad de F se pudo duplicar sin interferir en el desempeño del equipo. De esta manera, la capacidad de producción de NCABZ se incrementó 100% en comparación con la técnica de HAP. El proceso desarrollado es económico, simple y fiable.

## 5. Bibliografía

- Afolabi, A., Akinlabi, O. & Bilgili, E., 2014. Impact of process parameters on the breakage kinetics of poorly water-soluble drugs during wet stirred media milling: A microhydrodynamic view. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 51(1), pp.75–86.
- Eskin, D. y cols., 2005. Microhydrodynamic analysis of nanogrinding in stirred media mills. *AIChE Journal*, 51(5), pp.1346–1358.
- Keck, C.M. & Müller, R.H., 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62(1), pp.3–16.
- Li, M. y cols., 2015. Sub-100 nm drug particle suspensions prepared via wet milling with low bead contamination through novel process intensification. *Chemical Engineering Science*, 130, pp.207–220.
- Loh, Z.H., Samanta, A.K. & Sia Heng, P.W., 2014. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian J. of Pharm. Sci.*, 10(4), pp.255–274.
- Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003;18(2):113–20.
- Romero, G.B., Keck, C.M. & Müller, R.H., 2016. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int. J. Pharm.*, 501(1-2), pp.236–244.
- Yamamoto, Y. y cols., 2012. DEM simulation of bead motion during wet bead milling using an enlarged particle model. *Int. J. Min.l Proces.*, 114-117, pp.93–99.

# **Conclusiones Generales**

El presente estudio se enmarcó en una línea de trabajo que se lleva adelante desde hace diez años y comprende el diseño de nuevas estrategias para aumentar la eficacia de F antiparasitarios.

En esta Tesis Doctoral se exploró la obtención de NC de ABZ y Poloxamer 188 utilizando dos técnicas acopladas, Homogeneización por Alta Presión y secado por aspersión. Se optimizaron parámetros de proceso y formulación para asegurar que las partículas del F en suspensión se encuentren entre 400 y 600 nm de acuerdo a la definición de NC. Para la operación de secado, se hizo hincapié en la obtención de polvos altamente redispersables con tamaños de partícula cercanos a los 500 nm y rendimientos elevados de producción (72%).

Ambas técnicas, reproducibles y con factibilidad de ser escaladas en la industria no produjeron cambios en el estado cristalino de ABZ, que presentó una velocidad de disolución y concentración de saturación incrementada cuando se formuló como NC.

Los ensayos de farmacocinética validaron la hipótesis planteada, ya que la disminución en el tamaño de partícula produjo una mejora notable en los parámetros farmacocinéticos, especialmente en perros, con un valor de área bajo la curva y  $C_{m\acute{a}x}$  incrementados y un  $T_{m\acute{a}x}$  reducido.

Cuando se administró NCABZ a un grupo de ratones experimentalmente infectados con *Echinococcus granulosus* se observó un aumento significativo de la eficacia quimioproliférica y clínica, lo cual quedó evidenciado en una disminución en el peso y la apariencia de los quistes extraídos *post-mortem*, en la vitalidad de los protoescolices y en los severos cambios morfológicos observados por MEB en la capa germinal de dichos quistes.

En los ensayos de eficacia en caninos naturalmente parasitados se demostró que ABZ es altamente eficaz contra *Ancylostoma Caninum*, un parásito que infecta con gran prevalencia a esta especie. La administración de NC a un cuarto de la dosis recomendada generó una eficacia cercana al 100% y no presentó diferencias significativas con el tratamiento comercial a la dosis de referencia (25 mg/kg). Esto permitiría disminuir los riesgos de toxicidad, además del costo en el tratamiento ya que se necesitaría una dosis 75% menor.

Los NC de ABZ desarrollados en esta tesis presentaron características tecnológicas, biofarmacéuticas y desempeños *in vivo* notablemente mejorados, pero la técnica de obtención por HAP demanda infraestructura, tiempo y recursos económicos. Con el objetivo de aumentar la capacidad de producción y el potencial de transferencia de nuestro producto, se desarrolló una técnica innovadora basada en el principio de Nanomolienda Asistida por Microesferas (NAM) como una alternativa a la HAP. Se diseñó y construyó un molino que permitió obtener nanosuspensiones de ABZ con menores tamaños de partícula e IP que los obtenidos por homogeneización. Del estudio de variables realizado, surgió que el efecto del tamaño y la cantidad de perlas (*beads*) resultaron ser de gran relevancia en la eficiencia del proceso. Además, fue posible formular suspensiones con el doble de F, duplicando así la capacidad de producción.

Este trabajo de tesis aportó conocimiento científico y experiencia práctica en el desarrollo de NC, una plataforma que es tendencia mundial para la formulación de F poco solubles. Desde el punto de vista clínico, el tratamiento de las parasitosis con NCABZ podría ser de gran utilidad, ya que se podría lograr un alto grado de eficacia con bajo riesgo de toxicidad y la disminución de los costos al utilizar menor cantidad de F.

### ***Proyecciones de este Trabajo de Tesis***

#### ***✓ Formulación de un inyectable de ABZ***

ABZ como droga madre es más activo que su metabolito sulfóxido (ricobendazol). Utilizando ricobendazol se han diseñado inyectables que son escasamente utilizados en terapéutica debido a que son formulados a un pH extremadamente ácido, cercano a 1.5.

NCABZ con un tamaño de partícula menor a 5 micrómetros, permitiría formular un inyectable a pH neutro, con el F más activo y evitar el primer paso hepático, algo que hasta el momento no ha sido ensayado, especialmente en bovinos donde existen algunas condiciones particulares tales como:

- Imposibilidad de usar la vía oral en un gran número de animales.
- Alta resistencia a un gran número de F debido al uso indiscriminado de antiparasitarios.
- Pérdidas económicas debido a la alta prevalencia de parasitosis en el ganado.

En este marco, fue financiado un Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS) por \$200.000 con una empresa privada (Biotandil S.R.L.), para la realización de un ensayo farmacocinético de ABZ inyectable en bovinos.

#### ***✓ Ensayo de farmacocinética en humanos***

Por los resultados favorables obtenidos en los ensayos *in vivo* de esta Tesis, un estudio de farmacocinética en humanos sería un gran aporte científico y permitiría facilitar un potencial registro y transferencia del producto a la industria farmacéutica.

#### ***✓ Diseño y desarrollo de equipamiento farmacéutico***

El molino construido en esta tesis permitió el desarrollo de nanosuspensiones de otros F con diferentes aplicaciones, además se encuentra en proceso de construcción un tercer prototipo completamente de acero, con una camisa refrigerada que permitirá procesar muestras por encima de las 3000 rpm, de esta manera se podrán alcanzar tamaños de partícula e IP menores.

Para la construcción de los prototipos utilizados en el Capítulo V se realizó un trabajo multidisciplinario con alumnos de las carreras de Diseño Industrial de la Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo (UNC), y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC); en este marco se obtuvo financiación del Programa “Innovación y Capital Humano” de la Agencia para el Desarrollo Económico de Córdoba por \$65.000.

Además, recientemente fue financiado el proyecto “Medicamentos de base nanotecnológica: diseño de sistemas innovadores, procesos y equipamientos específicos” en la convocatoria PICT Start-Up 2016 por un monto de \$756.000, lo cual permitirá la continuación de esta línea de trabajo focalizada en la nanometrización de principios activos.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

*Producción científica y tecnológica relacionada a esta Tesis Doctoral*

### *Trabajos publicados*

**Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by High Pressure Homogenization and Spray Drying.** Alejandro Paredes, Juan Manuel Llabot, Sergio Sanchez Bruni, Daniel Allemandi and Santiago Palma. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylors and Francis. 2016;42(10):1564–70.

**Antiparasitic efficacy of a ricobendazole controlled release formulation against *Ancylostoma caninum* and *Trichuris sp* intended for oral administration in dogs.** Dib. A., Paredes A., Aldrovandi A., Allemandi D., Lanusse C., Palma S., Sánchez Bruni S. *Veterinaria (Montevideo)*. Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. 2016; 52 (204): 11-21.

### *Trabajos en redacción*

**Albendazole nanocrystals improve the chemoprophylactic activity against secondary alveolar echinococcosis in mice.** Patricia E. Pensel, Alejandro J. Paredes, Clara M. Albani, Sergio F. Sanchez Bruni, Daniel A. Allemandi, María C. Elissondo, Santiago D. Palma.

**Self-dispersible nanocrystals (SDNCs) of albendazol: pharmacokinetic performance and clinical efficacy in dogs.** Alejandro J Paredes, Daniel A. Allemandi, Nicolás Litterio, Sergio Sanchez Bruni and Santiago D. Palma.

**A new laboratory-scale methodology for the nanometrization of hydrophobic drugs.** Alejandro J. Paredes, Daniel Allemandi, Santiago Palma.

### *Presentaciones a Congresos*

**Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by high pressure homogenization and spray-drying.** Paredes AJ, Llabot JM, Allemandi DA, Palma SD. Presentado en el VI Simposio Internacional de Química. Junio de 2016, Cayo Santa María, Cuba.

**Actividad quimioproliférica de nanocristales de albendazol sobre el estadio larval de *Echinococcus Multilocularis*.** Patricia E. Pensel, Alejandro J Paredes, Clara M. Albani, Daniel Allemandi, Sergio Sanchez Bruni, Santiago D. Palma, María C. Elissondo. Presentado en la XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE 2015). Noviembre 2015, Córdoba, Argentina.

### *Patentes*

**Dispositivo para obtener nanosuspensiones a escala laboratorio.** Alejandro J. Paredes, Daniel Allemandi, Santiago Palma. Actualmente en análisis de factibilidad por la Dirección de Vinculación Tecnológica de CONICET. Contacto: Virginie Coste, e-mail: [virginiecoste@conicet.gov.ar](mailto:virginiecoste@conicet.gov.ar).

### *Divulgación*

**“Producen un efectivo fármaco antiparasitario de tamaño nanométrico”.** Publicada en octubre de 2016 por Candela Ahumada en la Agencia universitaria de comunicación de la ciencia, el arte y la tecnología (UNCiencia) de la Universidad Nacional de Córdoba.

**Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, application and characterization.** Alejandro Javier Paredes, Claudia Mariana Asencio, Llabot Juan Manuel, Santiago Daniel Palma, Daniel Alberto Allemandi. *Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing*. Nanobiofoods. 2016 (1) 1, 56 – 79.

**Study of the preparation process and variation of wall components in chia (salvia hispanica l.) oil microencapsulation.** Agustín González; Marcela L Martinez; Alejandro J Paredes; Alberto E León; Pablo Daniel Ribotta. *Powder Technology*. Elsevier B.V.; 2016 (301): 868–75.

**Novel modified release formulations of ricobendazole intended for oral administration in dogs. Pharmacokinetic assessment.** Dib A., Paredes A., Eliópulos N, Farías C., Suárez G., Aldrovandi S., Palma S., Allemandi D., Lanusse C., Sánchez Bruni S. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology*. 2015, 5:6. DOI: 10.4172/2161-1459.1000198.

**Diseño y preparación de formas farmacéuticas sólidas de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.** Sonia Tarragona, Claudio Salomón, Álvaro Jiménez-Kairuz, María Lamas, Silvina Orlandi, Darío Leonardi, Norma Maggia, Alejandro Paredes, Carolina Romañuk, Mónica García. *Revista Argentina de Salud Pública*. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2013 (4) 5: 6-13.