

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS
SISTEMAS FARMACOTERAPÉUTICOS PARA
LA OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**



Farm. Mónica Cristina García



FCQ

Facultad de
Ciencias Químicas



Universidad
Nacional
de Córdoba

UNITEFA-CONICET-UNC

Unidad de Investigación y Desarrollo en
Tecnología Farmacéutica

Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS SISTEMAS FARMACOTERAPÉUTICOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

*Trabajo de tesis para acceder al grado de
Doctor en Ciencias Químicas de*

Farm. Mónica Cristina García

Director

Prof. Dr. Álvaro F. Jimenez Kairuz

Comisión asesora

Prof. Dr. Gerardo Fidelio

Prof. Dr. Rubén Hilario Manzo

Prof. Dra. Lidia Mabel Yudi

Evaluador externo

Prof. Dr. Roberto Williams



BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Clasificación R-7

Gráfica 615.9

Identificación G
Número 73669

Origen AUTOR

Observaciones

Observaciones 2 p6 / 20

ML		
----	--	--

Con mucho amor a mi familia, por acompañarme siempre y,

en especial, a mis abuelos por su incondicionalidad

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota"

Madre Teresa de Calcuta

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a...

...todas aquellos que, de una u otra manera, me han acompañado a lo largo de estos años y han hecho agradable y ameno este proceso de aprendizaje.

...la Universidad Nacional de Córdoba, por permitirme llevar a cabo esta formación superior.

...mi director de tesis, Prof. Dr. Alvaro Jimenez Kairuz, por darme la oportunidad de trabajar en un tema tan noble y por su confianza.

...los profesores que integran la Comisión asesora de tesis: Prof. Dra. Mabel Yudi y Prof. Dr. Gerardo Fidelio, por su excelente predisposición y por todos sus aportes durante el desarrollo de esta tesis.

...el Prof. Dr. Rubén Manzo, por sus invaluable e innumerables contribuciones, por su apoyo permanente, por estar siempre pendiente y predispuesto a colaborar. ¡Gracias Doc!

...el Prof. Dr. Roberto Williams, por acceder a evaluar este trabajo de tesis y por los aportes realizados.

...el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), institución que financió mi beca doctoral.

...la Dra. Sandra Martín y al Dr. Mario Lanteri, por todo lo que me han enseñado, por confiar en mí y darme la oportunidad de dar mis primeros pasos en investigación. Fue mi experiencia con ustedes, la que me motivó a realizar este doctorado.

...los profesores del grupo de investigación: Dra. María Eugenia Olivera, Dra. Fabiana Alovero, Dr. Santiago Palma, Dr. Juan Manuel Llabot y Dr. Daniel Allemandi, por su colaboración y por mostrarse siempre predispuestos a ayudar.

...la Dra. Marisa Martinelli, por los trabajos en colaboración y por toda su ayuda.

...todos los integrantes de UNITEFA y del Departamento de Farmacia, por el tiempo compartido y por hacer agradables los días laborales. Al Departamento de Bioquímica Clínica, por abrirme sus puertas.

...mis compañeros de grupo, a los que están: Laura, Celeste, Florencia, Melisa, Carolina L., Franco, Carolina R., Liliana A., Luciana, Gabriela, Carolina B., Daniela, Alejandro, Lina, Ignacio, Marina, Sonia, Octavio, y a los que se fueron: Andrea, Vero, Clarisa, Norma y Natalia; por los momentos compartidos, por hacer amenos los días de trabajo y por su cooperación.

...Pilar, Nicolás, Liliana S. y Natalia, por su excelente predisposición siempre, por todo lo que me han enseñado, por su colaboración y ayuda, por integrarme y por hacerme sentir una más del grupo. ¡Gracias!

...Lauri, por estar siempre presente y por mostrarte más que dispuesta a colaborar en todo lo que necesité. A Cele, mi co-equiper, por toda tu colaboración y ayuda. A Andre, por tu compañía y apoyo.

A Meli, por ser mi confidente, por escucharme y por tu cariño. A Flor, por tu predisposición para colaborar y por tu apoyo permanente. A todas, gracias por su amistad y por los hermosos momentos compartidos.

...esas personas con las que me he cruzado en el camino, durante el desarrollo de esta tesis y con quienes he tenido el gusto de compartir espacios de trabajo, por fuera del doctorado, y que han hecho agradable este proceso. A Ana, Mariela, Fabiò, Marisa R., Velia, Juana, Nora, Esteban, Alicia, Mónica, Martín, Juan.

...mis vecinas, Marce, Anto y Desi, por las tardes compartidas, por escucharme y por su cariño.

...Ale, Miri, María y Lau, mis amigas del alma y hermanas del corazón. Gracias por estar siempre pendientes, por su apoyo constante, por su paciencia y por transitar a la par mío este camino.

...Norma y Juan, por tanto cariño, por su apoyo constante, por toda su ayuda a lo largo de estos años y por quererme como una hija más.

...Pablo, por ayudarme siempre que lo necesité, por interceder por mí y por sus bendiciones.

...mis abuelos, por su incondicionalidad, por su amor, por ser un ejemplo de vida y por haber formado una familia tan hermosa.

...mis tíos y primos, por tantos momentos bellos compartidos y por su apoyo.

...mis padres, por haberme dado la vida, por su amor, su paciencia y comprensión, por enseñarme tanto, por inculcarme valores y ayudarme a ser una buena persona.

...mis hermanos, Jorge, Laura, Carlos y Ceci, por cuidarme y por haberme apoyado siempre, por su amor, por estar pendientes de mí, a pesar de las distancias, y por enseñarme con su ejemplo. A mis cuñados, Vale, Gise, Emma y Fer, gracias por su cariño, apoyo y comprensión.

...mis sobrinos, Nachi, Alex, Cathy y Diego, por ser soles que brillan siempre y por su amor tan puro. A Ori, Sathy y Fiore, por todo su cariño. Gracias por hacerme una tía tan feliz.

...Ruffo y Nena, mis perros, por su compañía y amor, por estar siempre a mi lado.

...Hernán, mi amor. No alcanzan las palabras para agradecerte por todo lo que hacés por mí. Gracias por tanto. Por acompañarme y contenerme siempre, por transitar este camino a la par mío, por todo tu apoyo y tu paciencia, por ser mi equilibrio, por ser incondicional y por amarme tanto. Gracias por todos los años que hemos compartido juntos y por hacerme tan feliz. ¡Te amo!

...Dios, por haberme resguardado la vida, por darme fuerza y tenacidad para seguir adelante, por iluminarme el camino y colmarme de bendiciones.

...todos y a cada uno, muchas gracias.

Resumen

Este trabajo de tesis doctoral tuvo por objetivo el desarrollo y evaluación de nuevos sistemas portadores de benznidazol (BZ) y clomipramina (CMP), y nuevas formulaciones de BZ aptas para su uso en pediatría, orientados a la optimización del tratamiento de la enfermedad de Chagas. En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que los sistemas desarrollados ofrecerían ventajas farmacoterapéuticas, respecto de los productos farmacéuticos que se utilizan actualmente. Este escenario, propicia condiciones prometedoras para el desarrollo de terapias antichagásicas eficaces y más seguras, que podrían ser de utilidad para el abordaje farmacoterapéutico de esta enfermedad.

En particular, la evaluación de la combinación de BZ y CMP permitió evidenciar que el sinergismo de la actividad tripanocida, mediante el mecanismo de acción independiente de cada uno de los fármacos (F), podría ser aprovechado, con el fin de reducir las dosis de BZ para el tratamiento, con la consecuente reducción de los efectos adversos asociados a su uso, lo que se traduciría en una farmacoterapia eficaz, más segura y confiable.

Por su parte, los sistemas portadores de BZ y CMP son promisorios para el diseño de sistemas de liberación modificada de F para vía per-oral, en los que se aprovechen las características peculiares de cada uno de los sistemas desarrollados y las potencialidades de su utilización. Esto se podría traducir en una mejora significativa de la eficacia y seguridad en la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas y en una mejor adherencia al tratamiento, por parte de los pacientes.

En lo que refiere a las formulaciones pediátricas de BZ, éstas presentan versatilidad posológica, se obtienen por procesos que pueden ser escalables y la evaluación de sus atributos farmacotécnicos y biofarmacéuticos de calidad, demostró un alto grado de cumplimiento de las especificaciones de farmacopeas. Además, la optimización del sabor, promovería una mejor aceptación del tratamiento, por parte de los pacientes pertenecientes a este grupo etario. Estas formulaciones, son alternativas farmacéuticas interesantes, para dar respuesta a la falta de disponibilidad de farmacoterapias adecuadas, en dosis y formas farmacéuticas, para el tratamiento pediátrico de la enfermedad de Chagas.

Tabla de contenido general

Tabla de contenido de figuras y tablas	IX
Listado de abreviaturas y acrónimos	XV
Capítulo 1: Introducción general y objetivos	
1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS	3
1.1.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	4
1.1.2. CICLO BIOLÓGICO DEL <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
1.1.3. ETAPAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	7
1.1.4. CONTROL, PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	9
1.1.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	10
1.2. DISEÑO DE MEDICAMENTOS	12
1.2.1. PROPIEDADES DESFAVORABLES DE LOS F.....	15
1.2.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACOS	17
1.2.2.1. Aspectos generales a considerar en el diseño de SLM.....	19
1.2.2.2. Estrategias farmacotécnicas utilizadas para obtener SLM.....	21
1.2.2.3. Estrategias para evaluar el desempeño de los SLM	24
1.2.3. POLIELECTROLITOS UTILIZADOS EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA.....	24
1.3. ESQUEMA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO	32
1.4. OBJETIVOS	34
1.4.1. OBJETIVOS GENERALES	34
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
1.5. ORGANIZACIÓN DE LOS CAPÍTULOS DE LA TESIS	36
1.6. REFERENCIAS	37
Capítulo 2: Principios activos y excipientes seleccionados	
2.1. CONSIDERACIONES GENERALES	47
2.2. FÁRMACOS SELECCIONADOS	47
2.2.1. BENZNIDAZOL.....	47
2.2.1.1. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de BZ.....	48
2.2.2. CLONIPRAMINA.....	50
2.2.2.1. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de CMP	50
2.3. POLIELECTROLITOS SELECCIONADOS	53
2.3.1. POLIMETACRILATOS	53
2.3.1.1. Eudragit® EPO	55
2.3.1.2. Eudragit® L100 y S100.....	56
2.3.1.3. Eudragit® L100 55	56
2.3.1.4. Eudragit® FS 30 D.....	57

2.3.2. POLISACÁRIDOS	59
2.3.2.1 Chitosan	60
2.3.2.2 Ácido alginico	61
2.3.2. TITULACIONES POTENCIOMÉTRICAS DE LOS PE SELECCIONADOS.....	63
2.4. REFERENCIAS.....	64

Capítulo 3: Estudios *in vitro* de la combinación de BZ y CMP

3.1. INTRODUCCIÓN.....	71
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
3.2.1. MATERIALES	73
3.2.1.1. Fármacos	73
3.2.1.2. Reactivos y medios de cultivo.....	73
3.2.2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> SOBRE TRYPOMASTIGOTES	73
3.2.2.1. Obtención de los trypomastigotes en cultivos de células de mamíferos	73
3.2.2.2. Checkerboard test para evaluar la actividad anti-trypomastigote de BZ y CMP.....	74
3.2.3. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> SOBRE AMASTIGOTES.....	76
3.2.3.1. Obtención de los macrófagos	76
3.2.3.2. Actividad anti-amastigote de BZ y CMP	77
3.2.3.3. Ensayo de inmunofluorescencia	77
3.3. RESULTADOS	78
3.4. DISCUSIÓN	80
3.5. CONCLUSIONES PARCIALES	82
3.6. REFERENCIAS.....	82

Capítulo 4: Sistemas portadores de BZ y CMP

4.1. INTRODUCCIÓN.....	87
PARTE I: SISTEMAS PORTADORES DE BZ BASADOS EN CIPE.....	94
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
4.2.1. MATERIALES	94
4.2.1.1. Fármaco.....	94
4.2.1.2. Polielectrolitos	94
4.2.2. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE LOS CIPE CARGADOS CON BZ.....	94
4.2.3. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN LAS MULTIPARTÍCULAS.....	95
4.2.4. CARACTERIZACIÓN FARMACOTÉCNICA Y BIOFARMACÉUTICA DE LAS MULTIPARTÍCULAS	96
4.2.4.1. Granulometría, distribución de tamaño y rendimiento de obtención	96
4.2.4.2. Reología de sólidos y propiedades de flujo.....	96
4.2.4.2.a. Medición de la densidad de sólidos	96
4.2.4.2.b. Medición del ángulo de reposo dinámico.....	97
4.2.4.3. Medición de la sorción de agua y soluciones.....	98
4.2.4.4. Estudios de liberación de BZ desde las multipartículas de CIPE.....	99
4.2.4.5. Análisis matemática de los perfiles de liberación de BZ desde las multipartículas de CIPE	100

4.2.4.5.a. Comparación de los perfiles de liberación mediante el análisis del factor de similitud	100
4.2.4.5.b. Análisis cinético de los perfiles de liberación	101
4.2.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MULTIPARTÍCULAS	101
4.2.5.1. Difracción de Rx de polvos	101
4.2.5.2. Microscopia confocal	101
4.2.5.3. Espectroscopia FT-IR	102
4.3. RESULTADOS	102
4.3.1. PROPIEDADES FARMACOTÉCNICAS Y BIOFARMACÉUTICAS DE LAS MULTIPARTÍCULAS	102
4.3.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS MULTIPARTÍCULAS	114
PARTE II: SISTEMAS PORTADORES PE-CMP	122
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	122
4.4.1. MATERIALES	122
4.4.1.1. Fármaco	122
4.4.1.2. Polielectrolitos	122
4.4.2. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS PE-CMP	123
4.4.3. CARACTERIZACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE LOS COMPLEJOS PE-CMP	124
4.4.3.1. Estudios de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP	124
4.4.3.1. Análisis matemática de los perfiles de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP	124
4.4.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS MULTIPARTÍCULAS	125
4.4.4.1. Difracción de Rx de polvos	125
4.4.4.2. Microscopia óptica de luz polarizada	125
4.4.4.3. Espectroscopia FT-IR	125
4.5. RESULTADOS	125
4.5.1. PROPIEDADES BIOFARMACÉUTICAS DE LOS COMPLEJOS PE-CMP	125
4.5.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COMPLEJOS PE-CMP	129
4.6. DISCUSIÓN	132
4.7. CONCLUSIONES PARCIALES	143
4.8. REFERENCIAS	143

Capítulo 5: Estudios *in vivo* de eficacia y seguridad

5.1. INTRODUCCIÓN	152
PARTE I: ESTUDIO DE BZ Y CMP COMO F TRIPANOCIDAS	153
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	153
5.2.1. MATERIALES	153
5.2.1.1. Fármacos	153
5.2.1.2. Reactivos	154
5.2.1.3. Animales	154
5.2.3. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i>	154
5.2.3.1. Primer diseño experimental	155

5.2.3.2. Segundo diseño experimental.....	155
5.2.4. ENSAYO <i>IN VIVO</i> EN LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i> (FCI).....	156
5.2.5. ENSAYO DE HEPATOTOXICIDAD <i>IN VIVO</i>	156
5.2.6. PARASITEMIA Y ANÁLISIS DE LA SOBREVIDA DE LOS ANIMALES.....	156
5.2.7. REGISTRO DE PESO DE ÓRGANOS RELEVANTES.....	157
5.2.8. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO EN TEJIDOS.....	157
5.2.9. ESTUDIOS ELECTROCARDIOGRÁFICOS (ECG).....	157
5.2.10. HISTOLOGÍA CARDIACA E ÍNDICE DE INFLAMACIÓN.....	159
5.2.11. CARGA PARASITARIA EN TEJIDO CARDIACO.....	160
5.2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	160
5.3. RESULTADOS.....	160
5.3.2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> DE LA INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i> EN FASE AGUDA.....	160
5.3.2.1. Primer diseño experimental.....	160
5.3.2.2. Segundo diseño experimental.....	163
5.3.3. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i> EN FASE CRÓNICA.....	164
5.3.4. ESTUDIO DE HEPATOTOXICIDAD <i>IN VIVO</i>	170
PARTE II: ESTUDIO DE LOS SISTEMAS PORTADORES DE BZ Y CMP.....	172
5.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	172
5.4.1. MATERIALES.....	172
5.4.1.1. Sistemas portadores de BZ y CMP.....	172
5.4.1.2. Animales.....	172
5.4.2. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i>	172
5.4.2.1. Diseño experimental.....	173
5.4.3. PARASITEMIA Y ANÁLISIS DE LA SOBREVIDA DE LOS ANIMALES.....	173
5.4.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DAÑO EN TEJIDOS.....	173
5.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	173
5.5. RESULTADOS.....	173
5.6. DISCUSIÓN.....	175
5.7. CONCLUSIONES PARCIALES.....	180
5.8. REFERENCIAS.....	181

Capítulo 6: Formulaciones pediátricas de BZ

6.1. INTRODUCCIÓN.....	187
PARTE I: SUSPENSIÓN EXTEMPORÁNEA DE BZ.....	192
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	192
6.2.1. MATERIALES.....	192
6.2.2. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE BZ AL 1 %.....	192
6.2.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FÍSICA DE LA SUSPENSIÓN.....	193
6.2.4. ESTUDIOS DE LA UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE LA SUSPENSIÓN.....	194
6.2.5. MEDICIONES DEL PH DE LA SUSPENSIÓN.....	195
6.2.6. ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA SUSPENSIÓN.....	195

6.2.7. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LA SUSPENSIÓN	195
6.3. RESULTADOS	196
6.3.1. EVALUACIÓN DE LA UNIFORMIDAD DE CONTENIDO Y PH.....	199
6.3.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA	199
6.3.3. EVALUACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LAS SUSPENSIONES.....	199
PARTE II: COMPRIMIDOS E HIDROGELES AZUCARADOS MASTICABLES	200
6.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	200
6.4.1. MATERIALES	200
6.4.2. PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES AZUCARADOS MASTICABLES (HAM).....	201
6.4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS HAM.....	202
6.4.3.1. <i>Determinación de la uniformidad de peso y de contenido en los HAM</i>	202
6.4.3.2. <i>Análisis morfológico de los HAM</i>	202
6.4.3.3. <i>Estudios reológicos de los HAM</i>	202
6.4.3.4. <i>Estudios de disolución de BZ desde los HAM</i>	203
6.4.3.4. <i>Estudios de estabilidad de los HAM</i>	203
6.4.4. PREPARACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES	203
6.4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES.....	204
6.4.5.1. <i>Determinación de la uniformidad de peso y de contenido</i>	204
6.4.5.2. <i>Determinación de la dureza de los comprimidos masticables</i>	204
6.4.5.3. <i>Determinación de la friabilidad de los comprimidos masticables</i>	204
6.4.5.4. <i>Ensayo de desintegración de los comprimidos masticables</i>	205
6.4.5.5. <i>Estudios de disolución de BZ desde los comprimidos masticables</i>	205
6.5. RESULTADOS	205
6.5.1. EVALUACIÓN DE LOS HAM	208
6.5.2. EVALUACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES	210
6.6. DISCUSIÓN	214
6.7. CONCLUSIONES PARCIALES	221
6.8. REFERENCIAS.....	222

Capítulo 7: Validación de una metodología de HPLC para cuantificar BZ en plasma humano

7.1. INTRODUCCIÓN.....	227
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	229
7.2.1. REACTIVOS UTILIZADOS	229
7.2.2. EQUIPAMIENTO Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	229
7.2.3. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS SOLUCIONES DE CALIBRACIÓN Y DE LAS MUESTRAS DE BZ EN PLASMA	230
7.2.3.1. <i>Preparación de las soluciones stock</i>	230
7.2.3.2. <i>Preparación de las muestras</i>	230
7.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	231
7.2.4.1. <i>Construcción y análisis de la curva de calibración</i>	231

7.2.4.2. Criterios de validación	231
7.2.4.2.1. Linealidad	231
7.2.4.2.2. Precisión y exactitud	232
7.2.4.2.3. Recuperación	232
7.2.4.2.4. Límite de detección	233
7.2.4.2.5. Límite inferior de cuantificación de detección	233
7.2.4.2.6. Especificidad	233
7.2.4.2.7. Estabilidad	233
7.2.4.2.7.a. Estabilidad en ciclos de congelado-descongelado	233
7.2.4.2.7.b. Estabilidad post-preparativa	234
7.3. RESULTADOS	234
7.3.1. ESTUDIO POR HPLC DE BZ EN PLASMA HUMANO	234
7.3.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	234
7.4. DISCUSIÓN	237
7.5. CONCLUSIONES PARCIALES	239
7.6. REFERENCIAS	239
Capítulo 8: Conclusiones generales, proyecciones y perspectivas	
8.1. CONCLUSIONES GENERALES	243
8.2. PROYECCIONES A CORTO PLAZO Y PERSPECTIVAS A FUTURO	248
Anexos	
ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BZ EXTRAÍDO Y PURIFICADO DESDE COMPRIMIDOS COMERCIALES	XXI
ANEXO 2: NEUTRALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CMP NEUTRA	XXXIII
ANEXO 3: DIFRACTOGRAMAS DE RX DE POLVO	XLIII
ANEXO 4: ESPECTROS FT-IR	XLIX
Publicaciones generadas a partir de esta tesis	LIX

Tabla de contenido de figuras y tablas

Capítulo 1: Introducción general y objetivos

FIGURA 1.1. ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DE LA MORFOLOGÍA DE UN TRYPOMASTIGOTE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> Y SU ESTRUCTURA INTERNA.....	4
FIGURA 1.2. CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO <i>T. CRUZI</i>	7
FIGURA 1.3. MAPA DE RIESGO DE ARGENTINA DESAGREGADO QUE MUESTRA EL RIESGO DE TRANSMISIÓN VECTORIAL Y CONGÉNITA.....	10
FIGURA 1.4. PRINCIPALES ATRIBUTOS CONSIDERADOS DURANTE EL DISEÑO RACIONAL DE MEDICAMENTOS.....	13
FIGURA 1.5. POTENCIALES PROBLEMAS PRESENTADOS POR LOS F QUE LIMITAN SU UTILIZACIÓN Y PUEDEN SER SUPERADOS POR MEDIO DE ESTRATEGIAS FARMACOTÉCNICAS U OBTENCIÓN DE DERIVADOS FARMACÉUTICOS.....	17
FIGURA 1.6. ESQUEMA DE I+D REALIZADO EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN DONDE SE EVIDENCIAN LOS DIFERENTES NIVELES DE EXPERIMENTACIÓN.....	34
TABLA 1.1. ALGUNAS VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS SLM DE F.....	18
TABLA 1.2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS F QUE CONDICIONAN EL DISEÑO DE SLM.....	19
TABLA 1.3. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS F QUE INFLUYEN EN EL DISEÑO DE SLM.....	20
TABLA 1.4. ALGUNOS POLIELECTROLITOS ACTUALMENTE UTILIZADOS COMO EXCIPIENTES FARMACÉUTICOS (MOURYA & INAMDAR, 2009; ROWE, SHESKEY, & QUINN, 2009).....	26
TABLA 1.5. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPLEJOS CONSTITUIDOS POR PE ÁCIDOS Y BÁSICOS COMO PORTADORES DE F IONIZABLES DE CARGA OPUESTA.....	32

Capítulo 2: Principios activos y excipientes seleccionados

FIGURA 2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE BZ.....	48
FIGURA 2.2. ESQUEMA DE LOS PASOS INVOLUCRADOS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE BZ.....	50
FIGURA 2.3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE CMP.....	51
FIGURA 2.4. INTERACCIÓN DE CLOMIPRAMINA CON TR, MODIFICADO DE (PITA & PASCUTTI, 2012).....	53
FIGURA 2.5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EUDRAGIT [®] EPD.....	55
FIGURA 2.6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS EUDRAGIT [®] L100 (EuL) Y S100 (EuS). LA RELACIÓN DE GRUPOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS/UNIDADES ÉSTERES ES 1:1 EN EuL Y 1:2 EN EuS.....	56
FIGURA 2.7. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EUDRAGIT [®] L100 55.....	57
FIGURA 2.8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EUDRAGIT [®] FS 30 D.....	57
FIGURA 2.9. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CHITOSAN.....	60

FIGURA 2.10. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO ALGÍNICO	61
FIGURA 2.11. TIPOS DE BLOQUES EN LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO ALGÍNICO	62
TABLA 2.1. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS DE INTERÉS DEL BZ	48
TABLA 2.2. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS DE INTERÉS DE LA CMP ⁺	51
TABLA 2.3. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE INTERÉS DE LOS POLIMETACRILATOS SELECCIONADOS	58
TABLA 2.4. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE INTERÉS DE LOS POLISACÁRIDOS SELECCIONADOS.....	63

Capítulo 3: Estudios *in vitro* de la combinación de BZ y CMP

FIGURA 3.1. PROCESO ESQUEMÁTICO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS TRYPOMASTIGOTES DEL <i>T. CRUZI</i> DE LA CEPA TULAHUEN, SOBRE LA BASE DE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS VERD.	74
FIGURA 3.2. ESQUEMA QUE REÚNE TODOS LOS PASOS NECESARIOS, LOS COMPONENTES Y LAS CONCENTRACIONES DE BZ Y CMP EMPLEADAS PARA EL DESARROLLO DEL CHECKERBOARD TEST.	75
FIGURA 3.3. ESQUEMA DEL CHECKERBOARD TEST EMPLEADO Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS EXPRESADOS COMO % DE MUERTE DE LOS PARÁSITOS.....	78
FIGURA 3.4. ISOBOLOGRAMA OBTENIDO PARA LA COMBINACIÓN DE CMP Y BZ FRENTE A TRYPOMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	78
FIGURA 3.5. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS INMUNOFLUORESCENCIAS DE LOS MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MÉDULA ÓSEA E INFECTADOS CON <i>T. CRUZI</i> , NO TRATADOS (MEDIO) Y TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BZ, SOLO O EN COMBINACIÓN CON CMP.....	79
FIGURA 3.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA FRENTE A LOS AMASTIGOTES NO TRATADOS (MEDIO) Y TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BZ, SOLO O EN COMBINACIÓN CON CMP.	80

Capítulo 4: Sistemas portadores de BZ y CMP

FIGURA 4.1. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE LOS CIPE MULTIPARTICULADOS.....	96
FIGURA 4.2. DETERMINACIÓN DE LAS $\Delta_{90,00}$ Y $\Delta_{50,00}$	97
FIGURA 4.3. ÁNGULO DE REPOSO DINÁMICO	98
FIGURA 4.4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL EQUIPO UTILIZADO PARA LA MEDICIÓN DE SORCIÓN DE AGUA O SOLUCIONES.	98
FIGURA 4.5. FOTOGRAFÍAS DE LAS MULTIPARTÍCULAS OBTENIDAS.	103
FIGURA 4.6. SORCIÓN DE FLUIDOS DESDE LAS MULTIPARTÍCULAS EN UNA MASA DE ~50 MG. A) PERFIL DE SORCIÓN DE AGUA. B) PERFIL DE SORCIÓN DE SOLUCIÓN GÁSTRICA SIMULADA SIN ENZIMAS DE PH 1,2.....	106
FIGURA 4.7. ÁPARIENCIA VISUAL DE LAS PARTÍCULAS DE EUE-EUL-BZ ⁺ Y CHI-AA-BZ ⁺ DURANTE EL ENSAYO DE SORCIÓN DE FLUIDOS A DIFERENTES TIEMPOS.	107
FIGURA 4.8. PERFILES DE LIBERACIÓN DE BZ EN AGUA DE LOS CIPE OBTENIDOS UTILIZANDO COMO MEDIO DE INTERACCIÓN EN AGUA.	108
FIGURA 4.9. PERFILES DE LIBERACIÓN DE BZ EN NaCl 0,9 % DE LOS CIPE OBTENIDOS UTILIZANDO COMO MEDIO DE INTERACCIÓN EN AGUA.	109

FIGURA 4.10. PERFILES DE LIBERACIÓN DE BZ UTILIZANDO EL MÉTODO A – USP DE LOS CIPE OBTENIDOS UTILIZANDO COMO MEDIO DE INTERACCIÓN A) AGUA Y B) MEZCLA HIDROALCOHÓLICO.	111
FIGURA 4.11. PERFILES DE LIBERACIÓN DE BZ UTILIZANDO EL MÉTODO A – USP DE COMBINACIONES DE CIPE CON DIFERENTE COMPORTAMIENTO DE LIBERACIÓN.	112
FIGURA 4.12. PERFILES DE LIBERACIÓN DE BZ UTILIZANDO EL MÉTODO A – USP EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA, DE ACUERDO CON LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS, A PARTIR DE LOS CIPE OBTENIDOS UTILIZANDO MEZCLA HIDROALCOHÓLICA COMO MEDIO DE INTERACCIÓN. A) PERFILES DE LIBERACIÓN DESDE EL SISTEMA CHI-AA-BZ ^{MS} , B) PERFILES DE LIBERACIÓN DESDE EL SISTEMA EUE-EUL-BZ ^{MS}	113
FIGURA 4.13. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOS SISTEMAS CHI-AA-BZ OBTENIDOS EN MEDIO ACUOSO (IZQUIERDA) E HIDROALCOHÓLICO (DERECHA).	114
FIGURA 4.14. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOS SISTEMAS EUE-EUL-BZ OBTENIDOS EN MEDIO ACUOSO (IZQUIERDA) E HIDROALCOHÓLICO (DERECHA).	115
FIGURA 4.15. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOS SISTEMAS EUE-EUS-BZ OBTENIDOS EN MEDIO ACUOSO (IZQUIERDA) E HIDROALCOHÓLICO (DERECHA).	116
FIGURA 4.16. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOS SISTEMAS EUE-EULD-BZ OBTENIDOS EN MEDIO ACUOSO (IZQUIERDA) E HIDROALCOHÓLICO (DERECHA).	117
FIGURA 4.17. IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOS SISTEMAS EUE-EUFS-BZ OBTENIDOS EN MEDIO ACUOSO (IZQUIERDA) E HIDROALCOHÓLICO (DERECHA).	117
FIGURA 4.18. DIFRACTOGRAMAS DE RX DE POLVOS OBTENIDO PARA EUE, EUL, EUE-EUL-BZ ^{MS} , EUE-EUL-BZ ^{MS} Y LA MEZCLA FÍSICA (MF).	119
FIGURA 4.19. DIFRACTOGRAMAS DE RX DE POLVOS OBTENIDO PARA CHI, AA, CHI-AA- BZ ^A , CHI-AA-BZ ^{MS} Y LA MEZCLA FÍSICA (MF).	119
FIGURA 4.20. ESPECTROS DE FT-IR OBTENIDOS PARA EUE-EUL-BZ ^{MS} , EUE-EUL-BZ ^{MS} Y LA MEZCLA FÍSICA (MF).	121
FIGURA 4.21. ESPECTROS DE FT-IR OBTENIDOS PARA CHI-AA-BZ ^A , CHI-AA-BZ ^{MS} Y LA MEZCLA FÍSICA (MF).	122
FIGURA 4.22. PERFILES DE LIBERACIÓN DE CMP EN AGUA DESDE LOS COMPLEJOS PE-CMP.	127
FIGURA 4.23. PERFILES DE LIBERACIÓN DE CMP EN NaCl 0,9% DESDE LOS COMPLEJOS PE-CMP.	127
FIGURA 4.24. PERFILES DE LIBERACIÓN DE CMP DESDE LOS COMPLEJOS PE-CMP, UTILIZANDO EL MÉTODO A – USP (2 H EN 750 ML DE SOLUCIÓN DE HCl 0,1 N SEGUIDO DE 4 H EN 1000 ML DE SOLUCIÓN TAMPÓN DE pH 6,8).	128
FIGURA 4.25. DIFRACTOGRAMAS DE RX DE POLVOS OBTENIDO PARA LOS COMPLEJOS PE-CMP Y LAS MEZCLAS FÍSICAS CORRESPONDIENTES.	129
FIGURA 4.26. MICROGRAFÍAS SIN Y CON LUZ POLARIZADA (20X) OBTENIDAS PARA LOS POLÍMEROS AA Y EUL, LOS COMPLEJOS AA-CMP ₅₀ Y EUL-CMP ₅₀ , Y LAS RESPECTIVAS MEZCLAS FÍSICAS.	130
FIGURA 4.27. ESPECTROS DE FT-IR OBTENIDOS PARA EL COMPLEJO AA-CMP ₅₀ Y SU RESPECTIVA MEZCLA FÍSICA.	131
FIGURA 4.28. ESPECTROS DE FT-IR OBTENIDOS PARA EL COMPLEJO EUL-CMP ₅₀ Y SU RESPECTIVA MEZCLA FÍSICA.	131
FIGURA 4.29. SECUENCIA DE EVENTOS QUE OCURREN DURANTE LA LIBERACIÓN DE UN F DESDE LOS CIPE, LUEGO DE PONERSE EN CONTACTO CON FLUIDOS FISIOLÓGICOS.	137
TABLA 4.1. TIPIFICACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y PORCENTAJE RECOLECTADO EN CADA FRACCIÓN.	103

TABLA 4.2. PROPIEDADES DE FLUJO DE LAS PARTÍCULAS COMO MEDIDA DE SU COMPORTAMIENTO REOLÓGICO. PARÁMETROS EVALUADOS EN LA FRACCIÓN 16-20.	104
TABLA 4.3. VELOCIDAD DE SORCIÓN DE LOS CIPE, DETERMINADA POR REGRESIÓN LINEAL DE LOS GRÁFICOS DE VOLUMEN DE SORCIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.	105
TABLA 4.4 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE BZ DESDE LOS CIPE EN AGUA Y NaCl 0,9 %, SOBRE LA BASE DE LAS ECUACIONES DE HIGUCHI Y PEPPAS.....	109
TABLA 4.5. CANTIDAD NECESARIA DE CMP PARA NEUTRALIZAR EL 50 % DE LOS EQUIVALENTES DE GRUPOS ÁCIDOS IONIZABLES DE CADA PE, REFERENCIADA A UNA MASA IGUAL A 1 G DE PE.....	124
TABLA 4.6. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CMP DESDE LOS COMPLEJOS PE-CMP EN AGUA Y NaCl 0,9 %, SOBRE LA BASE DE LAS ECUACIONES DE HIGUCHI Y PEPPAS.....	128
TABLA 4.7. EL ÍNDICE DE CARR (IC %) COMO INDICADOR DE FLUJO DE SÓLIDOS PARTICULADOS (STANFORTH, 2002).	133
TABLA 4.8. EL ÁNGULO DE REPOSO COMO INDICADOR DE LAS PROPIEDADES DE FLUJO DE LOS SÓLIDOS PARTICULADOS (STANFORTH, 2002).....	133

Capítulo 5: Estudios *in vivo* de eficacia y seguridad

FIGURA 5.1. PROCESO DE INOCULACIÓN DE LOS PARÁSITOS EN LOS RATONES BALB/c POR MEDIO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE SANGRE INFECTADA CON <i>T. CRUZI</i>	154
FIGURA 5.2. PROCESO DE ADMINISTRACIÓN DE LOS F POR VÍA PER-ORAL.....	155
FIGURA 5.3. PROCEDIMIENTO PARA A) ANESTESIAR A LOS RATONES CON VAPORES DE ISOFLUORANO Y B) EXTRAER SANGRE PERIFÉRICA POR PUNCIÓN INTRACARDIACA.....	157
FIGURA 5.4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN REGISTRADOS EN DIVERSOS TEJIDOS CARDÍACOS SEGÚN LA SECUENCIA DE ACTIVACIÓN Y SU CORRELACIÓN CON EL ECG DE SUPERFICIE. SE PRESENTAN, TAMBIÉN, LOS TEJIDOS QUE GENERAN POTENCIALES DE ACCIÓN Ca^{2+} -DEPENDIENTES (NÓDULOS SA Y AV) Y Na^{+} -DEPENDIENTES (AURÍCULAS, VENTRÍCULOS Y SISTEMA HIS-PURKINIE).....	158
FIGURA 5.5. A) ELECTROCARDIOGRAMA UTILIZADO Y SISTEMA DE REGISTRO EMPLEADO PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ECG. B) RATÓN ANESTESIADO, CON LOS ELECTRODOS COLOCADOS PARA REALIZAR EL ECG.....	159
FIGURA 5.6. EFECTOS DE BZ SOLO Y EN COMBINACIÓN CON CMP A DOSIS FIJA SOBRE LA PARASITEMIA DE LOS RATONES BALB/c INFECTADOS.....	161
FIGURA 5.7. EFECTO DE BZ SOLO Y EN COMBINACIÓN CON CMP A DOSIS FIJA EN LOS RATONES BALB/c INFECTADOS. A) PESO RELATIVO DEL BAZO. B) PORCENTAJE RELATIVO DE ENZIMA CKMB RESPECTO DE CK TOTAL EN PLASMA. C) ÍNDICE DE RITIS.....	162
FIGURA 5.8. EFECTOS DE BZ A DOSIS FIJA EN COMBINACIÓN CON CMP A DOSIS VARIABLE EN EL TRATAMIENTO DE RATONES BALB/c INFECTADOS SOBRE LOS NIVELES DE PARASITEMIA.	163
FIGURA 5.9. EFECTOS DE BZ A DOSIS FIJA EN COMBINACIÓN CON CMP A DOSIS VARIABLE SOBRE LOS RATONES BALB/c. A) PESO RELATIVO DEL BAZO. B) PORCENTAJE RELATIVO DE LA ENZIMA CKMB RESPECTO DE CK TOTAL EN PLASMA. C) ÍNDICE DE RITIS.....	165
FIGURA 5.10. EFECTOS DE BZ SOLO O EN COMBINACIÓN CON CMP EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE LA INFECCIÓN CRÓNICA CON <i>T. CRUZI</i> (90 DPI). A) PESO RELATIVO DEL CORAZÓN. B) PORCENTAJE RELATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CKMB RESPECTO DE CK TOTAL EN PLASMA.....	166

FIGURA 5.11. CARACTERÍSTICAS ELECTROCARDIOGRÁFICAS. LOS ECG FUERON EVALUADOS SOBRE LA BASE DE LAS VARIACIONES EN: A) LA FRECUENCIA CARDÍACA MONITOREADA POR LATIDOS/MINUTO, B) INTERVALO PR E C) INTERVALO QT, AMBOS INTERVALOS MEDIDOS EN MILSEGUNDOS (MS).....	168
FIGURA 5.12. EFECTOS DE BZ SOLO Y EN COMBINACIÓN CON CMP EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR <i>T. CRUZI</i> . A) HISTOLOGÍA CARDÍACA DE LOS ANIMALES EN ESTUDIO, LUEGO DE LA TINCIÓN CON H-E. B) ÍNDICE INFLAMATORIO DEL TEJIDO CARDÍACO.....	169
FIGURA 5.13. ADN PARASITARIO DETERMINADO POR PCR EN TIEMPO REAL EN TEJIDO CARDÍACO.....	170
FIGURA 5.14. EFECTOS DE BZ SOLO Y EN COMBINACIÓN CON CMP SOBRE EL PESO DEL HÍGADO EN ANIMALES NO INFECTADOS.....	171
FIGURA 5.15. NIVELES DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GPT EN PLASMA.....	171
FIGURA 5.16. EFECTOS DE LOS SLM DE BZ Y CMP SOBRE LA PARASTEMIA DE LOS RATONES BALB/C INFECTADOS.....	174
FIGURA 5.17. EFECTO DE LOS SLM DE BZ Y CMP EN LAS DOSIS ÓPTIMAS DE COMBINACIÓN Y DOSIS DE REFERENCIA SOBRE LA RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ENZIMAS CARDÍACAS Y HEPÁTICAS. A) RELACIÓN PORCENTUAL ENTRE CK MB Y CK TOTAL. B) ÍNDICE DE RITIS.....	175
TABLA 5. 1. ANORMALIDADES OBSERVADAS, EXPRESADAS COMO PORCENTAJE DE ANIMALES AFECTADOS RESPECTO DE LA CANTIDAD TOTAL DE RATONES DEL GRUPO DE ANIMALES EN ESTUDIO.....	167

Capítulo 6: Formulaciones pediátricas de BZ

FIGURA 6.1. IMÁGENES OBTENIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA (10X) DE LA SUSPENSIÓN DE BZ DESARROLLADA POR REFORMULACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS COMERCIALES, EN AUSENCIA (IMAGEN DE LA IZQUIERDA) Y PRESENCIA DE LUZ POLARIZADA (IMAGEN DE LA DERECHA).....	198
FIGURA 6.2. CURVAS DE FLUJO DE LA SUSPENSIÓN DE BZ, PREPARADAS A PARTIR DE LOS COMPRIMIDOS COMERCIALES, ALMACENADAS DURANTE 90 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE (AMB) Y EN HELADERA (HEL) Y FRESCAS O RECÍEN PREPARADAS (DÍA 0).....	198
FIGURA 6.3. PERFILES DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LAS SUSPENSIÓNES FRESCAS (DÍA 0), Y ALMACENADAS LUEGO DE 90 DÍAS, TANTO A TEMPERATURA AMBIENTE COMO EN HELADERA. SE PRESENTA ADEMÁS EL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LOS COMPRIMIDOS COMERCIALES DE RADANIL [®] INTACTOS Y PULVERIZADOS.....	200
FIGURA 6.4. FOTOGRAFÍA DE LOS HAM CONTENIDOS EN LOS BLÍSTER EN DONDE SON MOLDEADOS.....	207
FIGURA 6.5. IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA CON LUZ POLARIZADA OBTENIDAS PARA BZ PURO Y PARA DOS SECCIONES DIFERENTES DE LOS HAM.....	208
FIGURA 6.6. PARÁMETROS REOLÓGICOS EVALUADOS: MÓDULO ELÁSTICO (G') [PA], VISCOSO (G'') [PA] Y VISCOSIDAD COMPLEJA (T) [PA.S] EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA ANGULAR, A LOS DÍAS 1 Y 15 DÍAS DE LA FORMULACIÓN DE LOS HAM.....	209
FIGURA 6.7. PERFILES DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LOS HAM ENTEROS Y TRITURADOS, EN COMPARACIÓN CON EL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LOS COMPRIMIDOS COMERCIALES DE RADANIL [®]	210
FIGURA 6.8. FOTOGRAFÍAS DE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES OBTENIDOS. DE IZQUIERDA A DERECHA, CADA COLUMNA DE COMPRIMIDOS, CORRESPONDE A UNA DOSIS DE BZ DE 12,5; 25, 50 Y 100 MG, RESPECTIVAMENTE.....	212
FIGURA 6.9. ENSAYO DE DESINTEGRACIÓN DE UN COMPRIMIDO DE 100 MG DE BZ EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE ENSAYO, EXPRESADOS EN SEGUNDO.....	213

FIGURA 6.10. PERFILES DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES CONTENIENDO DOSIS DE BZ DE 12,5; 25; 50 Y 100 MG, EN COMPARACIÓN CON EL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE BZ DESDE LOS COMPRIMIDOS COMERCIALES DE RADANIL®	214
TABLA 6.1. COMPOSICIÓN CUALI-CUANTITATIVA DE LA FÓRMULA DE LA SUSPENSIÓN DE BZ	196
TABLA 6.2. PARÁMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS ANALIZADOS PARA LA SUSPENSIÓN DE BZ, HASTA LOS 90 DÍAS DE ALMACENAMIENTO, EN LAS DOS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EVALUADAS.....	197
TABLA 6.3. COMPOSICIÓN DE LAS SIETE FORMULACIONES PREPARADAS (F1-F7), EN LOS ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN, BAJO LA FORMA DE HIDROGELES AZUCARADOS MASTICABLES (HAM), EN DOSIS DE 50 MG DE BZ PARA USO PEDIÁTRICO*. LAS CANTIDADES DE CADA COMPONENTE SE EXPRESAN EN % RESPECTO DEL TOTAL DE EXCIPIENTES UTILIZADOS.	206
TABLA 6.4. COMPOSICIÓN DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA BAJO LA FORMA DE HIDROGELES AZUCARADOS MASTICABLES (HAM), EN DOSIS DE 50 MG DE BZ PARA USO PEDIÁTRICO*. LAS CANTIDADES DE CADA COMPONENTE SE EXPRESAN EN % RESPECTO DEL TOTAL DE EXCIPIENTES UTILIZADOS.....	207
TABLA 6.5. PARÁMETROS DE CALIDAD FARMACOTÉCNICA Y BIOFARMACÉUTICA IN VITRO DE LOS HAM.....	208
TABLA 6.6. PARÁMETROS REOLÓGICOS DE LOS HAM PREPARADOS EXPRESADOS COMO LA PENDIENTE DE LA GRÁFICA DE $\ln G'$ Y $\ln G''$ VS \ln FRECUENCIA ANGULAR Y EL VALOR DE LA $\tan \delta$	209
TABLA 6.7. COMPOSICIÓN DE LAS SEIS FORMULACIONES PREPARADAS (F1-F6), EN LOS ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN, BAJO LA FORMA DE COMPRIMIDOS MASTICABLES EN DOSIS DE 50 MG DE BZ PARA USO PEDIÁTRICO. LAS CANTIDADES DE CADA COMPONENTE SE EXPRESAN EL % RESPECTO DE TOTAL DE EXCIPIENTES UTILIZADOS.....	211
TABLA 6.8. COMPOSICIÓN DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA BAJO LA FORMA DE COMPRIMIDOS MASTICABLES EN DOSIS DE 50 MG DE BZ PARA USO PEDIÁTRICO. LAS CANTIDADES DE CADA COMPONENTE SE EXPRESAN EL % RESPECTO DE TOTAL DE EXCIPIENTES UTILIZADOS.	211
TABLA 6.9. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARACTERIZACIÓN FARMACOTÉCNICA Y BIOFARMACÉUTICA DE LOS COMPRIMIDOS MASTICABLES, CONTENIENDO BZ EN DIFERENTES DOSIS. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO DE LAS MEDICIONES Y SU CORRESPONDIENTE DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	212

Capítulo 7: Validación de una metodología de HPLC para cuantificar BZ en plasma humano

FIGURA 7.1. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS PARA EL PLASMA HUMANO A) LIBRE DE BZ Y B) EN PRESENCIA DE BZ Y SI.235	
FIGURA 7.2. CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD FRENTE A OTRO ANTIMICROBIANO: BZ (TIEMPO DE RETENCIÓN 6,3-7,0 MIN), METRÓNIDAZOL (TIEMPO DE RETENCIÓN 3,5 - 4,0 MIN) Y SI (TIEMPO DE RETENCIÓN 11,0 - 12,0 MIN).....	237
TABLA 7.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PRECISIÓN Y EXACTITUD EN MUESTRAS DE BZ EN PLASMA HUMANO, INTRA-DÍA (N=5) E INTER-DÍA (N=15).....	236
TABLA 7.2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD, EXPRESADO COMO % DE BZ CUANTIFICADO (5%) LUEGO DE 24 H DE PREPARADAS LAS MUESTRAS O LUEGO DE SOMETERLAS A TRES CICLOS DE CONGELADO-DESCONGELADO, RESPECTO DE MUESTRAS FRESCAS.	236

Listado de abreviaturas y acrónimos

- ▶ ADN: ácido desoxirribonucleico
- ▶ BD_o : biodisponibilidad oral
- ▶ BZ: benznidazol
- ▶ BZ-CMP-FCI: BZ 25 mg/kg/día + CMP 7,5 mg/kg/día, en fase crónica de la infección
- ▶ BZ-CMP-H: BZ 25 mg/kg/día + CMP 7,5 mg/kg/día, en estudio de hepatotoxicidad
- ▶ BZ-FCI: BZ 100 mg/kg/día, en fase crónica de la infección
- ▶ BZ-H: BZ 100 mg/kg/día, en estudio de hepatotoxicidad
- ▶ c.s.: cantidad suficiente
- ▶ c.s.p.: cantidad suficiente para
- ▶ CH: cociente de Hausner
- ▶ CIPE: complejos interpolielectrolitos
- ▶ CLogP: coeficiente de partición calculado teóricamente
- ▶ CK total: enzima creatinfosfoquinasa sérica total
- ▶ CKMB: enzima creatinfosfoquinasa isoforma MB (isoenzima específica de miocardio)
- ▶ CMP: clomipramina
- ▶ δ_{bulk} : densidad a granel o *bulk*
- ▶ δ_{tap} : densidad empaquetada o *tap*
- ▶ DMEM: medio Dulbecco's modified Eagle's
- ▶ DMSO: dimetilsulfóxido
- ▶ dpi: días post-infección
- ▶ DSC: calorimetría diferencial de barrido
- ▶ ECG: electrocardiogramas
- ▶ EuE: Eudragit® EPO
- ▶ EuFS: Eudragit® FS 30 D
- ▶ EuL: Eudragit® L100
- ▶ EuLD: Eudragit® L10055

- ▶ EuS: Eudragit[®] S100
- ▶ F: fármacos
- ▶ f_2 : factor de similitud
- ▶ FCI: fase crónica de la infección chagásica
- ▶ FITC: fluoresceína-5-isotiocianato
- ▶ FT-IR: espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
- ▶ G' : módulo elástico
- ▶ G'' : módulo viscoso
- ▶ GAPDH: gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenasa
- ▶ GOT: enzima glutamato-oxalacetato transaminasa
- ▶ GPT: encima glutamato piruvato transaminasa
- ▶ GRAS: *generally recognized as safe* (generalmente reconocido como seguro)
- ▶ HAM: hidrogeles azucarados masticables
- ▶ H-E: hematoxilina-eosina
- ▶ HPLC: cromatografía líquida de alta presión
- ▶ IC %: índice de Carr
- ▶ IC: índice de combinación
- ▶ I+D: investigación y desarrollo
- ▶ INT: infectados y no tratados, en fase aguda de la infección con *T. cruzi*
- ▶ INT-FCI: infectados y no tratados, en fase crónica de la infección con *T. cruzi*
- ▶ LADME: Liberación-Absorción-Distribución-Metabolismo-Excreción
- ▶ M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos
- ▶ MF: mezcla física
- ▶ η : viscosidad compleja
- ▶ η' : viscosidad dinámica
- ▶ NFX: nifurtimox
- ▶ NI: animales no infectados
- ▶ OMS: Organización Mundial de la Salud
- ▶ PBS: solución buffer fosfato
- ▶ PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- ▶ PE: polielectrolitos
- ▶ PE-F: complejo polielectrolito- fármaco

- ▶ PEG: polietilenglicol
- ▶ pKa: constante de disociación ácida
- ▶ PM: peso molar
- ▶ PVP: polivinilpirrolidona
- ▶ RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
- ▶ S_{ac} : solubilidad acuosa
- ▶ SI: estándar interno
- ▶ SLM: Sistemas de Liberación Modificada
- ▶ *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*
- ▶ Tg: transición vítrea
- ▶ TGA: análisis termogravimétrico
- ▶ TGI: tracto gastrointestinal
- ▶ TP: tripanotona peroxidasa
- ▶ TR: tripanotona reductasa
- ▶ UFC: unidades formadores de colonias
- ▶ USP: United State Pharmacopocia
- ▶ UV: ultravioleta
- ▶ V_s : volumen de sedimentación



CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS



Capítulo 1:

Introducción general y objetivos

1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como *Trypanosomiasis Americana*, es una enfermedad infecciosa que fue descrita en 1909 por el Dr. Carlos Chagas, al detectar parásitos flagelados en sangre periférica de una niña infectada. Esta infección es causada por el parásito protozoario flagelado intracelular obligado *Trypanosoma cruzi* y representa un grave problema para la salud pública en América Latina. Se estima que hay más de 8 millones de personas infectadas mundialmente, con más de 300.000 casos nuevos cada año (Campi-Azevedo et al., 2015; Moncayo & Silveira, 2009; Schofield, Jannin, & Salvatella, 2006; World Health Organization, 2015a).

En las últimas estimaciones, la Organización Panamericana de la Salud indica que en Argentina habría 7.300.000 personas expuestas, 1.600.000 infectadas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico. Esta enfermedad constituye un problema sanitario prioritario en nuestro país, que se ve agravado por la falta de una vacuna, de tratamientos seguros y eficaces y por la presencia persistente del vector en ésta área endémica (Pan American Health Organization, 2015). Adicionalmente, esta enfermedad tropical se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial, debido a las migraciones de personas infectadas hacia áreas no endémicas (Cencig, Coltel, Truyens, & Carlier, 2012; Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010).

La enfermedad de Chagas afecta, principalmente, a las regiones más desfavorecidas socioeconómicamente. A su vez, recibe poca atención y se ve postergada en lo que respecta a las prioridades de la salud pública, sumado a la inexistencia de estadísticas fiables, lo que dificulta su control y prevención. Esta situación, ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a catalogarla como una “enfermedad desatendida u olvidada”, con el principal objetivo de estimular la I+D por parte del sector privado o público mundial en esta área de vacancia relevante en la región (World Health Organization, 2015b).



1.1.1. Agente etiológico

El agente etiológico causal de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo flagelado perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*. Esta familia pertenece al súper-reino *Eukaryota*, *Phylum Euglenozoa*, orden *Kinetoplastida*. Todos los miembros de este orden están caracterizados por la presencia de un orgánulo que los define, llamado *kinetoplasto* (Figura 1.1) (McGhee & Cosgrove, 1980).

La variabilidad genética de la población de *T. cruzi* ha sido demostrada utilizando patrones electroforéticos enzimáticos (zimogramas) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) del *kinetoplasto* (Manoel-Caetano & Silva, 2007).

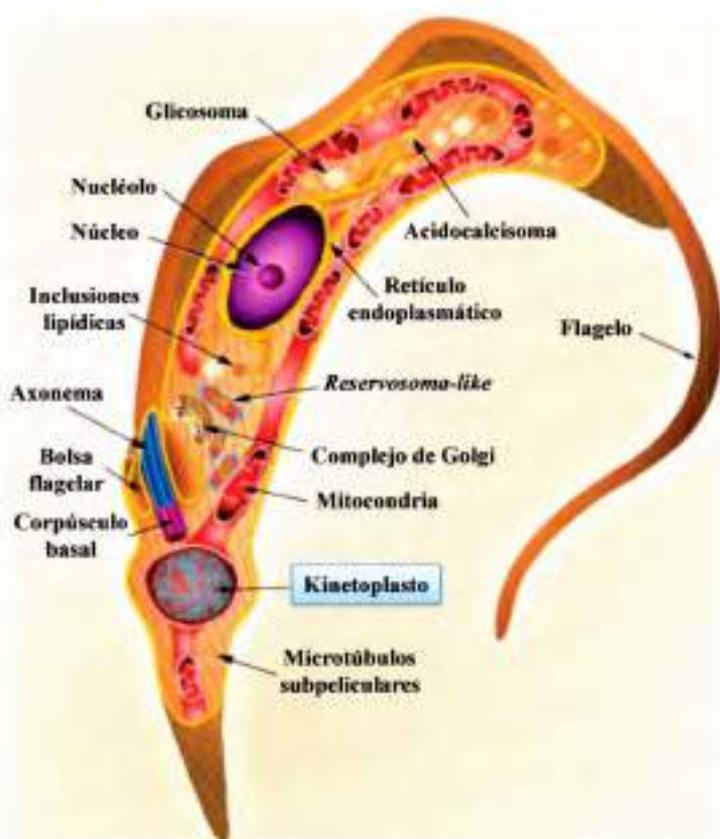


Figura 1.1. Esquema tridimensional de la morfología de un trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* y su estructura interna. Adaptado de (Teixeira, Benchimol, Crepaldi, & de Souza, 2011).

En la actualidad, se reconoce que la especie *T. cruzi* está compuesta por diferentes subpoblaciones, que exhiben un alto grado de polimorfismo cuando son analizadas por diferentes métodos moleculares y bioquímicos. Éstas presentan distintas características biológicas, inmunológicas, bioquímicas y farmacológicas. Recientemente, todas estas subpoblaciones han sido agrupadas en seis grandes grupos o linajes, denominados *T. cruzi* I-VI. Además, esta heterogeneidad genética determina un marcado tropismo tisular y la variabilidad genética del parásito en un mismo



individuo marca una distribución diferencial de las distintas subpoblaciones en los diferentes órganos del huésped, lo que, en consecuencia, podría influir o determinar la evolución clínica de la enfermedad. En este sentido, algunas cepas prefieren parasitar células musculares, ya sea de músculo esquelético o cardíaco, por lo que se las considera miotrópicas; otras prefieren las células mononucleares fagocíticas, por lo que son consideradas retolotrópicas, y un tercer grupo, prefiere otros tejidos, dentro de los cuales se incluye el tejido nervioso, los tejidos del sistema reproductor, bazo, hígado y tejido adiposo (Andrade, 1999). Cabe destacar que distintas cepas de *T. cruzi* pueden presentar variaciones en cuanto a la sensibilidad frente a la acción de los fármacos (F)¹. En esta línea, se ha demostrado que, en la infección experimental, el efecto tripanocida de los F depende de la cepa empleada (Clark & Pung, 1994; Macedo & Pena, 1998).

Si bien existe un alto grado de polimorfismo, se reconocen dos grandes grupos filogenéticos. Estos grupos, en 1999, fueron designados como *T. cruzi* I (TcI) y II (TcII) por un Comité de Expertos, basados en evidencias bioquímicas y genéticas ("International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease," 1999). *T. cruzi* I, está asociado con el ciclo selvático de transmisión y la infección de marsupiales (Clark & Pung, 1994). *T. cruzi* II, consiste en cinco subgrupos relacionados llamados: IIa, IIb, IIc, IId y IIe (Brisse, Barnabe, & Tibayrenc, 2000); y que están asociados con el ciclo doméstico de transmisión y la infección de mamíferos placentarios. Esta clasificación ha sido recientemente modificada renombrando los grupos como "Unidades Discretas de Tipificación" (DTUs) I-VI por consenso internacional (Zingales et al., 2009).

1.1.2. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*

Los protozoarios de la familia *Trypanosomatidae* presentan, durante su ciclo de vida, diversas formas que pueden ser fácilmente identificadas, tal como se detalla sintéticamente a continuación:

- *Amastigotes*: de forma esférica u ovalada, son capaces de dividirse y multiplicarse en el interior de las células de vertebrados (Ley, Robbins, Nussenzweig, & Andrews, 1990).

¹Fármaco, principio activo, agente terapéutico o droga farmacéutica refieren a toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana (Farmacopea Argentina, 2014).



- *Epimastigotes*: miden entre 20 y 40 μm de largo, con *kinetoplasto* localizado en la zona anterior al núcleo. Estas formas son capaces de dividirse y se detectan en el intestino del huésped invertebrado.
- *Trypomastigotes*: son fusiformes, con 25 μm de largo y 2 μm de diámetro. Cuentan con una membrana ondulante que recorre el parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por el extremo anterior. El *kinetoplasto* se localiza en la región inmediatamente posterior al núcleo. Pueden ser observados en la sangre del huésped vertebrado y en el intestino posterior, heces y orina del insecto vector. Estas formas no son capaces de dividirse, sin embargo son consideradas la forma infectante (Tyler & Engman, 2001).

En la Figura 1.2 se esquematiza el ciclo biológico del parásito. En el caso de la transmisión vectorial, la contaminación con el insecto vector (vinchuca) (1), que es un insecto hematófago, ocurre cuando éste pica a un mamífero infectado e ingiere *trypomastigotes* sanguíneos (2) que son conducidos a la porción anterior del estómago. En este nuevo ambiente, los *trypomastigotes* se diferencian a *epimastigotes* y algunas formas de *esferomastigotes* (3). Sin embargo, en el estómago, estas formas de transmisión son digeridas. Las formas de *epimastigotes* sobrevivientes, cuando alcanzan el intestino, se comienzan a multiplicar sucesivamente por división binaria (5) y se adhieren a las membranas perimicrovirales que son secretadas por células intestinales. Esta adhesión ocurre predominantemente en la región del flagelo. Posteriormente, los *epimastigotes* se sueltan y se mueven para el intestino posterior, donde inician un proceso de diferenciación a *trypomastigotes* metacíclicos (5) que se adhieren a la cutícula que reviste el epitelio del recto o del saco rectal del insecto. Al soltarse del epitelio, pueden ser eliminados por orina o heces. La contaminación de un huésped vertebrado ocurre cuando el insecto infectado pica a un mamífero. En este proceso, el insecto generalmente defeca y orina (6), y de este modo, deposita, sobre la piel o mucosa del mamífero, los *trypomastigotes* metacíclicos, que son la forma infectiva (7), pero no replicativa. Esta invasión del parásito ocurre cuando el huésped se rasca y se genera lesiones en la piel, por donde el parásito puede ingresar al organismo. Los *trypomastigotes* metacíclicos acceden a la circulación sanguínea, se adhieren e invaden células nucleadas como, por ejemplo, macrófagos (8), células musculares y epiteliales. Inicialmente, la forma de *trypomastigotes* es fagocitada por los macrófagos, seguida de la formación de la vacuola parasitófora (9). En su interior, la forma *trypomastigote* se diferencia a la forma *amastigote* y se lisa la membrana de la vacuola (10). En el citoplasma, esta forma se multiplica por fisiones binarias y



puede tomar todo el citoplasma (11). Después de las sucesivas divisiones, los amastigotes inician una diferenciación, pasan por una forma de transición (12) y se diferencian a la forma de trypomastigote, antes de que la célula del huésped se lise por el exceso de parásitos (13). El lisado de la célula huésped puede ocurrir antes de la diferenciación total de amastigotes a trypomastigotes, lo que genera la aparición de diferentes formas en el medio externo (14). En el medio extracelular, los trypomastigotes (15a) y amastigotes (15b) pueden infectar nuevas células del huésped.



Figura 1.2. Ciclo biológico del parásito *T. cruzi*. Extraído de (Teixeira, Benchimol, Crepaldi, & de Souza, 2011).

1.1.3. Etapas de la enfermedad de Chagas

La etapa aguda de la infección tiene una duración de 4 a 8 semanas y, frecuentemente, se presenta como una fase que evoluciona a una resolución clínica espontánea, siendo en muy pocos casos letal (< 5 – 10 % de los casos sintomáticos) (Rassi, Rassi, & de Rezende, 2012). Se caracteriza por altos niveles de parásitos en sangre y, si bien usualmente es asintomática, puede manifestarse con síntomas no específicos, como fiebre, mialgias, adenopatías, miocarditis, esplenomegalia. Si la transmisión es vectorial, se evidencia una inflamación característica en el sitio de



ingreso del *T. cruzi*, que en la conjuntiva del ojo se presenta como el signo de Romaña y, en la piel, se denomina chagoma de inoculación (Kirchhoff, Weiss, Wittner, & Tanowitz, 2004; Miles, Feliciangeli, & de Arias, 2003).

Conforme avanza la etapa aguda, sin un tratamiento adecuado, se desencadena una efectiva respuesta inmune contra el *T. cruzi*. Esto es evidenciado por la disminución de la carga parasitaria, en sangre y tejidos, como así también, por la desaparición de la miocarditis. Sin embargo, el parásito no se erradica y persiste por años en músculo cardíaco y esquelético. Así, la mayoría de los individuos infectados pasan a una etapa crónica asintomática, caracterizada por la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* y ausencia de sintomatología cardíaca (Rassi et al., 2010).

Luego, la infección puede evolucionar hacia la fase crónica y puede durar toda la vida. Muchos años o incluso décadas después de la infección inicial, aproximadamente el 30 o 40 % de los individuos infectados desarrollan la fase crónica inflamatoria, la cual afecta principalmente al tejido cardíaco (Coura & Borges-Pereira, 2012; Lo Presti et al., 2015; Rassi et al., 2010). La miocarditis chagásica es la forma más común de cardiomiopatía no isquémica en el mundo y la manifestación más expresiva de la enfermedad de Chagas, debido a su frecuencia y severidad (Coura & Borges-Pereira, 2012). Se caracteriza por una intensa inflamación, mionecrosis, miocitolisis, vasculitis y numerosos pseudoquistes de parásitos. En esta fase, los individuos permanecen asintomáticos por décadas, durante las cuales exhiben relativamente pocas lesiones en corazón y otros tejidos, sin signos de malfuncionamiento cardíaco. Es evidente, entonces, que la regeneración de los tejidos blancos y su supervivencia serían críticas para el estado de salud de los individuos chagásicos, ya que menos del 30 % de las personas infectadas progresan a la cardiopatía (Rassi et al., 2010).

La etiología de las lesiones patológicas de la enfermedad de Chagas es controvertida (Bonney & Engman, 2008; Gironès & Fresno, 2003; Marin-Neto, Cunha-Neto, Maciel, & Simões, 2007). Una importante cantidad de evidencia sustenta la hipótesis de que el *T. cruzi* y sus antígenos persisten en los órganos blancos y serían así, un estímulo constante de la respuesta inflamatoria crónica que resulta en el daño tisular (García et al., 2005; Gutierrez, Guedes, Gazzinelli, & Silva, 2009; Tarleton, 2001). Por otro lado, algunas hipótesis proponen y, a partir de estas, se ha evidenciado la reactividad cruzada entre componentes del parásito y del huésped, lo que produce una respuesta inmune contra auto-antígenos que podría ser responsable del daño tisular (Cunha-Neto et al., 2006; Giordanengo, Fretes, et al.,



2000; Giordanengo, Maldonado, et al., 2000; Kierszenbaum, 2005; Sterin-Borda, Giordanengo, Joensen, & Gea, 2003). Ambas posturas avalan la hipótesis de que los mecanismos que posibilitan la persistencia del parásito y la sobrevida de los cardiomiocitos durante la enfermedad de Chagas son determinantes del destino final de la infección, así como también de la severidad de la enfermedad.

En línea con la evidencia de la persistencia de la infección, ha sido demostrada la reactivación de la infección en pacientes inmunocomprometidos por síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o por tratamiento con sustancias inmunosupresoras (Sartori et al., 2007). Asimismo, antígenos de *T. cruzi*, como la cruzipaina, son reconocidos en la mayoría de los sueros de pacientes inmunocompetentes crónicos chagásicos y han sido detectados como depósitos en muestras de miocarditis chagásica crónica humana, lo que sugiere su potencial papel en la patogénesis. (Martinez, Campetella, Frasc, & Cazzulo, 1991; Morrot et al., 1997; Murta et al., 1990; Scharfstein et al., 1986). Aunque se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la persistencia del parásito, la descripción completa del conjunto de eventos que participan en el proceso de evasión de la respuesta inmune aún no ha sido totalmente dilucidada.

1.1.4. Control, prevención y diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Las estrategias de los programas para la eliminación de la enfermedad de Chagas están basadas en el control vectorial, control de bolsas de sangre de donantes de países endémicos (cribado de la sangre donada), control de transmisión congénita y el tratamiento de niños infectados de casos agudos y crónicos (Guhl & Lazdins-Held, 2007). La inversión en estas campañas de control y prevención de la infección ha reducido sustancialmente nuevos casos de infección y ha disminuido la carga de la enfermedad en Latinoamérica.

En este sentido, los objetivos del control y la prevención de la enfermedad se centran en la eliminación de la transmisión y en lograr que la población infectada y enferma pueda acceder a la asistencia sanitaria correspondiente.

En particular, el control del vector es uno de los focos más fuertes sobre los cuales se trabaja en nuestro país, a través del Programa Nacional de Control de Vectores, promocionado por el Ministerio de Salud de la Nación. Como puede observarse en la Figura 1.3, la únicas provincias en las que se ha logrado el control vectorial son Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego; no obstante, en éstas se encuentra presente el riesgo de transmisión congénita. En el caso de Formosa, Chaco,

Santiago del Estero, Catamarca, San Juan y Mendoza, estas provincias se encuentran en una situación de alto riesgo de transmisión vectorial, debido al aumento de la infección domiciliar y la alta seroprevalencia en los grupos vulnerables (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2015).

El diagnóstico durante la fase aguda, se basa en la detección de trypomastigotes en la sangre del paciente, por microscopía o del análisis del material genético (ADN) del *T. cruzi*, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para posibles casos de infección congénita. Sin embargo, a pesar de la elevada parasitemia, los síntomas clínicos no específicos, no siempre inducen a los pacientes infectados agudos a asistir al hospital. Por lo que, el diagnóstico, usualmente no se produce en la etapa aguda, lo que favorece, en consecuencia, la evolución de la enfermedad en los pacientes, con el alto costo asociado en materia de salud que esto implica.



Figura 1.3. Mapa de riesgo de Argentina desagregado que muestra el riesgo de transmisión vectorial y congénita.

1.1.5. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Para el tratamiento farmacoterapéutico de esta enfermedad, sólo se dispone de dos F de reconocida utilidad: nifurtimox (NFX) y benznidazol (BZ), ambos desarrollados hace más de 50 años. NFX ha sido producido por Bayer (Lampit[®]) desde 1965. BZ fue fabricado y distribuido por Roche (Rochagan[®]) en Brasil y (Radanil[®]) en Argentina hasta 2012 y, actualmente, los laboratorios Maprimed y ELEA (Abarax[®]) fabrican el medicamento² en Argentina (García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015; Maya et al., 2010). Ambos F, tienen una actividad antichagásica significativa en la

²Medicamento refiere a toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra (Farmacopea Argentina, 2014).



fase aguda, con 60–80 % de cura parasitológica en los pacientes tratados (Urbina & Docampo, 2003; Von, Zaragoza, Jones, Rodríguez-Morales, & Franco-Paredes, 2007). Sin embargo, a pesar de su larga historia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, BZ y NFX inducen frecuentes efectos adversos, especialmente en adultos (Pinazo et al., 2010; Urbina & Docampo, 2003).

Los principales efectos adversos de BZ son la intolerancia hepática o hepatotoxicidad, generalmente concomitante con reacciones de hipersensibilidad, al principio del tratamiento, o toxicidad medular y neuropatías periféricas, al final del tratamiento (Castro & Díaz de Toranzo, 1988; Davies et al., 2014; Maya et al., 2007; Rojo et al., 2014). NFX presenta, como efectos adversos: frecuentes reacciones de hipersensibilidad, anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad, insomnio y manifestaciones digestivas. A pesar que la información disponible sobre la toxicidad de ambos F es controvertida; en general, BZ es mejor tolerado que NFX (Rassi et al., 2010; Rojo et al., 2014). Debido a esto y sumado a que BZ presenta una notable actividad anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, constituye el F de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Coura & de Castro, 2002; Urbina, 2010; Von et al., 2007). Sin embargo, la quimioterapia con agentes tripanocidas sigue siendo aun altamente insatisfactoria, debido a las importantes limitaciones en los tratamientos y los múltiples efectos adversos asociados a la farmacoterapia que, con frecuencia, inducen al abandono por parte de los pacientes y resultan en el incumplimiento del tratamiento a largo plazo (Coura & Borges-Pereira, 2012; Lo Presti et al., 2015). A lo cual se suma, que en el tratamiento con BZ, se sugieren dos tomas diarias de la dosis recomendada, durante al menos 60 días (World Health Organization, 1991). Éste es un esquema posológico que, frecuentemente, no se cumple adecuadamente por parte de los pacientes. Además, durante el tratamiento, se suelen generar fluctuaciones en la concentración plasmática de BZ, lo que se pone de manifiesto por un aumento de la prevalencia de los efectos adversos asociados a la terapia.

Por otra parte, en las últimas dos décadas, se han propuesto nuevos enfoques para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas y se encuentran bajo estudio nuevos blancos moleculares anti-*T. cruzi*, basados principalmente en vías metabólicas exclusivas del parásito. Entre éstos se destacan los derivados de triazol como inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol, inhibidores de la enzima escualeno sintasa, inhibidores de cisteinproteasa, inhibidores de la farnesildifosfato sintetasa, entre otros (Urbina, 2015). En particular, la tripanotona reductasa, es una



enzima exclusiva del orden *Kinetoplastide*, que confiere gran utilidad, como blanco molecular contra el *T. cruzi*.

En este sentido, cabe destacar que clomipramina (CMP), es un F clínicamente utilizado por sus efectos a nivel del sistema nervioso central (U.S. National Library of Medicine, 2015); sin embargo, tiene la capacidad de inhibir la enzima tripanotona reductasa y, en consecuencia, resulta de interés para ser estudiado por sus propiedades tripanocidas (Olin-Sandoval, Moreno-Sanchez, & Saavedra, 2010; Ravaschino, Docampo, & Rodriguez, 2006).

Por su parte, si bien la transmisión de la enfermedad de Chagas ocurre principalmente por vía vectorial, las infecciones congénitas o mediante transfusiones sanguíneas se han incrementado en los últimos años (Carlier & Torrico, 2003; Muñoz, Portús, Corachan, Fumadó, & Gascon, 2007). En Argentina se ha detectado un marcado incremento en la prevalencia de la infección congénita, lo que afecta a los recién nacidos de madres infectadas y se estima que cada año nacen más de 1000 neonatos infectados (Negrette, Mora, & Basombrio, 2005).

Adicionalmente, los esfuerzos invertidos en el tratamiento de esta enfermedad aún no satisfacen las limitaciones asociadas a la falta de especialidades medicinales para el tratamiento específico de pacientes pediátricos y neonatales, lo cual conlleva a fallas en el tratamiento de este grupo etario, con la consecuente progresión de la enfermedad. Esto es debido a que sólo se dispone de comprimidos de 50 y 100 mg de BZ, y estas formas farmacéuticas disponibles, son actualmente fraccionadas para ser utilizadas en los recién nacidos y niños. Esta situación puede resultar en consecuencias indeseadas, tales como dosis inapropiadas y aumento de los riesgos de desarrollar efectos adversos (García et al., 2015). En este sentido, cabe destacar que la eficacia terapéutica de BZ es alta y que los efectos adversos en los niños se presentan con menor frecuencia y severidad, comparados con los adultos (Pinazo et al., 2010; Urbina & Docampo, 2003), pero la limitante con relación al tratamiento de la población infantil, se debe a la falta de disponibilidad de medicamentos adecuados, en dosis y formas farmacéuticas, para la farmacoterapia pediátrica (García et al., 2015).

1.2. Diseño de medicamentos

Todo medicamento es administrado con el propósito de curar, aliviar, prevenir o diagnosticar enfermedades en seres vivos, ya sean humanos o animales. Existen diferentes criterios que permiten evaluar las propiedades que reflejan la calidad de un

medicamento, tales como identidad, pureza y potencia, como así también, el comportamiento farmacoterapéutico que éste exhibe, en términos de eficacia, seguridad y confiabilidad (Joseph & Gwen, 2002). En esta línea, la racionalización en el diseño de medicamentos se sustenta en metas predeterminadas, para conferirles óptima eficacia, máxima seguridad y confiabilidad en la acción medicamentosa (Figura 1.4).



Figura 1.4. Principales atributos considerados durante el diseño racional de medicamentos.

Son numerosas las propiedades fisicoquímicas y biológicas de un F que inciden directamente en el diseño de un medicamento, en su forma farmacéutica³ y en la vía de administración. Dentro las propiedades fisicoquímicas, se pueden mencionar: solubilidad acuosa, estabilidad, constante de disociación ácida (pKa), coeficiente de reparto y permeabilidad efectiva. Por su parte, en lo que respecta a las propiedades biológicas, se deben tener en cuenta: absorción, distribución, metabolismo, tiempo de semivida de eliminación y el margen de seguridad, entre otros (Chiao & Robinson, 1998). Adicionalmente, deben considerarse los factores propios de la vía por la cual el medicamento será administrado. Por ejemplo, si un medicamento es administrado por vía per-oral, se evaluará su performance en los diferentes escenarios fisiológicos del tracto gastrointestinal (TGI), debido a que el tiempo de residencia de una formulación está influenciado por el tiempo de vaciado gástrico y el tránsito intestinal (Food and Drug Administration, 2011).

Luego de la administración de un medicamento a un ser vivo, se desencadena la acción medicamentosa, que corresponde a una serie de eventos que involucra diferentes procesos cinéticos: liberación (L), absorción (A), distribución (D), metabolismo (M) y excreción (E). En esta secuencia, generalmente conocida como

³La forma farmacéutica es el producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos farmacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica (Farmacopea Argentina, 2014).



LADME, se pueden distinguir tres fases características, que gobiernan la actividad biológica de un determinado F (Galbis Pérez, 2000; Velasco Martín, 2001), a saber:

- *Fase farmacéutica o biofarmacéutica*: comprende los eventos que ocurren previos a la absorción de un F (eventos pre-absortivos), es decir, a la disponibilidad de éste en el/los sitio/s donde se produce la absorción. Esta oferta se origina a partir de la fase de liberación (L) del F desde la forma farmacéutica que lo contiene y transporta.
- *Fase farmacocinética*: involucra la evolución del F en el organismo en función del tiempo, tras la administración de una dosis determinada. Esta trayectoria se resume mediante la sigla ADME, correspondiente a las iniciales de cada uno de los procesos que tienen lugar. La secuencia ADME involucra, desde un punto de vista dinámico y cuantitativo, los fenómenos de absorción del F y su acceso al torrente sanguíneo, su distribución en los diversos tejidos y órganos y, simultáneamente, su eliminación del organismo, por metabolismo (principalmente hepático) o por excreción a nivel renal (Berrozpe, Lanao, Delfina, & Campmany, 1997).
- *Fase farmacodinámica*: refiere a la interacción molecular que produce el F en un sitio específico del organismo, denominado biofase o sitio de acción (Berrozpe et al., 1997). La magnitud y duración de la acción medicamentosa dependen de la cantidad de F que accede al sitio diana, como así también, de la afinidad y del tiempo de contacto del F con el receptor biológico sobre el cual se une en el sitio de acción.

Todas las formas farmacéuticas convencionales⁴, excepto las soluciones, presentan la fase de liberación del F, lo cual resulta de relevancia en el ámbito farmacéutico, debido a que esta fase, mediante procedimientos farmacotécnicos, puede ser manipulada y, en consecuencia, es posible modular la liberación del F, con el objetivo de optimizar su desempeño farmacoterapéutico.

1.2.1. Propiedades desfavorables de los F

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los F resulta esencial en el diseño y desarrollo de las distintas formas farmacéuticas. En este sentido, cuando se

⁴Las formas farmacéuticas convencionales son aquellas que muestran una liberación de principio activo o fármaco que no es deliberadamente modificada por un método especial de diseño o fabricación. En el caso de las formas farmacéuticas sólidas, el perfil de disolución de un principio activo depende esencialmente de sus propiedades intrínsecas. Un término equivalente es formas farmacéuticas de liberación inmediata (Farmacopea Argentina, 2014).



inicia el desarrollo de un nuevo medicamento, durante la etapa de preformulación, se ponen de manifiesto diversos problemas relacionados con las propiedades del F (Figura 1.5), a saber:

- baja solubilidad del F en los fluidos biológicos, lo que impide una adecuada velocidad de disolución;
- inadecuado coeficiente de reparto, lo que limita el pasaje del F a través de las membranas biológicas;
- insuficiente permeabilidad, lo que dificulta su absorción gastrointestinal o su distribución en órganos y tejidos;
- inestabilidad química del F en los fluidos biológicos, antes de alcanzar el sitio de acción, lo que limita su utilidad clínica;
- degradación metabólica por sistemas enzimáticos, antes de alcanzar la circulación sistémica. Ésta puede tener lugar en la luz intestinal, en la superficie de la mucosa, en el plasma o en el hígado, lo que puede comprometer la eficacia clínica;
- características organolépticas desfavorables, tales como mal sabor o sabor desagradable, que pueden conducir al rechazo e incumplimiento de la terapia, por parte del paciente, con el consecuente fracaso terapéutico;
- margen terapéutico estrecho, lo que requiere de un estricto seguimiento y monitoreo de los niveles de F en los fluidos biológicos, durante el tratamiento y;
- alta incidencia de eventos adversos, cuya frecuencia y magnitud pueden incrementarse cuando su uso es inadecuado (por ejemplo, dosis incorrectas, interacciones medicamentosas, entre otros).

Estos problemas, relacionados con las propiedades desfavorables de los F, deben ser cuidadosamente estudiados durante la etapa de preformulación del medicamento, ya que, de otro modo, pueden comprometer la eficacia o seguridad del tratamiento.

Tradicionalmente, las líneas estratégicas utilizadas para el mejoramiento de los tratamientos farmacoterapéuticos se han basado, principalmente, en la obtención de nuevos F más potentes, selectivos y específicos, mediante procesos de síntesis y semisíntesis. Sin embargo, el desarrollo de nuevos F, se ha convertido en un proceso complejo, difícil y costoso, por lo que las investigaciones se encuentran centradas,



fundamentalmente, en la modificación estructural de los principios activos existentes, con la intención de aumentar su potencia y su selectividad, y reducir sus efectos adversos (Huttunen, Raunio, & Rautio, 2011). Además, de la totalidad de las nuevas moléculas bioactivas desarrolladas, una muy baja proporción logran convertirse en F que superan las etapas preclínicas o clínicas para ser autorizados, por la autoridad sanitaria, para su utilización en medicina humana (Food and Drug Administration, 2005). En consecuencia, el desarrollo de nuevas moléculas o nuevos agentes terapéuticos es un proceso que conlleva mucho tiempo, implica grandes costos y debe afrontar las dificultades inherentes al registro de nuevas moléculas o entidades químicas (Smith, 1993).

En este contexto, si bien la obtención de nuevos F resulta una estrategia de utilidad para mejorar las terapias, no siempre es la línea de elección. Por el contrario, en la actualidad, el desarrollo de la farmacotecnia, sustentada tanto en tecnología farmacéutica, como en las disciplinas farmacocinéticas/biofarmacéuticas, ha contribuido al aprovechamiento de los F existentes, de reconocida utilidad terapéutica, que mediante el diseño de derivados reversibles, sistemas de liberación u otros sistemas farmacoterapéuticos, permiten optimizar sus propiedades desfavorables (Banker, Siepmann, & Rhodes, 2002).



Figura 1.5. Potenciales problemas presentados por los F que limitan su utilización y pueden ser superados por medio de estrategias farmacotécnicas u obtención de derivados farmacéuticos⁵.

⁵Los derivados farmacéuticos son obtenidos a partir de F de interés, mediante reacciones químicas, de acuerdo a los grupos funcionales presentes en las moléculas, con propiedades fisicoquímicas más o menos



En lo que respecta a la aceptación por parte de los pacientes al tratamiento terapéutico, la administración de F por vía per-oral es la más conveniente y, en general, considerada la más segura, la menos costosa y, por lo tanto, la más frecuentemente utilizada. En esta línea, resulta de relevancia destacar el aporte de Dressman (1998), quien citó que las propiedades desfavorables de F administrados por vía per-oral y en formas farmacéuticas sólidas, tienen una fuerte influencia sobre su disolución en el TGI, por lo que podrían ser la etapa limitante de la absorción (Dressman, Amidon, Reppas, & Shah, 1998).

1.2.2. Sistemas de liberación modificada de fármacos

Dentro de las nuevas estrategias de formulación, para la optimización de las propiedades desfavorables de los F de reconocida utilidad terapéutica, se pueden mencionar los Sistemas de Liberación Modificada (SLM) de F.

En este marco, desde finales de la década de 1930, se ha comenzado a trabajar en el diseño de sistemas que permitieran modificar la liberación de los F. En particular, Lipowski (U.S.Patent N° 2738303, 1938) fue quien obtuvo la primera patente de una forma farmacéutica de administración oral que logró una liberación lenta y constante del F después de la ingestión. Sin embargo, la primera formulación farmacéutica de acción sostenida, diseñada bajo el aporte realizado por Lipowski, fue introducida en el mercado en 1952 (Lazarus & Cooper, 1959) y, a partir de entonces, se continúa investigando arduamente con relación al diseño de diferentes tipos de sistemas que permitan modificar la liberación de los F (Helfand & Cowen, 1983).

En particular, la Farmacopea Argentina 7° Ed. (Farmacopea Argentina, 2014) define a las formas farmacéuticas de “liberación prolongada” como aquellas en las que la liberación del F se produce durante un período de tiempo prolongado después de su administración. Las expresiones como “extendida”, “prolongada”, “repetida” y “sostenida” también se emplean para describir tales formas farmacéuticas.

La Farmacopea de Estados Unidos (USP33-NF28, 2010) utiliza el término “liberación modificada” (“modified release”) para referirse a formas farmacéuticas en las que sus características de disolución son moduladas, en el tiempo o en el espacio, a los fines de cumplir con objetivos terapéuticos específicos o de conveniencia, que no son alcanzados con las formulaciones farmacéuticas convencionales. Dentro de

diferenciadas a las de sus precursoras, con el objeto de ampliar las posibilidades de aplicación de F (Manzo, Mazziari, & Olivera, 2005)



este término se incluyen las formas de liberación retardada (“delayed release”) y de liberación extendida (“extended release”).

En el desarrollo de esta tesis se hará referencia al término “liberación modificada”, descrito en USP33-NF28, porque se considera más amplio e inclusivo de todas las aplicaciones descriptas.

Se define a una formulación de “liberación modificada”, como aquella forma farmacéutica en la cual las características de liberación del F, en el curso del tiempo o en la localización espacial, son adecuadas para lograr objetivos terapéuticos o de conveniencia que no ofrecen las formas farmacéuticas convencionales.

La ubicación espacial se encuentra relacionada con la orientación o direccionamiento del F hacia un órgano o tejido específico, en donde se produce la absorción, mientras que el suministro temporal hace referencia al control de la velocidad con la que éste llega a dicho tejido u órgano.

En este marco, resulta relevante destacar las ventajas y las limitaciones relacionadas con el desarrollo de SLM de F, las cuales se resumen en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Algunas ventajas y limitaciones de los SLM de F.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none">• Efecto terapéutico prolongado y reducción de la frecuencia de dosificación.• Confiabilidad del efecto terapéutico.• Mejora del cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes.• Reducción de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas del F.• Liberación sitio-específica del F en el TGI.• Reducción de efectos adversos.• Posible mejora en la selectividad de la actividad farmacológica.	<ul style="list-style-type: none">• Riesgo de falla del SLM, lo que conduciría a una liberación masiva del F y, en consecuencia, a dosis no deseadas.• Riesgo de acumulación del F en el sistema circulatorio.• Falta de reproducibilidad del efecto terapéutico, por fluctuación de dosis.• Problemas asociados a la manipulación incorrecta del SLM.• Mayor costo de diseño y producción.• Pérdida de flexibilidad para ajustar la dosis (en sistemas de tipo monolíticos)



Adicionalmente, cabe destacar que son múltiples las consideraciones generales que se deben tener en cuenta en el diseño de SLM para que éstos puedan cumplir los objetivos terapéuticos para los cuales fueron desarrollados.

1.2.2.1. Aspectos generales a considerar en el diseño de SLM

El diseño y desarrollo de SLM de F es generalmente una tarea difícil debido a la relación que existe entre las propiedades del F, el paciente y su enfermedad, y las limitaciones tecnológicas en la elaboración de una determinada forma farmacéutica, además de la necesidad de conocimientos y cooperación multidisciplinario. En este sentido, algunos factores que pueden influir en la estrategia de diseño de SLM son:

- tipo de enfermedad a tratar y, consecuentemente, lugar de acción al cual el F debe acceder;
- forma farmacéutica; por ejemplo, depende de si se formula un sistema simple o monolítico (cápsula, comprimido), múltiple (gránulos, micropartículas) o dispersiones líquidas;
- fisiología intrínseca del TGI, en particular para la vía de administración peroral; por ejemplo, el tiempo de residencia de una formulación es influenciado por el vaciado gástrico y el tránsito gastrointestinal.

Entre las propiedades fisicoquímicas de los F, que influyen significativamente o condicionan el diseño de los SLM, pueden citarse las que se encuentran presentadas en la Tabla 1.2 (Chiao & Robinson, 1998).

Tabla 1.2. Propiedades fisicoquímicas de los F que condicionan el diseño de SLM

Propiedades fisicoquímicas	
Peso molecular	Se prefieren F con pesos moleculares inferiores a 1000 Da, ya que este parámetro podría limitar su paso a través de las membranas biológicas.
Solubilidad acuosa y pKa	Los F que presentan valores de solubilidad acuosa extremadamente bajos, no son buenos candidatos para el diseño de un SLM, ya que en general su velocidad de disolución sería el factor limitante de la cinética del proceso. La solubilidad en los fluidos gastrointestinales, dependiente del pH, también condiciona la velocidad de difusión a través de las membranas, dado que representa la fuerza directriz para su pasaje a través de éstas.



<i>Coefficiente de reparto</i>	Un valor de coeficiente de reparto favorable hacia la fase lipídica facilita el flujo a través de membranas. Los F con valores de coeficiente de reparto octanol/agua extremadamente pequeños tienen un flujo de entrada al organismo demasiado bajo. Valores de coeficiente de reparto excesivamente altos pueden producir acumulación de los F en los tejidos.
<i>Estabilidad</i>	Los F que son inestables en el intestino presentan una limitada utilidad para el diseño y desarrollo de SLM.

Por otra parte, las características farmacológicas y biológicas que un F debe presentar para poder ser formulado exitosamente en un SLM, se presentan en la Tabla 1.3. En donde puede evidenciarse que, estas propiedades, se encuentran vinculadas a la trayectoria del F en el organismo.

Tabla 1.3. Características farmacológicas y biológicas de los F que influyen en el diseño de SLM

Características farmacológicas y biológicas	
<i>Dosis</i>	Los F para la vía per-oral que requieran dosis mayores a 500 mg no son buenos candidatos, ya que generarían sistemas de tamaño inaceptable.
<i>Semivida de eliminación, ($t_{1/2}$)</i>	Los F con $t_{1/2}$ entre 2-6 h son candidatos ideales. Si el $t_{1/2}$ es menor a 2 h se requerirían dosis muy elevadas para alcanzar niveles plasmáticos eficaces y la administración del medicamento a intervalos posológicos aceptables (12-24 h). En este caso, la utilización de un SLM puede que no reúna las exigencias de seguridad requeridas.
<i>Clearance total</i>	No debe ser dosis dependiente.
<i>Volumen de distribución</i>	Para F con baja actividad farmacológica intrínseca el volumen de distribución no debe ser demasiado elevado, ya que cuanto mayor es este parámetro, deben incorporarse mayores dosis del F al SLM para alcanzar las concentraciones terapéuticas adecuadas.
<i>Metabolismo y efecto de primer paso hepático</i>	Los F que son metabolizados antes de su absorción (ya



sea en el lumen o en la pared intestinal) o que sufren un efecto de primer paso hepático importante, pueden exhibir una disminución en la biodisponibilidad, cuando son liberados lentamente desde el SLM. Esto es debido a que, en las condiciones mencionadas, la mayoría de las enzimas metabolizadoras utilizan procesos saturables y pueden no verse saturadas.

Índice terapéutico

Los F con índice terapéutico estrecho requieren un preciso control de sus niveles plasmáticos, por lo que no son adecuados para el desarrollo de SLM. La incorporación de más de una dosis a una formulación implica un mayor riesgo, si se produce la liberación masiva, no deseada, del F.

En resumen, los principios activos que son candidatos para sistemas de liberación modificada para la vía oral, deben tener un $t_{1/2}$ adecuado (entre 2-6 h) para que no se produzca acumulación en el cuerpo, una dosis tal que permita obtener un sistema de tamaño adecuado y se debe tener en cuenta la capacidad para formar metabolitos activos, por ejemplo por metabolismo de primer paso, que prolonguen la acción terapéutica.

1.2.2.2. Estrategias farmacotécnicas utilizadas para obtener SLM

El control de la velocidad y del sitio de liberación del F puede ser alcanzado mediante diferentes estrategias farmacotécnicas. La base tecnológica en la elaboración de SLM consiste en diseñar formulaciones que permitan liberar el F en pequeñas cantidades, a una velocidad determinada y en un sitio específico; de modo tal que, el proceso de absorción se desarrolle, preferentemente, en el segmento adecuado del TGI y permita mantener las concentraciones plasmáticas dentro de la ventana terapéutica.

Para estudiar los mecanismos de liberación de los F contenidos en estos sistemas, es fundamental el conocimiento de los excipientes a utilizar, así como de la tecnología específica a desarrollar.

En función del tipo de excipientes y de la tecnología empleada para modular la velocidad de liberación del F, se pueden citar, entre otros, los siguientes ejemplos de SLM (Berrozpe & Ferrer, 1998):



- *Sistemas recubiertos*: en estos sistemas el F está rodeado por una barrera o lamina (habitualmente de algún material polimérico) que condiciona la velocidad de liberación (por disolución, difusión u ósmosis) y, por lo tanto, su velocidad de absorción. Entre éstos se pueden mencionar:
 - *Cápsulas de material polimérico*: contienen el F ya sea en estado sólido, en solución o dispersado en una suspensión. La liberación del F ocurre por difusión a través de la pared de la cápsula.
 - *Microencapsulados*: el F, ya sea en forma de moléculas, partículas o glóbulos líquidos, es recubierto con materiales de distinta naturaleza, para obtener partículas de tamaño micrométrico.
- *Sistemas matriciales*: corresponden a una dispersión o disolución de partículas del F en una matriz sólida, biodegradable o no, en la que su liberación se produce por difusión, erosión o una combinación de ambos procesos.
- *Hidrocoloides*: se trata de F incluidos en cápsulas o comprimidos, en los cuales se utilizan polímeros hidrofílicos, con elevada capacidad gelificante.
- *Bombas osmóticas*: controlan la liberación del F mediante estrategias químicas o mecánicas.
- *Sistemas flotantes*: son microgránulos o pellets recubiertos, cuya densidad aparente es inferior a la de los jugos gástricos. Esto facilita su flotación y, por lo tanto, prolonga su permanencia en el tracto digestivo.
- *Nanopartículas*: refiere a la tecnología orientada a la liberación espacial. El término vectorización hace referencia a la liberación selectiva de F o moléculas bioactivas a nivel de órganos, tejidos o células, sobre los que han de ejercer su acción mediante la utilización de transportadores o portadores de distinta naturaleza (Vila Jato, 1997). Dentro de la llamada nanotecnología farmacéutica, es posible mencionar a los liposomas, micelas poliméricas, nanopartículas y dendrímeros, como los sistemas de más amplia utilización en la actualidad. Algunos de éstos, ya cuentan con una larga trayectoria como vehículos portadores de F y ha sido en los últimos años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones más interesantes.

Los SLM se han utilizado, también, para aumentar la absorción de F vehiculizados, ya sea por vía tópica u oral, por medio del empleo de promotores de la absorción. Algunos ejemplos de promotores de la absorción a través de las



membranas biológicas, ya sean piel o mucosas, son: alcoholes y polioles, aminas y amidas, ácidos grasos, terpenos, ésteres y surfactantes, los cuales se intercalan dentro de la estructura de los lípidos y proteínas de las membranas biológicas, modifican su ordenamiento o estructura y facilitan el pasaje y difusión de ciertas sustancias. También, dilatan los espacios intercelulares y, por consiguiente, provocan un incremento en el pasaje paracelular.

A nivel intestinal, los promotores de la absorción pueden actuar sobre el epitelio intestinal, mediante tres mecanismos (Junginger & Verhoef, 1998):

- *Acción sobre la capa de mucina:* la capa de mucina cubre la superficie de las células de la mucosa intestinal y actúa como una barrera de difusión de algunas moléculas. Los surfactantes iónicos y no iónicos (como los polisorbatos, polioxietilentalquilester, lauril sulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato) reducen la viscosidad y elasticidad de la capa de mucosa. Además, algunos polímeros mucoadhesivos, interaccionan con la capa de mucina, cubren la superficie de mucus y se inter-penetran en su red, lo que reduce su función de barrera. Algunos ejemplos son polímeros hidrofílicos, tales como el Carbomer[®] 934P, Polycarbophil[®] o chitosan.
- *Acción sobre los componentes de la membrana:* la membrana de las células epiteliales contienen fosfolípidos y proteínas. Las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de los lípidos resultan en la formación de bicapas de fosfolípidos bien organizados. Estas bicapas organizadas son poco permeables a las macromoléculas y a los compuestos polares. Los ácidos grasos, monoglicéridos o diglicéridos del ácido caprílico, micelas de ácidos grasos de sales biliares y surfactantes, pueden incrementar la permeabilidad de la membrana epitelial y afectar alguna de sus proteínas o lípidos. Algunos surfactantes, también solubilizan algunas proteínas. Esto influencia, tanto la vía de pasaje transcelular, como la paracelular.
- *Acción sobre las uniones intercelulares ("tight junctions"):* representan la mayor barrera para el transporte por la vía paracelular de macromoléculas y compuestos polares. La estructura de las *tight junctions* y, consecuentemente, la permeabilidad, pueden ser reguladas, a través de varios factores fisiológicos. Entre éstos se incluyen la concentración del adenosín monofosfato cíclico, la concentración del calcio intracelular y la carga mucosal transiente. Además, algunos polímeros hidrofílicos (por ejemplo: chitosan) tienen efecto directo



sobre estas uniones y aumentan la permeabilidad intestinal (Ranaldi, Marigliano, Vespignani, Perozzi, & Sambuy, 2002).

Numerosos estudios han demostrado que uno de los posibles mecanismos de promoción de la absorción, es la pérdida de las *tight junctions* de las membranas epiteliales, lo que incrementa el transporte paracelular de F.

Cabe destacar que, si bien todos los sistemas descriptos previamente son destinados a la vía per-oral, además de éstos, se han desarrollado otras estrategias para la administración de F a través las vía nasal, colónica, tópica, transdérmica, entre otras.

1.2.2.3. Estrategias para evaluar el desempeño de los SLM

Las estrategias utilizadas para evaluar el desempeño de un SLM dependerán de cuales sean las propiedades desfavorables del F en cuestión, como así también, de la etapa del proceso de desarrollo del sistema, que abarca desde la optimización de los materiales de partida, hasta estudios sobre los productos finales, que permiten evaluar su eficacia, seguridad y confiabilidad.

La evaluación del desempeño de un SLM puede llevarse a cabo mediante ensayos que incluyan modelos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En todos los casos, la/s propiedad/es a evaluar deben ser comparadas y constatadas con una referencia, ya sea el propio F o una formulación de referencia que lo contenga.

En este sentido, resultan de gran utilidad las metodologías codificadas en la Farmacopea Argentina o en la Farmacopea de Estados Unidos y, siempre que sea posible, los ensayos se realizan sobre la base de las especificaciones de las monografías de los F puros o de producto terminado (Farmacopea Argentina, 2014; USP33-NF28, 2010). De esta manera, los resultados obtenidos, a partir de los diferentes experimentos, cuentan con el respaldo de ensayos codificados, pueden ser fácilmente reproducibles y replicados en diferentes partes de Argentina y el mundo.

1.2.3. Polielectrolitos utilizados en tecnología farmacéutica

En el campo de la tecnología farmacéutica, los SLM han sido desarrollados para responder a situaciones farmacoterapéuticas específicas. Es muy común la utilización de un gran número de macromoléculas como excipientes⁶ para lograr liberación modificada u otras características particulares que derivan de su presencia en una

⁶Excipiente hace referencia a toda sustancia de origen natural o sintética presente en una preparación farmacéutica incorporada sin propósito terapéutico (Farmacopea Argentina, 2014).



dada formulación. En este sentido, un gran número de excipientes aprobados para uso en farmacia poseen, en su estructura molecular repetitiva, grupos con capacidad de generar cargas (ionizables) en presencia de contraiones, que les confieren propiedades particulares para una amplia variedad de propósitos, tales como: agentes viscosantes, gelificantes, bioadhesivos en formulaciones de uso tópico, aglutinantes, formadores de matriz o de membranas inteligentes en formulaciones de uso oral, estabilizantes de suspensiones o emulsiones, entre otros.

En este contexto, los SLM que se basan en las propiedades únicas de los complejos entre polielectrolitos (PE) y F ionizables de carga opuesta han cautivado la atención. En este sentido, es posible evidenciar en la literatura científica numerosas contribuciones realizadas, en los últimos años, en el área de los complejos PE-F, en donde se estudian los aspectos moleculares relevantes que permiten conocer los factores que gobiernan su comportamiento como portadores y sus potencialidades aplicaciones en farmacoterapia (Battistini, Flores-Martin, Olivera, Genti-Raimondi, & Manzo, 2014; Battistini, Olivera, & Manzo, 2013; Guzmán, Manzo, & Olivera, 2012; Quinteros, Allemandi, & Manzo, 2012; Quinteros, Manzo, & Allemandi, 2011).

Por lo expuesto, los SLM basados en PE como portadores de F de reconocida utilidad terapéutica, son una propuesta interesante para la optimización de tratamientos farmacoterapéuticos, particularmente, en situaciones en las que la disponibilidad biológica del F pudiera estar condicionada por su velocidad de liberación, estabilidad en el entorno gastrointestinal o permeabilidad, entre otros.

En particular, los PE son polímeros hidrofílicos que contienen en su estructura grupos ionizables, los cuales, al ser dispersados en un solvente polar, pueden disociarse y generar cargas en las cadenas del polímero (macroiones) y pequeños contraiones (Barrat & Joanny, 1997; Dobrynin & Rubinstein, 2005). En contacto con el agua, las partículas sólidas de PE provocan el influjo por ósmosis, con el consecuente hinchamiento. Si la interacción entre el PE y el agua es favorable, éste puede terminar disolviéndose o dispersándose homogéneamente (sistemas coloidales) y provocar un aumento de la viscosidad del sistema. El entrecruzamiento de las cadenas poliméricas limita el grado de hidratación e hinchamiento, la velocidad de disolución y la viscosidad resultante puede verse aumentada (Martín, 1993).

Sobre la base de la carga que generan en dispersión, los PE pueden clasificarse en aniónicos (que generan cargas negativas provistas, por ejemplo, por grupos carboxilatos) y catiónicos (que generan cargas positivas generalmente provistas por



grupos aminos protonados). Los PE, bajo la forma de resinas de intercambio iónico (PE insolubles) o de polímeros hidrofílicos dispersables (PE solubles), han sido ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas.

En la Tabla 1.4 se describen algunos PE aprobados para su uso como excipientes en formulaciones farmacéuticas.

En algunas formas farmacéuticas, si bien la interacción entre PE y contraiones orgánicos o inorgánicos puede ser considerada como una incompatibilidad entre excipientes, o bien, entre excipientes y F (Phaechamud, Koizumi, & Ritthidej, 2000); las potencialidades particulares de esta interacción, han sido explotadas para una amplia variedad de propósitos, tales como: modular la liberación de F (Guzmán et al., 2012; Jimenez-Kairuz, Llabot, Allemandi, & Manzo, 2005; Jimenez-Kairuz, Allemandi, & Manzo, 2002; Quinteros et al., 2011; Ramirez-Rigo, Allemandi, & Manzo, 2006a), incrementar la compatibilidad de los F con el vehículo (Vilches et al., 2002), incrementar la estabilidad acuosa de los F (Jimenez-Kairuz, Allemandi, & Manzo, 2004; Zoppi et al., 2012), transportar fármacos hasta el sitio de absorción o acción (Jantzen & Robinson, 1996; Quinteros, Manzo, & Allemandi, 2010), dirigir selectivamente el sistema portador hacia el sitio blanco (Battistini et al., 2014), enmascarar u optimizar el sabor de F con caracteres organolépticos inadecuados (Borodkin & Sundberg, 1971), prolongar el tiempo de residencia de las formas farmacéuticas por las propiedades mucoadhesivos de los sistemas (Andrews, Lavery, & Jones, 2009; Bernkop-Schnurch & Walker, 2001; Llabot, Manzo, & Allemandi, 2004), como agentes viscosantes (Billany, 2002), entre otros.

Tabla 1.4. Algunas polielectrolitos actualmente utilizados como excipientes farmacéuticos (Mourya & Inamdar, 2009; Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)

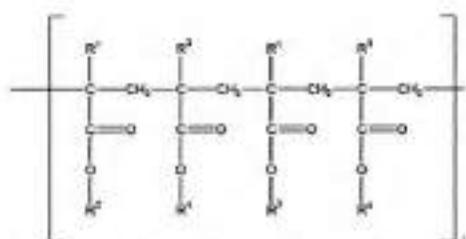
Sustancia	Estructura	Categoría funcional
(a) PE aniónicos		
Poliacrílatos		
Carbomer	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ -\text{C} & -\text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{COOH} \end{array} \right]_n$	Sustancia bioadhesiva, agente para liberación modificada, estabilizador de emulsiones, agente de suspensión, ligante para compresión directa en comprimidos
Policarbófilo	Homopolímero del ácido acrílico entrecruzado con divinilglicol	Sustancia bioadhesiva, agente para liberación controlada, ligante para



compresión directa en comprimidos, agente de suspensión.

Polimetacrilatos aniónicos

Eudragit®
(-S, -L)



Agentes de cobertura, ligante para compresión directa en comprimidos o diluyentes.

Para Eudragit® L y S:

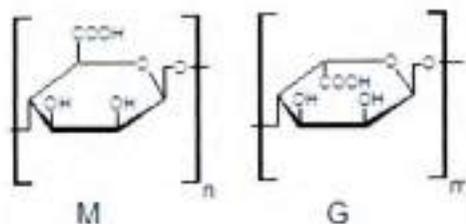
$R^1, R^3 = CH_3$

$R^2 = H$

$R^4 = CH_3$

Polisacáridos aniónicos

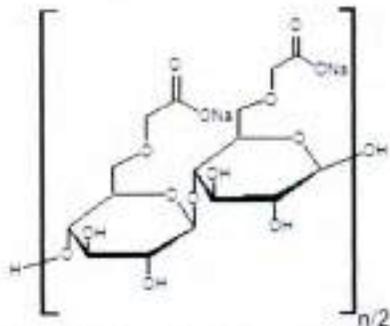
Ácido alginico



Agente para liberación modificada, ligante para compresión directa en comprimidos, agente desintegrante, agente viscosante

Unidades manurónico (M) y gulurónico (G)

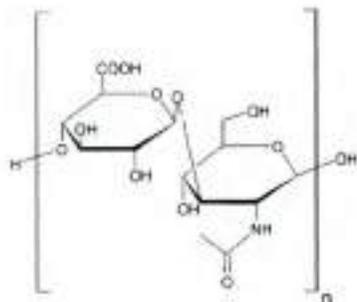
Carboximetilcelulosa



Agente estabilizante, agente desintegrante para comprimidos o cápsulas, agente viscosante, agente para liberación controlada.

Ej: Carboximetilcelulosa sódica con un grado de sustitución.

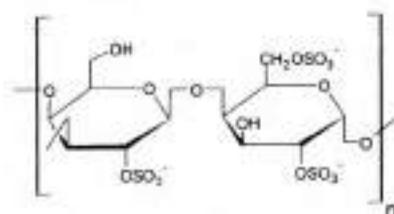
Ácido hialurónico



Humectante, lubricante, agente para liberación modificada, agente viscosante.



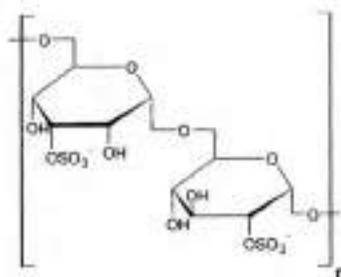
Carragenanos
(λ^- , κ^- , ι^-)



Ej: Lambda carragenina

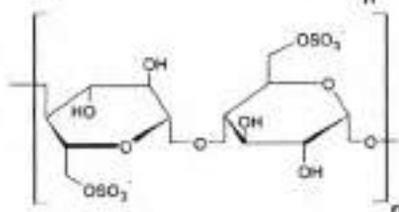
Agente emulsificante, base para geles, agente para liberación modificada, agente viscosante, agente de suspensión.

Dextran sulfato



Agente de encapsulación, agente para liberación controlada.

Celulosa sulfato

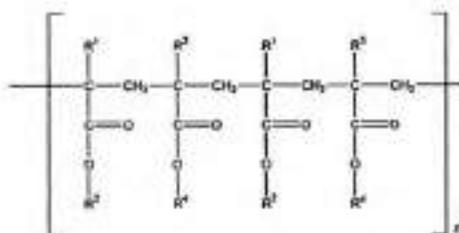


Agente para encapsulación, agente para liberación controlada.

(b) PE catiónicos

Polimetacrilatos catiónicos

Eudragit®
(-E, -RL, -RS)



Agente de cobertura, ligante para comprimidos o diluyente

Para Eudragit® E:

$R^1, R^3 = \text{CH}_3$

$R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

$R^4 = \text{CH}_3, \text{C}_4\text{H}_9$

Para Eudragit® RL y RS:

$R^1 = \text{H}, \text{CH}_3$

$R^2 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$

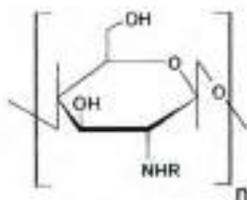
$R^3 = \text{CH}_3$

$R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-$



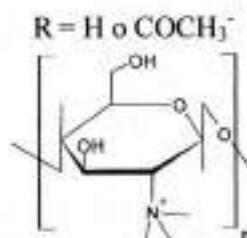
Polisacáridos

Chitosan



Agente de cobertura,
agente desintegrante,
mucoadhesivo, agente
promotor de la
permeabilidad, agente
viscosante.

Trimetil chitosan



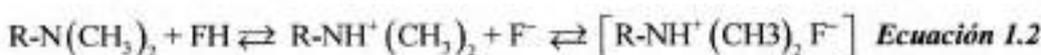
Agente promotor de la
permeabilidad, agente para
liberación controlada.

Cuando se neutralizan los grupos ácidos o básicos de un PE con moléculas de carga contraria, como F de características ácido/base opuestas, se generan los siguientes equilibrios en un medio acuoso:

- para PE ácidos (R-COOH):



- para PE básicos R-N(CH₃)₂:



Las Ecuaciones 1.1 y 1.2 ejemplifican el fenómeno de condensación iónica, que genera una dada proporción de pares iónicos como producto de la asociación iónica entre un PE y un F de carga opuesta. Estos pares iónicos, indicados en las mencionadas ecuaciones como las especies entre corchetes, son denominados sistemas o complejos PE-F (Dobrynin & Rubinstein, 2005).

La interacción proveniente de la atracción electrostática de un contraión (F) hacia el PE y la pérdida de la entropía translacional por el contraión, debido a su localización en la vecindad de la cadena del polímero, generan la reacción de condensación.

El estudio sistemático del comportamiento de estos equilibrios de condensación iónica, en dispersión acuosa, permitió determinar que:

- Se caracterizan por una alta proporción del F formando pares iónicos con el PE portador.



- No es afectado por la presencia de no electrolitos (Jimenez-Kairuz et al., 2002; Ramirez-Rigo, Allemandi, & Manzo, 2006b).
- Puede ser parcialmente desplazado por la adición de sales (Jimenez-Kairuz, Allemandi, & Manzo, 2003; Jimenez-Kairuz et al., 2002; Ramirez-Rigo et al., 2006b).
- No es afectado significativamente por la dilución (Jimenez-Kairuz et al., 2003).

En particular, el fenómeno de condensación iónica confiere propiedades particulares a las dispersiones entre PE y F, que son de relevancia en aplicaciones farmacotécnicas y biofarmacéuticas, tales como las que se presentan a continuación:

- Aumento de la compatibilidad (solubilidad aparente) de F ácidos y básicos poco solubles en agua vehiculizados en dispersiones PE-F (Jimenez-Kairuz et al., 2004; Quinteros et al., 2012)
- Protección del F frente a la degradación química, ya que es posible proteger F susceptibles de sufrir reacciones de degradación mediante catálisis ácido-base específica (Esteban, Manzo, & Alovero, 2009; Jimenez-Kairuz et al., 2004; Quinteros et al., 2012; Zoppi et al., 2012).
- Aumento de la interacción con los sitios de absorción de F (Ramírez-Rigo, Olivera, Rubio, & Manzo, 2014).
- Potenciación de la acción antimicrobiana frente a microorganismos resistentes (Romero, Manzo, & Alovero, 2010).
- Modulación de la liberación de F (Jimenez-Kairuz et al., 2003).
- Aumento del *up-take* celular y direccionamiento específico de F anticancerígenos (Battistini et al., 2014).

Los sistemas portadores constituidos por PE en interacción con F pueden ser catalogados como “sistemas inteligentes de liberación” dado que liberan el F en respuesta a cambios en el entorno; en este caso, el estímulo es la presencia de iones. El agregado de electrolitos al sistema genera intercambios iónicos y reagrupamientos de cargas, lo que provoca la disociación parcial de los pares iónicos y la consecuente liberación del F desde el sistema portador.

Estos resultados, han permitido el desarrollo de sistemas portadores en dispersión constituidos por complejos PE-F. Algunos ejemplos relevantes son:

- El aumento de permeabilidad y biodisponibilidad de enalapril (F de baja permeabilidad) cuando se encuentra vehiculizado como complejo Eudragit®E100 (EuE100)-enalapril maleato, respecto a igual concentración de F libre (Ramírez-Rigo et al., 2014).
- El aumento de la permeabilidad intraocular de flurbiprofeno vehiculizado como complejo con Eudragit®E100 para administración oftálmica (aumento de la permeación en córnea) (Tártara, Quinteros, Saino, Allemandi, & Palma, 2012).
- El aumento de la bioadhesión en el sitio de absorción del F. Es conocido que el uso de PE con capacidad de generar cargas positivas sobre las superficies de las partículas, tales como quitosan, polietilimina, Eudragit®E100, pueden contribuir a aumentar la interacción con la mucina presente en las mucosas y otras membranas biológicas que, en general, presentan densidad de carga negativa sobre su superficie. De este modo, se promueve la bioadhesión (di Colo, Zambito, Burgalassi, Nardini, & Saettone, 2004; Sun et al., 2010; Yin et al., 2009).
- El aumento del efecto bactericida y acción prolongada de estos sistemas en comparación con el respectivo F libre (Romero et al., 2010), ya sea por las propiedades bioadhesivas de los hidrogeles o por sus interacciones con células procariotas (Romero, Pons, Bocco, Manzo, & Alovero, 2012). Se ha informado que, los sistemas portadores que poseen cargas positivas facilitan la permeación de los agentes antimicrobianos al interior de las bacterias (Liu, Du, Wang, & Sun, 2004; Romero et al., 2010).
- La modulación de la liberación de ciprofloxacina (Cip) desde hidrogeles de carbomer (CB)-Cip que han demostrado utilidad en el tratamiento de endometritis. Por su parte, los hidrogeles de CB-Cip-lidocaína resultaron más efectivos para el tratamiento de infecciones de la piel, incluyendo a pacientes con heridas quemaduras, respecto del tratamiento de referencia (Breda, Manzo, & Olivera, 2010). Resultados similares se observaron con los comprimidos matriciales de CB-Cip vs Cipro XR® (Bermudez, Jimenez-Kairuz, Olivera, Allemandi, & Manzo, 2008). Las matrices CB-Cip se realizaron en lotes pilotos y se evaluaron mediante ensayos clínicos en voluntarios sanos.

Por otra parte, se han obtenido matrices de liberación modificada a partir de complejos PE-F, con una amplia variedad de PE aniónicos y catiónicos, y se han estudiado exhaustivamente las propiedades de relevancia farmacotécnica y



biofarmacéutica de los materiales obtenidos, lo que ha permitido, además, definir los mecanismos que gobiernan la liberación del F en estos sistemas (Jimenez-Kairuz et al., 2005; Llabot et al., 2004; Ramirez-Rigo et al., 2006b). Dentro de los complejos PE-F en estado sólido, las matrices poliméricas hidrofílicas son las más representativas y han sido las más estudiadas, debido a que los métodos de producción son versátiles, simples y costo-efectivos (Gallo, Piña, Bucalá, Allemandi, & Ramirez-Rigo, 2013; Nokhodchi & Asare-Addo, 2014). Las características de los complejos PE-F en estado sólido bajo la forma de matrices y su comportamiento frente a un medio acuoso se resumen en la Tabla 1.5.

El conocimiento de los factores que determinan el tipo de interacción entre F iónicos o ionizables y PE, resulta relevante en el diseño de formulaciones farmacéuticas.

Tabla 1.5. Principales características de los complejos constituidos por PE ácidos y básicos como portadores de F ionizables de carga opuesta.

Complejos	Comportamiento estructural de la superficie de la matriz	Velocidad de liberación del F	Mecanismo de liberación del F
Carbomer-F	Amplia capa gel viscosa	Lenta-modulable	Intercambio iónico/difusión
Ácido alginico-F	Moderada-limitada capa gel	Moderada-modulable	Erosión
Ácido alginico-F:Alginato de sodio	Moderada capa gel y moderada viscosidad	Lenta modulable	Erosión
Carboximetilcelulosa-F	No desarrolla capa gel	Rápida	Intercambio iónico/difusión/erosión
Carboximetilcelulosa-F: Carboximetilcelulosa sódica	Moderada capa gel	Moderada-modulable	Intercambio iónico/difusión/erosión
Eudragit®E100-F ₅₀ Cl ₅₀	No desarrolla capa gel	Rápida	Intercambio iónico/erosión
Eudragit®L100-F	Membrana gastrorresistente frente al fluido gástrico simulado	Muy lenta	No se ha podido determinar
	No desarrolla capa gel frente al fluido intestinal simulado	Rápida	Erosión

1.3. Esquema de investigación y desarrollo

Este proyecto de tesis doctoral se encuentra enmarcado en uno de mayor envergadura que se desarrolla en 3 niveles de experimentación (Figura 5). A través de



éste, se pretende adquirir gradualmente la capacidad científica y técnica para el desarrollo integral de sistemas farmacoterapéuticos, que permitan optimizar los atributos de F de reconocida utilidad, abarcando desde su concepción hasta la evaluación de sus propiedades de eficacia y seguridad.

El NIVEL 1 comprende el desarrollo y optimización de la metodología de obtención y evaluación de los nuevos derivados y materiales portadores, su caracterización física, química y biológica. En el NIVEL 2, se diseñan y obtienen nuevos medicamentos, SLM y otras formas farmacéuticas cuyas propiedades biofarmacéuticas son evaluadas *in vitro* o *in vivo/in situ* en animales. El NIVEL 3 comprende estudios farmacocinéticos y clínicos que permitan ponderar eficacia, seguridad y confiabilidad.

En el contexto señalado, se identifican dos grandes problemáticas vinculadas específicamente con las áreas farmacotécnicas y biofarmacéuticas:

1. *Incidir en la velocidad y eficiencia del proceso de absorción de los F (a) mediante la modulación de la liberación de éstos en el/los sitio/s en que se produce la absorción y (b) facilitar su permeación a través de las membranas involucradas.*
2. *Dirigir selectivamente el F al blanco de la acción farmacodinámica.*

En esta línea, en los últimos 15 años, nuestro grupo de investigación en tecnología farmacéutica ha desarrollado una nueva estrategia de I+D, que ha permitido consolidar una plataforma tecnológica original, basada en la interacción ácido-base entre un PE y F ionizables de carga opuesta, sobre cuya base se diseñan SLM para atender situaciones farmacoterapéuticas específicas. Estos sistemas permiten mejorar la eficacia, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa de F de reconocida utilidad terapéutica.



Figura 1.6. Esquema de I+D realizado en el grupo de investigación en donde se evidencian los diferentes niveles de experimentación.

1.4. Objetivos

El desarrollo de esta tesis doctoral pretende proveer nuevos conocimientos en los tres niveles del esquema de I+D descrito en la Figura 1.6. En este sentido, se plantean los objetivos generales y específicos que sustentan la investigación llevada a cabo en este trabajo de tesis.

1.4.1. Objetivos generales

Sobre la base de lo expuesto, se propone la generación de conocimiento científico y tecnológico interdisciplinario que permita cumplir con todas las etapas involucradas en la I+D que se aborda y que aporten al diseño y desarrollo de nuevos sistemas farmacoterapéuticos, en los cuales se pondere la eficacia, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa.

A tal efecto y centrados en la plataforma de investigación de nuestro grupo, presentada previamente en la Figura 1.6, se plantea como objetivo general:



- Desarrollar y evaluar nuevos sistemas portadores de BZ y CMP, y nuevas formulaciones pediátricas de BZ, que permitan optimizar la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.

Se espera que, estos sistemas farmacoterapéuticos, puedan ofrecer ventajas respecto de las formulaciones que se utilizan actualmente.

1.4.2. Objetivos específicos

Para poder abordar el objetivo general, se plantean los objetivos específicos, en función de los diferentes niveles de experimentación, de acuerdo con el esquema de I+D presentado en la Figura 1.6.

En lo que refiere al primer nivel de investigación, se propone la evaluación de nuevos PE como portadores de F con acción tripanocida y de nuevas formulaciones pediátricas. A partir de esto, se plantea:

- Evaluar *in vitro* el efecto tripanocida de la acción combinada de BZ y CMP, en cultivos celulares de trypomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.
- Evaluar nuevos portadores de F con acción tripanocida, basados en polisacáridos y polimetacrilatos como PE.
- Caracterizar los sistemas portadores de liberación modificada conteniendo BZ y CMP, mediante la evaluación de atributos de relevancia químico-farmacéutica.
- Desarrollar y evaluar nuevas formulaciones pediátricas de BZ.

En lo que respecta al segundo nivel de investigación, se aplicarán los conocimientos generados para resolver situaciones farmacotécnicas específicas. Para esto, se plantea:

- Evaluar *in vitro* las propiedades de relevancia farmacotécnicas y biofarmacéuticas de los sistemas farmacoterapéuticos desarrollados.
- Validar una metodología bioanalítica, mediante una evaluación *ex vivo*, que permita cuantificar BZ en plasma humano, de utilidad para posteriores estudios farmacocinéticos.

En lo que respecta al tercer nivel de investigación, se aplicarán los conocimientos generados para evaluar la performance *in vivo* de los sistemas portadores. Para esto, se plantea:



- Evaluar *in vivo* en modelos animales, las propiedades representativas de la eficacia tripanocida y seguridad, tanto de los F puros como de los sistemas portadores desarrollados, luego de su administración por vía per-oral.

En este contexto, resulta de relevancia destacar que el desarrollo de los sistemas portadores de BZ aspira a minimizar los efectos adversos asociados con la farmacoterapia, poder reducir la frecuencia de administración, mediante un cambio en el esquema posológico, para lograr una sola administración diaria y poder combinar sistemas portadores con diferentes comportamiento de liberación de BZ. En conjunto, la optimización de estos aspectos permitiría lograr una mayor aceptación del tratamiento por parte de los pacientes.

En lo que respecta a los sistemas portadores de CMP, se espera que los SLM desarrollados permitan optimizar la biodisponibilidad, en términos de poder aumentarla y reducir las variaciones intra e inter-individuales, es decir, dar respuesta a la biodisponibilidad errática que presenta este F. Además, debido a que su acción tripanocida en combinación con BZ es favorable para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, se requiere modular su liberación para que pueda actuar en conjunto con BZ. Cabe destacar que las dosis de CMP necesarias para actuar en combinación con BZ, no presentarían efectos a nivel del sistema nervioso central.

Por su parte, en lo que refiere a las formulaciones pediátricas, éstas se desarrollan y evalúan para suplir la falta de disponibilidad de tratamientos adecuados en dosis y formas farmacéuticas para este grupo etario.

Finalmente, la validación del método bioanalítico sería de utilidad en estudios posteriores de farmacocinética, para evaluar la biodisponibilidad de BZ desde los sistemas portadores.

1.5. Organización de los capítulos de la tesis

Por lo expuesto, para el abordaje de los diferentes objetivos planteados, se ha organizado este trabajo de tesis doctoral, de forma tal de ofrecer una secuencia lógica de I+D, de acuerdo con los diferentes estudios llevados a cabo. En consecuencia, el presente capítulo (*Capítulo 1*) detalla desde una perspectiva general, la relevancia e impacto de la enfermedad de Chagas, el marco introductorio a esta problemática y lo inherente al diseño de medicamentos, sobre la base de los antecedentes correspondientes. Seguidamente, se describen los materiales seleccionados utilizados en el desarrollo de este trabajo de tesis, principios activos y excipientes, sus



características generales y aplicaciones en tecnología farmacéutica (**Capítulo 2**). Se presentan los estudios *in vitro* que permitieron evaluar la acción combinada de BZ y CMP sobre trypomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* (**Capítulo 3**). A partir de los PE seleccionados, se describen las metodologías de obtención y caracterización físico-química, farmacotécnica y biofarmacéutica de los sistemas portadores de BZ y CMP, junto con los resultados y discusión inherentes a éstos (**Capítulo 4**). Posteriormente, se presentan los estudios *in vivo* en animales de experimentación de los F puros, que permiten elucidar el efecto de la acción combinada de BZ y CMP y sentar las bases para llevar a cabo los estudios *in vivo* de los sistemas portadores de desarrollados (**Capítulo 5**). Se presentan, además, el diseño, desarrollo y evaluación de las formulaciones pediátricas desarrolladas para atender a la problemática de la falta de disponibilidad de medicamentos adecuados para la población infantil (**Capítulo 6**). Complementariamente, se presenta la validación de la metodología bioanalítica para cuantificar BZ en plasma humano, de acuerdo con el detalle de las especificaciones exigidas por la autoridad sanitaria (**Capítulo 7**).

Finalmente, se exponen las conclusiones generales y perspectivas o proyecciones que se derivan de este trabajo de tesis (**Capítulo 8**). Se presentan además los **Anexos** correspondientes.

Adicionalmente, se presentan las publicaciones generadas a partir del trabajo de investigación llevado a cabo en esta tesis doctoral.

1.6. Referencias

- Andrade, S. G. (1999). Trypanosoma cruzi: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 185-187.
- Andrews, G. P., Laverty, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucosal adhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 505-518.
- Banker, G. S., Siepmann, J., & Rhodes, C. (2002). *Modern pharmaceutics* (4^o ed.). New York: CRC Press.
- Barrat, J. L., & Joanny, J. F. (1997). Theory of polyelectrolyte solutions. *Advances in Chemical Physics, Polymeric Systems*, 94, 66.
- Battistini, F., Flores-Martin, J., Olivera, M., Genti-Raimondi, S., & Manzo, R. (2014). Hyaluronan as drug carrier. The *in vitro* efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 122-129.
- Battistini, F., Olivera, M., & Manzo, R. (2013). Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 588-594.



- Bermudez, J., Jimenez-Kairuz, A., Olivera, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2008). A ciprofloxacin extended release tablet based on swellable drug polyelectrolyte matrices. *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 924-930.
- Bernkop-Schnurch, A., & Walker, G. (2001). Multifunctional matrices for oral peptide delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18(5).
- Berrozpe, J., & Ferrer, E. (1998). Preparados orales de cesión modificada. In J. Berrozpe, J. Martínez Lanao & D. Plá (Eds.), *Biofarmacia y Farmacocinética* (Vol. 2, pp. 317-347). Madrid, España: Síntesis S.A.
- Berrozpe, J., Lanao, J., Delfina, J., & Campmany, A. (1997). *Biofarmacia y Farmacocinética*. Madrid, España: Síntesis.
- Billany, M. (2002). Suspensions and emulsions. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, Ed., Aulton ME. 2nd ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, 334-359.
- Bonney, K. M., & Engman, D. M. (2008). Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Current molecular medicine*, 8(6), 510.
- Borodkin, S., & Sundberg, D. P. (1971). Polycarboxylic acid ion-exchange resin adsorbates for taste coverage in chewable tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(10), 1523-1527.
- Breda, S., Manzo, R., & Olivera, M. (2010). Evaluation of antibiotic and antibiotic/analgesic hydrogels with potential utility as topical therapy. 1º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas-RICiFa. 24 y 25 de Junio de 2010. Córdoba, Capital.
- Brisse, S., Barnabe, C., & Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal of Parasitology*, 30(1), 35-44.
- Campi-Azevedo, A., Gomes, J., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., . . . Martins-Filho, O. (2015). Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. *Immunobiology*, 220(5), 564-574.
- Carlier, Y., & Torrico, F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 767-771.
- Castro, J., & Díaz de Toranzo, E. (1988). Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed Environ Sci*, 1(1), 19-33.
- Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C., & Carlier, Y. (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome(R) in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*, 40(6), 527-532.
- Clark, C., & Pung, O. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66(1), 175-179.
- Coura, J., & Borges-Pereira, J. (2012). Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296.
- Coura, J., & de Castro, S. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Cunha-Neto, E., Bilate, A. M., Hyland, K. V., Fonseca, S. G., Kalil, J., Engman, D. M., . . . Fonseca, S. G. (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, 39(1), 41-54.
- Chiao, C., & Robinson, J. (1998). Sistemas de liberación sostenida de drogas. In A. R. Gennaro (Ed.), *Remington Farmacia* (19º ed., pp. 2536-2559). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Davies, C., Dey, N., Negrette, O., Parada, L., Basombrio, M., & Garg, N. (2014). Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethylnitrofurazone: a comparison with Benznidazole. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3231.



- di Colo, G., Zambito, Y., Burgalassi, S., Nardini, I., & Saettone, M. (2004). Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 273(1), 37-44.
- Dobrynin, A. V., & Rubinstein, M. (2005). Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 30(11), 1049-1118.
- Dressman, J., Amidon, G., Reppas, C., & Shah, V. (1998). Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res*, 15, 11-22.
- Esteban, S. L., Manzo, R. H., & Alovero, F. L. (2009). Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 53-57.
- Farmacopea Argentina. (2014). Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 7ma ed. Retrieved December 17 th, 2015, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf
- Food and Drug Administration, F. (2005). Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Retrieved 28st December, 2014, from <http://webarchive.library.unt.edu/eot2008/20090513032000/http://www.fda.gov/ohrms/docket/ac/05/transcripts/2005-4191T1.pdf>
- Food and Drug Administration, F. (2011). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata.[Internet]. Retrieved 19th, 2015, from <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
- Galbis Pérez, J. A. (2000). Absorción, distribución y excreción de fármacos. In J. A. Galbis Pérez (Ed.), *Panorama actual de la química farmacéutica* (Vol. 5, pp. 65-83). Madrid, España: Universidad de Sevilla.
- Gallo, L., Piña, J., Bucalá, V., Allemandi, D., & Ramírez-Rigo, M. V. (2013). Development of a modified-release hydrophilic matrix system of a plant extract based on co-spray-dried powders. *Powder technology*, 241, 252-262.
- García, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2015). Extemporaneous benznidazole oral suspension prepared from commercially available tablets for treatment of Chagas disease in paediatric patients.
- Garcia, S., Ramos, C., Senra, J. F., Vilas-Boas, F., Rodrigues, M., Campos-de-Carvalho, A., . . . Soares, M. (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4), 1521-1528.
- Giordanengo, L., Fretes, R., Diaz, H., Cano, R., Bacile, A., Vottero-Cima, E., & Gea, S. (2000). Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle & nerve*, 23(9), 1407-1413.
- Giordanengo, L., Maldonado, C., Rivarola, H. W., Iosa, D., Girones, N., Fresno, M., & Gea, S. (2000). Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur J Immunol*, 30(11), 3181-3189.
- Gironés, N., & Fresno, M. (2003). Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*, 19(1), 19-22.
- Guhl, F., & Lazdins-Held, J. (2007). Grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. . Geneva: *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. Retrieved 12nd February, 2016, from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69724/1/TDR_SWG_09_spa.pdf
- Gutierrez, F., Guedes, P., Gazzinelli, R., & Silva, J. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunology*, 31(11), 673-685.
- Guzmán, M., Manzo, R., & Olivera, M. (2012). Eudragit E100 as a Drug Carrier: The Remarkable Affinity of Phosphate Ester for Dimethylamine. *Molecular Pharmaceutics*, 9(9), 2424-2433.



- Helfand, W. H., & Cowen, D. L. (1983). Evolution of pharmaceutical oral dosage forms. *Pharmacy in history*, 25(1), 3-18.
- Huttunen, K. M., Raunio, H., & Rautio, J. (2011). Prodrugs—from serendipity to rational design. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 750-771.
- Jantzen, G. M., & Robinson, J. R. (1996). Sustained-and controlled-release drug delivery systems. In G. Banker & C. Rhodes (Eds.), *Modern Pharmaceutics* (3^o ed., Vol. 72, pp. 575-610). Nueva York: Marcel Dekker.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., & Manzo, R. (2003). Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 129-136.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., & Manzo, R. (2004). The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(1), 149-156.
- Jimenez-Kairuz, A., Llabot, J., Allemandi, D., & Manzo, R. (2005). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM): characterization and delivery properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(1), 87-99.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., & Manzo, R. (2002). Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(1), 267-272.
- Joseph, R. R., & Gwen, M. J. (2002). Sustained-and Controlled-Release Drug-Delivery Systems *Modern Pharmaceutics, Fourth Edition*: CRC Press.
- Junginger, H. E., & Verboef, J. C. (1998). Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs—a fiction? *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(9), 370-376.
- Kierszenbaum, F. (2005). Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol*, 21(11), 513-516.
- Kirchhoff, L. V., Weiss, L. M., Wittner, M., & Tanowitz, H. B. (2004). Parasitic diseases of the heart. *Front Biosci*, 9(706), 23.
- Lazarus, J., & Cooper, J. (1959). Oral prolonged action medicaments: their pharmaceutical control and therapeutic aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(1), 257-290.
- Ley, V., Robbins, E., Nussenzweig, V., & Andrews, N. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International journal of food microbiology*, 95(2), 147-155.
- Lo Presti, M., Bazan, P., Strauss, M., Baez, A., Rivarola, H., & Paglini-Oliva, P. (2015). Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop*, 145, 79-87.
- Llabot, J. M., Manzo, R. H., & Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 276(1), 59-66.
- Macedo, A., & Pena, S. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*, 14(3), 119-124.
- Manoel-Caetano, F. d. S., & Silva, A. E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, 2263-2274.
- Manzo, R., Mazziere, M., & Olivera, M. (2005). Preparación de complejos en estado sólido de clorhidratos de antimicrobianos fluoroquinolónicos (AMFQs) con aluminio *Argentinian patent AR007762B1*.
- Marín-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109-1123.
- Martin, A. (1993). *Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*: BI Waverly. Pvt Ltd.



- Martinez, J., Campetella, O., Frasch, A. C., & Cazzulo, J. J. (1991). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect Immun*, 59(11), 4275-4277.
- Maya, J., Cassels, B., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., . . . Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 601-620.
- Maya, J., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R., & Morello, A. (2010). Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy.
- McGhee, R., & Cosgrove, W. (1980). Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiological Reviews*, 44(1), 140-173.
- Miles, M. A., Feliciangeli, M. D., & de Arias, A. R. (2003). American trypanosomiasis (Chaga's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, 326(7404), 1444.
- Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, P. (2015). Programa Nacional de Chagas. Retrieved July 2nd, 2015
- Moncayo, A., & Silveira, A. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Morrot, A., Strickland, D. K., Higuchi Mde, L., Reis, M., Pedrosa, R., & Scharfstein, J. (1997). Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Int Immunol*, 9(6), 825-834.
- Muñoz, J., Portús, M., Corachan, M., Fumadó, V., & Gascon, J. (2007). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), 1161-1162.
- Murta, A. C., Persechini, P. M., Padron Tde, S., de Souza, W., Guimaraes, J. A., & Scharfstein, J. (1990). Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol*, 43(1), 27-38.
- Negrette, O. S., Mora, M. C., & Basombrio, M. Á. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, 115(6), e668-e672.
- Nokhodchi, A., & Asare-Addo, K. (2014). Drug release from matrix tablets: physiological parameters and the effect of food. *Expert opinion on drug delivery*, 11(9), 1401-1418.
- Olin-Sandoval, V., Moreno-Sanchez, R., & Saavedra, E. (2010). Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Current Drug Targets*, 11, 1614-1631.
- Pan American Health Organization, P. (2015). Chagas disease. General Information - Chagas Disease. Retrieved July 22nd, 2015, from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=4196
- Phaechamud, T., Koizumi, T., & Ritthidej, G. C. (2000). Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. *International Journal of Pharmaceutics*, 198(1), 97-111.
- Pinazo, M., Munoz, J., Posada, E., Lopez-Chejade, P., Gallego, M., Ayala, E., . . . Gascon, J. (2010). Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults.
- Quinteros, D., Allemandi, D., & Manzo, R. (2012). Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit e 100. *Sci Pharm*, 80(2), 487-496.
- Quinteros, D., Manzo, R., & Allemandi, D. (2010). Design of a colonic delivery system based on cationic polymethacrylate (Eudragit E100)-mesalamine complexes. *Drug delivery*, 17(4), 208-213.



- Quinteros, D., Manzo, R., & Allemandi, D. (2011). Interaction between Eudragit(R) E100 and anionic drugs: addition of anionic polyelectrolytes and their influence on drug release performance. *J Pharm Sci*.
- Ramírez-Rigo, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2006a). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid characterization and delivery properties. *Int J Pharm*.
- Ramírez-Rigo, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2006b). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid: characterization and delivery properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 322(1), 36-43.
- Ramírez-Rigo, M., Olivera, M., Rubio, M., & Manzo, R. (2014). Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 1-11.
- Ranaldi, G., Marigliano, I., Vespignani, L., Perozzi, G., & Sambuy, Y. (2002). The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(3), 157-167.
- Rassi, A. J., Rassi, A., & de Rezende, J. M. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America*, 26(2), 275-291.
- Rassi, A. J., Rassi, A., & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Ravaschino, E., Docampo, R., & Rodríguez, J. (2006). Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. *J. Med. Chem*, 49 (1), 426-435.
- Recommendations from a satellite meeting. . (1999). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 429-432.
- Rojó, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., . . . Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Trop*, 132, 112-118.
- Romero, V., Manzo, R., & Alovero, F. (2010). Enhanced bacterial uptake and bactericidal properties of ofloxacin loaded on bioadhesive hydrogels against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother*, 22(5), 328-334.
- Romero, V., Pons, P., Bocco, J., Manzo, R., & Alovero, F. (2012). Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 334(2), 102-110.
- Sartori, A. M., Ibrahim, K. Y., Nunes Westphalen, E. V., Braz, L. M., Oliveira, O. C., Jr., Gakiya, E., . . . Shikanai-Yasuda, M. A. (2007). Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol*, 101(1), 31-50. doi: 10.1179/136485907X154629
- Scharfstein, J., Schechter, M., Senna, M., Peralta, J., Mendonca-Previato, L., & Miles, M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, 137(4), 1336-1341.
- Schofield, C., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, 22(12), 583-588.
- Smith, C. (1993). Overview of drug discovery and development. In C. Smith (Ed.), *The Process of New Drug Discovery and Development* (Vol. 2). California (USA): CRC press.
- Sterin-Borda, L., Giordanengo, L., Joensen, L., & Gea, S. (2003). Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional and pathological implications. *Eur J Immunol*, 33(9), 2459-2468.
- Sun, W., Mao, S., Wang, Y., Junyaprasert, V. B., Zhang, T., Na, L., & Wang, J. (2010). Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 386(1), 275-281.



- Tarleton, R. L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 31(5), 550-554.
- Tártara, L. I., Quinteros, D. A., Saino, V., Allemandi, D. A., & Palma, S. D. (2012). Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), 102-109.
- Tyler, K., & Engman, D. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, 31(5-6), 472-481.
- U.S. National Library of Medicine, N. (2015). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2801, Clomipramine monograph, available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2801>. Retrieved December 22nd, 2015
- Urbina, J. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*, 62(1), 149-156.
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- USP33-NF28, U. S. P. C. (2010). General Chapter. En: The United States Pharmacopeia (USP) 33-National Formulary (NF) 28. Inc, Rockville, Maryland: United States Pharmacopeia Convention.: Inc.
- Velasco Martín, A. (2001). Absorción, distribución y eliminación de fármacos. In A. Velasco Martín (Ed.), *Compendio de Farmacología General* (pp. 23-51), Madrid, España: Ediciones Días de Santos S.A.
- Vila Jato, J. (1997). Tecnología Farmacéutica-Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. *Editorial Síntesis, Madrid*, 75-142.
- Vilches, A., Jimenez-Kairuz, A., Alovero, F., Olivera, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2002). Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 246(1), 17-24.
- Von, A., Zaragoza, E., Jones, D., Rodríguez-Morales, A. J., & Franco-Paredes, C. (2007). New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*.
- World Health Organization, W. (1991). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Retrieved 28th December, 2015, from <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/jh2924s/>
- World Health Organization, W. (2015a). Chagas disease. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. Retrieved July 22nd, 2015, from <http://www.who.int/tdr/research/ntd/chagas/en/>
- World Health Organization, W. (2015b). Chagas disease information. *The UNICEF-UNDP-Programme on TDR*.
- Yin, L., Ding, J., He, C., Cui, L., Tang, C., & Yin, C. (2009). Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 30(29), 5691-5700.
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., . . . Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051-1054.
- Zoppi, A., Linck, Y. G., Montí, G. A., Genovese, D. B., Jimenez Kairuz, Á. F., Manzo, R. H., & Longhi, M. R. (2012). Studies of pilocarpine:carbomer intermolecular interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), 252-259.



CAPÍTULO 2:

**PRINCIPIOS ACTIVOS Y EXCIPIENTES
SELECCIONADOS**



Capítulo 2:

Principios activos y excipientes seleccionados

2.1. Consideraciones generales

Como se mencionó en el capítulo *Introducción general y objetivos*, entre los factores determinantes que influyen en la estrategia de diseño de medicamentos se encuentran la forma farmacéutica y las propiedades fisicoquímicas y biológicas del principio activo. Es por ello que, la selección, tanto de los materiales portadores como de los F, es uno de los pasos más importantes en el diseño racional de sistemas farmacoterapéuticos.

En particular, durante la I+D de sistemas portadores de F, la correcta selección de las macromoléculas que actuarán como portadores y de las moléculas bioactivas que integrarán el sistema, condicionará no sólo las características del procedimiento de obtención y del producto, sino también sus potenciales aplicaciones.

Además, es de suma relevancia destacar la importancia de la vía de administración y el grado de aceptación por parte del paciente al tratamiento farmacoterapéutico propuesto.

2.2. Fármacos seleccionados

Dada la característica específica de la enfermedad de Chagas, se seleccionaron F de reconocida utilidad terapéutica con acción tripanocida. Específicamente, este trabajo de tesis se focalizó en los F: benznidazol (BZ) y clomipramina (CMP), cuyas propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de interés, que justifican su elección, se presentan a continuación.

2.2.1. Benznidazol

El BZ fue desarrollado hace más de 50 años; fue fabricado y distribuido por Roche (Rochagan[®]) en Brasil y (Radanil[®]) en Argentina hasta 2012. Luego se interrumpió la producción del principio activo y del medicamento. Actualmente, los laboratorios Maprimed y ELEA (Abarax[®]) producen, en Argentina, el BZ y el medicamento,

respectivamente. El Abarax® se comercializa bajo la presentación de comprimidos convencionales con dosis de 50 y 100 mg de BZ (Abarax ELEA Lab, 2016)

El BZ es el F de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, debido a que presenta una remarcada actividad anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Coura & de Castro, 2002; Urbina, 2010; Von, Zaragoza, Jones, Rodríguez-Morales, & Franco-Paredes, 2007) y una actividad tripanocida significativa en la fase aguda, con un 60 – 80 % de la cura parasitológica (Urbina & Docampo, 2003; Von et al., 2007). Sin embargo, presenta numerosos y diversos efectos adversos, los cuales se presentan con mayor frecuencia y severidad en los adultos mayores de 18 años, en comparación con los niños (Pinazo et al., 2010; Urbina & Docampo, 2003).

2.2.1.1. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de BZ

El BZ (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida) es un derivado nitroimidazólico. En la Figura 2.1 se puede observar la estructura química de este F.

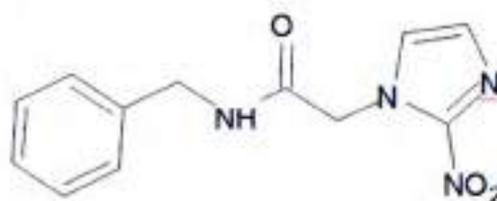


Figura 2.1. Estructura química de BZ

En la Tabla 2.1 se resumen algunas propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del BZ, que resultan de relevancia para la comprensión de los diferentes parámetros que son estudiados en este trabajo de tesis.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de interés del BZ

Fármaco	pK _a	S _{ac} (mg/mL)	PM (g/mol)	CLogP	BD _o	Dosis (mg/día)
Benznidazol (BZ)	Nd	0,4*	260,26**	0,9**	91,7***	5-10/kg 200-600

Nd: No descripto; S_{ac}: solubilidad acuosa; PM: peso molar, CLogP: coeficiente de partición calculado teóricamente, BD_o: biodisponibilidad oral

*(Kasim et al., 2004); **(U.S. National Library of Medicine, 2015b); *** (Raaflaub & Ziegler, 1978)

Como se puede observar en la Tabla 2.1, BZ presenta una baja solubilidad acuosa, lo cual condiciona, en gran medida, su acción medicamentosa (García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015).



La dosis de BZ recomendada en la fase aguda de la enfermedad es 5-7 mg/kg/día para adultos y de 10 mg/kg/día para niños de hasta 12 años. La administración se realiza en dos tomas diarias (World Health Organization, 1991). La duración promedio del tratamiento es 60 días, pero en casos de reactivación de la enfermedad crónica, como en los pacientes inmunosuprimidos, la duración puede prolongarse hasta 5 meses o más. Sólo en infecciones accidentales, sea a través del vector, por transfusión de sangre o por contaminación en el laboratorio, la duración del tratamiento es de 10-15 días (Viotti, Vigliano, Armenti, & Segura, 1994).

El mecanismo de acción de BZ es a través de la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos (Maya et al., 2007). En la Figura 2.2 se observa que el grupo nitro del BZ, por acción de nitroreductasas, requiere de un proceso de transferencia de electrones para reducirse a grupo amino, lo cual genera radicales libres y metabolitos electrofílicos. El proceso mediante el cual se forman los radicales libres se inicia por una reacción catalizada por flavoproteínas, incluyendo la NADPH-citocromo P-450 reductasa, que actúa directamente sobre el grupo nitro de las moléculas R-NO₂, produciendo un radical intermediario anión nitro (R-NO₂⁻) (Moreno, Docampo, Mason, Leon, & Stoppani, 1982). Este radical intermediario, entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular, produciendo una reducción parcial del oxígeno y regenerando el F (Mason & Holtzman, 1975). El anión superóxido (O₂⁻) es dismutado a H₂O₂ por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Temperton, Wilkinson, Meyer, & Kelly, 1998). El O₂⁻ y el H₂O₂, en presencia de Fe²⁺, forman el radical libre hidroxilo (OH·) (Reacción de Haber-Weiss). Estos radicales libres, fundamentalmente el OH·, alteran la estructura de macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y ADN.

Por otro lado, la generación de radicales nitro provenientes del BZ, tiene un efecto importante sobre el proceso infectivo de los tripanosomas, ya que mejoran la fagocitosis y aumentan la muerte del parásito (Castro, Montalto de Mecca, & Bartel, 2006). Además, se ha descrito que el BZ inhibe la NADH-fumarato reductasa del *T. cruzi*, lo que produce alteraciones en la cadena respiratoria en el parásito (Turrens, Watts, Zhong, & Docampo, 1996). Además, gatillaría la expansión de células T CD8+, lo cual puede promover la resistencia a una eventual reinfección, dadas las propiedades antiparasitarias de estas células (Olivieri, Cotta-de-Almeida, & Araújo-Jorge, 2002).

Cabe destacar que, para poder llevar a cabo este trabajo de tesis, fue necesario poner a punto una metodología de extracción y purificación de BZ desde los



comprimidos comerciales disponibles (Radanil®). Esto debió realizarse debido a que no se disponía del BZ puro para adquirirlo comercialmente y sólo se contaba con los comprimidos de Radanil® vencidos, gentilmente suministrados por la Coordinación Nacional de Control de Vectores (sede Córdoba) dependiente del Ministerio de Salud de la Nación. El detalle metodológico y los resultados obtenidos respecto de la caracterización de BZ extraído y purificado se presentan en el Anexo 1. Sin embargo, resulta de relevancia mencionar que el BZ se obtuvo con un buen porcentaje de rendimiento, $(87 \pm 2) \%$, con un alto grado de pureza, $(99,2 \pm 0,5) \%$, y cumple con las especificaciones de la Farmacopea Internacional (World Health Organization, 2015).

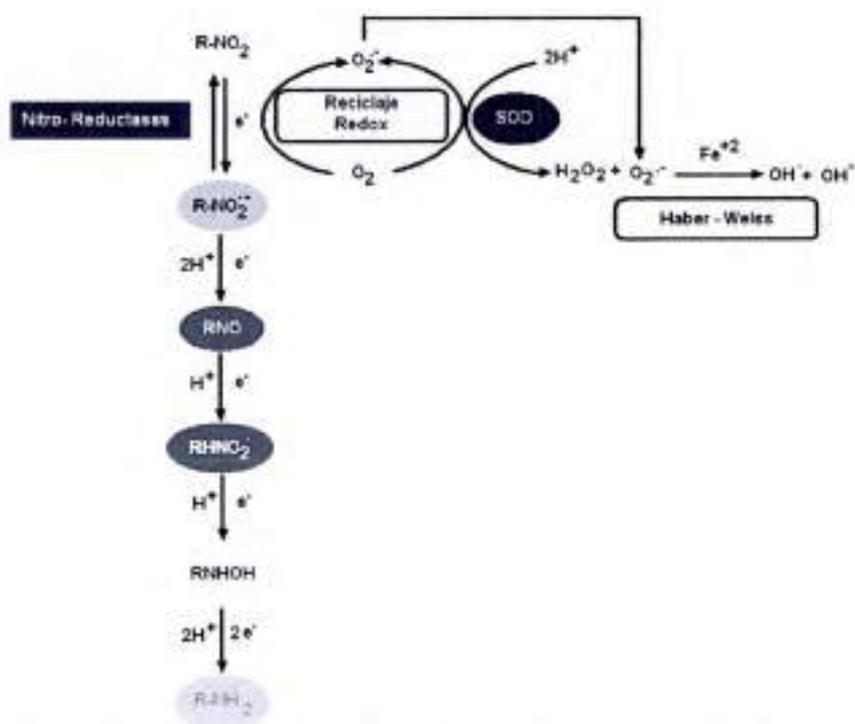


Figura 2.2. Esquema de los pasos involucrados en el mecanismo de acción de BZ.

2.2.2. Clomipramina

La CMP es un antidepresivo tricíclico que actúa mediante la reducción de la recaptación de serotonina y noradrenalina en el sistema nervioso central (Balant-Gorgia, Gex-Fabry, & Balant, 1991).

2.2.2.1. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de CMP

En cuanto a su estructura, la CMP (3-(3-cloro-10,11-dihidro-5H-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-N,N-dimetilpropan-1-amina) es un derivado de la dibenzazepina a la que se le añade un átomo de cloro, mediante una reacción de



sustitución electrofílica aromática (Agranat, 2009). En la Figura 2.3 se presenta la estructura química de este F antidepresivo.

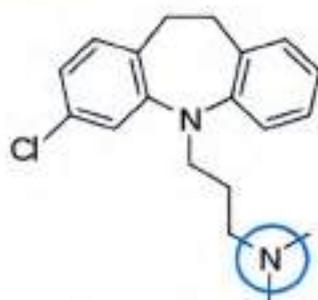


Figura 2.3. Estructura química de CMP

En la Tabla 2.2 se resumen las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de CMP, que resultan de relevancia para la comprensión de los diferentes parámetros que son estudiados en este trabajo de tesis.

Para el tratamiento de la depresión, las dosis habitualmente utilizadas de CMP se encuentran en el rango de 25 a 200 mg/kg/día (Álborg, 1999). Sin embargo, como se mencionó previamente, este F también presenta acción tripanocida (de Barioglio, Lacuara, & de Oliva, 1987) y, en estos casos, las dosis a emplear en humanos serían significativamente menores, con el fin de evitar o reducir los efectos adversos que se podrían presentar a nivel central. En los trabajos reportados en animales de experimentación, la dosis empleada de CMP, para la acción tripanocida, fue de 5 mg/kg/día, administrada por vía intraperitoneal sobre modelos murinos de Chagas experimental (Gobbi et al., 2010; Strauss et al., 2013).

Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de interés de la CMP*

Fármaco	pK _a	S _{ac} (mg/L)	PM (g/mol)	LogP	BD _o	Dosis (mg/día)
Clomipramina (CMP)	8,98	0,293	314,85	5,2	~ 50% (errática)	25-150

S_{ac}: solubilidad acuosa; PM: peso molar, LogP: coeficiente de partición octanol/agua; BD_o: biodisponibilidad oral reportada para CMP clorhidrato

* (U.S. National Library of Medicine, 2015a)

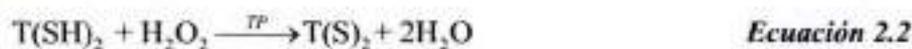
Para poder comprender el mecanismo de acción tripanocida de CMP, es necesario dejar en claro que, en los mamíferos, el sistema de defensa redox se basa principalmente en las enzimas glutatión oxidasa y glutatión reductasa. Sin embargo, en los *Trypanosomas*, este sistema de defensa es reemplazado por uno análogo, basado en las enzimas tripanotona peroxidasa (TP) y tripanotona reductasa (TR) (Fairlamb, Blackburn, Ulrich, Chait, & Cerami, 1985). Las similitudes que presenta



en su acción, comparada con el glutatión reductasa, sugieren que la TR podría tener una función crucial en el secuestro de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, que se forman en los procesos metabólicos cuando los parásitos se encuentran sujetos a estrés oxidativo por la respuesta inmune del huésped (Olin-Sandoval, Moreno-Sanchez, & Saavedra, 2010). En particular, la TR interviene en reacciones redox dependientes de NADPH y es la responsable de la conversión de la forma oxidada T(S)₂ [forma disulfuro - tripanotona oxidada] a la forma reducida T(SH)₂ [forma dihidrosulfuro - tripanotona reducida] (Pita & Pascutti, 2012), como se puede observar en la Ecuación 2.1.



Su acción, junto con la TP, contribuye a un eficaz sistema desintoxicante de hidroperóxidos en los *Trypanosomas*. Como se puede observar en la Ecuación 2.2, luego de que se forma la especie T(SH)₂, la acción de la TP permite la regulación de las especies reactivas del oxígeno al oxidar el H₂O₂ a H₂O (Krauth-Siegel & Schöneck, 1995).



De este modo, la TR se constituye en un blanco molecular específico en el *T. cruzi* (Ravaschino, Docampo, & Rodriguez, 2006). En particular, CMP interactúa con las membranas, con proteínas celulares, con receptores dopaminérgicos, inhibe la actividad ATP-asa dependiente de Mg²⁺, aumentan la fluidez de la membrana y presentan una marcada actividad anticalmodulina (Bondy, 1995; Paglini-Oliva & Rivarola, 2003).

En estudios previos, de Barioglio *et al.* (1987), demostraron que uno de los efectos tripanocidas de CMP se debe a su acción anticalmodulina y, a que *in vitro*, inhibe la motilidad y produce muerte de los trypomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* (de Barioglio *et al.*, 1987). Estudios experimentales realizados en ratones demostraron que produce la muerte de trypomastigotes y, además, disminuye los síntomas de la cardiomiopatía (Gobbi *et al.*, 2010; Rivarola *et al.*, 2005). La particularidad más destacable que presenta CMP, en su mecanismo de acción, es la capacidad de actuar como inhibidor directo de la TR. La actividad del sistema activado tricíclico-peroxidasa, a través de tres peroxidases diferentes, fue reportado por Gutierrez-Correa *et al.* (2001) y, a partir de su estudio, se apoya la hipótesis según la cual los radicales catiónicos producidos por peroxidación de los F tricíclicos, entre ellos CMP, inhiben a la TR (Gutierrez-Correa, Fairlamb, & Stoppani, 2001). En la Figura 2.4 se



representa esquemáticamente la interacción entre CMP y la TR a partir de lo reportado en la bibliografía (Pita & Pascutti, 2012).

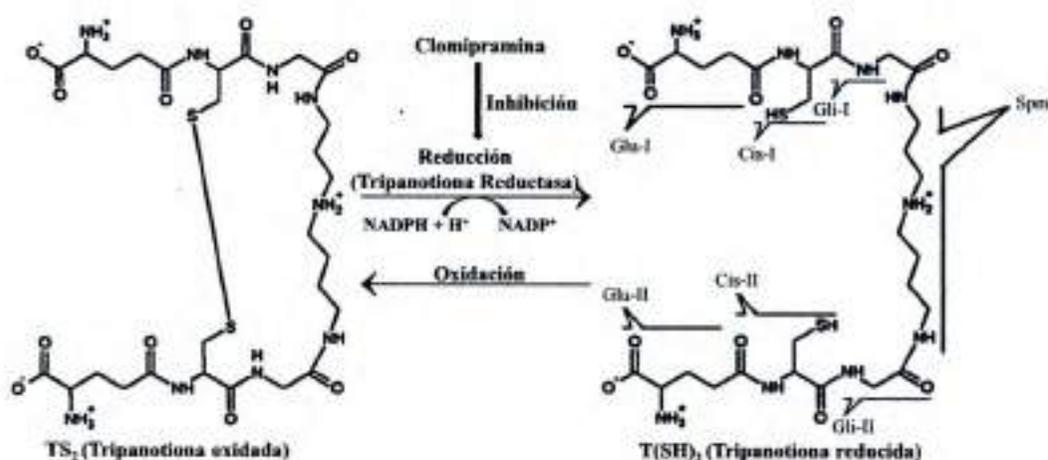


Figura 2.4. Interacción de clomipramina con TR. Modificado de (Pita & Pascutti, 2012).

Cabe destacar que, para poder utilizar la CMP en el desarrollo de los sistemas portadores, fue necesario poner a punto una metodología para neutralizar la sal clorhidrato de CMP, que es la forma en la que se dispone comercialmente. El detalle metodológico inherente a esto se detalla en el Anexo 2. Sin embargo, resulta de relevancia resaltar que, la metodología desarrollada, permitió obtener CMP neutra, en forma de sólido cristalino, con > 70 % de rendimiento.

2.3. Polielectrolitos seleccionados

La selección de los PE, basada fundamentalmente en sus características fisicoquímicas, tuvo en cuenta también otros criterios, tales como ausencia de toxicidad, impacto en su utilización, costo y disponibilidad en el mercado.

Para el desarrollo de los sistemas portadores propuestos, se consideró la selección de polímeros que son ampliamente utilizados en farmacia, sobre la base de que éstos presenten una seguridad que esté clínicamente probada y cuyo comportamiento *in vivo* se encuentre minuciosamente estudiado.

2.3.1. Polimetacrilatos

En particular, los copolímeros del ácido metacrílico y diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos de interés farmacéutico, son macromoléculas lineales, conocidas comercialmente como Eudragit®. Se dispone de una amplia variedad de presentaciones de estos polimetacrilatos, con diferentes características y aplicaciones



en tecnología farmacéutica, principalmente, orientadas a localizar la acción de los F en formas farmacéuticas de administración por vía per-oral (Degussa Pharma, 2007; Dittgen, Durrani, & Lehmann, 1997). Estos polímeros, han sido ampliamente utilizados en comprimidos, gránulos, micro y nanopartículas, generalmente como agentes de recubrimiento o como ligantes en los procesos de granulación para la producción de comprimidos matriciales (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009). Debido a la baja temperatura de transición vítrea (T_g) que presenta un grupo de Eudragit[®], además de las aplicaciones mencionadas previamente, han comenzado a utilizarse como materiales fusibles en granulación por fusión-extrusión, un nuevo procedimiento que se introduce en el área de la tecnología farmacéutica, para producir *pellets* esféricos y compactos, sin la necesidad de utilizar solventes (Degussa Pharma, 2007; Nollenberger & Albers, 2012).

Los polimetacrilatos son ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas, por ser considerados no tóxicos y no irritantes. Sobre la base de estudios de toxicidad oral en ratas, una cantidad de Eudragit[®] de 2-200 mg/kg/día es considerada segura en humanos (Rowe et al., 2009). Además, estos materiales se encuentran incluidos en las bases de datos de la U.S. Food and Drug Administration y forman parte de la lista GRAS (*generally recognized as safe*), para su utilización en la formulación de cápsulas orales y comprimidos. Paralelamente, se encuentran aprobados en el Reino Unido para uso no parenteral y están incluidos en el listado de excipientes aceptables de Canadá (Chatterjee & Alvi, 2014; Rowe et al., 2009).

Si se tiene en cuenta la estructura química de los Eudragit[®], éstos pueden dividirse en dos clases, en función de si sus propiedades son dependientes o sensibles al pH o si son independientes de éste parámetro. La primera clase, correspondiente a los Eudragit[®] con propiedades dependientes del pH, incluye los copolímeros con unidades monoméricas ionizables en sus estructuras, lo cual provoca que sean solubles en determinadas secciones del TGI. En este sentido se tiene, por un lado, los poliacrilatos, como el Eudragit[®] E, que son solubles en el entorno ácido del estómago, mientras que los polianiones, como los Eudragit[®] L, S y FS, son estables e insolubles a pH ácido, pero se disuelven a pH más elevados, como el que se puede encontrar en las distintas secciones del intestino. Las particularidades inherentes a cada una de estas propiedades, permiten que sean aprovechadas en el diseño y desarrollo los sistemas "inteligentes" de liberación modificada, que liberan al F en una determinada sección del TGI. Algunos ejemplos de estos incluyen los sistemas gastro-retentivos, de liberación retardada o pulsátil (Thakral, Thakral, & Majumdar, 2013).



La segunda clase consiste en los Eudragit® cuyas propiedades son independientes del pH. Esta propiedad se la confiere la presencia de grupos funcionales en sus estructuras, que se encuentran ionizados en todo el intervalo de pH. Dentro de este grupo se incluyen los Eudragit® RS y RL, que poseen en su estructura, aproximadamente, un 5-10 % de amonios cuaternarios. Dentro de esta clase, también se encuentran los Eudragit® neutros, que no presentan grupos ionizables en su estructura, debido a que todas las unidades de ácido metacrílico se encuentran esterificadas. Este grupo de polimeros se utiliza, más frecuentemente, en el diseño de sistemas “inertes” de liberación extendida o prolongada (Thakral et al., 2013).

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se seleccionaron cinco polimetacrilatos donados gentilmente por Etilfarma Argentina (Evonik Röhm GmbH): Eudragit® EPO (EuE) que presenta características básicas y Eudragit® L100 (EuL), Eudragit® L10055 (EuLD), Eudragit® S100 (EuS) y Eudragit® FS 30 D (EuFS), que presentan características ácidas. Todos son polimeros lineales y flexibles, sin entrecruzamientos, que generan dispersiones acuosas de baja viscosidad. En la Tabla 2.3 se presentan las principales características fisicoquímicas de los polimetacrilatos seleccionados.

2.3.1.1. Eudragit® EPO

El EuE es un copolímero lineal catiónico constituido por grupos dimetilaminoetilmetacrilatos (DMAEMA) y otros ésteres neutros del ácido metacrílico (Figura 2.5). Este polímero se presenta como un polvo blanco y exhibe el característico olor a las aminas.

Los grupos funcionales aminos del EuE dan lugar a la formación de películas solubles a pH ácido, que resultan de utilidad para liberación de F a nivel gástrico, para conseguir un efecto protector frente a la humedad y otros factores ambientales, o bien, para el enmascaramiento de las propiedades organolépticas desfavorables de algunos F.

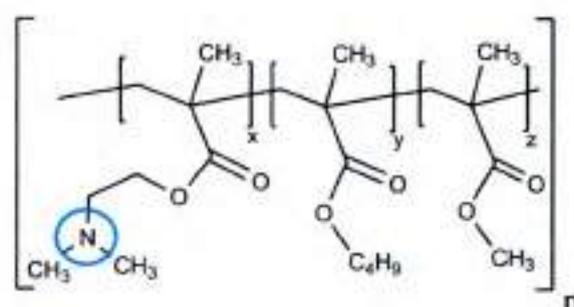


Figura 2.5. Estructura química del Eudragit® EPO

2.3.1.2. Eudragit® L100 y S100

Los EuL y EuS son copolímeros aniónicos lineales basados en unidades de ácido metacrílico y de ésteres metilmetacrilato (Figura 2.6). La proporción de monómeros con grupos ácidos libres y ésteres es aproximadamente 1:1 en el EuL y 1:2 en el EuS (Degussa Pharma, 2007; Thakral et al., 2013).

Estos polímeros se presentan como polvos blancos, con olor característico y son solubles en soluciones con valor de pH cercanos a la neutralidad.

En particular, las formas aniónicas de los EuL y EuS, que incorporan en su estructura grupos carboxílicos, se ionizan y son solubles a valores más elevados de pH (pH > 6 y 7, respectivamente) y, por lo tanto, son útiles para ser aplicados como materiales gastro-resistentes (Chang, Peng, Trivedi, & Shukla, 2009).

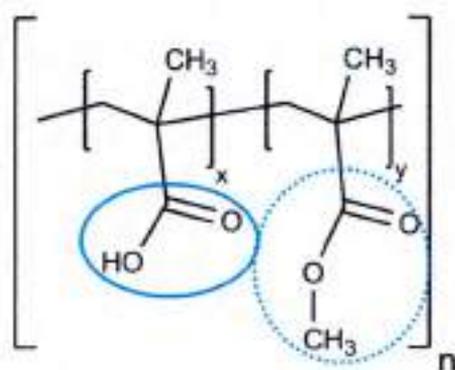


Figura 2.6. Estructura química de los Eudragit® L100 (EuL) y S100 (EuS). La relación de grupos ácidos carboxílicos/unidades ésteres es 1:1 en EuL y 1:2 en EuS.

2.3.1.3. Eudragit® L100 55

El EuLD es un copolímero aniónico lineal basado en unidades de ácido metacrílico y ésteres de etilacrilato (Figura 2.7), que se obtiene mediante secado por spray a partir del Eudragit® L 30 D55, que se presenta como una dispersión acuosa. La proporción de monómeros con grupos ácidos libres y ésteres es 1:1 (Chang et al., 2009; Thakral et al., 2013).

Este polímero se presenta como un polvo blanco, que puede ser redispersable en agua y da lugar a la formación de una dispersión opalescente, con propiedades similares al Eudragit® L 30 D55, del cual deriva. Este tipo de polímeros es de utilidad en el recubrimiento de sistemas matriciales o comprimidos, ya que se disuelve a pH > 5,5 y, por lo tanto, es insoluble en medio gástrico, pero soluble en las primeras porciones del intestino, lo cual permite una liberación del F sitio-específica (Chang et al., 2009).

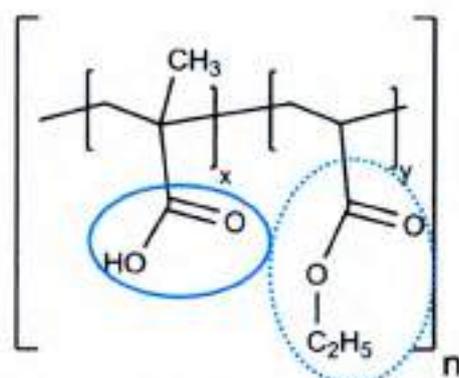


Figura 2.7. Estructura química del Eudragit® L100 55

2.3.1.4. Eudragit® FS 30 D

El EuFS se presenta como una dispersión acuosa de un copolímero aniónico basado en unidades de ácido metacrílico y ésteres de metilacrilato y metilmetacrilato (Figura 2.8). La proporción de monómeros con grupos ácidos libres y ésteres es aproximadamente 1:10 (Chang et al., 2009; Thakral et al., 2013).

Éste es un polímero flexible y de gran utilidad como agente de cobertura externa en las formas farmacéuticas sólidas. Debido a que se disuelve a $\text{pH} > 7$, es de preferencia para lograr liberación de F a nivel colónico (Chang et al., 2009).

Debido a que este polímero se presenta comercialmente como una dispersión acuosa, para su utilización en este trabajo de tesis se obtuvo el material en estado sólido mediante liofilización de la dispersión acuosa, congelada previamente a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo cual se utilizó un liofilizador Labconco® Freeze Dry System/Freeze Zone 6 (Kansas City, MO, USA).

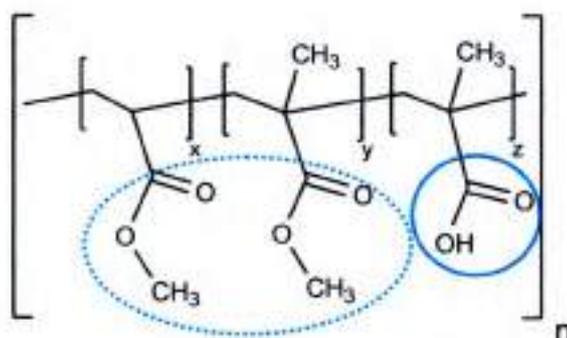


Figura 2.8. Estructura química del Eudragit® FS 30 D

Como se puede observar en las estructuras químicas de los polimetacrilatos aniónicos (Figuras 2.6-8), todos ellos presentan como grupo funcional característico al ácido carboxílico, pero se diferencian en los sustituyentes que presenta la unidad monomérica, que en algunos casos corresponde a ésteres metilmetacrilato (EuL y



EuS), en otros a ésteres etilacrilato (EuLD) o bien, a ésteres de metilacrilato y metilmetacrilato (EuFS). Estas particularidades en su estructura les confieren propiedades características y particulares, principalmente en lo que refiere a su solubilidad en función del pH, como puede observarse en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Características y propiedades fisicoquímicas de interés de los polimetacrilatos seleccionados

Propiedades	Polimetacrilatos seleccionados del tipo Eudragit®				
	Catiónicos	Aniónicos			
	EPO	L100	S100	L100 55	FS 30 D
Composición química*	Poli(butil metacrilato, (2-dimetilaminoetil) metacrilato, metil metacrilato) 1:2:1	Poli(ácido metacrílico, metil metacrilato) 1:1	Poli(ácido metacrílico, metil metacrilato) 1:2	Poli(ácido metacrílico, etilacrilato) 1:1	Metilacrilato, metilmetacrilato y ácido metacrílico
Peso molar** [g/mol]	~ 47000	~ 125000	~ 125000	~ 320000	~ 280000
pKa	8,4*	6,0**	~ 6***	~ 7****	~ 7****
Solubilidad***	Soluble en metanol, etanol, 2-propanol, acetona	Soluble en acetona, etanol 95 %, metanol y 2-propanol	Soluble en acetona, etanol 95 %, metanol y 2-propanol y NaOH 1 N	Soluble en acetona, etanol 95 %, metanol y 2-propanol y NaOH 1 N	-
Disolución en función del pH†	Soluble en fluido gástrico a pH < 5	Soluble en fluido intestinal a pH > 6	Soluble en fluido intestinal a pH > 7	Soluble en fluido intestinal a pH > 5,5	Soluble a pH > 6,8
Viscosidad [mPa.s]***	3-6	50-200	50-200	50-200	420
Densidad* [g/cm³]	0,811-0,821	0,831-0,852	0,831-0,852	0,821-0,841	1,058-1,068
Temperatura de transición vítrea* [°C]	- 48	No es posible determinar el valor debido al solapamiento con el daño de los grupos funcionales a temperaturas > 150 °C		- 110	- 48
Equivalentes de grupos ionizables/g de polímero‡	3,15.10 ⁻³ de grupos -N(CH ₃) ₂	4,85.10 ⁻³ de grupos -RCOOH	4,28.10 ⁻³ de grupos -RCOOH	5,30.10 ⁻³ de grupos -RCOOH	3,70.10 ⁻⁴ de grupos -RCOOH

* (Thakral et al., 2013); ** (Evonik Industries, 2016); *** (Chang et al., 2009); † (Menjoge & Kulkarni, 2007); ‡ (Laulicht, Tripathi, & Mathiowitz, 2011); § (Li, 2005); ¶ Se informa el valor correspondiente al ácido polimetacrílico (Katchalsky & Spitnik, 1947); † Determinado experimentalmente, de acuerdo con el detalle presentado en el apartado 2.2.3.

Como se puede observar en las estructuras químicas de los polimetacrilatos aniónicos (Figuras 2.6-8), todos ellos presentan como grupo funcional característico al ácido carboxílico (delimitado por línea continua), pero se diferencian en los sustituyentes que presenta la unidad monomérica (delimitado por línea discontinua), que en algunos casos corresponde a ésteres metilmetacrilato (EuL y EuS), en otros a



ésteres etilacrilato (EuLD) o bien, a ésteres de metilacrilato y metilmetacrilato (EuFS). Estas particularidades en su estructura, les confieren propiedades características y peculiares, principalmente, en lo que refiere a su solubilidad en función del pH, como puede observarse en la Tabla 2.3.

2.3.2. Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros naturales formados por la unión de monosacáridos que se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos. En la naturaleza, los polisacáridos se pueden obtener de diferentes fuentes, tales como los alginatos, que se obtienen de algas; la pectina y la goma guar, que se obtienen de plantas; dextran y goma xantan, que son de origen microbiano; chitosan y condroitin, que son de origen animal (Sinha & Kumria, 2001).

Estos polímeros, pueden presentar un gran número de grupos funcionales reactivos y pueden llegar a tener pesos moleculares muy diversos, dependiendo del número de residuos o unidades de monosacáridos, es decir, de su composición química, lo que contribuye a la gran diversidad en estructuras y propiedades de estos polímeros (Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008; Sinha & Kumria, 2001).

Los polisacáridos son biomateriales naturales, altamente estables, seguros, no tóxicos, hidrofílicos y biodegradables, propiedades que les confieren biocompatibilidad y una gran versatilidad para ser utilizados en el ámbito farmacéutico (Laurienzo, 2010; Lee, Park, & Robinson, 2000). La mayoría de los polisacáridos naturales presentan en su estructura grupos hidroxilos, carboxilos y aminos, que les permiten formar enlaces no covalentes con los tejidos biológicos, tales como los epitelios o las mucosas, lo que favorece el proceso de bioadhesión. Por ejemplo, el chitosan y los alginatos son buenos materiales bioadhesivos que permiten prolongar el tiempo de residencia de una formulación y, en consecuencia, aumentar la absorción de los F que vehiculizan (Lee et al., 2000).

Las propiedades particulares que presentan estos polímeros en cuestiones de seguridad, toxicidad y disponibilidad, los hacen muy interesantes en el diseño y desarrollo de sistemas para liberación controlada de F y, desde hace varios años, se vienen utilizando con diferentes propósitos en el ámbito farmacéutico (Lemarchand, Gref, & Couvreur, 2004; Rubinstein, 2000).

Dadas las características de biocompatibilidad y biodegradabilidad, estos polímeros se encuentran incluidos en la lista GRAS de la U.S. Food and Drug Administration para su utilización en farmacia (Dornish, Kaplan, & Skaugrud, 2001).

Estos polímeros, también pueden dividirse en PE y no PE. Dentro del primer grupo, se puede hacer una clasificación adicional, en catiónicos o aniónicos (Liu et al., 2008).

Para el desarrollo de este trabajo de tesis, se seleccionaron dos polisacáridos que se comportan como PE: quitosan (Chi) de bajo peso molecular, como polímero catiónico y ácido alginico (AA), como polímero aniónico. En la Tabla 2.4 se presentan las principales características fisicoquímicas de los polisacáridos seleccionados.

2.3.2.1 Chitosan

El Chi es un copolímero compuesto por unidades repetitivas de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, que se obtiene por la desacetilación parcial de la quitina (Figura 2.9). El Chi es una biomolécula extraída de las "cáscaras" de crustáceos marinos, tales como langostas, cangrejos y gambas, así como en otros con exoesqueleto o caparazón (Illum, 1998; Singla & Chawla, 2001).

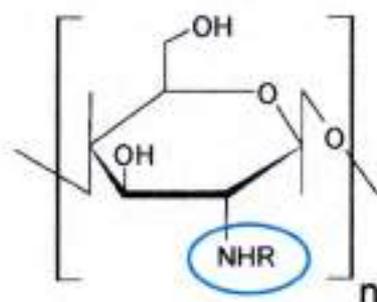


Figura 2.9. Estructura química del quitosan

Este polímero es utilizado en la industria cosmética y se encuentra bajo investigación para su uso en numerosas formulaciones farmacéuticas, en particular para su aplicación en sistemas de liberación modificada de F (Jones, 2009; Kas, 1997; Singla & Chawla, 2001). Dentro de estas aplicaciones, se destacan su uso en formulaciones mucoadhesivas, en sistemas de liberación a nivel colónico, formas farmacéuticas de muy rápida liberación del F, para optimizar la liberación de péptidos, como agente viscosante, entre otras. Se ha utilizado para obtener geles, films, microesferas, comprimidos, para llevar a cabo procesos de granulación convencional, secado por spray, entre otras aplicaciones (Jones, 2009; Singla & Chawla, 2001).

El Chi es inodoro y se presenta como un polvo blanco o amarillo (Jones, 2009). El grado de desacetilación y el peso molecular de este polímero son los principales

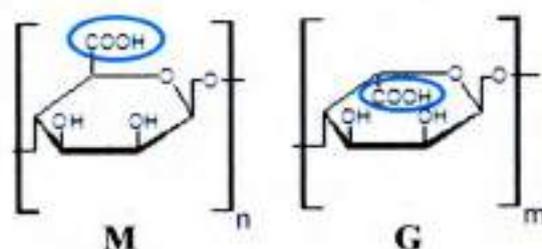


parámetros que permiten definir sus características físicas y químicas, que son las que condicionarán sus aplicaciones. Una limitación en su uso se debe a la baja solubilidad acuosa en un amplio intervalo de pH, debido a que este polímero sólo se disuelve en soluciones ácidas diluidas de $\text{pH} < 5$ (Berth & Dautzenberg, 2002; Berth, Dautzenberg, & Peter, 1998).

2.3.2.2 Ácido alginico

El AA es un polímero natural proveniente de diferentes fuentes naturales. En particular, en este trabajo de tesis se utilizó uno proveniente de algas marinas pardas, de la especie *Macrocystis pyrifera*. En estas algas, el AA es el polisacárido más abundante y comprende el 40 % del peso seco del vegetal.

Este copolímero es lineal y está constituido por unidades de ácidos α -(1 \rightarrow 4)-L-gulurónico (G) y β -(1 \rightarrow 4)-D-manurónico (M) (Figura 2.10).



Unidades manurónico (M) y gulurónico (G)

Figura 2.10. Estructura química del ácido alginico

Las unidades G y M se ubican en el polímero formando bloques homogéneos, que son separados por otros de unidades alternantes y la proporción de éstos es diferente, según el origen del polímero. En la Figura 2.11 se observan los diferentes tipos de bloques, de unidades alternativas, que se pueden presentar en el ácido alginico, que dependen de las especies de las cuales se extrae el polímero (Tønnesen & Karlsen, 2002). Esto se debe a que, durante la biosíntesis del polímero, las cadenas de poli-manuronato son sustrato de la C-5-epimerasa que transforma las unidades M en G, cuya actividad depende de la especie, edad, condiciones de crecimiento, sección del vegetal, estación del año, entre otros (Gacesa, 1988).

El AA es prácticamente inodoro e insípido y se presenta como un polvo blanco o amarillo pálido (Repka & Singh, 2009). Se utiliza en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y textil, para espesar soluciones, como agente gelante y para formar películas sobre diferentes superficies. En particular, en el ámbito farmacéutico se utiliza tradicionalmente como excipiente en formas farmacéuticas orales y tópicas

de liberación inmediata, como agente estabilizante de suspensiones y emulsiones, desintegrante de comprimidos y cápsulas, ligante en comprimidos y viscosante de pastas y cremas (Repka & Singh, 2009).

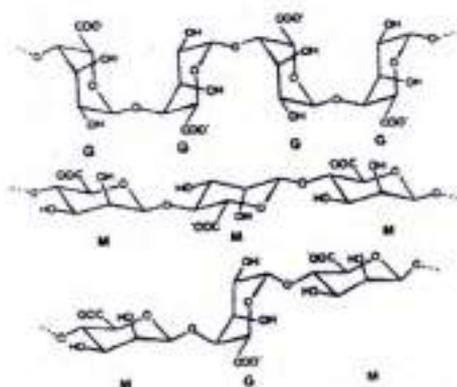


Figura 2.11. Tipos de bloques en la estructura química del ácido alginico
 (extraído de *Alginate in drug delivery systems* (Tønnesen & Karlsen, 2002))

Además, existen antecedentes del uso de AA o sus sales en formulaciones líquidas de liberación modificada para administración oral, ocular y transdermal, debido a su capacidad de gelificar en presencia de fluido gástrico (Zatz & Woodford, 1987) o en presencia de cationes divalentes (Miyazaki, Kubo, & Attwood, 2000). Sus propiedades mucoadhesivas permiten aumentar el tiempo de residencia de las formulaciones oftálmicas (Ludwig, 2005).

Como se puede observar, todos los polielectrolitos seleccionados han sido ampliamente utilizados con diferentes propósitos en el área farmacéutica. La particularidad de la selección realizada en esta tesis, se fundamenta en el aprovechamiento de las propiedades particulares que cada uno de estos materiales exhibe; dentro de las cuales, se destacan las características de éstos que permiten modular la liberación de los F que vehiculizan. Se pretende hacer uso de dichas potencialidades, a los fines de proponer alternativas superadoras, en lo que respecta a la optimización de la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas, a través del diseño y desarrollo de nuevos sistemas portadores de los F tripanocidas seleccionados.



Tabla 2.4. Características y propiedades fisicoquímicas de interés de los polisacáridos seleccionados

Propiedades	Polisacáridos seleccionados	
	Catiónico	Aniónico
	Chitosan	Ácido alginico
Composición química	Poli-β-(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa*	6-(2-carboxilato-4,5-dihidroxi-6-metoxioxan-3-il)oxi-4,5-dihidroxi-3-metoxioxano-2-carboxilato**
Peso molar [g/mol]	10000–1000000* (depende del tipo y del grado de desatilación)	20000–240000**
pKa	6,3*	3,38 (M) y 3,65 (G)**
Solubilidad	Soluble en soluciones diluidas y concentradas de ácidos orgánicos e inorgánicos (excepto en ácido fosfórico y sulfúrico)*	Soluble en hidróxidos alcalinos y muy ligeramente soluble en etanol (95 %) y otros solventes orgánicos. En agua se hincha, pero no se disuelve
Disolución en función del pH	Soluble en fluido gástrico de pH < 6,5*	Soluble en fluido intestinal de pH > 5**
Viscosidad [mPa.s]	50-260* (en soluciones ácidas al 1 %)	20-2000** (dispersión al 0,5 % y 2 %, respectivamente)
Densidad [g/cm³]	1,35–1,40*	1,601**
Temperatura de transición vítrea [°C]	203*	-110***
Equivalentes de grupos ionizables/g de polímero[†]	5,11.10 ⁻³ de grupos -NH ₂	4,4.10 ⁻³ de grupos -RCOOH

* (Jones, 2009); ** (Repka & Singh, 2009); * (Lu, Chen, Hamman, Ni, & Zhai, 2008); ** (Holte, Onsen, Myrvold, & Karlsen, 2003); *** (Nakamura, Nishimura, Hatakeyama, & Hatakeyama, 1995); † Determinado experimentalmente acorde al detalle del apartado 2.3.2

2.3.2. Titulaciones potenciométricas de los PE seleccionados

Para poder obtener los sistemas portadores en proporciones estequiométricas, es necesario conocer los equivalentes de grupos ionizables que presentan por unidad de gramo del polímero en estado sólido. En el caso de los PE seleccionados, es necesario conocer la cantidad de grupos ácidos carboxílicos, que pueden ser ionizados a aniones carboxilatos en los PE ácidos, o la cantidad de grupos aminos, que pueden ser protonados en los PE básicos, por interacción con F o con otros PE. Para poder realizar la determinación de los grupos ionizables, se utilizó una metodología desarrollada en nuestro de investigación, conocida como potenciometría diferencial de barrido, que resulta de gran utilidad por su mayor sensibilidad, cuando la potenciometría ácido-base convencional, no da lugar a puntos de inflexión apropiados para una finalidad analítica (Manzo & Luna, 1986).



Para la realización de las determinaciones, se preparó una solución estándar de KHF (patrón primario), a partir de la cual se tituló una solución de referencia (R), compuesta por 10 ml de NaOH 0,05 M y 10 ml de agua (patrón secundario). Posteriormente, se tituló una solución de HCl 0,05 M (patrón terciario) a partir del patrón secundario, previamente valorado.

En paralelo, se prepararon las muestras problema (P), para lo cual se midió una cantidad exacta del PE a valorar, aproximadamente 20 mg, la que se dispersó en 10 mL de agua y 10 mL del patrón valorado. En el caso de los PE básicos (EuE y Chi), se utilizó el patrón secundario, correspondiente a la solución de NaOH 0,05 M. En el caso de los PE ácidos, se utilizó el patrón terciario, correspondiente a la solución de HCl 0,05 M. Luego, las P fueron tituladas potenciométricamente con el patrón terciario y secundario, respectivamente. En todos los casos, el titulante se adicionó en incrementos de volumen (V) fijos, tanto para R como para P, de modo tal de que, en ambos sistemas de valoración, se mantuviera un ΔV constante.

Posteriormente, se graficaron de a pares (R y P) los resultados obtenidos en las diferentes titulaciones, que fueron expresados en pH vs V de titulante. A partir de las gráficas, se determinó el área (A) delimitada por las curvas P y R, a partir de la cual se calculó el número de equivalentes de grupos ionizables del PE por gramo. Los resultados obtenidos se encuentran detallado en las Tablas 2.3 y 2.4.

2.4. Referencias

- Abarax ELEA Lab. (2016). Productos antiinfectivos. *Laboratorio ELEA*. Retrieved January 22nd, 2016, from <http://www.elea.com/es/productos/1204/354/ABARAX.htm>
- Agranat, I. (2009). Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents and Applications of the Most Relevant APIs. *Synthesis*, 2009(12), 2116-2116.
- Ålborg, B. (1999). CLINICAL TRIALS Clomipramine dose-effect study in patients with depression: Clinical end points and pharmacokinetics.
- Balant-Gorgia, A. E., Gex-Fabry, M., & Balant, L. P. (1991). Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clinical pharmacokinetics*, 20(6), 447-462.
- Berth, G., & Dautzenberg, H. (2002). The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 47(1), 39-51.
- Berth, G., Dautzenberg, H., & Peter, M. G. (1998). Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 36(2), 205-216.
- Bondy, B. (1995). Resents trends in the field of calmodulin inhibitors. *Biol. and Chem. Aspects of thiazines and Analogs*, 1, 433-434.
- Castro, J., Montalto de Mecca, M., & Bartel, L. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology*, 25(8), 471-479.
- Coura, J., & de Castro, S. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.



- Chang, R., Peng, Y., Trivedi, N., & Shukla, A. (2009). Polymethacrylates. In R. C. Rowe, P. J. Sheskey & M. E. Quinn (Eds.), *Handbook of pharmaceutical excipients* (6^o ed.). London, UK: Pharmaceutical press.
- Chatterjee, P., & Alvi, M. M. (2014). Excipients and Active Pharmaceutical Ingredients *Pediatric Formulations* (pp. 347-361): Springer.
- de Barioglio, S. R., Lacuara, J. L., & de Oliva, P. P. (1987). Effects of clomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of parasitology*, 73(2), 451-452.
- Degussa Pharma, P. (2007). EUDRAGIT Application Guidelines: Darmstadt, Germany, Degussa.
- Dittgen, M., Durrani, M., & Lehmann, K. (1997). Acrylic polymers: a review of pharmaceutical applications. *STP pharma sciences*, 7(6), 403-437.
- Dornish, M., Kaplan, D., & Skaugrud, Ø. (2001). Standards and Guidelines for Biopolymers in Tissue-Engineered Medical Products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944(1), 388-397.
- Evonik Industries, P. a. S. (2016). EUDRAGIT® Acrylic Drug Delivery Polymers. Pharmaceutical Properties. Retrieved 15 st, 2016, from <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/Pages/default.aspx>
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., & Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227(4693), 1485-1487.
- Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 8(3), 161-182.
- García, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2015). Extemporaneous benzimidazole oral suspension prepared from commercially available tablets for treatment of Chagas disease in paediatric patients.
- Gobbi, P., Baez, A., Presti, M. S. L., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R., . . . Rivarola, H. W. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, 107(5), 1279-1283.
- Gutierrez-Correa, J., Fairlamb, A. H., & Stoppani, A. O. (2001). *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. *Free radical research*, 34(4), 363-378.
- Holte, Ø., Onsrøyen, E., Myrvold, R., & Karlsen, J. (2003). Sustained release of water-soluble drug from directly compressed alginate tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(4), 403-407.
- Ilium, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15(9), 1326-1331.
- Jones, D. (2009). Chitosan. In R. C. Rowe, P. J. Sheskey & M. E. Quinn (Eds.), *Handbook of pharmaceutical excipients* (6^o ed., pp. 159-162).
- Kas, H. S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, 14(6), 689-711.
- Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennemäs, H., Hussain, A. S., . . . Shah, V. P. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, 1(1), 85-96.
- Katchalsky, A., & Spitnik, P. (1947). Potentiometric titrations of polymethacrylic acid. *Journal of Polymer Science*, 2(4), 432-446.
- Krauth-Siegel, R., & Schöneck, R. (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *The FASEB journal*, 9(12), 1138-1146.
- Laulicht, B., Tripathi, A., & Mathiowitz, E. (2011). Diuretic bioactivity optimization of furosemide in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(2), 314-319.



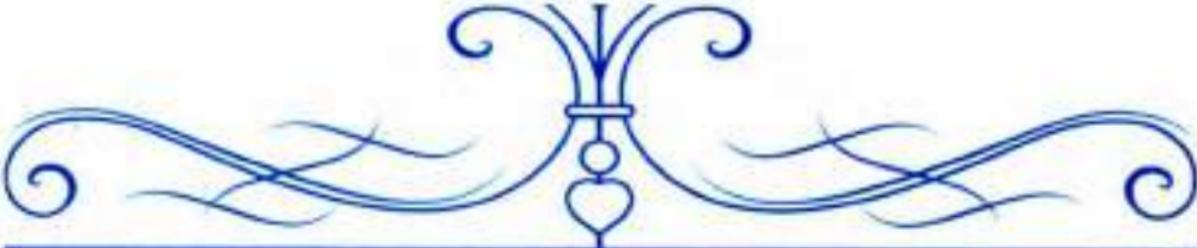
- Laurienzo, P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine drugs*, 8(9), 2435-2465.
- Lee, J. W., Park, J. H., & Robinson, J. R. (2000). Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(7), 850-866.
- Lemarchand, C., Gref, R., & Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 327-341.
- Li, D. (2005). Microencapsulation of protein with EUDRAGIT S 100 polymer.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1650-1662.
- Lu, Z., Chen, W., Hamman, J. H., Ni, J., & Zhai, X. (2008). Chitosan-polycarboxylate interpolyelectrolyte complex as an excipient for bioadhesive matrix systems to control macromolecular drug delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 13(1), 37-47.
- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595-1639.
- Manzo, R. H., & Luna, E. (1986). Differential scanning potentiometry. *Analytical Chemistry*, 58(6), 1055-1057.
- Mason, R. P., & Holtzman, J. L. (1975). The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 67(4), 1267-1274.
- Maya, J., Cassels, B., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., . . . Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 601-620.
- Menjoge, A., & Kulkarni, M. (2007). Mechanistic investigations of phase behavior in Eudragit® E blends. *International Journal of Pharmaceutics*, 343(1), 106-121.
- Miyazaki, S., Kubo, W., & Attwood, D. (2000). Oral sustained delivery of theophylline using in-situ gelation of sodium alginate. *Journal of Controlled Release*, 67(2), 275-280.
- Moreno, S. N., Docampo, R., Mason, R., Leon, W., & Stoppani, A. (1982). Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of biochemistry and biophysics*, 218(2), 585-591.
- Nakamura, K., Nishimura, Y., Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H. (1995). Thermal properties of water insoluble alginate films containing di- and trivalent cations. *Thermochimica Acta*, 267, 343-353.
- Nollenberger, K., & Albers, J. (2012). Applications of Poly (meth) acrylate Polymers in Melt Extrusion. *Hot-Melt Extrusion: Pharmaceutical Applications*, 113-144.
- Olin-Sandoval, V., Moreno-Sanchez, R., & Saavedra, E. (2010). Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Current Drug Targets*, 11, 1614-1631.
- Olivieri, B. P., Cotta-de-Almeida, V., & Araújo-Jorge, T. (2002). Benzimidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(12), 3790-3796.
- Paglioni-Oliva, P., & Rivarola, H. (2003). Central nervous system agents used as *Trypanosoma cruzi* infection chemotherapy: phenothiazines and related compounds. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, 2(4), 323-333.
- Pinazo, M., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gallego, M., Ayala, E., . . . Gascon, J. (2010). Tolerance of benzimidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11), 4896-4899.
- Pita, S. S. d. R., & Pascutti, P. G. (2012). Análise Farmacofórica da Tripanotona Redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* Complexada com Inibidores Peptídico Miméticos. *Revista Virtual de Química*, 4(6), 788-804.



- Raaflaub, J., & Ziegler, W. (1978). Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittel-Forschung*, 29(10), 1611-1614.
- Ravaschino, E., Docampo, R., & Rodriguez, J. (2006). Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. *J. Med. Chem.*, 49 (1), 426-435.
- Repka, M., & Singh, A. (2009). Alginic Acid. In R. C. Rowe, P. J. Sheskey & M. E. Quinn (Eds.), *Handbook of pharmaceutical excipients* (6^o ed.). London, UK: Pharmaceutical press.
- Rivarola, H., Bustamante, J., Lo Presti, S., Fernandez, A., Enders, J., Gea, S., . . . Paglini-Oliva, P. (2005). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. *Exp Parasitol*, 111(2), 80-86.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6^o ed.). Pharmaceutical press.
- Rubinstein, A. (2000). Natural polysaccharides as targeting tools of drugs to the human colon. *Drug development research*, 50(3-4), 435-439.
- Singla, A., & Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(8), 1047-1067.
- Sinha, V., & Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1), 19-38.
- Strauss, M., Lo Presti, M., Bazan, P., Baez, A., Fauro, R., Esteves, B., . . . Rivarola, H. (2013). Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int.* 62(3), 293-299.
- Temperton, N. J., Wilkinson, S. R., Meyer, D. J., & Kelly, J. M. (1998). Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 96(1), 167-176.
- Thakral, S., Thakral, N. K., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit®: a technology evaluation. *Expert opinion on drug delivery*, 10(1), 131-149.
- Tonnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), 621-630.
- Turrens, J. F., Watts, B. P., Zhong, L., & Docampo, R. (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82(1), 125-129.
- U.S. National Library of Medicine, N. (2015a). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2801, Clomipramine monograph, available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2801>. Retrieved December 22nd, 2015
- U.S. National Library of Medicine, N. (2015b). National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=31593, Benznidazole monograph, available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31593> Retrieved December 22nd, 2015
- Urbina, J. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., & Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American heart journal*, 127(1), 151-162.
- Von, A., Zaragoza, E., Jones, D., Rodriguez-Morales, A. J., & Franco-Paredes, C. (2007). New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2), 99-111.



- World Health Organization, W. (1991). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Retrieved 28th December, 2015, from <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/>
- World Health Organization, W. (2015). The international pharmacopoeia. 5°. Retrieved 2nd, 2016, from <http://apps.who.int/phint/en/p/doc/>
- Zatz, J., & Woodford, D. (1987). Prolonged release of theophylline from aqueous suspensions. *Drug development and industrial pharmacy*, 13(12), 2159-2178.



CAPÍTULO 3:

**ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA COMBINACIÓN
DE BZ Y CMP**



Capítulo 3:

Estudios *in vitro* de la combinación de BZ y CMP

En este capítulo se presentan los estudios *in vitro* realizados en cultivos celulares de trypomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, para evaluar la combinación de BZ y CMP como F tripanocidas.

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con la Dra. Pilar Aoki, el Dr. Nicolás Ponce y la Bioq. Liliana Sanmarco, del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET y Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

3.1. Introducción

La enfermedad de Chagas ha sido declarada, por la Organización Mundial de la Salud, como una “enfermedad desatendida u olvidada” y representa un grave problema de salud pública en América Latina (Campi-Azevedo et al., 2015; Moncayo & Silveira, 2009; Schofield, Jannin, & Salvatella, 2006; World Health Organization, 2015). Como se describió en el capítulo 1 *Introducción general y objetivos*, esta enfermedad tropical se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido a la resurgencia de la enfermedad en áreas endémicas del mundo y por las migraciones de personas infectadas, desde estas áreas hacia países no endémicos (Cencig, Coltel, Truyens, & Carlier, 2012; Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010). Además, hasta la actualidad, la enfermedad de Chagas ha resistido los intentos por desarrollar quimioterapias eficaces y seguras, y el desarrollo de una vacuna profiláctica efectiva, aún no se ha logrado.

Los dos F con demostrada eficacia frente a *T. cruzi*, BZ y NFX, presentan una actividad tripanocida significativa en la fase aguda, con un 60–80 % de la cura parasitológica (Urbina & Docampo, 2003; Von, Zaragoza, Jones, Rodriguez-Morales, & Franco-Paredes, 2007). Además, BZ presenta una remarcada actividad anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* y es el F de elección para el tratamiento (Coura & de Castro, 2002; Urbina, 2010; Von et al., 2007). Sin embargo, el tratamiento induce frecuentes



efectos adversos, especialmente en adultos (Castro & Díaz de Toranzo, 1988; Davies et al., 2014; Maya et al., 2007; Rojo et al., 2014).

Al considerar las limitaciones de los tratamientos etiológicos actualmente disponibles, el desarrollo de nuevas estrategias, que empleen combinaciones de los F existentes, resulta una interesante alternativa a ser tomada en cuenta, con el fin de proponer tratamientos que puedan ser superiores, para la optimización de la farmacoterapia antichagásica (Chatelain & Ioset, 2011).

En este sentido, en las últimas dos décadas, nuevos intentos para mejorar la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas han sido estudiados, específicamente dirigidos a diferentes *target* específicos del parásito, tales como los derivados de triazoles, inhibidores de la escualeno sintasa o cisteinproteasa, entre otros compuestos (Bern, 2011; Urbina, 2010).

En este contexto, en la búsqueda de nuevos agentes tripanocidas que sean eficaces y con menores efectos adversos, Hammond *et al.* (1984) realizó un “*screening*” de 500 compuestos, demostrando que 71 fueron activos frente a trypomastigotes; entre éstos, las fenotiazinas y los antidepresivos tricíclicos, como CMP, que a la vez son inhibidores directos de la enzima tripanotiona reductasa (Hammond, Cover, & Gutteridge, 1984; Rivarola et al., 2005). Se propone que, el efecto terapéutico de CMP en los animales de experimentación tratados, se debe a su capacidad para inhibir selectivamente la tripanotiona reductasa y su acción anti-calmodulina que regula la homeostasis del Ca^{2+} (Rivarola et al., 2005).

Adicionalmente, al considerar la posibilidad de resistencia parasitaria y la existencia de más de una cepa de parásito en el mismo huésped, se propone, como hipótesis de trabajo, que un tratamiento combinado con dos F con diferentes mecanismo de acción, podría ser una estrategia para mejorar la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas (Araujo, Martins-Filho, Pereira, & Brener; Strauss et al., 2013; Urbina & Docampo, 2003).

En este marco, se propuso evaluar *in vitro* la actividad tripanocida de la combinación de BZ y CMP, mediante la técnica de *checkerboard*, a los fines de poder evaluar el efecto de la acción combinada de ambos F, sobre cultivos celulares de trypomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, forma infectiva y replicativa, respectivamente. Sobre la base de estos estudios, posteriormente, se propuso abordar



estudios preclínicos de eficacia y seguridad, los cuales se presentan en el capítulo 5 de este trabajo de tesis.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales

3.2.1.1. Fármacos

Los F utilizados fueron CMP clorhidrato (grado farmacéutico, Parafarm[®], Bs.As., Argentina) y BZ extraído y purificado desde los comprimidos comerciales disponibles (Radanil[®], Roche, Argentina).

3.2.1.2. Reactivos y medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium; Gibco Invitrogen Corporation, New York y RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium; Gibco Invitrogen Corporation, New York).

Además, se utilizó suero fetal bovino (Gibco Invitrogen Corporation, New York), L-glutamina (Gibco by Life Technology, Japón), gentamicina (grado farmacéutico, Parafarm[®], Bs.As., Argentina), dimetilsulfóxido (DMSO, Merck[®], Alemania), formalina bufferizada 4 % (Merck[®], Alemania) y Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.2.2. Estudios *in vitro* sobre trypomastigotes

Los estudios *in vitro* fueron realizados mediante la técnica de *checkerboard*, para lo cual se utilizaron trypomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y se evaluó el efecto tripanocida de BZ y CMP, solos o en combinación, en diferentes concentraciones.

3.2.2.1. Obtención de los trypomastigotes en cultivos de células de mamíferos

Para la obtención de los parásitos se utilizaron monocapas de células Vero (línea celular obtenida del riñón del mono verde africano adulto normal, *Rhesus*), las cuales fueron infectadas con las formas trypomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y mantenidas con medio RPMI a 37 °C y en una atmósfera de 5 % de CO₂. Los trypomastigotes fueron colectados del sobrenadante de las células infectadas y obtenidos por centrifugación a 4400 r.p.m. por 5 min. El concentrado de parásitos, fue

resuspendido en medio DMEM y el recuento de parásitos viables se llevó a cabo en cámara de Neubauer, mediante observación directa al microscopio óptico.

En la Figura 3.1 se resumen los pasos necesarios para la obtención de los trypomastigotes.

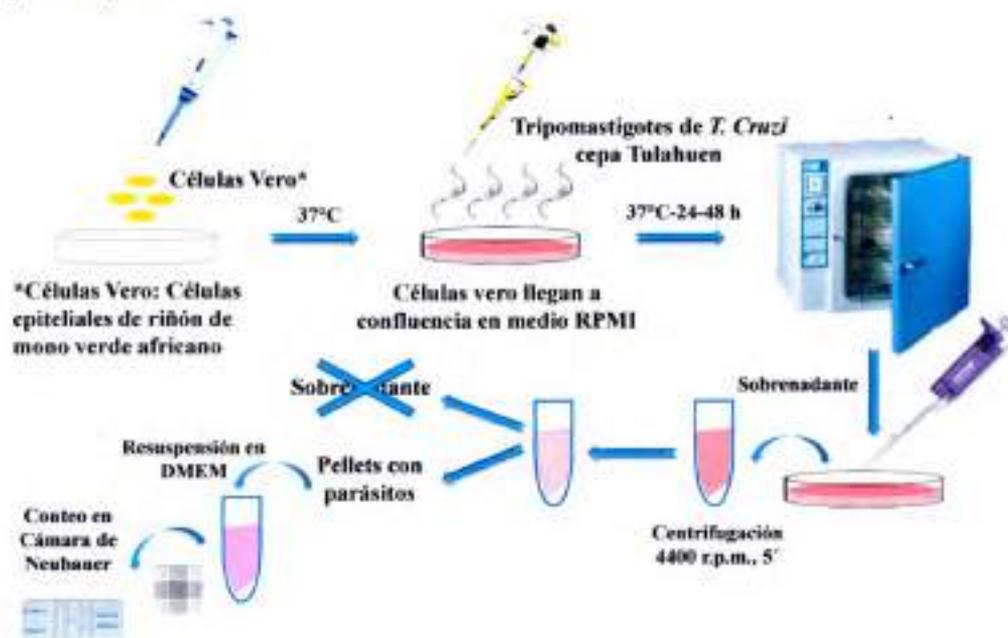


Figura 3.1. Proceso esquemático para la obtención de los trypomastigotes del *T. cruzi* de la cepa Tulahuen, sobre la base de la utilización de cultivos de células Vero.

3.2.2.2. *Checkerboard test* para evaluar la actividad anti-trypomastigote de BZ y CMP

La técnica de *checkerboard* se llevó a cabo en un *multiwell* de 96 pocillos. Se inocularon los trypomastigotes (1×10^6 parásitos/mL en cada pocillo) en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (DMEMc), a pH 7,4; 2 mM de L-glutamina y 50 mg/L de gentamicina. En cada pocillo se adicionó 20 μ L de sangre periférica murina, obtenida por punción intracardiaca de animales sanos. Posteriormente, se incorporaron cantidades crecientes de BZ y CMP, para obtener concentraciones finales en el intervalo de 0 a 64 μ g/mL.

Cabe destacar que, el intervalo de concentraciones seleccionado, fue planteado a partir de resultados de estudios previos realizados. Para esto, se consideró como criterio contar con dos valores de concentración por encima de la mínima concentración de cada F solo, que anula la parasitemia. Esto se hizo a los fines de evitar la posibilidad de falsos positivos que pudieran dar lugar a una interpretación incorrecta de los resultados. Además, se planteó un diseño cuadrado, es decir, se



consideró el mismo intervalo de concentraciones para cada F y el mismo delta de concentración en cada punto.

Para la disolución de los F se utilizó DMSO y medio DMEM. Cabe resaltar que, la concentración final de DMSO no excedió el 1 %, requisito que debe ser cumplido para que las células en estudio sean viables. Este ensayo fue realizado por triplicado y los *multiwells* fueron incubados durante 24 h a 37 °C, en una atmósfera al 5 % con CO₂ humidificada (Andrews & Colli, 1982).

Luego de 24 h de incubación, se adicionó buffer de lisis en una relación 1/10 respecto de la cantidad total de medio DMEMc y se realizó el recuento de los parásitos en cámara de Neubauer, mediante observación directa al microscopio óptico invertido (Zeiss Axiovert 25, D-07740 Jena). La viabilidad de los parásitos fue examinada mediante la observación de su movilidad flagelar.

En la Figura 3.2 se presenta esquemáticamente el procedimiento llevado a cabo para la realización del *checkerboard*.

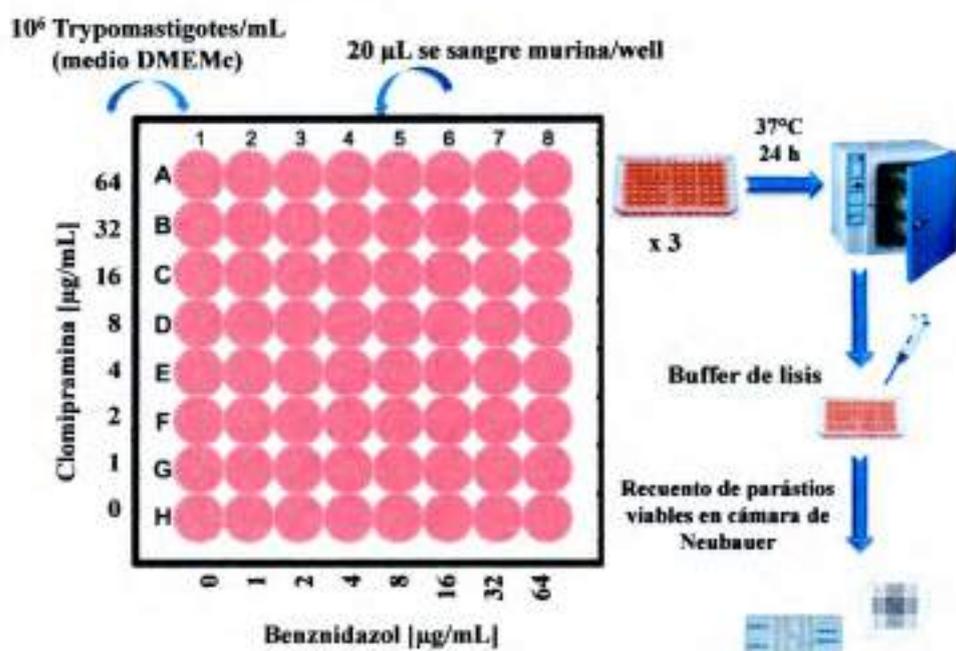


Figura 3.2. Esquema que reúne todos los pasos necesarios, los componentes y las concentraciones de BZ y CMP empleadas para el desarrollo del *checkerboard test*.

El efecto de la combinación de BZ y CMP fue analizado mediante el índice de combinación (IC) e isoblograma, de acuerdo con el método propuesto por Chou-Taladay (Chou, 2010), revisado por Zhao *et al.* (Zhao, Au, & Wientjes, 2010). Para el cálculo del IC se tuvo en cuenta la concentración de cada F que logra anular la



parasitemia por sí mismo y la combinación de F en las concentraciones más bajas que lograron el mismo efecto. Para el cálculo del IC se utilizó la Ecuación 3.1.

$$IC = \frac{[a]}{[A]} + \frac{[b]}{[B]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde $[A]$ y $[B]$ son las concentraciones de los fármacos A (solo) y B (solo), respectivamente, que producen un determinado efecto, en este caso, anulan la parasitemia, es decir que presentan actividad tripanocida; $[a]$ y $[b]$ se refieren a las concentraciones de a y b en combinación, que producen el mismo nivel de efecto.

Se pueden calcular distintos IC, a partir de todas las combinaciones de concentraciones posibles que resultan eficaces, pero se informa sólo el IC óptimo, es decir, el que emplea la menor concentración de cada uno de los F.

La construcción del isoblograma se hace a partir de la $[A]$ y $[B]$, las cuales se grafican en el plano xy . En el eje de las abscisas se coloca la coordenada ($[A]; 0$), que en este caso corresponde a la $[BZ]$, y, en el eje de las ordenadas, la coordenada ($0; [B]$), que corresponde a la $[CMP]$. Los puntos generados se unen y se traza una línea de puntos, que se conoce como línea de aditividad. Luego, se grafican los puntos correspondientes a todas las combinaciones de concentraciones posibles, que presentan un efecto del mismo nivel que el de lo F solos (actividad tripanocida). Estos puntos se unen en una línea de trazo continuo y, a partir de la gráfica, se interpretan los resultados.

3.2.3. Estudios *in vitro* sobre amastigotes

Los estudios *in vitro* frente a amastigotes se realizaron mediante inmunofluorescencia para evaluar el efecto tripanocida de BZ en diferentes concentraciones, sólo y en combinación con CMP. Para evaluar la actividad anti-amastigote de BZ y CMP, se utilizaron macrófagos diferenciados de progenitores de médula ósea, que fueron infectados con *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y tratados con los F.

3.2.3.1. Obtención de los macrófagos

Para obtener los macrófagos diferenciados desde médula ósea, se dislocaron asépticamente fémur y tibia intactos, de las patas traseras de ratones BALB/c. Se extrajo la médula ósea con una aguja estéril de calibre 25 y 5 mL de solución de buffer fosfato (PBS). Los progenitores de médula ósea se centrifugaron durante 5 min



a 2300 r.p.m. Luego, las células fueron maduradas en placas de Petri, con medio RPMI suplementado con un 13 % de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), obtenido del sobrenadante de la línea celular L929 (medio condicionado) por 7 días.

3.2.3.2. Actividad anti-amastigote de BZ y CMP

Para llevar a cabo el cultivo celular de amastigotes, se infectaron 150.000 macrófagos derivados de médula ósea con trypomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen, en una relación 1:5 célula huésped-parásito, durante 24 h. Luego, se descartaron los sobrenadantes, se lavaron las células con medio RPMI y se sometieron a los siguientes tratamientos: BZ en concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BZ 8); BZ en concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solo (BZ 2) y en combinación con CMP en concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BZ 2 + CMP 2), o bien, fueron mantenidos en medio durante 48 h. Para esto se utilizó un *multiwell* de 24 pocillos conteniendo un *coverlip* cada uno. Este ensayo se realizó por cuadruplicado para cada una de las condiciones evaluadas.

3.2.3.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Para llevar a cabo este ensayo, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formalina 4 % durante 40 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y fueron permeabilizadas con Triton X-100 1 %, durante 15 min, a temperatura ambiente. Después de varios lavados, se bloquearon con PBS-albúmina 1% los espacios vacíos en los *coverlips*, durante 15 min a temperatura ambiente.

Luego, las células fueron incubadas con suero de pacientes chagásicos diluido 1:50 en PBS-albúmina 1% y mantenidas por toda la noche a 4 °C. Se lavaron las células con PBS y se reveló la reacción con anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana marcada con el fluorocromo fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (diluido 1/200 en PBS-albúmina 1 %). Este anticuerpo secundario reconoce la fracción Fc de los anticuerpos anti-*T. cruzi* contenidos en el suero de los pacientes chagásicos. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, las células fueron lavadas y se montaron en glicerina-PBS, para ser observadas en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE 2000 U a un aumento de 1000X).

Se calculó el número de amastigotes en 100 macrófagos derivados de médula ósea (Stempin, Giordanengo, Gea, & Cerbán, 2002).

3.3. Resultados

A fin de determinar *in vitro* el efecto de la combinación de BZ y CMP en la sobrevivencia de la forma infectiva de los parásitos, se desarrolló el *checkerboard test* de acuerdo al esquema descrito en la Figura 3.3. La viabilidad de los parásitos se analizó mediante el recuento en cámara de Neubauer de los trypomastigotes viables (con movilidad flagelar). Las mínimas concentraciones de combinaciones de F que produjeron el 100 % de muerte parasitaria; es decir, que anularon la parasitemia, fueron graficadas en un isoblograma y se calculó el IC.

64	100	100	100	100	100	100	100	100
32	100	100	100	100	100	100	100	100
16	100	100	100	100	100	100	100	100
8	94,52	100	100	100	100	100	100	100
4	75,34	86,3	100	100	100	100	100	100
2	53,42	72,6	100	100	100	100	100	100
1	34,25	45,21	69,86	83,56	100	100	100	100
0	0	36,99	47,95	69,86	100	100	100	100
	0	1	2	4	8	16	32	64
	BZ [$\mu\text{g/mL}$]							

Figura 3.3. Esquema del *checkerboard test* empleado y los resultados obtenidos expresados como % de muerte de los parásitos. Los pocillos sin colorear corresponden a las combinaciones de BZ y CMP que logran reducir la parasitemia. ■ Combinaciones de concentraciones de BZ y CMP que reducen la parasitemia. ■ Mínima concentración de cada F que anula la parasitemia.

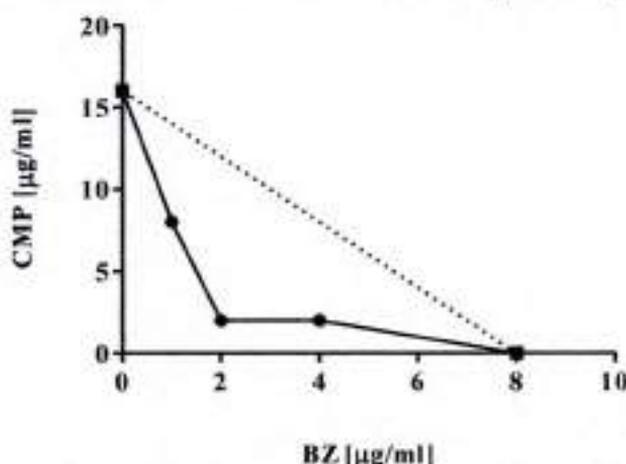


Figura 3.4. Isoblograma obtenido para la combinación de CMP y BZ frente a trypomastigotes de *T. cruzi*. En línea continua se presentan las combinaciones de las concentraciones de F, que se corresponden con una curva cóncava a izquierda y, en la línea discontinua, se presenta la línea de aditividad. La gráfica por debajo de la línea de aditividad indica efecto sinergista de la combinación entre BZ y CMP.



En la Figura 3.4 se presenta el isoblograma obtenido, en donde se evidencia que la curva graficada, correspondiente a la asociación de los F, se ubica por debajo de la línea de aditividad (denotada con línea de puntos). El análisis isobolográfico y el resultado del IC con un valor de 0,375, reveló que CMP asociada a BZ produce un efecto sinergista en la acción tripanocida de este último.

Por su parte, la actividad anti-amastigote se evaluó en macrófagos diferenciados desde médula ósea de ratón, expuestos a los tratamientos con BZ 8, BZ 2 y BZ 2 + CMP 2, o mantenidos en medio. A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que las células que no fueron tratadas, presentaron una alta carga parasitaria en su interior, evidenciada por un gran número de amastigotes en el interior de los macrófagos, tal como puede observarse en la Figura 3.5. En tanto que, se observó una significativa inhibición del crecimiento del parásito en el tratamiento combinado, en comparación con BZ 2 ($p < 0,05$) (Figura 3.6). Adicionalmente, tratamiento BZ 8, también presentó eficacia tripanocida. Estos resultados confirman los obtenidos frente a los trypomastigotes de *T. cruzi*.

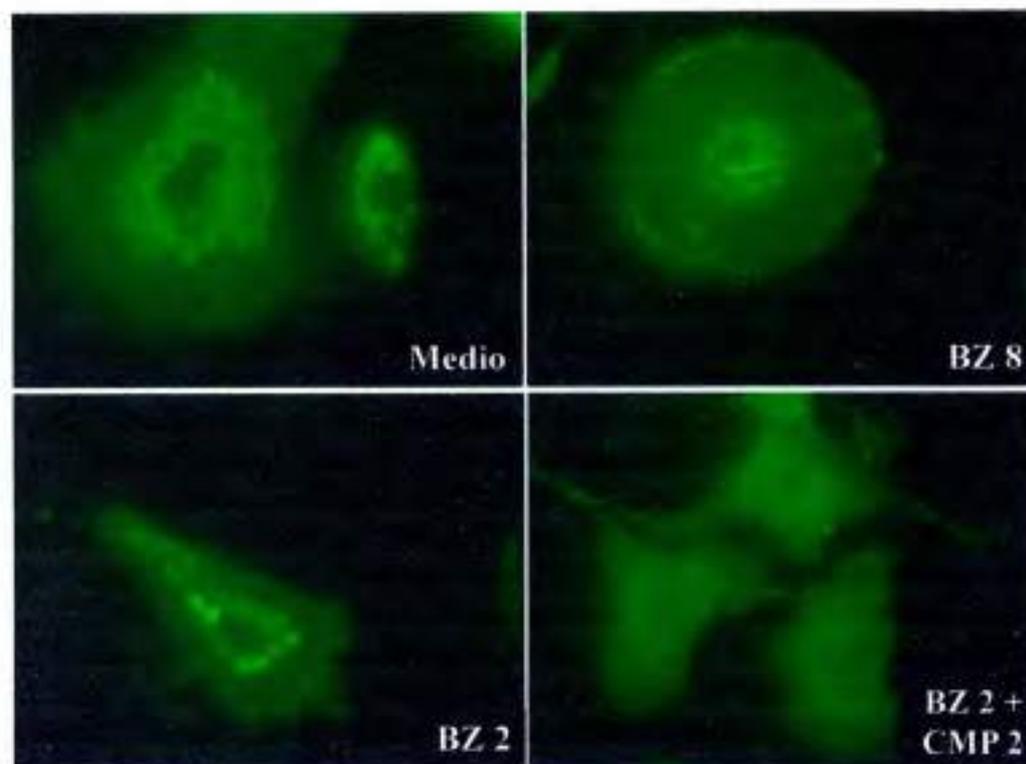


Figura 3.5. Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de los macrófagos diferenciados de médula ósea e infectados con *T. cruzi*, no tratados (medio) y tratados con diferentes concentraciones de BZ, solo o en combinación con CMP.

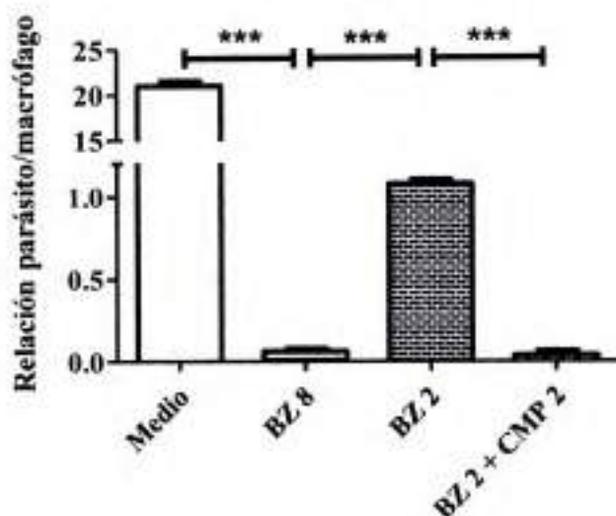


Figura 3.6. Análisis cuantitativo de la actividad tripanocida frente a los amastigotes no tratados (medio) y tratados con diferentes concentraciones de BZ, solo o en combinación con CMP.

3.4. Discusión

El desarrollo de nuevos enfoques farmacoterapéuticos específicos para la enfermedad de Chagas ha tenido una progresión limitada, debido a las controversias existentes con relación a su patogénesis. Por esta razón, en las últimas dos décadas, se encuentran bajo investigación nuevos enfoques que se centran en blancos específicos del parásito y en diferentes estrategias farmacoterapéuticas, con el objetivo de encontrar la cura de esta enfermedad.

En particular, este trabajo de tesis se focalizó en la enzima tripanotiona reductasa, un enzima específica del *T. cruzi*, que desempeña funciones vitales en el parásito, y en el antidepresivo tricíclico CMP, que presenta actividad inhibitoria demostrada contra esta enzima (Gobbi, Baez, et al., 2010).

Para abordar los estudios propuestos, se empleó la técnica de *checkerboard*, a los fines de evaluar el potencial efecto sinérgico de la combinación de BZ con CMP, sobre la viabilidad de los trypomastigotes de *T. cruzi*. El efecto de la acción combinada de BZ y CMP fue analizado por medio de un isoblograma y mediante el análisis del IC (Chou, 2010; Zhao et al., 2010).

Se ha descrito que un efecto sinérgico es definido como un efecto producido por la combinación de los F que es mayor que la suma de los efectos producidos por cada F solo, representado por un $IC < 1$ (Chou, 2010). La interpretación gráfica, por medio del análisis isobolométrico, permite evaluar la naturaleza de la interacción



farmacológica entre BZ y CMP. En este sentido, un efecto sinergista se evidencia cuando menores concentraciones de dos F, contenidos en una combinación, proveen el mismo efecto, que mayores concentraciones de los F solos y, cuando los resultados son graficados en un isoblograma, la curva resultante se localiza por debajo de la línea de aditividad (Zhao et al., 2010).

A partir de los resultados obtenidos, se evidenció que el isoblograma de la combinación BZ-CMP mostró un efecto sinérgico anti-trypomastigote, que se demuestra por el $IC < 1$ ($IC = 0,375$) y la gráfica cóncava a izquierda, ubicada por debajo de la línea de aditividad. La estrategia de *checkerboard* ha sido empleada para evaluar la capacidad de otros compuestos en interacción con BZ y, de este modo, evaluar si la combinación incrementa su actividad tripanocida (Pelizzaro-Rocha et al.; Valdez et al., 2012). Sin embargo, estos intentos previos reportados no revelaron una actividad sinergista anti-trypomastigotes, que son la forma clínicamente relevante e infectiva en la infección por *T. cruzi*.

Adicionalmente, los estudios realizados sobre los amastigotes, forma replicativa del parásito, confirmaron los resultados del sinergismo de la combinación de BZ y CMP. Esto se evidenció por la significativa reducción de la carga parasitaria en los macrófagos ($p < 0,05$), en comparación con las células infectadas y mantenidas en medio y las tratadas con BZ 2.

En este punto, cabe destacar que las concentraciones seleccionadas de BZ y CMP para el estudio sobre los amastigotes, se basaron en los resultados obtenidos frente a los trypomastigotes. Se seleccionó la concentración de BZ de 8 $\mu\text{g/mL}$, ya que ésta es fue la mínima concentración de este F que logró anular la parasitemia por sí mismo. La concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, corresponde con la mínima concentración de BZ que, por sí mismo, no logra eficacia tripanocida, pero que al combinarlo con 2 $\mu\text{g/mL}$ CMP, la combinación, logra anular la parasitemia y presenta eficacia anti-*T. cruzi*.

La actividad sinergista de la combinación entre BZ y CMP podría ser explicada al considerar el mecanismo de acción independiente de cada F. En particular, BZ produce radicales libres o metabolitos electrofilicos e induce estrés oxidativo en el parásito (Maya et al., 2007). Por su parte, CMP inhibe la tripanotona reductasa (Benson et al.; Gobbi, A, et al., 2010), una enzima esencial en las defensas antioxidantes del *T. cruzi*. En consecuencia, es plausible pensar que estos mecanismos podrían trabajar en conjunto contra el parásito y permitirían poner en evidencia la sinergia de la combinación entre BZ y CMP.



Los resultados obtenidos, indican que CMP puede mejorar la efectividad de BZ y, en consecuencia, la combinación terapéutica de ambos F permitiría la utilización de menores dosis de BZ, con una disminución concomitante de los efectos adversos asociados a su uso.

Además, resulta de relevancia destacar que los estudios *in vitro* fueron de utilidad para reducir la cantidad de animales de experimentación en los estudios posteriores realizados, los cuales se presentan en el capítulo 5, ya que, a partir de los resultados obtenidos, se pudo acotar el intervalo de dosis a evaluar *in vivo*. Esto se encuentra en línea con las recomendaciones de los comités de ética internacionales, los cuales sugieren reducir el máximo posible el número de animales de experimentación. Además, el estudio sistemático realizado, ha permitido racionalizar los protocolos de trabajo y proponer posibles correlaciones *in vitro-in vivo*, lo cual hace de la técnica de *checkerboard*, no sólo una metodología novedosa para el estudio en parásitos, sino también, una herramienta de gran utilidad para llevar a cabo posteriores estudios *in vivo*, sobre la base de un diseño de investigación racional.

3.5. Conclusiones parciales

La actividad tripanocida sinergista de CMP combinada con BZ, demostrada a partir de los estudios *in vitro* realizados, evidencia una potencial utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que permitiría utilizar dosis más bajas y eficaces de BZ. Cabe destacar en este sentido que, la combinación terapéutica de F existentes aprovecha el mecanismo de acción independiente de cada uno, lo cual sinergiza la acción entre ambos y, en consecuencia, permite optimizar el tratamiento farmacoterapéutico.

3.6. Referencias

- Andrews, N., & Colli, W. (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool*, 29 (2)(0022-3921), 264-269.
- Araujo, M., Martins-Filho, O., Pereira, M., & Brener, Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 819-824.
- Benson, T., McKie, J., Garforth, J., Borges, A., Fairlamb, A., & Douglas, K. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. *Biochem J*, 286 (Part 1), 9-11.
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2527-2534.
- Campi-Azevedo, A., Gomes, J., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., . . . Martins-Filho, O. (2015). Etiological treatment of Chagas disease patients with

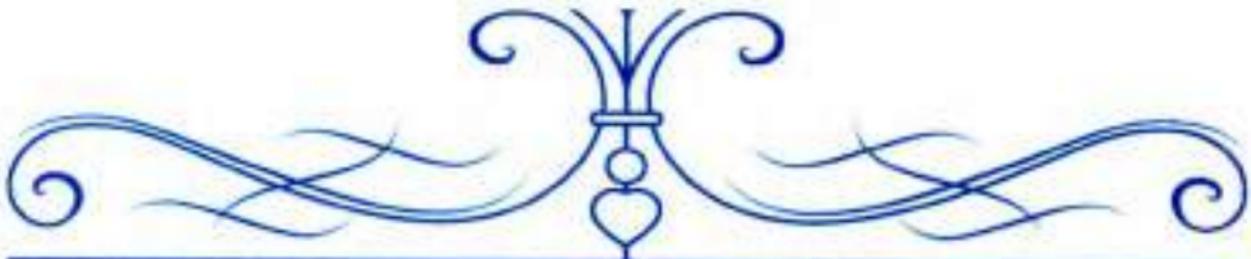


benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. *Immunobiology*, 220(5), 564-574.

- Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C., & Carlier, Y. (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or Ambisome(R) in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*, 40(6), 527-532.
- Coura, J., & de Castro, S. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Chatelain, E., & Isot, J. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDI model. *Drug Des Devel Ther*, 5, 175-181.
- Chou, T. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70(2), 440-446.
- Gobbi, P., A. B., Lo Presti, M., Fernandez, A., Enders, J., Gea, S., . . . Rivarola, H. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*, 107(5), 1279-1283.
- Gobbi, P., Baez, A., Presti, M. S. L., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R., . . . Rivarola, H. W. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, 107(5), 1279-1283.
- Hammond, D. J., Cover, B., & Gutteridge, W. E. (1984). A novel series of chemical structures active *in vitro* against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(1), 91-95.
- Maya, J., Cassels, B., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., . . . Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 601-620.
- Moncayo, A., & Silveira, A. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*(1), 17-30.
- Pelizzaro-Rocha, K., Tiunan, T., Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B., & Nakamura, C. (2010). Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, 18 (2010) 36-39.
- Rassi, A. J., Rassi, A., & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Rivarola, H., Bustamante, J., Lo Presti, S., Fernandez, A., Enders, J., Gea, S., . . . Paglini-Oliva, P. (2005). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. *Exp Parasitol*, 111(2), 80-86.
- Schofield, C., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, 22(12), 583-588.
- Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S., & Cerbán, F. (2002). Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *Journal of leukocyte biology*, 72(4), 727-734.
- Strauss, M., Lo Presti, M., Bazan, P., Baez, A., Fauro, R., Esteves, B., . . . Rivarola, H. (2013). Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int*, 62(3), 293-299.
- Urbina, J. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- Valdez, R., Tonin, L., Ueda-Nakamura, T., Silva, S., Dias Filho, B., Kaneshima, E., . . . Nakamura, C. (2012). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1), 507-512.



- Von, A., Zaragoza, E., Jones, D., Rodriguez-Morales, A. J., & Franco-Paredes, C. (2007). New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2), 99-111.
- World Health Organization, W. (2015). Chagas disease. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. Retrieved July 22nd, 2015, from <http://www.who.int/tdr/research/ntd/chagas/en/>
- Zhao, L., Au, J. L. S., & Wientjes, M. G. (2010). Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 2, 241-249.



CAPÍTULO 4:

SISTEMAS PORTADORES DE BZ Y CMP



Capítulo 4:

Sistemas portadores de BZ y CMP

El presente capítulo se encuentra estructurado en dos partes. La parte I versa sobre el desarrollo y la caracterización de sistemas portadores de BZ, basados en complejos interpolielectrolitos, bajo la forma de multipartículas. La estrategia de interacción entre dos PE fue seleccionada debido a que BZ no presenta en su estructura química un grupo ionizable que pudiera interactuar iónicamente y de manera directa con alguno de los PE portadores.

La parte II se focaliza en el desarrollo y caracterización de sistemas portadores de CMP, basados en complejos iónicos PE-F. Esta estrategia se empleó dado que CMP presenta en su estructura química una amina terciaria que puede protonarse para interactuar electrostáticamente con un PE portador, que contenga en su estructura grupos ácidos plausibles de ser ionizados.

La introducción que se presenta a continuación es común a ambas partes, debido a que presenta las particularidades de la interacción entre PE y F, como estrategia para modular la liberación de F de reconocida utilidad terapéutica. A su vez, se enfatiza los antecedentes que presenta nuestro grupo de investigación en tecnología farmacéutica. En este sentido, cabe destacar que se viene desarrollando una nueva estrategia de I+D con relación a los sistemas portadores de F, a partir de la cual, se ha consolidado una plataforma tecnológica original sobre la base de la interacción ácido-base entre PE y F ionizables de carga opuesta (complejos binarios) o bien entre dos PE de carga opuesta y F ionizables (complejos ternarios), sobre cuya base se diseñan SLM para dar respuesta a situaciones farmacoterapéuticas específicas.

En particular, en esta tesis doctoral, se utilizan los conocimientos generados en esta plataforma tecnológica de investigación, con relación a los PE como portadores de F, para diseñar y desarrollar sistemas portadores de BZ y CMP, que puedan ser de utilidad para proponer alternativas farmacoterapéuticas superadoras, que permitan optimizar el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

4.1. Introducción

En el área de la tecnología farmacéutica, algunos PE han sido utilizados empíricamente, sobre la base de sus propiedades generales como macromoléculas.



Sin embargo, en las dos últimas décadas, diversas aplicaciones han surgido en relación con sus propiedades específicas (Guo, Skinner, Harcum, & Barnum, 1998; Hugerth, 2001; Thünemann, Müller, Dautzenberg, Joanny, & Löwen, 2004), dentro de las cuales se destacan su utilización en el desarrollo de sistemas PE-F (Bonferoni et al., 1998; Holgado et al., 1995; Lu et al., 1991). Esto se pone de manifiesto en las diferentes publicaciones que se han reportado en los últimos años, acerca de algunas propiedades de los PE y de los complejos PE-F (de Robertis et al., 2015; Lankalapalli & Kolapalli, 2009; Müller, 2014).

Los sistemas portadores de F basados en la interacción ácido-base entre PE y F ionizables de carga opuesta, se han constituido en una estrategia que permite mejorar la eficacia, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa, de F de reconocida utilidad terapéutica (Jimenez-Kairuz, Allemandi, & Manzo, 2004; Jimenez-Kairuz, Llabot, Allemandi, & Manzo, 2005; Vilches et al., 2002). En función del objetivo que se persigue, los sistemas portadores de F son diseñados para ser administrados por diferentes vías. En algunos casos, se pretende direccionar el sistema portador directamente al sitio blanco (target farmacodinámico), ya sea mediante administración sistémica (vía parenteral) o local (vía tópica). En otros casos, se requiere que el sistema portador acceda y permanezca en el sitio de absorción durante un determinado período de tiempo (vía per-oral) (Crommelin & Florence, 2013; Hearnden et al., 2012).

El estudio de las propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y biofarmacéuticas realizado a estos complejos PE-F, tanto a nivel molecular, particulado, como a granel, ha permitido describir su performance bajo la forma de dispersiones y en estado sólido.

En particular, las formas farmacéuticas sólidas para administración por vía per-oral son las más prescritas y dispensadas, tanto como sistemas liberación inmediata, como en SLM. Idealmente, cuando se pretende una administración por vía per-oral, un SLM debe proteger al F de la degradación a lo largo de TGI y debe permitir su liberación en un sitio específico del intestino, donde es mejor absorbido o donde tiene que ejercer su actividad. En este sentido, los complejos PE-F pueden contribuir a cumplir con los requisitos mencionados y, también, pueden favorecer la interacción con las membranas del TGI, promover la absorción de los F (Andrews, Laverty, & Jones, 2009) y proteger el intestino de la acción no deseada que pudieran generar los F a nivel intestinal.



En este contexto, las propiedades de relevancia farmacotécnica y biofarmacéutica de los materiales sólidos, producto de la interacción ácido-base entre PE portadores ácidos o básicos con F ionizables de carga opuesta, han sido objeto de una intensa investigación, debido a que la caracterización de estos complejos en estado sólido, así como la de cualquier sólido farmacéutico, es materia ineludible para el desarrollo de formulaciones optimizadas. En términos generales, las propiedades en el estado sólido pueden ser definidas como aquellas características del material asociadas al ensamble de las moléculas individuales y, en general, para su estudio se requieren pequeñas cantidades de muestra. En efecto, el estudio exhaustivo de las propiedades de los sólidos farmacéuticos involucra un enfoque interdisciplinario, que permite obtener información física, química y mecánica, a nivel molecular, particulado y a granel (Shete, Puri, Kumar, & Bansal, 2010).

Por su parte, los complejos binarios (PE-F) en estado sólido pueden obtenerse mediante diferentes metodologías, tales como: evaporación del solvente, liofilización, coacervación, secado por spray o extrusión por fusión (Bermudez, Jimenez-Kairuz, Olivera, Allemandi, & Manzo, 2008; Jimenez-Kairuz et al., 2005; Kindermann, Matthée, Strohmeyer, Sievert, & Breitreutz, 2011; Quinteros, Manzo, & Allemandi, 2011).

La caracterización de estos complejos, principalmente mediante espectroscopia FT-IR, análisis térmico y difracción de rayos X de polvos, ha permitido evidenciar que la interacción que tiene lugar entre los PE y F, es de tipo iónica y determinar que éstos se obtienen como sólidos amorfos que exhiben propiedades diferenciadas a las de sus precursores (Bermudez et al., 2008; Guzmán, Manzo, & Olivera, 2012; Jimenez-Kairuz et al., 2005; Quinteros et al., 2011; Ramirez-Rigo, Allemandi, & Manzo, 2006).

En la literatura científica se reportan una amplia variedad de complejos PE-F en estado sólido, sobre la base de PE aniónicos o catiónicos en interacción con F que poseen en su estructura grupos básicos o ácidos, respectivamente (Bonferoni et al., 2008; Jimenez-Kairuz et al., 2005; Kim & Park, 2010; Kindermann et al., 2011; Quinteros et al., 2011; Ramirez-Rigo et al., 2006).

Una característica peculiar de los complejos PE-F en estado sólido, es su comportamiento frente a un medio acuoso. Por un lado, se ha descrito que los sistemas obtenidos con carbomer o ácido alginico como PE portadores de F, en contacto con un medio acuoso, se mojan con facilidad, presentan una importante capacidad de captación de agua, aumentan su volumen y se redispersan bajo la forma



de hidrogeles (Jimenez-Kairuz, Allemandi, & Manzo, 2002; Ramirez-Rigo et al., 2006). Por otra parte, los sistemas obtenidos con carboximetilcelulosa y Eudragit®E100 como portadores de F, en contacto con medio acuoso, captan una proporción limitada de agua y mantienen su morfología (Quinteros, Allemandi, & Manzo, 2012; Ramirez Rigo, Allemandi, & Manzo, 2009).

Por su parte, los complejos interpolielectrolitos (CIPE) refieren a estructuras macromoleculares, formadas por la asociación no covalente de polímeros que presentan afinidad entre sí. Se forman por la interacción entre PE aniónicos y PE catiónicos. En los últimos años, han aumentado los reportes en la literatura en relación con estos complejos, lo que refleja el interés acerca de éstos, no sólo en el ámbito científico, sino también, en el ámbito industrial (R. Moustafine & Bobyleva, 2006; R. Moustafine, Kabanova, Kemenova, & Van den Mooter, 2005; R. Moustafine, Kemenova, & Van den Mooter, 2005; R. I. Moustafine et al., 2011; R. I. Moustafine, Margulis, Sibgatullina, Kemenova, & Van den Mooter, 2008; Mustafin, 2011; Palena, García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015b; Palena, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2012).

En estado sólido, los CIPE se caracterizan por presentar estructuras supramoleculares de “tipo escalera” o “huevos revueltos”, que se presentan de manera no periódica (Antonietti, Conrad, & Thuenemann, 1994). En la primera estructura, la formación del complejo tiene lugar a nivel molecular, mediante un mecanismo de tipo cremallera. En la segunda estructura, un gran número de cadenas de los PE se encuentran incorporadas a la partícula. Estos modelos han sido ampliamente discutidos; sin embargo, la mayoría de las estructuras experimentales se encuentran en relación con estos dos modelos y, en general, con más cercanía a la estructura de “huevos revueltos” (Philipp, Dautzenberg, Linow, Kötz, & Dawydoff, 1989).

En lo que refiere al modo de obtención de los CIPE, se ha descrito que la mezcla de dispersiones de polianiones o policationes conduce a la formación espontánea de estos complejos, con la consecuente liberación de los contraiones (Burkhardt et al., 2008). Esta asociación se debe a las fuertes interacciones electrostáticas que ocurren entre las macromoléculas que se encuentran en dispersión (Palena, García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015a; Van der Gucht, Spruijt, Lemmers, & Stuart, 2011). La fuerza impulsora de la formación del complejo es principalmente la ganancia de entropía debido a la liberación de los contraiones de bajo peso molecular. No obstante, otro tipo de interacciones, tales como, puente hidrógeno e hidrofóbicas, también pueden contribuir a la formación de los CIPE (Thünemann et al., 2004). La característica de



espontaneidad es una condición muy ventajosa para obtener los CIPE, ya que, de esta manera, se evita el uso de agentes de entrecruzamiento que pudieran causar toxicidad o efectos adversos en el organismo (Kaur, Harikumar, & Kaur, 2012).

La formación de las distintas estructuras de los complejos se encuentra determinada por la rápida cinética del proceso de formación, seguido de la redistribución de las cadenas de PE hasta alcanzar una conformación cercana al equilibrio (Thünemann et al., 2004). Otros factores influyentes en la formación y la estabilidad de los CIPE son el proceso de mezclado (Dragan & Schwarz, 2004), las condiciones del medio, tales como la concentración de sales y de PE, y las características intrínsecas de los PE, como el peso molecular, la flexibilidad de las cadenas y la densidad de carga (Thünemann et al., 2004).

En términos generales, el proceso de formación de los CIPE involucra dos pasos consecutivos. La formación de las partículas primarias de CIPE por la mezcla de las dispersiones de los PE, seguida por la formación de las partículas secundarias, como resultado de la agregación de las primeras (Müller, Kebler, Fröhlich, Poeschla, & Torger, 2011).

Como se mencionó en párrafos precedentes, se encuentran disponibles numerosas publicaciones acerca de complejos binarios PE-F, donde un F cargado se encuentra interaccionando con un PE de carga opuesta. Sin embargo, la información acerca de sistemas ternarios (CIPE) cargados con F, es más limitada.

En la literatura científica, se encuentra disponible un artículo de revisión, acerca del uso de Eudragit® para la obtención de CIPE (Mustafin, 2011). Uno de los primeros sistemas obtenidos fue el complejo formado entre Eudragit® E100 y Eudragit® L100, el cual fue caracterizado y se evaluó su potencial uso como sistema de liberación bajo la forma de comprimidos (R. Moustafine, Kabanova, et al., 2005) (Mustafine, 2005). Posteriormente, varios complejos, que contenían distintos tipos de Eudragit® (L100-55, L100, EPO) fueron preparados y estudiados, para ser utilizados en el diseño de matrices para liberación controlada de F (R. Moustafine & Bobyleva, 2006; R. Moustafine, Kabanova, et al., 2005; R. I. Moustafine et al., 2011; R. I. Moustafine et al., 2008). Además, se han descrito sistemas en donde interacciona un Eudragit® con otros PE, para el diseño de sistemas portadores, principalmente para ser administrados por vía oral. Dentro de estas investigaciones se destacan los CIPE en sistemas matriciales monolíticos para liberación controlada de F, en donde un Eudragit® interacciona con alginato de sodio (R. Moustafine, Kemenova, et al.,



2005), con chitosan (R. I. Moustafine et al., 2008) o con κ -carragenina (Prado, Matulewicz, Bonelli, & Cukierman, 2008).

En nuestro grupo de investigación existen algunos antecedentes sobre los complejos ternarios. Se han desarrollado y evaluado sistemas dispersos constituidos por Eudragit[®] L100 y Eudragit[®] EPO, portadores de F ácidos y básicos. Estos sistemas se caracterizan por obtenerse mediante una metodología simple y libre de solventes orgánicos. Además, luego de ser liofilizados se redispersan fácilmente, las dispersiones son físicamente estables y presentan una alta proporción de F cargado, lo que permite que actúen como un reservorio que libera lentamente el F en medio acuoso. Adicionalmente, la liberación de F desde los CIPE muestra una notable robustez frente a los cambios de pH del medio de liberación, lo que se constituye en una fortaleza, frente a los complejos binarios homólogos, para el diseño de SLM para ser administrados por vía per-oral (Palena et al., 2015a; Palena et al., 2012).

Además, se han evaluado sistemas matriciales (monolíticos compactos) con utilidad para liberación colónica de mesalazina, constituidos por complejos binarios Eudragit[®]E-F en estado sólido, con el agregado de pequeñas cantidades de carbómero. En este caso, los sistemas formarían un complejo ternario en el TGI luego de su administración. De esta manera, se ha demostrado que la liberación de los F, puede ser controlada y dirigida hacia las porciones distales del intestino y que el agregado de un segundo PE, de carga opuesta al primero, fue efectivo para lograr una liberación modulada del F (Quinteros, Manzo, & Allemanni, 2010).

Por otra parte, los SLM multiparticulados son principalmente formas farmacéuticas para administración por vía per-oral, que consisten en una multiplicidad de pequeñas unidades discretas, cada una de las cuales exhibe características propias (Dey, Majumdar, & Rao, 2008). En estos sistemas multiparticulados, la dosis de F liberado corresponde a una multiplicidad de eventos debido a las subunidades que las componen (propiedades que exhibe cada partícula), las cuales típicamente se presentan como partículas esféricas con diámetros comprendidos entre los 50 μm y 2 mm (Shaji, Chadawar, & Talwalkar, 2007).

De esta manera, las multipartículas son formas farmacéuticas en donde el F está presente en numerosas subunidades independientes pequeñas (Dey et al., 2008) y para administrar las dosis de F recomendadas, estas multipartículas suelen ser encapsuladas o comprimidas, para facilitar su posterior administración (Bodmeier, 1997; Pharma-Polymers, 2002).



Al ser un sistema múltiple-unitario, presenta ventajas biofarmacéuticas en comparación con las unidades simples o sistemas monolíticos, en términos de una distribución y transporte más uniforme y predecible a través del TGI, el cual es más independiente del estado nutricional, en comparación con las formas monolíticas convencionales; es decir, suelen ser menos dependientes del vaciado gástrico (Krämer & Blume, 1994; Tang, Chan, & Heng, 2005). En conjunto, estas propiedades resultan en una menor variabilidad inter e intra-individuo y se reflejan en una mayor robustez y versatilidad de estos sistemas, en comparación con los monolíticos (Dey et al., 2008).

Los sistemas multiparticulados han sido estudiado con mucho énfasis, debido a que estas formas farmacéuticas presentan mayor biodisponibilidad del F en comparación con las unidades simples, menor riesgo de toxicidad sistémica y se puede predecir su comportamiento (Asghar & Chandran, 2006). Son diversas las razones que justifican la formulación de multipartículas: facilitar la desintegración en el estómago, proporcionar una rápida desintegración si se encuentran compactadas en un sistema matricial o la posibilidad de disolverse o dispersarse en agua, lo cual es de utilidad en los pacientes que presentan problemas de deglución, tales como los niños o ancianos. Además, estos sistemas presentan un comportamiento farmacocinético más reproducible que los sistemas monolíticos convencionales (Dey et al., 2008).

Una ventaja adicional de estos sistemas múltiples, es que se puede combinar en una misma unidad de dosificación, como por ejemplo en un cápsula, más de un tipo de sistema multiparticulado con patrones de liberación del F diferenciados, lo que resulta en un comportamiento multicinético en términos de velocidad y mecanismo de liberación del F (Ghebre-Sellassie, 1989).

Sobre la base de lo expuesto, en este trabajo de tesis se estudian diferentes PE como portadores de BZ y CMP, para ser utilizados en el diseño de formas farmacéuticas sólidas de liberación modificada, para la vía per-oral, en donde se hace uso del conocimiento generado en relación con los sistemas binarios (PE-F) y ternarios (CIPE), así como de las ventajas de los sistemas multiparticulados, con el fin de direccionar las potencialidades de estos sistemas para la optimización de la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.



PARTE I: SISTEMAS PORTADORES DE BZ BASADOS EN CIPE

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Materiales

4.2.1.1. Fármaco

Como fue descripto en el capítulo 2 *Principios activos y excipientes seleccionados*, el BZ fue extraído y purificado desde los comprimidos comerciales disponibles (Radanil[®], Roche, Argentina).

4.2.1.2. Polielectrolitos

Se utilizaron cinco polimetacrilatos donados por Etilfarma Argentina (Evonik Röhm GmbH, Alemania): Eudragit EPO[®] (EuE), Eudragit L100[®] (EuL), Eudragit L10055[®] (EuLD), Eudragit S100[®] (EuS) y Eudragit FS 30 D[®] (EuFS). Además, se utilizaron dos polisacáridos: ácido alginico (AA) de algas marrones *Macrocystis pyrifera* (grado farmacutico, Lote SLB C 9738V Sigma Aldrich[®], St. Louis, USA) y chitosan (Chi) (grado farmacéutico, (Lote 04924RH EC 222-311-2, Sigma Aldrich[®], St. Louis, USA).

4.2.2. Metodología de obtención de los CIPE cargados con BZ

Se prepararon dos tipos de sistemas: compuestos por polimetacrilatos (polímeros sintéticos) y compuestos por polisacáridos (polímeros naturales). En los primeros, se hizo interaccionar EuE con cada uno de los polimetacrilatos ácidos (EuL, EuLD, EuS, EuFS). En los segundos, se hizo interaccionar Chi con AA. El agregado del segundo PE se hizo en proporciones estequiométricas para neutralizar la totalidad de los grupos ionizables del PE catiónico (los grupos ionizables fueron determinados de acuerdo a la metodología descripta en el apartado 2.3.2 del capítulo 2). El BZ se incorporó en relación 1:1, respecto de la masa total de CIPE.

Para la obtención de los sistemas en estado sólido se utilizó el método de evaporación de solvente. Para lo cual, los sólidos de los dos PE y el BZ fueron puestos en contacto en un mortero y se adicionó poco a poco el medio de interacción. Los medios empleados fueron: agua y una mezcla hidroalcohólica (H₂O:Etanol 1:1). La adición del medio de interacción permitió formar una mezcla semisólida, la cual fue amasada y se dejó interaccionar durante 24 h. El volumen de agua utilizada como medio de interacción para la obtención de los sistemas fue (2,0 ± 0,4) mL/g sólido, en



tanto que en el caso de la mezcla hidroalcohólica el volumen fue $(1,7 \pm 0,5)$ mL/g sólido. Luego de transcurridas las 24 h, el material se dejó reposar y se secó a temperatura ambiente y hasta peso constante, monitoreado mediante determinación de la masa en una balanza analítica. Se consideró constante cuando 3 determinaciones sucesivas presentaron una variación en la masa inferior al 5 %. Una vez seco, el material fue molido con un pilón en el mortero y se tamizó a través de mallas de acero inoxidable para obtener partículas de tamaño uniforme en el rango de los 210-400 μm .

De esta manera se obtuvieron todas las series de sistemas basados en los CIPE cargados con BZ, tanto en agua (supraíndice "a"), como en mezcla hidroalcohólica (supraíndice "ha"), a saber: EuE-EuL-BZ^a, EuE-EuL-BZ^{ha}, EuE-EuLD-BZ^a, EuE-EuLD-BZ^{ha}, EuE-EuS-BZ^a, EuE-EuS-BZ^{ha}, EuE-EuFS-BZ^a, EuE-EuFS-BZ^{ha}, Chi-AA-BZ^a y Chi-AA-BZ^{ha}.

4.2.3. Metodología de obtención las multipartículas

Luego de tamizar los sólidos obtenidos de los CIPE, éstos se sometieron a un proceso de granulación húmeda, con el fin de obtener las multipartículas. Cada uno de los CIPE obtenidos fue granulado. Para esto, el sólido colocado en el mortero fue humedecido con un (42 ± 3) % de agua, respecto de la masa total de sólido y, posteriormente, se granuló a través de diferentes mallas o Mesh. La masa de sólido húmeda se hizo pasar forzosamente a través de tamices o mallas de acero inoxidable de diferentes tamaños de poro, los cuales en orden decreciente fueron: 16 (equivalente a ~ 1000 μm), 20 (equivalente a ~ 850 μm) y 30 (equivalente a ~ 600 μm), y, finalmente, se colocó el recipiente colector. Las partículas obtenidas se dejaron secar a temperatura ambiente y hasta peso constante.

En la Figura 4.1 se presenta esquemáticamente el modo de obtención de los CIPE multiparticulados. En este esquema se incluye la metodología de obtención de los CIPE cargados con BZ y la posterior granulación húmeda para obtener las multipartículas.



Figura 4.1. Esquema de la metodología de obtención de los CIPE multiparticulados

4.2.4. Caracterización farmacotécnica y biofarmacéutica de las multipartículas

4.2.4.1. Granulometría, distribución de tamaño y rendimiento de obtención

Los sistemas portadores multiparticulados fueron clasificados, según su tamaño de partícula, en función de los tamices empleados (16-20; 20-30 y 30-colector). Asimismo, fue analizado el porcentaje de rendimiento de cada fracción recolectada. Para ello, se determinó la masa de partículas recolectadas en cada fracción y se comparó en forma relativa a la masa total obtenida. Además, la masa total de partículas, es decir, la sumatoria de la masa de todas las fracciones, fue comparada con la masa total inicial que se había colocado para la obtención de los CIPE. De esta manera, se determinó el rendimiento de obtención de las multipartículas de CIPE conteniendo BZ. A partir de estos resultados obtenidos, se seleccionó la fracción 16-20 para continuar con los otros ensayos.

4.2.4.2. Reología de sólidos y propiedades de flujo

4.2.4.2.a. Medición de la densidad de sólidos

Se midió la densidad a granel o *bulk* (δ_{bulk}) que hace referencia a la densidad de un sólido que no ha sido sometido a fuerza alguna y la densidad empaquetada o *tap* (δ_{tap}) que hace referencia a la densidad del polvo después de someterlo a impactos.

Para la determinación de la δ_{bulk} se colocó suavemente el sólido a evaluar en el interior de un recipiente calibrado (probeta), previamente tarado, y se determinó la masa del sólido. La densidad fue calculada como la relación entre la masa del sólido y el volumen ocupado.



Para la determinación de la δ_{tap} el recipiente calibrado que contiene el sólido en su interior, fue sometido a una serie de suaves impactos manuales verticales, hasta que el volumen final ocupado no presentó variaciones. La densidad se calculó como la relación entre la masa del sólido y el volumen ocupado luego de los impactos.

Las determinaciones se realizaron por sextuplicado y los resultados se informan como el promedio y la desviación estándar de las seis mediciones.

A modo esquemático, se presenta en la Figura 4.2 la metodología para determinar las δ_{bulk} y δ_{tap} .

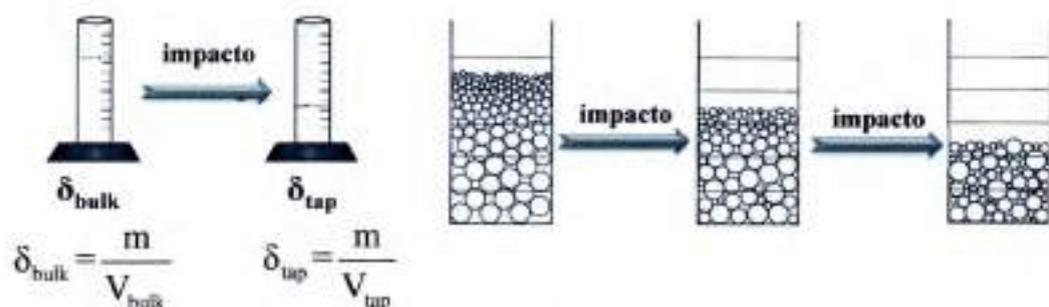


Figura 4.2. Determinación de las δ_{bulk} y δ_{tap}

A partir de los valores obtenidos de δ_{bulk} y δ_{tap} se calculó el índice de Carr (IC %) y el cociente de Hausner (CH), los cuales son indicativos de las propiedades de flujo de los sólidos (Vila Jato, 1997). Los cálculos de IC % y CH se realizaron mediante las Ecuaciones 4.1 y 4.2, respectivamente.

$$IC \% = \frac{\delta_{tap} - \delta_{bulk}}{\delta_{tap}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$CH = \frac{\delta_{tap}}{\delta_{bulk}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

4.2.4.2.b. Medición del ángulo de reposo dinámico

Para la determinación del ángulo de reposo dinámico se dejó caer el sólido sobre una base de diámetro conocido (2R), a través del orificio de un embudo de 0,7 cm de diámetro, ubicado a 5 cm de altura. El ángulo de reposo se calculó como $\Theta = \arctan h/r$ (Figura 4.3) y el resultado se informa como el promedio de doce mediciones.

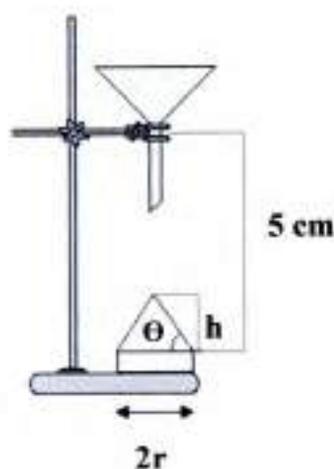


Figura 4.3. Ángulo de reposo dinámico

4.2.4.3. Medición de la sorción de agua y soluciones

Se utilizó un dispositivo descrito por Nogami *et al.* (1969) para cuantificar la sorción de fluidos (agua y solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2) desde las multipartículas. En la Figura 4.4 se observa el esquema de este equipo en forma de U (Nogami, Nagai, Fukuoka, & Sonobe, 1969).

En uno de los extremos se ubica el soporte porta muestra y en el otro una pipeta graduada al mismo nivel. Para llevar a cabo la medición de la sorción, en primer lugar, el sistema se llenó con agua o la solución de interés y se enrasó en 0 mL (posición inicial). Luego, se colocaron las multipartículas, contenidas dentro de un cilindro hueco de 1 cm de diámetro, en el soporte del equipo (tiempo cero). La masa de partículas analizada fue ~50 mg. A partir de ese momento, el sólido comenzó a capturar líquido por capilaridad y se midió el volumen tomado a intervalos de tiempo preestablecidos.



Figura 4.4. Esquema representativo del equipo utilizado para la medición de sorción de agua o soluciones.

En este ensayo se analizaron las multipartículas de los CIPE obtenidas en medio acuoso.



Todos los ensayos se realizaron por triplicado a una temperatura ambiente óptima, establecida entre 20-25 °C.

4.2.4.4. Estudios de liberación de BZ desde las multipartículas de CIPE

Se determinó la liberación del BZ desde cápsulas "0" de gelatina dura, cargadas con una masa de multipartículas que contenían el equivalente a 100 mg de BZ. Se utilizó un equipo de disolución-USP (Disolutor SOTAX®AT 7 Smart, Suiza), aparato 1 o método de canastillo a 100 rpm y $(37, 0 \pm 0,5)$ °C (USP33-NF28, 2010). El método de canastillo fue seleccionado debido a que las cápsulas flotan. De este modo, el canastillo deja de forma permanente la cápsula en contacto íntimo con el medio de liberación. Los canastillos utilizados fueron estándar, de malla 40.

El volumen de medio fue 900 mL cuando los medios ensayados fueron agua y NaCl 0,9%. Además, se evaluó la liberación mediante el empleo del Método A codificado en la Farmacopea de Estados Unidos para evaluar formas farmacéuticas de liberación modificada, que implica la evaluación de la liberación del BZ en medio ácido durante 2 h, seguido de un medio intestinal simulado sin enzimas durante 4 h, lo cual asemeja el pasaje del sistema por el TGI. Específicamente, se trata de un ensayo que evalúa la liberación de BZ durante 2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8, obtenida por el agregado de 250 mL de Na_3PO_4 0,2 M y, si es necesario, el ajuste de pH con HCl o NaOH 2 N (USP33-NF28, 2010). En este último caso el volumen de medio final fue 1000 mL. Previo al inicio del ensayo los medios fueron desgasificados.

Durante el ensayo se tomaron muestras prefiltradas de 4 mL a intervalos de tiempo predeterminados y se realizó la reposición con cantidades equivalentes de medio fresco termostatzado (medio sin BZ).

La concentración de BZ liberado se determinó por espectrofotometría UV-visible a $\lambda^{\text{BZ}} = 324$ nm, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción.

Las multipartículas evaluadas fueron principalmente las correspondientes a la fracción 16-20. Sin embargo, para evaluar la influencia del tamaño de partícula en las propiedades de liberación del BZ, se analizaron comparativamente los tres tamaños de partículas obtenidos (fracción 16-20, 20-30 y 30-colector) de dos de los sistemas obtenidos en medio hidroalcohólico: EuE-EuL-BZ^{ha} y Chi-AA-BZ^{ha}. Estos ensayos se realizaron utilizando el medio correspondiente al Método A, codificado en la Farmacopea de Estados Unidos, tal como se describió en el párrafo precedente.



Además, se evaluaron las liberaciones de sistemas multiparticulados compuestos por dos CIPE. En todos los casos se utilizó el sistema EuE-EuL-BZ^a, debido a sus propiedades de liberación de BZ, combinado con otro sistema en donde la liberación de BZ fuera modulada. Éste sistema se incorporó en una proporción equivalente a 25 mg de BZ. En las combinaciones se utilizaron los sistemas EuE-EuL-BZ^{ba}, EuE-EuLD-BZ^{ba}, EuE-EuLD-BZ^a y EuE-EuS-BZ^{ba}, que fueron incorporados en una proporción equivalente a 75 mg de BZ.

Los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron los perfiles de liberación como % de BZ liberado en función del tiempo.

4.2.4.5. Análisis matemático de los perfiles de liberación de BZ desde las multipartículas de CIPE

Para el análisis matemático de los perfiles de liberación se consideraron solamente las liberaciones en agua y en NaCl. Las liberaciones Método A-USP no se analizaron matemáticamente, debido a que los modelos elegidos para el análisis no han sido desarrollados o validados para el estudio de perfiles de liberación obtenidos con cambio de medio, durante el ensayo. Además, las aproximaciones o consideraciones que se realizan para poder aplicar las Ecuaciones 4.3-5, que se presentan a continuación, no serían válidas para este tipo de experimentos, fundamentalmente cuando se realiza el análisis cinético (Costa & Lobo, 2001).

4.2.4.5.a. Comparación de los perfiles de liberación mediante el análisis del factor de similitud

Los perfiles de liberación de BZ desde los CIPE fueron comparados, mediante el análisis del factor de similitud (f_2) (Food and Drug Administration, 2011), de acuerdo con la Ecuación 4.3. El f_2 es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual entre las dos curvas.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2 \right)^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad \text{Ecuación 4.3.}$$

Donde n es el número de tiempos de muestreo, R_t es el porcentaje de fármaco disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de referencia y P_t es el porcentaje de fármaco disuelto promedio en el tiempo t del medicamento de prueba. En este caso, será considerado R_t para un determinado sistema y P_t para otro de los sistemas.



Por lo general valores de f_2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia de las dos curvas de liberación o disolución (Cook, de Anda Jáuregui, Carrasco, & Cruz, 2012; Food and Drug Administration, 2011).

4.2.4.5.b. Análisis cinético de los perfiles de liberación

Los perfiles de liberación de BZ fueron analizados mediante la utilización de los modelos cinéticos descriptos por Higuchi (Higuchi, 1963) expresado en la Ecuación 4.4 y Peppas (Peppas, 1985) expresado en la Ecuación 4.5. Para los análisis cinéticos se consideraron los datos experimentales correspondientes al intervalo de 5 – 60 % de BZ liberado.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k\sqrt{t} \quad \text{Ecuación 4.4.}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Ecuación 4.5.}$$

Donde M_t/M_∞ es la fracción de BZ liberado a tiempo t , k la constante de liberación y n es el exponente de difusión.

Se estableció como criterio no considerar los ajustes por regresión lineal en donde el valor del coeficiente de correlación (r^2) fuera inferior a 0,8.

4.2.5. Caracterización fisicoquímica de las multipartículas

4.2.5.1. Difracción de Rx de polvos

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente utilizando un difractómetro de Rx (PANalytical® X'Pert Pro, Países Bajos), con radiación Cu K α ($\lambda=1,5418$ Å), tubo de voltaje de 40 kV y tubo con corriente de 40 mA. Las muestras fueron colocadas en porta muestras de aluminio y los datos colectados en un intervalo angular de 5° a 90° 2 θ / θ , con un paso de 0,02° y una velocidad de barrido de 1°/min.

4.2.5.2. Microscopia confocal

Las partículas de los CIPE se analizaron utilizando un microscopio confocal de reflexión (LEXT OLS4000 3D Confocal Laser Microscope, Olympus®, América Latina). Para la toma de las imágenes y el procesamiento se utilizó un software específico (Lext OLS 4000 versión 3.1.1v, Olympus Corp). Las muestras se prepararon colocando cuidadosamente el material sólido sobre un portaobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 408X.

4.2.5.3. Espectroscopia FT-IR

Los espectros FT-IR se tomaron en un microscopio infrarrojo (Nicolet iN10, Thermo Scientific®, España). Las muestras se secaron en condiciones de vacío durante 2 h, antes de la toma del espectro. Se conservaron en envases de cierre perfecto conteniendo sílica gel, para evitar que las muestras se humedecieran. Los espectros fueron obtenidos y procesados con el programa EZ OMNIC ESP 5.1.

4.3. Resultados

4.3.1. Propiedades farmacotécnicas y biofarmacéuticas de las multipartículas

Las multipartículas de los CIPE cargados con BZ se desarrollaron mediante la metodología de evaporación de solvente, en dos medios de interacción diferentes, seguida de la granulación húmeda con agua como agente de humectación. Se obtuvieron con rendimientos de $(83 \pm 8) \%$, respecto de la sumatoria de la masa inicial de cada uno de los sólidos. El tamaño de partícula estuvo comprendido entre los 600 y 850 μm .

En lo que respecta al método de obtención, la granulación húmeda dio lugar a la obtención de diferentes tamaños de partículas, en concordancia con la metodología utilizada para el proceso, lo cual permitió obtener diferentes fracciones y porcentajes recuperados de cada una de éstas, tal como se presenta en la Tabla 4.1. Como se puede observar, el mayor porcentaje recuperado de las partículas se encontró entre las fracciones 16-20 y 20-30. Además, pudo observarse que el medio de interacción influye marcadamente en el porcentaje recuperado en cada una de las fracciones, pero no se observa un patrón repetitivo que permita establecer que en un determinado medio se recupera más de una determinada fracción.

En la Figura 4.5 se observan las fotografías de las partículas obtenidas. En éstas se puede observar macroscópicamente la granulometría y el aspecto visual presentado. Como se evidencia, los sistemas compuestos por los polimetacrilatos son partículas de color blanco, en tanto que los obtenidos con los polisacáridos presentan una colocación amarillo pálido. En su aspecto macroscópico, estas partículas se presentan con una superficie de aspecto liso y poco poroso.



Tabla 4.1. Tipificación del tamaño de partícula y porcentaje recolectado en cada fracción.

Sistemas	% recuperado		
	Fracción 16-20	Fracción 20-30	Fracción 30-colector
Chi-AA-BZ ^a	33,82	37,12	29,06
Chi-AA-BZ ^{ha}	67,87	22,36	9,77
EuE-EuL-BZ ^a	45,01	38,82	16,14
EuE-EuL-BZ ^{ha}	25,938	44,24	29,82
EuE-EuS-BZ ^a	45,48	45,34	9,183
EuE-EuS-BZ ^{ha}	32,72	47,2	20,08
EuE-EuLD-BZ ^a	84,04	10,76	5,2
EuE-EuLD-BZ ^{ha}	64,56	30,45	4,99
EuE-EuFS-BZ ^a	40,70	42,42	16,88
EuE-EuFS-BZ ^{ha}	47,65	47,88	4,47



Figura 4.5. Fotografías de las multipartículas obtenidas.

Las propiedades de flujo de las partículas fueron analizadas mediante las determinaciones de las δ_{bulk} y δ_{tap} , con el consecuente cálculo de los IC % y CH. Además, se determinó el ángulo de reposo dinámico (Θ). Los resultados obtenidos se informan en la Tabla 4.2.

Como puede observar, la δ_{tap} es igual o levemente mayor a la δ_{bulk} , lo que da indicio de que las partículas no se compactan marcadamente al recibir los impactos. En adición, cuando se comparó la influencia del medio de interacción, se pudo observar, en todos los sistemas desarrollados que las δ_{bulk} y δ_{tap} son levemente



mayores en los CIPE obtenidos en medio hidroalcohólico en comparación con los obtenidos sólo en agua. Un comportamiento similar se observó con el ángulo de reposo, en donde los sistemas obtenidos con la mezcla de solventes presentan valores de Θ iguales o levemente mayores a los obtenidos con agua, con excepción del sistema EuE-EuLD-BZ^{ha} que presentó un ángulo inferior en 1° respecto de su equivalente obtenido en medio acuoso.

Tabla 4.2. Propiedades de flujo de las partículas como medida de su comportamiento reológico. Parámetros evaluados en la fracción 16-20.

Sistemas	Parámetros de flujo				
	δ_{bulk} (g/mL)	δ_{tap} (g/mL)	IC %	CH	Θ (°)
Chi-AA-BZ^a	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,03	4 ± 1	1,04 ± 0,01	36 ± 1
Chi-AA-BZ^{ha}	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,03	3 ± 1	1,03 ± 0,01	37 ± 2
EuE-EuL-BZ^a	0,318 ± 0,004	0,339 ± 0,002	5 ± 2	1,05 ± 0,02	34 ± 2
EuE-EuL-BZ^{ha}	0,41 ± 0,02	0,419 ± 0,009	2 ± 2	1,02 ± 0,02	34 ± 2
EuE-EuS-BZ^a	0,34 ± 0,01	0,41 ± 0,01	2 ± 2	1,02 ± 0,02	28 ± 2
EuE-EuS-BZ^{ha}	0,34 ± 0,01	0,43 ± 0,01	3 ± 3	1,03 ± 0,03	30 ± 1
EuE-EuLD-BZ^a	0,37 ± 0,03	0,34 ± 0,02	7 ± 1	1,07 ± 0,01	31 ± 1
EuE-EuLD-BZ^{ha}	0,40 ± 0,03	0,37 ± 0,02	6 ± 2	1,06 ± 0,02	30 ± 1
EuE-EuFS-BZ^a	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,03	6 ± 1	1,06 ± 0,01	32 ± 1
EuE-EuFS-BZ^{ha}	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,03	5 ± 1	1,05 ± 0,01	35 ± 2

Como puede observar, la δ_{tap} es igual o levemente mayor a la δ_{bulk} , lo que da indicio de que las partículas no se compactan marcadamente al recibir los impactos. En adición, cuando se comparó la influencia del medio de interacción, se pudo observar, en todos los sistemas desarrollados que las δ_{bulk} y δ_{tap} son levemente mayores en los CIPE obtenidos en medio hidroalcohólico en comparación con los obtenidos sólo en agua. Un comportamiento similar se observó con el ángulo de reposo, en donde los sistemas obtenidos con la mezcla de solventes presentan valores de Θ iguales o levemente mayores a los obtenidos con agua, con excepción del sistema EuE-EuLD-BZ^{ha} que presentó un ángulo inferior en 1° respecto de su equivalente obtenido en medio acuoso.

La sorción de fluidos por parte de las partículas fue evaluada frente a los medios: agua y solución gástrica simulada sin enzimas, de pH 1,2. En la Figura 4.6 a) y b) se pueden observar los perfiles generados por la captura o sorción de fluidos en función del tiempo, para los medios agua y solución de pH 1,2, respectivamente.



Como puede observarse, en ambos medios, el sistema EuE-EuL-BZ^a presentó una mayor velocidad en la captura de fluidos, alcanzando aproximadamente un volumen de 1 mL de fluido a los 30 min del ensayo.

Los sistemas compuestos por los otros polimetacrilatos (EuE-EuLD-BZ^a, EuE-EuS-BZ^a y EuE-EuFS-BZ^a) no presentaron diferencias entre sus perfiles y, tal como puede observarse, se muestran prácticamente superpuestos, incluso el volumen final de fluido capturado es aproximadamente igual en los dos medios evaluados (~ 0,7 mL).

Por su parte, los perfiles de sorción correspondientes al sistema Chi-AA-BZ^a presentan, en los primeros tiempos, una rápida captura de fluido cuando el medio es solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2; en comparación a cuando el medio de sorción es agua. El volumen final sorbido por este sistema es mayor en la solución gástrica (~1,2 mL) que en agua (~ 0,85 mL), en los tiempos ensayados.

Además, si se considera la porción lineal de la gráfica, se obtiene por extrapolación una mayor ordenada al origen (~ 0,55 mL) en el medio ácido en comparación con agua como medio de sorción (~ 0,2 mL). En la Tabla 4.3 se presentan las velocidades de captura, determinada a partir de la regresión lineal del perfil de sorción. Se puede observar que, los perfiles de sorción ajustaron adecuadamente a la regresión línea aplicada, evidenciado por los $r^2 \geq 0,97$ en todos los casos. A partir de estos resultados, se confirma la mayor velocidad de captura de fluidos por parte del sistema EuE-EuL-BZ^a que es aproximadamente 10 veces mayor, en comparación con los otros CIPE.

Tabla 4.3. Velocidad de sorción de los CIPE, determinada por regresión lineal de los gráficos de volumen de sorción en función del tiempo.

CIPE multiparticulados		Medio: agua	Medio: solución gástrica simulada sin enzimas, de pH 1,2.
EuE-EuL-BZ ^a	Pendiente	0,030 ± 0,001	0,031 ± 0,001
	r^2	0,97	0,98
EuE-EuLD-BZ ^a	Pendiente	0,00353 ± 0,00004	0,00441 ± 0,00006
	r^2	0,99	0,99
EuE-EuS-BZ ^a	Pendiente	0,00347 ± 0,00003	0,00420 ± 0,00007
	r^2	0,99	0,99
EuE-EuFS-BZ ^a	Pendiente	0,00345 ± 0,00004	0,00407 ± 0,00008
	r^2	0,99	0,9889
Chi-AA-BZ ^a	Pendiente	0,00347 ± 0,00007	0,0037 ± 0,0001
	r^2	0,99	0,97

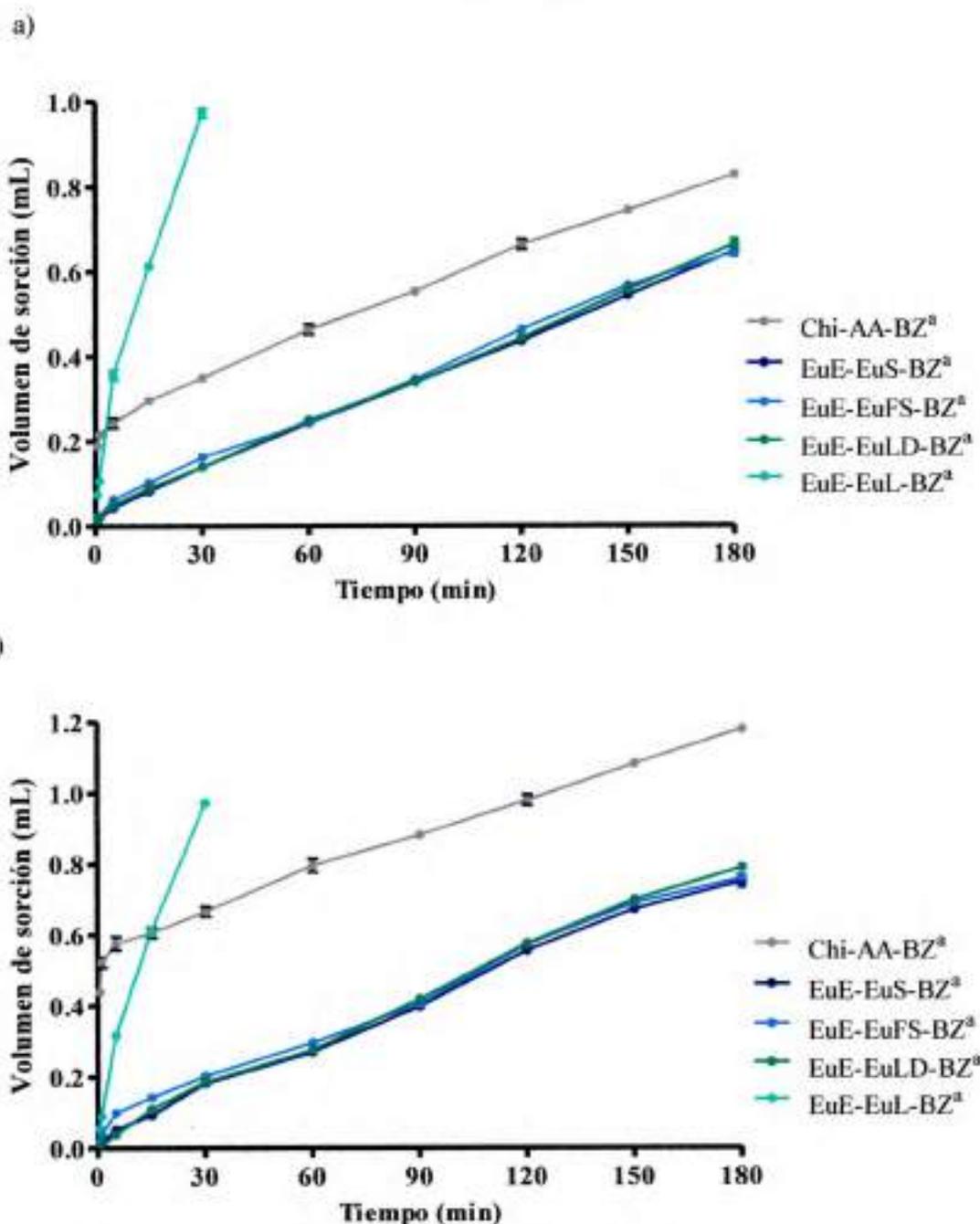


Figura 4.6. Sorción de fluidos desde las multipartículas en una masa de ~50 mg. a) perfil de sorción de agua. b) Perfil de sorción de solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2.

En la Figura 4.7 se observa la apariencia visual de las partículas de EuE-EuL-BZ² y Chi-AA-BZ² a medida que capturaban la solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2 en tres diferentes tiempos del ensayo: 0 min (condición inicial), 90 min (tiempo medio del ensayo) y 180 min (tiempo final del ensayo). En estas imágenes se puede observar que la mayoría de las partículas contenidas en el cilindro hueco se encuentran humectadas con el medio de sorción. En particular, el sistema Chi-AA-BZ² desarrolla una amplia capa gel y presenta un marcado hinchamiento de las



partículas, en tanto que el sistema EuE-EuL-BZ^o desarrolla una limitada capa gel. Similar aspecto de las partículas, en cuanto a la apariencia visual, se observó cuando el medio de sorción fue agua.

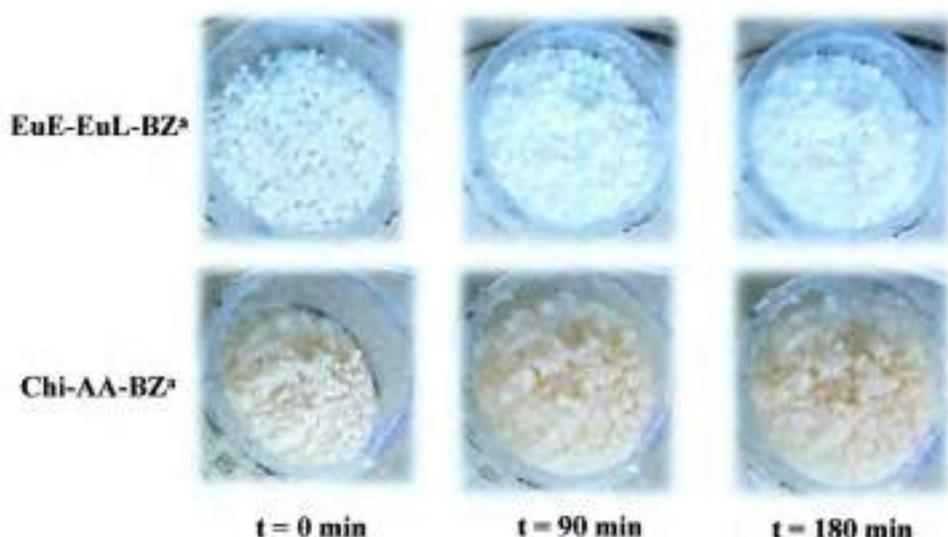


Figura 4.7. Apariencia visual de las partículas de EuE-EuL-BZ^o y Chi-AA-BZ^o durante el ensayo de sorción de fluidos a diferentes tiempos.

En la Figura 4.8 presentan los perfiles de liberación de BZ en agua, expresados como % de BZ liberado en función del tiempo. En éstos, se puede observar que los sistemas compuestos por los polimetacrilatos presentaron perfiles de liberación similares ($f_2 > 50$) y la velocidad de liberación de BZ es lenta y modulada. Además, en las condiciones ensayadas, la cantidad total de BZ liberada no supera el 60 %. Por su parte, el sistema compuesto por los polisacáridos, presentó una mayor velocidad de liberación en los primeros 30 min del ensayo, en comparación con los constituidos por polimetacrilatos. El sistema Chi-AA-BZ^o presentó efecto *Burst* (liberación inicial grande y rápida) y liberó el 40 % del BZ cargado a los 5 min del ensayo. Alcanzadas las 6 h del ensayo, el % de BZ liberado alcanza ~100 %, lo que representó aproximadamente el doble de la cantidad total liberada de BZ desde los CIPE compuestos por Eudragit[®]. Complementariamente, el análisis del aspecto visual de las partículas que quedaron retenidas en el canastillo, luego de finalizado el estudio de liberación, permitió evidenciar una reducción del tamaño de partícula, lo que podría indicar que tuvo lugar un proceso de erosión.

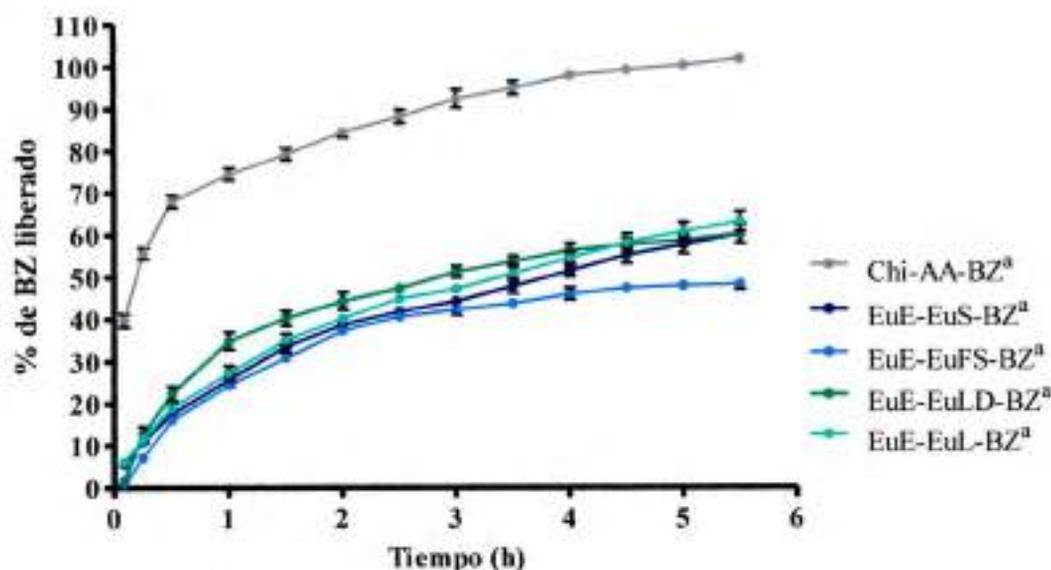


Figura 4.8. Perfiles de liberación de BZ en agua de los CIPE obtenidos utilizando como medio de interacción en agua.

Los perfiles de liberación de BZ en NaCl 0,9 % se presentan en la Figura 4.9. En este medio de liberación no se observaron marcadas diferencias entre los sistemas compuestos por los polimetacrilatos o los polisacáridos. Sin embargo, el análisis estadístico de estos perfiles permite evidenciar que sólo son similares estadísticamente los perfiles de liberación de EuE-EuS-BZ^a y EuE-EuFS-BZ^a ($f_2 > 50$), en tanto que todos los otros no son similares entre sí. En todos los casos, se observó una velocidad de liberación lenta y modulada. El sistema EuE-EuL-BZ^a es el que presentó la menor velocidad de liberación. En este último caso, las partículas que se recolectaron en el canastillo, luego de la liberación, se encontraban en su mayoría con una capa gel alrededor, lo que podría ser el causante de la menor velocidad de liberación de BZ desde este sistema, en comparación con los perfiles de liberación obtenidos en agua.

En la Tabla 4.4 se presentan el análisis cinético de los perfiles de liberación de BZ desde los CIPE constituidos por polimetacrilatos. A partir de estos resultados, se puede observar que la regresión lineal se ajusta con un buen coeficiente de correlación para ambos modelos, con $r^2 \geq 0,94$ en todos los casos.

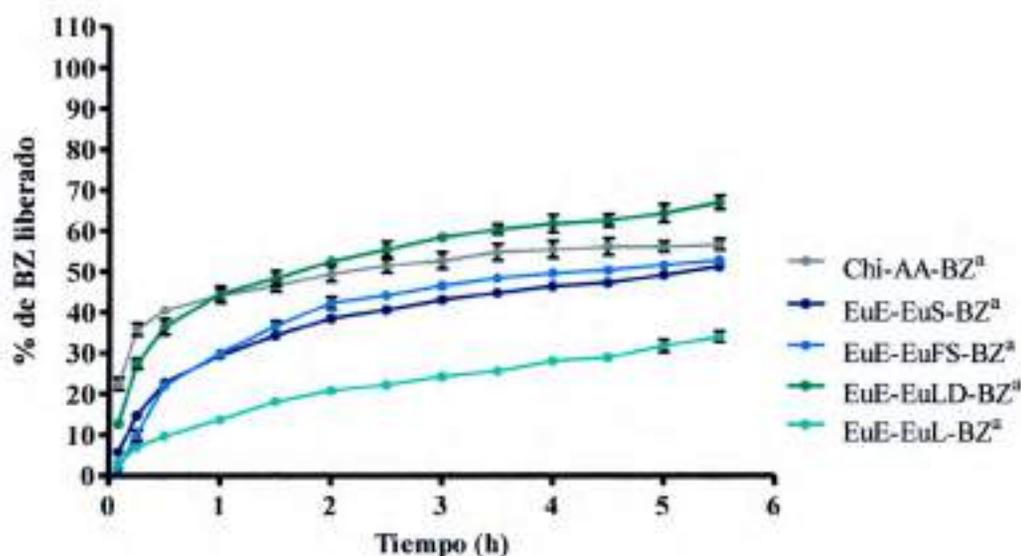


Figura 4.9. Perfiles de liberación de BZ en NaCl 0,9 % de los CIPE obtenidos utilizando como medio de interacción en agua.

Tabla 4. 4 Cinética de liberación de BZ desde los CIPE en agua y NaCl 0,9 %, sobre la base de las ecuaciones de Higuchi y Peppas.

Medio	Sistemas	Higuchi		Peppas	
		k	r ²	n	r ²
Agua	EuE-EuL-BZª	26,53	0,99	0,50	0,99
	EuE-EuLD-BZª	24,35	0,96	0,48	0,96
	EuE-EuS-BZª	25,29	0,99	0,5	0,99
	EuE-EuFS-BZª	21,79	0,94	0,57	0,94
NaCl 0,9 %	EuE-EuL-BZª	14,15	0,99	0,51	0,99
	EuE-EuLD-BZª	23,04	0,98	0,29	0,99
	EuE-EuS-BZª	16,63	0,98	0,33	0,99
	EuE-EuFS-BZª	18,10	0,94	0,36	0,97

k expresada en %·h⁻¹. Datos experimentales: 5 – 60 % de BZ liberado.

En la Figura 4.10 a) se observan los perfiles de liberación en las soluciones codificadas en el Método A-USP (medio de liberación) de BZ desde los CIPE multiparticulados, obtenidos en agua como medio de interacción. A partir de los resultados obtenidos, es posible observar que para los polimetacrilatos la velocidad de liberación de BZ desde sistemas es diferente, lo que evidencia la influencia de las características fisicoquímicas del segundo PE adicionado, es decir, del PE ácido. El orden de la velocidad de liberación de BZ desde estos CIPE es: EuE-EuL-BZª > EuE-EuS-BZª >> EuE-EuFS-BZª > EuE-EuLD-BZª. El sistema EuE-EuS-BZª presenta



efecto *Burst* y libera el 65 % del BZ cargado a los 5 min del ensayo y luego presenta una liberación modulada. Los sistemas EuE-EuFS-BZ³ y EuE-EuLD-BZ³ presentaron una liberación lenta y modulada durante las dos primeras horas del ensayo. En todos los casos, con excepción del sistema EuE-EuL-BZ³ que presentó una muy rápida velocidad de liberación y liberó el 90 % del BZ a los 5 min (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2009), el cambio de medio (a partir de las 2 h) activó la liberación del BZ, lo que se corresponde con un aumento en la solubilidad de los PE en función del pH. El sistema Chi-AA-BZ³ presentó una velocidad de liberación lenta y modulada e independiente del pH.

Los perfiles de liberación de BZ desde los CIPE obtenidos utilizando mezcla hidroalcohólica como medio de interacción y las soluciones codificadas en el Método A-USP como medio de liberación se presentan en la Figura 4.10 b). En estos perfiles puede observarse que, durante las 2 h de etapa ácida, la velocidad de liberación de BZ desde los CIPE constituidos por los polimetacrilatos fue modulada. El orden de la velocidad de liberación de BZ desde estos CIPE es: EuE-EuS-BZ^{3a} > EuE-EuL-BZ^{3a} ~ EuE-EuLD-BZ^{3a} > EuE-EuFS-BZ^{3a}, pero los perfiles de liberación obtenidos para cada sistema, presentan menores diferencias entre ellos, que aquellos sistemas homólogos obtenidos en agua, como medio de interacción. Se observó efecto *Burst* en los sistemas EuE-EuS-BZ^{3a} y EuE-EuL-BZ^{3a}, los cuales liberaron aproximadamente el 25 % del BZ cargado a los 5 min del ensayo. Para estos CIPE, el cambio de medio (a partir de las 2 h) activó levemente la liberación del BZ, con excepción del sistema EuE-EuFS-BZ^{3a}, en donde la influencia por el cambio de medio fue mayor y, en consecuencia, la liberación del BZ resultó activada.

El sistema Chi-AA-BZ³ presentó una velocidad de liberación lenta y modulada e independiente del pH. Además, si se comparan los perfiles de liberación de éste último, se puede observar que el medio de interacción para la obtención de los CIPE (agua o mezcla hidroalcohólica), no influye en las propiedades de liberación del BZ.

Sobre la base de los resultados obtenidos utilizando el Método A, se decidió evaluar las propiedades de liberación del BZ desde sistemas multiparticulados que combinaran dos CIPE con diferente comportamiento de liberación. Fueron seleccionadas cuatro combinaciones. Todas éstas contienen EuE-EuL-BZ^{3a}, debido a que presenta una velocidad de liberación de BZ muy rápida, en combinación con otro CIPE, en donde la liberación de BZ fue lenta y modulada. Los perfiles de liberación de BZ obtenidos se presentan en la Figura 4.11.

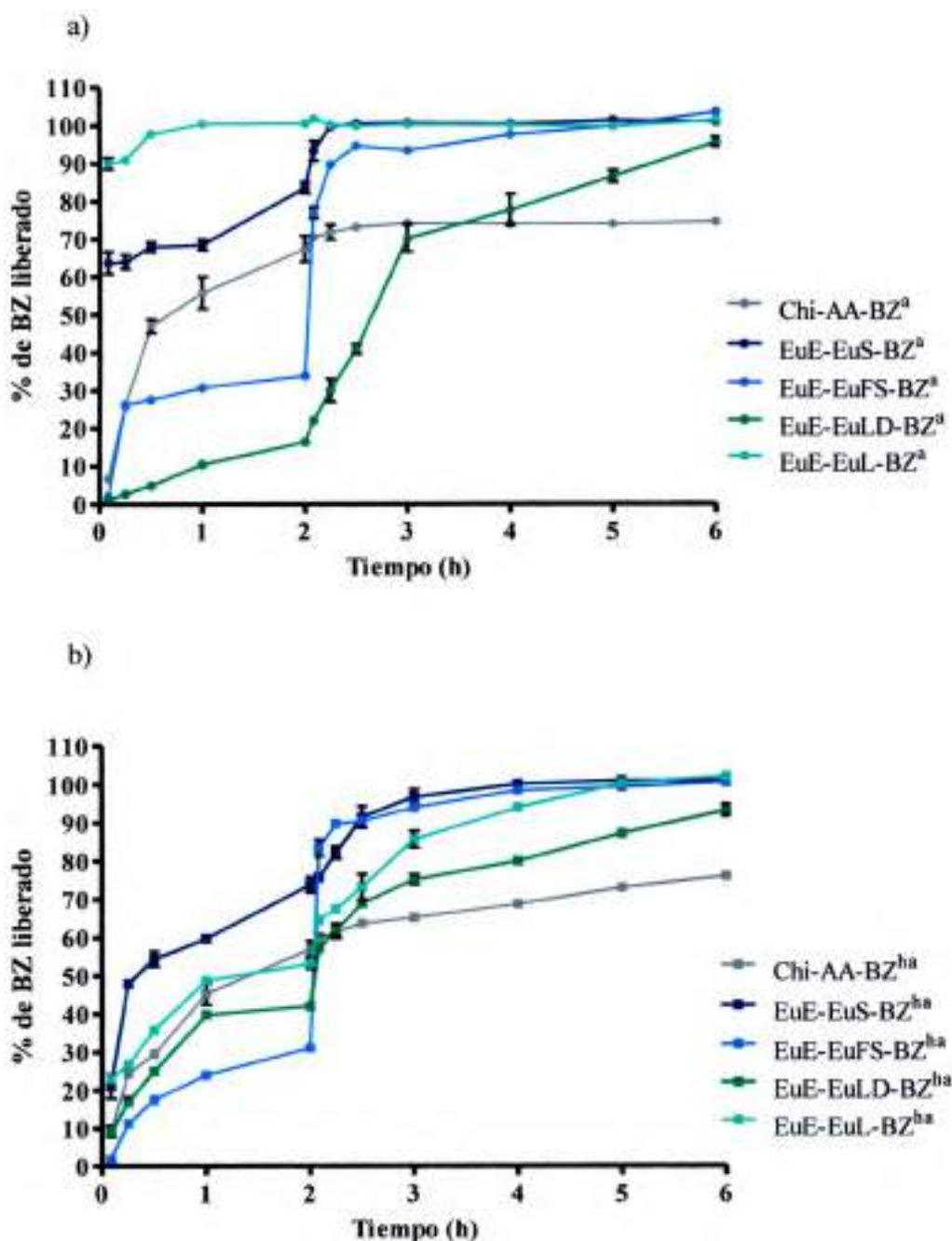


Figura 4.10. Perfiles de liberación de BZ utilizando el Método A – USP (2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8) de los CIPE obtenidos utilizando como medio de interacción a) agua y b) mezcla hidroalcohólico.

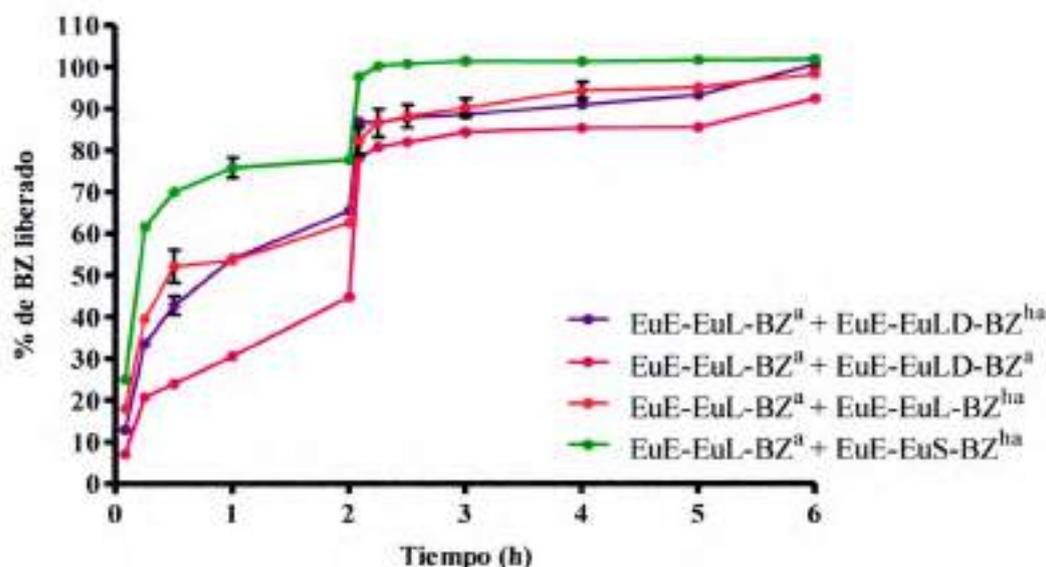


Figura 4. 11. Perfiles de liberación de BZ utilizando el Método A – USP (2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8) de combinaciones de CIPE con diferente comportamiento de liberación.

Como puede observarse, la velocidad de liberación de BZ se corresponde con la sumatoria de los perfiles de liberación de cada uno de los sistemas que componen la combinación estudiada. En todos los casos, se observó una liberación modulada hasta las 2 h. Luego, el cambio de medio activó la liberación del BZ y alcanzó un 80 % del porcentaje total de BZ cargado en los sistemas.

En análisis de la influencia del tamaño de partícula en las propiedades de liberación de BZ se realizó para los sistemas Chi-AA-BZ^{ha} y EuE-EuL-BZ^{ha}. Como puede observarse en la Figuras 4.12 a) y b), los perfiles de liberación para ambos sistemas mostraron que, la fracción 30-colector, presentó una velocidad de liberación de BZ mayor que la fracción 20-30 y ésta mayor que la fracción 16-20. Es decir, se observó que a menor tamaño de partícula se produjo un leve incremento en la velocidad de liberación de BZ. En el sistema Chi-AA-BZ^{ha} la liberación de BZ fue modulada y prácticamente no se vio alterada por el cambio de medio, es decir, no resultó influenciada por el cambio de pH. En el sistema EuE-EuL-BZ^{ha} la velocidad de liberación de BZ también fue modulada, pero la influencia del cambio de pH en las propiedades de liberación fue marcada y a partir de las 2 h, la cantidad de BZ liberado se incrementó rápidamente. Además, las partículas que quedaron retenidas en el canastillo, luego del proceso de liberación, permitieron evidenciar que en el sistema Chi-AA-BZ^{ha} se había formado una amplia capa gel viscosa y las partículas habían



reducido su tamaño. Por su parte, en el sistema EuE-EuL-BZ^{ha} la formación de capa gel fue limitada y las partículas se redujeron en tamaño.

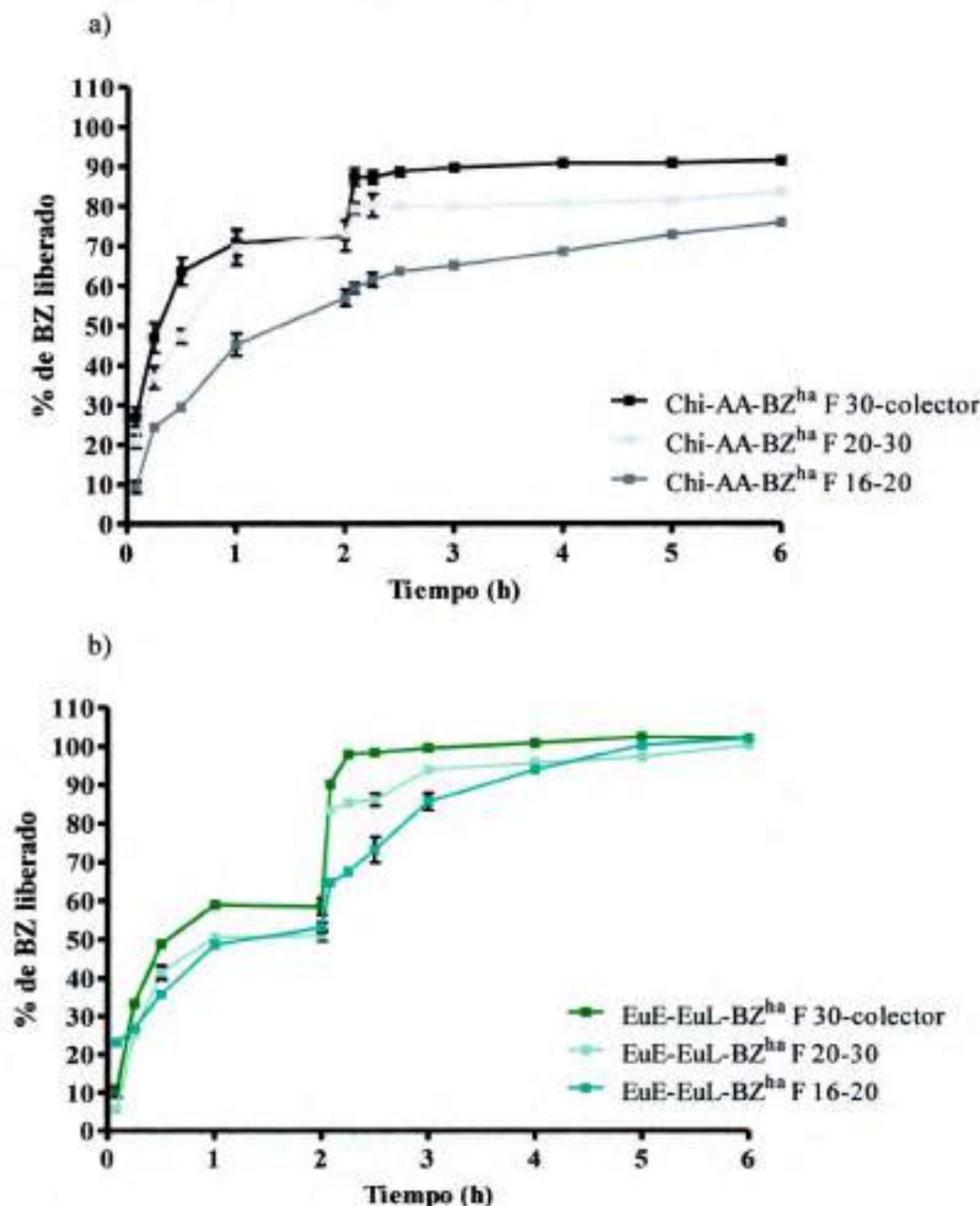


Figura 4.12. Perfiles de liberación de BZ utilizando el Método A – USP (2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8) en función del tamaño de partícula, de acuerdo con las diferentes fracciones obtenidas, a partir de los CIPE obtenidos utilizando mezcla hidroalcohólica como medio de interacción. a) Perfiles de liberación desde el sistema Chi-AA-BZ^{ha}. b) Perfiles de liberación desde el sistema EuE-EuL-BZ^{ha}.



4.3.2. Propiedades fisicoquímicas de las multipartículas

En análisis de las partículas mediante microscopía confocal de reflexión permitió observar las características morfológicas microscópicas de las partículas obtenidas, principalmente a nivel superficial.

Como se puede observar en la Figura 4.13 las partículas correspondientes a los sistemas Chi-AA-BZ^a y Chi-AA-BZ^{ba} poseen forma irregular, con una superficie que no es lisa, sino rugosa y la coloración es heterogénea a nivel superficial. En algunas regiones se observaron tintes anaranjados-marrones, mientras que en otras, la coloración fue amarillo pálido. Las fotografías permiten evidenciar que no se observa agregación entre las partículas. El medio de interacción influyó las características de superficie de las partículas. En las imágenes superiores de la Figura 4.13 se puede observar que cuando el medio de interacción es agua, el BZ se presenta en mayor medida libre a nivel superficial, lo que se ve reflejado por un aumento de la reflexión debido a la cristalinidad del sólido correspondiente al F puro. Por su parte, cuando el medio de interacción es la mezcla hidroalcohólica, la reflexión es menor, lo que se puede relacionar con una mayor proporción de BZ incorporado dentro del particulado polimérico matricial.

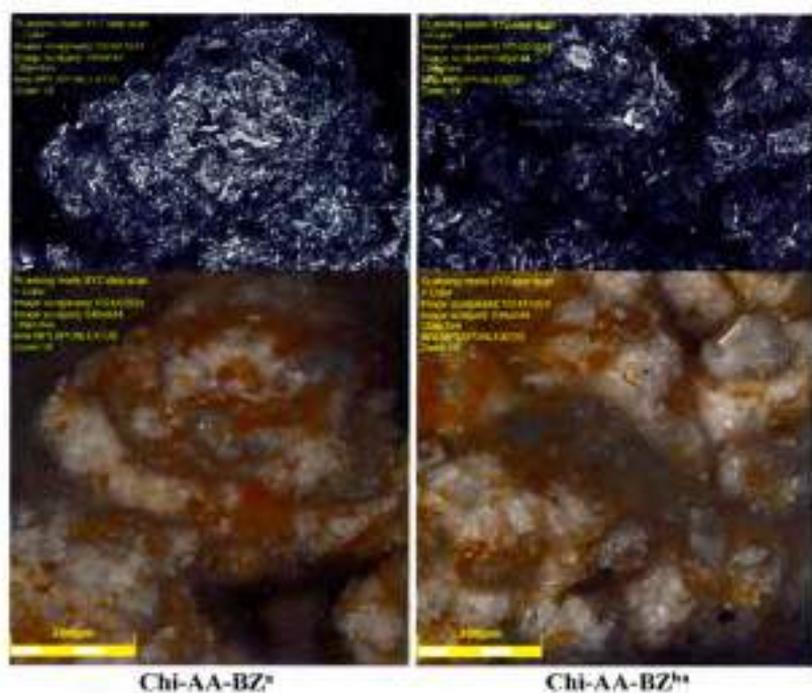


Figura 4.13. Imágenes de microscopía confocal para los sistemas Chi-AA-BZ obtenidos en medio acuoso (izquierda) e hidroalcohólico (derecha).



Las imágenes obtenidas por microscopía confocal para las partículas de EuE-EuL-BZ^a y EuE-EuL-BZ^{ba} se presentan en la Figura 4.14. Estas partículas también se presentan con formas y superficies irregulares, pero todos dentro de un intervalo de tamaño entre 600 y 800 μm . Las fotografías permiten evidenciar que no se observa agregación entre las partículas. En estas se puede observar que la coloración de las partículas es blanca y homogénea en la mayor parte de la extensión de la superficie y en algunas regiones se observa un aumento de la intensidad de la coloración que se corresponde con zonas de depresión en la topografía de superficie. Las partículas obtenidas en medio acuoso presentan una mayor proporción de BZ cristalino, que se observa como cristales aciculares en la superficie de las partículas (imágenes superiores). En las partículas obtenidas en medio hidroalcohólico la proporción de BZ presente como cristal es inferior, observado por la presencia de menores cristales aciculares en la superficie de la partícula analizada.

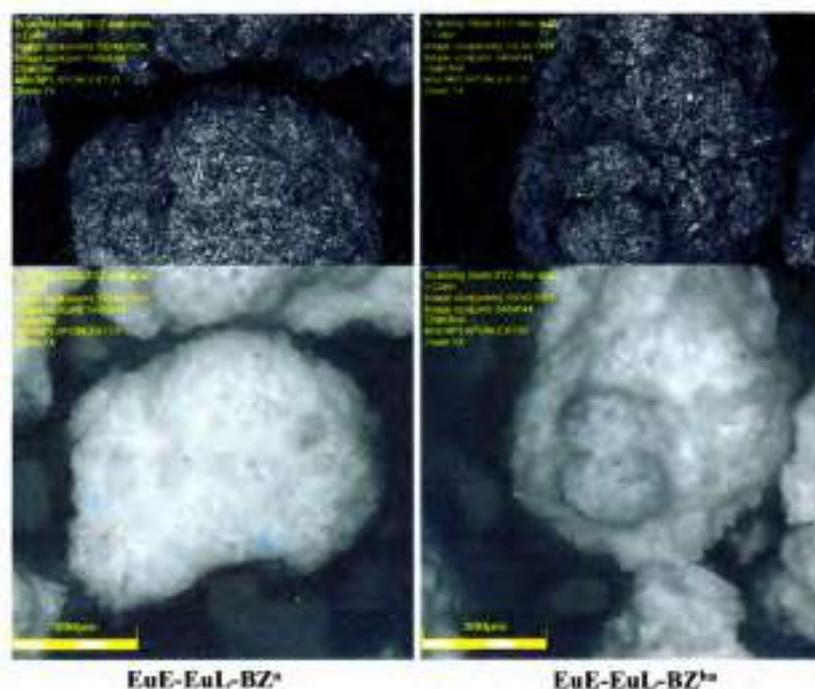


Figura 4.14. Imágenes de microscopía confocal para los sistemas EuE-EuL-BZ obtenidos en medio acuoso (izquierda) e hidroalcohólico (derecha).

En la Figura 4.15 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía confocal de las partículas EuE-EuS-BZ^a y EuE-EuS-BZ^{ba}. Al igual que en los casos anteriores, cuando el medio de interacción es agua, se observa mayor cantidad de BZ en la superficie de las partículas. Estas partículas también presentan coloración blanquecina, que se corresponde con las propiedades de los sólidos que la componen. El análisis de la reflexión del BZ permite evidenciar que hay presencia de cristales



aciculares en ambas partículas, pero aquellas obtenidas en medio acuoso presentan regiones de mayor densidad de reflexión que se observan como zonas diferenciadas del resto de la superficie de la partícula. En el sistema obtenido con la mezcla hidroalcohólica este fenómeno también se presenta, pero la intensidad de la reflexión es menor.

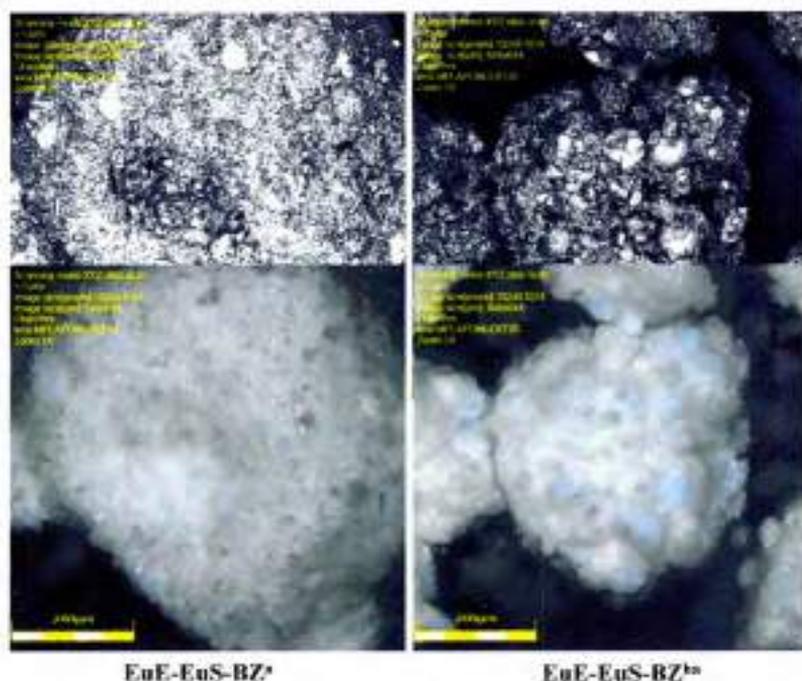


Figura 4.15. Imágenes de microscopía confocal para los sistemas EuE-EuS-BZ obtenidos en medio acuoso (izquierda) e hidroalcohólico (derecha).

Las partículas de EuE-EuLD-BZ obtenidas, tanto en medio acuoso como hidroalcohólico, no presentaron marcadas diferencias en la superficie de las partículas mediante el análisis por microscopía confocal. En la Figura 4.16 se muestran que las partículas obtenidas presentan coloración blanca y, que en ambos medios de interacción, hay BZ cristalino en la superficie de las partículas, presente como los cristales aciculares característicos de este F. Las imágenes registradas permiten evidenciar que no se observa agregación entre las partículas.

Finalmente, el análisis por microscopía confocal de los sistemas EuE-EuFS-BZ^a y EuE-EuFS-BZ^{ba} permitió evidenciar una marcada influencia del medio de interacción en lo que respecta a la superficie de las partículas (Figura 4.17). Si bien en ambos casos las partículas se presentan con una coloración blanquecina, cuando el medio de interacción es la mezcla hidroalcohólica, la superficie de las partículas se presenta menos rugosa y con algunas regiones de mayor translucencia, evidenciadas por la menor intensidad de la coloración blanca. No obstante, en ambos casos, la presencia

de BZ cristalino en la superficie de las partículas, al igual que en los sistemas presentados previamente. Las imágenes obtenidas permiten evidenciar que no se produce agregación entre las partículas.

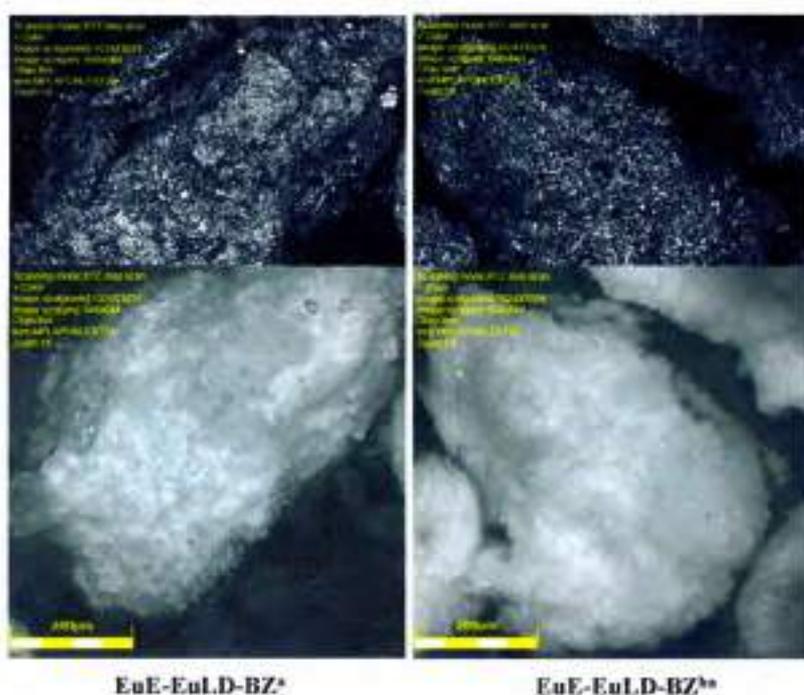


Figura 4.16. Imágenes de microscopia confocal para los sistemas EuE-EuLD-BZ obtenidos en medio acuoso (izquierda) e hidroalcohólico (derecha).

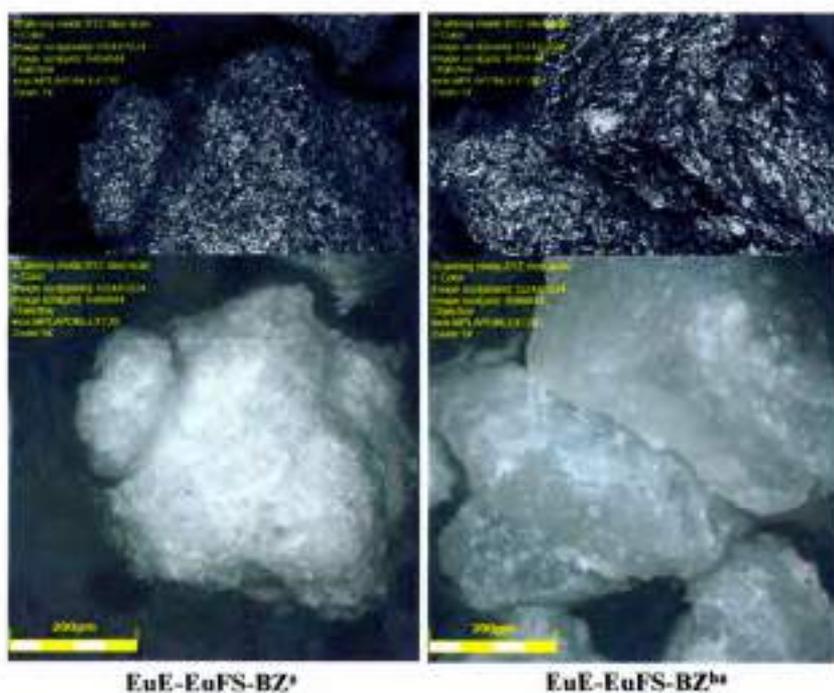


Figura 4.17. Imágenes de microscopia confocal para los sistemas EuE-EuFS-BZ obtenidos en medio acuoso (izquierda) e hidroalcohólico (derecha).



En la Figura 4.18 se presentan los difractogramas de los sistemas EuE-EuL-BZ, obtenidos tanto en agua como en medio hidroalcohólico. Se presentan, además, los difractogramas correspondientes a los materiales de partida: EuE y EuL. El difractograma de BZ no se presenta debido a que éste se encuentra consignado en el *Anexo 1*. Complementariamente, se muestra el difractograma de la mezcla física (MF), es decir, la mezcla de los sólidos que forman el CIPE, en las mismas proporciones que se encuentran en éste, pero sin que haya tenido lugar la interacción con un medio.

Como se puede observar, el BZ presenta un patrón de difracción característico de un sólido cristalino, mientras que EuE y EuL presentan un difractogramas característicos de sólidos amorfos, tal como ocurre con todos los PE evaluados (*Anexo 3*). El análisis por difracción de Rx de polvos, permitió evidenciar la presencia de BZ libre en los CIPE, ya que se observa la presencia de picos de cristalinidad en los difractogramas, los cuales se corresponden con los picos de difracción que presenta BZ puro. No se observan diferencias en los patrones de difracción de los sistemas obtenidos en agua respecto de los obtenidos en medio hidroalcohólico.

En el difractograma de la MF se pueden observar claramente los picos de cristalinidad de BZ y no se observan marcadas diferencias entre este difractograma y los obtenidos para los CIPE cargados con BZ, independientemente del medio de interacción en el que fueron obtenidos. Sólo se puede apreciar una leve disminución de la intensidad de los picos en los CIPE, respecto de la MF.

Resultados similares a los presentados para los sistemas EuE-EuL-BZ se observaron para el resto de los sistemas compuestos por polimetacrilatos (*Anexo 3*).

En la Figura 4.19 se presentan los difractogramas de los sistemas Chi-AA-BZ, obtenidos tanto en agua como en medio hidroalcohólico. Además, se presentan los difractogramas correspondientes a los materiales de partida: Chi y AA. En éstos, se puede observar un comportamiento en los patrones de difracción similar a lo que ocurre con los sistemas compuestos por polimetacrilatos. Es decir, en los CIPE se observa la presencia de BZ libre, que se aprecia debido a la presencia de los picos de cristalinidad correspondientes a BZ puro y no se observan diferencias entre los CIPE obtenidos en agua y los obtenidos en mezcla hidroalcohólica.

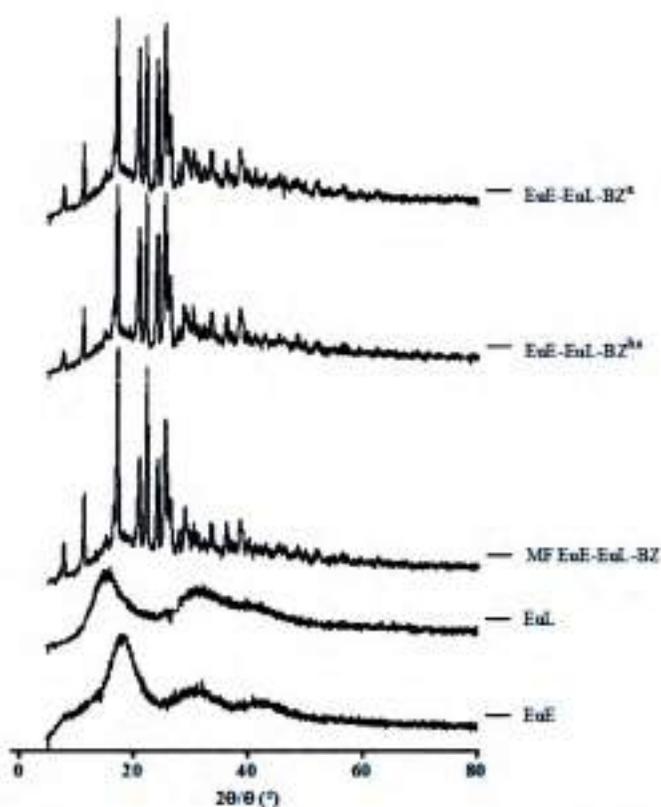


Figura 4.18. Difractogramas de Rx de polvos obtenido para EuE, EuL, EuE-EuL-BZ², EuE-EuL-BZ³ y la mezcla física (MF).

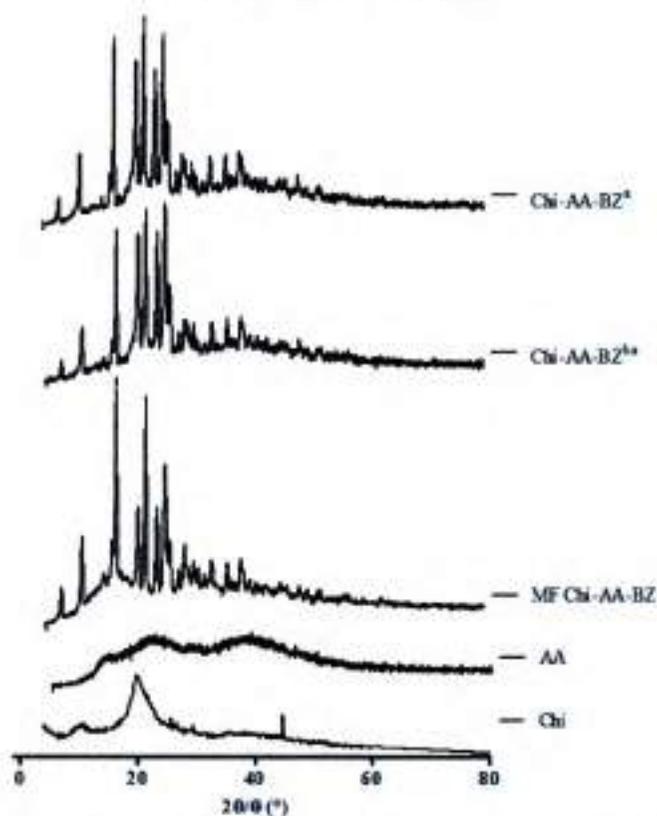


Figura 4.19. Difractogramas de Rx de polvos obtenido para Chi, AA, Chi-AA-BZ², Chi-AA-BZ³ y la mezcla física (MF).



Complementariamente, a partir del análisis por espectroscopia FT-IR, se observó que los espectros de los CIPE mostraron marcadas diferencias cuando fueron comparados con los compuestos de partida. Sin embargo, no se observaron marcadas diferencias en las bandas de absorción entre los sistemas obtenidos en agua y en medio hidroalcohólico.

En la Figura 4.20 se presentan los espectros de FT-IR de los sistemas EuE-EuL-BZ^a y EuE-EuL-BZ^{ba} y de la MF correspondiente. Los espectros de EuL y EuE se encuentran en el *Anexo 4* y el de BZ se presenta en el *Anexo 1*.

Como se puede observar en la Figura 4.20, hay zonas sombreadas que remarcan las regiones en las cuales se presentan diferencias en las bandas de absorción. En términos generales, los espectros correspondientes a los CIPE mostraron sutiles diferencias en comparación con las MF. Entre los 1250 y 1290 cm^{-1} se observan las bandas correspondientes a los enlaces C-O y C-N del BZ en la MF, en tanto que, a esas frecuencias, en los CIPE se presentan cambios en la intensidad relativa y el aspecto de las bandas. Esto podría indicar que en los CIPE se establece una interacción entre los grupos funcionales involucrados, que no se observa en la MF. Por otra parte, se evidencian cambios en la intensidad relativa correspondiente al grupo C=O del COOH, entre los 1600 y 1750 cm^{-1} , cuando se compara la MF y los CIPE. En ambos CIPE, se observa un corrimiento de las bandas (cambios en la frecuencia) correspondientes a la zona de C=O y C-O, respecto de los espectros de los polímeros de polímero, lo que indicaría que hay interacción entre éstos. La región correspondiente a la protonación del grupo dimetilaminoetilmetacrilato del EuE, aproximadamente a 2700 cm^{-1} , no se puede observar en el espectro, debido a la superposición de señales en esa región, debido a la cantidad de grupos funcionales presentes por los diferentes componentes del CIPE, lo que hace que se solapen con las señales de los cationes trialkilamonio ($\text{R-N}(\text{CH}_3)_3^+$) del EuE. En la MF se evidencia la aparición de la señal correspondiente al grupo dimetilaminoetilmetacrilato no protonado, entre los 2770 y 2825 cm^{-1} , señal que está ausente en los CIPE, lo que podría indicar que este grupo se encuentra protonado en los complejos.

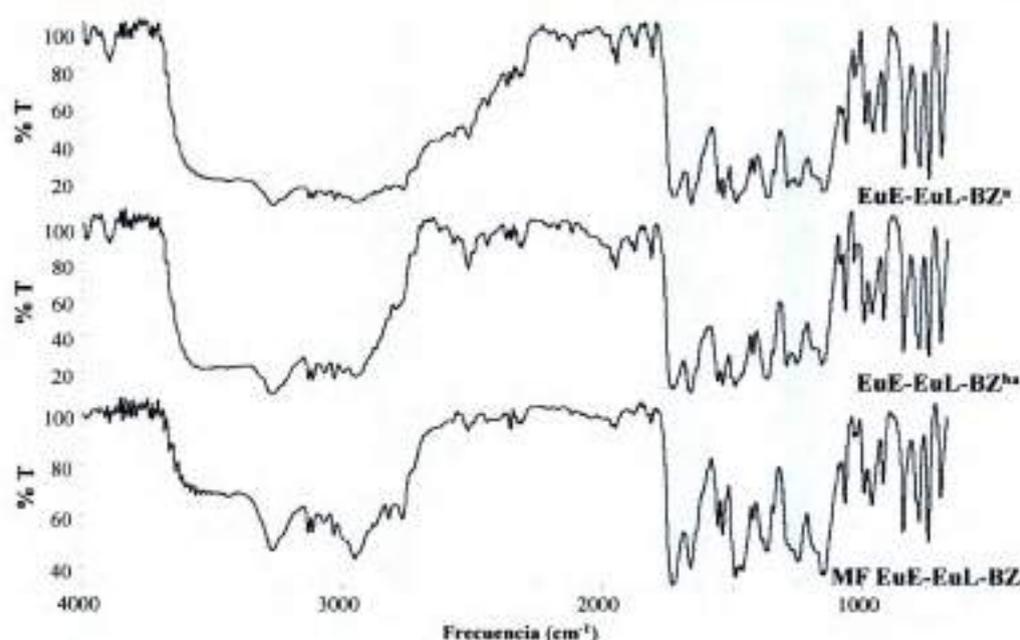


Figura 4.20. Espectros de FT-IR obtenidos para EuE-EuL-BZ^a, EuE-EuL-BZ^b y la mezcla física (MF).

Resultados similares a los observados para los sistemas EuE-EuL-BZ, se obtuvieron para los otros CIPE compuestos por polimetacrilatos (*Anexo 4*).

En la Figura 4.21 se presentan los espectros FT-IR de los sistemas Chi-AA-BZ, obtenidos en ambos medios, y de la MF correspondiente. Al igual que para los CIPE compuestos por polimetacrilatos, se puede observar que entre en los complejos, independientemente del medio, los espectros son semejantes, pero se diferencian sutilmente del espectro de la MF. Entre 3750 y 3500 cm^{-1} , la banda correspondiente a las señales N-H y OH del Chi entre la MF y los CIPE presentó un corrimiento hacia frecuencias mayores. Por otra parte, se observan cambios en la intensidad relativa en la región del grupo C=O, aproximadamente a 1727 cm^{-1} , correspondientes al AA. Esta banda se encuentra más desplazada en los CIPE, tanto en aquellos obtenidos en agua como en mezcla hidroalcohólica, en comparación con la MF, la cual presenta un espectro con una banda correspondiente al COOH del AA más parecida a la del AA libre. Entre 1650 y 1656 cm^{-1} se observan las señales correspondientes al N-H del Chi, que aparecen a frecuencias mayores en los CIPE, en comparación con la MF. Además, en la MF se observan con claridad las señales correspondientes a los grupos funcionales de BZ, lo que evidencia que éste no está interactuando de ninguna manera en la MF.

En términos generales, en la MF se observa una mayor definición de las bandas, que podría deberse a la sumatoria de las señales individuales de cada uno de los



componentes de ésta, en tanto que en los CIPE se evidencian corrimientos en las bandas, cambios en la intensidad relativa y aspecto de éstas, lo que podría estar indicando la interacción entre los PE involucrados.

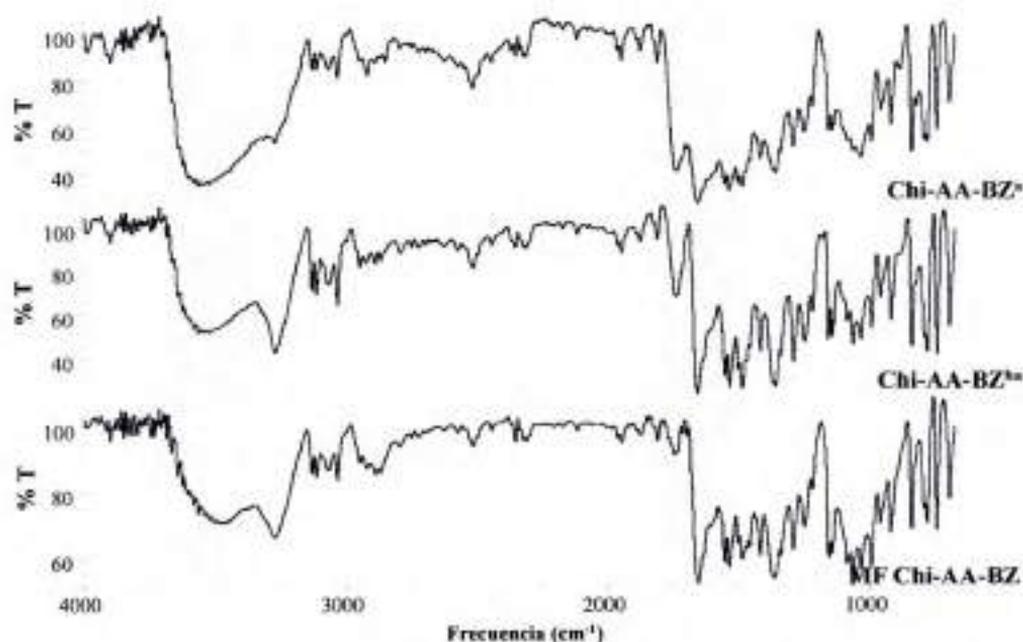


Figura 4.21. Espectros de FT-IR obtenidos para Chi-AA-BZ², Chi-AA-BZ³ y la mezcla física (MF).

PARTE II: SISTEMAS PORTADORES PE-CMP

4.4. Materiales y Métodos

4.4.1. Materiales

4.4.1.1. Fármaco

Como fue descrito en el capítulo 2 *Principios activos y excipientes seleccionados* y tal como se detalla en el Anexo 2, CMP neutra fue obtenida por neutralización ácido-base en un sistema bifásico compuesto por agua y CH₃CH₂Cl₂.

3.4.1.2. Polielectrolitos

Debido a que CMP presenta una amina terciaria plausible de ser protonada, los polímeros utilizados para la obtención de los complejos PE-F fueron seleccionados por presentar características ácidas. Se seleccionaron cuatro polimetacrilatos, a saber: EuL, EuLD, EuS y EuFS (Evonik Röhm GmbH, Alemania), gentilmente donados por



Etilfarma Argentina, y el polisacárido AA de algas marrones *Macrocystis pyrifera* (grado farmacéutico, Lote SLB C 9738V Sigma Aldrich®, St. Louis, USA).

4.4.2. Metodología de obtención de los complejos PE-CMP

Se prepararon cinco tipos de sistemas, cuatro de ellos compuestos por polimetacrilatos y uno por un polisacárido. Como CMP presenta en su estructura química una amina que puede ser protonada para interactuar iónicamente con PE aniónicos, se evaluaron los polimetacrilatos ácidos (EuL, EuLD, EuS, EuFS) y el polisacárido AA. En el desarrollo de los sistemas, CMP se incorporó en proporciones estequiométricas para neutralizar el 50% de los grupos ionizables del PE aniónico (los grupos ionizables fueron determinados de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.3.2 del capítulo 2).

Para la obtención de los sistemas en estado sólido se utilizó el método de evaporación de solvente. Para lo cual, los sólidos del PE y CMP fueron puestos en contacto y mezclados en un mortero y se adicionó poco a poco el medio de interacción que fue etanol absoluto (grado PA, Cicarelli®, Santa Fe, Argentina). La adición del medio de interacción permitió formar una mezcla semisólida, la cual fue amasada y se dejó interactuar durante 24 h. El volumen de etanol utilizado para la obtención de los sistemas fue $(1,6 \pm 0,5)$ mL/g sólido. Luego de transcurridas las 24 h, el material se dejó reposar y se secó a temperatura ambiente y hasta peso constante, monitoreado mediante determinación de la masa en una balanza analítica, considerando una variación en la masa $< 5 \%$ como parámetro. Una vez seco, el material fue molido con un pilón en el mortero y se tamizó a través de mallas de acero inoxidable, para obtener partículas de tamaño uniforme en el rango de los 212-425 μm . En el caso particular del sistema obtenido con EuFS, el sólido obtenido no pudo ser molido directamente y se requirió del proceso de criomolienda.

Se obtuvieron cinco sistemas diferentes, basado en complejos PE-CMP, a saber: EuL-CMP₅₀, EuLD-CMP₅₀, EuS-CMP₅₀, EuFS-CMP₅₀ y AA-CMP₅₀. En donde el subíndice "50" refiere al porcentaje del total de grupos ácidos ionizables del PE que fueron neutralizados por la adición de la CMP. Para la obtención de estos complejos, la masa de PE y de CMP se detalla en la Tabla 4.5.



Tabla 4.5. Cantidad necesaria de CMP para neutralizar el 50 % de los equivalentes de grupos ácidos ionizables de cada PE, referenciada a una masa igual a 1 g de PE.

PE	Masa de CMP (g)
EuL	0,7635 ± 0,0002
EuS	0,6738 ± 0,0002
EuLD	0,8344 ± 0,0002
EuFS	0,0582 ± 0,0002
AA	0,6927 ± 0,0002

4.4.3. Caracterización biofarmacéutica de los complejos PE-CMP

4.4.3.1. Estudios de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP

Se determinó la liberación del CMP desde los complejos PE-CMP contenidos en cápsulas “0” de gelatina dura, cargadas con una masa de complejo que contenía el equivalente a 25 mg de CMP. Se utilizó un equipo de disolución-USP (Disolutor AT 7 Smart SOTAX®, Suiza), aparato 1 o método de canastillo a 100 rpm (USP33-NF28, 2010) y $(37, 0 \pm 0,5)$ °C. Este método fue seleccionado debido a que las cápsulas flotan. Los canastillos utilizados fueron estándar de malla 40.

Todos los medios fueron desgasificados antes de iniciar los ensayos. El volumen de medio fue 900 mL cuando los medios ensayados fueron agua y NaCl 0,9%, y 1000 mL como volumen final cuando el medio ensayado fue el codificado en el Método A-USP para evaluar formas farmacéuticas de liberación modificada. En éste último, se evaluó la liberación de CMP durante 2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8 (USP33-NF28, 2010).

Durante el ensayo se tomaron muestras prefiltradas de 4 mL, a intervalos de tiempo predeterminados, y se llevó a cabo la reposición del volumen muestreado con cantidades equivalentes de medio fresco termostatzado (medio sin CMP).

La concentración de CMP liberada se determinó por espectrofotometría UV-visible a $\lambda^{CMP} = 251$ nm, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción.

Los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron los perfiles de liberación como % de CMP liberada vs tiempo.

4.4.3.1. Análisis matemático de los perfiles de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP

Al igual que para los CIPE cargados con BZ, para el análisis matemático de los perfiles de liberación de CMP se consideraron solamente las liberaciones en agua y



en NaCl 0,9 %. Los detalles inherentes al análisis comparativo y cinético de los perfiles de liberación de CMP se encuentran detallados en el apartado 4.2.4.5.a y 4.2.4.5.b, respectivamente, del presente capítulo, ya que la metodología utilizada es la misma que para los CIPE.

4.4.4. Caracterización fisicoquímica de las multipartículas

4.4.4.1. Difracción de Rx de polvos

Los patrones de difracción de los complejos PE-CMP y de las mezclas físicas correspondientes, fueron obtenidos de acuerdo con la metodología detallada en el apartado 4.2.5.1 del presente capítulo.

4.4.4.2. Microscopia óptica de luz polarizada

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio óptico con filtros polarizadores (Olympus[®] BX41), equipado con una cámara digital (Infinity[®]1) para la toma de las imágenes y software específico para su procesamiento (Infinity Analyze[®], Release 5.0.2). Las muestras se prepararon colocando cuidadosamente los cubreobjetos sobre los portaobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 20X.

4.4.4.3. Espectroscopia FT-IR

Los espectros FT-IR de los complejos PE-CMP y de las mezclas físicas correspondientes, fueron obtenidos de acuerdo con la metodología detallada en el apartado 4.2.5.3 del presente capítulo.

4.5. Resultados

4.5.1. Propiedades biofarmacéuticas de los complejos PE-CMP

Los complejos PE-CMP se obtuvieron con rendimientos > 70 %. El rendimiento fue variable y dependiente del tipo de PE utilizado para la obtención de los complejos. En particular, los complejos obtenidos con EuFS se obtuvieron como sólidos gomosos y, por ese motivo, se requirió de la utilización de la criomolienda para obtenerlo como un polvo sólido. En este caso, el rendimiento de obtención fue de aproximadamente el 72 %, lo que denota una importante pérdida de material por adherencia a las paredes del mortero y por la manipulación del sólido para obtenerlo como polvo. Por otra parte, los demás complejos fueron obtenidos en todos los casos



con rendimientos $> 90\%$, los cuales, una vez secos, se presentaron como sólidos que pudieron ser molidos directamente en el mortero con un pilón.

Los perfiles de liberación de CMP desde los complejos binarios utilizando agua como medio de liberación, se presentan en la Figura 4.22. Puede observarse que el complejo AA-CMP₅₀ presenta un marcado efecto *Burst* y libera el 70 % de la CMP cargada a los 15 min del ensayo. Luego de ese tiempo, la liberación es controlada en el tiempo. Por su parte, los sistemas compuestos por los polimetacrilatos en todos los casos presentan una liberación lenta y controlada de CMP. El complejo EuFS-CMP₅₀ presentó la mayor proporción de CMP liberada, luego de 6 h del ensayo, la cual fue $\leq 30\%$. Además, los sistemas basados en los polimetacrilatos mostraron proporciones de CMP liberada, acorde a la siguiente secuencia: EuFS-CMP₅₀ $>$ EuLD-CMP₅₀ \sim EuL-CMP₅₀ \sim EuS-CMP₅₀. Como se puede observar, los perfiles de liberación de los complejos constituidos por EuS, EuLD y EuL son similares ($f_2 > 50$).

Por otra parte, como se observa en la Figura 4.23, cuando el medio de liberación es NaCl 0,9 %, se presenta una mayor velocidad de liberación de CMP, que puede ser atribuida al mecanismo de intercambio iónico, favorecido por la presencia de iones en la solución salina. Un caso excepcional fue el sistema EuS-CMP₅₀, que presenta un perfil similar al que exhibió en agua. En solución salina, el complejo AA-CMP₅₀ libera la CMP en forma más modulada, en comparación con la liberación hacia agua, y no se observa el efecto *Burst*. En el caso de los Eudragit® la liberación de CMP es más lenta y controlada, aunque al cabo de las 6 h de transcurrido el ensayo, la proporción de CMP liberada fue mayor que en agua y se presentó de acuerdo con la siguiente secuencia: EuLD-CMP₅₀ $>$ EuFS-CMP₅₀ \sim EuL-CMP₅₀ \gg EuS-CMP₅₀. Además, puede observarse que los perfiles de liberación de EuFS-CMP₅₀ y EuL-CMP₅₀ se presentan prácticamente superpuestos, lo cual se corrobora estadísticamente, ya que presentan un $f_2 > 50$.

En la Tabla 4.6 se presentan el análisis cinético de los perfiles de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP constituidos por polimetacrilatos. Cuando el medio de liberación fue agua, sólo el complejo EuFS-CMP₅₀ ajusto a los modelos empleados, por ese motivo se informa solamente este resultado. Para el resto de los complejos no hubo ajuste a ninguno de los dos modelos, debido a que ocurre una liberación del 10 % que luego se mantiene aproximadamente constante en el tiempo y, en todos los casos, se observó $r^2 < 0,8$. En el medio de liberación NaCl 0,9 %, se evidencia que la regresión lineal, se ajusta con un buen coeficiente de correlación

para ambos modelos, con $r^2 \geq 0,83$ y $r^2 \geq 0,839$, para los modelos de Higuchi y Peppas, respectivamente.

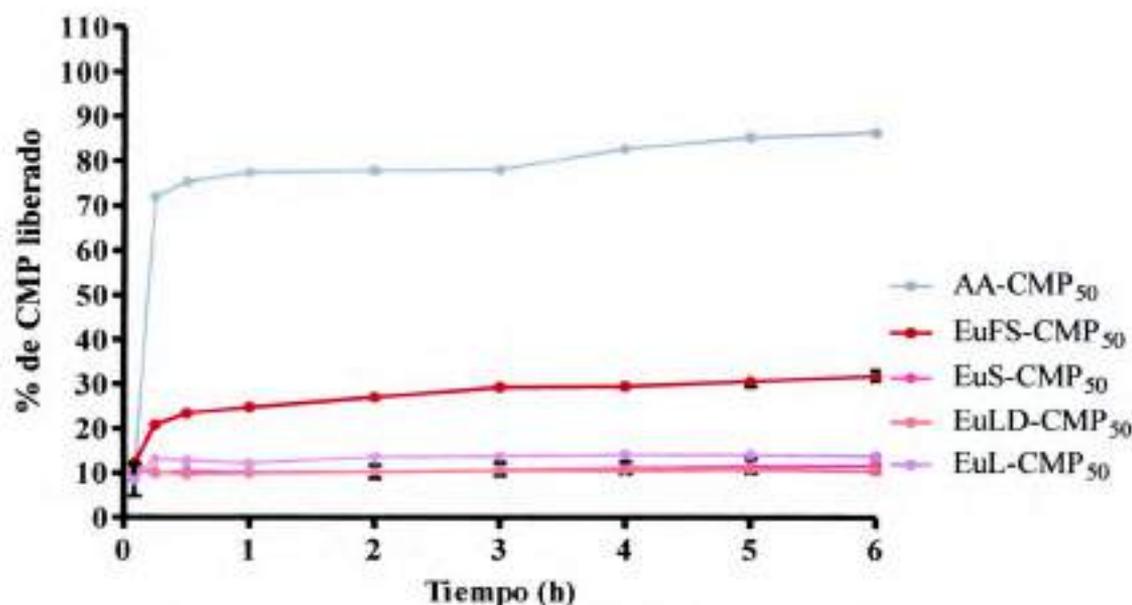


Figura 4.22. Perfiles de liberación de CMP en agua desde los complejos PE-CMP.

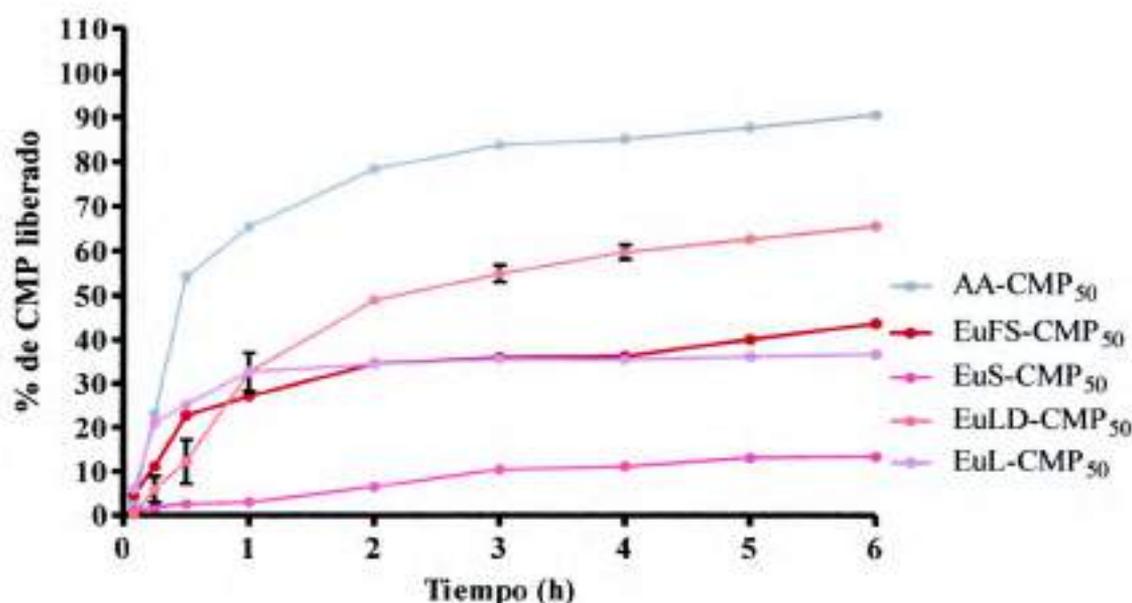


Figura 4.23. Perfiles de liberación de CMP en NaCl 0,9% desde los complejos PE-CMP.

El análisis de las propiedades de liberación utilizando como medio las soluciones codificadas en el Método A-USP, que involucra la evaluación de la liberación del CMP durante 2 h en un medio de 750 mL de HCl 0,1 N, seguida de 4 h en un medio de 1000 mL de solución tampón de fosfatos de pH 6,8, permitió evidenciar que el cambio de medio activa la liberación de CMP desde los complejos PE-CMP, lo que



se corresponde con un aumento de la solubilidad de los PE en función del pH, para el caso de los polimetacrilatos (Figura 4.24). En estos complejos, la proporción de CMP liberada, durante las 2 primeras horas del ensayo, siguió la siguiente secuencia: EuFS-CMP₅₀ >> EuLD-CMP₅₀ ~ EuL-CMP₅₀ > EuS-CMP₅₀. Además, el complejo EuFS-CMP₅₀ presenta un pequeño efecto *Burst* y libera el 20 % de la CMP a los 5 min. Por su parte, el complejo AA-CMP₅₀ presenta un marcado efecto *Burst* con una liberación de CMP ≥ 80 % a los 5 min y, en este sistema, no se observa una marcada influencia del cambio de medio en las propiedades de liberación de CMP.

Tabla 4.6. Cinética de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP en agua y NaCl 0,9 %, sobre la base de las ecuaciones de Higuchi y Peppas.

Medio	Sistemas	Higuchi		Peppas	
		k	r ²	n	r ²
Agua	EuFS-CMP ₅₀	5,28	0,97	0,13	0,99
NaCl 0,9 %	EuL-CMP ₅₀	5,29	0,83	0,17	0,89
	EuLD-CMP ₅₀	37,61	0,96	0,85	0,95
	EuS-CMP ₅₀	6,48	0,92	0,64	0,92
	EuFS-CMP ₅₀	13,93	0,90	0,36	0,89

k expresada en %·h⁻¹. Datos experimentales: 5 – 60 % de BZ liberado.

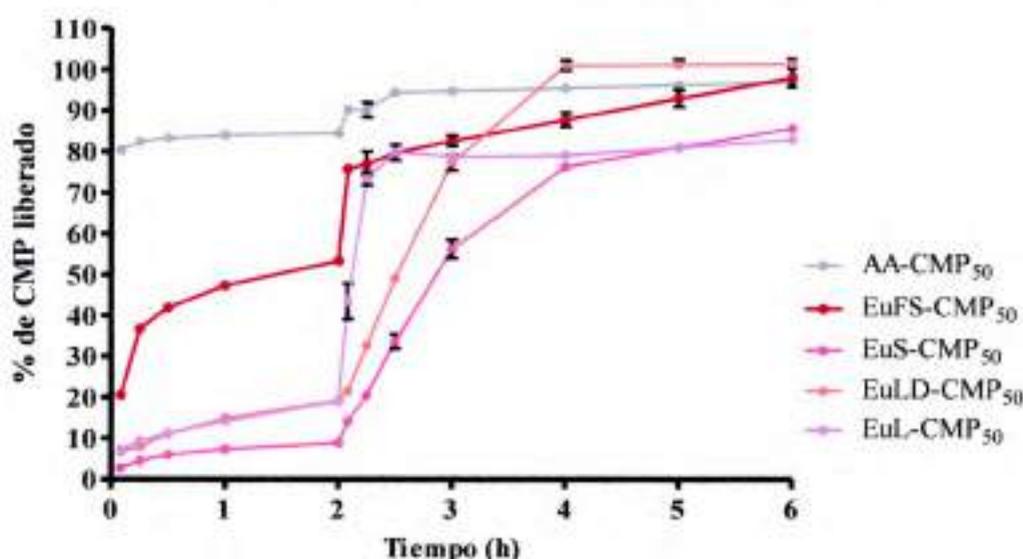


Figura 4.24. Perfiles de liberación de CMP desde los complejos PE-CMP, utilizando el Método A – USP (2 h en 750 mL de solución de HCl 0,1 N seguido de 4 h en 1000 mL de solución tampón de pH 6,8).

4.5.2. Propiedades fisicoquímicas de los complejos PE-CMP

En la Figura 4.25 se presentan los difractogramas obtenidos para algunos de los complejos PE-CMP y para las MF correspondientes, como ejemplo del análisis que se realizó a toda la serie de complejos PE-CMP. El difractograma de CMP neutra no se presenta debido a que éste se encuentra consignado en el *Anexo 2*. Los difractogramas correspondientes a los PE se encuentran presentados en el *Anexo 3*.

El patrón de difracción de los polímeros es característico de los sólidos amorfos, es decir, no se observa en estos difractogramas la presencia de picos. Por su parte, como se detalla en *Anexo 2*, CMP se presenta como un sólido cristalino y exhibe los característicos picos de cristalinidad conferidos por su estructura. El análisis del patrón de difracción de los complejos PE-CMP permitió evidenciar que éstos se presentan como sólidos amorfos y se observa la ausencia de picos de cristalinidad de CMP. Por el contrario, las mezclas físicas se observan algunos picos, los cuales se corresponden con aquellos característicos de la CMP neutra cristalina.

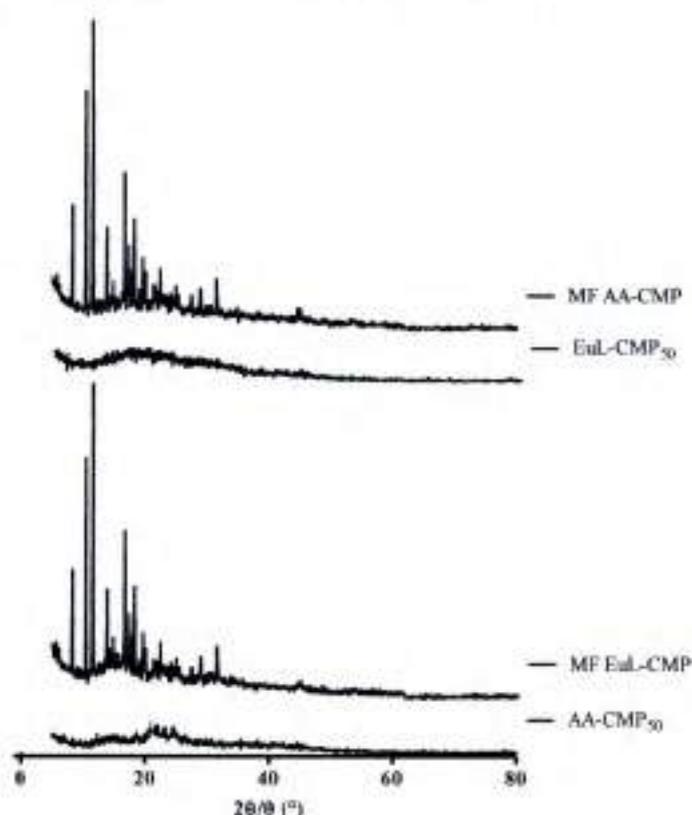


Figura 4.25. Difractogramas de Rx de polvos obtenido para los complejos PE-CMP y las mezclas físicas correspondientes.

Resultados similares a los obtenidos por difracción de Rx de polvos, se observaron mediante microscopía óptica de luz polarizada (Figura 4.26). Como puede observarse

de tanto los polímeros AA y EuL, como los complejos PE-CMP obtenidos a partir de éstos, se presentan en las imágenes sin la luz polarizada, debido a que son sólidos amorfos. Por su parte, en para las mezclas físicas se presentan las imágenes en presencia y ausencia de luz polarizada. A partir de éstas, pudo observarse el fenómeno de birrefringencia bajo la luz polarizada, lo que se debe a la presencia de CMP neutra que se encuentra libre y cristalina.

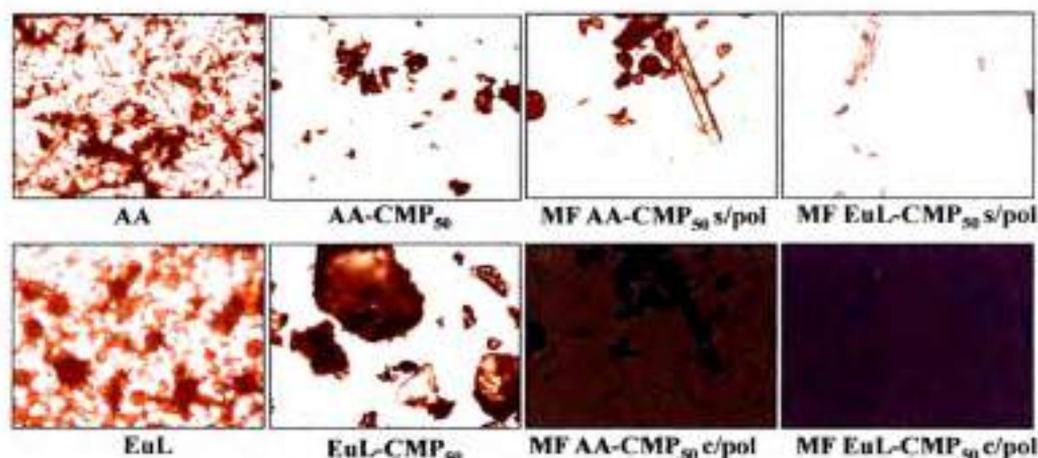


Figura 4.26. Micrografías sin y con luz polarizada (20X) obtenidas para los polímeros AA y EuL, los complejos AA-CMP₅₀ y EuL-CMP₅₀, y las respectivas mezclas físicas. La referencia “s/pol” y “c/pol” se refieren a imágenes obtenidas en ausencia y presencia de la luz polarizada.

El análisis por espectroscopia FT-IR permitió evidenciar que en los complejos AA-CMP₅₀ se presenta un corrimiento en la frecuencia de absorción atribuible al grupo C=O del -COO⁻ a 1000 cm⁻¹, el cual no se observa en la MF correspondiente (Figura 4.27). Además, las señales de los grupos funcionales de CMP neutra se presentan más definidas en la MF, lo cual se corresponde con la ausencia de interacción entre el AA y la CMP. Aproximadamente a 3500 cm⁻¹ se observan cambios en la señal de los grupos OH del AA, cambia el aspecto de la banda y se produce un leve desplazamiento hacia menores frecuencias en el complejo en comparación con la MF. A 2900 cm⁻¹ se observan cambios en la señal correspondiente al C-H alifático, la banda en el complejo se encuentra desplazada y cambia su aspecto e intensidad relativa en comparación con la MF.

Similares características se observaron en los espectros de los complejos de EuL-CMP₅₀ y la respectiva MF (Figura 4.28). Se evidencia que ambos espectros no son coincidentes. En el complejo aparece una señal a 1590 cm⁻¹ correspondiente al desdoblamiento de la señal del C=O de los grupos -COOH y -COO⁻ de los PE. A diferencia del EuL y de la MF, en el caso del complejo ese desdoblamiento se corresponde con la vibración asimétrica del C=O del COO⁻ sumada a una



disminución de la intensidad relativa del C=O del COOH a 1700 cm^{-1} y a un leve desplazamiento hacia frecuencias mayores. Esto se debe a la interacción entre el grupo ácido carboxílico del EuL y el grupo amino de la CMP. Similares resultados se observaron para todos los otros complejos constituidos por polimetacrilatos. En términos generales los espectros de los complejos presentan entre ellos diferentes aspectos, conferidos por los diferentes grupos que forman el copolímero; sin embargo, los espectros de las MF se presentan muy similares en todos los casos, independientemente del PE.

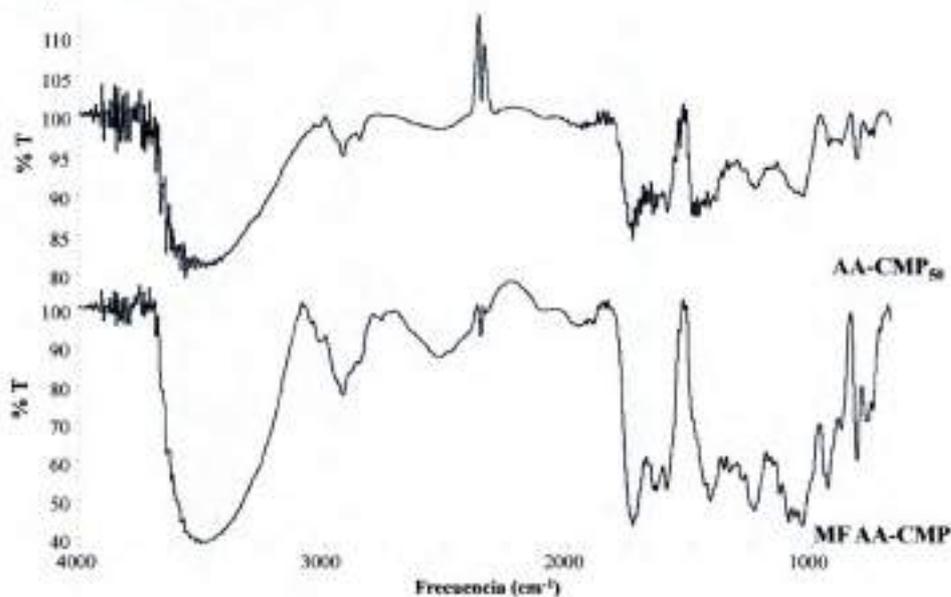


Figura 4.27. Espectros de FT-IR obtenidos para el complejo AA-CMP₅₀ y su respectiva mezcla física.

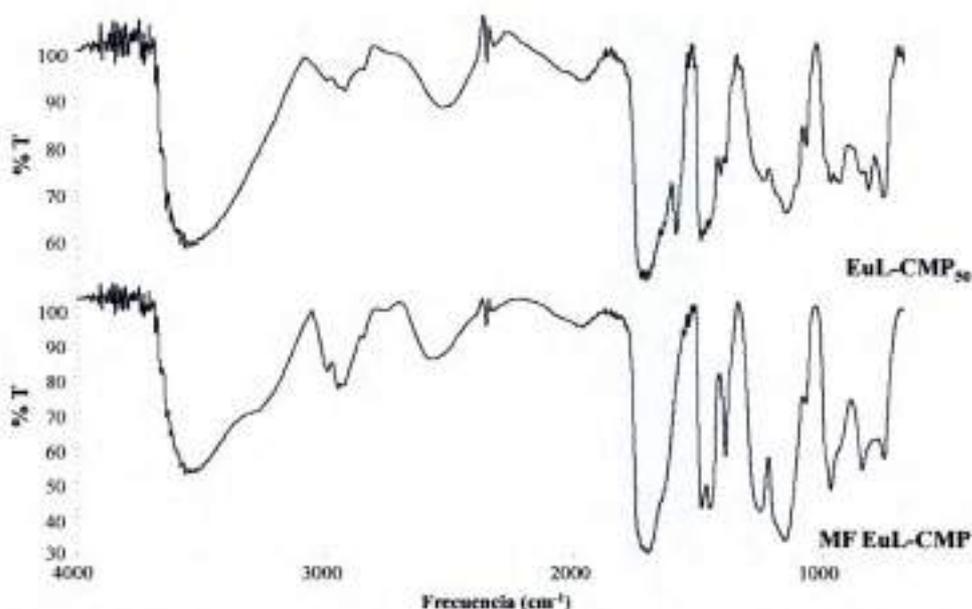


Figura 4.28. Espectros de FT-IR obtenidos para el complejo EuL-CMP₅₀ y su respectiva mezcla física.



4.6. Discusión

En conjunto, los resultados permiten evidenciar que los PE evaluados son adecuados portadores de BZ y CMP, que exhiben propiedades de liberación modificada de los F que vehiculizan. En términos generales, las propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y biofarmacéuticas estudiadas reflejan adecuadas características de estos sistemas portadores de F tripanocidas, lo que podrían ser de utilidad para la optimización de la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.

En particular, los resultados obtenidos respecto de las multipartículas, demuestran que la metodología de obtención de los sistemas CIPE multiparticulados conteniendo BZ es simple, reproducible, robusta y potencialmente escalable. Las partículas se obtienen con un alto porcentaje de rendimiento, > 83 % en todos los casos. El análisis de la granulometría y distribución de tamaño permitió evidenciar que la fracción 16-20 es la que se recupera en un mayor porcentaje y, por tal motivo, fue la seleccionada para la realización de todos los ensayos.

Las propiedades reológicas o de flujo de los materiales particulados tiene una importancia crítica, en el área de la tecnología farmacéutica, tanto para su procesamiento durante la elaboración de formas farmacéuticas sólidas, tal como es el caso de las cápsulas, como así también para el aseguramiento de calidad correspondiente. Los estudios de fluidez de los materiales particulados permiten conocer, de forma cuantitativa, las modificaciones que se presentan en las propiedades de flujo, como consecuencia de la incorporación de componentes no terapéuticos o excipientes en el proceso de producción y, de este modo, orientan el diseño de partículas sólidas con óptimas propiedades reológicas. En este sentido, que los materiales particulados presenten buena fluidez, permite asegurar un llenado uniforme de las unidades de dosificación y una adecuada uniformidad de peso (Vila Jato, 1997).

Las densidades δ_{bulk} y δ_{tap} , y su relación, el ángulo de reposo y el IC % son parámetros reológicos que se encuentran íntimamente relacionados con la fluidez de los materiales particulados.

Para comparar las propiedades de flujo de diferentes sólidos particulados, una prueba sencilla consiste en determinar la δ_{bulk} y δ_{tap} , a partir de las cuales se pueden obtener los IC % y el CH, tal como se describió en las Ecuaciones 4.1 y 4.2. En el caso del IC %, la interpretación de los resultados obtenidos se realizó de acuerdo al detalle de la Tabla 4.7. Complementariamente, el CH se interpreta de acuerdo a su valor y, a partir de éste, se considera un flujo aceptable cuando éste es inferior a 1,25;



mientras que valores superiores a este límite indican que el flujo es inadecuado. En el caso de que el CH se encuentre comprendido entre 1,25 y 1,5; las propiedades de flujo de las partículas pueden ser mejoradas por el agregado de un deslizante.

Tabla 4.7. El índice de Carr (IC %) como indicador de flujo de sólidos particulados (Staniforth, 2002)

IC %	Tipo de flujo
5 – 12	Excelente
12 – 16	Bueno
18 – 21	Aceptable*
23 – 35	Malo*
33 – 38	Muy malo
>40	Extremadamente malo

*Puede ser mejorado con deslizantes

Otro parámetro que permite el análisis de las propiedades de flujo de los sólidos es el ángulo de reposo (Θ). Cuando un polvo se deja caer a través de un orificio y sobre una superficie plana, el único factor que lo afecta es la gravedad, éste tiende a formar un montículo cónico con una limitación: el ángulo formado con la horizontal no puede superar determinado valor y esto es lo que se conoce como ángulo de reposo (Θ). Si en algún momento las partículas que caen quedan por fuera de este límite angular, se deslizarán por la superficie adyacente, por efecto de la gravedad, hasta que la fuerza de gravitación se equilibre con la fricción producida por las fuerzas entre partículas. Por consiguiente, existe una relación empírica entre el Θ y la capacidad de flujo de que presentan los sólidos particulados. En este caso, la interpretación de los resultados obtenidos se realizó de acuerdo al detalle de la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. El ángulo de reposo como indicador de las propiedades de flujo de los sólidos particulados (Staniforth, 2002)

Θ	Tipo de flujo
< 20	Excelente
20 – 30	Bueno
30 – 34	Aceptable*
>40	Extremadamente malo

*Puede ser mejorado con deslizantes

Por lo expuesto y tal como puede observar en la Tabla 4.2, las multipartículas obtenidas presentaron valores de IC % en el rango de 2–7 %, valores de CH comprendidos entre 1,02–1,07 y Θ en ángulos de 28° – 37°. En conjunto, los



resultados del análisis reológico permiten inferir que las multipartículas obtenidas presentan adecuadas propiedades reológicas, lo cual resulta de gran utilidad al momento de formularlas en unidades de dosificación múltiples, bajo la forma de cápsulas o comprimidos (Staniforth, 2002; Vila Jato, 1997).

La interacción de las multipartículas con los fluidos o soluciones es materia ineludible. Es conocido que un solvente, al penetrar y mojar las cadenas de un polímero, por el cual tiene afinidad, genera una reducción de la T_g del material polimérico lo que favorece la movilidad de las cadenas y el ingreso masivo de cantidades de solvente, con la consecuente relajación y disolución/dispersión del polímero (Martin, 1993).

Las propiedades de liberación de los F desde los sistemas, el sitio en donde ocurrirá, la disponibilidad del F y su potencial degradación o irritabilidad de las mucosas, así como la bioadhesión del sistema, dependen en primera instancia, de la mojabilidad del sólido y la velocidad de conversión del sólido a una dispersión-hidrogel. Esto se encuentra íntimamente relacionado con su capacidad para capturar o sorber fluidos. El análisis de las multipartículas de CIPE obtenidos en medio acuoso fue evaluado frente a la captura de agua y de solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2. En la Figura 4.6 se puede observar que el sistema EuE-EuL-BZ^a presenta una muy rápida captura de fluidos en comparación con los otros sistemas constituidos por polimetarilatos, inclusive mayor que la del sistema formado por polisacáridos. No se observan marcadas diferencias del medio de sorción en la velocidad de captura por parte de los CIPE constituidos por los Eudragit[®]. Sin embargo, en el sistema Chi-AA-BZ^a se observa una rápida captura inicial de solución gástrica simulada sin enzimas de pH 1,2, que es aproximadamente el doble de la cantidad de agua que captura a los mismos tiempos. Este resultado podría explicarse al considerar las propiedades fisicoquímicas de los PE y la erodibilidad o gelificación de las partículas durante el proceso de sorción.

Los resultados de sorción de fluidos se encuentran en relación con las propiedades de liberación del BZ, debido a que la secuencia de eventos que conducen a la liberación del F se inicia con el mojado o hinchamiento de las partículas, lo cual puede dar lugar a la formación de capa gel alrededor de éstas. En esta capa hidrogel se rompen las uniones iónicas, con la consecuente difusión de las moléculas del F hacia el medio de disolución por medio de un gradiente de concentración. Alternativamente, se puede producir la erosión de las partículas, lo que provoca que el sistemas, en particular los polímeros, se relajen o disuelvan/dispersen en el medio



de disolución, donde luego tendrá lugar la liberación y disolución del F (Ramirez-Rigo et al., 2006).

El análisis cinético de los perfiles de liberación mediante modelos matemáticos, permite realizar una aproximación de los mecanismos involucrados en el proceso de liberación de los F desde el sistema que los contiene. Dado que no existe un modelo que cubra todos los procesos físicos y químicos que pueden ocurrir en las distintos sistemas, resulta necesario evaluar cada sistema en particular (Fu & Kao, 2010; Siepmann & Siepmann, 2008). En consecuencia, son varios los mecanismos que pueden estar involucrados en la liberación de F desde determinados sistemas, tales como difusión, hinchamiento o erosión.

El modelo matemático más sencillo, propuesto por Higuchi, describe que la liberación de los F desde numerosos tipos de sistemas está gobernada por la difusión de éste, lo cual sigue las leyes de Fick. Un modelo más amplio, fue el propuesto por Peppas, a partir del cual se puede inferir la constante de liberación (k) de un F desde determinado sistema y determinar los mecanismos involucrados en su liberación. En este sentido, el análisis del valor de “ n ” permite realizar una aproximación para la interpretación de los mecanismos de liberación que operan durante el proceso. Este modelo propone: a) si n es igual a la unidad ($n = 1$), la velocidad de liberación es independiente del tiempo, por lo tanto la cinética de liberación es de orden cero y el paso limitante sería la relajación de las macromoléculas por sorción de agua y la consecuente disolución del F; b) si n es igual a 0,5 (o se halla aproximadamente entre 0,45 y 0,50) la fracción liberada se aproxima a la raíz cuadrada del tiempo y, por lo tanto, la liberación estaría controlada por la difusión del fármaco a través de la red polimérica, es decir, se trataría de una cinética fickiana y c) si se obtiene $0,50 < n < 1$, habría aporte de diferentes procesos, difusión, disolución, relajación, hinchamiento, erosión, disociación de pares iónicos, entre otros; lo que se conoce como comportamiento anómalo o no fickiano (Costa & Lobo, 2001; Fu & Kao, 2010; Siepmann & Siepmann, 2008).

Como se puede observar en la Tabla 4.4 la liberación de BZ en agua desde los CIPE ajusta adecuadamente al modelo de Higuchi, lo que indicaría que el mecanismo preponderante en la liberación es la difusión. Esto se corresponde con el ajuste realizado de acuerdo al modelo de Peppas, en donde el valor de “ n ” se encuentra comprendido entre 0,48 y 0,57, lo que indicaría que, además de la difusión, que es el mecanismo preponderante, existen otros mecanismos que gobiernan la liberación de BZ, como puede ser la erosión del sistema y la relajación de las cadenas de los PE. En



el caso de la liberación en NaCl 0,9 %, también se observa un ajuste adecuado para ambos modelos, lo que indicaría que el mecanismo preponderante es de tipo fickiano; no obstante, el análisis del valor de "n" de acuerdo con el modelo de Peppas, se encuentra en algunos casos comprendido entre 0,29 y 0,36, lo cual evidencia que la difusión no es el único mecanismo involucrado (Costa & Lobo, 2001).

A modo esquemático, en la Figura 4.29 se presenta la secuencia de eventos que puede tener lugar durante el proceso de liberación de un F. En numerosos sistemas estos procesos de liberación pueden ocurrir de manera simultánea, por lo que se observan perfiles de liberación anómalos que responden a la sumatoria de todos los procesos involucrados y, en consecuencia, no responden a un tipo particular de cinética de liberación (Costa & Lobo, 2001; Grassi & Grassi, 2014).

Todos los perfiles de liberación de BZ, los cuales se presentan en las Figuras 4.8 a 4.12, permiten evidenciar que el medio de interacción al momento de obtener los CIPE influencia sus propiedades de liberación. En este sentido, se observa que los sistemas obtenidos en agua presentan diferentes perfiles de liberación las cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de los PE que componen el CIPE; en tanto que, los sistemas obtenidos en la mezcla hidroalcohólica presentan menores diferencias entre sus perfiles de liberación. El análisis cualitativo mediante la inspección visual de las partículas, luego de transcurrido el ensayo, evidenció que tuvo lugar un proceso de erosión del sistema y la formación de capa gel, la cual fue variable y dependiente de la composición del CIPE. Esta observación se corresponde con los mecanismos preponderantes que fueron determinados mediante el análisis cinético de los perfiles de liberación.

Específicamente, los CIPE obtenidos con los polimetacrilatos presentaron una marcada erodibilidad de las partículas, en comparación con los sistemas a base de polisacáridos, en los cuales, además de la erosión de las partículas, se observó la formación de una extensa capa gel, la cual actúa como moduladora de la liberación del BZ, por un mecanismo preponderantemente difusivo (Costa & Lobo, 2001; Grassi & Grassi, 2014; Munday & Cox, 2000; Zuleger & Lippold, 2001). Por su parte, el análisis de la influencia del tamaño de partícula en los perfiles de liberación permitió evidenciar que no hay marcadas diferencias entre los diferentes tamaños de partículas evaluados y las propiedades de liberación de BZ. El leve incremento en la velocidad de liberación, se debe a la reducción del tamaño de partícula que permite que una mayor superficie de ésta quede expuesta al medio de disolución y, en consecuencia, el F se libera más rápidamente (Vila Jato, 1997).

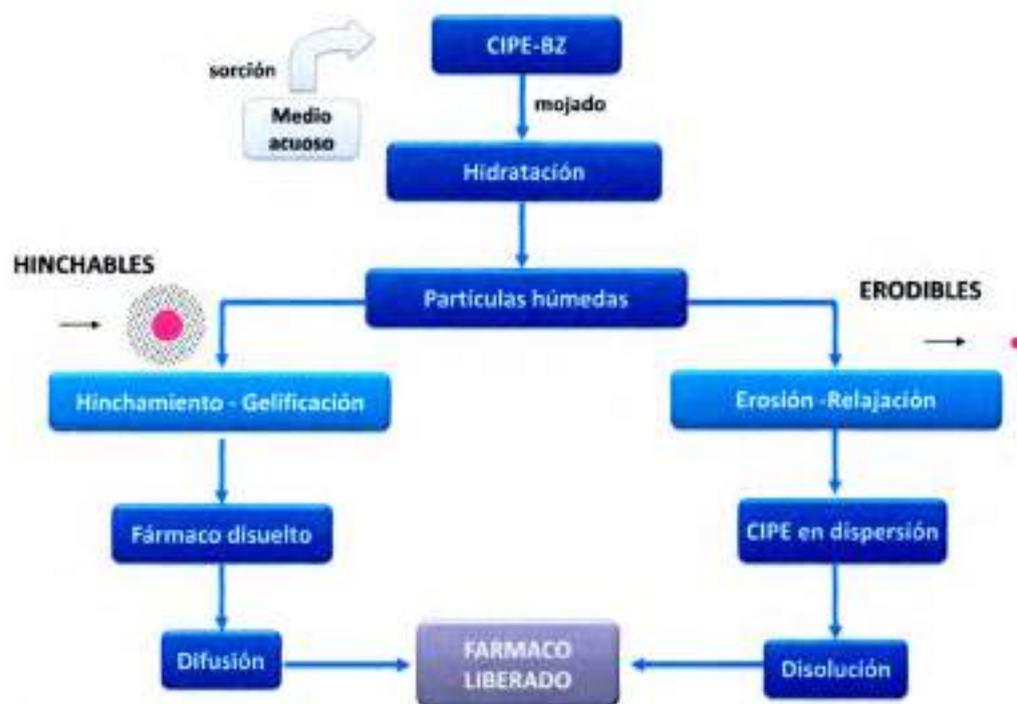


Figura 4.29. Secuencia de eventos que ocurren durante la liberación de un F desde los CIPE, luego de ponerse en contacto con fluidos fisiológicos.

Una particularidad en los perfiles de liberación, se observó en el sistema EuE-EuL-BZ², el cual presentó una disolución muy rápida de BZ (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2009) en el medio HCl 0,1 N, correspondiente a las 2 primeras horas de ensayo utilizando el Método A-USP (USP33-NF28, 2010). Las características peculiares exhibidas por este sistema, motivó el estudio de sistemas multiparticulados compuestos por dos CIPE con diferente comportamiento de liberación de BZ, en los cuales uno de éstos fue el sistema EuE-EuL-BZ², dadas sus propiedades de muy rápida velocidad de disolución, en combinación con otro CIPE en donde la liberación de BZ se presentara en forma modulada. El análisis de estos perfiles, permitió evidenciar que el comportamiento de liberación de BZ se corresponde con la sumatoria de eventos y con el aporte de los CIPE involucrados. Esta evaluación se constituye en una valiosa herramienta, ya que permitiría la administración de una dosis de ataque de BZ y luego una liberación controlada en el tiempo.

Por su parte, los complejos PE-CMP se obtuvieron con buen porcentaje de rendimiento, > 70 % y, en estos sistemas, la influencia del PE en el medio de interacción utilizado condicionó la metodología de obtención de los complejos. Pudo observarse que en medio etanólico, los polimetacrilatos se presentan con un comportamiento diferenciado si se lo compara con la preparación de los CIPE.



Durante el proceso de obtención de los complejos binarios, la pasta semisólida formada se presentó untuosa y chiclosa, lo que requirió de una permanente manipulación del sistema para evitar o reducir la adherencia al mortero. En particular, el complejo EuFS-CMP₅₀, una vez seco se presentó como un sólido gomoso, el cual fue muy difícil de manipular, lo que se atribuyó a la baja T_g del complejo molecular entre EuFS y CMP. Por este motivo, se decidió aplicar la metodología de la criomolienda para reducir el material a polvo (Hernández-Torres, Rodríguez-González, González-González, & Vázquez-Rodríguez, 2014).

La comparación de los perfiles de liberación de CMP desde los complejos binarios evidencia, de forma notoria, la influencia del medio de disolución. Como puede observarse al comparar los perfiles de las Figuras 4.22-24, la liberación de CMP es muy lenta y controlada en medio acuoso. En tanto que, cuando el medio de liberación es NaCl 0,9%, éste promueve la liberación de CMP y se observa un incremento en la velocidad de liberación, que se atribuye al intercambio iónico entre la CMP y los iones pequeños (electrolitos) presentes en el medio salino (Jimenez-Kairuz et al., 2002; Quinteros et al., 2012; Ramirez-Rigo et al., 2006). Por su parte, la liberación que simula el pasaje del sistema por el TGI (Método A-USP) evidencia una marcada influencia del cambio de medio en la liberación de CMP, la cual se ve drásticamente aumentada a partir de las 2 h del ensayo. Contrariamente, el complejo AA-CMP⁵⁰ presenta una liberación inmediata de CMP (~85 % en 30 min) y no presenta marcadas diferencias al cambiar el medio de liberación. Esta propiedad puede ser aprovechada en el diseño de sistemas multiparticulados que combinen complejos con perfiles de liberación de CMP diferenciados. Tal como se estudió con los CIPE cargados con BZ, en este caso, se podría combinar el sistema AA-CMP₅₀ con otro complejo binario que presente una liberación controlada de CMP. Asimismo, se podría realizar el diseño de sistemas que combinen dosis apropiadas de BZ y CMP, contenidas en una única unidad de dosificación, que presenten perfiles de liberación óptimos para cada F y que puedan ser utilizados en estudios preclínicos y clínicos.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica de los sistemas portadores, las técnicas utilizadas fueron difracción de Rx de polvos, microscopía y espectroscopía FT-IR, dadas las potencialidades que cada una de éstas tiene a momento de caracterizar los sólidos farmacéuticos.

En general los sólidos pueden ser cristalinos o amorfos (o una combinación de ambos) y la difracción de Rx de polvos es el método no destructivo más importante para distinguir fases sólidas de compuestos de distinta estructura cristalina, lo que



hace de ésta una herramienta habitual de trabajo para caracterizar diferentes sistemas en diversas disciplinas científicas y tecnológicas.

Los rayos X experimentan procesos de difracción en los cristales por tener longitudes de onda del mismo orden de magnitud que las distancias interatómicas de las redes cristalinas. El fenómeno de la difracción es, esencialmente, un proceso de dispersión de las radiaciones electromagnéticas por un conjunto de átomos dispuestos regularmente en el espacio, lo que produce interferencias constructivas de ondas que están en fase (Bermúdez-Polonio, 1981).

En particular, los sólidos cristalinos son aquellos en los cuales las moléculas están ordenadas de manera definida y ese orden se repite una y otra vez en todo el cristal. Una propiedad característica de los cristales es que tienen un punto de fusión definido, que es la temperatura a la cual la estructura cristalina se destruye debido a que las moléculas adquieren la energía suficiente para superar las fuerzas de atracción que mantienen al cristal unido. Por el contrario, en los sólidos amorfos, las moléculas no se agrupan en forma ordenada y repetitiva. En consecuencia, al no existir una red cristalina que romper, no presentan punto de fusión definido. Sin embargo, los sólidos amorfos tienen una temperatura característica que es la temperatura de transición vítrea (Buckton, 2004).

Los materiales poliméricos están formados por macromoléculas flexibles, y en estado sólido, es extremadamente difícil que se alineen perfectamente para formar cristales. En general, presentan un patrón de difracción característico de un sólido amorfo con ausencia de picos de difracción bien definidos y la temperatura de transición vítrea en éstos puede utilizarse como una característica distintiva.

Por lo expuesto, se entiende que cualquier sustancia cristalina produce un difractograma de Rx característico. En muestras constituidas por una mezcla de diferentes compuestos, el difractograma correspondiente manifestará la suma de los patrones de difracción de cada uno de éstos (huella dactilar de la fase cristalina). Por este motivo, para obtener evidencias de la formación de un complejo iónico, se comparan los diagramas de los complejos y de las mezclas físicas correspondientes. Lo descrito anteriormente ha sido de gran importancia en nuestro grupo de investigación y existen antecedentes de que, por interacción química de un F cristalino con un PE, se obtiene un material amorfo (Buckton, 2004; Jimenez-Kairuz et al., 2002; Ramirez-Rigo et al., 2006).



Tal como se ha descripto, BZ y CMP son sólidos cristalinos y en los difractogramas de éstos se observan picos agudos característicos. Por su parte, el análisis por difracción de Rx de polvo de los PE seleccionados, permitió evidenciar que éstos son amorfos (ausencia de picos de cristalinidad en los difractogramas).

En el análisis por difracción de Rx de los CIPE se evidenció que los sistemas obtenidos, independientemente del medio de interacción, presentan los picos de cristalinidad de BZ, lo que indica la presencia de BZ libre en los CIPE. Además, no se observaron marcadas diferencias en los difractogramas de los CIPE y las mezclas físicas (Figura 4.18 y 4.19). Estos resultados se presentaron en concordancia con las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, en donde se pudo evidenciar, en todos los casos, la presencia de BZ libre en la superficie de las partículas (Figuras 4.13-4.17).

Por el contrario, en los complejos PE-CMP, no se observaron los picos de cristalinidad de CMP neutra, es decir, no se pudo reconocer en los difractogramas de los complejos la presencia de la estructura cristalina de CMP, lo que indicaría que ésta se encuentra interaccionando con el PE portador y no habría CMP libre en el sólido. Por su parte, el análisis de los difractogramas de las MF, permite evidenciar algunos picos de cristalinidad de CMP, lo que da cuenta de que el F se encuentra libre en estos casos, lo cual se explica por la ausencia de un medio que promueva la interacción (Figura 4.25) (Jimenez-Kairuz et al., 2002; Ramirez-Rigo et al., 2006).

Complementariamente, el análisis microscópico de los complejos PE-CMP y de las mezclas físicas correspondientes, confirmó la presencia de CMP libre en las mezclas físicas, lo cual se puso de manifiesto por la observación del fenómeno de birrefringencia frente a la luz polarizada, el cual no se observó en los complejos (Figura 4.26) (Barón, 2001).

Por otra parte, la espectroscopia FT-IR, tradicionalmente, ha sido utilizada para identificación de compuestos orgánicos, debido a que no existen dos compuestos que absorban exactamente en las mismas frecuencias. Además, es considerada la técnica de primera elección para confirmar la existencia de unión iónica entre PE y F, cuando se encuentran en forma sólida, debido a que permite deducir información estructural del material analizado y provee información sobre el estado de grupos ácidos o básicos con capacidad de ionizarse (Streitwieser & Contin, 1979). Las potencialidades descriptas para esta técnica han sido explotadas en nuestro de investigación con el fin de poder evidenciar el tipo de interacción existente entre los



PE y los F, en particular, cuando ésta es de tipo iónica (Guzmán et al., 2012; Ramirez-Rigo et al., 2006).

En lo que respecta a la espectroscopia infrarroja análisis de los espectros FT-IR obtenidos, se centró en las señales correspondientes a los grupos C=O del -COOH y del COO⁻ de los PE aniónicos, y en los grupos amino libre y protonado del PE catiónico. Debido a que BZ no presenta en su estructura química grupos plausibles de ser ionizados, el análisis de las bandas de absorción estuvo focalizado en la búsqueda de diferencias en los espectros de los PE en comparación con los CIPE y las respectivas mezclas físicas. Se pudo observar que, los CIPE obtenidos en los dos medios presentan espectros similares, los cuales son diferentes a los de las MF (Figura 4.20-21). El análisis de los espectros permitió evidenciar cambios en las señales correspondientes al C=O del COOH y COO⁻ del PE aniónico y al grupo dimetilaminoetilmetacrilato del EuE o N-H del Chi. Estos cambios en las bandas sugerirían que se produce una interacción entre los PE involucrados en el CIPE y que ésta puede ser de características iónicas. Resultados similares obtuvo Moustafine (2005) cuando analizó la interacción entre EuE y EuL. En particular, para el complejo constituido por los polisacáridos, la señal que se observa entre 3750 y 3500 cm⁻¹, que corresponde a las señales N-H y OH del Chi, podría indicar que el corrimiento que se produce en esa región, cuando se comprara la MF y el CIPE, se debe a una interacción por puente hidrógeno entre los grupo del Chi y los del AA, que se observan en ambos CIPE, pero no en la MF.

Por su parte, para los complejos PE-CMP los cambios observados entre los espectros de las MF y de los complejos binarios, sugieren que la interacción entre el PE y la CMP es de tipo iónica, ya que se observan corrimientos en la frecuencia de absorción correspondiente C=O del -COO⁻ del PE en los complejos, los cuales no se observan en la MF correspondiente (Figura 4.27). Resultados similares se han observado para diferentes complejos binarios, tales como Carbomer-atenolol (Jimenez-Kairuz et al., 2005), AA-atenolol, AA-metoclopramina y AA-propranolol (Ramirez-Rigo et al., 2006).

En este sentido, la caracterización fisicoquímica de los sistemas portadores sugiere la interacción entre los PE que forman el CIPE o bien entre el PE y CMP en el caso de los complejos binarios.

En el conjunto de los resultados obtenidos, resulta interesante hacer un análisis desde la perspectiva de diseño de potenciales formulaciones a partir de estos sistemas. Es un hecho conocido que la utilización de materiales portadores produce una



dilución de la dosis a administrar de un determinado F y, en consecuencia, la presencia del portador incrementa la cantidad de material que contiene la dosis necesaria de F . Para el diseño de formas farmacéuticas sólidas, la dosis de F debe estar contenida en una masa final $\leq 1\text{g}$ (Allen & Ansel, 2013). Si se considera la dosis diaria de BZ de 100 mg, dado que la relación entre la proporción de CIPE y BZ es 1:1 p/p, sería necesaria una masa final de 200 mg de sistema para contener la dosis necesaria. Si se piensa en el agregado de excipientes para el desarrollo de la formulación, se cuenta con un amplio margen hasta alcanzar el límite de masa de 1 g, lo cual es altamente adecuado.

Otro punto interesante a destacar, es que el acomplejamiento entre los CIPE cargados con BZ, o bien, entre los PE y CMP, sólo afecta a la fase biofarmacéutica de la acción medicamentosa, es decir, los eventos preabsortivos, dado que el sistema libera el F que contiene, porque la interacción que se establece es reversible. Esto implica que, luego de la administración por vía per-oral, la liberación del F precede el proceso de absorción y no se genera modificación alguna en su estructura química (Romañuk et al., 2009). Además, como se ha mencionado, los PE utilizados se encuentran aprobados por los organismos sanitarios de referencia para su uso en humanos y son ampliamente utilizados para esta vía de administración.

En consecuencia, la potencial aprobación sanitaria, para el uso en clínica, de formulaciones innovadoras que pudieran desarrollarse a partir de estos sistemas, implicarían procesos más cortos, menos costosos y más factibles, que aquellas propuestas que devengan del uso de un nuevo derivado o un nuevo excipiente (Tetzlaff et al., 2012).

Desde una perspectiva tecnológica, son numerosas las estrategias farmacotécnicas que permiten optimizar el desempeño de un F , sin generar modificaciones en su estructura química. Una de las ventajas que presentan los materiales desarrollados en esta tesis, se vinculan con la simplicidad de su metodología de obtención y la posibilidad de desarrollar formulaciones sólidas multiparticuladas. En este sentido, éstas pueden ser obtenidas mediante la utilización de equipamientos de uso frecuente en la industria farmacéutica, lo que además, resulta conveniente desde un enfoque económico.



4.7. Conclusiones parciales

Los sistemas portadores de BZ y CMP obtenidos presentaron adecuadas propiedades farmacotécnicas y biofarmacéuticas.

En lo que respecta a los CIPE cargados con BZ se puede establecer que se optimizó una metodología de obtención de las multipartículas, la cual fue simple y reproducible, a la vez que permitió obtenerlas con un alto porcentaje de rendimiento y con tamaño de partículas inferiores a 1 mm, y esta metodología podría ser escalable para producirlas en mayor escala. Las propiedades reológicas exhibidas hacen de éstos sistemas, materiales adecuados para ser formulados en cápsulas, con la potencialidad de combinar diferentes CIPE para permitir una dosis de ataque de BZ y luego una liberación controlada en el tiempo, ya que, dependiendo de la composición del CIPE y del medio de interacción utilizado para su desarrollo, las propiedades de liberación de BZ son diferentes.

En lo que respecta a los sistemas portadores de CMP, éstos fueron obtenidos basados en la plataforma PE-F desarrollada en nuestro grupo de investigación. Los complejos PE-CMP presentan características de sólidos amorfos y su análisis fisicoquímico permite inferir la ausencia de CMP libre, lo que indicaría que todo el F forma parte del complejo y que la interacción entre los PE y CMP es de carácter electrostático. Los perfiles de liberación permiten establecer que CMP se libera mayoritariamente en forma lenta y controlada, con influencia del medio de liberación y del PE presente en la composición del complejo. Los sistemas PE-CMP se comportan como sistemas inteligentes y de reservorio de CMP, que son capaces de liberarla en presencia de iones en el medio, lo cual se ve promovido por un mecanismo de intercambio iónico.

En resumen, los sistemas portadores de BZ y CMP presentan ventajas farmacoterapéuticas y, de esta manera, se constituyen en alternativas superadoras que podrían ser utilizadas para optimizar el tratamiento de la enfermedad de Chagas

4.8. Referencias

- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, A. (2009). Ministerio de Salud. Productos Medicinales. Disposición 758/2009. Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata. Retrieved 22nd January, 2016, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/legislacion/medicamentos/Disposicion_ANMAT_758-2009.pdf
- Allen, L., & Ansel, H. C. (2013). *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems* (10th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.



- Andrews, G. P., Lavery, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 505-518.
- Antonietti, M., Conrad, J., & Thuenemann, A. (1994). Polyelectrolyte-surfactant complexes: a new type of solid, mesomorphous material. *Macromolecules*, 27(21), 6007-6011.
- Asghar, L. F. A., & Chandran, S. (2006). Multiparticulate formulation approach to colon specific drug delivery: current perspectives. *J Pharm Pharm Sci*, 9(3), 327-338.
- Barón, M. (2001). Definitions of basic terms relating to low-molar-mass and polymer liquid crystals (IUPAC Recommendations *Pure and Applied Chemistry*, 73(5), 845-895.
- Bermúdez-Polonio, J. (1981). *Métodos de difracción de rayos X: principios y aplicaciones*; Ediciones Pirámide.
- Bermudez, J., Jimenez-Kairuz, A., Olivera, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2008). A ciprofloxacin extended release tablet based on swellable drug polyelectrolyte matrices. *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 924-930.
- Bodmeier, R. (1997). Tableting of coated pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43(1), 1-8.
- Bonferoni, M., Rossi, S., Ferrari, F., Bertoni, M., Bolhuis, G., & Caramella, C. (1998). On the employment of λ carrageenan in a matrix system. III. Optimization of a λ carrageenan-HPMC hydrophilic matrix. *Journal of Controlled Release*, 51(2), 231-239.
- Bonferoni, M., Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Caramella, C., Aguzzi, C., & Viseras, C. (2008). Polyelectrolyte-drug complexes of lambda carrageenan and basic drugs: relevance of particle size and moisture content on compaction and drug release behavior. *Drug development and industrial pharmacy*, 34(11), 1188-1195.
- Buckton, G. (2004). Propiedades del estado sólido. In M. E. Aulton (Ed.), *Farmacología: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. (2ª ed., pp. 143-153); Elsevier.
- Burkhardt, M., Ruppel, M., Tea, S., Drechsler, M., Schweins, R., Pergushov, D. V., ... Müller, A. H. (2008). Water-soluble interpolyelectrolyte complexes of polyisobutylene-block-poly(methacrylic acid) micelles: Formation and properties. *Langmuir*, 24(5), 1769-1777.
- Cook, H. J., de Anda Jáuregui, G., Carrasco, K. R., & Cruz, L. M. (2012). Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f. *Rev Mex Cienc Farm*, 43, 3.
- Costa, P., & Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133.
- Crommelin, D. J., & Florence, A. T. (2013). Towards more effective advanced drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(1), 496-511.
- de Robertis, S., Bonferoni, M. C., Elviri, L., Sandri, G., Caramella, C., & Bettini, R. (2015). Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert opinion on drug delivery*, 12(3), 441-453.
- Dey, N., Majumdar, S., & Rao, M. (2008). Multiparticulate drug delivery systems for controlled release. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1067-1075.
- Dragan, E. S., & Schwarz, S. (2004). Polyelectrolyte complexes. VII. Complex nanoparticles based on poly(sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate) tailored by the titrant addition rate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(20), 5244-5252.
- Food and Drug Administration, F. (2011). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata.[Internet]. Retrieved 19th, 2015, from <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
- Fu, Y., & Kao, W. (2010). Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion Drug Delivery*, 7(4), 429-444.



- Ghebre-Sellassie, I. (1989). Pellets: A general overview. *Pharmaceutical pelletization technology*, 37, 1-13.
- Grassi, M., & Grassi, G. (2014). Application of mathematical modeling in sustained release delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 11(8), 1299-1321.
- Guo, J.-H., Skinner, G., Harcum, W., & Barnum, P. (1998). Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(6), 254-261.
- Guzmán, M., Manzo, R., & Olivera, M. (2012). Eudragit E100 as a Drug Carrier: The Remarkable Affinity of Phosphate Ester for Dimethylamine. *Molecular Pharmaceutics*, 9(9), 2424-2433.
- Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Juras, D. V., Greenberg, M., Kerr, A. R., . . . Thornhill, M. H. (2012). New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(1), 16-28.
- Hernández-Torres, E. M., Rodríguez-González, F. J., González-González, V. A., & Vázquez-Rodríguez, S. (2014). Influencia de la criomolienda en la morfología y propiedades de materiales compuestos de polipropileno y organoarcillas. *Ingenierías*, 17(62), 11.
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(12), 1145-1149.
- Holgado, M. A., Fernández-Arevalo, M., Álvarez-Fuentes, J., Caraballo, I., Llera, J. M., & Rabasco, A. M. (1995). Physical characterization of carteolol: Eudragit® L binding interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, 114(1), 13-21.
- Hugerth, A. M. (2001). Micropolarity and microviscosity of amitriptyline and dextran sulfate/carrageenan-amitriptyline systems: The nature of polyelectrolyte-drug complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(10), 1665-1677.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., & Manzo, R. (2004). The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(1), 149-156.
- Jimenez-Kairuz, A., Llabot, J., Allemandi, D., & Manzo, R. (2005). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM): characterization and delivery properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(1), 87-99.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., & Manzo, R. (2002). Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(1), 267-272.
- Kaur, J., Harikumar, S., & Kaur, A. (2012). Interpolyelectrolyte complexes as prospective carriers for controlled drug delivery. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 58-62.
- Kim, K.-S., & Park, S.-J. (2010). Characterization and release behaviors of porous PCL/Eudragit RS microcapsules containing tulobuterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 404-409.
- Kindermann, C., Mathée, K., Strohmeyer, J., Sievert, F., & Breitzkreutz, J. (2011). Tailor-made release triggering from hot-melt extruded complexes of basic polyelectrolyte and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(2), 372-381.
- Krämer, J., & Blume, H. (1994). Biopharmaceutical aspects of multiparticulates. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 65, 307-332.
- Lankalapalli, S., & Kolapalli, V. M. (2009). Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(5), 481.
- Lu, M.-y. F., Borodkin, S., Woodward, L., Li, P., Diesner, C., Hernandez, L., & Vadnere, M. (1991). A polymer carrier system for taste masking of macrolide antibiotics. *Pharmaceutical Research*, 8(6), 706-712.
- Martin, A. (1993). *Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*: BI Waverly. Pvt Ltd.



- Moustafine, R., & Bobyleva, O. (2006). Design of new polymer carriers based of Eudragit® E PO/Eudragit® L100-55 interpolyelectrolyte complexes using swellability measurements. *Journal of Controlled Release*, 116(2), 35-36.
- Moustafine, R., Kabanova, T., Kemenova, V., & Van den Mooter, G. (2005). Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 191-198.
- Moustafine, R., Kemenova, V., & Van den Mooter, G. (2005). Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate. *International Journal of Pharmaceutics*, 294(1), 113-120.
- Moustafine, R. I., Bobyleva, V. L., Bukhovets, A. V., Garipova, V. R., Kabanova, T. V., Kemenova, V. A., & Van Den Mooter, G. (2011). Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth) acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L 100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(3), 874-885.
- Moustafine, R. I., Margulis, E. B., Sibgatullina, L. F., Kemenova, V. A., & Van den Mooter, G. (2008). Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1), 215-225.
- Müller, M. (2014). Sizing, shaping and pharmaceutical applications of polyelectrolyte complex nanoparticles. *Adv. Polymer Sci*, 256, 197-260.
- Müller, M., Kehler, B., Fröhlich, J., Poeschla, S., & Torger, B. (2011). Polyelectrolyte complex nanoparticles of poly (ethyleneimine) and poly (acrylic acid): preparation and applications. *Polymers*, 3(2), 762-778.
- Munday, D. L., & Cox, P. J. (2000). Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1), 179-192.
- Mustafin, R. (2011). Interpolymer combinations of chemically complementary grades of Eudragit copolymers: a new direction in the design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45(5), 285-295.
- Nogami, H., Nagai, T., Fukuoka, E., & Sonobe, T. (1969). Disintegration of the aspirin tablets containing potato starch and microcrystalline cellulose in various concentrations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 17(7), 1450-1455.
- Palena, M., García, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2015a). Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 45-53.
- Palena, M., García, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2015b). Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, Part A, 45-53.
- Palena, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2012). Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carriers. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), 1-12.
- Peppas, N. (1985). Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 60(4), 110.
- Pharma-Polymers. (2002). Preparing Modified Release Multiparticulate Dosage Forms With Eudragit Polymers. *Pharma Polymers*, November, 9, 2-3.
- Philipp, B., Dautzenberg, H., Linow, K.-J., Kötz, J., & Dawydoff, W. (1989). Polyelectrolyte complexes—recent developments and open problems. *Progress in Polymer Science*, 14(1), 91-172.
- Prado, H., Matulewicz, M., Bonelli, P., & Cukierman, A. (2008). Basic butylated methacrylate copolymer/kappa-carrageenan interpolyelectrolyte complex: preparation, characterization and drug release behaviour. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1), 171-178.



- Quinteros, D., Allemandi, D., & Manzo, R. (2012). Equilibrium and release properties of aqueous dispersions of non-steroidal anti-inflammatory drugs complexed with polyelectrolyte eudragit e 100. *Sci Pharm*, 80(2), 487-496.
- Quinteros, D., Manzo, R., & Allemandi, D. (2010). Design of a colonic delivery system based on cationic polymethacrylate (Eudragit E100)-mesalamine complexes. *Drug delivery*, 17(4), 208-213.
- Quinteros, D., Manzo, R., & Allemandi, D. (2011). Interaction between Eudragit(R) E100 and anionic drugs: addition of anionic polyelectrolytes and their influence on drug release performance. *J Pharm Sci*.
- Ramírez-Rigo, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2006). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginate acid characterization and delivery properties. *Int J Pharm*.
- Ramírez Rigo, M. V., Allemandi, D. A., & Manzo, R. H. (2009). Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties. *Drug delivery*, 16(2), 108-115.
- Romañuk, C. B., Manzo, R. H., Linck, Y. G., Chattah, A. K., Monti, G. A., & Olivera, M. E. (2009). Characterization of the solubility and solid-state properties of saccharin salts of fluoroquinolones. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(10), 3788-3801.
- Shaji, J., Chadawar, V., & Talwalkar, P. (2007). Multiparticulate drug delivery system. *The Indian Pharmacist*, 6(60), 21-28.
- Shete, G., Puri, V., Kumar, L., & Bansal, A. K. (2010). Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 598-609.
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328-343.
- Staniforth, J. (2002). Powder flow. In M. E. Aulton (Ed.), *Pharmaceutics: The science of dosage form design* (2^o ed., pp. 197-210.). España: Churchill Livingstone Elsevier Science Limited.
- Streitwieser, A. H., & Contín, C. H. (1979). *Química orgánica*.
- Tang, E. S., Chan, L., & Heng, P. W. (2005). Coating of multiparticulates for sustained release. *American Journal of Drug Delivery*, 3(1), 17-28.
- Tetzlaff, J. M., Chan, A.-W., Kitchen, J., Sampson, M., Tricco, A. C., & Moher, D. (2012). Guidelines for randomized clinical trial protocol content: a systematic review. *Systematic reviews*, 1(1), 1.
- Thünemann, A. F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.-F., & Löwen, H. (2004). Polyelectrolyte complexes *Polyelectrolytes with defined molecular architecture II* (pp. 113-171): Springer.
- USP33-NF28, U. S. P. C. (2010). General Chapter. En: The United States Pharmacopeia (USP) 33-National Formulary (NF) 28. Inc, Rockville, Maryland: United States Pharmacopeia Convention.: Inc.
- Van der Gucht, J., Spruijt, E., Lemmers, M., & Stuart, M. A. C. (2011). Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems. *Journal of colloid and interface science*, 361(2), 407-422.
- Vila Jato, J. (1997). Tecnología Farmacéutica—Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. *Editorial Síntesis, Madrid*, 75-142.
- Vilches, A., Jiménez-Kairuz, A., Alovero, F., Olivera, M., Allemandi, D., & Manzo, R. (2002). Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 246(1), 17-24.
- Zuleger, S., & Lippold, B. C. (2001). Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*, 217(1), 139-152.



CAPÍTULO 5:

**ESTUDIOS *IN VIVO* DE EFICACIA Y
SEGURIDAD**



Capítulo 5:

Estudios *in vivo* de eficacia y seguridad

El presente capítulo se encuentra estructurado en dos partes, con el objetivo de presentar los resultados de un modo tal que respondan a la lógica con la cual se han planteado los diferentes diseños experimentales y con la secuencia en la cual se han llevado a cabo los distintos estudios.

La parte I versa sobre el estudio *in vivo* de la combinación de BZ y CMP como F tripanocidas. En este sentido, se evaluó, sobre la base de un diseño racional de investigación, la combinación de estos F para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, en un modelo murino de infección por *T. cruzi*. Estos resultados, permitieron establecer las dosis óptimas de combinación de los F tripanocidas que presentan eficacia terapéutica y mayor seguridad.

La parte II versa sobre el estudio de los sistemas portadores de BZ y CMP, para lo cual, se utilizaron los conocimientos generados en la parte I del presente capítulo y los resultados presentados en el capítulo 4, en el cual se desarrolló en detalle la forma de obtención y la caracterización de los sistemas portadores de BZ y CMP.

La introducción que se presenta a continuación es, en términos generales, común a ambas partes, debido a que enfatiza la importancia de abordar la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas, sobre la base del estudio de la alianza de F que presenten diferentes mecanismos de acción. Los aspectos relativos al marco teórico e introductorio en lo que refiere a los sistemas de liberación modificada (SLM), fueron presentados en el capítulo 4.

Cabe destacar que estos ensayos fueron realizados en colaboración con la Dra. Pilar Aoki, el Dr. Nicolás Ponce y la Bioq. Liliana Sanmarco, del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET y Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Los estudios electrocardiográficos de los animales de experimentación fueron realizados en colaboración con el Dr. Walter Rivarola del Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.



5.1. Introducción

La enfermedad de Chagas es una condición compleja resultante del establecimiento exitoso del *T. cruzi* en los tejidos clave del huésped. Tal como se describió previamente, se desarrolla a partir de una fase aguda inicial que puede durar 2 o 3 meses y se caracteriza por la presencia de parásitos circulantes detectables en sangre (Aoki et al., 2012; Coura & Borges-Pereira, 2012; Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010). Luego, la infección puede evolucionar hacia la fase crónica y sin un tratamiento adecuado, puede durar toda la vida. Muchos años o incluso décadas después de la infección inicial, aproximadamente el 30 o 40% de los individuos infectados inicialmente desarrollan la fase crónica inflamatoria, la cual afecta principalmente al tejido cardíaco (Coura & Borges-Pereira, 2012; Lo Presti et al., 2015; Rassi et al., 2010). La miocarditis chagásica es la forma más común de cardiomiopatía no isquémica en el mundo y la manifestación más expresiva de la enfermedad de Chagas, debido a su frecuencia y severidad. A lo cual se suman las fallas en el diagnóstico temprano y en el tratamiento de la enfermedad (Coura & Borges-Pereira, 2012).

A pesar de su larga historia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, NFX y BZ inducen frecuentes efectos adversos, especialmente en adultos. El principal efecto adverso de BZ es la intolerancia hepática o hepatotoxicidad, usualmente concomitante con reacciones de hipersensibilidad, al comienzo del tratamiento, toxicidad medular y neuropatías periféricas, al final del tratamiento (Castro & Diaz de Toranzo, 1988; Davies et al., 2014; Maya et al., 2007; Rojo et al., 2014).

En este contexto, debido a la alta incidencia de efectos adversos asociados con el tratamiento de la enfermedad de Chagas, la quimioterapia con agentes tripanocidas continúa siendo insatisfactoria, debido a las significativas limitaciones de los F actualmente disponibles y los múltiples efectos adversos que se presentan. Ésto, frecuentemente, resulta en situaciones de incumplimiento del esquema terapéutico a largo plazo, particularmente, en el tratamiento de los pacientes crónicos (Coura & Borges-Pereira, 2012; Lo Presti et al., 2015).

Además, es relevante destacar que la terapia con ambos F tripanocidas, NFX y BZ, no se encuentra completamente validada en la medicina basada en evidencia. Estos F son utilizados para el tratamiento, pero no están completamente recomendados por la US Food and Drug Administration de Estados Unidos o la Agencia Europea de Medicamentos (Rassi et al., 2010). Diversos reportes acerca de la toxicidad

diferencial de ambos F son controvertidos; sin embargo, se propone que BZ es usualmente mejor tolerado que NFX (Rassi et al., 2010; Rojo et al., 2014).

El reciente estudio multicéntrico, *Benznidazole evaluation for Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT), ha revelado resultados desalentadores luego de un seguimiento por 5 años de 2854 pacientes con cardiopatía chagásica bien documentada, tratados con BZ o placebo randomizadamente (o a doble ciego) (Morillo et al., 2015). Si bien el tratamiento de pacientes crónicos redujo significativamente los parásitos en sangre, no se redujo en forma significativa el deterioro clínico, ni la tasa de mortalidad, en el período estudiado. El estudio BENEFIT confirma, comparativamente, menores tasas de eliminación del parásito en adultos con enfermedad cardíaca, ya que tales pacientes, presumiblemente, han sido infectados por mayores períodos de tiempo que los niños o jóvenes adultos. En consecuencia, en la práctica, se debería dar prioridad al diagnóstico y tratamiento de niños infectados, en los cuales BZ presenta un mejor perfil, con mayores tasas de cura parasitológica y menores efectos adversos que en los adultos (Maguire, 2015).

Además, ante la necesidad de contar con nuevos tratamientos farmacoterapéuticos eficaces y seguros, y al considerar las potencialidades del efecto sinergista del tratamiento combinado de BZ y CMP, de acuerdo con los resultados presentados en el capítulo 3 *Estudios in vitro de la combinación de BZ y CMP*, se propuso evaluar *in vivo*, en modelos murinos de infección con *T. cruzi*, la eficacia y seguridad del tratamiento combinado de BZ y CMP. Cabe destacar que, para seleccionar las dosis a utilizar en los tratamientos, se tuvieron en cuenta los parámetros farmacocinéticos de los F (Workman, White, Walton, Owen, & Twentyman, 1984; Yoo, Yoon, Lee, & Lee, 1999), la volemia de los ratones y se realizó una aproximación alométrica, a partir de los resultados *in vitro* obtenidos y presentados en el capítulo 3.

PARTE I: ESTUDIO DE BZ Y CMP COMO F TRIPANOCIDAS

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Materiales

5.2.1.1. Fármacos

Los F utilizados fueron CMP clorhidrato (grado farmacéutico, Parafarm[®], Bs.As., Argentina) y BZ fue extraído y purificado desde los comprimidos comerciales disponibles (Radanil[®], Roche, Argentina).



5.2.1.2. Reactivos

TRIzol (Gibco by Life Technology, Japón), isoflorano (Foranc[®], Abbott, fraccionado en Argentina), clorhidrato de ketamina (Ketamina[®] 50, Holliday, Argentina), formalina bufferizada 4 % (Merck[®], Alemania).

5.2.1.3. Animales

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones BALB/c machos de tres meses de edad y (24 ± 3) g de peso corporal, que fueron criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua en todos los experimentos llevados a cabo. Todos los experimentos y procedimientos realizados se ajustaron a las exigencias del Comité de ética para uso y cuidado de los animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Número de aprobación del Comité de Ética HCD 753/14) en estricto acuerdo con las recomendaciones de la Guía para uso y cuidado de los animales de experimentación, publicado por el Consejo Canadiense de cuidado animal (Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care, OLAW Assurance number A5802-01).

5.2.3. Ensayos *in vivo* en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*

Para llevar a cabo los ensayos *in vivo* en la fase aguda experimental, en primera instancia se infectaron los animales con *T. cruzi*. Para esto, los ratones BALB/c fueron inoculados, por vía intraperitoneal, con 10^3 trypomastigotes de la cepa Tulahuen. Esta forma del parásito fue obtenida del torrente sanguíneo, por punción intracardiaca, de animales previamente infectados, durante el pico de parasitemia que ocurre entre el día 14 a 18 post-infección. Los parásitos se mantuvieron mediante pases seriados de ratón a ratón. La Figura 5.1 presenta cómo se lleva a cabo la inoculación de parásitos en los ratones.



Figura 5.1. Proceso de inoculación de los parásitos en los ratones BALB/c por medio de la administración intraperitoneal de sangre infectada con *T. cruzi*.



Para todos los tratamientos realizados, los F fueron administrados mediante sonda, por vía per-oral, tal como lo muestra la Figura 5.2 (Morton & Muriana, 2002). El tratamiento se llevó a cabo diariamente y durante 14 días, con la primera dosis administrada 24 h post-infección. Previo a la administración de los F, los sólidos de éstos fueron dispersados en agua esterilizada. El volumen de administración fue 30 μ L, en todos los casos.

Los animales fueron divididos en grupos de $n=6$, de acuerdo con los diferentes diseños experimentales, tal como se muestra a continuación. Cabe destacar que, ratones no infectados (NI) e infectados y no tratados (INT), fueron utilizados como control.



Figura 5.2. Proceso de administración de los F por vía per-oral.

5.2.3.1. Primer diseño experimental

Para llevar a cabo este ensayo, los animales fueron divididos en 10 grupos: NI, INT, infectados y tratados solo con BZ en dosis de 100; 50; 25 y 12,5 mg/kg de peso corporal/día (BZ 100 mg/kg/día, BZ 50 mg/kg/día, BZ 25 mg/kg/día y BZ 12,5 mg/kg/día, respectivamente) e infectados y tratados con BZ en dosis de 100; 50; 25 y 12,5 mg/kg de peso corporal/día en combinación con CMP a dosis fija de 7,5 mg/kg de peso corporal/día (BZ 100 + CMP 7,5 mg/kg/día, BZ 50 + CMP 7,5 mg/kg/día, BZ 25 + CMP 7,5 mg/kg/día y BZ 12,5 + CMP 7,5 mg/kg/día, respectivamente).

5.2.3.2. Segundo diseño experimental

Los animales fueron divididos en 7 grupos: NI, INT, infectados y tratados con CMP en dosis de 12,5; 10; 7,5; 5 y 2,5 mg/kg de peso corporal/día en combinación con BZ a dosis fija de 25 mg/kg de peso corporal/día (BZ 25 + CMP 12,5 mg/kg/día, BZ 25 + CMP 10 mg/kg/día, BZ 25 + CMP 7,5 mg/kg/día, BZ 25 + CMP 5 mg/kg/día y BZ 25 + CMP 2,5 mg/kg/día, respectivamente).

En ambos diseños experimentales, los animales fueron sacrificados a los 15 días post-infección (dpi), es decir, luego de culminar los 14 días de tratamiento.



5.2.4. Ensayo *in vivo* en la fase crónica de la infección con *T. cruzi* (FCI)

Para los ensayos *in vivo* en la fase crónica de la infección experimental, los animales fueron infectados y tratados de la forma en la que se detalló previamente, en la sección 5.2.3. del presente capítulo. Los ratones fueron divididos en los siguientes grupos: NI, infectados y no tratados (INT-FCI), infectados y tratados solo con BZ en dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día (BZ-FCI) y BZ en dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día en combinación con CMP en dosis de 7,5 mg/kg de peso corporal/día (BZ-CMP-FCI).

Luego de 14 días de administración de los F, los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y supervisados diariamente, hasta 90 dpi.

5.2.5. Ensayo de hepatotoxicidad *in vivo*

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos: animales sanos y no tratados (Control), tratados solo con BZ en dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día (BZ-H) y tratados con BZ en dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día en combinación con CMP en dosis de 7,5 mg/kg de peso corporal/día (BZ-CMP-H).

Los ratones fueron tratados diariamente y durante 14 días. Los F fueron administrados mediante sonda por vía per-oral (Morton & Muriana, 2002), tal como se describió en la sección 5.2.3.

Para el procesamiento de los animales se utilizaron diferentes metodologías, de acuerdo con la descripción que se presenta en los siguientes apartados.

5.2.6. Parasitemia y análisis de la sobrevida de los animales

Para el análisis de la parasitemia, los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano y se extrajo sangre periférica, por medio de punción intracardiaca, tal como se presenta en las Figuras 5.3 a) y b), respectivamente. La sangre fue puesta en contacto con buffer de lisis, durante 10 min y se llevó a cabo el recuento de parásitos en cámara de Neubauer, mediante observación directa en el microscopio óptico. Los resultados se expresaron como la cantidad de parásitos por cada mL sangre en función de los diferentes tratamientos. Además, la sobrevida de cada grupo de animales fue monitoreada diariamente.

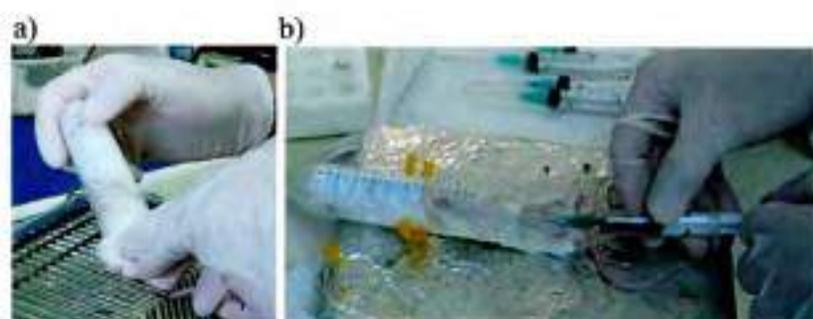


Figura 5.3. Procedimiento para a) anestesiarse a los ratones con vapores de isoflurano y b) extraer sangre periférica por punción intracardiaca.

5.2.7. Registro de peso de órganos relevantes

Los animales sacrificados fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos. Luego de cortar la tubuladura renal, para permitir la circulación de fluidos, los corazones fueron perfundidos durante 5 min con solución de buffer fosfato (PBS). Luego, se extrajeron los hígados, corazones y bazo, y se registró la masa de estos órganos. Los resultados se expresaron como peso de los órganos relativo al peso corporal de los animales.

5.2.8. Marcadores bioquímicos de daño en tejidos

Para el análisis de los marcadores bioquímicos de daño, se tomaron muestras de sangre, las cuales fueron centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 min y el plasma fue analizado con el objetivo de determinar la actividad de las enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT), las cuales son biomarcadores de daño hepático (Davies et al., 2014). Por otra parte, se determinó la actividad de las enzimas creatinfosfoquinasa sérica total (CK total) y creatinfosfoquinasa isoforma MB (CKMB) (isoenzima específica de miocardio), las cuales son marcadores de daño cardíaco (Kindermann et al., 2012). Estos estudios fueron tercerizados y se realizaron en el Laboratorio Biocon (Córdoba, Argentina). En el caso de las enzimas hepáticas, algunos resultados se expresan como el índice de Ritis (Botros & Sikaris, 2013), que corresponde a la relación (cociente) entre GOT y GPT. Para las enzimas cardíacas, los resultados se expresan como la relación porcentual entre CKMB y CK total (% CKMB/CK total).

5.2.9. Estudios electrocardiográficos (ECG)

Al abordar este punto es necesario recordar que el sistema de conducción eléctrica del corazón se genera en el nodo sinusal (nodo SA), se propaga y estimula el miocardio o músculo cardíaco, lo que causa, en consecuencia, la contracción del



corazón. Este sistema de conducción consiste en una estimulación coordinada del miocardio, que permite la contracción eficaz del corazón y, de ese modo, la sangre se bombea a todo el cuerpo. El impulso nervioso se genera en el nodo SA, de ahí pasa a las aurículas, luego llega al nodo auriculoventricular (nodo A-V) y se distribuye a los ventrículos, a través del haz de His y las fibras de Purkinje (Longo, Fauci, Kasper, Hauser, & Loscalzo, 2011). De esta manera, el ciclo cardíaco se presenta como una sucesión de ondas en el trazado del ECG: onda P, onda o complejo QRS y onda T.

En la Figura 5.4 se representa esquemáticamente un corazón con todos sus tejidos y los potenciales de acción que son activados durante el proceso de contracción cardíaca por la conducción eléctrica. Se puede observar que la sumatoria de los potenciales de acción de cada uno de los procesos que forman parte del sistema de conducción eléctrica del corazón da lugar al ECG, en donde se evidencia el intervalo PR y QT, ya que estos segmentos son claves en el análisis electrocardiográfico. Cabe destacar que, en los animales de experimentación, estos intervalos son más acotados, debido a que éstos presentan una frecuencia cardíaca marcadamente mayor que los humanos.

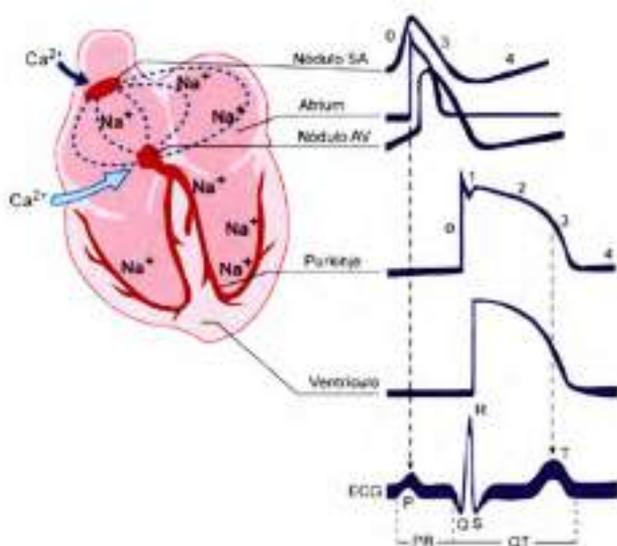


Figura 5.4. Representación esquemática de los potenciales de acción registrados en diversos tejidos cardíacos según la secuencia de activación y su correlación con el ECG de superficie. Se presentan, también, los tejidos que generan potenciales de acción Ca²⁺-dependientes (nódulos SA y AV) y Na⁺-dependientes (aurículas, ventrículos y sistema His-Purkinje).

Los ECG de los ratones fueron obtenidos con un electrocardiógrafo (Modelo FD-16 Fukuda Denshi). A 90 dpi, los animales fueron anestesiados por medio de la administración intraperitoneal de clorhidrato de ketamina, en dosis de 10 mg/kg de peso corporal. La Figura 5.5 muestra el equipo utilizado para llevar a cabo los ECG y



el sistema para realizar el registro. El trazado del ECG fue obtenido con seis electrodos estándar (electrodos dipolares DI, DII y DIII, y electrodos unipolares aVR, aVL y aVF). El registro se realizó a 50 mm/s con una amplitud para dar 1mV/10mm. Con el objetivo de seguir el progreso de la cardiopatía, los parámetros electrocardiográficos evaluados fueron: frecuencia cardiaca (latidos/min), modificaciones en la conducción atrioventricular (intervalo PR prolongado) y en la conducción ventricular (intervalo QT prolongado) expresados en ms.

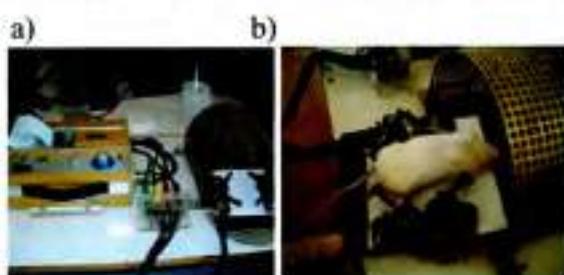


Figura 5.5. a) Electrocardiógrafo utilizado y sistema de registro empleado para la realización de los ECG. b) Ratón anestesiados, con los electrodos colocados para realizar el ECG.

5.2.10. Histología cardiaca e índice de inflamación

Los corazones obtenidos de los ratones sanos e infectados, tratados y no tratados, fueron fijados en formalina bufferizada y embebidos en parafina. Se cortaron secciones de 5 μm de tejido cardiaco, que fueron sometidas a tinción con hematoxilina-eosina (H-E). La inflamación fue evaluada semicuantitativamente, por medio de la examinación de los cortes, en un microscopio de baja potencia. El análisis se realizó de acuerdo a la distribución y extendido de las células inflamatorias (focales, confluentes o difusas) en epicardio y miocardio (1+ para focos inflamatorios simples, 2+ para focos múltiples o focos no confluentes de infiltrados inflamatorios, 3+ para inflamación confluyente y 4+ para inflamación difusa extendida a lo largo de toda la sección) (Martin, Postan, Lucas, Gress, & Tarleton, 2007; Postan, Bailey, Devorak, McDaniels, & Pottala, 1987). Adicionalmente, se evaluó el agrandamiento de las células endoteliales, la presencia de edema perivascular y de fibras miocárdicas interrumpidas o necróticas. La sumatoria numérica de la sección de cada corazón analizado representa una estimación del índice de inflamación. Todos los cortes fueron observados y fotografiados con un microscopio adosado a una cámara fotográfica (Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo de 40X).



5.2.11. Carga parasitaria en tejido cardiaco

Los corazones de los ratones infectados a 90 dpi y conservados en TRIzol, fueron procesados para determinar la carga parasitaria en tejido cardiaco. El ADN genómico fue purificado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el protocolo descrito en el producto TRIzol (Thermo Fisher Scientific Products, 2015).

El ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036) fue cuantificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, para lo cual se empleó una sonda Taqman específica (Custom Taqman Gene Expression Assay, Applied Biosystem). Se utilizó el *primer* y la secuencia de la sonda descrita por Piron *et al* (Piron *et al.*, 2007). Se amplificó una muestra conteniendo 2 μ g de ADN genómico. Este ensayo fue realizado por triplicado. La abundancia del ADN satélite del *T. cruzi* fue normalizada con respecto a la abundancia de la proteína gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) (Taqman Rodent GAPDH Control Reagent, Applied Biosystem) y se expresó como unidades arbitrarias.

5.2.12. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de la significancia estadística para comparar las diferentes condiciones experimentales. Para llevar a cabo este análisis se asumió distribución normal de los datos obtenidos. Se realizó la comparación de las medias (por medio del *test* de *t-Student* de dos colas) y el análisis de varianza (por medio de ANOVA de una vía) seguido de un *post-test* de Bonferroni. Para el procesamiento y análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el software GraphPad Prism®. Un valor de $p < 0,05$ o inferior fue considerado significativo y *ns* denotó que la diferencia no fue significativa.

5.3. Resultados

5.3.2. Estudios *in vivo* de la infección por *T. cruzi* en fase aguda

5.3.2.1. Primer diseño experimental

Para determinar *in vivo* el efecto de la combinación entre BZ y CMP, diferentes grupos de ratones recibieron, diariamente y por vía per-oral, dosis variables de BZ, solo y en combinación con CMP a dosis fija (7,5 mg/kg/día), durante 14 días, con el inicio del tratamiento a las 24 h post-infección. A los ratones infectados y no tratados (INT) se les administró agua por vía oral y fueron utilizados como control. Luego de



15 dpi, los animales fueron sacrificados y se evaluó la parasitemia, registro de pesos de bazo y corazones, relación de la actividad de CK-MB respecto de CK total en plasma como biomarcador altamente específico y sensible para evidenciar daño o injuria a nivel cardíaco (Kindermann et al., 2012).

Todos los grupos de animales mostraron una sobrevida del 100 % en las condiciones evaluadas. En la Figura 5.6 se pueden observar los resultados obtenidos con relación a la parasitemia. Se observó que, tanto la dosis de BZ utilizada actualmente como referencia en modelos de ratones chagásicos (100 mg/kg/día) (Cencig, Coltel, Truyens, & Carlier, 2012; Strauss et al., 2013), como la dosis de 50 mg/kg/día de BZ, fueron eficaces para anular la parasitemia. En tanto que, BZ en dosis de 25 y 12,5 mg/kg/día logra disminuir significativamente los niveles de parasitemia ($p < 0,001$), comparado con el grupo de animales INT. Sin embargo, resultó interesante el resultado obtenido con BZ en dosis de 25 mg/kg/día combinado con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día, debido a que, en conjunto, estos F anularon la parasitemia. Además, BZ en dosis de 12,5 mg/kg/día asociado con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día disminuyó significativamente los niveles de parasitemia ($p < 0,001$), en comparación con la misma dosis de BZ administrado solo.

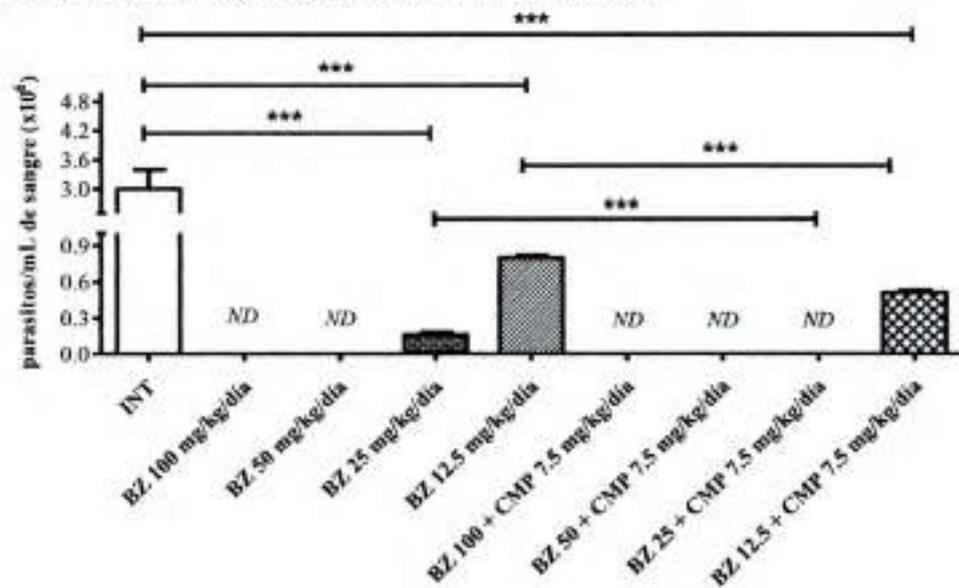


Figura 5.6. Efectos de BZ solo y en combinación con CMP a dosis fija sobre la parasitemia de los ratones BALB/c infectados. Los asteriscos indican diferencia significativa entre los grupos comparados, con $p < 0,001$. ND significa que no se detectaron parásitos en sangre.

En lo que refiere al peso del bazo relativo al peso corporal, en los animales INT el peso relativo de este órgano es mayor que en los animales NI ($p < 0,001$). Además, el tratamiento con BZ en dosis de 100, 50 y 25 mg/kg/día, solo y en combinación con



CMP (7,5 mg/kg/día) produce una disminución del peso relativo del bazo, comparado con el grupo de ratones INT ($p < 0,001$) (Figura 5.7a).

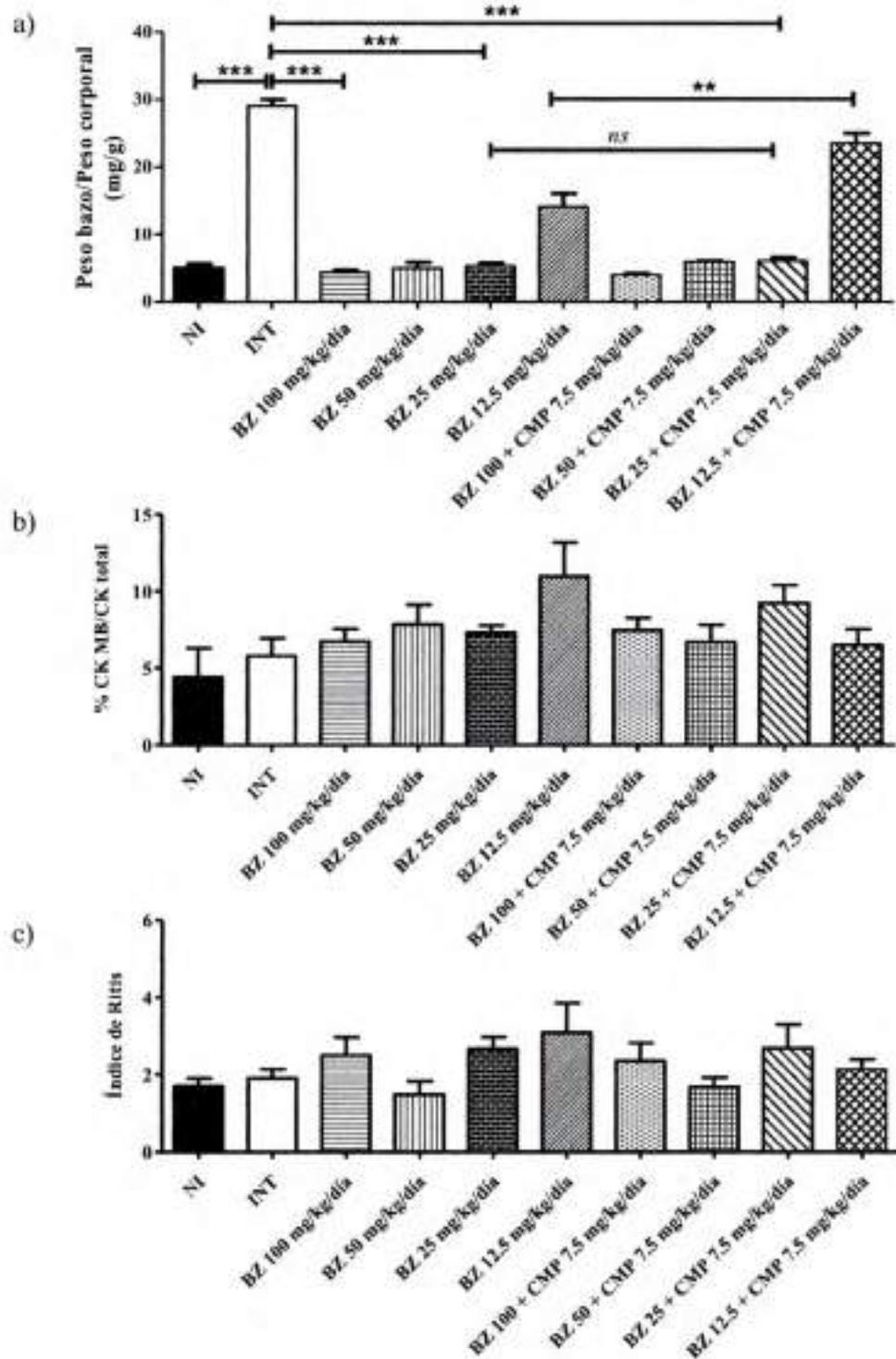


Figura 5.7. Efecto de BZ solo y en combinación con CMP a dosis fija en los ratones BALB/c infectados. a) Peso relativo del bazo, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, y *ns* indica diferencia no significativa. b) Porcentaje relativo de enzima CKMB respecto de CK total en plasma. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas. c) Índice de Ritis. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.



Como puede observarse en la Figura 5.7b, la relación entre los niveles de actividad de las enzimas CKMB respecto de CK total, no presentó diferencias significativas entre los grupos evaluados (Figura 5.7b). En la misma línea, en la Figura 5.7c se presenta el índice de Ritis (Botros & Sikaris, 2013) y, puede observarse que, los resultados obtenidos, fueron similares en los diferentes grupos de animales evaluados. Estos resultados evidencian que, entre los animales NI, los INT e infectados y tratados, no se observan diferencias en la actividad enzimática entre los diferentes grupos de animales, en las condiciones evaluadas, correspondientes a un modelo experimental en fase aguda de la infección con *T. cruzi*.

5.3.2.2. Segundo diseño experimental

De acuerdo con los resultados obtenidos en primer diseño experimental, se propuso llevar a cabo este estudio, en donde la atención se centra en evaluar cuál es la mínima dosis de CMP, que podría ser empleada en combinación con BZ, para lograr eficacia tripanocida y mayor seguridad en la terapia. En este diseño experimental, se evaluaron los mismos parámetros que fueron descriptos previamente. Los diferentes grupos de animales recibieron BZ a dosis fija de 25 mg/kg/día y dosis variables de CMP.

Los diferentes grupos de animales exhibieron, en todos los casos, una sobrevida del 100 %. En la Figura 5.8 se observan los resultados del análisis de parasitemia.

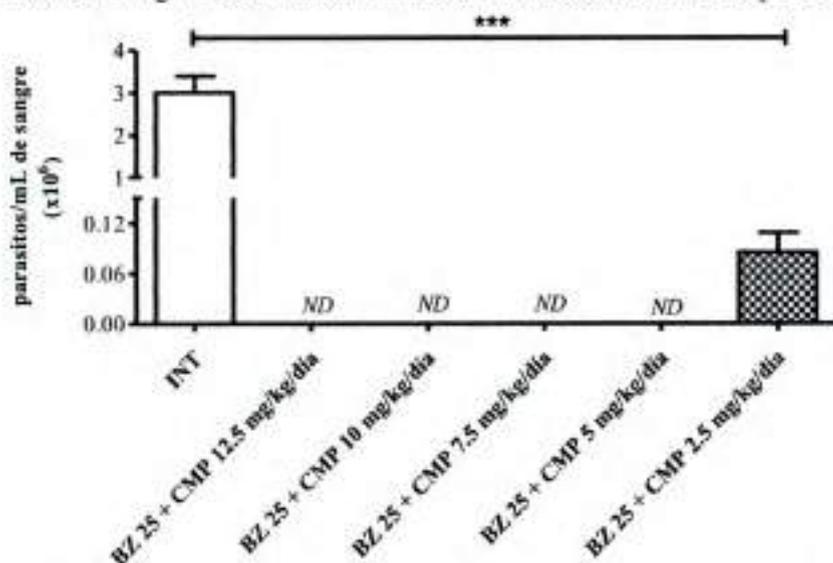


Figura 5.8. Efectos de BZ a dosis fija en combinación con CMP a dosis variable en el tratamiento de ratones BALB/c infectados sobre los niveles de parasitemia. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo evaluado y el control de animales INT ($p < 0,001$). ND significa que no se detectaron parásitos en sangre.



Se puede observar que a los 15 dpi, los animales tratados con CMP en dosis de 12,5; 10; 7,5 y 5 mg/kg/día combinada con BZ en dosis de 25 mg/kg/día presentaron una parasitemia nula, es decir, se logró la eficacia terapéutica. Adicionalmente, CMP en dosis de 2,5 mg/kg/día combinada con BZ en dosis de 25 mg/kg/día, logró disminuir significativamente los niveles de parasitemia ($p < 0,001$), respecto del grupo de animales INT.

En la Figura 5.9a se observa el análisis del peso relativo de los bazos. Se puede evidenciar que los ratones INT presentaron un marcado incremento del peso relativo de los bazos comparados con los otros grupos, incluido el los animales NI ($p < 0,001$).

Resulta de relevancia destacar que la relación entre CKMB y CK total en la mayoría de los grupos fue similar, excepto en los ratones tratados con BZ en dosis de 25 mg/kg/día en combinación con CMP en dosis de 5 mg/kg/día que presentaron un porcentaje marcadamente mayor que el grupo de animales INT ($p < 0,05$) (Figura 5.9b). Por su parte, el índice de Ritis fue similar en los diferentes grupos de animales en estudio (Figura 5.9c).

5.3.3. Estudio *in vivo* de la infección por *T. cruzi* en fase crónica

Para determinar el impacto del tratamiento combinado en la fase crónica de la infección (FCI) con *T. cruzi* de la cepa Tulahuen, se realizó un estudio a 90 dpi, sobre la base de los protocolos previamente descriptos.

Al tomar en consideración los resultados obtenidos en el primer y segundo diseño experimental, se seleccionó como óptima la combinación de BZ en dosis de 25 mg/kg/día asociado con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día (BZ-CMP-FCI) y se comparó con BZ solo a la dosis de referencia (100 mg/kg/día) (BZ-FCI). A los 90 dpi, los animales, luego de ser sacrificados, fueron sometidos a una batería de ensayos. Se realizó PCR en tiempo real para determinar carga parasitaria en tejido cardíaco, registro de peso de corazones, análisis de las características electrocardiográficas, análisis de la histología cardíaca e índice de inflamación y determinación de la actividad de biomarcadores de daño cardíaco.

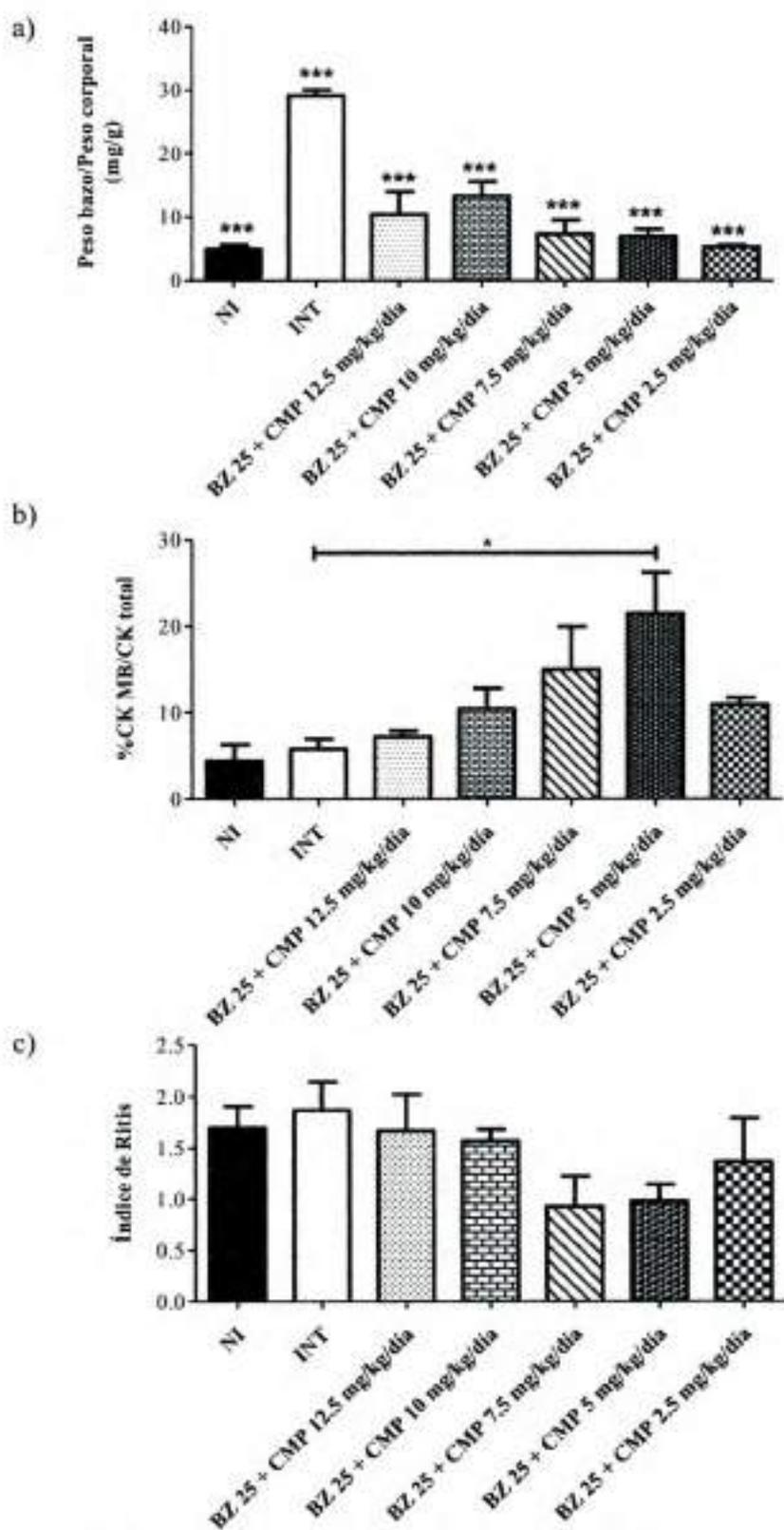


Figura 5.9. Efectos de BZ a dosis fija en combinación con CMP a dosis variable sobre los ratones BALB/c. a) Peso relativo del bazo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre los grupos analizados y el grupo control de animales INT ($p < 0,001$). b) Porcentaje relativo de la enzima CKMB respecto de CK total en plasma. El asterisco indica diferencia significativa entre los grupos comparados ($p < 0,05$). c) Índice de Ritis. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.



El análisis de los pesos relativos de los corazones permitió evidenciar que los tratamientos, BZ-FCI o BZ-CMP-FCI, no presentaron diferencias significativas respecto de los INT-FCI. Sin embargo, el peso relativo de los corazones tratados con BZ-FCI fue significativamente mayor que los tratados con BZ-CMP-FCI ($p < 0,05$) y los animales NI ($p < 0,01$) (Figura 5.10a). En concordancia con estos resultados, el porcentaje relativo de la actividad enzimática de CK-MB fue significativamente mayor en los ratones tratados con BZ-FCI, en comparación con los tratados con BZ-CMP-FCI o con los grupos de animales NI o INT-FCI ($p < 0,001$; $p < 0,01$ y $p < 0,05$; respectivamente) (Figura 5.10b).

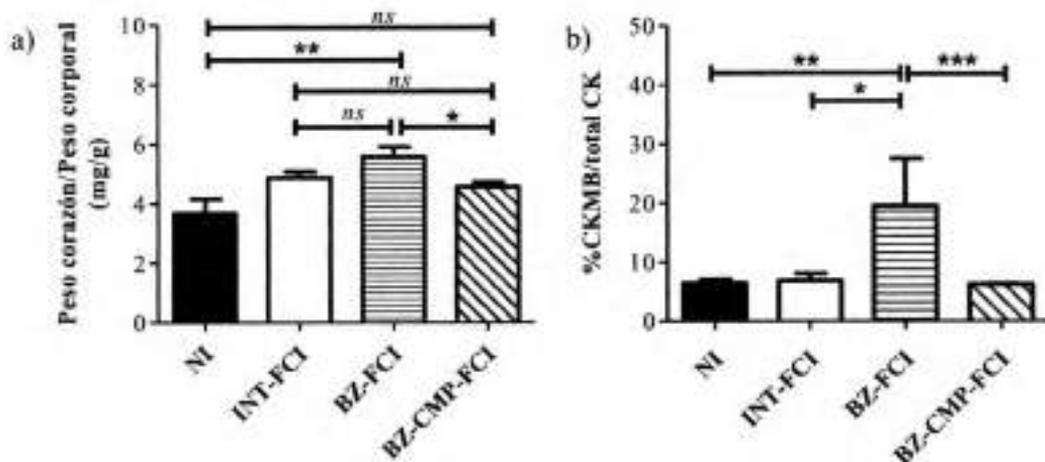


Figura 5.10. Efectos de BZ solo o en combinación con CMP en el modelo experimental de la infección crónica con *T. cruzi* (90 dpi). a) Peso relativo del corazón. Los asteriscos indican que las diferencias entre los grupos fueron significativas ($p < 0,05$) y *ns* indica que las diferencias no fueron significativas. b) Porcentaje relativo de la actividad enzimática de CKMB respecto de CK total en plasma. Los asteriscos indican que las diferencias entre los grupos fueron significativas ($*p < 0,05$ y $**p < 0,01$).

El análisis de las características electrocardiográficas mostró similar frecuencia cardíaca e intervalos PR y QT, excepto entre los grupos de animales NI e INT-FCI. Los INT presentaron mayores intervalos que los controles sanos ($p < 0,05$) (Figura 5.11). El intervalo QT prolongado, en los animales INT-FCI, sugiere la presencia de bloqueos intraventriculares en la conducción cardíaca.

La Tabla 4.1 presenta las anomalías observadas en todos los grupos de animales evaluados, expresadas como porcentaje, respecto del total de animales de cada grupo. En los animales NI se observó una leve bradicardia (17 %), un tipo de arritmia cardíaca, y la mayoría de los animales no presentaron alteraciones (83 %). El grupo de ratones INT-FCI presentó alteraciones múltiples y serias, tales como defectos en la conducción atrial (22 %), defectos en la conducción intraventricular (44



%) y arritmias (77 %), incluidas las bradicardias. Sin embargo, un pequeño grupo de animales (22 %) de los INT, no presentó alteraciones, lo cual es una situación similar a la usualmente observada en los pacientes con enfermedad de Chagas, en donde no se observan manifestaciones por signos o síntomas clínicos de infección por *T. cruzi*. En contraste, los animales sometidos a los tratamientos con ambos con BZ-CMP-FCI, exhibieron ECG sin alteraciones en la conducción atrial e intraventricular. Sin embargo, el 25 % y 33 % de los ratones tratados con BZ-FCI y BZ-CMP-FCI, respectivamente, presentaron arritmias cardíacas. En este sentido, es importante destacar que estas alteraciones fueron leves en comparación con los animales del grupo de INT-FCI.

Tabla 5. 1. Anormalidades observadas, expresadas como porcentaje de animales afectados respecto de la cantidad total de ratones del grupo de animales en estudio.

Grupos de ratones	Anormalidades observadas			No se observaron alteraciones
	Defectos en conducción atrial	Defectos en conducción intraventricular	Arritmias	
NI	0 %	0 %	17 %	83 %
INT	22 %	44 %	77 %	22 %
BZ-FCI	0 %	0 %	25 %	75 %
BZ-CMP-FCI	0 %	0 %	33 %	67 %

El análisis histopatológico de las secciones de corazón, presentado en la Figura 5.12a, mostró que la severidad de las lesiones inflamatorias observadas en el grupo de animales INT (focos inflamatorios en miocardio y epicardio, edema de vasos sanguíneos y disrupción de las fibras miocárdicas) fue mayor que las observadas en los animales tratados. Los corazones de los ratones que recibieron BZ solo o en combinación con CMP en las dosis evaluadas, presentaron menores alteraciones cardíacas incluyendo aislados infiltrados inflamatorios y edemas. En la Figura 5.12b se presenta el índice de inflamación cardíaco. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo INT-FCI y BZ-FCI. Los ratones INT presentaron mayor índice de inflamación que los animales NI ($p < 0,01$). Sin embargo, los ratones infectados y tratados con la combinación de BZ y CMP, presentaron menores infiltrados inflamatorios y edemas que los animales INT-FCI ($p < 0,05$) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas, comparadas con el grupo control de animales NI ($p > 0,05$).

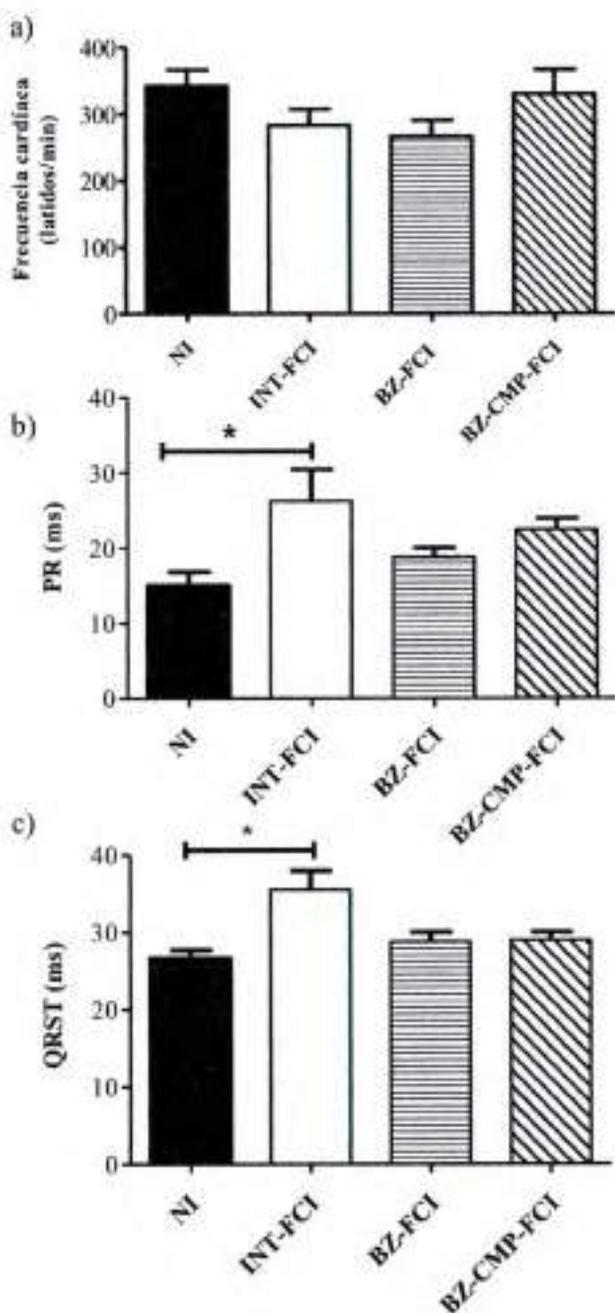


Figura 5.11. Características electrocardiográficas. Los ECG fueron evaluados sobre la base de las variaciones en: a) la frecuencia cardíaca monitoreada por latidos/minuto, b) intervalo PR e c) intervalo QT, ambos intervalos medidos en milisegundos (ms). Los asteriscos indican que las diferencias entre los grupos evaluados fueron significativas ($p < 0,05$).

Se puede evidenciar que, no se observaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, los ratones tratados con la combinación de BZ y CMP, presentan menor índice de inflamación cardíaco, respecto de los animales INT ($p < 0,05$) y una tendencia a menor daño, comparado con BZ-FCI (Figura 5.12b).

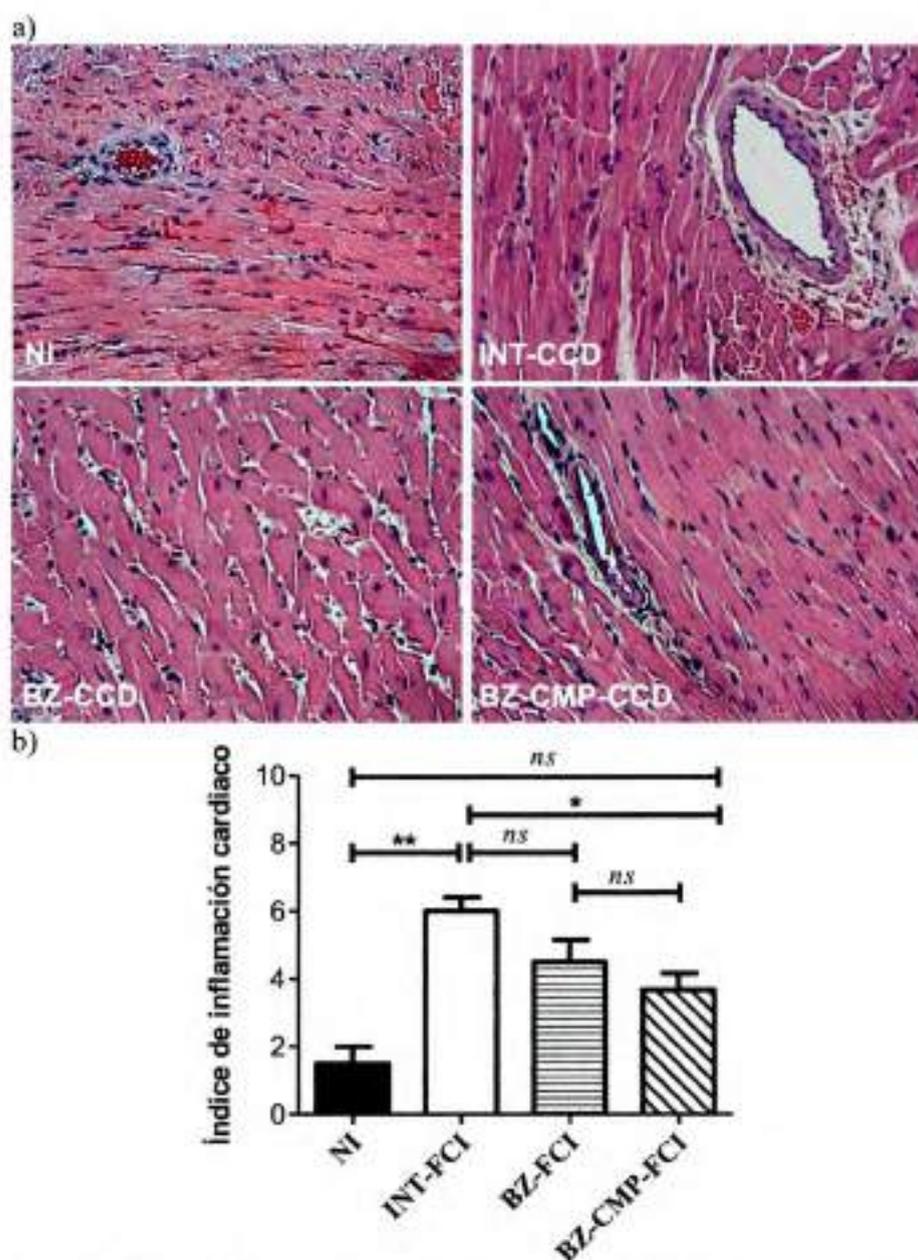


Figura 5.12. Efectos de BZ solo y en combinación con CMP en la infección crónica por *T. cruzi*.

a) Histología cardíaca de los animales en estudio, luego de la tinción con H-E. b) Índice inflamatorio del tejido cardíaco. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$) y *ns* indica diferencia no significativa.

En lo que refiere a la PCR en tiempo real, se observó que los animales INT-FCI presentaron una carga parasitaria cardíaca significativamente mayor que los animales tratados con BZ-CMP-FCI ($p < 0,05$). Además, los ratones tratados con BZ-FCI no presentaron niveles detectables de ADN parasitario en tejido cardíaco (Figura 5.13).

Al considerar todos los resultados presentados hasta el momento, se observa que, la reducción de la dosis de BZ en combinación con una baja dosis de CMP (que no presentaría efectos importantes a nivel del sistema nervioso central, por estar en dosis

subterapéuticas como antidepresivo), sería de gran utilidad para reducir significativamente la carga parasitaria en tejido cardíaco, con la ventaja de que este tratamiento presentaría menores efectos adversos asociados al uso de BZ.

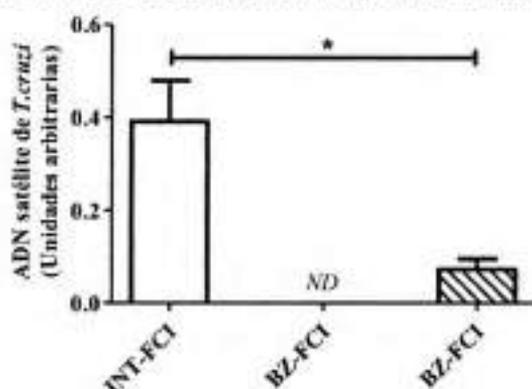


Figura 5.13. ADN parasitario determinado por PCR en tiempo real en tejido cardíaco. El asterisco indica diferencia significativa entre los grupos comparados ($p < 0,05$) y ND indica que no se detectaron parásitos en tejido cardíaco, con la metodología empleada.

5.3.4. Estudio de hepatotoxicidad *in vivo*

Sobre la base de los resultados obtenidos, con los estudios realizados en el modelo experimental de infección aguda de la enfermedad de Chagas y, al tomar en consideración que uno de los principales efectos adversos de BZ es su intolerancia hepática o hepatotoxicidad; se propuso evaluar *in vivo* el efecto de BZ sobre el hígado en la dosis de referencia (100 mg/kg/día) (BZ-H) y en la combinación de BZ y CMP que se consideró óptima, de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios en fase aguda y crónica de infección experimental con *T. cruzi*; es decir, BZ en dosis de 25 mg/kg/día en combinación con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día (BZ-CMP-H).

Este ensayo, se realizó por medio de la administración por vía per-oral de los F. Un grupo de animales NI, fue mantenido como control y recibió sólo agua, administrada por la misma vía. El tratamiento se realizó durante 14 días y, posteriormente, se realizó el registro de peso del hígado y se determinaron los niveles plasmáticos de la enzima GPT como biomarcador específico de daño a nivel hepático (Davies et al., 2014).

El análisis del peso relativo del hígado evidenció que los tratamientos con BZ-H o BZ-CMP-H no presentaron diferencias respecto del grupo de animales control ($p > 0,05$) (Figura 5.14).

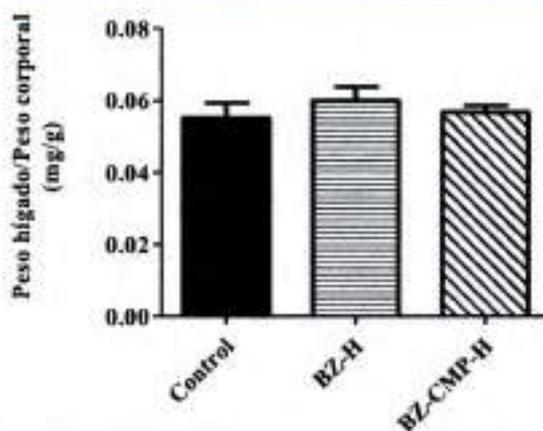


Figura 5.14. Efectos de BZ solo y en combinación con CMP sobre el peso del hígado en animales no infectados.

El análisis de la actividad enzimática de GPT, permitió evidenciar que los ratones sometidos a ambos tratamientos, presentaron mayores niveles de actividad de esta enzima comparación con el grupo control ($p < 0,01$ para BZ-H y $p < 0,05$ para BZ-CMP-H). Adicionalmente, el tratamiento con BZ-H presenta mayores niveles de GPT comparado con BZ combinado con bajas dosis de CMP (BZ-CMP-H). Si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, dada la gran desviación estándar de los resultados obtenidos, se puede observar una mayor tendencia al daño hepático con el tratamiento BZ-H, en comparación con BZ-CMP-H. (Figura 5.15).

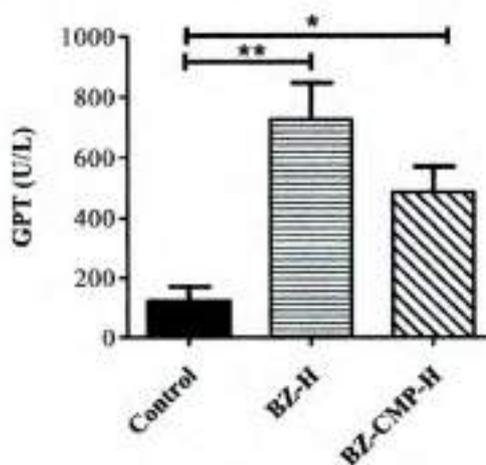


Figura 5.15. Niveles de la actividad de la enzima GPT en plasma. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$)



PARTE II: ESTUDIO DE LOS SISTEMAS PORTADORES DE BZ Y CMP

5.4. Materiales y Métodos

5.4.1. Materiales

5.4.1.1. Sistemas portadores de BZ y CMP

Los F utilizados para el desarrollo de los sistemas portadores fueron BZ y CMP. Estos F fueron incorporados en sistemas potadores basados en PE, con propiedades de liberación modificada, de acuerdo con el detalle presentado en el capítulo 4 *Sistemas portadores de BZ y CMP*.

En particular, para el estudio *in vivo* de los sistemas portadores, se seleccionaron los sistemas: EuE-EuL-BZ^a, EuE-EuL-BZ^{ba} y EuL-CMP₅₀. Éstos fueron seleccionados sobre la base de las propiedades que exhibieron, las cuales fueron presentadas y discutidas en el capítulo precedente (capítulo 4). Además, se tuvo en cuenta la facilidad de preparación y obtención de los sistemas portadores y la reproducibilidad del proceso.

En el caso de los sistemas portadores de BZ, se trabajó con la combinación de dos sistemas de liberación modificada (SLM), es decir, se obtuvo un sistema multiparticulado, compuesto por EuE-EuL-BZ^a y EuE-EuL-BZ^{ba}. En función de la dosis necesarias de BZ, se hicieron los cálculos correspondientes para que un 25 % de la dosis total fuera aportada por el sistema EuE-EuL-BZ^a y el 75 % restante, por el sistema EuE-EuL-BZ^{ba}, de acuerdo con las propiedades de liberación exhibidas por estos sistemas; en donde el primero, libera el BZ en forma muy rápida, en tanto que, el segundo, lo hace en forma modulada, tal como fue detallado en el capítulo 4.

5.4.1.2. Animales

De acuerdo con el detalle descripto en el apartado 5.2.1.3, los animales utilizados fueron ratones BALB/c machos de tres meses de edad y (24 ± 3) g de peso corporal, criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas.

5.4.2. Ensayos *in vivo* en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*

Para los estudios *in vivo* en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, los ratones BALB/c fueron inoculados, por vía intraperitoneal, con 10³ trypomastigotes del *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y 24 h post-infección se inició el tratamiento con los



sistemas portadores de BZ y CMP. En todos los casos, los tratamientos fueron administrados diariamente, mediante sonda, por vía per-oral. Previo a la administración, los sistemas portadores fueron dispersados en 30 μ L de agua esterilizada. Los animales fueron divididos en 4 grupos de n=6 y ratones NI e INT fueron utilizados como control.

5.4.2.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo el ensayo con los sistemas portadores de BZ y CMP, los animales fueron organizados en los siguientes grupos: NI, INT, infectados y tratados solo con la combinación de SLM de BZ, en dosis de 100 mg/kg de peso corporal/día (SLM BZ) e infectados y tratados con la combinación de los SLM de BZ en dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día y el SLM de CMP en dosis de 7,5 mg/kg de peso corporal/día (SLM BZ-CMP).

5.4.3. Parasitemia y análisis de la sobrevida de los animales

Se realizó de acuerdo con el detalle metodológico presentado en la sección 5.2.6.

5.4.4. Marcadores bioquímicos de daño en tejidos

Para el análisis de los marcadores bioquímicos, se llevó a cabo la metodología descrita en el apartado 5.2.8.

5.4.5. Análisis estadístico

Al igual que en los estudios reportados en la *Parte I*, se realizó el análisis de la significancia estadística para comparar las diferentes condiciones experimentales evaluadas. Se asumió una distribución normal de los datos obtenidos y se realizó la comparación de las medias (por medio del *test* de *t-Student* de dos colas) y el análisis de varianza (por medio de ANOVA de una vía) seguido de *post-test* de Bonferroni. Los datos fueron procesados y analizados de acuerdo con el detalle presentado en el apartado 5.2.12.

5.5. Resultados

Para la evaluación *in vivo* de la eficacia y seguridad de los sistemas portadores de BZ y CMP, diferentes grupos de ratones recibieron, diariamente y por vía per-oral, las dosis de BZ y CMP que se seleccionaron como óptimas en los estudios de los F puros, descritos en la *Parte I* de este capítulo, y se compararon con BZ, en la dosis



de referencia, contenido en el SLM. A los ratones INT y NI, se les administró agua por vía oral. Luego de 15 dpi, se determinaron la parasitemia y los marcadores bioquímicos de daño hepático y cardíaco. Estos estudios fueron realizados para evaluar la eficacia tripanocida y la seguridad de cada tratamiento, respectivamente.

Todos los grupos de animales mostraron una sobrevida del 100 % en las condiciones evaluadas. En la Figura 5.16 se puede observar que ambos tratamientos lograron anular la parasitemia, es decir, tanto el SLM de BZ en la dosis de referencia y el sistema que contiene la combinación del SLM de BZ en dosis de 25 mg/kg/día en asociación con el SLM de CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día, logran la muerte de 100 % de los parásitos en sangre, lo cual es indicativo de eficacia terapéutica.

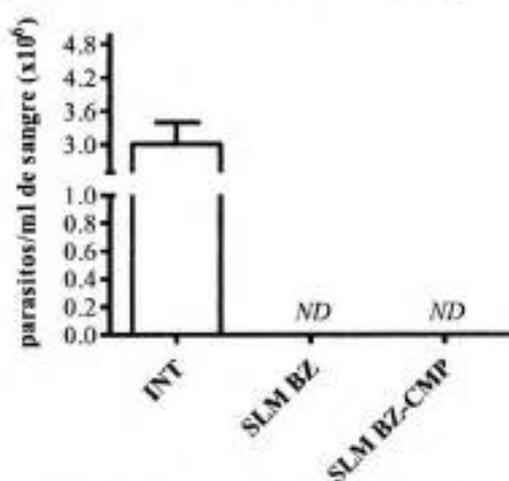


Figura 5.16. Efectos de los SLM de BZ y CMP sobre la parasitemia de los ratones BALB/c infectados. ND significa que no se detectaron parásitos en sangre.

Con relación a los niveles de la actividad plasmática de las enzimas CKMB respecto de CK total, se observó que los animales tratados con el SLM de BZ en dosis de referencia, presentó una actividad enzimática significativamente mayor que el grupo de ratones tratados con la combinación de los SLM de BZ y CMP ($p < 0,05$). Además, el SLM de BZ en dosis de 100 mg/kg/día presentó mayor actividad comparado con los animales NI e INT ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 5.17a). En lo que refiere a la relación entre los niveles de actividad plasmática de GOT y GPT, expresado como índice de Ritis, no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p > 0,05$) (Figura 5.17b).

Además, si se comparan estos resultados con los respectivos tratamientos con los F puros, se puede observar que, el tratamiento con los sistemas portadores presenta una menor tendencia a daño hepático, principalmente, en el tratamiento con la combinación de BZ y CMP.

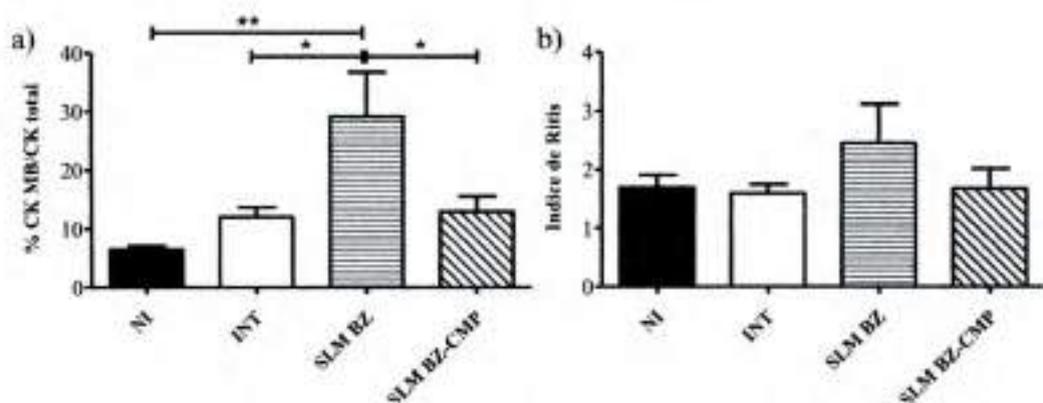


Figura 5.17. Efecto de los SLM de BZ y CMP en las dosis óptimas de combinación y dosis de referencia sobre la relación de los niveles de enzimas cardíacas y hepáticas. a) Relación porcentual entre CK MB y CK total. Los asteriscos indican diferencia significativa entre los grupos comparados (** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$). b) Índice de Ritis. Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.

5.6. Discusión

En la primera parte de estos estudios (*Parte I*), se confirmó que CMP sinergiza la actividad tripanocida de BZ y que las bajas dosis de BZ empleadas en el tratamiento, mejoran el resultado de la cardiomiopatía chagásica experimental. En este sentido, los ratones infectados con la cepa Tulahuen de *T. cruzi* y tratados diariamente por vía per-oral con BZ en dosis de 25 mg/kg/día en asociación con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día, a partir de las 24 h post-infección, presentan menor severidad de la infección y de las lesiones en el tejido cardíaco, comparados con los ratones tratados con el BZ a la dosis de referencia (BZ 100 mg/kg/día). Además, cabe destacar que, tanto los tratamientos con los F puros, como con los respectivos sistemas portadores, presentan eficacia terapéutica, evidenciada por la anulación de la parasitemia.

Como se ha mencionado, la enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida que afecta áreas empobrecidas, es decir, regiones en donde las condiciones socioeconómicas son desfavorables, en particular, de los países en vías de desarrollo. Como se describió, la farmacoterapia actual, está basada solo en dos agentes terapéuticos, NFX y BZ, los cuales están recomendados durante la fase aguda de la enfermedad, en la fase crónica temprana y en los casos de recidiva (Coura & de Castro, 2002; J. Urbina, 2010; J. Urbina & Docampo, 2003; Von, Zaragoza, Jones, Rodríguez-Morales, & Franco-Paredes, 2007). Sin embargo, menos del 1 % de las personas infectadas con el *T. cruzi* reciben el tratamiento adecuado (Ribeiro et al., 2009).



En particular, se ha demostrado que el tratamiento con BZ presenta eficacia tripanocida *in vitro* e *in vivo* (Coura & de Castro, 2002; J. Urbina, 2010; Von et al., 2007), pero los graves y serios efectos adversos que produce, condicionan su uso, fundamentalmente, en la fase crónica. Si bien se utiliza clínicamente, su uso en la fase crónica de la enfermedad es aún controvertido (Rassi et al., 2010).

La evaluación del efecto tripanocida del tratamiento con BZ, en pacientes con cardiomiopatía chagásica, fue recientemente reportado y evaluado mediante el ensayo clínico BENEFIT (Morillo et al., 2015). Después de 5 años de seguimiento, los resultados frente al tratamiento con BZ, evidenciaron que es poco probable lograr un efecto preventivo, en la progresión de la enfermedad cardíaca, en pacientes con infección por enfermedad de Chagas avanzada. Por otra parte, se ha informado una alta tasa de abandono al tratamiento, por parte de los pacientes, especialmente durante la fase crónica, debido a la alta incidencia de efectos adversos producidos por BZ, los cuales se presentan con mayor frecuencia y severidad en los adultos mayores de 18 años, en comparación con los niños (Pinazo et al., 2010; J. Urbina & Docampo, 2003). En consecuencia, la enfermedad de Chagas continúa siendo un serio problema de salud pública, debido, principalmente, a la ausencia de alternativas farmacoterapéuticas más eficientes para su tratamiento y la falta de diagnósticos precoces, en pos de evitar la progresión de la enfermedad.

El desarrollo de nuevos enfoques farmacoterapéuticos específicos para esta enfermedad, también ha estado limitado en su progresión, durante décadas, debido a las controversias existentes con relación a su patogénesis. Aunque el rol del *T. cruzi* en la fase aguda de la patología y la importancia del tratamiento etiológico en esta fase de la enfermedad ha sido ampliamente aceptado y demostrado, numerosas investigaciones han manifestado en sus explicaciones la implicancia de los fenómenos autoinmunes, como la principal razón de la inflamación persistente, asociada a las manifestaciones patológicas crónicas. En este sentido, el tratamiento antiparasitario en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas se considera irrelevante y es uno de los motivos de la controversia de su uso (Ribeiro et al., 2009; J. A. Urbina, 2015). El nuevo paradigma indica, en cambio, que la erradicación del parásito debe ser un requisito previo para detener la evolución de la enfermedad de Chagas y, en consecuencia, debe ser tratada primariamente como una condición infecciosa, no autoinmune (Coura & Borges-Pereira, 2012; Tarleton, Gürtler, Urbina, Ramsey, & Viotti, 2014; J. Urbina, 2010).



Por esta razón, en las últimas dos décadas, se encuentran bajo investigación nuevos enfoques, que se centran en blancos específicos del parásito para tratar esta enfermedad y en diferentes estrategias farmacoterapéuticas, con el objetivo de encontrar la cura para la enfermedad de Chagas.

Tal como se ha descripto, este trabajo de tesis, se focalizó en la enzima tripanotiona reductasa, un enzima específica del *T. cruzi*, que desempeña funciones vitales en el parásito, y en el antidepresivo tricíclico CMP, que presenta actividad inhibitoria demostrada contra esta enzima (Gobbi et al., 2010).

Los resultados obtenidos indican que CMP puede mejorar la efectividad de BZ y, en consecuencia, la combinación terapéutica de ambos F permitiría la utilización de menores dosis de BZ, con una disminución concomitante de los efectos adversos asociados a su uso. Cabe destacar que, CMP se está utilizando en dosis que serían subterapéuticas, respecto de las indicadas frecuentemente para su acción a nivel central. Un cálculo aproximado permite determinar que se requieren dosis < 30 %, de las que actualmente se utilizan como antidepresivo (Adli, Baethge, Heinz, Langlitz, & Bauer, 2005). Además, resulta de relevancia destacar que, la utilización de CMP como F tripanocida, implicaría un uso "off label" de ésta (Stafford, 2008), ya que no se encuentra aprobada o descripta por la autoridad sanitaria con este fin terapéutico.

En lo que respecta a los estudios *in vivo*, se llevaron a cabo diferentes diseños experimentales para estudiar la eficacia y seguridad en la fase aguda y crónica de la enfermedad en modelos murinos de Chagas experimental. Primero se seleccionaron diferentes dosis de BZ, solo y en combinación con CMP a dosis fija. Los resultados obtenidos con el primer diseño experimental permitieron seleccionar 25 mg/kg/día como una dosis eficaz de BZ en combinación con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día. Esta combinación de F, logra anular la parasitemia, al igual que la dosis de referencia de BZ, e induce una significativa disminución del peso relativo de los bazos, en comparación con los ratones infectados no tratados ($p < 0,001$). La importancia de la medición del peso de los bazos, radica en que éstos son órganos que dan cuenta de un proceso inflamatorio en el organismo. Estos resultados, se encuentran en relación con un trabajo previamente publicado en donde se utiliza BZ en dosis de 50 mg/kg/día administrado por vía per-oral, en combinación con CMP en dosis de 5 mg/kg/día administrada por vía intraperitoneal (Strauss et al., 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis resultan de mayor relevancia, desde una perspectiva clínica, debido a que la vía intraperitoneal no es una vía que se utilice frecuentemente en humanos (Chaudhary, Haddadin, Nistala, & Papageorgio, 2010; Quantc, Thatc-



Waschke, & Schofer, 2012). Por el contrario, la utilización de la vía per-oral, que es la que se ha seleccionado en los estudios descriptos, ha permitido obtener resultados alentadores, no sólo por ser la vía de administración de mayor aceptación para los tratamientos, sino también, porque la dosis de BZ que logra anular la parasitemia, cuando se lo combina con CMP, es de 25 mg/kg/día, es decir, el 50 % de lo que está reportado por Strauss (2013).

Con el objetivo de determinar la mínima dosis de CMP necesaria para utilizar en combinación con 25 mg/kg/día de BZ y anular la parasitemia, es decir, que presentara eficacia terapéutica, se realizó el segundo diseño experimental. En éste, se utilizaron diferentes dosis de CMP en combinación con BZ a dosis fija de 25 mg/kg/día. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que CMP en dosis de 5 mg/kg/día combinada con BZ logra anular la parasitemia. Sin embargo, esta combinación exhibe un mayor porcentaje de enzimas CKMB respecto de CK total, la cual incluso es mayor que en los animales INT (Kindermann et al., 2012). Si bien no se ha explicado la razón de este comportamiento, evidentemente el daño a nivel cardíaco es considerable, motivo por el cual se seleccionó la dosis de 7,5 mg/kg/día en combinación con BZ en dosis de 25 mg/kg/día, como la óptima combinación para realizar los estudios posteriores.

Al considerar los efectos secundarios de BZ, en particular su intolerancia hepática y hepatotoxicidad (Davies et al., 2014; Valdez et al., 2012), se decidió evaluar la toxicidad de ambos F en las dosis de combinación seleccionadas y compararlas con el BZ en la dosis de referencia (100 mg/kg/día). Se pudo evidenciar que, incluso cuando las diferencias entre los parámetros evaluados (peso relativo del hígado y niveles de GPT en plasma) no fueron estadísticamente significativas, ambos tratamientos mostraron un incremento de los niveles de GPT en plasma, en comparación con el grupo control que no recibió tratamiento. Como se esperaba y, tal como ha sido reportado en la literatura, BZ produce alteraciones hepáticas por sí mismo (Davies et al., 2014), mientras que la presencia de CMP parece no inducir alteraciones e injurias hepáticas adicionales (Strauss et al., 2013). Además, la posibilidad de poder reducir las dosis de BZ al combinarlo con CMP, estarían en concordancia con la hipótesis de que se podría lograr la eficacia tripanocida y reducir los efectos adversos, a nivel hepático, asociados al uso de BZ.

Con el fin de determinar el impacto del tratamiento en la fase crónica de la infección, se decidió llevar a cabo la administración de los F en las dosis de combinación seleccionadas y se comparó con el BZ solo en dosis de 100 mg/kg/día.



Los resultados demostraron que, aunque la combinación de F es eficaz para anular la parasitemia (parásitos en sangre), el análisis por PCR en tiempo real, evidencia la presencia de ADN parasitario en el tejido cardíaco de los ratones infectados, a los 90 dpi, luego del tratamiento con la combinación de CMP y BZ. Estos resultados sugieren la necesidad de realizar un tratamiento más prolongado, para lograr la ausencia de parásitos en tejido cardíaco, tal como fue observado en el tratamiento con BZ a la dosis de referencia. Varios estudios terapéuticos muestran que la PCR es una herramienta útil para evaluar la detección temprana del fracaso del tratamiento en las fases agudas y crónicas de la enfermedad de Chagas (Caldas et al., 2012; Zulantay et al.). En este sentido, los resultados obtenidos enfatizan la importancia de evaluar la carga parasitaria por PCR en tiempo real, como un método preciso para medir el impacto de los F tripanocidas durante el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Varios estudios han demostrado que la farmacoterapia con BZ produce una disminución de las lesiones y disfunciones cardíacas durante la fase crónica de la infección con *T. cruzi* (Viotti et al., 2006). Es este trabajo, se ha demostrado que el tratamiento con CMP combinada con bajas dosis de BZ disminuye la inflamación cardíaca y mejora el pronóstico de la cardiomiopatía crónica, en comparación con la dosis de referencia de BZ.

Adicionalmente, con el fin de poder evaluar los sistemas portadores desarrollados conteniendo BZ y CMP, se llevó a cabo un estudio *in vivo*, con el mismo diseño experimental que el utilizado para evaluar los F solos. Para esto, se seleccionaron los sistemas portadores de BZ y de CMP, teniendo en cuenta sus propiedades farmacotécnicas y biofarmacéuticas, y las dosis que se seleccionaron como óptimas a partir de los resultados obtenidos con los F puros. Se pudo evidenciar que, estos sistemas, en las condiciones evaluadas, logran anular la parasitemia, es decir, presentan eficacia terapéutica, lo que se encuentra en línea con los resultados que se obtuvieron al evaluar los F solos o en combinación, en las mismas dosis.

En lo inherente a la seguridad en el tratamiento, los SLM desarrollados no presentaron diferencias estadísticamente significativas en lo que refiere a la intolerancia hepática o hepatotoxicidad ($p > 0,05$). Sin embargo, presentan una menor tendencia a daño a nivel hepático, en comparación con los F solos en las mismas dosis. Además, el sistema que contiene la combinación de los SLM de BZ y de CMP, presentó menor alteración a nivel cardíaco, evidenciado por una menor actividad de la enzima CK MB respecto de CK total, en comparación con el SLM de BZ ($p < 0,05$). Este resultado permitiría establecer que el sistema que contiene la combinación de los



SLM de BZ y CMP sería una opción superadora al tratamiento convencional con BZ, no sólo porque presenta una eficacia terapéutica óptima, sino también porque le confiere a la terapia una mayor seguridad.

En resumen, los resultados obtenidos son muy alentadores; sin embargo, sería necesario confirmarlos mediante estudios preclínicos en animales de mayor tamaño, cuyos resultados puedan ser extrapolados, de una manera más directa, a los humanos. Adicionalmente, cabe destacar que la extrapolación *in vitro-in vivo* realizada, entre los resultados obtenidos por el *checkerboard* y los estudios *in vivo* de eficacia y seguridad, ha sido de utilidad para acotar los rangos de dosis a evaluar *in vivo*. Además, se pudo reducir al 25 % la dosis de BZ de referencia, cuando se lo combina con CMP en dosis de 7,5 mg/kg/día y mantener la eficacia tripanocida, con una mejora significativa de la seguridad del tratamiento. En este sentido, la consideración de los parámetros farmacocinéticos de BZ y CMP, la volemia de los ratones y la aproximación alométrica realizada, junto con los estudios *in vitro* en cultivos celulares, son herramientas de gran utilidad al momento de llevar a cabo estudio *in vivo*, ya que permiten reducir la cantidad de animales de experimentación necesarios para los estudios.

5.7. Conclusiones parciales

La actividad tripanocida sinérgica de CMP combinada con BZ, demostrada a partir de estudios *in vitro* y confirmada mediante los estudios *in vivo* presentados, claramente evidencia una potencial utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que permitiría utilizar dosis más bajas y eficaces de BZ con una mayor seguridad en el tratamiento farmacoterapéutico. Claramente, la alianza de los F, aprovecha el mecanismo de acción independiente de cada uno y, la acción combinada de éstos, muestra un sinérgismo en la actividad tripanocida.

Los SLM desarrollados presentan eficacia terapéutica y la combinación de los sistemas portadores de BZ y CMP permite lograr una mayor seguridad en la terapia. De este modo, los sistemas portadores desarrollados, además de presentar propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y biofarmacéuticas adecuadas, permiten una mayor eficacia y seguridad en el tratamiento y se constituyen en una alternativa farmacoterapéutica interesante para ser empleada en la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.



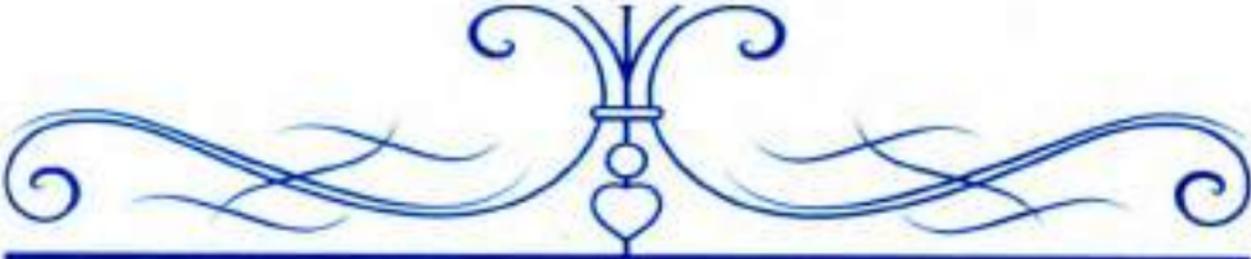
5.8. Referencias

- Adli, M., Baethge, C., Heinz, A., Langlitz, N., & Bauer, M. (2005). Is dose escalation of antidepressants a rational strategy after a medium-dose treatment has failed? *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 255(6), 387-400.
- Aoki, M., Carrera-Silva, E., Cuervo, H., Fresno, M., Girones, N., & Gea, S. (2012). Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Parasitol Res*, 2012, 1-13.
- Botros, M., & Sikaris, K. A. (2013). The De Ritis Ratio: The Test of Time. *The Clinical Biochemist Reviews*, 34(3), 117-130.
- Caldas, S., Caldas, I., Diniz Lde, F., Lima, W., Oliveira Rde, P., Cecilio, A., . . . Bahia, M. (2012). Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop*, 123(3), 170-177.
- Castro, J., & Diaz de Toranzo, E. (1988). Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed Environ Sci*, 1(1), 19-33.
- Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C., & Carlier, Y. (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome(R) in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*, 40(6), 527-532.
- Coura, J., & Borges-Pereira, J. (2012). Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296.
- Coura, J., & de Castro, S. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Chaudhary, K., Haddadin, S., Nistala, R., & Papageorgio, C. (2010). Intraperitoneal drug therapy: an advantage. *Current clinical pharmacology*, 5(2), 82-88.
- Davies, C., Dey, N., Negrette, O., Parada, L., Basombrio, M., & Garg, N. (2014). Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethylnitrofurazone: a comparison with Benznidazole. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), 1-12.
- Gobbi, P., Baez, A., Presti, M. S. L., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R., . . . Rivarola, H. W. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, 107(5), 1279-1283.
- Kindermann, L., Barth, C., Mahfoud, F., Ukena, C., Lenski, M., Yilmaz, A., . . . Böhm, M. (2012). Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 59(9), 779-792.
- Lo Presti, M., Bazan, P., Strauss, M., Baez, A., Rivarola, H., & Paglini-Oliva, P. (2015). Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop*, 145, 79-87.
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., & Loscalzo, J. (2011). Electrocardiografía. In Harrison (Ed.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (18^o ed.). Nueva York.
- Maguire, J. H. (2015). Treatment of Chagas' Disease—Time Is Running Out. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1369-1370.
- Martin, D., Postan, M., Lucas, P., Gress, R., & Tarleton, R. (2007). TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*, 37(10), 2764-2771.
- Maya, J., Cassels, B., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M., Galanti, N., . . . Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146(4), 601-620.
- Morillo, C., Marin-Neto, J., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., . . . Yusuf, S. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 373(14), 1295-1306.

- Morton, D., & Muriana, J. M. O. (2002). *Refinando los procedimientos para la administración de sustancias*: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio.
- Pinazo, M., Muñoz, J., Posada, E., Lopez-Chejade, P., Gallego, M., Ayala, E., . . . Gascon, J. (2010). Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11), 4896-4899.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergès, M., . . . Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*, 103(3), 195-200.
- Postan, M., Bailey, J., Devorak, J., McDaniels, J., & Pottala, E. (1987). Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 37(3), 541-559.
- Quante, M., Thate-Waschke, I., & Schofer, M. (2012). What are the reasons for patient preference? A comparison between oral and subcutaneous administration. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 150(4), 397-403.
- Rassi, A. J., Rassi, A., & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Ribeiro, I., Sevesik, A.-M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harbay, M. O., . . . Pecoul, B. (2009). New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), 1-6.
- Rojó, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., . . . Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Trop*, 132, 112-118.
- Stafford, R. S. (2008). Regulating off-label drug use—rethinking the role of the FDA. *New England Journal of Medicine*, 358(14), 1427-1429.
- Strauss, M., Lo Presti, M., Bazan, P., Baez, A., Fauro, R., Esteves, B., . . . Rivarola, H. (2013). Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int*, 62(3), 293-299.
- Tarleton, R. L., Gürtler, R. E., Urbina, J. A., Ramsey, J., & Viotti, R. (2014). Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3219. doi: 10.1371/journal.pntd.0003219
- Thermo Fisher Scientific Products. (2015). Trizol reagent. Retrieved 15st September, 2015, from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
- Urbina, J. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- Urbina, J. A. (2015). Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 149-156. doi: 10.1111/jeu.12184
- Valdez, R., Tonin, L., Ueda-Nakamura, T., Silva, S., Dias Filho, B., Kaneshima, E., . . . Nakamura, C. (2012). In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1), 507-512.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M., . . . Armentí, A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*, 144(10), 724-734.
- Von, A., Zaragoza, E., Jones, D., Rodriguez-Morales, A. J., & Franco-Paredes, C. (2007). New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2), 99-111.
- Workman, P., White, R., Walton, M., Owen, L., & Twentyman, P. (1984). Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *British journal of cancer*, 50(3), 291.



- Yoo, S. D., Yoon, B. M., Lee, H. S., & Lee, K. C. (1999). Increased bioavailability of clomipramine after sublingual administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(11), 1119-1121.
- Zulantay, I., Honores, P., Solari, A., Apt, W., Ortiz, S., Osuna, A., . . . Sanchez, G. (2004). Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48, 253-257.



CAPÍTULO 6:

FORMULACIONES PEDIÁTRICAS DE BZ



Capítulo 6:

Formulaciones pediátricas de BZ

El presente capítulo se encuentra estructurado en dos partes con el objetivo de presentar, de manera separada, los conocimientos generados con relación a las formulaciones pediátricas desarrolladas.

La parte I versa sobre el desarrollo y la caracterización de una formulación líquida para uso oral, específicamente una suspensión extemporánea de BZ formulada a partir de los comprimidos comerciales disponibles, con utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en los pacientes pediátricos y neonatales.

La parte II versa sobre el estudio de formulaciones masticables sólidas y semisólidas, para la vía oral, formuladas a partir del BZ extraído y purificado desde los comprimidos comerciales. En esta sección se presenta el desarrollo y la caracterización de comprimidos masticables e hidrogeles azucarados masticables conteniendo BZ en dosis pediátricas, de utilidad para el tratamiento de la población infantil.

En ambas partes, se ha trabajado con el énfasis centrado en dar respuesta a la falta de medicamentos adecuados, en dosis y forma farmacéutica, para el tratamiento de los pacientes pediátricos y neonatales, y en atender esta demanda insatisfecha de la falta de disponibilidad.

La introducción que se presenta a continuación es común a ambas partes, debido a que pone en énfasis la importancia de abordar la farmacoterapia pediátrica de la enfermedad de Chagas. Así como también, las contribuciones que se pueden realizar desde el área de la farmacotecnia hospitalaria, en lo que refiere al desarrollo de formulaciones extemporáneas.

6.1. Introducción

La enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud pública en América Latina, no sólo para los adultos, sino también para la población pediátrica y se estima que hay más de 8 millones de personas infectadas mundialmente, con más de 300.000 casos nuevos cada año (Campi-Azevedo et al., 2015; Moncayo & Silveira, 2009; Schofield, Jannin, & Salvatella, 2006; World Health Organization, 2015a).



A pesar de casi un siglo de investigaciones en curso dirigidas a superar la problemática en relación con la enfermedad de Chagas, ésta sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en América Latina, por enfermedades cardiovasculares asociadas a ésta (Chagas, 1909; Engels & Savioli, 2006). La OMS considera a la enfermedad de Chagas como una enfermedad desatendida silenciosa y crónica (World Health Organization, 2002).

Si bien la transmisión vectorial del parásito *T. cruzi* es la principal forma de contagio, las infecciones congénitas o mediante transfusiones sanguíneas se han incrementado notablemente en los últimos años (Carlier & Torrico, 2003; Muñoz, Portús, Corachan, Fumadó, & Gascon, 2007).

En particular, en Argentina se ha detectado un incremento en la prevalencia de la infección congénita, en áreas endémicas y no endémicas, lo que afecta entre el 1 y 10 % de los recién nacidos de madres infectadas (Negrette, Mora, & Basombrió, 2005). Además, se estima que cada año, cerca de 1300 recién nacidos poseen infección congénita y si ésta se detecta tempranamente, la enfermedad de Chagas puede ser tratada y curada (Carlier & Torrico, 2003; Carlier et al., 2011; Schijman et al., 2003). Específicamente, 9 de cada 10 niños tratados en la fase aguda y 7 de cada 10 niños tratados en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, son curados con éxito, lo que permite evitar la progresión de la enfermedad (Carlier et al., 2011).

En este contexto, resulta de relevancia destacar que los medicamentos producidos a nivel industrial, antes de ser comercializados, son regulados para aportar una información completa que demuestre su seguridad, eficacia y confiabilidad; lo cual proporciona garantías de calidad a los pacientes consumidores. No obstante, la industria farmacéutica funciona bajo las leyes del libre mercado, lo que conduce a situaciones particulares, como es el caso de ciertas formas farmacéuticas pediátricas, especialmente las de administración por vía per-oral, donde existe una problemática relacionada con la rentabilidad de su producción, hecho que conduce a que éstas no se encuentren disponibles en el mercado.

La carencia de formulaciones farmacéuticas de administración por vía per-oral con dosis pediátricas, de F de probada acción terapéutica, genera una preocupación importante, tanto para los profesionales de la salud, como para padres o tutores de los pacientes pediátricos, que necesitan ser tratados farmacológicamente.

Como se describió en el capítulo 1 *Introducción general y objetivos*, BZ es el F de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero sólo se encuentra



disponible bajo la forma de comprimidos convencionales Abarax[®], que contienen BZ en dosis de 50 y 100 mg (Maya et al., 2010). Debido que el BZ presenta una baja solubilidad acuosa, se dificulta su formulación oral bajo la forma de solución y, desafortunadamente, no hay disponibles formas farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de los pacientes pediátricos y neonatales (García, Manzo, & Jimenez-Kairuz, 2015).

Por lo tanto, los pacientes que no son capaces de deglutir (tragar) medicamentos sólidos, como ser los recién nacidos, lactantes, niños y ancianos, no disponen de formas farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de su enfermedad y, en consecuencia, pueden presentar una necesidad especial para recibir la farmacoterapia adecuada (Sosa-Estani, Belizan, Althabe, & Rubinstein, 2005). En este sentido, para el tratamiento de la población pediátrica con enfermedad de Chagas, los comprimidos son divididos, triturados y molidos en los servicios de farmacia hospitalaria, para dispensarse en sobres de papel, que luego se dispersan en jugo de fruta o leche para ser administrados en los pacientes. Esta situación, puede provocar algunas consecuencias no deseadas, tales como la incorrecta dosificación, disolución incompleta o riesgos de desarrollar mayores efectos secundarios, que condicionan la eficacia y seguridad del tratamiento (Sosa-Estani et al., 2005; Yeung & Wong, 2005).

Si bien en los últimos años se han reportado en la literatura varios enfoques para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, tales como: soluciones líquidas con cosolventes o suspensiones (Lamas et al., 2006; Manarin et al., 2013), liposomas (M. Morilla, Benavidez, Lopez, Bakas, & Romero, 2002; M. J. Morilla, Prieto, & Romero, 2005), micropartículas (Leonardi, Salomón, Lamas, & Olivieri, 2009) y nanopartículas (Romero & Morilla, 2010); todos éstos se encuentran en etapas tempranas de desarrollo y entre los gobiernos y la industria farmacéutica se ha establecido una baja prioridad para financiar el desarrollo de nuevas formas de dosificación adecuadas para el tratamiento de esta infección protozoaria en los niños pequeños (Ribeiro et al., 2009).

Para cubrir este vacío terapéutico, es necesario acudir al desarrollo galénico de formulaciones extemporáneas, que faciliten la administración de medicamentos a pacientes prematuros, recién nacidos y niños pequeños.

Por su parte, desde el área de la farmacotecnia hospitalaria se propone dar respuesta a diferentes problemáticas vinculadas a la falta de disponibilidad de medicamentos adecuados, para pacientes específicos. En este sentido, a pesar de los profundos cambios que se han producido en los últimos años en el modo de



elaboración de las formas farmacéuticas, el área de la farmacotecnia constituye una parte fundamental del servicio de farmacia en el ámbito hospitalario.

En general, desde este ámbito, se aspira a satisfacer las demandas de determinados pacientes, que presentan requerimientos específicos para su tratamiento, en cualquier momento y con independencia de las disponibilidades del mercado farmacéutico, de modo tal que se les garantice la provisión de medicamentos en formas farmacéuticas adecuadas a sus necesidades y con un nivel de calidad apropiado (Arias et al., 1992; Herreros de Tejada, 1997). Hasta hace pocos años, atender a esta demanda implicó afrontar la elaboración de la totalidad de los preparados farmacéuticos. Sin embargo, en la actualidad, el desarrollo de la tecnología farmacéutica y, sobre todo, el rigor creciente en cuanto a requerimientos de calidad por parte de la autoridad sanitaria, ha tenido como consecuencia que, en el ámbito hospitalario, la elaboración de medicamentos se circunscriba esencialmente a la preparación de formulaciones no disponibles en el mercado; es decir, las que no son producidas por la industria farmacéutica. Además, se suma la necesidad de la manipulación o readecuación, en condiciones que garanticen la correcta utilización, de las formulaciones suministradas por la industria, para adaptarlas a las necesidades particulares de cada paciente. En consecuencia, dentro de las diversas actividades del área de la farmacotecnia hospitalaria, algunas de estas se circunscriben a la elaboración y control de una serie de formulaciones normalizadas y extemporáneas (Arias et al., 1992).

Por lo expuesto, existen diferentes razones, por las cuales, desde la farmacotecnia hospitalaria, se pueden ofrecer servicios farmacéuticos a la comunidad (Herreros de Tejada, 1997), dentro de los cuales se pueden mencionar:

- La necesidad de adaptaciones de formas farmacéuticas o dosis de medicamentos disponibles comercialmente, a los fines de atender requerimientos específicos de pacientes, en relación con su patología, edad o dificultad en la aplicación de la presentación comercial original.
- La necesidad de un paciente de que se le suministre una formulación no disponible comercialmente, pero que se encuentra descrita en farmacopeas o la bibliografía especializada.
- La prescripción “off label” de un determinado F, para atender una enfermedad para el cual éste no ha sido registrado o descrito por la autoridad sanitaria para dicho uso.



La elaboración de una formulación extemporánea no está exenta de riesgos. Cualquier error en la preparación, puede dar lugar a serias consecuencias, ya sea por riesgos de contaminación microbiológica, problemas de estabilidad del F en la formulación, errores en la dosificación, entre otros. Por este motivo, debe ser realizada y supervisada por un profesional farmacéutico. A su vez, se hace imprescindible la generación de un protocolo para cada uno de los procesos implicados en la preparación, en donde se contemple la aplicación de criterios de calidad en todas y cada una de las operaciones necesarias, lo que incluye el registro de los ingredientes o componentes utilizados en cada preparación, sus cantidades y los respectivos controles de calidad.

La utilización de F codificados en farmacopea, permite la elaboración de formulaciones magistrales¹ seguras, eficaces y de calidad. Como se menciona en el *Anexo 1*, el BZ sólo se encuentra codificado en la Farmacopea Internacional (World Health Organization, 2015b) y, recientemente, se ha aceptado la propuesta elevada para la incorporación de éste en la Farmacopea Argentina.

Dentro de los procesos necesarios a llevar cabo para la elaboración de una formulación extemporánea, se encuentran los estudios de estabilidad y el análisis de los periodos de caducidad de las preparaciones y, además, es necesario establecer el proceso de producción, las condiciones de almacenamiento y las especificaciones para la utilización de la formulación. Los estudios físicos, químicos y microbiológicos actúan como parámetros de control de calidad en la preparación de fórmulas extemporáneas con la seguridad requerida.

Por su parte, las formulaciones líquidas orales de medicamentos destinados a pacientes pediátricos prematuros, neonatos y lactantes, así como de formulaciones masticables para los niños, acompañadas de una adecuada información en el momento de su dispensación, facilitan significativamente su administración y aumentan la seguridad del tratamiento en los pacientes receptores. Además, dada la población etaria a la que están dirigidas, las características organolépticas, en especial el sabor, deben ser parámetros a considerar, en términos de palatabilidad, para propender la aceptabilidad de las formulaciones desarrolladas, por parte de los pacientes (Díez-Gandía et al., 2010).

¹ Se entiende por medicamento magistral a todo medicamento prescripto en una receta magistral para un paciente individualizado, posteriormente preparado, envasado y rotulado por un Farmacéutico en el laboratorio de su Farmacia y dispensado en la misma (Farmacopea Argentina, 2014).



En este contexto y sobre la base de los lineamientos que establece la iniciativa *Drugs for Neglected Diseases* (DNDi), se propuso desarrollar formulaciones pediátricas de BZ, para el tratamiento de la población pediátrica en general, a los fines de dar respuesta a la demanda insatisfecha de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en dosis y formas farmacéuticas adecuadas (Chatelain & Ioset, 2011). De este modo, se aspira a contribuir a la farmacoterapia de medicamentos no disponibles comercialmente y dar respuesta a la problemática social de la población más susceptible.

PARTE I: SUSPENSIÓN EXTEMPORÁNEA DE BZ

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Materiales

Para el desarrollo de la suspensión se utilizaron todos excipientes que se encuentran incluidos en la base de datos de la U.S. Food and Drug Administration y forman parte de la lista GRAS (*generally recognized as safe*), tales como agentes humectantes, agentes de suspensión o viscosantes, endulzantes, agentes floculantes, conservadores antimicrobianos, colorantes y saborizantes (Chatterjee & Alvi, 2014).

La suspensión fue preparada a partir de los comprimidos comerciales que contienen BZ en dosis de 100 mg (Radanil[®], Lote RJ0357, Roche, Argentina). Además, se utilizaron las siguientes como excipientes: Tween[®] 80 (Lote 182/09, Parafarm[®], Argentina), carboximetilcelulosa sódica (4000 cP, Lote 00340300332/010, Parafarm[®], Argentina), acesulfame de potasio (Lote 20070203, Parafarm[®], Argentina), metilparabeno (Parafarm[®], Argentina), propilparabeno (Montreal[®], Argentina), saborizante sólido de sabor banana (Lote 0200145451, Parafarm[®], Argentina), saborizante sólido de sabor frutilla (Lote BN00017824, Parafarm[®], Argentina), colorante Sunset yellow (Lote T7680709, Parafarm[®], Argentina), NaCl (grado PA, Lote 59599, Cicarelli[®], Argentina).

Los reactivos y solventes utilizados fueron: agua destilada, HCl 37% P/P (Lote: 18581-1, Anedra[®], Argentina) y KCl (Lote 59259, Cicarelli[®], Argentina).

6.2.2. Preparación de la suspensión de BZ al 1 %

Se prepararon seis lotes de 900 mL cada uno, de una suspensión de BZ al 1%, de acuerdo al detalle que se presenta en la Tabla 6.1, que corresponde a la formulación



optimizada. Cabe destacar que previamente, se llevó a cabo un exhaustivo estudio de preformulación, para establecer las proporciones óptimas de cada uno de los excipientes.

El procedimiento de preparación fue el siguiente: 90 comprimidos de Radanil® se molieron en un mortero y se mezclaron con 0,9 g de Tween® 80, y 90 mL de agua destilada. En paralelo, se midieron 6,3 g de carboximetilcelulosa sódica y se dispersó en 400 mL de agua destilada, bajo agitación con calor moderado (~ 40 °C), hasta completa homogenización. Esta dispersión se colocó en el mortero y se malaxó para mezclar adecuadamente los componentes de la formulación. Luego se incorporó el resto de los excipientes en polvo, bajo constante malaxado, para favorecer la homogenización de la suspensión.

Finalmente, la mezcla fue trasvasada a una probeta graduada de 1000 mL y se enrasó a volumen final de 900 mL con agua destilada, que fue lentamente incorporada. Se agitó la probeta para mezclar adecuadamente y la suspensión se envasó en frascos de vidrio inactivos de 50 mL y se almacenó.

En total se prepararon 108 envases con 50 mL de suspensión cada uno, correspondientes a los tres los desarrollados, los cuales fueron almacenados en dos condiciones predeterminadas: temperatura ambiente y bajo refrigeración en heladera.

6.2.3. Evaluación de la estabilidad física de la suspensión

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad, cada lote fue dividido en dos grupos de 54 envases cada uno, los cuales fueron almacenados en condiciones de temperatura ambiente y bajo refrigeración, (25 ± 2) y (5 ± 2) °C, respectivamente. Todas las muestras fueron correctamente rotuladas, para la adecuada identificación, y se almacenaron durante 90 días. Se tomaron muestras de cada lote a los días 0, 7, 15, 30, 60 y 90. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio y la desviación estándar.

La estabilidad física fue definida como la ausencia de cambios en el color, olor o sabor y la facilidad de resuspensión de la torta formada (producto de la decantación de la fase dispersa de la suspensión), mediante una agitación manual durante 15 segundos (USP33-NF28, 2010). La estabilidad física fue evaluada mediante la inspección visual, por microscopía óptica, determinación de la viscosidad dinámica (η) y medición del volumen de sedimentación (V_s).



El análisis morfológico de las partículas de BZ en suspensión se realizó por medio de un microscopio óptico con filtros polarizadores (Olympus® BX41, Japón), equipado con una cámara digital (Infinity Lumera®) para la toma de las imágenes y software específico para su procesamiento (Infinity Analyze®, Release 5.0.2). Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 10X.

La η de la formulación fue evaluada a los días 0 (formulación preparada en el momento), 15 y 90, en las dos condiciones de almacenamiento. Para la determinación, se utilizó un viscosímetro rotacional (VT500, Haake®, Alemania) equipado con sensores NV cilindro-copa, acoplado a una PC con el software VT500 3,01v específico para el procesamiento de los datos. Durante las mediciones, las muestras fueron termostalizadas a 37 °C utilizando un cabezal de calentamiento (Termo Haake, DC10, Alemania), montado sobre un baño para tal fin.

Se realizaron las curvas de flujo en el intervalo de 0 a 60 rpm y 60 a 0 rpm, en 60 s, para cada segmento. La η se midió a velocidad de cizallamiento constante, de 60 rpm durante 60 s y los resultados se expresaron en centipoise (cP).

El V_s se determinó mediante el análisis de la relación entre el volumen de dispersión (torta) medido en diferentes tiempos (V_t), en función del volumen original de suspensión (V_o) contenido en el envase. Para esto, se utilizó la Ecuación 6.1.

$$V_s = \frac{V_t}{V_o} \quad \text{Ecuación 6.1.}$$

El V_s fue determinado a tiempos predeterminados de almacenamiento: 0, 24 y 48 h, 7, 14 y 90 días.

6.2.4. Estudios de la uniformidad de contenido de la suspensión

La uniformidad de contenido en función del tiempo fue evaluada mediante el seguimiento de la concentración de BZ en la suspensión, luego de la redispersión de la formulación mediante una agitación manual por 15 s. La cuantificación de BZ se realizó por espectrofotometría UV-Vis (Evolution 300, Termo Scientific, Suiza), a 324 nm. Para evaluar la uniformidad de contenido se tomaron muestras de cada lote a los días 0, 7, 15, 30, 60 y 90. Se tomó 1 mL de suspensión de cada lote se disolvió en HCl 1 N y se realizó una dilución 1 en 10 en el mismo medio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio y la desviación estándar.



6.2.5. Mediciones del pH de la suspensión

Los valores de pH fueron determinados con un pH-metro digital (SevenMulti S40, Mettler-Toledo, Suiza) equipado con electrodo combinado de Ag/AgCl (DG-115-SG). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Previo a las determinaciones, el equipo fue calibrado con buffers de pH estándar 4,0; 7,0 y 10,0 (Anedra®, Arg.) en modo de compensación de temperatura automático.

6.2.6. Estudios de la estabilidad microbiológica de la suspensión

La estabilidad microbiológica de la suspensión de BZ fue realizada a los días 0, 30, 60 y 90 para las suspensiones que se almacenaron a temperatura ambiente.

Las muestras fueron sometidas a evaluación microbiológica para determinar si cumplen con los atributos microbiológicos de “productos farmacéuticos no necesariamente estériles”, para los cuales se establece un recuento de microorganismos aerobios totales inferior a 102 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, total de levaduras/moldes combinados por debajo de 2 UFC/mL y ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* La evaluación microbiológica se realizó de acuerdo con los métodos que se encuentran codificados en la Farmacopea de Estados Unidos (USP33-NF28, 2010): *Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Test <61> and Test for Specified Microorganism <62>*. El contenido límite de microorganismos se determinó de acuerdo a los lineamientos del método <1111> (USP33-NF28, 2010) y la disposición 7667 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2010). Estos estudios, se realizaron en el Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

6.2.7. Estudios de disolución de BZ desde la suspensión

El ensayo de disolución de BZ se realizó desde las suspensiones a tiempo 0 (inmediatamente preparada) y 90 días.

Se utilizó un equipo de disolución-USP (Disolutor AT 7 Smart SOTAX®, Suiza), aparato 2 o método de paletas a 75 rpm (USP33-NF28, 2010) y $(37, 0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Previo al inicio del ensayo, los medios fueron desgasificados. El medio de disolución utilizado fue HCl 0,1 N, en un volumen de 900 mL. Durante el ensayo, se



tomaron muestras prefiltradas de 4 mL, a intervalos de tiempo predeterminados, y se realizó la reposición con cantidades equivalentes de medio fresco termostatzado. La concentración de BZ disuelto se determinó por espectrofotometría UV-visible a $\lambda^{BZ} = 324$ nm, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción.

Además, se evaluó la disolución de los comprimidos comerciales de BZ (Radanil[®]) que fueron utilizados como referencia.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron los perfiles de disolución de BZ, como % disuelto de BZ en función del tiempo.

6.3. Resultados

Como se puede observar en la Tabla 6.1, diferentes excipientes fueron utilizados para formular la suspensión líquida de BZ al 1 %. Todos son excipientes considerados como seguros para su uso en pediatría (Fabiano, Mameli, & Zuccotti, 2011). La suspensión se obtuvo mediante un proceso sencillo y reproducible. Cabe destacar, que en la formulación final, además de los excipientes adicionados para obtener la suspensión, se encuentran presentes los excipientes que forman parte de los comprimidos comerciales de Radanil[®].

Tabla 6.1. Composición cuali-cuantitativa de la fórmula de la suspensión de BZ

Componentes	Proporción (g)	Categoría funcional
BZ (equivalente a 10 comprimidos)	1,00	Ingrediente farmacéutico activo (fármaco)
Tween 80	0,10	Agente humectante
NaCl/Carboximetilcelulosa sódica	0,90/0,70	Vehículo estructurante/ Agente de suspensión
Metilparabeno	0,02	Conservante antimicrobiano
Propilparabeno	0,02	Conservante antimicrobiano
Acesulfame-K	0,05	Agente edulcorante
Sabor banana (polvo)	2,00	Agente saborizante
Sabor frutilla (polvo)	2,00	Agente saborizante
Colorante Sunset yellow	c.s.	Colorante
Agua destilada c.s.p.	100,00	Vehículo

c.s. indica cantidad suficiente y c.s.p. indica cantidad suficiente para



En cuanto a los caracteres organolépticos, la suspensión presentó coloración amarillo-anaranjada, conferida por el colorante utilizado, con partículas dispersas uniformemente y, en los tiempos evaluados, no se detectaron cambios de color, olor o sabor.

En la Tabla 6.2 se presentan los parámetros de la estabilidad física y de la uniformidad de contenido de las suspensiones, almacenadas hasta los 90 días, en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

Las mediciones del V_s en las formulaciones, permitieron evidenciar una leve disminución entre los días 0 y 7 (Tabla 6.2). Después de los 7 días, el V_s permaneció relativamente constante en el tiempo, hasta los 90 días.

La Figura 6.1 se presenta la caracterización morfológica, mediante el análisis microscópico realizado a la suspensión, en presencia y ausencia de luz polarizada. En las imágenes se pueden observar las partículas de BZ suspendidas, las cuales presentan una distribución uniforme, con tamaños de partículas adecuados, en el rango de 35 a 63 μm (Buontempo et al., 2010). La forma y el tamaño de las partículas en suspensión se mantuvieron estables durante todo el tiempo de almacenamiento.

Tabla 6.2. Parámetros físicos, químicos y microbiológicos analizados para la suspensión de BZ, hasta los 90 días de almacenamiento, en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

Parámetros evaluados	T [*] (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)					
		0	7	15	30	60	90
BZ (% \pm DE) ^a	25	104,1 \pm 0,6	102,9 \pm 0,7	102,3 \pm 0,8	101,0 \pm 0,7	100,4 \pm 0,7	99,5 \pm 0,7
	5		100,9 \pm 0,8	100,7 \pm 0,5	100 \pm 1	99 \pm 1	98 \pm 1
pH \pm DE	25	5,63 \pm 0,06	5,63 \pm 0,05	5,56 \pm 0,05	5,54 \pm 0,07	5,53 \pm 0,06	5,50 \pm 0,06
	5		5,59 \pm 0,05	5,51 \pm 0,05	5,57 \pm 0,04	5,55 \pm 0,04	5,55 \pm 0,04
η (mPa.s \pm DE)	25	71 \pm 3	-	69 \pm 3	-	-	64 \pm 4
	5		-	67 \pm 3	-	-	59 \pm 3
Crecimiento microbiano	25	negativo	-	-	negativo	negativo	negativo
V_s	25	0,25 \pm 0,01 ^b	0,20 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	-	-	0,20 \pm 0,02

* Refiere a la temperatura de almacenamiento de las suspensiones.

Los resultados se expresan como el promedio de las mediciones y la desviación estándar (DE)

^a Cantidad de BZ expresada como porcentaje, respecto de la concentración inicial en la suspensión.

^b Vs medido luego de 20 h de la preparación de la suspensión.

En la Figura 6.2 se presentan las curvas de flujo, donde se grafica el esfuerzo de cizallamiento en función de la velocidad de cizalla, tanto para las suspensiones preparadas en el momento, como para aquellas almacenadas durante 90 días, bajo las dos condiciones. Las curvas mostraron flujo característico, de tipo pseudoplástico. Las curvas ascendentes (ida) y descendentes (vuelta), prácticamente se superpusieron, lo que sugiere una tixotropía (recuperación dependiente del tiempo del flujo) estrecha o insignificante². Los valores de viscosidad de las suspensiones, luego de los 90 días de almacenamiento, fueron levemente inferiores a los de las suspensiones preparadas en el momento (Tabla 6.2). Sin embargo, los cambios observados en la viscosidad fueron mínimos y no conducen a cambios significativos en la calidad de la formulación.

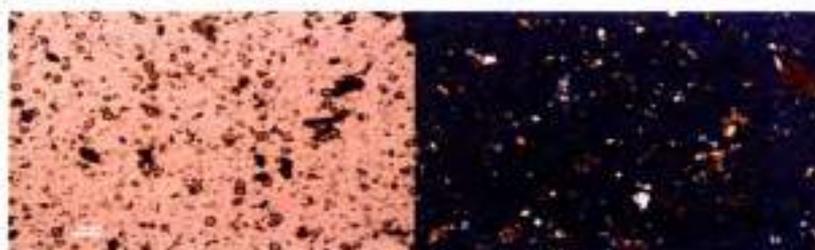


Figura 6.1. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (10X) de la suspensión de BZ desarrollada por reformulación de los comprimidos comerciales, en ausencia (imagen de la izquierda) y presencia de luz polarizada (imagen de la derecha).

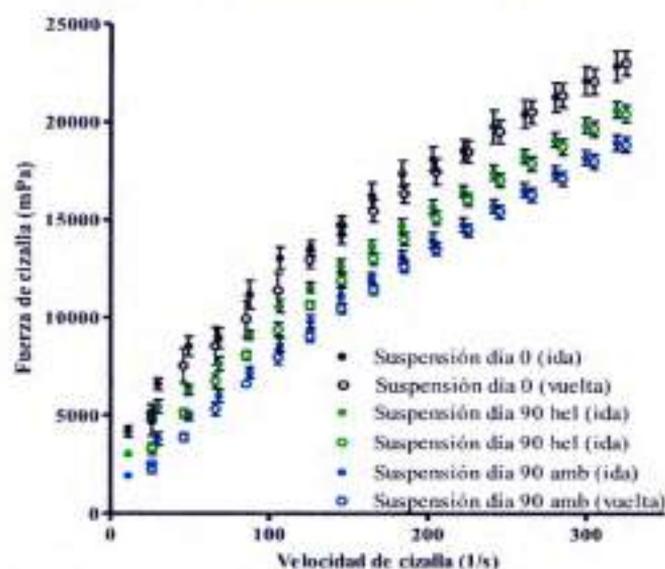


Figura 6.2. Curvas de flujo de las suspensiones de BZ, preparadas a partir de los comprimidos comerciales, almacenadas durante 90 días a temperatura ambiente (amb) y en heladera (hel) y frescas o recién preparadas (día 0).

² Se entiende por tixotropía a una disminución de la viscosidad ante un determinado estrés, seguida por la recuperación gradual de la viscosidad cuando el estrés es eliminado (Pignon, Magnin, & Piau, 1996).



En todos los casos, las suspensiones almacenadas fueron fácilmente redispersables, luego de una agitación manual durante 15 s, lo que permite asegurar la uniformidad en la dosificación y es indicativo de la reversibilidad de la torta y de la estabilidad física de la suspensión.

6.3.1. Evaluación de la uniformidad de contenido y pH

La evaluación de la uniformidad de contenido, permitió evidenciar una aceptable redispersión de la suspensión de BZ en todas las muestras y la concentración de BZ se presentó, en todos los casos, con un valor aceptable y con mínimas variaciones (Tabla 6.2). Se observó una leve disminución de la concentración de BZ en función del tiempo; sin embargo, en todos los casos se cuantificó un porcentaje de BZ > 98 %, en un volumen de dosificación adecuado (5 mL), durante un periodo de, al menos, 90 días. Además, la suspensión se mantuvo sin cambios de pH y presentó valores ligeramente ácidos, comprendidos entre 5,0 y 6,8.

6.3.2. Evaluación de la estabilidad microbiológica

El análisis microbiológico permitió determinar que las suspensiones almacenadas a temperatura ambiente (condición más desfavorable) no presentaron crecimiento microbiano, de ninguno de los microorganismos evaluados, en el intervalo de tiempo de almacenamiento estudiado, lo cual se expresa en la Tabla 6.2 como “negativo”.

6.3.3. Evaluación de la disolución de BZ desde las suspensiones

La performance comparativa de la disolución *in vitro* de BZ desde las suspensiones y desde los comprimidos comerciales disponibles, se presentan en la Figura 6.3. Como puede observarse, la disolución de BZ desde las suspensiones es total (Q (cantidad)=100 %) antes de los 15 min, mientras que la disolución de BZ desde los comprimidos comerciales intactos no alcanza el 50 % en el mismo tiempo (15 min). Complementariamente, se observa una disolución más rápida desde los comprimidos pulverizados (simula lo que ocurre en la práctica clínica) respecto de los intactos, pero ésta alcanza el total disuelto luego de los 30 min ($Q_{100\%} \geq 30$ min). Sin embargo, a los fines de la comparación entre los perfiles de disolución, los comprimidos pulverizados son más adecuados para referenciar, respecto de la suspensión, ya que es la forma en la que actualmente se dispensan.

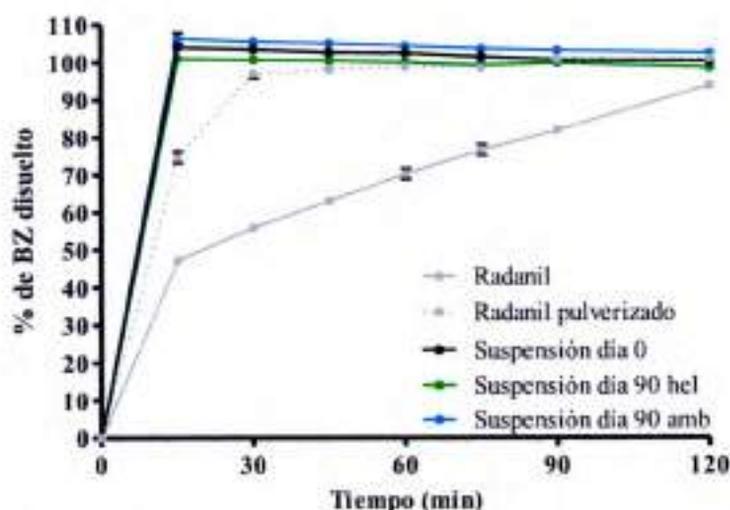


Figura 6.3. Perfiles de disolución de BZ desde las suspensiones frescas (día 0), y almacenadas luego de 90 días, tanto a temperatura ambiente como en heladera. Se presenta además el perfil de disolución de BZ desde los comprimidos comerciales de Radanil® intactos y pulverizados.

PARTE II: COMPRIMIDOS E HIDROGELES AZUCARADOS MASTICABLES

6.4. Materiales y Métodos

6.4.1. Materiales

Como fue descripto en el capítulo 2 *Principios activos y excipientes seleccionados*, el BZ fue extraído y purificado desde los comprimidos comerciales disponibles (Radanil® Lote: 110877, Roche, Argentina).

Además, se emplearon excipientes incluidos en la base de datos de la U.S. Food and Drug Administration y que forman parte de la lista GRAS (*generally recognized as safe*). Los excipientes utilizados fueron: polietilenglicol (PEG) 400 (Lote N0603c, Parafarm®, Argentina), PEG 4000 (Lote N0503c, Parafarm®, Argentina), gelatina comercial sin sabor, ciclamato de calcio (Lote B06159, Parafarm®, Argentina), sacarina sódica (Lote B98122, Parafarm®, Argentina), acesulfame de potasio (Lote 20070203, Parafarm®, Argentina), jarabe de alta fructosa (Lote 5643219, Parafarm®, Argentina), ácido cítrico anhidro (Lote 000934, Parafarm®, Argentina), esencia de frutilla, esencia de banana, esencia de menta y esencia de cereza (Parafarm®, Argentina), saborizante sólido de sabor banana (Lote 0200145451, Parafarm®, Argentina), saborizante sólido de sabor frutilla (Lote BN00017824, Parafarm®, Argentina), saborizante sólido sabor vainilla (BU



60014624, Parafarm[®], Argentina), colorante rojo, colorante Sunset yellow (Lote T7680709, Parafarm[®], Argentina), ácido oleico (Lote 060825, Parafarm[®], Argentina), Ac-Di-Sol[®] que fue gentilmente donado por Productos Destilados Argentina SAICYF (Lote TN10821441, FMC Biopolymer[®]), manitol (Parafarm[®], Argentina), lactosa anhidra (Parafarm[®], Argentina), Ludiflash[®] (Lote 36889406D0, BASF SE[®], Alemania), polivinilpirrolidona (PVP) (Lote P14010S0002, distribuido por Droguería Frest SAICIA[®], Dinamarca), Avicel[®] (PH 101 Lote 398174, Fluka[®], Suiza), talco (Lote 031203, Parafarm[®], Argentina), Aerosil[®] y estearato de magnesio (Parafarm[®], Argentina)

Los reactivos y solventes utilizados fueron: agua destilada, etanol absoluto anhidro (Merck. Lote: 0211012), HCl 37% P/P (Lote: 18581-1, Anedra[®], Argentina) y KCl (Lote 59259, Cicarelli[®], Argentina).

6.4.2. Preparación de los hidrogeles azucarados masticables (HAM)

Para la formulación de los HAM se utilizó el método de gelificado y moldeado por temperatura. Luego de los estudios de preformulación, se determinó la composición cuali-cuantitativa de la formulación optimizada. Sobre la base de ésta, se prepararon tres lotes de 50 unidades de HAM cada uno, con dosis de 50 mg de BZ. Para lo cual, por un lado, el edulcorante natural (jarabe de alta fructosa) se disolvió en cantidad suficiente de agua destilada caliente (aproximadamente a 80 – 90 °C) y, luego, se incorporó lentamente el agente gelificante (gelatina,) bajo agitación constante a 500 r.p.m., hasta alcanzar una completa homogenización. Por otra parte, se disolvió el BZ en la mezcla de polietilenglicoles (PEG 400/PEG 4000) mezclados con el sorbitol y el ácido oleico, bajo agitación a 500 r.p.m. y calor (aproximadamente a 80 – 90 °C). Por último, se efectuó la mezcla de ambas soluciones en caliente, se dejó enfriar levemente y se incorporó el resto de los constituyentes de la fórmula, bajo agitación vigorosa, durante 1 h. Luego, se realizó el vertido en los moldes y se dejó enfriar y estabilizar durante 72 h, a temperatura ambiente. Finalmente, los HAM fueron desmoldados y colocados en envases plásticos transparentes con cierre hermético.



6.4.3. Caracterización de los HAM

6.4.3.1. Determinación de la uniformidad de peso y de contenido en los HAM

Para la determinación de la uniformidad de peso, se midió la masa de 15 unidades, seleccionadas al azar, de cada lote de los HAM preparados, para determinar la masa promedio y la desviación estándar correspondiente.

Para la determinación de la uniformidad de contenido, se seleccionaron cinco unidades al azar de cada lote de HAM y se disolvieron en 1000 mL de HCl 0,1 N bajo sonicación (Sonicador Ultrasonic® LC 30H, Alemania), con el fin de asegurar la completa disolución del BZ. El contenido de BZ se determinó espectrofotométricamente, a la longitud de onda de máxima absorción (324 nm).

6.4.3.2. Análisis morfológico de los HAM

En análisis morfológico se realizó mediante microscopia, por medio de la utilización de un microscopio óptico con filtros polarizadores (Olympus® BX41, Japón), equipado con una cámara digital (Infinity Lumera®) para la toma de las imágenes y software específico para su procesamiento (Infinity Analyze®, Release 5.0.2). Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 10X.

Esta determinación se realizó para evidenciar la presencia de BZ, en forma de cristales en los HAM y la distribución de éstos, en las regiones inferior y central. Los cortes transversales de los HAM fueron realizados con un cuchilla. Las imágenes se compararon con una referencia de BZ extraído y purificado desde los comprimidos comerciales.

6.4.3.3. Estudios reológicos de los HAM

Se realizaron estudios reológicos para evaluar posibles cambios de la plasticidad de los HAM en función del tiempo. Para esto, se analizaron las propiedades reológicas (Reómetro Physica MCR 301, Anton Paar®, México) a los días 1 y 15, considerados a partir del día de formulación. Para la determinación, se utilizó la geometría de platos paralelos 8 mm, termostatizados a 20 °C.

El rango de viscoelasticidad lineal se determinó mediante un barrido de amplitud en entre 0,01 y 100 %. A partir de esta determinación, se eligió una deformación de 0,1 %. Luego se realizó un barrido de frecuencia y, a partir de este, se determinaron los módulos elásticos y viscosos (G' y G'') y la viscosidad compleja (η) en el rango de 100 a 0,1 Hz (Log ω). Cabe destacar que, G' está relacionado con las propiedades



elásticas del material, G'' hace referencia a las propiedades de viscosidad y califica la disipación de energía debido a un flujo viscoso, y η hace referencia a la respuesta ante esfuerzos de corte oscilatorio. A partir del módulo elástico y viscoso, se calculó el ángulo de fase ($\tan \delta$), como el cociente entre G'' y G' , de acuerdo con la Ecuación 6.2. A menor $\tan \delta$, más pronunciado es el carácter elástico de la muestra en relación con el carácter viscoso (Bonferoni, Rossi, Ferrari, Bertoni, & Caramella, 1995).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ecuación 6.2.}$$

6.4.3.4. Estudios de disolución de BZ desde los HAM

Se evaluó la disolución de BZ desde los HAM enteros y triturados con cuchilla, para simular el proceso de masticación.

Las demás condiciones del ensayo fueron idénticas a las descritas en el apartado 6.2.7. del presente capítulo.

6.4.3.4. Estudios de estabilidad de los HAM

Se evaluó la estabilidad, a 30 días, de los HAM, mediante el análisis de las características organolépticas y por medio de la cuantificación de BZ por espectrofotometría UV-Vis a la longitud de onda de máxima absorción (324 nm). Adicionalmente, se consideraron las propiedades reológicas de los HAM, luego de 15 días de elaboración, como otra medida de estabilidad.

6.4.4. Preparación de los comprimidos masticables

Para la formulación de los comprimidos masticables se utilizó el método de granulación húmeda (Vila Jato, 1997) con posterior compresión (comprimidora monopunzón DS2[®], Talleres Sánchez, Argentina).

Para la preparación, se midieron todos los componentes de la formulación y se incorporaron en una mezcladora planetaria, donde se realizó una premezcla de polvos (con excepción del talco y el estearato de magnesio). Esta mezcla se humectó, con cantidad suficiente de etanol absoluto, bajo mezclado permanente, durante 30 min. Luego, la mezcla se granuló mediante el paso forzado de la masa húmeda obtenida, a través de un tamiz de malla 25 y se secó durante 2 h a 40 °C. Los gránulos secos y tipificados se procesaron durante 3 min, en una mezcladora de tipo doble cono, junto con la cantidad necesaria de talco y estearato de magnesio, antiadherente y lubricante,



respectivamente. Finalmente, se procedió a la compresión de la mezcla, utilizando punzones circulares planos.

Las matrices y los punzones fueron seleccionados de acuerdo con la masa final de comprimidos, en función de la masa total de BZ y excipientes. Para los comprimidos de 100 mg de BZ se utilizó una matriz bicóncava de 13,0 mm de diámetro, para los comprimidos de 50 mg de BZ una matriz plana de 11,0 mm de diámetro, para los comprimidos de 25 mg y 12,5 de BZ una matriz bicóncava de 7,0 mm de diámetro.

Una vez establecida la formulación optimizada, se desarrollaron comprimidos masticables con dosis de 12,5; 25, 50 y 100 mg de BZ. Se obtuvieron 200 comprimidos de cada formulación.

6.4.5. Caracterización de los comprimidos masticables

6.4.5.1. Determinación de la uniformidad de peso y de contenido

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a las especificaciones de Farmacopea Argentina, correspondiente al texto <740> *Uniformidad de las unidades de dosificación* (Farmacopea Argentina, 2014). La determinación de estos ensayos se realizó dependiendo de la dosis de BZ en los comprimidos masticables, de acuerdo a las especificaciones farmacopeicas. Los resultados se informan como el promedio de las determinaciones y su correspondiente desviación estándar.

6.4.5.2. Determinación de la dureza de los comprimidos masticables

La dureza de los comprimidos fue determinada en un Durómetro (DU4, AVIC, Buenos Aires, Argentina), de acuerdo a las especificaciones de Farmacopea Argentina, texto <1060> *Friabilidad y dureza de comprimidos* (Farmacopea Argentina, 2014). Se evaluó la fuerza requerida para producir la ruptura radial de un comprimido, al aplicar una fuerza diametral. Las mediciones fueron realizadas en N = 10 comprimidos y los resultados se informan como el promedio de las 10 determinaciones y su correspondiente desviación estándar.

6.4.5.3. Determinación de la friabilidad de los comprimidos masticables

La friabilidad de los comprimidos se determinó para establecer que esto no experimentan daño o muestran evidencias de laminación/ruptura, cuando se someten a un estrés mecánico. Este ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones de Farmacopea Argentina, texto <1060> *Friabilidad y dureza de comprimidos* (Farmacopea Argentina, 2014). Para esta determinación, se midió con exactitud una



masa de aproximadamente 6,5 g de comprimidos, previa eliminación de las partículas superficiales de polvo, con ayuda de un cepillo. Los comprimidos fueron colocados suavemente en el tambor del friabilómetro (Equipos Farmacéuticos) y se los sometió a estrés y fricción, mediante la rotación del tambor a 25 r.p.m. y 100 vueltas. Finalmente, los comprimidos se retiraron del equipo, se eliminaron suavemente las partículas de polvo residuales y se procedió a determinar la masa nuevamente, de los comprimidos que permanecieron intactos. El % de friabilidad se calculó de acuerdo con la Ecuación 6.3.

$$\% \text{ Friabilidad} = \frac{\text{masa inicial de comprimidos (antes de la rotación)}}{\text{masa final de comprimidos (luego de la rotación)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6.3.}$$

6.4.5.4. Ensayo de desintegración de los comprimidos masticables

Dado que no se dispone de un ensayo de desintegración codificado para comprimidos masticables, para determinar la desintegración espontánea de los comprimidos, se realizó la evaluación en condiciones estáticas, tal como ocurriría cuando éstos entran en contacto con los fluidos bucales. Para realizar este ensayo se colocó un comprimido en una placa de vidrio (tipo de Petri) con cantidad suficiente de agua, termostatzada a 37 °C, para cubrir la totalidad del comprimido (~ 40 mL). Se determinó el tiempo transcurrido hasta la disgregación total y se tomaron fotografías a intervalos de tiempos predeterminados (2, 5, 15, 30, 60 y 120 s) para evaluar la evolución temporal del comprimido en estas condiciones. Las mediciones fueron efectuadas por quintuplicado para cada lote y se calculó el tiempo medio de desintegración y su desviación estándar.

6.4.5.5. Estudios de disolución de BZ desde los comprimidos masticables

Se evaluó la disolución de BZ desde los comprimidos. Para lo cual se utilizó un equipo de disolución-USP (Disolutor AT 7 Smart SOTAX®, Suiza), aparato 2 o método de paletas a 50 rpm (USP33-NF28, 2010) y (37, 0 ± 0,5) °C.

Las demás condiciones del ensayo fueron idénticas a las descritas en el apartado 6.2.7. del presente capítulo.

6.5. Resultados

Como se puede observar en las Tablas 6.3 y 6.5, para formular los HAM y los comprimidos masticables, se utilizaron diferentes excipientes calificados como seguros (Chatterjee & Alvi, 2014; Fabiano et al., 2011) para su uso en pediatría.



En el caso de los HAM, durante los estudios de preformulación se desarrollaron siete formulaciones diferentes, en donde se varió la proporción de excipientes (Tabla 6.3.), con el énfasis puesto en mejorar el sabor, la plasticidad, la masticabilidad, la homogeneidad y el aspecto visual de las formulaciones, como así también, se evaluó la contracción de los HAM dentro de los moldes durante su secado y consolidación.

Tabla 6.3. Composición de las siete formulaciones preparadas (F1-F7), en los estudios de preformulación, bajo la forma de hidrogeles azucarados masticables (HAM), en dosis de 50 mg de BZ para uso pediátrico*. Las cantidades de cada componente se expresan en % respecto del total de excipientes utilizados.

Componentes	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Gelatina	11,15	11,4	11,4	11,4	11,4	11,4	11,4
Jarabe de alta fructosa	38,57	38,57	38,57	38,57	43,43	43,43	43,43
Agua	16,53	16,53	16,53	16,53	16,53	16,53	16,53
PEG 400	25,68	25,43	25,43	25,43	20,42	17,32	19,4
PEG 4000	-	-	-	-	-	3,1	1,02
Ciclamato de calcio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sacarina sódica	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Acesulfame-K	0,25	0,25	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Ácido cítrico	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Esencia de banana	3,31	3,31	3,31	-	-	-	-
Esencia de frutilla	-	-	3,31	-	-	-	-
Esencia de cereza	3,31	3,31	-	-	-	-	-
Esencia de menta	-	-	-	-	c.s.	c.s.	c.s.
Saborizante de banana	-	-	-	3,31	-	-	-
Saborizante de frutilla	-	-	-	3,31	-	-	-
Saborizante de vainilla	-	-	-	-	6,77	6,77	6,77
Color	c.s.						

*1 HAM presenta una masa de aproximadamente 1,85 g y contiene 50 mg de BZ.

c.s.: cantidad suficiente

A partir de los estudios de preformación realizados, se arribó a la formulación optimizada, la cual presenta en la Tabla 6.4, en la cual se evidencia la incorporación del ácido oleico como excipiente, ya que de este modo la formulación obtenida presentó las características deseadas.

Estas formulaciones, contienen dosis pediátricas de BZ y formas farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de los pacientes pertenecientes a esta población etaria, por lo que facilitarían su administración.



Tabla 6.4. Composición de la formulación optimizada bajo la forma de hidrogeles azucarados masticables (HAM), en dosis de 50 mg de BZ para uso pediátrico*. Las cantidades de cada componente se expresan en % respecto del total de excipientes utilizados.

Componentes	Formulación optimizada de los HAM
Gelatina	11,08
Jarabe de alta fructosa	42,24
Agua	16,08
PEG 400	11,57
PEG 4000	0,99
Ciclamato de calcio	0,10
Sacarina sódica	0,10
Acesulfame-K	0,34
Ácido cítrico	0,88
Sorbitol	3,66
Ácido oleico	3,66
Esencia de menta	c.s.
Saborizante de vainilla	6,58
Colorante Sunset yellow	c.s.

*1 HAM presenta una masa de aproximadamente 1,85 g y contiene 50 mg de BZ.

c.s. refiere a cantidad suficiente

En cuanto a los caracteres organolépticos de ambas formulaciones, se evidenció que éstas presentan un aspecto homogéneo, coloración amarillo-pálido (conferida por el colorante utilizado), adecuado sabor y óptimas características de plasticidad y masticabilidad. En la Figura 6.4 se presenta una fotografía de los HAM obtenidos.

Los parámetros de calidad evaluados y los resultados obtenidos para los HAM se presentan en la Tabla 6.7.



Figura 6.4. Fotografía de los HAM contenidos en los blister en donde son moldeados.



6.5.1. Evaluación de los HAM

Como se puede observar, los HAM presentan aceptables características de uniformidad de peso y contenido, según las especificaciones generales de Farmacopea Argentina para cualquier forma farmacéutica (Farmacopea Argentina, 2014), ya que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos.

En análisis morfológico mediante microscopía óptica, bajo el efecto de la luz polarizada, permitió determinar que el BZ se encuentra cristalizado en los HAM, pero distribuido uniformemente. La forma de cristalización es bajo la forma de cristales aciculares, característicos del BZ (Figura 5.5).

Tabla 6.5. Parámetros de calidad farmacotécnica y biofarmacéutica *in vitro* de los HAM.

Parámetros estudiados	Formulación optimizada de los HAM
Uniformidad de peso [$\sigma_{\pm 1} < 5\%$] [*]	(1,62 ± 0,06) g
Uniformidad de contenido [47,5 – 55 mg] [*]	(52 ± 1) mg
Ensayo de disolución [$Q_{85\%} < 60$ min] [*]	< 30 min

** Intervalo límite máximo de aceptabilidad de cada parámetro estudiado, según especificaciones preestablecidas de calidad para el producto terminado. En el caso de la uniformidad de contenido equivale al 95 – 110 % de la cantidad de BZ declarada.*

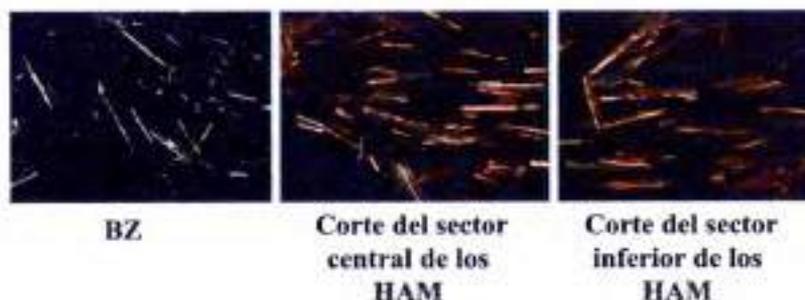


Figura 6.5. Imágenes de microscopía óptica con luz polariza obtenidas para BZ puro y pura dos secciones diferentes de los HAM.

En análisis reológico permitió determinar que se produce un leve incremento en el módulo elástico y viscoso, al igual que en la viscosidad compleja, cuando se compara el día 15 con el día 1. Además, puede observarse que para los tres parámetros estudiados, el comportamiento es lineal cuando se grafica el logaritmo neperiano de los parámetros en estudio (Figura 6.6).

En la Tabla 6.8. se presentan los resultados obtenidos del análisis de las pendientes de las curvas $\text{Ln } G'$, $\text{Ln } G''$ y $\text{Ln } \eta$ en función del Ln frecuencia angular. Como puede observarse las variaciones en las pendientes entre los días 1 y 15 son inferiores al 5 %



en todos los casos. En particular, para $\text{Ln } G'$, se observa un leve incremento de la pendiente; en tanto que, para $\text{Ln } G''$, se observa un mínima, casi despreciable disminución de la pendiente, lo que conlleva una leve disminución de la $\tan \delta$.

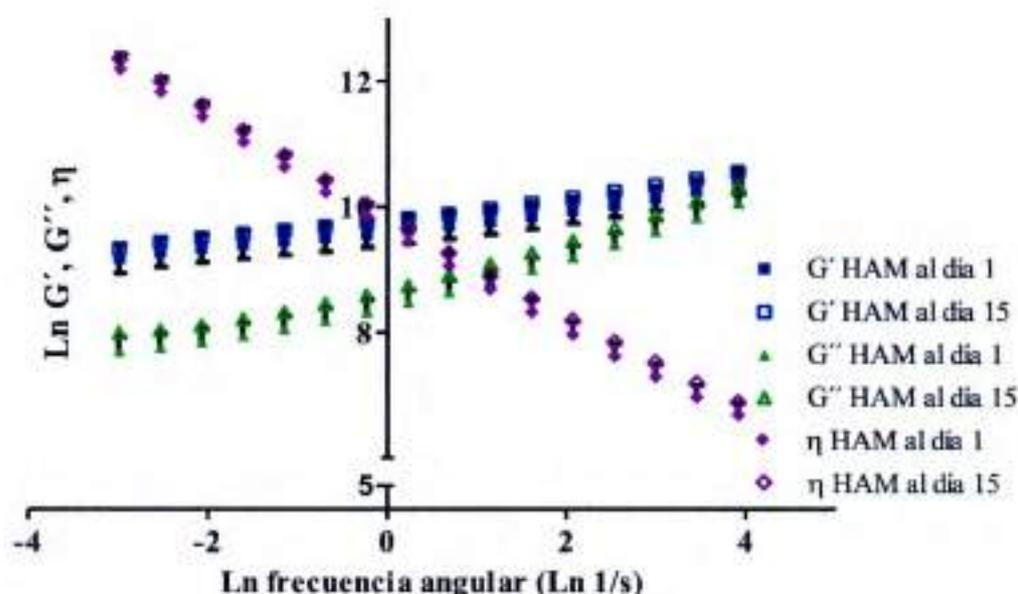


Figura 6.6. Parámetros reológicos evaluados: modulo elástico (G') [Pa], viscoso (G'') [Pa] y viscosidad compleja (η) [Pa.s] en función de la frecuencia angular, a los días 1 y 15 días de la formulación de los HAM.

En los ensayos de disolución presentados en la Figura 6.7, se puede observar que, tanto los HAM enteros como los triturados, que simulan la masticación previa a la deglución, presentan una disolución de BZ completa (más de 85 %) antes de los 30 min del ensayo. Asimismo, transcurridos los 120 minutos, se disolvió el $(99 \pm 1) \%$ del BZ total contenido en los HAM, tanto enteros, como triturados y los perfiles de disolución de ambos, a partir de los 45 min, se presentan prácticamente superpuestos. Además, se puede observar que desde los HAM el BZ se disuelve marcadamente más rápido que desde los comprimidos de Radanil®.

Tabla 6.6. Parámetros reológicos de los HAM preparados expresados como la pendiente de la gráfica de $\text{Ln } G'$ y $\text{Ln } G''$ vs Ln frecuencia angular y el valor de la $\tan \delta$. Los resultados se expresan como el promedio de las tres determinaciones y su correspondiente desviación estándar

Día de ensayo	$\text{Ln } G'$	$\text{Ln } G''$	$\tan \delta$
1	$0,16 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02$	$2,12 \pm 0,04$
15	$0,17 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$2,03 \pm 0,02$

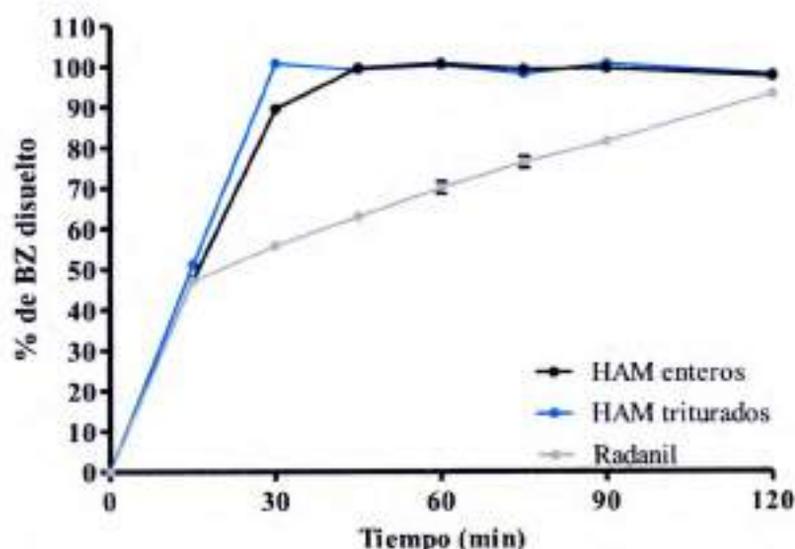


Figura 6.7. Perfiles de disolución de BZ desde los HAM enteros y triturados, en comparación con el perfil de disolución de BZ desde los comprimidos comerciales de Radanil®.

6.5.2. Evaluación de los comprimidos masticables

Se desarrollaron seis formulaciones diferentes, durante los estudios de preformulación, en donde se varió la proporción de excipientes (Tabla 6.5), para lo cual se consideraron las características finales de los comprimidos masticables obtenidos, en términos de dureza y friabilidad. A partir de los estudios de preformación realizados, se arribó a la formulación optimizada de los comprimidos masticables, la cual se presenta en la Tabla 6.6, y se desarrollaron diferentes lotes de comprimidos con dosis de 12,5; 25; 50 y 100 mg de BZ.

Durante la elaboración de los comprimidos masticables, se observaron adecuadas propiedades reológicas o de flujo de sólidos, durante el proceso de compresión y el rendimiento total de obtención fue adecuado, con mínimas pérdidas durante el procesamiento (rendimiento > 80 %, respecto de la masa inicial de sólido).

En la Figura 6.8 se presentan las fotografías de algunos de los comprimidos obtenidos, en donde se puede evidenciar su diferente tamaño, dependiente de la cantidad de BZ que contiene como dosis.



Tabla 6.7. Composición de las seis formulaciones preparadas (F1-F6), en los estudios de preformulación, bajo la forma de comprimidos masticables en dosis de 50 mg de BZ para uso pediátrico. Las cantidades de cada componente se expresan el % respecto de total de excipientes utilizados.

Componentes	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Manitol	40,0	41,0	35,0	28,0	-	41,0
Lactosa anhidra	34,83	34,33	23,7	28,7	-	34,3
Ludiflash®	-	-	-	-	71,3	-
Ac-Di-Sol®	-	5,0	5,0	2,0	10,0	5,0
Polivinilpirrolidona	-	-	-	3,0	-	-
Avicel®	6,0	-	-	-	-	-
Talco	-	-	-	2,0	-	-
Acesulfame K	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aerosil®	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0
Estearato de magnesio	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Saborizante de vainilla	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabla 6.8. Composición de la formulación optimizada bajo la forma de comprimidos masticables en dosis de 50 mg de BZ para uso pediátrico. Las cantidades de cada componente se expresan el % respecto de total de excipientes utilizados.

Componentes	Formulación optimizada de los comprimidos masticables
Manitol	56,5
Lactosa anhidra	10
Ludiflash®	-
Ac-Di-Sol®	10
Polivinilpirrolidona	3,33
Avicel®	-
Talco	1,0
Acesulfame K	0,5
Aerosil®	-
Estearato de magnesio	1,5
Saborizante de vainilla	0,5

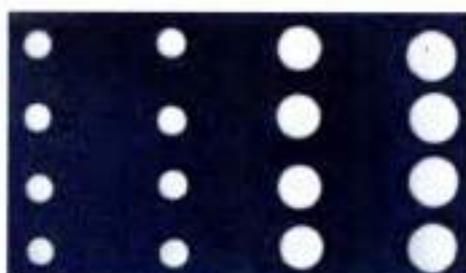


Figura 6.8. Fotografías de los comprimidos masticables obtenidos. De izquierda a derecha, cada columna de comprimidos, corresponde a una dosis de BZ de 12,5; 25, 50 y 100 mg, respectivamente.

Los resultados de los atributos farmacotécnicos y biofarmacéuticos evaluados, se presentan en la Tabla 6.9. Como se puede observar, los comprimidos masticables formulados, en las diferentes dosis, presentan parámetros farmacotécnicos (uniformidad de peso, uniformidad de contenido, dureza y friabilidad) adecuados a los requerimientos de Farmacopea Argentina para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (Farmacopea Argentina, 2014).

Tabla 6.9. Resultados obtenidos de la caracterización farmacotécnica y biofarmacéutica de los comprimidos masticables, conteniendo BZ en diferentes dosis. Los resultados se expresan como el promedio de las mediciones y su correspondiente desviación estándar.

Ensayo	Formulación optimizada de los comprimidos masticables			
	BZ 12,5 mg	BZ 25 mg	BZ 50 mg	BZ 100 mg
Uniformidad de peso (g) [*]	0,0762 ± 0,002	0,150 ± 0,003	0,337 ± 0,002	0,601 ± 0,005
Uniformidad de contenido (mg) [*]	12,4 ± 0,3	24 ± 1	56 ± 2	104 ± 2
Dureza (kg)	5,4 ± 0,8	4,2 ± 0,9	9 ± 1	7,7 ± 0,9
Desintegración (min)	< 5	< 5	< 5	< 10
Friabilidad (%)	0,52	0,56	0,37	0,25
Disolución Q _{80%} (min)	≤ 5	≤ 5	≤ 15	≤ 10

^{*} Intervalo aceptable entre 85,0 a 115,0 % respecto del valor declarado y desviación estándar relativa menor o igual a 6,0 %, de acuerdo a especificaciones de Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina, 2014).

Desde el punto de vista de la evaluación *in vitro*, dentro de los atributos que tienen importancia biofarmacéutica, se destacó el tiempo de disgregación de los comprimidos formulados. En estos, el tiempo fue < 10 min y, en iguales condiciones de ensayos no oficiales, superó ampliamente a la formulación de referencia Radanil[®],



que exhibió un tiempo de desintegración de ~ 25 min. En la Figura 6.9 se presenta una secuencia de imágenes fotográficas registradas para un comprimido masticable de 100 mg de BZ, durante el ensayo de desintegración realizado.

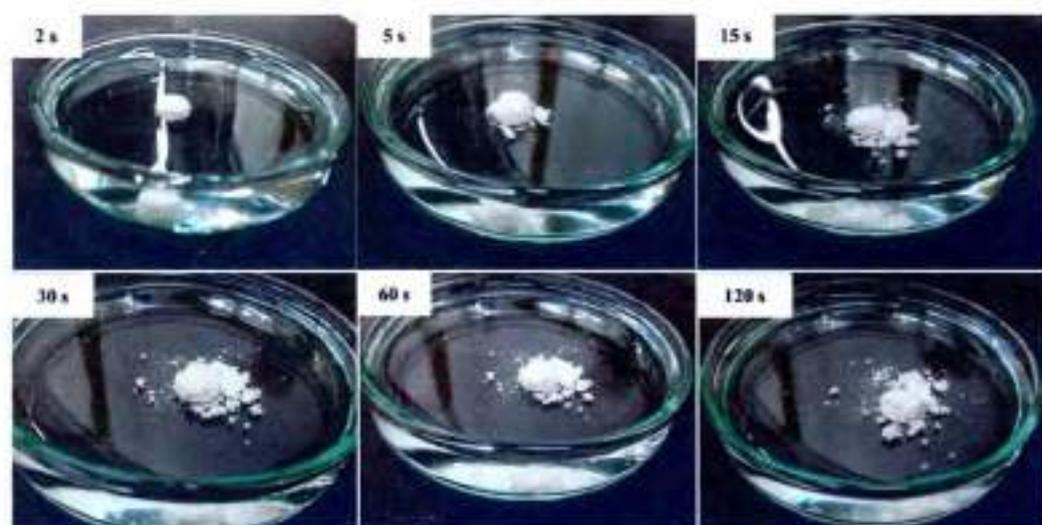


Figura 6.9. Ensayo de desintegración de un comprimido de 100 mg de BZ en los diferentes tiempos de ensayo, expresados en segundo.

Como puede observarse en la Figura 6.9. a los 120 s de transcurrido el experimento, el comprimido masticable presenta una desintegración marcada, pierde la forma matricial y se evidencia el desprendimiento de las partículas de sólido que lo constituyen, sin necesidad de someterlo a ningún tipo de estrés adicional.

A partir del ensayo de disolución, se observó que, los comprimidos masticables superaron ampliamente el perfil de disolución de la formulación de referencia Radanil®. Se evidenció una disolución completa del BZ en menos de 15 min. En la Figura 6.10 se presentan los perfiles de disolución de los comprimidos masticables obtenidos para las diferentes dosis de BZ formuladas, en comparación con el perfil de disolución de BZ desde los comprimidos comerciales disponibles Radanil®. Puede observarse además, que los perfiles de disolución de BZ desde los comprimidos masticables, en las diferentes dosis de BZ, se presentan prácticamente superpuestos. Además, en la Tabla 6.9 se presenta el tiempo necesario para la disolución del 80 % de la cantidad total de BZ contenida en la formulación evaluada ($Q_{80\%}$) y, en todos los casos, el tiempo es inferior a 15 min. En tanto que, el BZ disuelto desde los comprimidos de referencia Radanil®, no logra liberar esta cantidad de F en todos los tiempos evaluados.

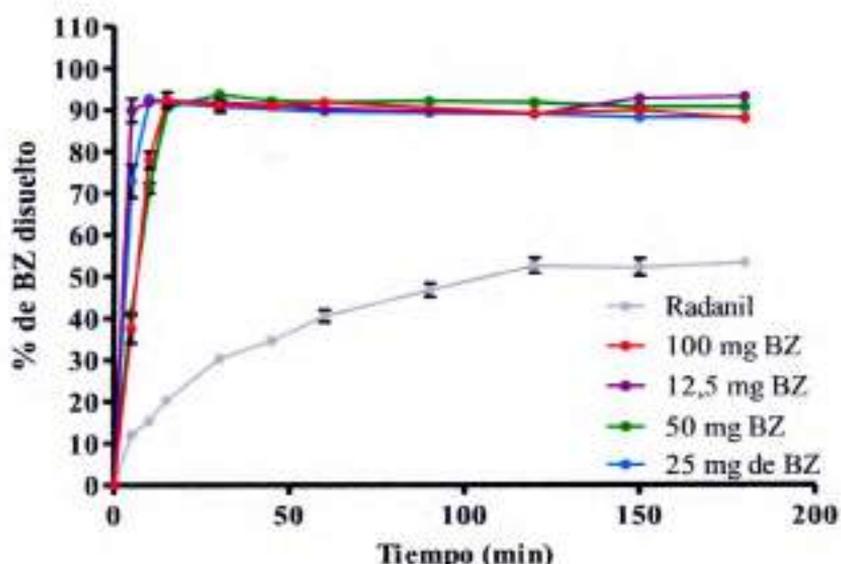


Figura 6.10. Perfiles de disolución de BZ desde los comprimidos masticables conteniendo dosis de BZ de 12,5; 25; 50 y 100 mg, en comparación con el perfil de disolución de BZ desde los comprimidos comerciales de Radanil®.

6.6. Discusión

Los resultados obtenidos evidencian que las tres formulaciones desarrolladas, para ser administradas por vía per-oral (suspensiones, comprimidos masticables e hidrogeles azucarados masticables) contienen BZ en dosis adecuadas y formas farmacéuticas, y son aptas para el tratamiento de los pacientes pediátricos y neonatales.

En este sentido, en lo que respecta a la aceptación por parte de los pacientes al tratamiento farmacoterapéutico, esta vía de administración es la más conveniente y, en general, considerada la más segura, la menos costosa y, en consecuencia, es la más frecuentemente utilizada. Cabe destacar que, la elección de los excipientes, resulta de fundamental importancia para obtener el perfil deseado de liberación o disolución del F (Liebermann, Lachman, & Schwartz, 1990).

Por su parte, en lo que refiere a la suspensión extemporánea desarrollada a partir de los comprimidos comerciales, ésta se obtuvo con una concentración de BZ del 1 %. Para su formulación, se utilizaron excipientes reconocidos como seguros para formulaciones pediátricas (Chatterjee & Alvi, 2014), los cuales se encuentran detallados en la composición cuali-cuantitativa presentada en la Tabla 5.1. Esta suspensión fue desarrollada mediante un proceso sencillo y reproducible, que cumple



con las buenas prácticas de preparación de medicamentos magistrales (Farmacopea Argentina, 2014).

Cabe destacar que, para poder arribar a esta fórmula optimizada, se llevaron a cabo previamente estudios de preformulación, en donde se utilizaron diferentes proporciones de Tween[®] 80 y carboximetilcelulosa sódica, de acuerdo con los rangos de concentraciones recomendados (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009), con el fin de evaluar la capacidad de humectación, mojado de la fase dispersa de la suspensión y viscosidad. Estos parámetros fueron evaluados luego de someter la suspensión a simples agitaciones manuales por 15 s (datos no mostrados). A partir de estas determinaciones, fue que se seleccionaron los excipientes detallados en la Tabla 6.1.

Además, es sabido que las suspensiones son sistemas inestables termodinámicamente. Por lo tanto, las partículas en suspensión tienden a sedimentar a una cierta velocidad y esta es la razón principal por la cual se requiere de la agitación previo a su administración, para poder asegurar la uniformidad de contenido (Buontempo et al., 2010). Si la torta (fase sólida decantada de la suspensión) no se puede volver a resuspender, con una cantidad razonable de agitaciones, esto es un indicio principal de inestabilidad de la suspensión. En los compendios oficiales no se especifica cuáles deben ser los valores de V_s como una exigencia de calidad de la formulación. Sin embargo, con los valores más altos de V_s y variaciones mínimas del V_s en función del tiempo, la formulación se considera que puede permanecer en estado floculado y, de esta manera, se asegura la facilidad de resuspensión de las partículas del sedimento (Jones, 2008; Nash, 2007). Tal como se presentó en la Tabla 6.2, el V_s de las suspensiones disminuyó levemente entre el día 0 y 7, pero luego permaneció prácticamente sin cambios hasta los 90 días. Los valores de V_s obtenidos son relativamente altos, entre 20 – 25 %, respecto del volumen total de la suspensión y la suspensión fue fácilmente redispersable. La caracterización de las suspensiones por microscopía óptica, permitió determinar el tamaño aproximado de las partículas de la fase dispersa, el cual fue adecuado (35 – 63 μm) (Jones, 2008). Además, la forma y el tamaño de las partículas en suspensión, se mantuvieron estables durante el periodo de almacenamiento.

Por su parte, de acuerdo con la ley de Stoke's (Hennart, Wildeboer, Van Hee, & Meesters, 2010), el incremento de la viscosidad de los vehículos acuosos, reduce la velocidad de sedimentación de las partículas suspendidas, lo cual se traduce en un aumento de la estabilidad física de la formulación. El criterio para niveles de viscosidad aceptables para las formulaciones líquidas de uso oral no está establecido



en los compendios ni especificado en las farmacopeas. En este sentido, se considera que la viscosidad debe ser lo suficientemente alta, tanto como sea posible, para minimizar la velocidad de sedimentación de las partículas y prevenir la aglomeración y la irreversibilidad de la sedimentación de la torta durante el almacenamiento. Sin embargo, la viscosidad también tiene que ser tan baja como sea posible, para asegurar el vertido o dosificación, al momento de la administración, del volumen de líquido que contenga la dosis de BZ deseada y que facilite el proceso de preparación de la formulación (Jones, 2008; Nash, 2007).

Como se presentó en la Figura 6.2, en las condiciones evaluadas, la suspensión formulada presentó curvas ascendentes y descendentes con caminos similares, lo que sugiere un flujo pseudoplástico con tixotropía estrecha o despreciable (Pignon et al., 1996). La viscosidad de las suspensiones almacenadas fue ligeramente mayor en comparación con las suspensiones frescas; sin embargo, estos cambios en la viscosidad no interfieren negativamente en la calidad de la formulación. Además, en todos los casos, las suspensiones pudieron ser redispersadas con la simple agitación manual durante 15 s, lo que asegura que al momento de la dosificación, el volumen a administrar contenga la dosis adecuada de BZ.

En lo que respecta a la uniformidad de contenido, de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos (USP33-NF28, 2010), el criterio general para aceptar los niveles de concentración F en los estudios de uniformidad de contenido en las suspensiones, involucra que éstas no deben tener menos del 90,0 % ni más del 110,0 % de la cantidad especificada de BZ. Como se presentó en la Tabla 6.2, la concentración de BZ se mantuvo dentro de los límites especificados con mínimas desviaciones estándar. Cabe destacar que BZ, es químicamente estable en medio acuoso (Lamas et al., 2006) y, en las condiciones evaluadas, no se detectó una disminución drástica de la concentración de BZ. En todos los casos, al menos el 98 % de la cantidad de BZ total pudo ser cuantificada. Además, el pH de las suspensiones fue adecuado y se encontró en valores ligeramente ácidos (5 – 6,8), lo cual generalmente se recomienda para formas farmacéuticas líquidas de uso oral (USP33-NF28, 2010).

En lo que refiere a la evaluación microbiológica realizada (Tabla 6.2), con el fin de determinar si la suspensión cumplía las especificaciones microbiológicas para formas farmacéuticas no estériles (Farmacopea Argentina, 2014), que involucran un recuento de microorganismos aerobios totales por debajo de 102 UFC/mL, recuento total combinado de levadura/hongos por debajo del 2 UFC/mL y la ausencia de las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y



Salmonella spp.; se pudo determinar que en la condición más desfavorable de almacenamiento, es decir a temperatura ambiente, la formulación no desarrolló microorganismos de ningún tipo y, de este modo, cumple con los requerimientos de calidad oficiales especificados (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2010; USP33-NF28, 2010).

Por su parte, el análisis comparativo de los estudios de disolución de las suspensiones, en sus diferentes condiciones de almacenamiento, y de los comprimidos de Radanil® intactos y pulverizados (Figura 6.3), permitieron determinar que, desde las suspensiones, la disolución de BZ ocurre en forma completa y rápida, ya que se disuelve el total de la dosis en menos de 15 min y la velocidad de liberación es mayor en comparación con el Radanil® intacto o pulverizado. De esta manera, se espera que la disolución rápida y completa de BZ desde la suspensión pueda asegurar una absorción del F más uniforme a través del TGI y el posible aumento de la biodisponibilidad, que se traduciría en una mayor eficacia, en comparación con los tratamientos pediátricos actuales, que involucran la molienda de los comprimidos y su dispensación en sobres de papel para ser redispersados en jugos de fruta o leche.

Además, cabe destacar que la concentración de BZ en la suspensión permitiría dosificar volúmenes adecuados, que contengan las dosis requeridas, para el tratamiento de un amplio grupo de pacientes pediátricos, en función de su peso corporal.

En conjunto, estos resultados permiten establecer que la suspensión obtenida por reformulación de los comprimidos comerciales garantiza la correcta dosificación de BZ en una forma farmacéutica conveniente para la administración en la población pediátrica, cuya dosis de BZ puede ser administrada en un volumen adecuado de 0,5 a 0,7 mL/kg en los recién nacidos, bebés o niños. Además, la formulación enmascara el sabor desagradable de BZ (Díez-Gandía et al., 2010), lo que podría favorecer la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes pediátricos (García et al., 2015).

Todos estos resultados, reflejan que si la formulación se prepara sobre la base de un procedimiento normalizado de trabajo y de acuerdo con las buenas prácticas de elaboración de medicamentos magistrales, la calidad de ésta es la adecuada para su uso en medicina humana y puede permanecer estable, al menos durante 90 días.

En este contexto cabe destacar que, se ha desarrollado el protocolo para la preparación de esta suspensión, el cual ha sido transferido a algunos hospitales de



Córdoba, Mendoza y El Calafate, a demanda del Servicio de Farmacia de estas instituciones, con la finalidad de poder dispensar esta formulación para el tratamiento de los pacientes pediátricos.

En lo que refiere a los HAM, éstos presentaron una mejora significativa en el enmascaramiento del mal sabor del BZ y en los perfiles de disolución de BZ, en comparación con los comprimidos comerciales disponibles. El enmascaramiento del sabor es atribuible a la alta proporción de excipientes con sabor dulce con que éstos han sido elaborados. En este sentido, cabe destacar que en los estudios de preformulación, se evidenció que aquellos HAM que presentaban altas proporciones de PEG 400, aportaban un sabor desagradable adicional y residual en la boca. Por eso motivo, con las sucesivas formulaciones desarrolladas, durante los estudios de preformulación, la cantidad de PEG 400 se redujo, se incorporó PEG 4000 y, en la formulación optimizada, también se adicionó ácido oleico. Dentro de todos los saborizantes utilizados, la combinación del sabor vainilla con la esencia de menta fue la que presentó mejores resultados para enmascarar el mal sabor de BZ y disminuir su efecto residual en la boca. Por otro lado, la incorporación de PEG de mayor punto de fusión, PEG 4000, incrementó notoriamente la capacidad de contracción de la mezcla durante su enfriamiento, lo que facilitó el desmolde adecuado de los HAM, sin necesidad de lubricar previamente los moldes. Por este motivo, la formulación presentada en la Tabla 6.4 fue la seleccionada para proceder a los ensayos farmacotécnicos y biofarmacéuticos de rigor, dirigidos a evaluar la calidad de la formulación optimizada. La caracterización realizada sobre los tres lotes producidos, generó los resultados que se presentaron en la Tabla 6.7.

La evaluación realizada, en lo que refiere a la uniformidad de peso y de contenido de los HAM (Tabla 6.7), permitió evidenciar que se ajustan a las especificaciones generales de Farmacopea Argentina para cualquier forma farmacéutica de uso oral (Farmacopea Argentina, 2014). Esto evidencia la reproducibilidad en los lotes de producción, ya que éstos presentan mínimas variaciones en los parámetros farmacotécnicos evaluados.

Por otra parte, el análisis morfológico realizado, permitió demostrar que, si bien BZ cristaliza cuando los HAM se enfrían, la cristalización es uniforme en toda la masa del HAM (Figura 6.5), lo que se podría adjudicar a la alta viscosidad de la formulación resultante, conferida por el agente gelificante (Liebermann et al., 1990; Vila Jato, 1997). Además, los cristales que se observaron se presentaron como aciculares, siendo ésta la forma más estable de los diferentes polimorfos de BZ.



(Honorato et al., 2014; Maximiano et al., 2011). El análisis de la forma cristalina resultante, se constituye en una importante herramienta, debido a que el estado de los sólidos influye directamente en la velocidad de disolución del F en el organismo (Martin, 1993). La formación de los cristales de BZ podría deberse a la disminución de la solubilidad de BZ durante el proceso de enfriamiento, por la reducción de la temperatura (Mota, Carneiro, Queimada, Pinho, & Macedo, 2009). El hecho de que el BZ se encuentre cristalizado, permitiría que su disolución en la boca se vea disminuida o enlentecida y, en consecuencia, su sabor amargo sería menos percibido por las papilas gustativas (Cram et al., 2009).

Por otra parte, la respuesta de un material en el régimen de viscoelasticidad lineal, está fuertemente condicionada con su estructura molecular, por esta razón, es una herramienta importante para la caracterización de materiales. Como se pudo observar, en los HAM formulados, con el paso del tiempo (a los 15 días) las propiedades elásticas se vieron levemente incrementadas (Figura 6.5), lo cual se pone de manifiesto por la leve disminución de la $\tan \delta$ (Tabla 5.8) (Bonferoni et al., 1995). Este comportamiento podría ser atribuido a la pérdida de agua de la formulación por evaporación y deshidratación de los HAM, durante su almacenamiento (Martin, 1993).

En lo que respecta a las perfiles de disolución de BZ (Figura 6.7), se pudo observar que desde los HAM triturados, la disolución de BZ, en los primeros tiempos, ocurre más rápido que desde los HAM enteros. Esto podría deberse al aumento de la superficie de contacto de la formulación con el medio de disolución (Martin, 1993). La realización de esta evaluación de los HAM triturados, estuvo fundamentada en simular el proceso de masticación de la formulación, previo a su deglución. Además, tanto los HAM enteros como los triturados presentaron una completa disolución del BZ > 85 %, antes de los 30 min, la cual fue marcadamente más rápida que desde los comprimidos de Radanil®. Además, si se los compara con el perfil de Radanil® pulverizado, presentado en la Figura 6.3, se puede observar que desde estas formulaciones, se disuelve mayor cantidad de BZ en menor tiempo. Las ventajas de los HAM, respecto del Radanil® entero o polvo, radica en contar con una forma farmacéutica adecuada para la población pediátrica y con una dosis de BZ que permitiría asegurar la eficacia y seguridad del tratamiento. Además, estas formulaciones como producto terminado, no requieren de agua para su administración, ya que se tratan de formas farmacéuticas masticables de fácil deglución. El perfil de disolución presentado por los HAM se enmarca dentro de las



formas farmacéuticas de liberación inmediata codificadas en la Farmacopea Argentina. Y si bien Radanil® debería presentar este tipo de comportamiento, en las condiciones ensayadas, puede evidenciarse que no cumple con este requerimiento farmacopeico (Farmacopea Argentina, 2014).

En lo que respecta a los comprimidos masticables, cabe destacar que, en estudios previos, se determinó que el saborizante de vainilla asociado con el acesulfame de potasio, como edulcorante artificial, enmascaró eficazmente el sabor metálico y amargo residual, que deja el BZ en la boca. Diferentes estudios de preformulación fueron desarrollados (Tabla 6.5) hasta arribar a la formulación optimizada de los comprimidos masticables (Tabla 6.6). Una vez determinada la composición de la fórmula optimizada, se elaboraron comprimidos masticables conteniendo dosis de BZ de 12,5; 25; 50 y 100 mg por unidad de dosificación. Se procedió a realizar los ensayos farmacotécnicos y biofarmacéuticos correspondientes, dirigidos a evaluar la calidad de la formulación optimizada. La caracterización realizada sobre los lotes producidos (200 comprimidos de cada formulación), generó los resultados que se presentan en la Tabla 6.9.

Como puede evidenciarse, los parámetros de dureza y friabilidad superaron ampliamente las especificaciones generales de Farmacopea Argentina para este tipo de formulaciones (Farmacopea Argentina, 2014). La uniformidad de peso fue aceptable y se correspondió con una alta uniformidad de contenido del BZ.

Desde el punto de vista de la evaluación biofarmacéutica *in vitro*, se destacó el tiempo de disgregación de los comprimidos (Figura 6.9), el cual fue < 10 min, en tanto que para la formulación de referencia fue ~ 25 min. Estos resultados se corresponden con los estudios de disolución de BZ (Figura 6.10), en donde se puede observar que, los comprimidos masticables presentan un velocidad de disolución muy rápida, el BZ se disuelve en más de un 85 % en 15 min (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, 2009; Food and Drug Administration, 2000). Esta velocidad de disolución de BZ fue marcadamente mayor que en los comprimidos de Radanil®.

En conjunto, los resultados obtenidos para las formulaciones sólidas (comprimidos masticables) y semisólidas (HAM), evidencian el desarrollo de dos nuevas alternativas farmacéuticas que presentan propiedades farmacotécnicas y biofarmacéuticas superadoras, frente al medicamento de referencia disponible. Los resultados se consideran alentadores en términos de las propiedades de disolución de BZ, como así también, en lo que refiere a la optimización del sabor, lo que podría



resultar en una mayor aceptación, por parte de los pacientes al tratamiento y, en consecuencia, un mayor cumplimiento de la terapia, particularmente en pediatría. Ambas formulaciones, se obtienen mediante la utilización de materiales, excipientes, procesos y equipamientos de uso frecuente en la industria farmacéutica, por lo que su producción es escalable (Tarragona et al., 2013). Además, las formulaciones desarrolladas presentan versatilidad posológica, ya que se obtuvieron con dosis de BZ de 12,5; 25; 50 y 100 mg, sin comprometer la facilidad de la producción ni la calidad del producto terminado.

Complementariamente, cabe destacar que la propuesta de preparación de los HAM, puede adaptarse a la farmacia galénica y desarrollarse en los servicios de farmacia institucionales, como un medicamento magistral, de manera de atender rápidamente la problemática del tratamiento de la enfermedad de Chagas, sobre todo en los niños, ya que desde fines de 2012-principios de 2013, se dispone de la producción nacional de BZ como ingrediente farmacéutico activo. Esta formulación, junto con la suspensión desarrollada, serían alternativas que permitirían dar respuestas, en el corto plazo, a la falta de disponibilidad de formulaciones, en formas farmacéuticas adecuadas, para el tratamiento de los pacientes pediátricos y neonatales, respectivamente.

6.7. Conclusiones parciales

Se desarrollaron formulaciones pediátricas de BZ, de utilidad para dar respuesta a la demanda insatisfecha de medicamentos no disponibles, para el tratamiento pediátrico de la enfermedad de Chagas. Estas formulaciones se obtuvieron en dosis y formas farmacéuticas adecuadas.

La suspensión desarrollada, a partir de los comprimidos comerciales, contiene BZ al 1 %, es estable al menos por 90 días y reúne los atributos de calidad requeridos.

Las formulaciones masticables presentan versatilidad posológica y se obtienen por procesos que pueden ser escalables. La caracterización farmacotécnica y biofarmacéutica, evidencia que éstas presentan atributos de calidad con alto grado de cumplimiento de las especificaciones farmacopeicas.

Estas formulaciones son alternativas interesantes, en términos de eficacia, seguridad y confiabilidad, que pueden ser preparadas en el servicio de farmacia institucional o transferidas al sector productivo, en el marco local de la producción



pública de medicamentos, para dar respuesta al tratamiento de los pacientes pediátricos y neonatales con enfermedad de Chagas.

6.8. Referencias

- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, A. (2009). Ministerio de Salud. Productos Medicinales. Disposición 758/2009. Criterios de Bioexención de Estudios de Bioequivalencia para medicamentos sólidos orales de liberación inmediata. Retrieved 22nd January, 2016, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/legislacion/medicamentos/Disposicion_ANMAT_758-2009.pdf
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, A. (2010). Ministerio de Salud de la Nación, Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Disposición 7667. Calidad microbiológica de los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles. Retrieved 22nd January, 2016, from http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2010/Dispo_7667-10.pdf
- Arias, L., Paradela, A., Concheiro, Á., Martínez, R., Regueira, A., & Vila, J. (1992). Farmacotecnia: formas farmacéuticas no estériles. In B. J. & A. Domínguez-Gil (Eds.), *Farmacia Hospitalaria* (2^o ed., pp. 465-485). Madrid: Editorial Medica Internacional.
- Bonferoni, M., Rossi, S., Ferrari, F., Bertoni, M., & Caramella, C. (1995). Influence of medium on dissolution-erosion behaviour of Na carboxymethylcellulose and on viscoelastic properties of gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 117(1), 41-48.
- Buontempo, F., Bernabeu, E., Glisani, R., Quiroga, E., Bregni, C., & Chiappetta, D. (2010). Carvedilol stability in paediatric oral liquid formulations. *Farmacia Hospitalaria*, 34(6), 293-297.
- Campi-Azevedo, A., Gomes, J., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Vitelli-Avelar, D., Sathler-Avelar, R., . . . Martins-Filho, O. (2015). Etiological treatment of Chagas disease patients with benzimidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. *Immunobiology*, 220(5), 564-574.
- Carlier, Y., & Torrico, F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 767-771.
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., & Vinas, P. A. (2011). Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(10), e1250.
- Cram, A., Breitkreutz, J., Desset-Bréthes, S., Nunn, T., Tuleu, C., & European Paediatric Formulation Initiative, E. (2009). Challenges of developing palatable oral paediatric formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 365(1), 1-3.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
- Chatelain, E., & Ioset, J. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDI model. *Drug Des Devel Ther*, 5, 175-181.
- Chatterjee, P., & Alvi, M. M. (2014). Excipients and Active Pharmaceutical Ingredients *Pediatric Formulations* (pp. 347-361): Springer.
- Díez-Gandía, A., Ajenjo, M. A., Navalón, A. G., Fernández, R. B., Sanz, A. B., & Díez-Domingo, J. (2010). *Palatabilidad de las soluciones de rehidratación oral en niños sanos de 6 a 9 años. Ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado y simple ciego*. Paper presented at the Anales de Pediatría.
- Engels, D., & Savioli, L. (2006). Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. *Trends Parasitol*, 22(8), 363-366.



- Fabiano, V., Mameli, C., & Zuccotti, G. V. (2011). Paediatric pharmacology: remember the excipients. *Pharmacological Research*, 63(5), 362-365.
- Farmacopea Argentina. (2014). Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 7ma ed. Retrieved December 17 th, 2015, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf
- Food and Drug Administration, F. (2000). Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. *Food and Drug Administration, Rockville, MD*. Retrieved 25st January, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>
- García, M., Manzo, R., & Jimenez-Kairuz, A. (2015). Extemporaneous benznidazole oral suspension prepared from commercially available tablets for treatment of Chagas disease in paediatric patients.
- Hennart, S., Wildeboer, W., Van Hee, P., & Meesters, G. (2010). Stability of particle suspensions after fine grinding. *Powder technology*, 199(3), 226-231.
- Herreros de Tejada, A. (1997). Guías para el Desarrollo de Servicios Farmacéuticos Hospitalarios: Formulaciones Magistrales Programa de Medicamentos Esenciales y Tecnología. División de Desarrollo de Sistemas y Servicios de Salud. OPS/OMS. Madrid, España.
- Honorato, S. B., Mendonça, J. S., Boechat, N., Oliveira, A. C., Mendes Filho, J., Ellena, J., & Ayala, A. P. (2014). Novel polymorphs of the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 389-394.
- Jones, D. (2008). *FASTtrack Pharmaceutics-Dosage Form and Design*. Pharmaceutical Press.
- Lamas, M. C., Villaggi, L., Nocito, I., Bassani, G., Leonardi, D., Pascutti, F., . . . Salomón, C. J. (2006). Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(2), 239-243.
- Leonardi, D., Salomón, C. J., Lamas, M. C., & Olivieri, A. C. (2009). Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1), 140-147.
- Liebermann, H. A., Lachman, L., & Schwartz, J. B. (1990). *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, vol. 2: Marcel Dekker, New York.
- Manarin, R., Lamas, M. C., Bottasso, E., Serra, E., Revelli, S., & Salomón, C. J. (2013). Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int*, 62(1), 79-81.
- Martin, A. (1993). *Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*: BI Waverly. Pvt Ltd.
- Maximiano, F. P., de Paula, L. M., Figueiredo, V. P., de Andrade, I. M., Talvani, A., Sá-Barreto, L. C., . . . Cunha-Filho, M. S. (2011). Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(3), 377-384.
- Maya, J., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R., & Morello, A. (2010). Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biological Research*, 43, 323-331.
- Moncayo, A., & Silveira, A. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*(1), 17-30.
- Morilla, M., Benavidez, P., Lopez, M., Bakas, L., & Romero, E. (2002). Development and in vitro characterisation of a benznidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1), 89-99.



- Morilla, M. J., Prieto, M. J., & Romero, E. L. (2005). Benzimidazole vs benzimidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 213-219.
- Mota, F. L., Carneiro, A. P., Queimada, A. J., Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2009). Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 499-507.
- Muñoz, J., Portús, M., Corachan, M., Fumadó, V., & Gascon, J. (2007). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), 1161-1162.
- Nash, R. A. (2007). Suspensions *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition* (pp. 3597-3610).
- Negrette, O. S., Mora, M. C., & Basombrio, M. A. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, 115(6), e668-e672.
- Pignon, F., Magnin, A., & Piau, J. M. (1996). Thixotropic colloidal suspensions and flow curves with minimum: Identification of flow regimes and rheometric consequences. *Journal of Rheology (1978-present)*, 40(4), 573-587.
- Ribeiro, I., Sevesik, A.-M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M. O., . . . Pecoul, B. (2009). New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), e484.
- Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2010). Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4), 576-588.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6th ed.): Pharmaceutical press.
- Schijman, A. G., Altcheh, J., Burgos, J. M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M. J., & Freilij, H. (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 441-449.
- Schofield, C., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, 22(12), 583-588.
- Sosa-Estani, S., Belizan, J. M., Alhabe, F., & Rubinstein, A. (2005). The need of a neonatal preparation for Chagas disease. *PLoS medicine*, 2(11).
- Tarragona, S., Salomón, C., Jiménez-Kairuz, Á., Lamas, M., Orlandi, S., Leonardi, D., . . . García, M. (2013). Diseño y preparación de formas farmacéuticas sólidas de Benzimidazol para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Rev. argent. salud publica*, 4(15), 6-13.
- USP33-NF28, U. S. P. C. (2010). The United States Pharmacopeia (USP) 33- National Formulary (NF) 28, Inc, Rockville, Maryland: United States Pharmacopeia Convention.: Inc.
- Vila Jato, J. (1997). Tecnología Farmacéutica-Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. *Editorial Síntesis, Madrid*, 75-142.
- World Health Organization, W. (2002). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. *Tech. Rep. Ser.* (905), 1-109.
- World Health Organization, W. (2015a). Chagas disease. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. Retrieved July 22nd, 2015, from <http://www.who.int/tdr/research/ntd/chagas/en/>
- World Health Organization, W. (2015b). The international pharmacopoeia. 5th. Retrieved 2nd, 2016, from <http://apps.who.int/iphint/en/p/doc/f/>
- Yeung, V. W., & Wong, I. C. (2005). When do children convert from liquid antiretroviral to solid formulations? *Pharmacy World and Science*, 27(5), 399-402.



CAPÍTULO 7:

**VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE
HPLC PARA CUANTIFICAR BZ EN PLASMA
HUMANO**



Capítulo 7:

Validación de una metodología de HPLC para cuantificar BZ en plasma humano

El presente capítulo versa sobre el desarrollo y validación de una metodología bioanalítica para determinar BZ, cualitativa y cuantitativamente, en una matriz biológica particular, que es el plasma humano.

La validación de la metodología se realiza sobre la base de los criterios de validación codificados, de acuerdo con las especificaciones de la Guía para la Industria acerca de la validación de métodos bioanalíticos de la US Food and Drug Administration (Food and Drug Administration, 2001).

7.1. Introducción

Como se mencionó en el capítulo 6 *Formulaciones pediátricas*, la necesidad de contar con medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, en formas farmacéuticas adecuadas para los pacientes neonatos, niños y adultos mayores, está aún insatisfecha. Esto motivó el desarrollo y evaluación de las formulaciones pediátricas descritas en el capítulo 6, con el fin de poder suplir las deficiencias de los tratamientos actuales en estas poblaciones etarias.

El objetivo final en el diseño de un medicamento, consiste en lograr una óptima eficacia con un máximo de seguridad y confiabilidad (Joseph & Gwen, 2002). En consecuencia, la comprensión de los factores que condicionan la eficacia de un medicamento, requiere del estudio de un conjunto de aspectos relacionados con su acción medicamentosa.

Como se describió en el capítulo 1 *Introducción general y objetivos*, luego de la administración extravascular de un medicamento (por ejemplo por vía per-oral) cuyo F posee acción sistémica, la acción medicamentosa puede visualizarse y entenderse como la evolución temporal del F en el organismo, mediante la secuencia de eventos cinéticos, denominado procesos LADME (Berrozpe, Lanao, Delfina, & Campmany, 1997) y en ésta, se pueden distinguir las tres fases características que gobiernan la actividad biológica de un determinado F, a saber: fase farmacéutica o



biofarmacéutica, fase farmacocinética y fase farmacodinámica (Galbis Pérez, 2000; Velasco Martín, 2001).

Durante la fase farmacocinética, el proceso de absorción y, consecuentemente, los eventos siguientes, dependen de la concentración de F disuelto en el sitio en el cual se produce la absorción. Los procesos previos a la absorción, tales como la disgregación, disolución y difusión, pueden ser modulados o influenciados, dentro de ciertos límites. De esta manera, se puede incidir sobre la fase farmacéutica, por factores tales como: el tamaño de partículas, la formación de complejos, la presencia de sales, los excipientes y el proceso de formulación, entre otros.

Por su parte, los perfiles de concentración plasmática del F en función del tiempo, se vinculan al inicio y a la duración del efecto farmacodinámico del F en el sitio de acción. En tanto que, la concentración que se alcanza en los tejidos es función de la concentración plasmática del F, dado que se establece un equilibrio entre las moléculas de éste que se encuentran en el sistema circulatorio y las que acceden a la biofase (Berrozpe et al., 1997).

En este sentido, se propuso llevar a cabo estudios clínicos Fase IV en voluntarios adultos sanos (Friedman, Furberg, DeMets, Reboussin, & Granger, 2010), en el marco de un proyecto de investigación, previo a la evaluación de la eficacia terapéutica en pacientes pediátricos. En este proyecto, se propuso evaluar las formulaciones pediátricas desarrolladas, bajo la forma de comprimidos e hidrogeles azucarados (Universidad Nacional de Córdoba, 2012).

Sin embargo, para poder abordar estos estudios, se requiere del conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de BZ, las cuales aún no han sido claramente dilucidadas. En consecuencia, resulta imperativo poder contar con una metodología bioanalítica validada que permita determinar los parámetros farmacocinéticos de BZ, a los fines de poder abordar, posteriormente, los ensayos clínicos previamente mencionados y otros ensayos de biodisponibilidad¹(Food and Drug Administration, 1999).

Por su parte, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), puede ser considerada una técnica bioanalítica adecuada para la cuantificación de BZ en plasma humano. Dada la sensibilidad, precisión y aplicabilidad de ésta a una amplia variedad de moléculas, su uso en laboratorios clínicos resulta de gran utilidad para monitorear

¹ Se define a la biodisponibilidad como la velocidad y magnitud a la cual un ingrediente activo o una entidad terapéutica es absorbida desde un producto y está disponible en el sitio de acción (Food and Drug Administration, 1999).

una amplia variedad de agentes terapéuticos, estudiar su farmacocinética y seguridad (Jehl, Gallion, & Monteil, 1990; Meyer, 2013; Skoog, Holler, Nieman, & Gómez, 2001).

El desarrollo de un método bioanalítico para la cuantificación de un F por HPLC es un proceso complejo, debido a la amplia existencia de variedad de equipos, columnas cromatográficas, fase móvil o eluyentes y parámetros operacionales involucrados.

En este sentido, se propuso validar una metodología bioanalítica mediante HPLC, para la cuantificación de BZ en plasma humano, de utilidad para su posterior aplicación en estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia. Cabe destacar estos estudios serán desarrollados en una etapa posterior al doctorado; sin embargo, la validación de la metodología bioanalítica desarrollada, permite avanzar hacia los estudios farmacocinéticos con mayor celeridad.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Reactivos utilizados

Como fue descripto en el capítulo 2 *Principios activos y excipientes seleccionados*, el BZ fue extraído y purificado desde los comprimidos comerciales disponibles (Radanil[®], Roche, Argentina).

Además, se utilizó: acetonitrilo (grado HPLC, Sintorgan[®]), dimetilsulfóxido (DMSO) (grado farmacéutico, Anedra[®]), benzocaína como estándar interno (SI) (grado farmacéutico, Parafarm[®]) y metronidazol (grado farmacéutico, Parafarm[®]). Agua bidestilada y desionizada (agua Milli Q, utilizando sistema de purificación Simplicity[®], Millipore, Brazil).

El plasma utilizado fue gentilmente donado por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

7.2.2. Equipamiento y condiciones cromatográficas

La metodología utilizada consistió en una cromatografía líquida de alta resolución isocrática, en fase reversa.

Se utilizó un equipo de HPLC (Waters 1525 pump) con un inyector automático (Waters[®] 717 plus autosampler, EEUU). La fase estacionaria consistió en una columna C18, de fase reversa (Phenomenex, Luna[®]; 250 x 4.6 mm; 5 μ m de tamaño



de partícula) con guardacolumna (Phenomenex®). La temperatura del horno se mantuvo en 25 °C utilizando termostatizador (Waters® 1500 series column heater EEUU).

Como fase móvil se utilizó una mezcla agua:acetonitrilo en proporción 60:40. El volumen de inyección fue de 100 µL y la velocidad de flujo se fijó en 0,9 mL/min.

La detección de BZ en las muestras se realizó con un detector PDA UV (PDA detector 2296, Waters®, EEUU) a una $\lambda=324$ nm. Los datos fueron colectados y analizados utilizando el software específico Empower PRO 1154 (Waters®, EEUU).

Adicionalmente, se utilizó un desgasificador al vacío para acondicionar los medios, previo a la inyección de las muestras en el equipo de HPLC; un agitador (Shaker Vortex Fbr Eternity, Decalab®, Argentina) para homogeneizar las muestras y una centrifuga para tubos *ependorf* (VT-1675, Cavour®, Argentina).

7.2.3. Preparación y procesamiento de las soluciones de calibración y de las muestras de BZ en plasma

7.2.3.1. Preparación de las soluciones stock

Se midió exactamente una cantidad de, aproximadamente, 500 mg de BZ, los cuales se disolvieron en 10 mL de DMSO. Esta solución se enrasó a un volumen de 50 mL con fase móvil. Posteriormente, se realizó una dilución 1/10 con fase móvil y, de esta manera, se obtuvo la solución stock "A" con una concentración de BZ de 1 mg/mL.

Por otra parte, se midió exactamente una cantidad de, aproximadamente, 15 mg de SI, los cuales se disolvieron en 1,5 mL de DMSO y se enrasó a un volumen final de 25 mL con agua Milli Q. De esta manera, se obtuvo la solución stock "B" con una concentración de SI 0,6 mg/mL.

7.2.3.2. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se utilizó plasma como matriz biológica. A seis alícuotas de 500 µL de plasma se le adicionaron 300 µL de solución stock "B" y 200 µL de la solución stock "A" en diferentes diluciones, para obtener seis soluciones estándar de concentración final de BZ equivalentes a: 1,6; 5,3; 13,3; 40,0; 66,0; 100,0 µL/mL. Luego se adicionaron 2 mL de acetonitrilo, como precipitante de proteínas y se enrasó a volumen final de 3 mL con fase móvil. Estas muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min y, posteriormente, se separó el sobrenadante, el cual se filtró e inyectó en el equipo de HPLC.



7.2.4. Validación del método analítico

7.2.4.1. Construcción y análisis de la curva de calibración

La curva de calibración fue construida utilizando plasma humano fresco enriquecido con BZ y SI, y se graficó la relación de áreas entre las sustancias en función de la concentración. De esta manera se obtuvo la Ecuación 7.1 como resultado de la curva de calibración.

$$\frac{A_{BZ}}{A_{SI}} = m \frac{[BZ]_T}{[SI]_T} + b \quad \text{Ecuación 7.1.}$$

En donde A_{BZ} es el área de benznidazol, A_{SI} es el área de benzocaina, $[BZ]_T$ es la concentración teórica de BZ ($\mu\text{g/mL}$), $[SI]_T$ es la concentración teórica de benzocaina ($\mu\text{g/mL}$), m es la pendiente y b es la ordenada al origen que se corresponde cuando la concentración de benznidazol es igual a $0 \mu\text{g/mL}$.

7.2.4.2. Criterios de validación

En concordancia con la Guía para la Industria acerca de la validación de métodos bioanalíticos de la US Food and Drug Administration (Food and Drug Administration, 2001), son siete los puntos que deben ser considerados y tenidos en cuenta al momento de evaluar una metodología analítica sobre la base de los criterios de validación codificados. Entre éstos se encuentran: linealidad, precisión y exactitud, recuperación, límite de detección, límite mínimo de cuantificación, especificidad y estabilidad.

7.2.4.2.1. Linealidad

Para la validación del método analítico, se estableció el rango de linealidad sobre la base del promedio de tres curvas de calibración, un duplicado realizado en un mismo día y una corrida cromatográfica (unuplicado) realizada al día siguiente.

Se graficó el área de BZ en relación al área de SI en función de la concentración de BZ. Las concentraciones analizadas fueron las seis mencionadas previamente en el apartado 7.2.3.2. correspondiente a la preparación de las muestras.

De la curva de la curva de regresión lineal promedio del triplicado, se evaluó el coeficiente de correlación cuadrático (r^2).



7.2.4.2.2. Precisión y exactitud

La exactitud del método analítico se determinó mediante un estudio de recuperación, a tres concentraciones distintas (1,6; 13,3 y 100,0 µg/mL) por quintuplicado. Todas las determinaciones se realizaron el mismo día y durante tres días consecutivos, para evaluar el error porcentual (Er %) intra- e inter-día, respectivamente. Con la misma metodología se determinó la precisión del método, utilizando el coeficiente de variabilidad (CV %). De esta manera, la precisión y exactitud se determinaron sobre la base de las Ecuaciones 7.2 y 7.3, respectivamente.

$$CV (\%) = \frac{DE}{X_{\text{promedio}}} 100 \quad \text{Ecuación 7.2.}$$

Donde CV (%) es el coeficiente de variabilidad, DE es la desviación estándar de las relaciones de áreas y X_{promedio} es la media de las relaciones de áreas determinadas.

$$Er (\%) = \frac{[BZ]^E - [BZ]^T}{[BZ]^T} 100 \quad \text{Ecuación 7.3.}$$

Donde Er (%) es la inexactitud o porcentaje de error, $[BZ]^E$ es la concentración de benznidazol experimental y $[BZ]^T$ es la concentración teórica de benznidazol.

A partir de estos parámetros se consideró aceptable una variabilidad e inexactitud inferior al 20 %, para el límite inferior de cuantificación, e inferior al 15 %, en los puntos restantes.

7.2.4.2.3. Recuperación

La recuperación (R) se determinó por medio de la comparación analítica de los resultados obtenidos para BZ extraído de las muestras plasmáticas, en relación con las muestras sin extraer (100 % de recuperación). Se evaluaron tres concentraciones (1,6; 13,3 y 100,0 µg/mL) por triplicado cada una de ellas.

A partir de estos resultados, se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con la Ecuación 7.4.

$$R (\%) = \frac{\left(\frac{A_{BZ}^E}{A_{St}^E} \right)}{\left(\frac{A_{BZ}^T}{A_{St}^T} \right)} 100 \quad \text{Ecuación 7.4.}$$



Donde A_{BZ}^E y A_{SI}^E son las áreas obtenidas luego de la inyección de soluciones estándar a una determinada concentración y A_{BZ}^T y A_{SI}^T son las áreas esperadas o teóricas a esa concentración, calculadas sobre la base de la curva de calibración; en ambos casos para benznidazol y benzocaína, respectivamente.

7.2.4.2.4. Límite de detección

Para la determinación del límite de detección se prepararon varias muestras conteniendo BZ en concentraciones conocidas y crecientes, en un amplio rango de concentraciones, en presencia del SI y se inyectaron en el equipo de HPLC. El límite de detección fue establecido por la evaluación visual de la concentración mínima de BZ en la que la señal de éste, se podía detectar de forma fiable. Se estableció como criterio que la señal de BZ fuera tres veces mayor respecto de la línea de base de la corrida cromatográfica o ruido del equipo.

7.2.4.2.5. Límite inferior de cuantificación de detección

El límite inferior de cuantificación es la cantidad mínima de analito que se puede determinar con una precisión y exactitud no menor al 20 %. Ambos parámetros fueron determinados por el análisis del coeficiente de variabilidad y el error porcentual, respectivamente. Para la determinación del límite inferior de cuantificación se utilizó una muestra de BZ concentración 1,6 $\mu\text{g/mL}$ en presencia del SI. Este ensayo se realizó por quintuplicado.

7.2.4.2.6. Especificidad

La especificidad se evaluó mediante el análisis del tiempo de retención de metronidazol (seleccionado por ser una sustancia relacionada debido a la analogía estructural) frente a BZ, en una misma muestra conteniendo el SI.

7.2.4.2.7. Estabilidad

7.2.4.2.7.a. Estabilidad en ciclos de congelado-descongelado

Se determinó la estabilidad de BZ después de tres ciclos de congelado y descongelado a $-5\text{ }^\circ\text{C}$. Se trabajó con muestras de BZ de concentración 13,3 y 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Las determinaciones fueron realizadas el mismo día. Este ensayo se realizó por triplicado.



7.2.4.2.7.b. Estabilidad post-preparativa

Se determinó la estabilidad de tres muestras de BZ de concentración 1,6; 13,3 y 100 $\mu\text{g/mL}$ luego de 24 h de su preparación. Este ensayo se realizó por triplicado.

Tanto para la estabilidad en ciclos de congelado-descongelado, como para la estabilidad post-preparativa, se compararon los resultados obtenidos de estas determinaciones con los de las muestras frescas (preparadas en el momento). A tal fin, se utilizó la Ecuación 7.5 para el análisis.

$$S (\%) = \frac{\left(\frac{A_{\text{BZ}}^j}{A_{\text{SI}}^j} \right)}{\left(\frac{A_{\text{BZ}}^c}{A_{\text{SI}}^c} \right)} 100 \quad \text{Ecuación 7.5.}$$

Donde A_{BZ}^j y A_{SI}^j son las áreas de benznidazol y benzocacina, respectivamente, luego de los ciclos de congelado y descongelado o luego de las 24 h; y A_{BZ}^c y A_{SI}^c son las áreas de benznidazol y benzocacina control, correspondiente a las muestras frescas.

7.3. Resultados

7.3.1. Estudio por HPLC de BZ en plasma humano

Bajo las condiciones experimentales descriptas anteriormente, el BZ y el SI eluyeron con un tiempo de retención de 6,3 – 7,0 min y 11,0 – 12,0 min, respectivamente. Los cromatogramas correspondientes a plasma libre de BZ y en presencia de éste, se muestran en la Figura 7.1 a y b, respectivamente.

7.3.2. Parámetros de validación

A partir del análisis de la relación de área en función de la concentración de BZ, en el rango de concentraciones de BZ evaluadas (1,6 – 100 $\mu\text{g/mL}$), se pudo observar que el promedio de las tres curvas de calibrado realizadas responden a las características de una función lineal con ecuación:

$$\frac{A_{\text{BZ}}}{A_{\text{SI}}} = 0,144 \frac{[\text{BZ}]_T}{[\text{SI}]_T} + 0,0376$$

El valor del coeficiente de correlación cuadrático (r^2) obtenido a partir de la regresión lineal fue 0,9987.



El análisis de los parámetros evaluados de precisión y exactitud intra- e inter-día, en las tres concentraciones de BZ evaluadas, se resumen en la Tabla 7.1.

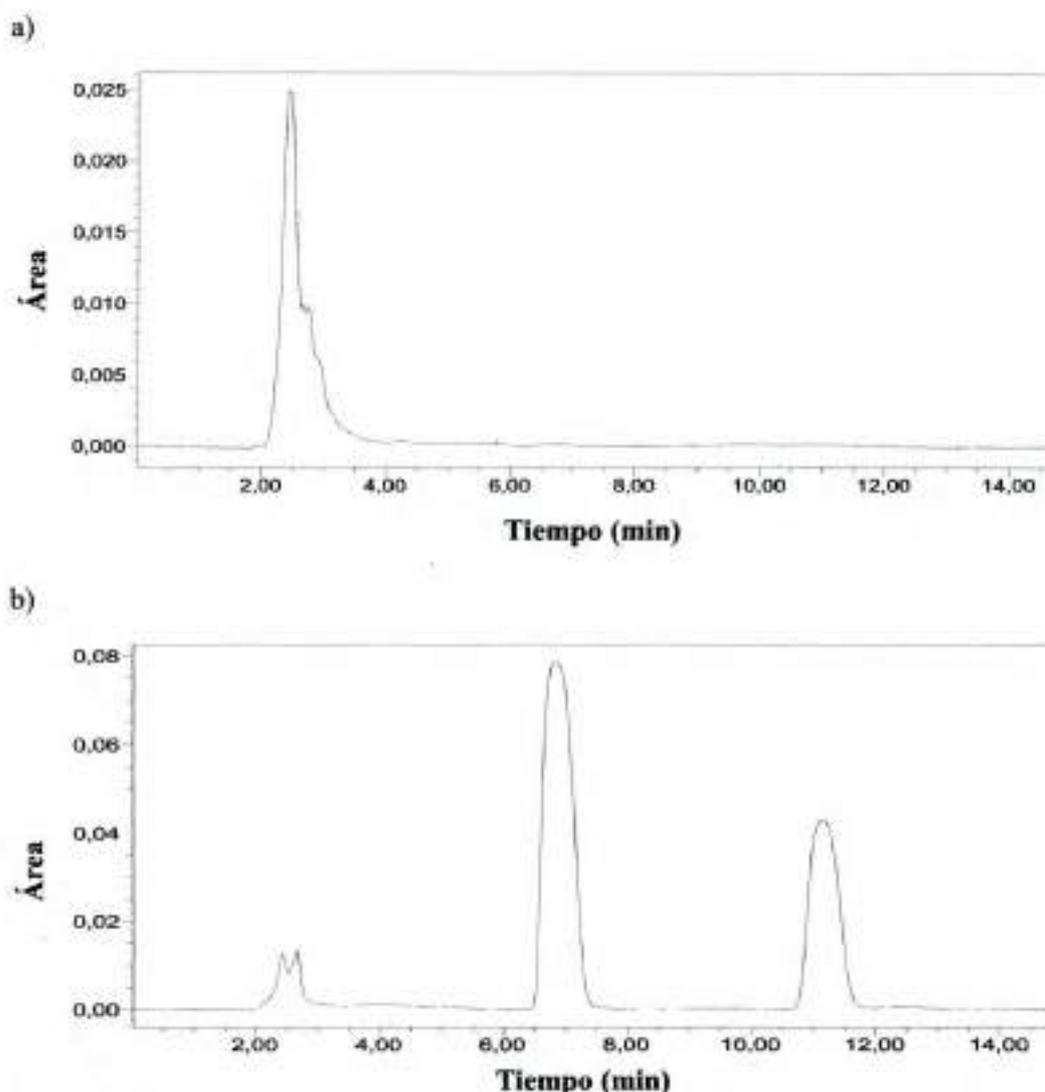


Figura 7.1. Cromatogramas obtenidos para el plasma humano a) libre de BZ y b) en presencia de BZ y SI.

El límite de detección fue de $0,07 \mu\text{g/mL}$ y el límite inferior de cuantificación fue $1,6 \mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos respecto de CV % y Er % son aceptables, ya que, en el límite inferior de cuantificación, que se corresponde con una concentración de BZ de $1,6 \mu\text{g/mL}$, los parámetros de precisión y exactitud son $< 20 \%$. En tanto que, en los otros valores de concentración, en todos los casos, estos parámetros son $< 15 \%$, tal como se observa en la Tabla 7.1.



Tabla 7.1. Resultados del análisis de precisión y exactitud en muestras de BZ en plasma humano, intra-día (N=5) e inter-día (N=15).

Parámetro	Período	Concentración de BZ (µg/mL)		
		1,6	13,3	100,0
CV (%)	Intra-día	3,22	6,19	1,60
	Inter-día	13,57	8,17	6,44
Er (%)	Intra-día	5,49	0,68	2,6
	Inter-día	1,51	5,02	4,70

Criterio de aceptabilidad para CV % (precisión) y Er % (exactitud): < 20 % en el límite inferior de cuantificación y < 15 % en las concentraciones restantes.

Respecto de la recuperación media, ésta se mantuvo constante para diferentes concentraciones de BZ. Los resultados obtenidos del R % fueron 101,2 %; 100,7 % y 100,4 % para concentraciones de BZ de 1,6; 13,3 y 100,0 µg/mL, respectivamente.

A partir del análisis de estabilidad se pudo determinar que no hay pérdida de BZ luego de tres ciclos de congelado y descongelado, al igual que luego de 24 h de la preparación de las muestras, en las dos concentraciones evaluadas. Los resultados obtenidos en relación con el parámetro de estabilidad se presentan en la Tabla 7.2.

El análisis de la especificidad permitió observar que no hay superposición en los tiempos de retención de metronidazol y BZ, ya que presentan tiempo de retención de 3,5 – 4,0 min y 6,3 – 7,0 min, respectivamente. En la Figura 7.2 se presenta el cromatograma obtenido en el estudio de especificidad, en donde se evidencian los tres picos correspondientes a las tres diferentes sustancias que contiene la muestra, a saber: metronidazol, BZ y SI.

Tabla 7.2. Resultados de los estudios de estabilidad, expresado como % de BZ cuantificado (S %) luego de 24 h de preparadas las muestras o luego de someterlas a tres ciclos de congelado-descongelado, respecto de muestras frescas.

Estabilidad	S %	
	[BZ]=13,3 µg/mL	[BZ]=100 µg/mL
Post-preparativa (luego de 24 h)	103,6 %	105,9 %
Ciclos de congelado-descongelado	111,2 %	110,8 %

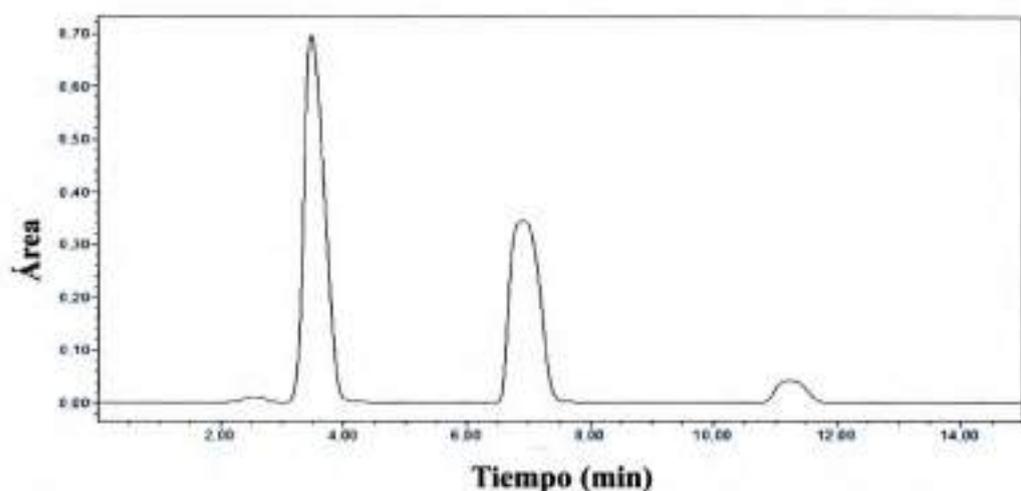


Figura 7.2. Cromatograma obtenido del análisis de especificidad frente a otro antimicrobiano: BZ (tiempo de retención 6,3-7,0 min), metronidazol (tiempo de retención 3,5 - 4,0 min) y SI (tiempo de retención 11,0 - 12,0 min)

7.4. Discusión

Se desarrolló un método bioanalítico específico para cuantificar BZ en plasma humano, con adecuada especificidad, sensibilidad, precisión y exactitud, que cumple con los criterios bioanalíticos. Este método permite la determinación rápida de BZ en plasma humano de una manera sencilla, ya que el procesamiento de las muestras se realiza en pocos pasos.

La correlación entre la concentración de BZ y la relación de áreas de éste y del SI fue excelente, en el rango de concentraciones de 1,6 – 100,0 $\mu\text{g/mL}$ analizadas, evidenciado por el valor de $r^2 > 0,99$. La linealidad del método bioanalítico desarrollado permitió determinar que, los resultados de las regresiones lineales, presentan un comportamiento lineal a la concentración del BZ, dentro del intervalo de concentraciones analizado.

El análisis de la precisión, como medida del grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando método se aplica repetidamente a alícuotas de una muestra homogénea, permitió establecer que el método desarrollado es preciso, ya que el porcentaje de imprecisión analizado mediante el coeficiente de variabilidad (CV %), se encuentra dentro de los parámetros establecidos (Food and Drug Administration, 2001). El método desarrollado es exacto, en la medida que presenta proximidad entre el valor obtenido y el considerado de referencia o real. Esto se evidenció a partir del porcentaje de inexactitud (Er %), el cual se encuentra dentro de los parámetros establecidos (Food and Drug Administration, 2001).



Por su parte, en los ensayos la precisión intra-día (quintuplicado de cada concentración) se obtuvieron valores de 1-6 % de coeficiente de variabilidad, en los estudios de precisión inter-día (quintuplicado por concentración determinado en tres días consecutivos) se obtuvieron valores de coeficiente variabilidad de 6-14 %. Además, la exactitud fue ≥ 95 % en todos los casos (inter- e intra-día), lo cual implica un alto grado de precisión y exactitud en los resultados obtenidos, que evidencian una metodología bioanalítica adecuada para la cuantificación de BZ en plasma humano (Food and Drug Administration, 2001).

Como se observó en los resultados obtenidos, el análisis de recuperación permitió demostrar que el método desarrollado es analíticamente válido y permite recuperar ~ 100 % de BZ en todas las concentraciones evaluadas, lo que da cuenta de que no hay pérdidas de BZ durante el procesamiento.

Por su parte, el límite de detección que refiere a la concentración más baja de BZ que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una determinada muestra bajo las condiciones experimentales establecidas, permitió observar que es marcadamente inferior al valor de las concentraciones analizadas ($0,07 \mu\text{g/mL}$), ya que a partir de ese valor de concentración de BZ la señal de éste es claramente diferenciable del ruido del equipo o línea de base.

Asimismo, el límite de cuantificación como medida de la menor concentración de BZ que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas, fue $1,6 \mu\text{g/mL}$. Este límite es aceptable y no tiene ningún impacto en términos de significancia clínica ya que los niveles en sangre que se cuantifican de BZ, luego de la administración del tratamiento para la enfermedad de Chagas, se encuentran en valores superiores a $3 \mu\text{g/mL}$ (Guerrero et al., 2011).

El análisis de la especificidad es de gran utilidad para evaluar la capacidad del para determinar inequívocamente el BZ en presencia de otros compuestos que podrían estar presentes en la muestra, tales como: impurezas, productos de degradación, entre otros. Este análisis, permitió determinar que frente al otro antimicrobiano analizado, perteneciente a la familia de los azoles (metronidazol), no se observan interferencias en los tiempos de retención, lo cual se traduce en una alta especificidad del método para cuantificar BZ en presencia de una sustancia relacionada o análogo estructural.

Finalmente, el análisis de la estabilidad realizado, tanto frente a sucesivos ciclos de congelado y descongelado, así como luego de 24 h de preparación de la muestra,



permitió evidenciar que no se produce degradación del BZ en las condiciones evaluadas y que puede ser mantenido en esas condiciones o someterse a esos procesos sin que se vea comprometida su estabilidad en las muestras de plasma (Food and Drug Administration, 2001). Esto permite ciertas flexibilidades al momento de manipular matrices biológicas, ya que dentro de los tiempos y condiciones evaluadas el BZ permanece estable y no sufre degradación.

7.5. Conclusiones parciales

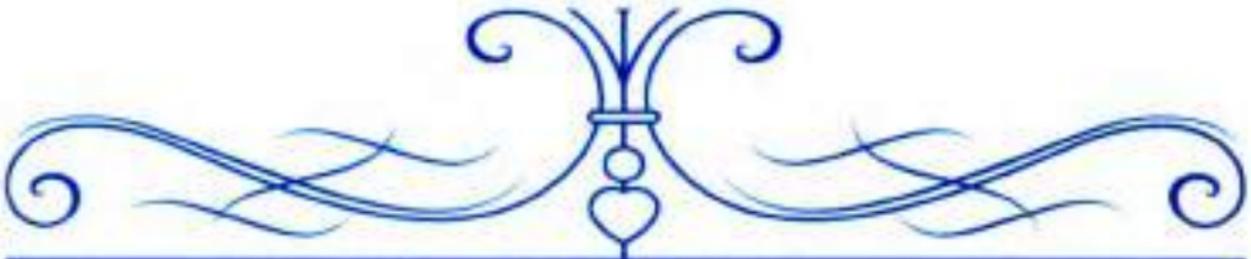
La metodología de cromatografía líquida de alta resolución isocrática permite determinar cualitativa y cuantitativamente BZ en la matriz biológica plasma humano. El método desarrollado no requiere de costosos procedimientos de extracción para purificar el BZ de la matriz y el tiempo de retención que éste exhibe es apropiado para ser utilizado en un ensayo clínico. Esta metodología demostró ser rápida, sencilla, sensible, precisa, exacta, selectiva y económica. Además, cumple con los lineamientos de la guía para la validación de métodos bioanalíticos de la US Food and Drug Administration. En consecuencia, se constituye en una herramienta de gran valor para poder y es plausible de ser utilizada para posteriores estudios de farmacocinética, toxicidad, bioequivalencia, entre otros, en voluntarios sanos.

7.6. Referencias

- Berrozpe, J., Lanao, J., Delfina, J., & Campmany, A. (1997). *Biofarmacia y Farmacocinética*. Madrid, España: Síntesis.
- Food and Drug Administration, F. (1999). Guidance for Industry: BA and BE Studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations. Retrieved 22nd January, 2016, from http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3995B1_07_GFI-BioAvail-BioEquiv.pdf
- Food and Drug Administration, F. (2001). Guidance for industry: bioanalytical method validation. Retrieved 28 st January, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
- Friedman, L. M., Furberg, C., DeMets, D. L., Reboussin, D. M., & Granger, C. B. (2010). *Fundamentals of clinical trials* (Vol. 4): Springer.
- Galbis Pérez, J. A. (2000). Absorción, distribución y excreción de fármacos. In J. A. Galbis Pérez (Ed.), *Panorama actual de la química farmacéutica* (Vol. 5, pp. 65-83). Madrid, España: Universidad de Sevilla.
- Guerrero, L., Pinazo, M. J., Posada, E., Gascón, J., Ribas, J., & Soy, D. (2011). A high-performance liquid chromatographic method for benzimidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(1), 77-82.
- Jehl, F., Gallion, C., & Monteil, H. (1990). High-performance liquid chromatography of antibiotics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 531, 509-548.
- Joseph, R. R., & Gwen, M. J. (2002). Sustained-and Controlled-Release Drug-Delivery Systems *Modern Pharmaceutics, Fourth Edition*: CRC Press.
- Meyer, V. R. (2013). *Practical high-performance liquid chromatography*: John Wiley & Sons.



- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., & Gómez, M. d. C. M. (2001). Principios de análisis instrumental.
- Universidad Nacional de Córdoba, U. (2012). Res 373_12 Anexo - Subsidios Proyectos C. Retrieved 26 January, 2016, from <http://www.unc.edu.ar/investigacion/financiamiento/subsidios-e-incentivos/parainvestigacion/res-373-12-anexo-subsidios-proyectos-c.pdf>
- Velasco Martín, A. (2001). Absorción, distribución y eliminación de fármacos. In A. Velasco Martín (Ed.), *Compendio de Farmacología General* (pp. 23-51). Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos S.A.



CAPÍTULO 8:

**CONCLUSIONES GENERALES,
PROYECCIONES Y PERSPECTIVAS**



Capítulo 8:

Conclusiones generales, proyecciones y perspectivas

8.1. Conclusiones generales

El trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral representa una valiosa contribución al conocimiento científico actual sobre la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas. Como se ha mencionado en los capítulos precedentes, esta enfermedad es endémica en América Latina y las estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud indican que en Argentina habría más de 7 millones de personas expuestas y más de 1,5 millones de personas infectadas (Pan American Health Organization, 2015). Esto evidencia la alta prevalencia de esta enfermedad endémica en nuestro país, que fundamentalmente afecta a las regiones más vulnerables socioeconómicamente; situación que ha llevado a la OMS catalogarla como una “enfermedad desatendida u olvidada” (World Health Organization, 2015). Además, de acuerdo con recientes modelos computacionales, esta enfermedad impone en el mundo una gran carga económica, de aproximadamente \$ 7 billones al año, lo cual es similar o sustancialmente mayor a la carga mundial existente para otras patologías, como cáncer u otras enfermedades de reconocida incidencia global, como por ejemplo cólera y rotavirus (Lee, Bacon, Bottazzi, & Hotez, 2013).

El tratamiento actualmente disponible, se basa en los fármacos (F) nitroheterocíclicos, benznidazol (BZ) y nifurtimox, que son parcialmente eficaces. Ambos presentan una actividad antichagásica significativa en la fase aguda, con 60 – 80 % de cura parasitológica en los pacientes tratados (Urbina & Docampo, 2003; Von, Zaragoza, Jones, Rodriguez-Morales, & Franco-Paredes, 2007). Sin embargo, el tratamiento con éstos induce frecuentes efectos adversos, especialmente en los adultos (Pinazo et al., 2010; Urbina & Docampo, 2003).

En este sentido, si bien muchos compuestos han mostrado prometedora actividad anti-*T. cruzi*, la poca estandarización entre los protocolos empleados, en los diferentes grupos de investigación, ha limitado el desarrollo y avance de estudios posteriores, y muchos trabajos se han detenido luego de publicar sus resultados (Ribeiro et al., 2009).



En este contexto, la escasez de tratamientos eficaces y seguros motivó el desarrollo de esta tesis doctoral, a los fines de generar conocimiento científico y tecnológico interdisciplinario, para cumplir con todas las etapas involucradas en la I+D propuesta y aportar al diseño y desarrollo de nuevos sistemas farmacoterapéuticos, con énfasis en el abordaje de la problemática de un modo integral, centrado en la optimización de la eficacia, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa.

En este sentido, se desarrollaron nuevos sistemas farmacoterapéuticos y la evaluación de sus propiedades permitió evidenciar que éstos ofrecerían ventajas respecto de las formulaciones que se utilizan actualmente.

Se realizaron diferentes actividades para el logro de los objetivos propuestos. Se utilizaron PE como portadores de los F tripanocidas, BZ y clomipramina (CMP), para el diseño y desarrollo de sistemas de liberación modificada (SLM). Como se detalló, algunos PE han sido utilizados empíricamente, sobre la base de sus propiedades generales como macromoléculas. Sin embargo, en las dos últimas décadas, diversas aplicaciones han surgido en relación con sus propiedades específicas, las cuales podrían aportar beneficios en el diseño y desarrollo de sistemas farmacoterapéuticos. En particular, sus características como portadores de F constituyen una propiedad de suma relevancia en el área de la tecnología farmacéutica.

Los estudios realizados en este trabajo de tesis doctoral, amplían y profundizan los conocimientos actuales sobre la utilización de PE como portadores de F. En particular, se revelaron nuevas potencialidades de la utilización de diferentes polimetacrilatos (EuE, EuL, EuLD, EuS y EuFS) y polisacáridos (Chi y AA) como portadores de BZ y CMP, que no habían sido estudiadas previamente.

Se diseñaron y caracterizaron nuevos SLM constituidos por la interacción iónica entre dos PE (CIPE) que vehicularon BZ, y entre un PE aniónico y CMP, los cuales fueron caracterizados a través de una amplia batería de estudios para la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas y los atributos farmacotécnicos y biofarmacéuticos, que permitieron visualizar las potenciales aplicaciones de los sistemas obtenidos.

Los CIPE cargados con BZ se obtuvieron mediante una metodología simple y reproducible, extrapolable a su obtención en mayor escala.

La caracterización fisicoquímica de estos sistemas permitió evidenciar la interacción iónica entre los polielectrolitos (PE); sin embargo, no se observaron



marcadas diferencias entre los complejos interpolielectrolitos (CIPE) obtenidos en los diferentes medios de interacción y las mezclas físicas (MF) correspondientes.

Las micropartículas desarrolladas se obtuvieron con un alto porcentaje de rendimiento y exhibieron óptimas propiedades reológicas, adecuadas para formular estos sistemas en cápsulas, con la potencialidad de poder combinar diferentes CIPE con propiedades de liberación de BZ diferenciadas; a los fines de diseñar sistemas combinados que permitan proveer una dosis de ataque de BZ y luego una liberación controlada en el tiempo. Esto se podría aprovechar por las propiedades peculiares conferidas por las diferentes composiciones de los CIPE desarrollados y la influencia del medio de interacción utilizado para su desarrollo, que dan lugar a la obtención de sistemas con diferentes propiedades de liberación de BZ.

En lo que respecta a los sistemas portadores de CMP, éstos fueron obtenidos por interacción electrostática, basados en la plataforma PE-F desarrollada en nuestro grupo de investigación. La caracterización fisicoquímica de estos sistemas, permitió evidenciar la interacción iónica entre el PE portador y CMP, los materiales se presentan como sólidos amorfos y se observa ausencia de CMP libre, lo que indicaría que todo el F forma parte del complejo.

Al evaluar las propiedades de liberación, se pudo establecer que los PE utilizados actúan como soporte de CMP y que los sistemas portadores obtenidos se comportan como sistemas inteligentes y de reservorio, capaces de liberar el F en presencia de iones (electrolitos pequeños) en el medio de liberación, proceso que resulta favorecido por el intercambio iónico. La liberación de CMP es lenta y controlada, se observa influencia del medio de liberación y del PE presente en la composición del complejo.

En general, para los CIPE cargados con BZ y los complejos PE-CMP, la evaluación de la liberación mediante la utilización de cambio de medio (2 h en medio ácido seguido de 4 h en solución tampón de pH 6,8), que simularía el pasaje del sistema por le TGI, evidencia una promoción de la liberación del F al cambiar el medio de liberación, lo que se atribuye al aumento de la solubilidad del PE portador de naturaleza ácida.

Dadas las potencialidades de los sistemas portadores de BZ y CMP desarrollados y al visualizar sus ventajas farmacoterapéuticas, respecto de los tratamientos actualmente disponibles, se avanzó en los estudios *in vivo* en animales de experimentación, con el fin de evaluar la eficacia y seguridad de estos sistemas que



constituyen alternativas superadoras que podrían ser utilizadas para optimizar el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Para el cumplimiento de estos objetivos, fue necesario, en primera instancia, realizar exhaustivos estudios *in vitro* e *in vivo* de los F. En este sentido, se evaluó meticulosamente el efecto anti-*T. cruzi* de la combinación entre CMP (un inhibidor específico de la tripanotiona reductasa) y BZ, para diseñar nuevas estrategias que pudieran estar dirigidas a mejorar los tratamientos etiológicos actuales y en donde se aprovechara el mecanismo de acción independiente de cada uno de los F, de modo tal que, la combinación entre éstos, permitiera optimizar la eficacia y seguridad de la farmacoterapia antichagásica.

Los estudios *in vitro* realizados mediante la técnica de *checkerboard* permitieron establecer que CMP actúa como sinergista de BZ y que la combinación de los F presenta un importante efecto tripanocida sobre la viabilidad de los trypomastigotes. Estos resultados, junto con el análisis de los parámetros farmacocinéticos y mediante una aproximación alométrica, permitieron establecer los intervalos de dosis a emplear en los experimentos *in vivo*. Cabe destacar que esta estrategia fue muy eficaz para reducir la cantidad de animales de experimentación empleados en estos estudios.

Sobre la base de los estudios *in vivo* realizados se corroboró la sinergia en la acción de los F y se pudo evidenciar que el tratamiento con CMP combinada con bajas dosis de BZ reduce la inflamación cardíaca y mejora los resultados de la cardiomiopatía crónica, en comparación con las dosis clínica de BZ. Esto se traduce en la posibilidad de utilizar dosis más bajas y eficaces de BZ, con una mayor seguridad en la farmacoterapia.

A partir de estos estudios y al evidenciar la potencialidad de la alianza de los F tripanocidas evaluados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, se abordaron los estudios de los sistemas portadores desarrollados. Estos SLM presentaron eficacia terapéutica anti-*T. cruzi* y la combinación de los F en los sistemas portadores permitió lograr una mayor seguridad en el tratamiento. En consecuencia, los sistemas portadores de BZ y CMP, además de presentar propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y biofarmacéuticas adecuadas, permiten una mayor eficacia y seguridad en el tratamiento antichagásico y se constituyen en una alternativa farmacoterapéutica óptima para ser empleada en la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas.



En esta línea y a los fines de contar con una metodología bioanalítica validada, para posteriores estudios de farmacocinética y bioequivalencia, se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de BZ en plasma humano como matriz biológica. La metodología de HPLC puesta a punto demostró ser rápida, sencilla, sensible, precisa, exacta, selectiva y de bajo costo, y de este modo se ajusta a los requerimientos de la autoridad sanitaria.

Por otra parte, se desarrollaron formulaciones pediátricas de BZ, en formas farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de la población pediátrica, con el énfasis centrado en dar respuesta a la demanda insatisfecha de medicamentos no disponibles para el tratamiento pediátrico de la enfermedad de Chagas. Se desarrolló una suspensión a partir de los comprimidos comerciales que contiene BZ al 1 %, la cual reúne los atributos de calidad requeridos y es estable al menos por 90 días, tiempo suficiente para llevar a cabo el tratamiento completo.

En lo que refiere a las formulaciones pediátricas masticables, se evidenció que éstas presentan versatilidad posológica. La evaluación de los atributos farmacoténicos y biofarmacéuticos, permitió evidenciar que éstas se obtienen por procesos que pueden ser escalables y que presentan atributos de calidad con alto grado de cumplimiento de las especificaciones de farmacopeas. Además, la optimización del sabor de la formulación promovería una mejor aceptación del tratamiento, por parte de los pacientes pertenecientes a este grupo etario.

Las formulaciones pediátricas desarrolladas y los exhaustivos estudios realizados, permiten establecer que éstas son alternativas farmacéuticas interesantes, en términos de eficacia, seguridad y confiabilidad, para dar respuesta a la falta de disponibilidad del tratamiento pediátrico de la enfermedad de Chagas.

En resumen, en el transcurso de la presente tesis doctoral, se desarrollaron y evaluaron nuevos sistemas farmacoterapéuticos, algunos de ellos, basados en sistemas portadores de BZ y CMP, con propiedades de liberación modificada y, otros, basados en formulaciones pediátricas. En conjunto, estos sistemas ofrecen ventajas farmacoterapéuticas, respecto de las formulaciones que se utilizan actualmente, que podrían ser aprovechadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Este escenario, propicia condiciones prometedoras para el desarrollo de terapias antichagásicas más eficaces y seguras. En particular, los sistemas portadores de BZ y CMP son promisorios para el diseño de sistemas de liberación de F con propiedades peculiares para la vía per-oral, en donde se aprovechen las características particulares de cada uno de los sistemas desarrollados. Esto se podría traducir en una mejor



adherencia al tratamiento por parte de los pacientes y en una mejora significativa de la eficacia y seguridad la enfermedad de Chagas.

8.2. Proyecciones a corto plazo y perspectivas a futuro

Este trabajo de tesis doctoral abre nuevas perspectivas de investigación, no sólo direccionadas a la aplicación de los sistemas portadores en situaciones terapéuticas específicas, sino también, con relación a evaluar y documentar potenciales propiedades de los polímeros, aún no descriptas. En este sentido, en función de los estudios realizados y los resultados obtenidos, resulta interesante profundizar el estudio de los sistemas portadores desarrollados. Sería de gran relevancia llevar a cabo estudios de bioadhesión de los sistemas portadores, a fin de establecer si éstos tienen alguna incidencia en los eventos preabsortivos de BZ y CMP.

Asimismo, aportaría al conocimiento sobre la farmacoterapia de la enfermedad de Chagas, la ampliación de los estudios *in vivo*, de eficacia y seguridad, a todos los sistemas portadores de cada uno y de las combinaciones óptimas que se pudieran diseñar. Esto permitirá seleccionar las composiciones más convenientes para el desarrollo de formulaciones sólidas optimizadas, para ser administradas por vía peroral, que aporten mayor eficacia, seguridad y confiabilidad, respecto de los tratamientos actuales. La realización de estudios farmacocinéticos para la evaluación de la biodisponibilidad de BZ, en animales de mayor tamaño o bien en humanos, también aportaría al conocimiento acerca de la enfermedad de Chagas.

Complementariamente, sería interesante evaluar la modulación de la respuesta inmune frente al tratamiento con los sistemas portadores, debido a que, por la condición intracelular del parásito, la respuesta inmunológica del huésped es crítica para su control.

Las proyecciones presentadas previamente son a corto plazo y estos estudios forman parte de mi proyecto posdoctoral aprobado por CONICET para el período 2016-2018.

Adicionalmente, se abren como perspectivas a futuro una serie de líneas sobre las cuales investigar, producto del conocimiento generado durante esta tesis doctoral. Por un lado, los resultados de los estudios farmacocinéticos permitirían contar con un *background* de información adecuado para proponer la realización de estudios *in vivo* en humanos voluntarios.



Otros aspectos que ameritan ser abordados en detalle implican profundizar el conocimiento a nivel molecular de los sistemas portadores y llevar a cabo estudios mecanísticos que permitan evaluar la interacción existente entre los PE y el BZ en los CIPE, a fin de evidenciar el tipo de fuerzas intermoleculares que tiene lugar en la dispersión molecular del complejo. Asimismo, sería interesante profundizar en el estudio de los complejos PE-CMP, tanto a nivel molecular, como a nivel particulado, como así también, dilucidar con mayor detalle el mecanismo que gobierna la liberación de CMP, desde el punto de vista cinético. En conjunto, sería de gran relevancia evaluar el comportamiento de los sistemas portadores en diferentes escenarios fisiológicos.

Finalmente y centrados en la enfermedad de Chagas, resulta también interesante evaluar el potencial de las formulaciones pediátricas desarrolladas, a los fines de generar conocimientos que permitan abordar con seguridad estudios de eficacia clínica, necesarios para el registro del producto y su potencial transferencia, para atender a la problemática pediátrica antichagásica.

En paralelo, sería interesante finalizar la caracterización fisicoquímica integral de CMP neutra y poder dar a conocer dichos resultados, no sólo como una publicación científica, sino también, como parte de las bases de datos cristalográficas que se utilizan como referencia a nivel mundial.

8.3. Referencias

- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*, 13(4), 342-348.
- Pan American Health Organization, P. (2015). Chagas disease. General Information - Chagas Disease. Retrieved July 22nd, 2015, from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=4196
- Pinazo, M., Muñoz, J., Posada, E., Lopez-Chejade, P., Gallego, M., Ayala, E., . . . Gascon, J. (2010). Tolerance of benzimidazole in treatment of Chagas' disease in adults.
- Ribeiro, I., Sevesik, A.-M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M. O., . . . Pecoul, B. (2009). New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), e484.
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501.
- Von, A., Zaragoza, E., Jones, D., Rodríguez-Morales, A. J., & Franco-Paredes, C. (2007). New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*.
- World Health Organization, W. (2015). Chagas disease information. *The UNICEF-UNDP- Programme on TDR*.



ANEXOS



Anexo 1:

Identificación y caracterización de BZ extraído y purificado desde comprimidos comerciales

Debido a las limitaciones existentes en lo que refiere a la disponibilidad de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y sumado a que en septiembre de 2011 (año de inicio de la tesis) se anunció que, el único laboratorio proveedor a nivel mundial interrumpió la producción del BZ, no sólo como ingrediente farmacéutico activo, sino también del producto terminado bajo la forma de comprimidos (Radanil[®], Roche), para el desarrollo de este trabajo de tesis, fue necesario poner a punto una metodología de extracción y purificación de BZ a partir de los comprimidos comerciales disponibles y su identificación y caracterización fisicoquímica, de modo tal de garantizar la calidad de este material, para su empleo en el desarrollo de los diferentes sistemas farmacoterapéuticos propuestos. Además, cabe destacar que, hasta 2015, no se disponía de una monografía oficial de éste ni de sus productos terminados en la Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina, 2014) y sólo se contaba como referencia con lo que se encontraba codificado para el F puro en la Farmacopea Internacional (World Health Organization, 2015).

En este sentido, se planteó la puesta a punto de un procedimiento para extraer, purificar y caracterizar BZ, a partir de los comprimidos comerciales disponibles (Radanil[®], Roche), luego de que superaron su fecha de caducidad, los cuales fueron suministrados gentilmente por la Coordinación Nacional de Control de Vectores (sede Córdoba) dependiente del Ministerio de Salud de la Nación. Este proceso fue fundamental para el desarrollo de la tesis, ya que el F puro era necesario, tanto para el desarrollo de los sistemas portadores con propiedades de liberación modificada de BZ, como para el desarrollo de las formulaciones pediátricas.

Cabe destacar que, a partir del conocimiento generado, se contó con información relevante para proponer la incorporación de su monografía en la nueva edición de la Farmacopea Argentina.



#1.1. Proceso de extracción y purificación de BZ

Frente a las dificultades para acceder a los comprimidos de BZ, la extracción debió realizarse en lotes pequeños, a partir de los comprimidos disponibles (Radanil[®], Roche).

En un mortero se procedió a la molienda de los comprimidos de Radanil[®], aproximadamente 100 comprimidos por lote, equivalente a 10 g de BZ (según lo declarado en rótulo). Se trasvasó el material pulverulento a un recipiente de vidrio de 250 mL y se agregó cantidad suficiente (c.s.) de etanol destilado a partir del alcohol medicinal (Porta[®], Cba., Argentina) y se mantuvo la dispersión bajo agitación y calor (aproximadamente 60 °C), durante 30 min. Luego se procedió al filtrado del sólido remanente y BZ fue obtenido a partir de las aguas madres, mediante recristalización por cambio de temperatura-solvente por el agregado de 200 mL de agua destilada fría y el empleo de un baño de hielo. El sistema se dejó reposar 30 min y, luego, el BZ en estado sólido fue obtenido por filtración bajo vacío (-760 mmHg) y posterior secado hasta peso constante en estufa a 45 °C. El material particulado obtenido fue almacenado en envases de vidrio inactivos con cierre hermético, en condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente.

#1.2. Identificación y caracterización fisicoquímica del BZ

Para la identificación se realizaron los ensayos codificados en la Farmacopea Internacional (World Health Organization, 2015): espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), determinación del punto de fusión y cromatografía en placa fina. Complementariamente, se realizaron estudios de análisis térmico: análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC); difracción de Rx de polvos, microscopía óptica, determinación de solubilidad en equilibrio y análisis de la curva espectral UV-Vis en agua y fluidos biorrelevantes, de manera de caracterizar integralmente las propiedades fisicoquímicas del BZ.

#1.2.a. Espectroscopia FT-IR

Los espectros FT-IR se tomaron en un microscopio infrarrojo (Nicolet iN10, Thermo Scientific[®], España). Las muestras se secaron en condiciones de vacío durante 2 h, antes de la toma del espectro y se conservaron en envases de cierre perfecto que contenían sílica gel, para evitar que las muestras se humedecieran. Los espectros fueron obtenidos y procesados con el programa EZ OMNIC ESP 5.1.



#1.2.b. Análisis térmico

El comportamiento térmico del BZ fue determinado mediante TGA y DSC, utilizando los equipos TA-Instruments, USA; Hi-Res-TGA 2950 y Modulated-DSC 2920, respectivamente. Las muestras colocadas en recipientes de aluminio, cerrados no-herméticos con un orificio en la tapa (*pin-hole*), fueron sometidas a rampas de calentamiento de 10 °C/min entre 0 y 300 °C, en atmósfera inerte de N₂ en un flujo de 50 mL/min. La temperatura y entalpía de fusión del BZ fue determinada a partir de las curvas de DSC, mientras que la temperatura de descomposición y el contenido de solventes volátiles totales se determinaron por TGA. Los datos fueron obtenidos y procesados mediante un software específico (Universal Analysis V3.9[®] TA Instruments[®]). Complementariamente, se observó el comportamiento de las partículas en función de la temperatura entre 25 y 200 °C utilizando un microscopio óptico con platina calentable (Koffler[®], Alemania) equipado con una fuente de 2,5 A y lente de 40X.

#1.2.c. Difracción de Rx de polvos

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente utilizando un difractómetro de Rx de polvos (PANalytical[®] X'Pert Pro, Países Bajos), con radiación Cu K α ($\lambda=1,5418$ Å), tubo de voltaje de 40 kV y tubo con corriente de 40 mA. Las muestras fueron colocadas en porta muestras de aluminio y los datos colectados en un intervalo angular de 5° a 80° 2 θ/θ , con un paso de 0,02° y una velocidad de barrido de 1°/min.

#1.2.d. Microscopia óptica de luz polarizada

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio óptico con filtros polarizadores (Olympus[®] BX41, Japón), equipado con una cámara digital (Infinity Lumera[®]) para la toma de las imágenes y software específico para su procesamiento (Infinity Analyze[®], Release 5.0.2). Las muestras se prepararon colocando cuidadosamente los cubreobjetos sobre los portaobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 20X.

#1.2.e. Determinación de la solubilidad de BZ en agua y medios biorrelevantes

Para realizar las determinaciones de solubilidad en equilibrio, se colocó un exceso de BZ en sendos tubos con tapa (cada uno por triplicado) utilizando como medios agua destilada y soluciones tampón de pH 1,2; 4,5; 6,8 y 7,5, en un baño



termostatizado a 37 °C. Los sistemas fueron agitados periódicamente utilizando un mezclador de vórtice (Decalab®, Bs.As., Argentina) y luego se dejaron reposar hasta alcanzar el equilibrio. Se tomaron muestras del sobrenadante, a diferentes intervalos de tiempo entre 12 h y hasta 7 días de transcurrido el experimento, que fueron filtradas para su posterior valoración. La cuantificación de BZ se realizó por espectrofotometría UV-Vis y el valor de solubilidad de BZ fue determinado cuando tres mediciones consecutivas de la concentración de BZ permanecieron constantes (coeficiente de variación no mayor al 5 % en las concentraciones medidas).

#1.2.f. Categorización del BZ en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

En el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), los F se clasifican respecto de su solubilidad relativa a la dosis en función del número de dosis (D_o). En este sentido, un F es considerado como de alta solubilidad relativa cuando $D_o < 1$ y de baja solubilidad relativa cuando $D_o > 1$ (Amidon, Lennernäs, Shah, & Crison, 1995).

A tales fines, con los valores de solubilidad obtenidos para el BZ, se calculó el D_o , en los distintos medios ensayados, de acuerdo a la Ecuación #1.1, en donde la dosis máxima aprobada por la OMS es de 100 mg.

$$D_o = \frac{\text{Dosis mg}/250 \text{ mL}}{\text{Solubilidad mg/mL}} \quad \text{Ecuación \#1.1}$$

#1.2.g. Determinación de una metodología analítica para valorar el BZ

A los fines de desarrollar un método de cuantificación para determinar la pureza del F y que fuera de utilidad para los estudios posteriores, se realizaron determinaciones espectrofotométricas de soluciones de BZ utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Evolution 300, Termo Scientific, Suiza). Se realizaron curvas espectrales en diferentes medios (agua destilada, HCl 0,1 M, soluciones tampón-USP de pH 1,2; 4,5; 6,8 y 7,5) para determinar los valores de longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}). Luego se realizaron las curvas de calibración de BZ a la $\lambda_{\text{max}} = 324 \text{ nm}$ en cada uno de estos medios, utilizando un estándar de referencia. En todos los casos los ensayos se realizaron por triplicado.



#1.3. Resultados y discusión de caracterización de BZ

#1.3.1. Propiedades fisicoquímicas y características observadas para BZ

Mediante el procedimiento de extracción y purificación de BZ a partir de los comprimidos comerciales, se logró obtener diez lotes de BZ con un grado de pureza de $(99,2 \pm 0,5) \%$, cumplimentando con lo especificado en la Farmacopea Internacional (World Health Organization, 2015). El rendimiento medio del proceso de extracción y purificación fue variable y muy dependiente de las condiciones de procesamiento de cada lote y del tamaño del lote, de la temperatura, la relación de solventes en el proceso de recristalización, el tiempo de agitación, entre otros. Sin embargo, una vez que fue optimizado el proceso de extracción y purificación a escala laboratorio, se obtuvieron rendimientos reproducibles de $(87 \pm 2) \%$, para lo cual, el control de la temperatura de calentamiento entre 60 y 65 °C durante la extracción y la cantidad de comprimidos procesados entre 100 y 200 unidades como máximo, fueron los parámetros críticos en el rendimiento obtenido.

La Figura #1.1 muestra el espectro FT-IR del BZ, el que se superpone con el del estándar de referencia. Allí se pueden observar los grupos las bandas características atribuibles a los grupos funcionales característicos del BZ, especialmente aquellas que se corresponden con las bandas típicas de las amidas, tales como el estiramiento del enlace N-H (vibración N-H), estiramiento del enlace carbonilo (banda amida I) y la deformación del enlace N-H (banda amida II), además de las vibraciones resultantes del grupo bencílico e imidazólico y en particular del grupo nitro (Schrader, 2008). En la Tabla #1.1 se detalla la asignación de las señales consideradas más relevantes.

Tabla #1.1. Frecuencias de vibración y asignaciones correspondientes a las bandas de absorción más importantes del BZ.

Asignación	Frecuencias (cm ⁻¹)
Estiramiento del enlace N-H	3270
Estiramiento del grupo carbonilo	1658
Deformación del enlace N-H (amida II)	1543
Estiramiento del enlace C-N	1358
Estiramiento simétricos y asimétricos del CH ₂ y estiramiento del enlace C-H aromático	3130, 3105, 3067 y 3025

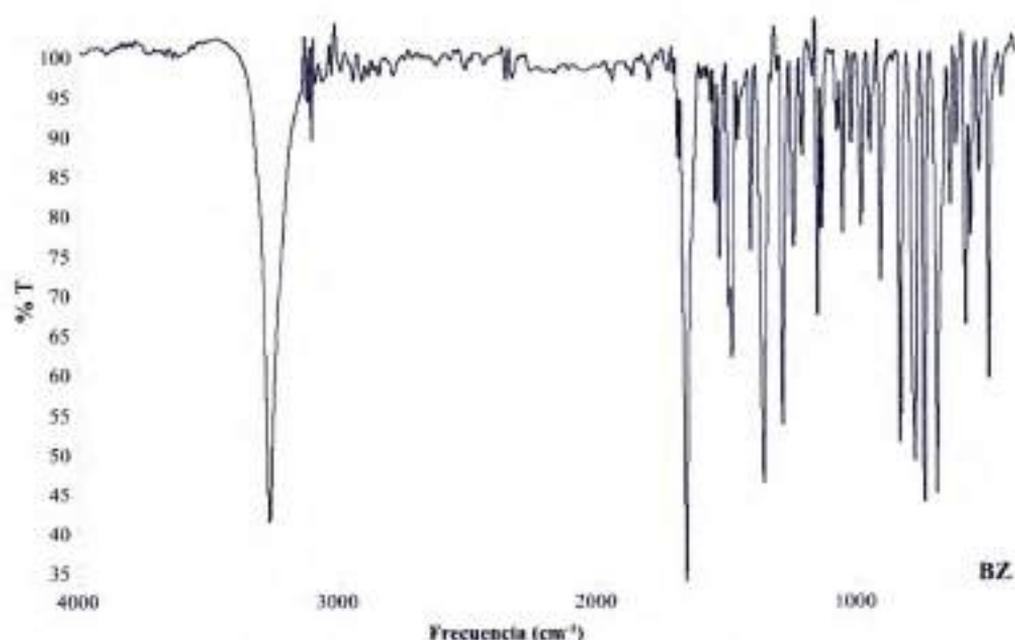


Figura #1.1. Espectro FT-IR obtenido para el BZ.

Las curvas obtenidas mediante los análisis térmicos, TGA y DSC (Figura #1.2), demostraron que el BZ es poco higroscópico y térmicamente estable. A partir del TGA se observó pérdida de peso a 110 °C, atribuible al contenido de humedad, que fue $\leq 0,5$ % p/p, lo cual cumple con las especificaciones generales de la Farmacopea Argentina e Internacional (Farmacopea Argentina, 2014; World Health Organization, 2015). Además, se observó que la descomposición del BZ se inicia aproximadamente a 250 °C. Mediante las curvas de DSC se confirmaron estos resultados y adicionalmente se determinó que BZ funde a 190,2-191,2 °C, caracterizado por una endoterma de fusión aguda y simétrica, que refleja la pureza del BZ, cuya entalpía de fusión fue $\Delta H = 135,3$ J/g. Por microscopía óptica con platina calentable se confirmó esta temperatura e intervalo de fusión del BZ.

La difracción de Rx de polvos mostró un difractograma característico de un material cristalino (Figura #1.3). Este estudio no tuvo como objetivo realizar un análisis cristalográfico detallado, sin embargo puede observarse que el perfil de difracción del BZ demuestra su naturaleza cristalina, mostrando numerosos picos de alta intensidad. La mayor intensidad se observa de 3 a 11,5; 16,5 y 22°; además de varios picos secundarios (Honorato et al., 2014).

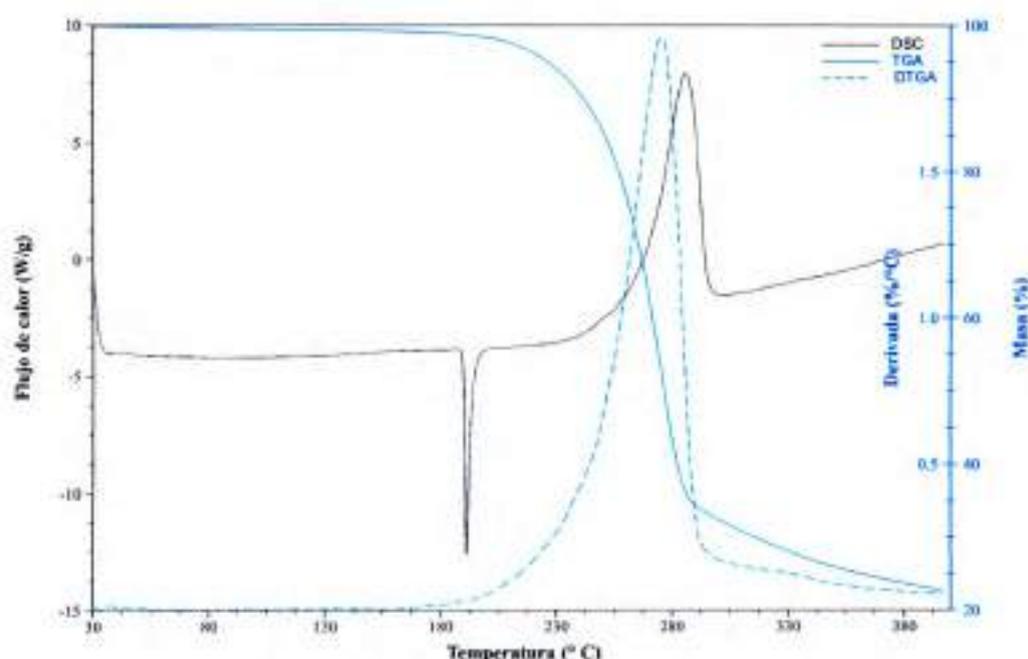


Figura #1.2. Curvas de TGA, DSC y derivada de TGA obtenidas para el BZ

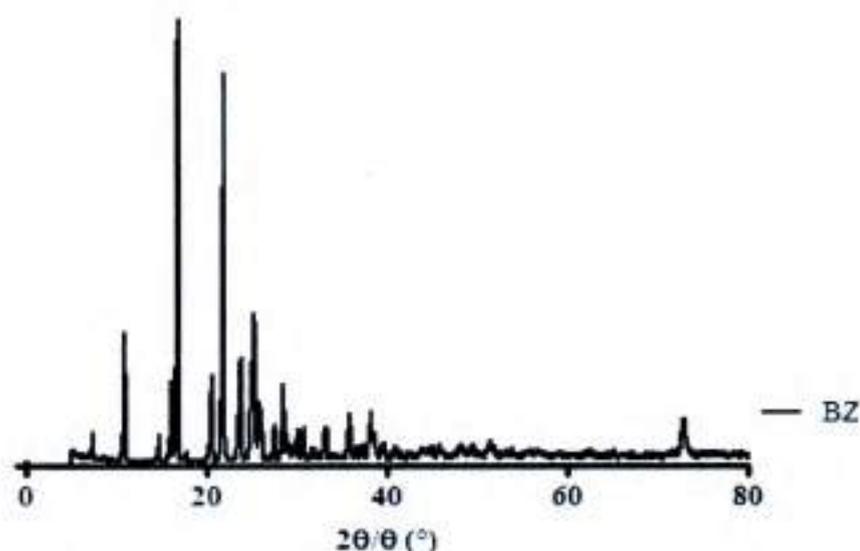


Figura #1.3. Difractograma de Rx de polvos obtenido para el BZ

La observación del material al microscopio óptico, sin y con luz polarizada, confirmó este resultado. Las fotografías de la Figura #1.4 muestran que BZ se presenta como cristales aciculares, característicos de la Forma I cristalina más estable de BZ (Honorato et al., 2014), a la vez que se observó el fenómeno de birrefringencia bajo el efecto de la luz polarizada.

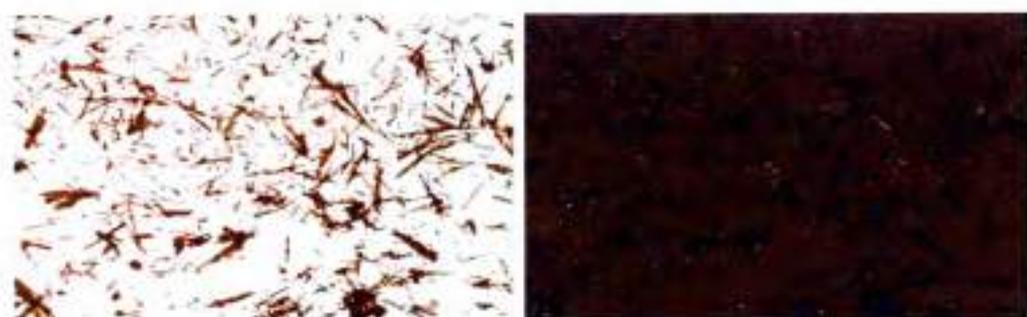


Figura #1.4. Micrografías sin y con luz polarizada (20x) obtenidas para el BZ.

#1.3.2. Determinaciones espectrofotométricas UV-Vis

Mediante el análisis de la curva espectral obtenida por espectrofotometría UV-visible se determinó que la longitud de máxima absorción de BZ es de 324 nm y que ésta no sufre cambios significativos con el cambio de solvente; es decir, no se producen desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos con el cambio de solvente. Las curvas de calibrado se obtuvieron con valores de correlación lineal $r^2 \geq 0,998$; considerado como criterio óptimo para la aceptación de los datos.

A partir de estos resultados, es posible afirmar que esta metodología analítica es útil y apropiada para valorar el BZ y puede ser complementaria a la titulación potenciométrica en solución no acuosa descrita en la Farmacopea Internacional.

#1.3.3. Determinación de la solubilidad y solubilidad relativa a la dosis

La solubilidad acuosa de los F es un parámetro muy importante y determinante en el diseño de las formas farmacéuticas, su versatilidad posológica y es uno de los criterios utilizados por el SCB. En el marco de este sistema, la determinación de la solubilidad relativa a la dosis junto a la permeabilidad intestinal, permite asignar los F a una de las cuatro clases del SCB.

En la Tabla #1.2 se observan las clases biofarmacéuticas en las que pueden ser clasificados los fármacos dependiendo de su solubilidad acuosa relativa a la dosis y su permeabilidad intestinal (Amidon et al., 1995; Food and Drug Administration, 2000).

A partir de estos resultados y dependiendo de la clase biofarmacéutica a la cual correspondería el BZ, se podría sugerir como candidato a bioexenciones¹.

¹ El término bioexención se aplica en la práctica regulatoria cuando un producto farmacéutico se aprueba en base a evidencias de equivalencia que no involucran pruebas de bioequivalencia in-vivo (Food and Drug Administration, 2000).



Tabla #1.2. Clasificación de F y las correlaciones *in-vivo-in-vitro* esperadas para formas farmacéuticas de liberación inmediata, sobre la base del SCB.

Clase	Solubilidad acuosa relativa a la dosis	Permeabilidad intestinal	Correlación <i>in vitro-in vivo</i> esperada
1	Alta	Alta	Cuando la velocidad de disolución es más lenta que la de vaciado gástrico
2	Baja	Alta	Cuando la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la velocidad de disolución <i>in vivo</i>
3	Alta	Baja	La absorción (permeabilidad) es la velocidad determinante y limita ó no las correlaciones <i>in vitro-in vivo</i> con la velocidad de disolución
4	Baja	Baja	Correlaciones <i>in vitro-in vivo</i> limitadas o no esperadas

En la Tabla #1.3 se informan los valores de solubilidad y de ésta relativa la dosis (D_0) de BZ, obtenidos en agua y los fluidos biorrelevantes recomendados por la U.S. Food and Drug Administration (Food and Drug Administration, 2000).

Tabla #1.3. Parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos obtenidos para BZ

Parámetros	Medios ensayados				
	Agua	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 7,5
Solubilidad (mg/mL)	0,268 ± 0,001	0,375 ± 0,003	0,332 ± 0,004	0,387 ± 0,002	0,330 ± 0,003
D_0	-	1,07	1,20	1,03	1,21
SCB	Baja solubilidad – CLASE II o IV				

De acuerdo a los valores de solubilidad acuosa de BZ se corroboró que es muy poco soluble, acorde a las indicaciones de solubilidad definidas en la Farmacopea Argentina. En tanto que, los valores de D_0 en los medios biorrelevantes catalogan al BZ como de baja solubilidad relativa a la dosis de acuerdo a los lineamientos del SCB, por lo que correspondería a la Clase II o IV (Amidon et al., 1995; Food and Drug Administration, 2000). No obstante, cabe mencionar que Kasim *et al.* (2004) clasificó al BZ como de Clase III, pero en esta revisión no queda claro el origen de los datos de solubilidad considerada (0,4 mg/mL), por lo cual se desconoce el detalle de las condiciones experimentales para su determinación. Además, esta clasificación se realiza considerando la permeabilidad en función del CLogP y no mediante estudios experimentales como recomienda la autoridad sanitaria (Food and Drug Administration, 2000; Kasim et al., 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y para poder enmarcarlo claramente en una Clase particular del



SCB, sería necesario llevar a cabo los estudios de permeabilidad, por alguno de los métodos que los protocolos de la U.S. Food and Drug Administration sugiere (perfusión intestinal *in vivo* en seres humanos; perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* usando modelos animales apropiados; permeabilidad *in vitro* usando tejidos intestinales extirpados humanos o animales; o permeabilidad *in vitro* a lo largo de una capa simple de células epiteliales cultivadas)(Food and Drug Administration, 2000) .

En resumen, como se puede observar a partir de todos los resultados informados, se puso a punto una metodología de extracción y purificación de BZ sencilla y reproducible, a partir de comprimidos comerciales, que permitió obtener BZ con alto grado de pureza y rendimiento, útil para el desarrollo de los sistemas farmacoterapéuticos propuestos.

Los datos fisicoquímicos obtenidos aportaron información útil para la identificación, caracterización integral y valoración de BZ como F puro. Los resultados obtenidos al considerar los parámetros del SCB, permiten asignar al BZ a la clase II-IV (baja solubilidad relativa a la dosis), lo que sugiere que los productos que deriven de éste no son candidatos a bioexcenciones.

Los datos obtenidos, a partir de todos los estudios realizados, fueron de gran importancia para la elaboración de una monografía de BZ, que fue elevada para consideración a la subcomisión correspondiente para su análisis y evaluación, a los fines de ser incluida en la nueva edición de la Farmacopea Argentina. Recientemente, a fines de 2015, fueron aprobadas las monografías de BZ y de los comprimidos que contienen BZ.

#1.4. Referencias

- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
- Farmacopea Argentina. (2014). Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 7ma ed. Retrieved December 17 th, 2015, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf
- Food and Drug Administration, F. (2000). Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. *Food and Drug Administration, Rockville, MD*. Retrieved 25st January, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>
- Honorato, S. B., Mendonça, J. S., Boechat, N., Oliveira, A. C., Mendes Filho, J., Ellena, J., & Ayala, A. P. (2014). Novel polymorphs of the anti-Trypanosoma cruzi drug benzimidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 389-394.



- Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A. S., . . . Shah, V. P. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, *1*(1), 85-96.
- Schrader, B. (2008). *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*: John Wiley & Sons.
- World Health Organization, W. (2015). The international pharmacopoeia. 5°. Retrieved 2nd, 2016, from <http://apps.who.int/phint/en/p/doc/>

Anexo 2:

Neutralización y caracterización de CMP neutra

Debido a que CMP sólo se dispone bajo la forma de su sal clorhidrato, en este trabajo de tesis se desarrolló una metodología para neutralizar y caracterizar la CMP neutra, necesaria para obtener los sistemas portadores de F que se presentaron el capítulo 4 *Sistemas portadores de BZ y CMP*.

#2.1. Obtención y caracterización químico-farmacéutica de CMP neutra

Ante la necesidad de contar con la CMP neutra, se puso a punto una metodología para llevar a cabo la neutralización ácido-base de CMP clorhidrato en medio acuoso.

#2.1.1. Neutralización de CMP clorhidrato

Debido a que CMP en su forma neutra y en medio acuoso se presenta como un aceite (Rabinowitz & Zaffaroni, 2006), para la neutralización de su sal clorhidrato, se preparó una solución acuosa al 0,5 % y se adicionó $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}_2$, en proporción 1:1, para obtener un sistema bifásico. Posteriormente, se adicionó, gota a gota, una solución de NaOH 1 M (grado PA, Cicarelli, Santa Fe, Argentina) en proporción equivalente para neutralizar la totalidad del clorhidrato presente en el F. Para corroborar la completa neutralización se llevó a cabo el registro del pH de la fase acuosa. Finalmente, el sistema bifásico fue colocado en una ampolla de decantación y luego de 3 particiones sucesivas con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}_2$, en proporción 1:1, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se concentró para obtener la CMP neutro. La evaporación de la fase orgánica se llevó a cabo de dos formas diferentes. Por un lado se utilizó un evaporador rotatorio o rotavapor (Rotavapor R-110, Büchi®, Italia) y se aplicó vacío a -760 mmHg. Por otra parte, se llevó a cabo la evaporación lenta y no forzada, a temperatura ambiente para recrystalizar la CMP, para lo cual se colocó la fase orgánica en un recipiente de vidrio inactínico y de solventes volátiles se determinó mediante el análisis del % de humedad de la muestra en una balanza acoplada a una platina calentable (Analizador de humedad MB35, Ohaus®, Suiza).



#2.2. Caracterización fisicoquímica de CMP

La CMP neutra no se encuentra codificada en la Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina, 2014); en consecuencia, para la caracterización del materiales obtenido se emplearon diferentes metodologías a los fines de determinar la temperatura e intervalo de fusión; la pérdida de masa en función de la temperatura, el porcentaje de volátiles y de agua; los grupos funcionales presentes en su estructura y las propiedades cristalinas.

#2.2.a. Difracción de Rx de polvos

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente utilizando un difractómetro de Rx (PANalytical® X'Pert Pro, Países Bajos), con radiación Cu K α ($\lambda=1,5418$ Å), tubo de voltaje de 40 kV y tubo con corriente de 40 mA. Las muestras fueron colocadas en porta muestras de aluminio y los datos colectados en un intervalo angular de 5° a 80° 2 θ/θ , con un paso de 0,02° y una velocidad de barrido de 1°/min. Adicionalmente, se determinó el patrón de difracción de Rx en un equipo sincrotrón (Brookhaven National Laboratory).

#2.2.b. Microscopía óptica de luz polarizada

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio óptico con filtros polarizadores (Olympus® BX41, Japón), equipado con una cámara digital (Infinity Lumera®) para la toma de las imágenes y software específico para su procesamiento (Infinity Analyze®, Release 5.0.2). Las muestras se prepararon colocando cuidadosamente los cubreobjetos sobre los portaobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 20X.

#2.2.c. Análisis térmico

El comportamiento térmico de CMP neutra y clorhidrato fue determinado mediante TGA y DSC, utilizando los equipos TA-Instruments, USA; Hi-Res-TGA 2950 y Modulated-DSC 2920, respectivamente. Las muestras colocadas en recipientes de aluminio, cerrados no-herméticos con un orificio en la tapa, fueron sometidas a rampas de calentamiento de 10 y 2 °C/min entre 0 y 300 °C. Se determinó la temperatura e intervalo de fusión a partir de las curvas de DSC y la temperatura de descomposición y el contenido de solventes volátiles totales se determinaron por TGA. Los datos fueron obtenidos y procesados mediante un software específico (Universal Analysis V3.9® TA Instruments®). Complementariamente, se determinó el punto de fusión con un fusiómetro digital (IA-



9100, Electrochemical[®]) y se observó el comportamiento del sólido en función de la temperatura entre 25 y 200 °C utilizando un microscopio óptico con platina calentable (Koffler[®], Alemania) equipado con una fuente de 2,5 A y lente de 40X.

#2.2.d. Espectroscopia FT-IR

Los espectros FT-IR se tomaron en un microscopio infrarrojo (Nicolet iN10, Thermo Scientific[®], España). Las muestras se secaron en condiciones de vacío durante 2 h, antes de la toma del espectro y se conservaron en envases de cierre perfecto que contenían sílica gel, para evitar que las muestras se humedecieran. Los espectros fueron obtenidos y procesados con el programa EZ OMNIC ESP 5.1.

#2.2.e. Titulación de Karl Fischer

Para poder determinar las trazas de agua de la muestra y poder compararla con la cantidad de volátiles totales, se llevó a cabo la valoración de Karl Fischer en un equipo de titulación (Karl Fischer Titration Metrohm[®], 803 Ti Stand), para lo cual se utilizó el reactivo de Karl Fischer que consiste en una solución estándar de yodo (I_2 + base [imidazol o piridina] + SO_2 en proporción 1:3:10 disueltos en metanol anhidro). Esta determinación se llevó a cabo por sextuplicado.

#2.3. Resultados y discusión de la caracterización de CMP neutra

#2.3.1. Características de CMP neutra y rendimiento de obtención

El procedimiento de obtención de CMP neutra se llevó a cabo de diferentes formas, hasta poder optimizar la metodología. En una primera instancia se intentó realizar la neutralización directa en medio acuoso, por el agregado de una solución de NaOH. Este proceso dio lugar a la formación de un aceite untuoso y viscoso que se quedaba adherido a las paredes del recipiente de vidrio, era muy difícil de coleccionar y se dificultaba su manipulación.

Los rendimientos de obtención fueron < 20 %, por ese motivo, se decidió llevar a cabo la neutralización ácido-base en fase acuosa, con posterior partición con solvente orgánico y evaporación del solvente en rotavapor. Este proceso permitió lograr un mayor porcentaje de rendimiento del material obtenido, cercano al 38 %. Sin embargo, el rendimiento continuaba siendo bajo y un gran parte del material aceitoso seguía adherido a las paredes del recipiente en la porción correspondiente a la fase acuosa, lo que implicaba una gran pérdida de CMP neutra. A partir de esto, se decidió llevar a cabo la neutralización ácido-base directamente en un sistema bifásico, con el



fin de que en la medida que el F se fuera neutralizando, la CMP neutra generada se disolviera y particionara a la fase orgánica. De este modo, se evitó o disminuyó la adhesión de CMP neutra a las paredes del recipiente y, en consecuencia, se redujeron las pérdidas del F. Para la puesta a punto de esta metodología, se trabajó con diferentes solventes orgánicos: CH_2Cl_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}_2$, CHCl_3 y ciclohexano, y se obtuvieron rendimientos de CMP neutra comprendidos entre el 50 y 85 %, dependiente del solvente orgánico empleado.

Como se detalló previamente, para la evaporación de la fase orgánica se emplearon dos metodologías: evaporación al vacío mediante rotavapor y evaporación lenta a temperatura ambiente. Interesantemente, de todos los solventes orgánicos evaluados y en cuando la evaporación es lenta, sólo el solvente $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}_2$ permitió obtener la CMP neutra en forma cristalina, lo cual resulta de gran utilidad en el ámbito farmacéutico, dada la versatilidad que tiene lugar al momento de su manipulación y la mayor estabilidad química que presenta el estado sólido. En particular, con este solvente orgánico, la CMP neutra bajo la forma de aceite se obtuvo siempre con rendimientos $> 80 \%$, en tanto que bajo la forma cristalina se obtuvo con rendimientos $> 70 \%$. Como se observa, el rendimiento de obtención de los cristales es levemente inferior; no obstante, obtener la CMP neutra de forma cristalina es una gran ventaja para su posterior procesamiento. En este punto, es de relevancia destacar que para la obtención de los cristales el sistema se encuentra bajo evaporación lenta durante > 20 días, momento en el que comienza a observarse la formación de núcleos cristalinos.

En resumen, la metodología optimizada para la obtención de CMP neutra a partir de su sal clorhidrato implicó su neutralización ácido-base en un sistema bifásico, en donde la CMP clorhidrato se encuentra inicialmente disuelta en la fase acuosa y, a medida que se neutraliza con NaOH, la CMP neutra particiona a la fase orgánica. En particular, para la obtención del sólido, se requiere de una evaporación del solvente orgánico lenta y no forzada, a temperatura ambiente.

En la Figura #2.1 se pueden observar las características macroscópicas del sólido obtenido, el cual se presenta como un sólido cristalino blanco, y como se forman los cristales del sólido mientras se recrystaliza e la fase orgánica.

#2.3.2. Propiedades fisicoquímicas de CMP neutra

La difracción de Rx de polvos mostró un difractograma característico de un material cristalino (Figura #2.2). A los fines comparativos, se presenta en la Figura

#2.2 el difractograma correspondiente a la CMP neutra y al clorhidrato, en donde se puede evidenciar que los picos de cristalinidad cambian, lo que sugeriría la presencia de una estructura cristalina diferente (Giacovazzo, 2002). Es decir, se puede observar que en el difractograma de CMP neutra entre los 5 y 20° aparecen picos que son distintivos en comparación con el difractograma de la CMP clorhidrato. Estos resultados fueron corroborados mediante sincrotrón y se encuentran bajo un exhaustivo análisis para la determinación de la celda unidad de la estructura cristalina.



Figura #2.1. Aspecto macroscópico de CMP neutra. a) Luego de 25 días en $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}_2$, en donde se puede observar la formación de núcleos cristalinos de CMP neutra. b) Núcleos cristalinos de CMP neutra luego de 35 días una vez extraídos del solvente orgánico.

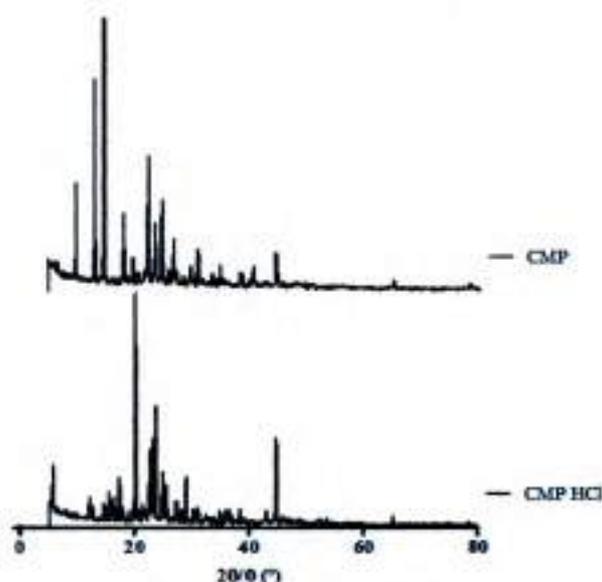


Figura #2.2. Difractograma de Rx de polvos obtenido para CMP neutra y clorhidrato.

La observación del material al microscopio óptico, sin y con luz polarizada, confirmó las características de cristalinidad de CMP neutra. Las fotografías que se presentan en la Figura #2.3 muestran que CMP neutra se presenta como cristales aciculares (Honorato et al., 2014) y sus propiedades cristalinas permiten observar el fenómeno de birrefringencia en presencia de la luz polarizada.

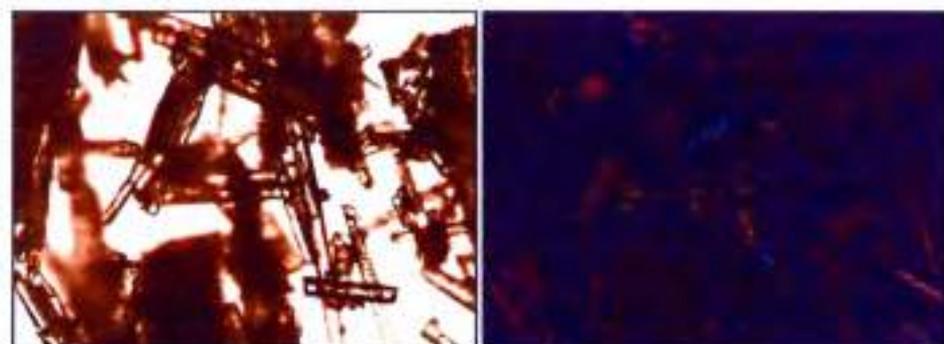


Figura #2.3. Micrografías sin y con luz polarizada (20X) obtenidas para CMP neutra

Cabe destacar que, CMP neutra como cristal, no se encuentra descrita en la bibliografía, por lo que se están realizando todos los estudios necesarios para poder indexarlo en las bases de datos de F cristalinos. En adición, cabe mencionar que, al parecer, la recristalización de la CMP daría lugar a la formación de monocristales, los cuales resultan de gran interés para ser caracterizados. Para realizar este exhaustivo análisis cristalográfico, mediante sincrotrón y Rx de monocristal, se trabaja en colaboración con la Dra. Silvína Pagola que se desempeña en el College of William and Mary-Applied Science Dept-Applied Research Center, Newport News, VA, USA.

Además, dado que CMP neutra presenta en su estructura un átomo de Cl, muestras de este material se encuentran bajo análisis para su caracterización por resonancia magnética cuadrupolar, para lo cual se trabaja en colaboración con el Dr. Wolfenson de la Facultad de Física Astronomía y Matemática, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Complementariamente, a los fines de caracterizar las propiedades termodinámicas *in vitro* de CMP neutra y en diferentes medios, se trabaja en colaboración con el Dr. Fleming Martínez del Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; respectivamente. Si bien se cuenta con resultados a partir de estos trabajos en colaboración, en este trabajo de tesis no se presentan, ya que exceden los objetivos planteados.

Las curvas obtenidas mediante los análisis térmicos, TGA y DSC (Figura #2.4), demostraron que el CMP es poco higroscópica y estable hasta aproximadamente 150



°C. A partir del TGA se observó que la pérdida de peso a 62 °C fue $\leq 2\%$ p/p, a 100 °C fue $\leq 3\%$ p/p y a 160 °C fue $\leq 4\%$ p/p y la descomposición del material se inicia aproximadamente a 175 °C. A partir de las curvas de DSC se observan diferentes eventos térmicos, en donde el principal ocurre a los 97,24 °C y corresponde a la fusión del sólido; se caracteriza por una endoterma de fusión ancha, cuya entalpía de fusión es $\Delta H=40,6$ J/g. Esta endoterma ensanchada podría ser producto del solapamiento de dos eventos: por un lado la fusión del sólido y, por otro, la evaporación del agua de la muestra (Valls & del Castillo García, 2003). La determinación del punto de fusión por medio del fusiómetro digital y por microscopía óptica con platina calentable permitieron confirmar esta temperatura e intervalo de fusión de CMP. No obstante, se requiere de un estudio más exhaustivo para poder analizar los diferentes eventos térmicos que se observan, pero éstos exceden los alcances de este trabajo de tesis.

El porcentaje promedio de agua presente en la muestra, determinado por Karl Fischer, fue $(3,3 \pm 0,2)\%$. Este resultado se encuentra en relación con el porcentaje de pérdida de masa a 100 °C que se observó mediante TGA. Este 3,3 % corresponde a agua sorbida en el sólido (Kontny & Zografi, 1995).

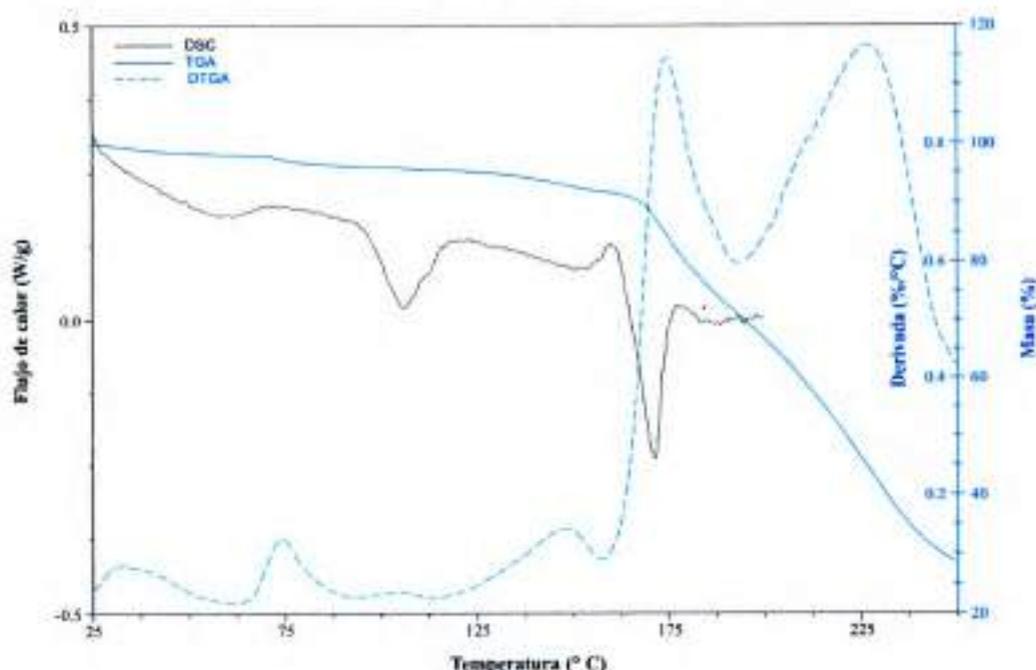


Figura #2.4. Curvas de TGA, DSC y derivada de TGA obtenidas para CMP neutra cristalina

La Figura #2.5 muestra el espectro de FT-IR de CMP neutra y de CMP clorhidrato. Las señales correspondientes al benceno monosustituido ($\sim 700-750\text{ cm}^{-1}$), como así también a la amina terciaria ($\sim 1030 - 1230\text{ cm}^{-1}$) de CMP neutra se

encuentran superpuestas y entre ambos espectros resulta dificultoso realizar el análisis comparativo (Schrader, 2008). Sin embargo, la banda gris en la Figura #2.5 denota el principal cambio observado entre ambos espectros, que corresponde a la señal del grupo amino protonado o ión trialquilamonio (R_3NH^+) entre $2400-2550\text{ cm}^{-1}$, el cual se observa en la sal, pero no en la CMP neutra, lo que da cuenta de que el proceso de neutralización fue llevado a cabo correctamente.

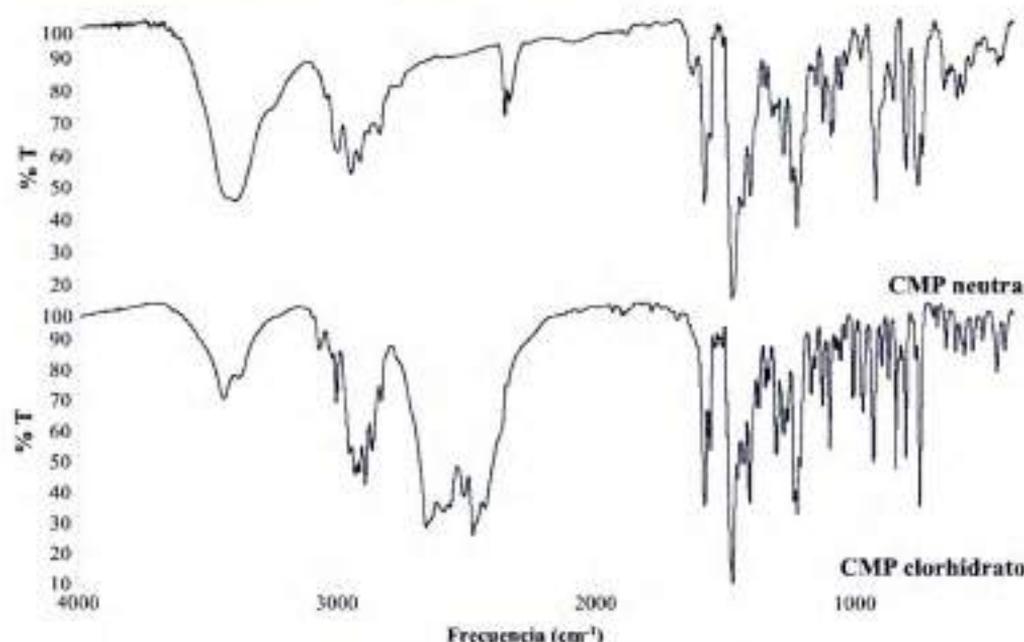


Figura #2.5. Espectro FT-IR obtenido para el CMP neutra

En resumen, como se puede observar a partir de todos los resultados obtenidos, se puso a punto una metodología para CMP neutra a partir de la neutralización de la sal clorhidrato. A partir de éste sólido se derivó una línea de trabajo inherente a la caracterización fisicoquímica integral de este sólido, la cual se está llevando en colaboración con otros investigadores expertos en el área.

Por su parte, la posibilidad de obtener el material en forma sólida, permite una mayor facilidad en lo que refiere a su manipulación; además, la metodología desarrollada permite obtener la CMP neutra con un alto rendimiento y es de utilidad para el posterior desarrollo de los sistemas farmacoterapéuticos propuestos.

#2.4. Referencias

Farmacopea Argentina. (2014). Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina, Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 7ma ed. Retrieved December 17 th, 2015, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf

Giacovazzo, C. (2002). *Fundamentals of crystallography* (Vol. 7): Oxford university press, USA.



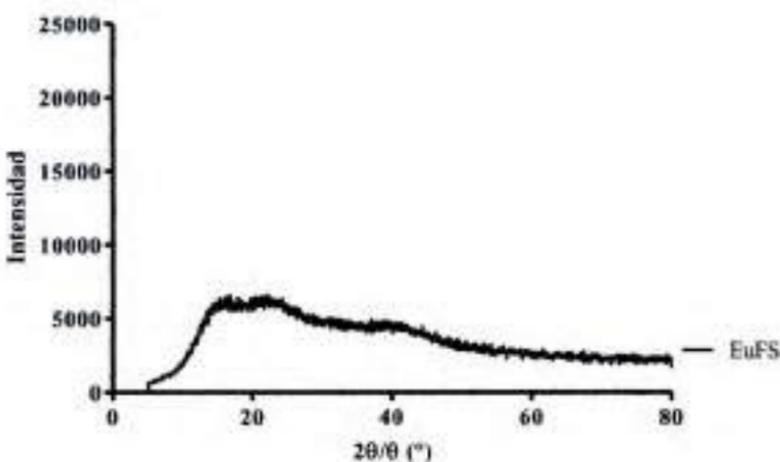
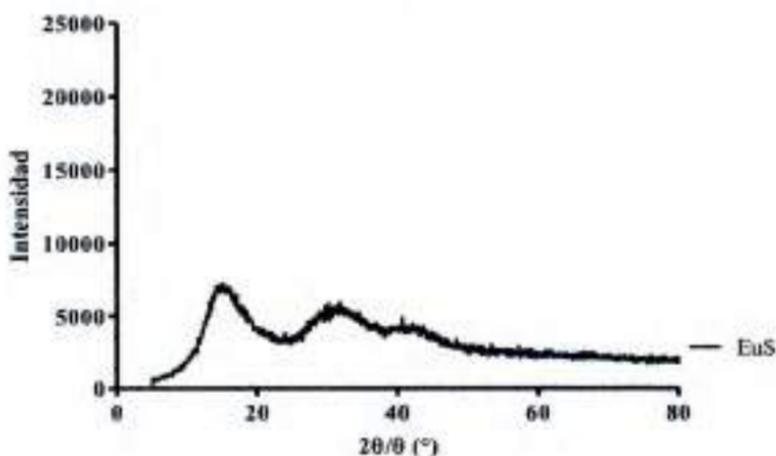
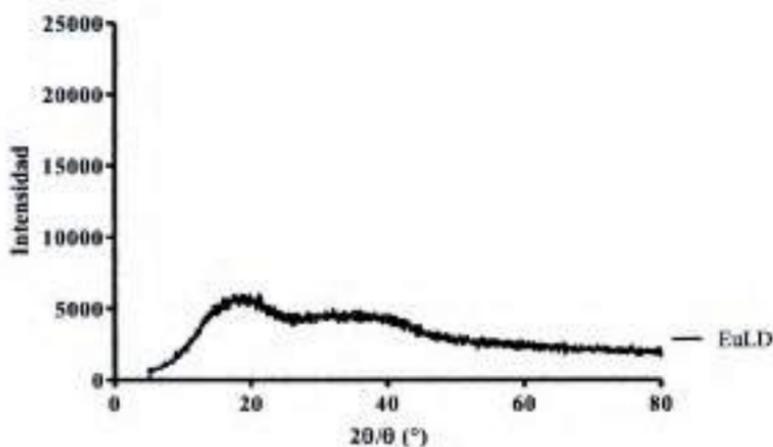
- Honorato, S. B., Mendonça, J. S., Boechat, N., Oliveira, A. C., Mendes Filho, J., Ellena, J., & Ayala, A. P. (2014). Novel polymorphs of the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 389-394.
- Koutny, M. J., & Zografi, G. (1995). Sorption of water by solids. In H. Britain (Ed.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* (Vol. 70, pp. 387-415). New York: Marcel Dekker.
- Rabinowitz, J. D., & Zaffaroni, A. C. (2006). Delivery of antidepressants through an inhalation route: Google Patents.
- Schrader, B. (2008). *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*: John Wiley & Sons.
- Valls, O., & del Castillo García, B. (2003). *Técnicas instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*: Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Anexo 3:

Difractogramas de Rx de polvo

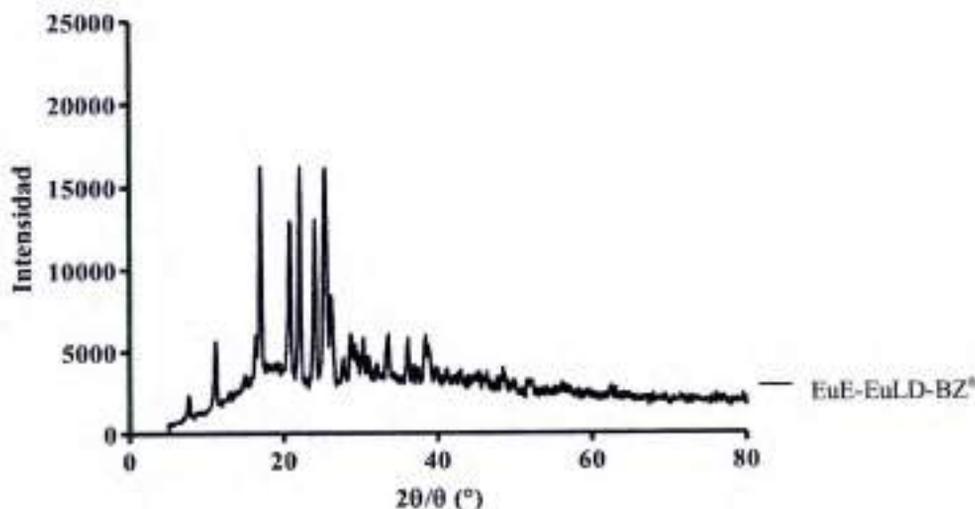
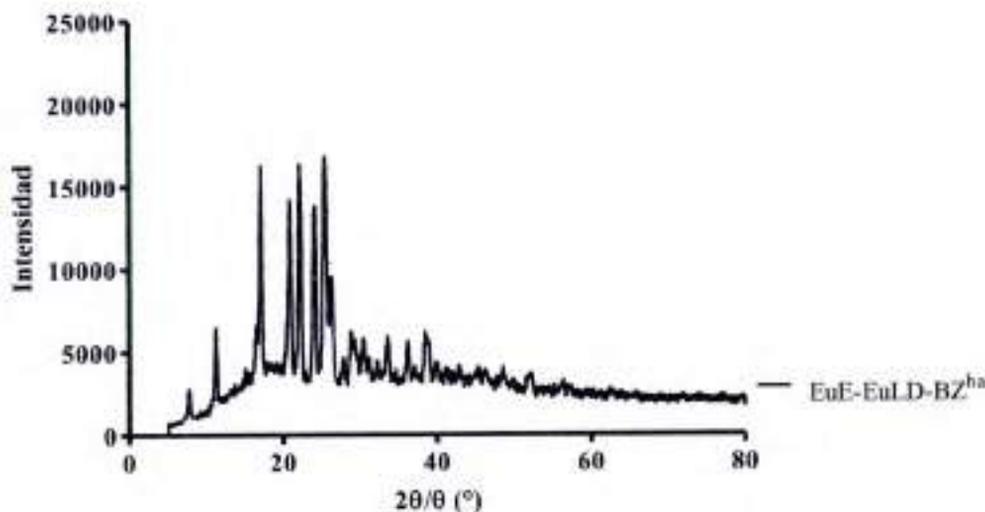
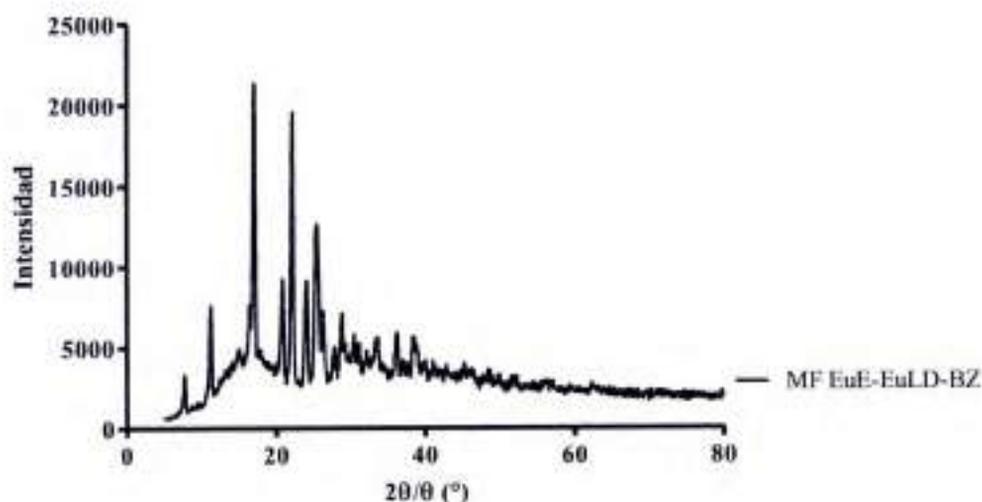
Difractogramas de Rx de polvo de PE seleccionados

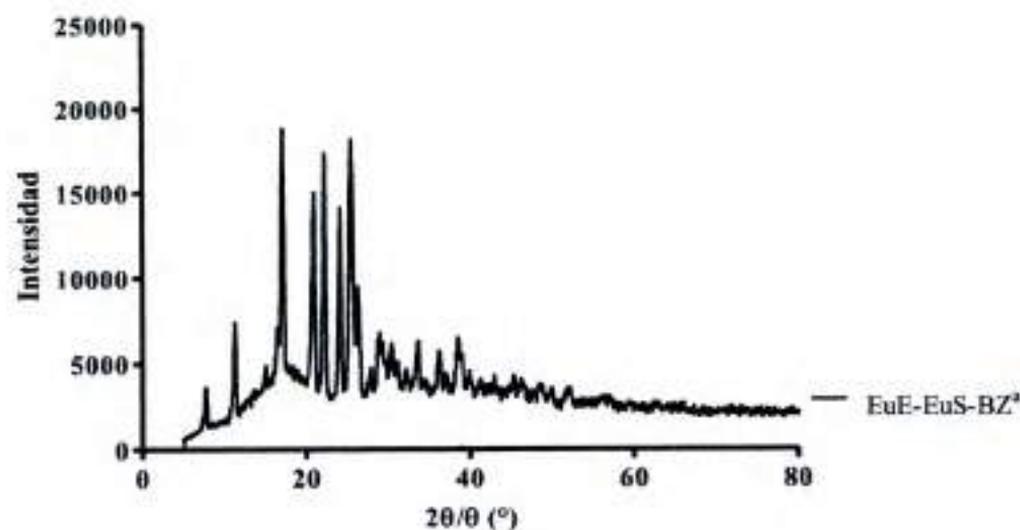
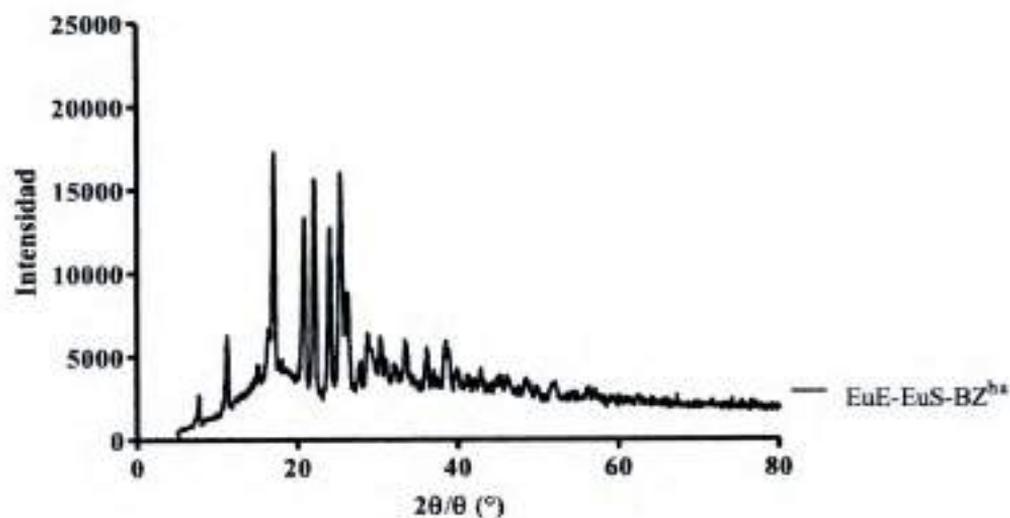
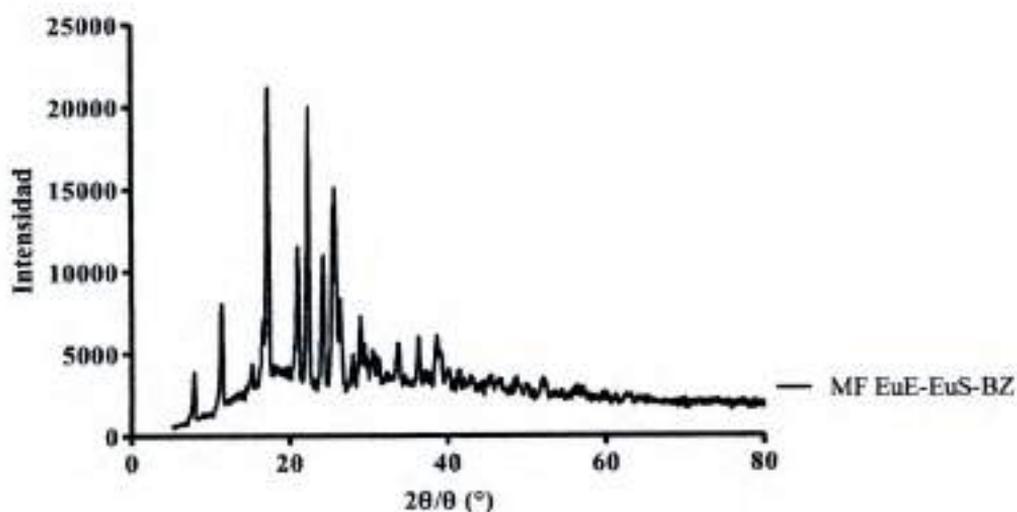
Polimetacrilatos

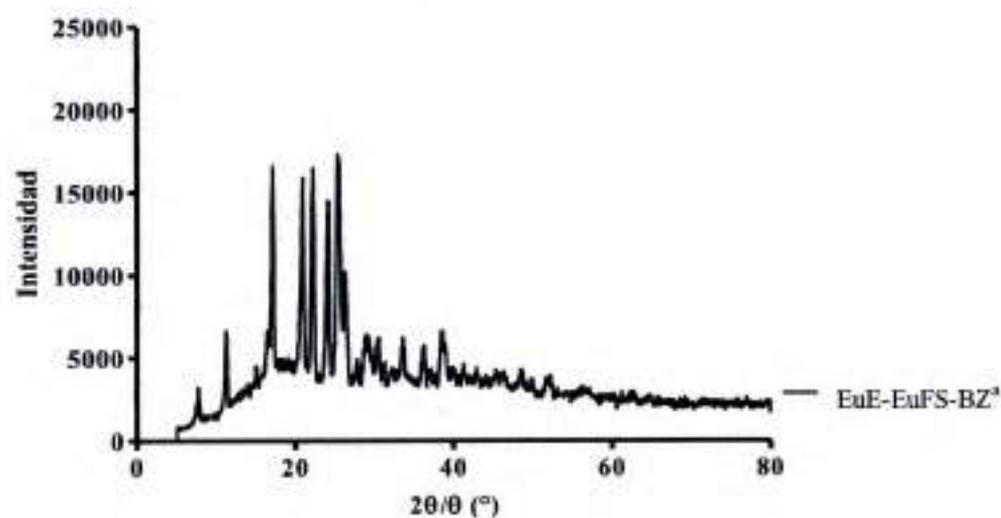
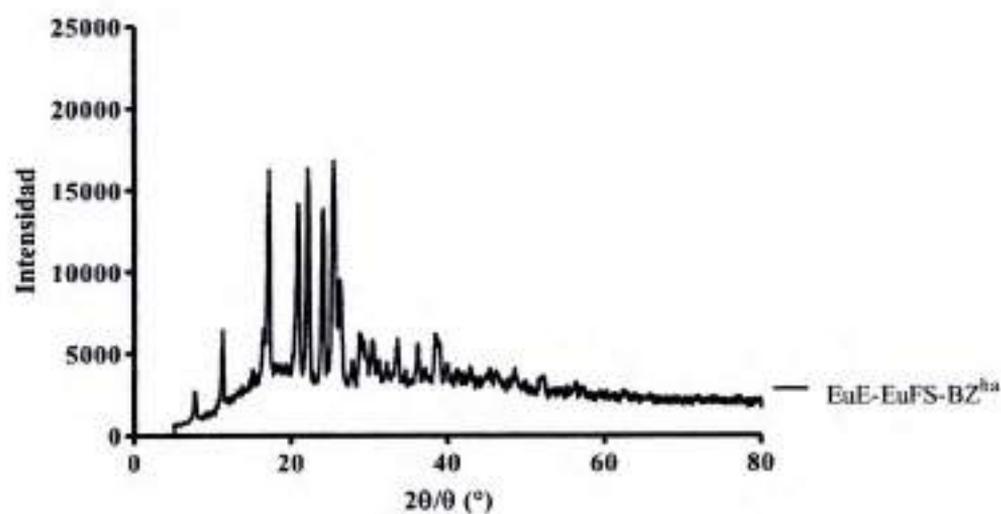
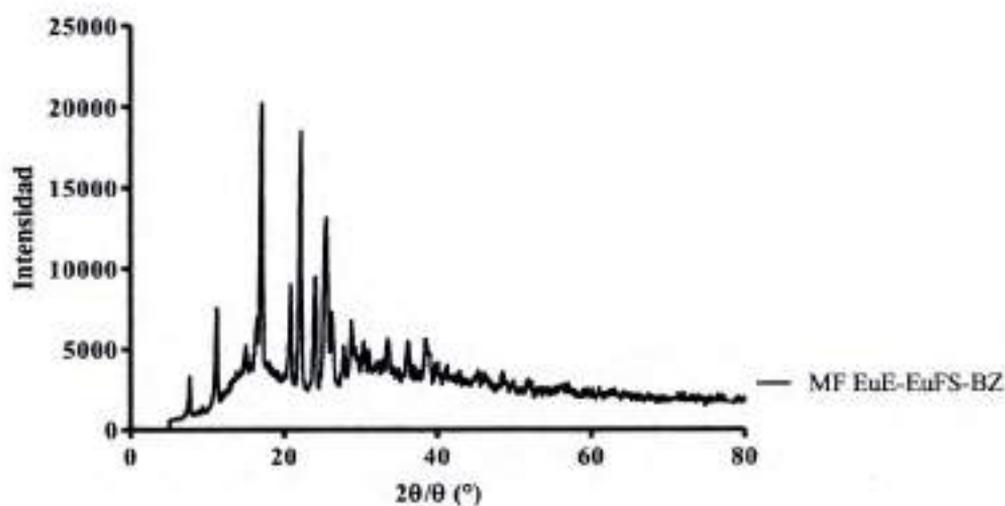




Difractogramas de Rx de polvo de los sistemas portadores de BZ y mezclas físicas

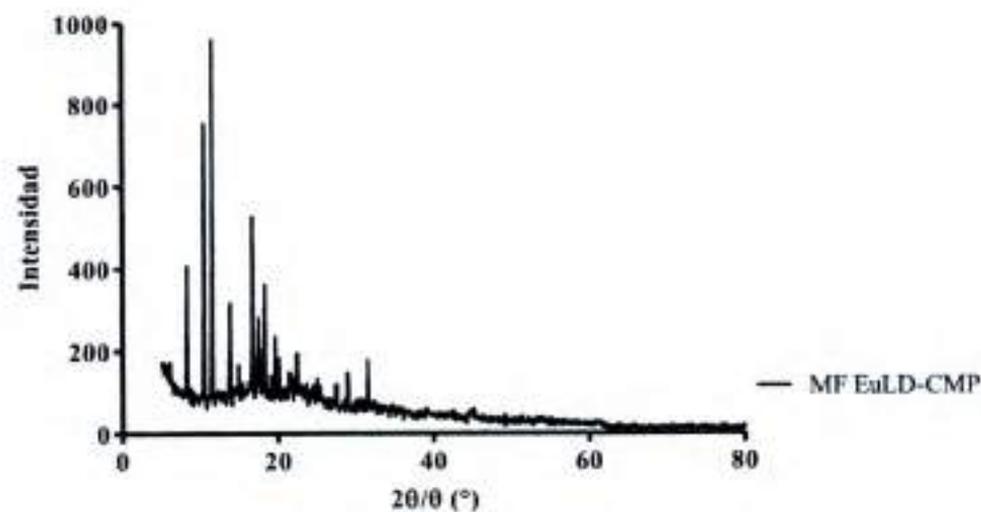
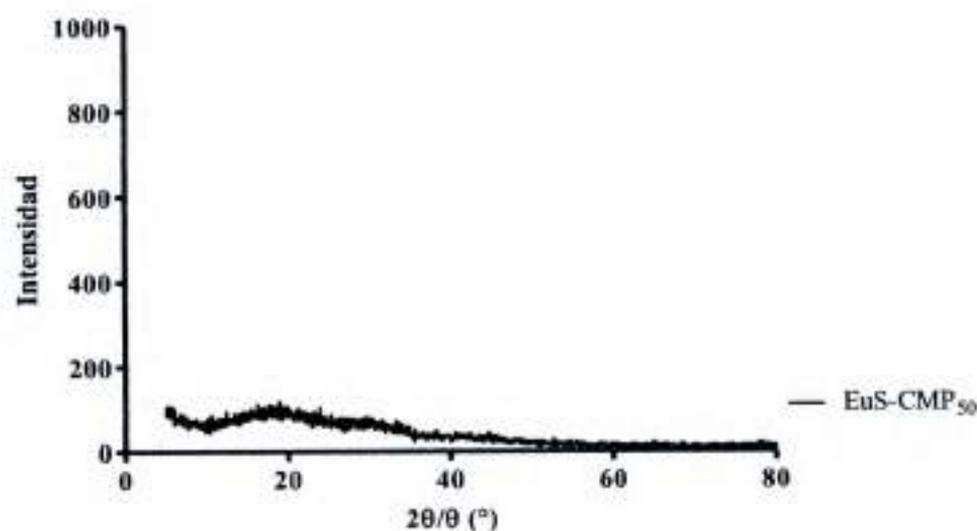
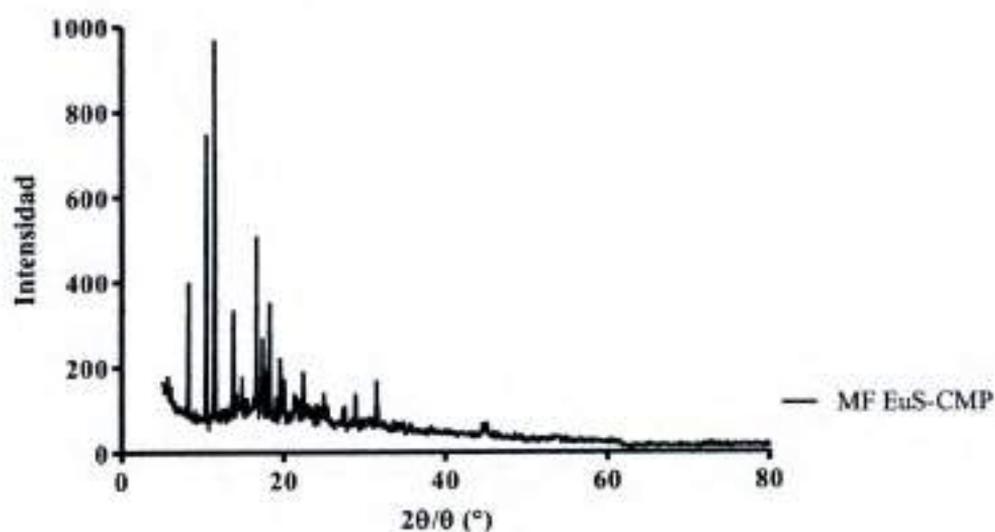


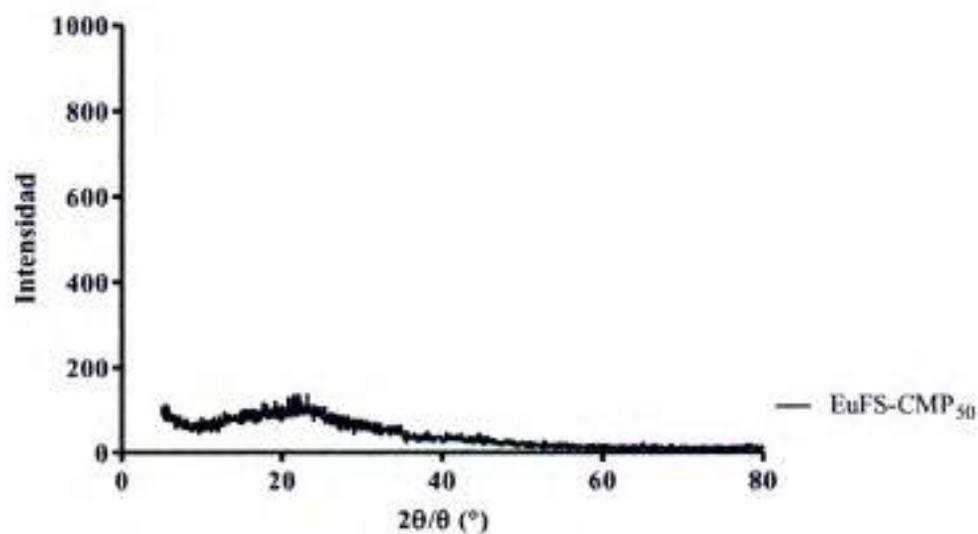
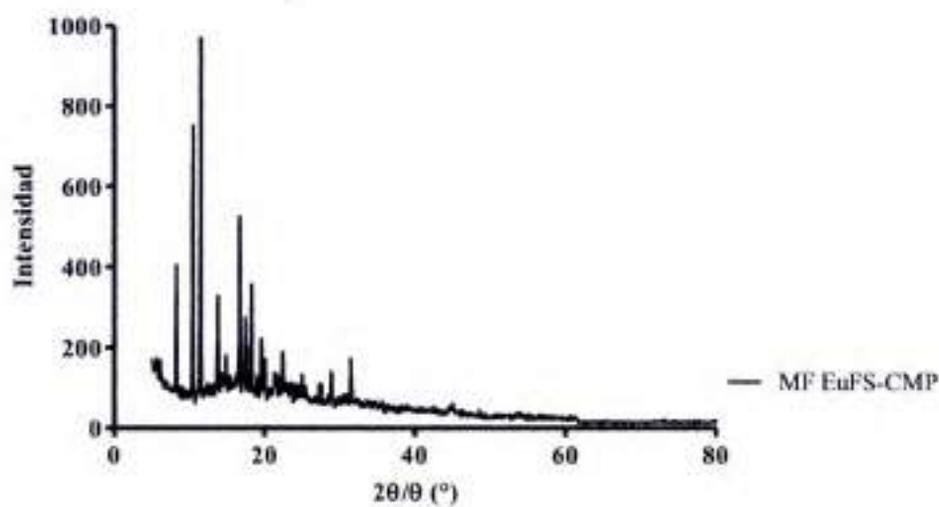
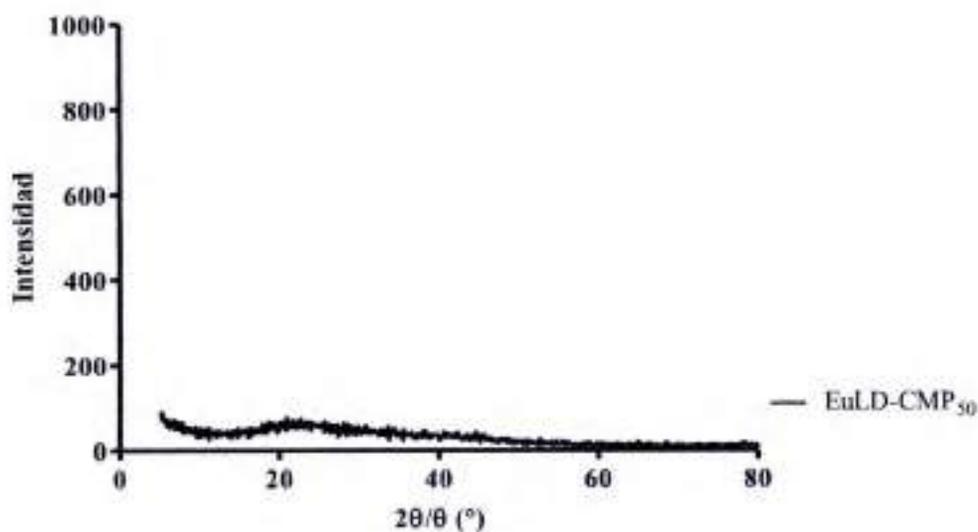






Difractogramas de Rx de polvo de los sistemas portadores de CMP y mezclas físicas

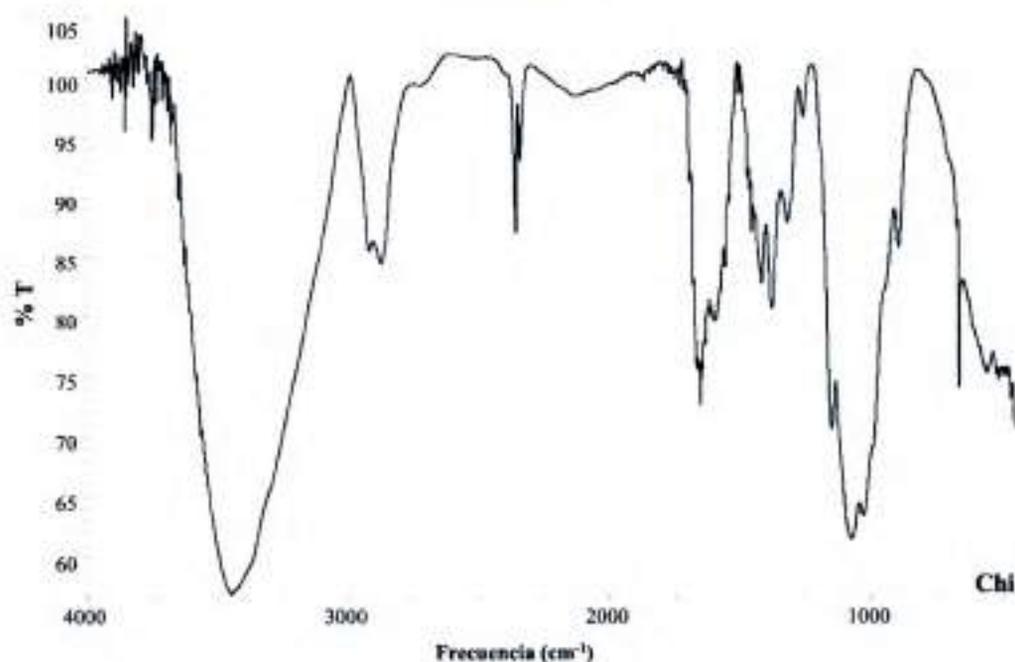
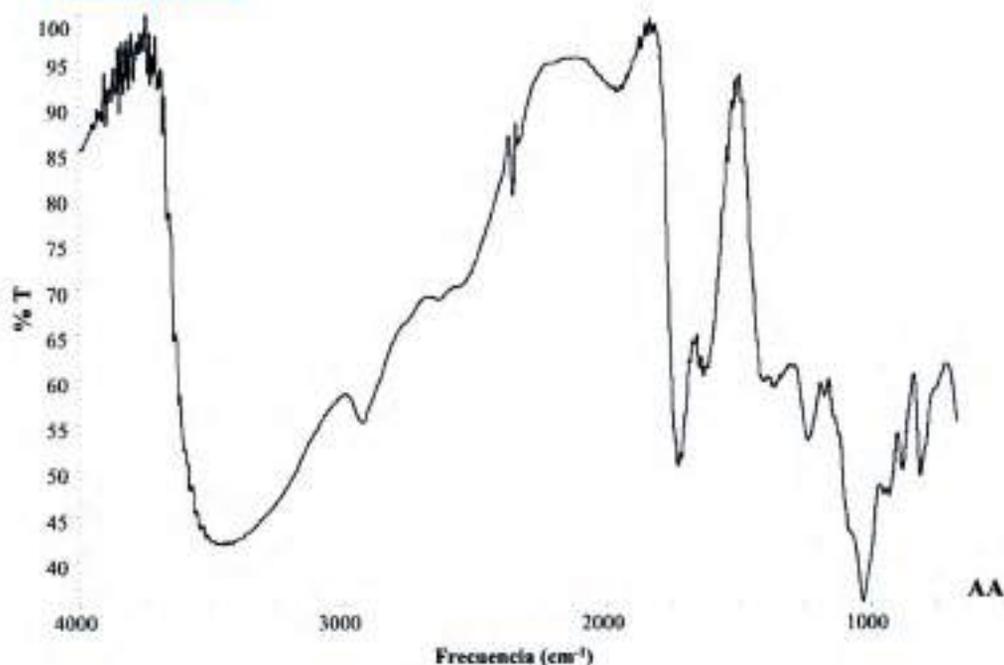




Anexo 4: Espectros FT-IR

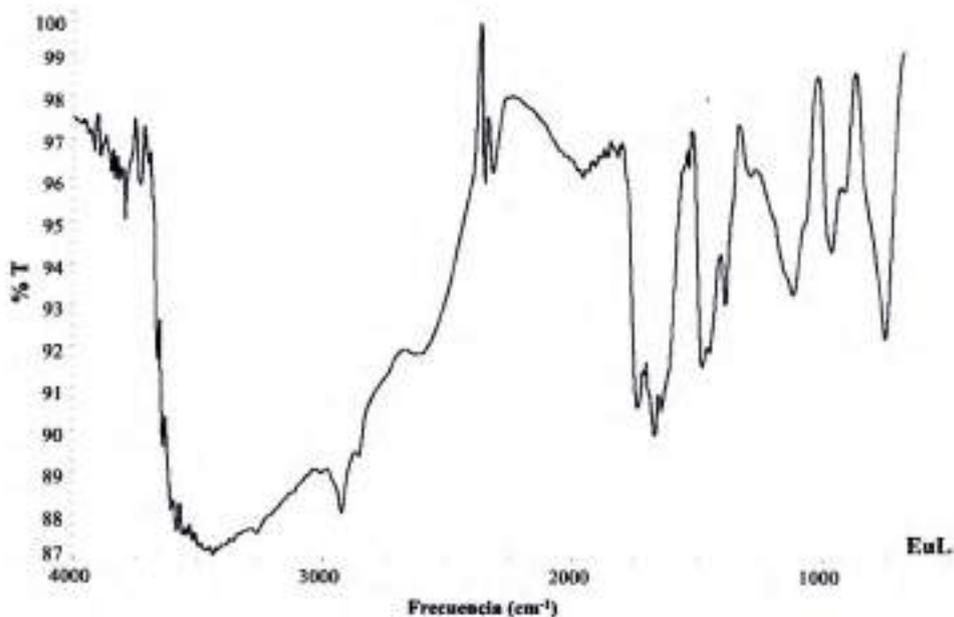
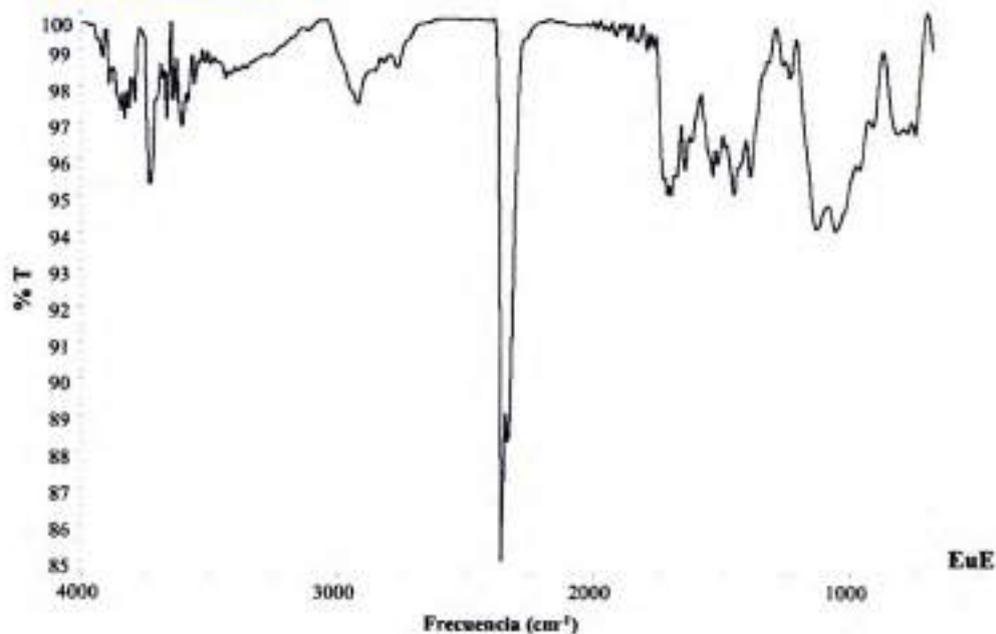
Espectros FT-IR de los PE seleccionados

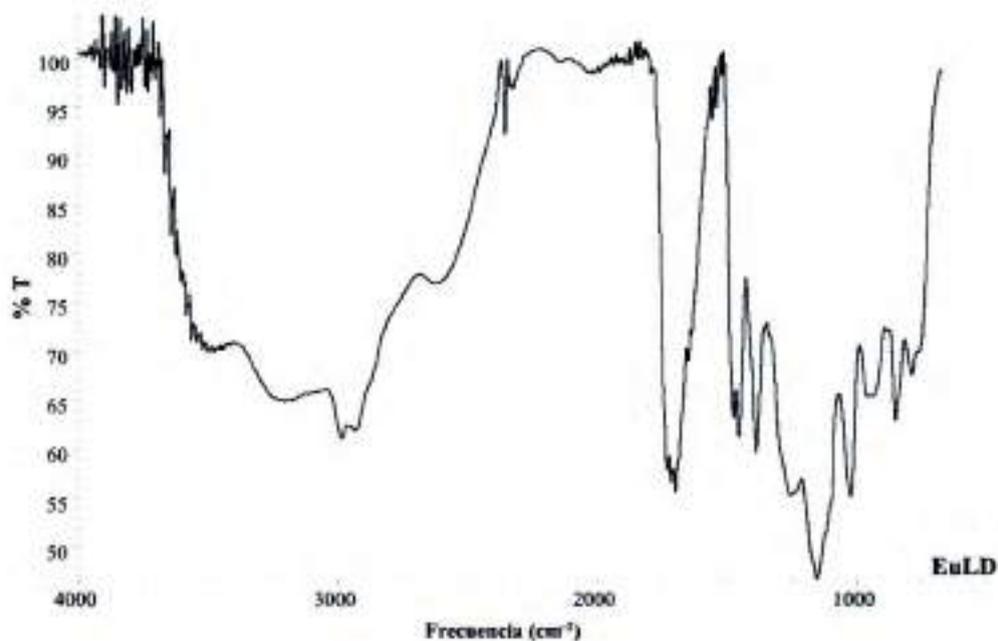
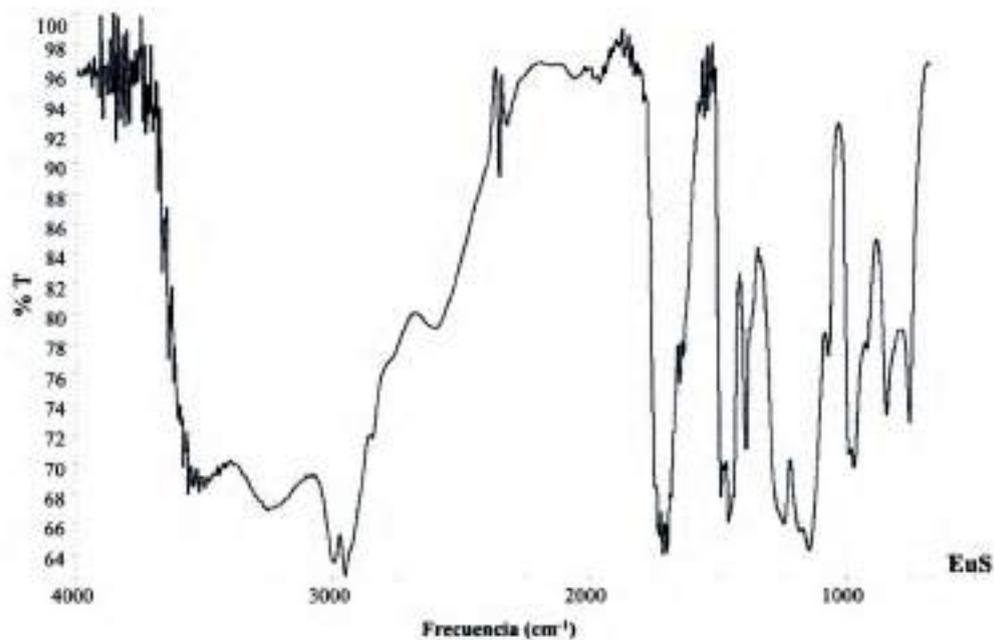
Polisacáridos

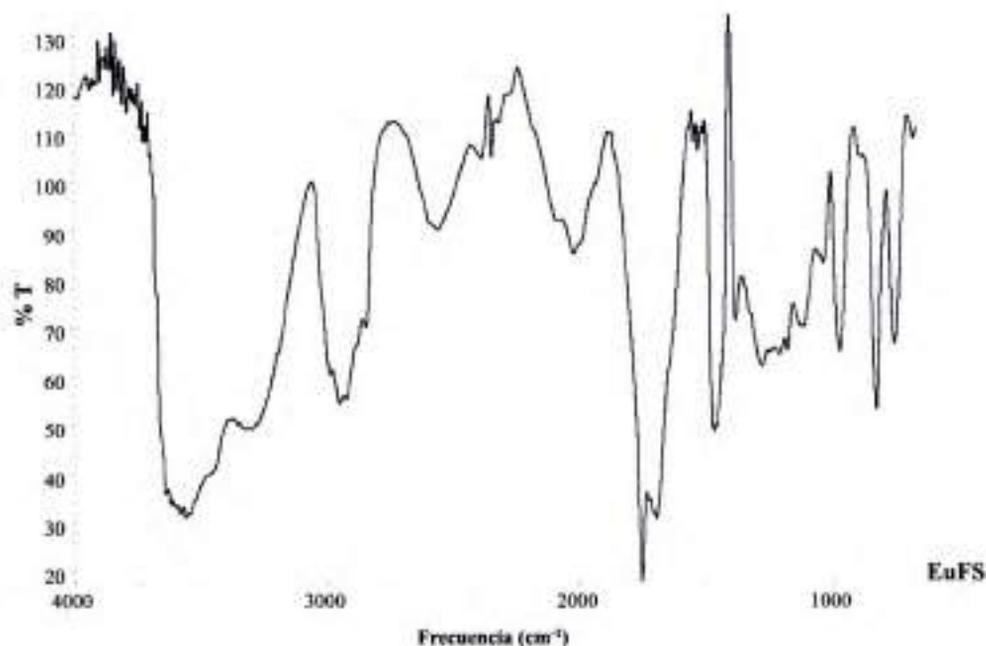




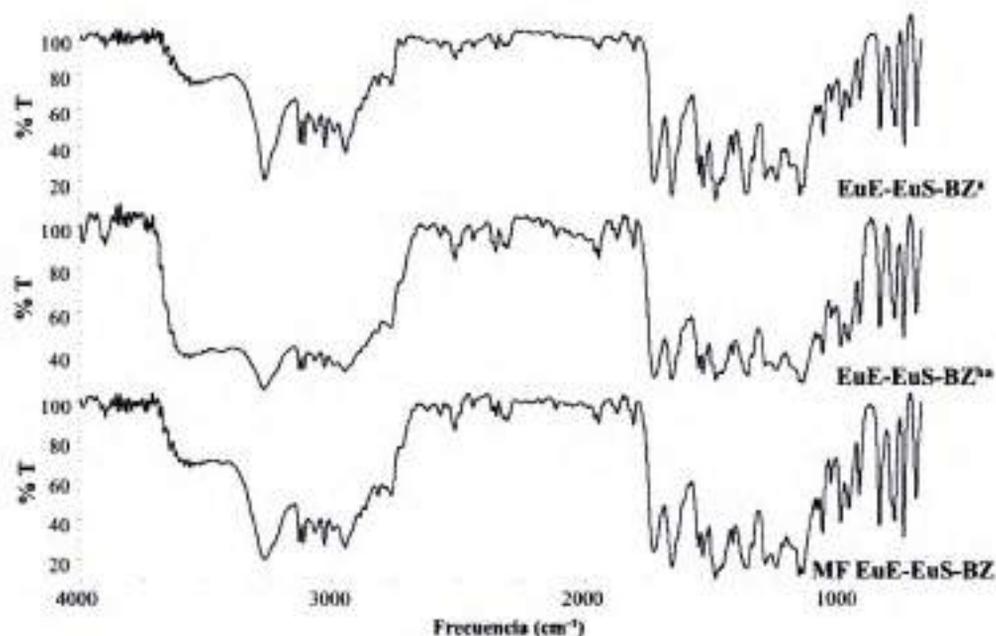
Polimetacrilatos

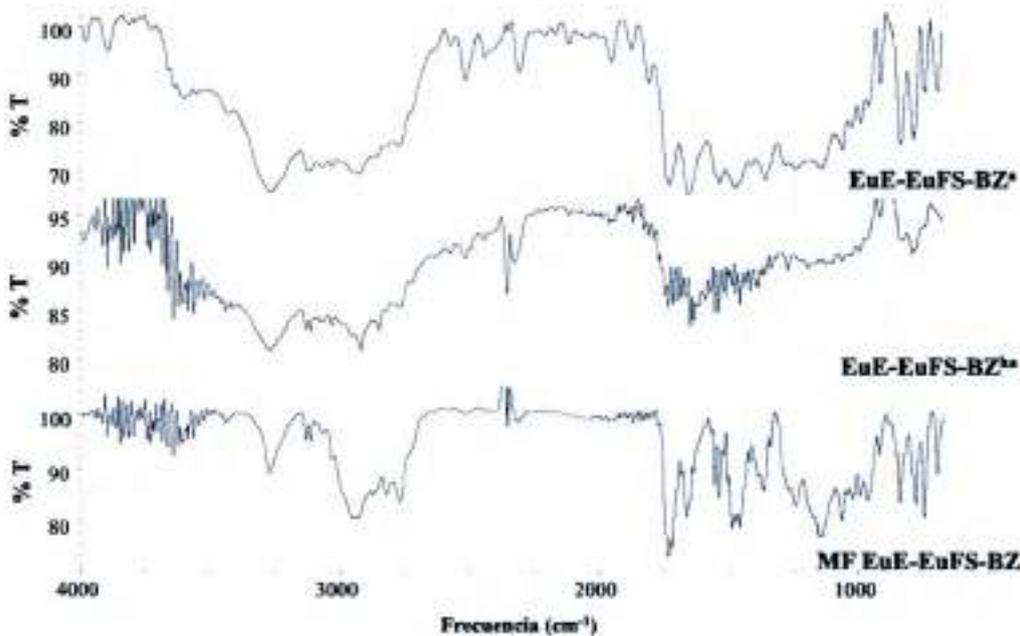
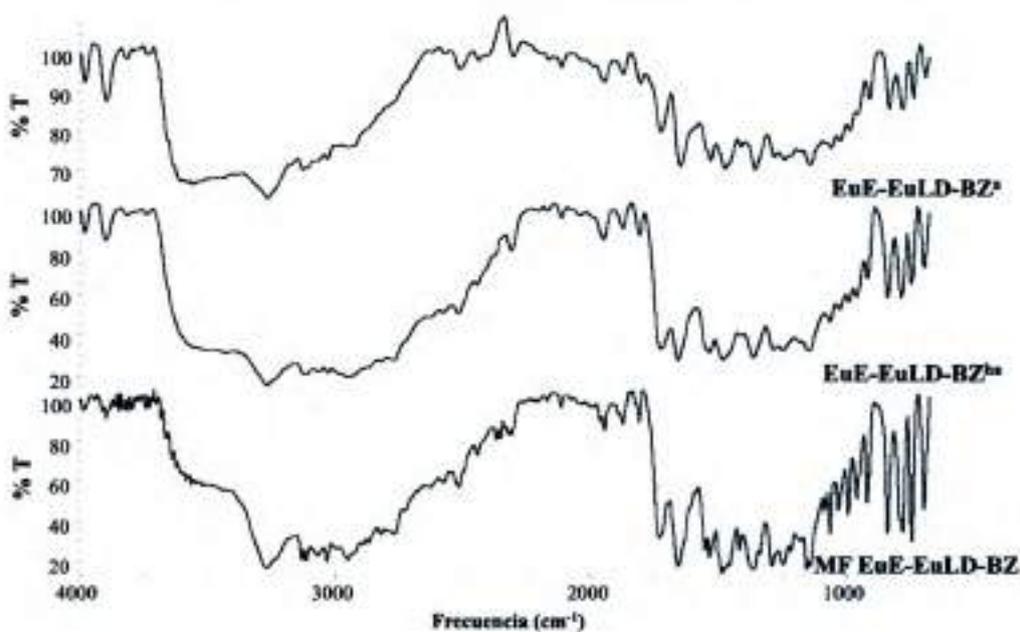






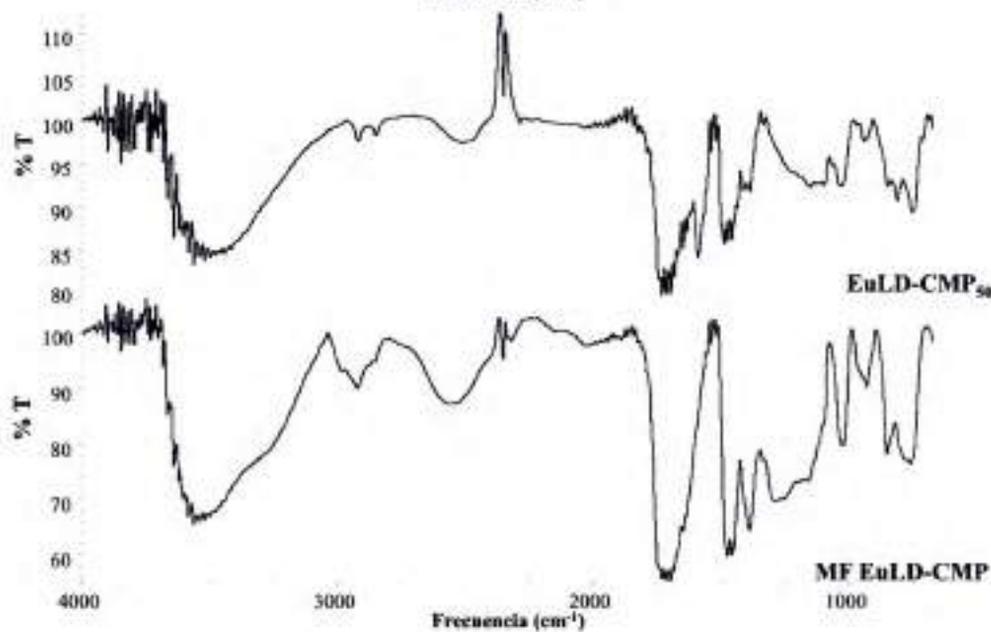
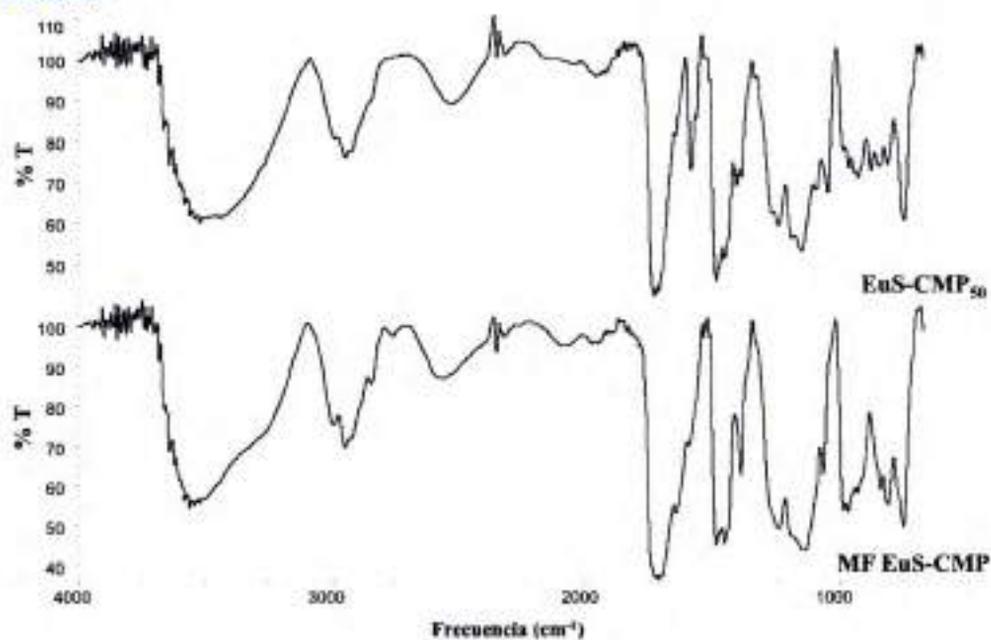
Espectros FT-IR de los sistemas portadores de BZ y mezclas físicas

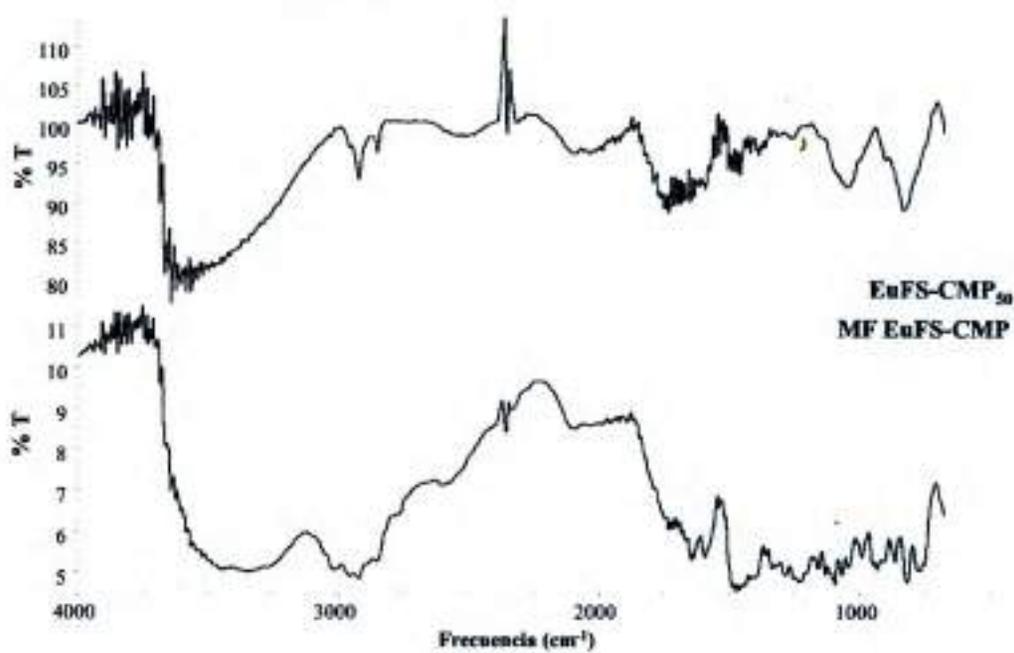


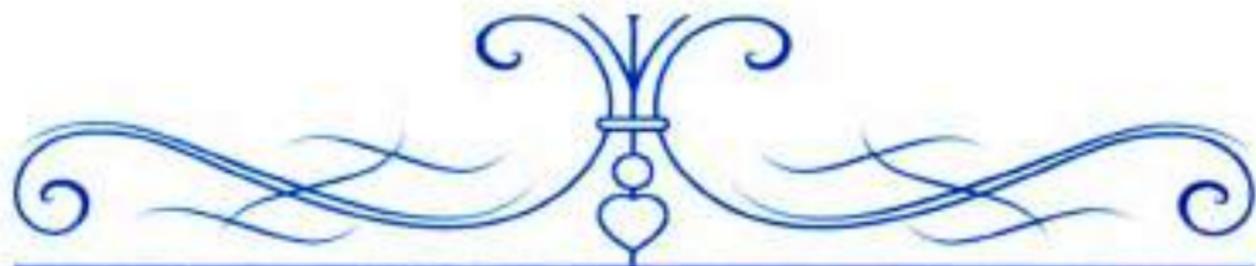




Espectros FT-IR de los sistemas portadores de CMP y mezclas físicas







**PUBLICACIONES GENERADAS
A PARTIR DE ESTA TESIS**



Publicaciones generadas a partir de esta tesis

Publicaciones científicas

- García MC, Ponce NE, Sanmarco LM, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF, Aoki MP (2016). *Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental Chagas disease: In vivo and in vitro assessments. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Trabajo enviado y aceptado con modificaciones.
- Palena MC, García MC, Manzo RH, Jimenez Kairuz AF (2015). *Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 30:45-53.
- García MC, Manzo RH, Jimenez Kairuz AF (2015). *Extemporaneous benznidazole oral suspensions prepared from commercially available tablets for treatment of Chagas' disease in pediatric patients. Tropical Medicine & International Health*. 20(7):864-70
- Tarragona S, Salomón S, Jimenez-Kairuz A, Lamas M, Orlandi S, Leonardi D, Maggia N, Paredes A, Romañuk C, García MC (2013). *Diseño y Preparación de formas farmacéuticas solidas de benznidazol para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Rev. Argentina de Salud Pública* 4(15):6-13.

Avances de presentaciones a congresos (Proceedings)

- 2014. García MC, Martinez R, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. *Validation of isocratic reverse-phase HPLC method for benznidazole determination in human plasma*. 3rd International Meeting on Pharmaceutical Sciences-RICiFa. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**. ISSN (Online): 0975-8232. Disponible en: <http://ijpsr.com/wp-content/uploads/2015/05/Proceedings-RICiFa2014-Cordoba-ARGENTINA.pdf>.
- 2014. García MC, Timofeijuk E, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. *In vitro release evaluation of two model NSAIDs from interpolyelectrolyte-drug complexes in solid state*. 3rd International Meeting on Pharmaceutical Sciences-RICiFa.



International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR).
ISSN (Online): 0975-8232. Disponible en: <http://ijpsr.com/wp-content/uploads/2015/05/Proceedings-RICiFa2014-Cordoba-ARGENTINA.pdf>.

- **2012.** García MC, Sanchez MF, Manzo RH., Jimenez-Kairuz AF. *“Novel sugared chewable hydrogels containing benznidazole for improve pediatric treatment of Chagas’ disease”*. **AAPS PharmSciTech 2014; suppl.** On-line: Report from the 2nd Annual RICiFa Meeting. e-ISSN 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-014-0082-2. Disponible en:
<http://www.ricifa.com.ar/documentos/Report%20RICiFa%202012.pdf>.
- **2012.** Paredes AJ, García MC, Romañuk C, Manzo RH., Jimenez-Kairuz AF. *“New benznidazole chewable tablets for the treatment of Chagas’ disease in pediatric patients”*. **AAPS PharmSciTech 2014; suppl.** On-line: Report from the 2nd Annual RICiFa Meeting. e-ISSN 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-014-0082-2. Disponible en:
<http://www.ricifa.com.ar/documentos/Report%20RICiFa%202012.pdf>
- **2012.** Palena MC, García MC, Manzo RH and Jimenez-Kairuz AF. *“Self-organizing nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes loading with acidic drugs”*. **AAPS PharmSciTech 2014; suppl.** On-line: Report from the 2nd Annual RICiFa Meeting. e-ISSN 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-014-0082-2. Disponible en
<http://www.ricifa.com.ar/documentos/Report%20RICiFa%202012.pdf>

Presentaciones a congresos de trabajos de ciencia y tecnología

1.1. Nacionales

- **2015.** *“Efecto sinérgico anti-T. cruzi de benznidazol combinado con clomipramina”*. García MC, Ponce NE, Sanmarco LM, Manzo RH, Rivarola HW, JimenezKairuz AF, Aoki MP. **XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología**. 15 al 17 de noviembre. Buenos Aires, Argentina. Modalidad Oral y Póster.
- **2015.** *“Sistemas de liberación modificada de fármacos basados en complejos Polielectrolito-Fármaco”*. Palena MC, García MC, Manzo RH, Jimenez Kairuz



AF. XI Simposio Argentino de Polimeros-SAP 2015. 20 al 23 de octubre. Santa Fé, Argentina. Modalidad Póster.

- **2013.** *“Actividad sinérgica in vitro de Benznidazol y Clomipramina sobre Trypanosoma cruzi”*. Strauss M, da Silva Rodrigues JH, García MC, Lo Presti S, Baez A, Bazan C, Nakamura CV, Jimenez-Kairuz A, Paglini-Oliva P, Rivarola HW. **XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP)**. 25 y 25 de octubre. Rosario, Argentina. Modalidad Póster.
- **2013.** *“Reformulación y estabilidad de una suspensión extemporánea de benznidazol al 1% para el tratamiento pediátrico de la Enfermedad de Chagas”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. **2  Congreso Nacional de Servicios Farmacéuticos. XIX Jornadas de Farmacia Hospitalaria. V Jornadas Rioplatenses de Farmacia Hospitalaria**. 12 y 13 de septiembre. Montevideo, Uruguay. Modalidad e-poster.

1.2. Internacionales

- **2015.** *“Caracterización de sistemas de liberación controlada de clomipramina. Evaluación de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas”*. García MC, Sanmarco L., Ponce N., Manzo R., Aoki P., Jimenez-Kairuz A. **VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética**. 4, 5 y 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.
- **2015.** *“Evaluación preclínica de la eficacia y seguridad del tratamiento combinado benznidazol-clomipramina en la enfermedad de Chagas experimental”*. García MC, Sanmarco L., Ponce N., Rivarola W., Manzo R., Jimenez-Kairuz A., Aoki P. **VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética**. 4, 5 y 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.
- **2015.** *“Caracterización de sistemas de liberación modificada de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas”*. García MC, Manzo R., Jimenez-Kairuz A., Aoki P. **VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética**. 4, 5 y 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.



- **2014.** *“Controlled release microparticles of benznidazol based on interpolyelectrolyte complexes”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. **XIV Latin American Symposium on Polymers and XII Ibero American Congress on Polymers**. 12 al 16 de octubre. Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. Modalidad Póster.
- **2013.** *“Microparticulas de liberación controlada de benznidazol basados en complejos interpolielectrolitos”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. **XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia. XVI Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana. XXI Congreso Farmacéutica Argentino**. 3,4 y 5 de octubre. Salta, Argentina. Modalidad Póster.
- **2012.** *“Novel sugared chewable hydrogels containing benznidazole for improve pediatric treatment of chagas' disease”*. García MC, Sánchez MF, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. **2º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas-RICiFa**. 22 y 23 de noviembre. Rosario, Santa Fé, Argentina. Modalidad Póster.
- **2012.** *“Self-organizing nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes loading with acidic drugs”*. Palena MC, García MC, Manzo RH, Jimenez Kairuz AF. **2º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas-RICiFa**. 22 y 23 de noviembre. Rosario, Santa Fé, Argentina. Modalidad Póster.
- **2012.** *“New benznidazole chewable tablets for the treatment of Chagas' disease in pediatric patients”*. Paredes AJ, García MC, Romañuk C, Manzo RH., Jimenez-Kairuz AF. **2º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas-RICiFa**. 22 y 23 de noviembre. Rosario, Santa Fé, Argentina. Modalidad Póster.
- **2012.** *“Diseño y preparación de formas farmacéuticas sólidas de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas”*. Tarragona Sonia, Palópoli Gastón, Maggia Norma, García Mónica C, Romañuk Carolina, Orlandi Silvina, Paredes Alejandro, Leonardi Darío, Lamas María, Jimenez-Kairuz Alvaro, Salomón Claudio. **III Encuentro Internacional sobre enfermedades olvidadas y XV Simposio sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores**. 25-26 de octubre. Buenos Aires, Argentina. Modalidad: Póster.
- **2012.** *“Identification and physicochemical characterization of benznidazole extracted and purified from comercial tablets” (Identificación y Caracterización fisicoquímica de benznidazol extraído y purificado a partir de comprimidos comerciales)* García MC, Paredes AJ, Romañuk CB, Manzo RH, Jiménez Kairuz



AF. XV Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana (FeFaS). 16-18 de agosto. Cartagena de Indias, Colombia. Modalidad: Oral.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Trabajos de divulgación científica

- **2015.** *“Suspensión pediátrica de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF*. Revista Salud (i) Ciencia. Año XXI, Vol. 21, N° 6 - Octubre, 2015. Publicación de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC). ISSN 1667-8982.
- **2013.** *“Micropartículas de liberación controlada de benznidazol basados en complejos interpolielectrolitos”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. VI Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas. 5 y 6 de diciembre. Córdoba, Argentina. Modalidad Póster.
- **2012.** *“Diseño, obtención y evaluación de formulaciones pediátricas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas”*. García MC, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF. II Jornadas de Jóvenes Investigadores de la UNC. Construcción y difusión de conocimientos desde la Universidad Pública. 11-12 de octubre. Córdoba, Argentina. Modalidad: Oral.

Premios y distinciones

- **2015. Mención especial.** *“Evaluación preclínica de la eficacia y seguridad del tratamiento combinado benznidazol-clomipramina en la enfermedad de Chagas experimental”* otorgada por el Comité Científico en el área *Farmacología-Farmacodinamia*. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. 4, 5 y 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.
- **2015. Mención especial.** *“Caracterización de sistemas de liberación controlada de clomipramina. Evaluación de la eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas”* otorgada por el Comité Científico en el área *Tecnología Farmacéutica*. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. 4, 5 y 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.



- **2013. Mención Especial.** *“Diseño y preparación de formas farmacéuticas sólidas y líquidas de benznidazol para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas”*. Premio Salud Investiga 2012 otorgado al proyecto multicéntrico presentado por la Fundación Mundo Sano en 2011. Encuentro Nacional de Investigación en Salud Pública. 20 y 21 de noviembre. Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.
- **2013. Primer Mención.** *“Micropartículas de liberación controlada de benznidazol basados en complejos interpolielectrolitos”*. XXI Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia. XVI Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana. XXI Congreso Farmacéutica Argentino. 3, 4 y 5 de octubre. Salta, Argentina.
- **2013. Mención Especial.** *“Reformulación y estabilidad de una suspensión extemporánea de benznidazol al 1% para el tratamiento pediátrico de la Enfermedad de Chagas”*. 2º Congreso Nacional de Servicios Farmacéuticos. XIX Jornadas de Farmacia Hospitalaria. V Jornadas Rioplatenses de Farmacia Hospitalaria. 12 y 13 de septiembre. Montevideo, Uruguay.