



UNR Universidad
Nacional de Rosario

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

Tesis de Doctorado

“DISEÑO Y EVALUACIÓN *IN-VITRO/IN-VIVO* DE SISTEMAS
POLIMÉRICOS MICRO- Y NANOPARTICULADOS DE FÁRMACOS.”

Presentada por:

Lic. Eva Carolina Arrua

Rosario, Argentina

2018

“Diseño y evaluación *in-vitro/in-vivo* de sistemas poliméricos micro- y nanoparticulados de fármacos”

Eva Carolina Arrua

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Técnica Farmacéutica del Departamento Farmacia dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y el Instituto de Química de Rosario, durante el período comprendido entre abril 2015 y diciembre 2018, bajo la dirección del Dr. Claudio Salomon.

A mis abuelos por ser mis referentes y enseñarme los valores más importantes de la vida, por ser mis maestros eternos.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas o instituciones que de una u otra manera han ayudado para la realización de este trabajo, en especial:

A mi director, el Dr. Claudio Salomon, por haber dedicado su tiempo en la dirección de esta tesis y por la paciencia brindada durante el desarrollo de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Extiendo este agradecimiento a todos los miembros del área Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas por abrirme sus puertas para poder desarrollarme profesionalmente.

Al Instituto de Química de Rosario por permitirme el acceso a equipos e instalaciones.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas recibidas para llevar a cabo esta tesis.

A las Dras. Laura Fichera, Marina Vinaud y Teresa Nunes, al Dr. Andrew Hemphill, y a los miembros de su grupo de trabajo, por confiar en nuestro grupo de investigación y emprender proyectos en conjunto, los cuales han formado parte de esta tesis doctoral.

A los Dres. Guillaume Bastiat, Claus-Michael Lehr, Xabier Murgia y a los miembros de sus grupos de investigación, por recibirme en sus laboratorios y enseñarme tanto.

A mis padres Silvia y Oscar, por ser mi ejemplo a seguir, y haberme enseñado a seguir adelante en todo momento con paciencia y cariño.

A mis hermanos Juan y Camila, dos personas que admiro, por acompañarme siempre y por toda su ayuda.

A mis amigos, quienes me apoyaron, acompañaron, y compartieron de manera ilimitada su conocimiento conmigo.

A Agustín por apoyarme incondicionalmente siempre, pero especialmente en esta etapa.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xxii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xxiii
LENGUAJE ESPECIAL.....	xxvi
PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS.....	xxix
PREMIOS Y DISTINCIONES.....	xxviii
PRESENTACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS.....	xxix
CURSOS REALIZADOS DURANTE LA TESIS.....	xxxii
PASANTÍAS EN LABORATORIOS EXTERNOS DURANTE LA TESIS.....	xxxiii
1. Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Índice.....	2
1.2. Introducción.....	3
1.2.1. Desarrollo de formulaciones farmacéuticas	3
1.2.2. Empleo de biomateriales como trasportadores de fármacos	5
1.2.2.1. Biomateriales empleados en este trabajo de tesis	7
1.2.3. Micro- y nanosistemas farmacéuticos	8
1.2.4. Fármacos modelos	11
1.2.4.1. Glibenclamida	11
1.2.4.2. Benznidazol	12
1.2.4.3. Praziquantel	13
1.2.4.4. Fenbendazol	14

1.2.5. Diseño y optimización de experimentos	14
1.3. Objetivos	16
1.3.1. Objetivo general	16
1.3.2. Objetivos específicos	16
1.4. Bibliografía	17
2. Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	25
2.1. Índice.....	26
2.2. Materiales y metodología	27
2.2.1. Materiales	27
2.2.2. Metodología	27
2.2.2.1. Formulación de sistemas farmacéuticos.....	28
2.2.2.2. Cuantificación de fármacos	32
2.2.2.3. Caracterización fisicoquímica de los sistemas	34
2.2.2.4. Caracterización <i>in-vitro</i> de los sistemas	37
2.2.2.5. Eficacia antiparasitaria <i>in-vitro</i>	41
2.2.2.6. Estudios <i>in-vivo</i> de los sistemas empleando animales de experimentación.....	43
2.2.2.7. Diseño de experimentos y optimización en la formulación de micro- y nanopartículas.....	47
2.2.2.8. Análisis estadístico	48
2.3. Bibliografía	50
3. Capítulo 3. Glibenclamida.....	53
3.1. Índice.....	54
3.2. Introducción	56
3.3. Formulaciones	57
3.4. Resultados	58

3.4.1. Nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros	58
3.4.1.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta	58
3.4.1.2. Microscopía electrónica de barrido	60
3.4.1.3. Eficacia de encapsulación	62
3.4.1.4. Solubilidad en agua	63
3.4.1.5. Ensayo de disolución	65
3.4.2. Nanopartículas formuladas con Eudragit y polietilenglicoles de diferente peso molecular	67
3.4.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta	67
3.4.2.2. Microscopía electrónica de barrido	69
3.4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido	71
3.4.2.4. Análisis de difracción de rayos X	72
3.4.2.5. Eficacia de encapsulación	72
3.4.2.6. Solubilidad en agua	73
3.4.2.7. Ensayo de disolución de glibenclamida	74
3.4.2.8. Ensayo de liberación de glibenclamida	76
3.4.2.9. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus	79
3.4.2.10. Viabilidad celular	81
3.4.2.11. Ensayos de transporte	82
3.4.3. Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros	83
3.4.3.1. Fase de <i>screening</i>	83
3.4.3.2. Fase de optimización	85
3.4.3.3. Verificación de la optimización	92
3.4.3.4. Evaluación de la disolución de glibenclamida en el sistema optimizado.....	93

3.5. Conclusiones	95
3.6. Bibliografía	96
4. Capítulo 4. Benznidazol.....	100
4.1. Índice	101
4.2. Introducción	102
4.3. Formulaciones	104
4.4. Resultados	105
4.4.1. Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con poloxámero	105
4.4.1.1. Fase de <i>screening</i>	105
4.4.1.2. Fase de optimización	106
4.4.1.3. Verificación de la optimización	113
4.4.1.4. Ensayo de disolución de las nanopartículas optimizadas	114
4.4.1.5. Caracterización de las nanopartículas optimizadas	114
4.4.2. Nanocápsulas lipídicas	128
4.4.2.1. Nanocápsulas lipídicas convencionales	128
4.4.2.2. Diseño y optimización durante la elaboración de nanocápsulas lipídicas de benznidazol	142
4.5. Conclusiones	155
4.6. Referencias	157
5. Capítulo 5. Praziquantel.....	161
5.1. Índice.....	162
5.2. Introducción	163
5.3. Formulaciones	164
5.4. Resultados	165
5.4.1. Micro- y Nanopartículas	165
5.4.1.1. Cantidad de praziquantel nanocrystalizado y rendimiento	165

5.4.1.2. Tamaño de partícula y solubilidad acuosa	165
5.4.1.3. Calorimetría diferencial de barrido	166
5.4.1.4. Análisis de difracción de rayos X	167
5.4.1.5. Ensayos de disolución	168
5.4.1.6. Evaluación del metabolismo energético en ratones Balb/c.	171
5.4.2. Nanocápsulas lipídicas de praziquantel	173
5.4.2.1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad	173
5.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	174
5.4.2.3. Eficiencia de encapsulación	175
5.4.2.4. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus	175
5.4.2.5. Activación del complemento	175
5.4.2.6. Ensayos de citotoxicidad de nanocápsulas lipídicas en cultivos de células Caco-2	176
5.4.2.7. Evaluación de la eficacia antiparasitaria <i>in-vitro</i> de las nanocápsulas lipídicas de praziquantel	178
5.5. Conclusiones	179
5.6. Bibliografía	180
6. Capítulo 6. Fenbendazol.....	182
6.1. Índice.....	183
6.2. Introducción	184
6.3. Formulaciones	185
6.4. Resultados	186
6.4.1. Diseño y optimización de micropartículas de fenbendazol	186
6.4.1.1. Fase de <i>screening</i>	186
6.4.1.2. Fase de optimización	188
6.4.1.3. Verificación de la optimización	195

6.4.1.4. Caracterización de las micropartículas de fenbendazol	196
6.4.2. Nanocápsulas lipídicas de fenbendazol	201
6.4.2.1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad	201
6.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	202
6.4.2.3. Eficiencia de encapsulación	203
6.4.2.4. Interacción de nanocápsulas con proteínas del mucus	203
6.4.2.5. Activación del complemento	204
6.4.2.6. Evaluación de la eficacia antiparasitaria de las nanocápsulas lipídicas de fenbendazol	205
6.5. Conclusiones	209
6.6. Referencias	210
7. Capítulo 7. Conclusiones.....	214
7.1. Conclusiones	215
8. Capítulo 8. Resumen.....	217
7.1. Resumen	218

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Metodologías empleadas para aumentar la solubilidad y mejorar la disolución de fármacos poco solubles.....	5
Figura 1.2. Representación de los distintos tipos de NPs utilizados como sistemas de liberación de fármacos.....	10
Figura 1.3. Representación de los distintos tipos de nanosistemas lipídicos utilizados como sistemas de liberación de fármacos.....	10
Figura 1.4. Estructura química de la GB. N- [4 - β - [2-metoxi-5- clorobenzamido] -etil) -bencenosulfonil] -N-ciclohexil-urea.....	12
Figura 1.5. Estructura química del BNZ. N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida.....	13
Figura 1.6. Estructura química del PZQ. 2-(Ciclohexilcarbonil)-1, 2, 3, 6, 7,11b-hexahidro-4H-piracino[2,1-a]isoquinolina-4-ona.....	14
Figura 1.7. Estructura química del FNZ. Metil-(5-fenil-tío)- benzimidazol-2-carbamato.....	14
Figura 3.1. Micrografías de MEB de GB pura, las muestras 5H (estufa y liofilizada), 6H (estufa y liofilizada) y 11H (estufa y liofilizada).....	61
Figura 3.2. Perfiles de disolución de GB en <i>buffer</i> fosfato a pH 7,5 y 37 °C para las NPs formuladas por homogeneización.....	65
Figura 3.3. Correlación entre el $T_{partícula}$ y el PM de PEG empleado.....	68
Figura 3.4. Micrografías de MEB de las NPs de GB y PEG de diferentes PM. 11M, 11H, 12M, 12H, 13M, 13H, 14M, 14H, 15M y 15H.....	70
Figura 3.5. Patrones de DRX de GB sin tratar y las NPs elaboradas empleando agitación magnética y homogeneizador.....	72
Figura 3.6. Perfiles de disolución de NPs de GB con PEGs de diferente PM, empleando agitación magnética y homogeneizador durante su formulación.....	75
Figura 3.7. Perfiles de liberación, en medio simulado de fluido gástrico, de GB desde las NPs formuladas empleando agitación magnética y homogeneizador durante su formulación.....	77

Figura 3.8. Perfiles de liberación, en medio simulado de fluido intestinal, de GB desde las NPs formuladas empleando agitación magnética y homogeneizador durante su formulación.....	78
Figura 3.9. Distribución del $T_{partícula}$ para dos NPs control de 200 nm en ausencia y presencia de proteínas del mucus.....	80
Figura 3.10. Sobrevida celular de cultivos de células Caco-2 en presencia de las NPs.....	81
Figura 3.11. Evolución de los valores de TEER para cultivos de células Caco-2 durante el tratamiento con GB sin tratar, las NPs y medio de cultivo.....	82
Figura 3.12. P_{ap} de GB sin tratar y las NPs de GB y PEG a través de una monocapa de células Caco-2.....	83
Figura 3.13. Variación del R en función de las cantidades de P-188 y P-407.....	87
Figura 3.14. Variación del R en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.....	88
Figura 3.15. Variación de la $E_f E$ en función de las cantidades de P-188 y P-407.....	88
Figura 3.16. Variación de la $E_f E$ en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.....	88
Figura 3.17. Variación del $T_{partícula}$ en función de las cantidades de P-188 y P-407.....	89
Figura 3.18. Variación de la S_{GB} en función de las cantidades de P-188 y P-407.....	89
Figura 3.19. Variación de la S_{GB} en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.....	90
Figura 3.20. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y P-407.....	90
Figura 3.21. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y EuRLPO.....	91

Figura 3.22. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y PEG 6000.....	91
Figura 3.23. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-407 y EuRLPO.....	91
Figura 3.24. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-407 y PEG 6000.....	92
Figura 3.25. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.....	92
Figura 3.26. Perfiles de disolución de GB desde las NPs optimizadas y desde GB sin tratar.....	93
Figura 4.1. Variación del porcentaje de BNZ_{NC} en función de la concentración de BNZ.....	110
Figura 4.2. Variación del $T_{partícula}$ en función de la concentración de BNZ y P-188.....	110
Figura 4.3. Variación de la S_{BNZ} en función de la proporción de fase orgánica.....	110
Figura 4.4. Gráfico de deseabilidad en función de las concentraciones de BNZ y P-188.....	111
Figura 4.5. Gráfico de deseabilidad en función de la concentración de BNZ y la proporción de fase orgánica.....	112
Figura 4.6. Gráfico de deseabilidad en función de la concentración de P-188 y la proporción de fase orgánica.....	112
Figura 4.7. Perfiles de disolución de BNZ sin tratar, NPs no optimizadas y NPs optimizadas.....	114
Figura 4.8. IPd de las NPs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.....	115
Figura 4.9. Liberación de BNZ a partir de las NPs en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.....	116

Figura 4.10. Estabilidad de almacenado de las NPs con control del $T_{particula}$, la solubilidad y el contenido de BNZ, y control del $T_{particula}$ para nanosuspensiones....	118
Figura 4.11. Viabilidad celular de Caco-2 en presencia de BNZ sin tratar y NPs de BNZ optimizadas.....	119
Figura 4.12. Evolución en los valores de TEER de cultivos de células Caco-2 durante ensayos de transporte con BNZ sin tratar y NPs de BNZ optimizadas.....	120
Figura 4.13. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2.....	121
Figura 4.14. Cantidad total de BNZ que pasa a través de la monocapa celular de Caco-2 partiendo de BNZ sin tratar y de las NPs de BNZ optimizadas; P_{ap} de BNZ desde BNZ sin tratar y NPs optimizadas de BNZ.....	122
Figura 4.15. Efectos del BNZ sin tratar y las NPs de BNZ sobre los tripomastigotes obtenidos de los cultivos de células.....	124
Figura 4.16. Porcentaje de inhibición de células Vero y miocitos cardíacos infectados con TcN expuestos a BNZ sin tratamiento y NPs de BNZ optimizadas.....	126
Figura 4.17. Efectos de las NPs de BNZ optimizadas en el tratamiento de ratones infectados durante la fase aguda. Tratamiento de 30 días. Tratamiento de 15 días.....	127
Figura 4.18. Micrografías electrónicas de transmisión de las NCLs de BNZ, S4, S5 y S6. La barra representa 100 nm.....	130
Figura 4.19. IPd de las NCLs de BNZ en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados. S4, S5 y S6.....	132
Figura 4.20. Perfiles de liberación de BNZ a partir de las NCLs de BNZ en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados. S4, S5 y S6.....	133
Figura 4.21. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm^2/ml) de BNZ.....	135
Figura 4.22. Supervivencia celular luego de 24 horas de exposición a NCLs sin fármaco y las cápsulas de BNZ.....	136
Figura 4.23. Supervivencia celular luego de 48 horas de exposición a NCLs sin fármaco y las NCLs de BNZ.....	137

Figura 4.24. Evolución en los valores de TEER de cultivos de células Caco-2 durante ensayos de transporte con las NCLs de BNZ.....	138
Figura 4.25. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2. Luego de 2 días de cultivo y posterior a los ensayos de transporte con medio, BNZ sin tratar y las NCLs S4, S5 y S6.....	139
Figura 4.26. Cantidad total de BNZ que pasa a través de la monocapa de células Caco-2 empleando el BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ. P_{ap} de BNZ desde BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ.....	140
Figura 4.27. Eficiencia en la captación de NCLs por parte de células Caco-2.....	141
Figura 4.28. Micrografías obtenidas por microscopía confocal. Las NCLs se muestran en color rojo, las membranas celulares de verde y los núcleos de las células en azul. NCLs S4, NCLs S5 y NCLs S6.....	142
Figura 4.29. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de BNZ optimizadas.....	145
Figura 4.30. IPd de las NCLs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.....	146
Figura 4.31. Perfiles de liberación de BNZ a partir de las NCLs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.....	147
Figura 4.32. Perfiles de distribución del tamaño de las NCLs y las NCLs en presencia de proteínas del mucus.....	148
Figura 4.33. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs de BNZ.....	149
Figura 4.34. Supervivencia celular luego de 24 h de exposición a las NCLs.....	150
Figura 4.35. Supervivencia celular luego de 48 h de exposición a las NCLs.....	150
Figura 4.36. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2 posterior a los ensayos de transporte con las NCLs de BNZ optimizadas.....	151
Figura 4.37. Cantidad de BNZ permeado a través de la monocapa de células Caco-2 empleando BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ optimizadas. P_{ap} de BNZ partiendo de BNZ sin tratar y NCLs de BNZ.....	152

Figura 4.38. Eficiencia de captación de NCLs optimizadas por parte de células Caco-2.....	153
Figura 4.39. Imagen obtenida por microscopía confocal.....	154
Figura 5.1. Difractogramas de PZQ sin tratar y las NPs de PZQ formuladas.....	168
Figura 5.2. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de P-188.....	169
Figura 5.3. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de P-407.....	169
Figura 5.4. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de PVA.....	170
Figura 5.5. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de PZQ.....	174
Figura 5.6. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm^2/ml) de PZQ.....	176
Figura 5.7. Supervivencia celular luego de 24 h de exposición a las NCLs.....	177
Figura 5.8. Supervivencia celular luego de 48 h de exposición a las NCLs.....	177
Figura 5.9. Movilidad relativa de gusanos <i>S. mansoni</i> en presencia de PZQ de partida y las NCLs de PZQ y NCLs blanco, luego de (A) 1 hora, (B) 5 horas y (C) 24 horas....	178
Figura 6.1. Variación del <i>R</i> en función de la concentración de la cantidad de PVA y el <i>VSipernat</i>	192
Figura 6.2. Variación del <i>R</i> en función de la potencia de la <i>Bomba</i> y la <i>T entrada</i> del rociador.....	192
Figura 6.3. Variación del <i>FNZc</i> en función de la cantidad de PVA y del <i>VSipernat</i>	193
Figura 6.4. Variación del <i>FNZc</i> en función de la cantidad de PVA y de la <i>T entrada</i>	193
Figura 6.5. Variación de la <i>SFNZ</i> en función de la cantidad de PVA y el <i>VSipernat</i>	194
Figura 6.6. Representación de la deseabilidad en función de la cantidad de PVA y del <i>VSipernat</i>	194
Figura 6.7. Gráfico de deseabilidad en función de la potencia de la <i>Bomba</i> y la <i>T entrada</i> del aspersionador.....	195

Figura 6.8. Micrografías de FNZ de partida y de las MPs de FNZ optimizadas.....	196
Figura 6.9. Termograma de FNZ sin tratar, PVA y las MPs de FNZ optimizadas.....	197
Figura 6.10. Difractogramas del FNZ, PVA y las MPs de FNZ optimizadas.....	198
Figura 6.11. Perfiles de disolución de FNZ de partida y de FNZ desde las MPs optimizadas.....	200
Figura 6.12. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de FNZ (S8)	203
Figura 6.13. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm ² /ml) de FNZ.....	204
Figura 6.14. Porcentajes de liberación relativa de PGI en presencia de FNZ sin tratar y las NCLs de FNZ.....	206
Figura 6.15. Viabilidad relativa de metacestodos de <i>E. multilocularis</i> en presencia de las NCLs de FNZ y el FNZ sin tratamiento.....	207
Figura 6.16. Movilidad relativa en presencia de FNZ sin tratamiento y las NCLs de FNZ.....	207

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Protocolo de las muestras de GB ensayadas para comparar el tipo y concentración de estabilizante.....	29
Tabla 2.2. Protocolo de las muestras de GB ensayadas para estudiar el efecto del PM del PEG.....	30
Tabla 2.3. Protocolo resumido de las nanosuspensiones de PZQ elaboradas.....	30
Tabla 2.4. Composición de las NCLs convencionales sin fármacos.....	32
Tabla 3.1. $T_{partícula}$, IPd y PZ de las muestras liofilizadas.....	59
Tabla 3.2. R y E_fE de las muestras.....	63
Tabla 3.3. S_{GB} de las muestras.....	64
Tabla 3.4. Parámetros cinéticos (a y n) y estadísticos (r^2) del ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas.....	66
Tabla 3.5. $T_{partícula}$, IPd y PZ de las NP de GB.....	67
Tabla 3.6. Análisis térmico de los nanosistemas y sus componentes.....	71
Tabla 3.7. E_fE de GB para las NPs.....	73
Tabla 3.8I. S_{GB} en las NPs.....	73
Tabla 3.9. $T_{partícula}$ estimado por desplazamiento relativo y el efecto de mucinas sobre el mismo.....	80
Tabla 3.10. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.....	84
Tabla 3.11. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas estudiadas.....	85
Tabla 3.12. Restricciones de la optimización para la formulación de NPs de GB.....	86
Tabla 3.13. Protocolos y resultados del experimento de optimización (valores teóricos y experimentales).....	92

Tabla 3.14. Cantidades de GB disuelta a diferentes tiempos para las NPs optimizadas y GB sin tratamiento.....	94
Tabla 4.1. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas ensayadas.....	105
Tabla 4.2. Diseño Central Compuesto construido para optimizar las respuestas.....	107
Tabla 4.3. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.....	108
Tabla 4.4. Restricciones de la optimización para la formulación de NPs de BNZ.....	109
Tabla 4.5. Protocolos y resultados del experimento de optimización y de un sistema preparado sin optimización previa.....	113
Tabla 4.6. Resultados de toxicidad de células Vero frente a las NPs de BNZ.....	122
Tabla 4.7. Resultados del control de hemólisis causada por NPs de BNZ.....	123
Tabla 4.8. Resultados de las NCLs de S1, S2 y S3.....	128
Tabla 4.9. Resultados de las NCLs conteniendo BNZ.....	129
Tabla 4.10. $E_f E$ obtenida para cada NCL.....	130
Tabla 4.11. $T_{partícula}$ estimado por desplazamiento relativo y el efecto de mucinas sobre el mismo.....	134
Tabla 4.12. Ensayos realizados y resultados obtenidos en el diseño.....	143
Tabla 4.13. Valores de indicadores estadísticos obtenidos del diseño.....	144
Tabla 4.14. Restricciones de la optimización para la formulación de NCLs de BNZ..	144
Tabla 4.15. Protocolos y resultados del ensayo de optimización.....	145
Tabla 5.1. PZQ_{NC} y R de los sistemas.....	165
Tabla 5.2. $T_{partícula}$ y S_{PZQ} en agua de las partículas.....	166
Tabla 5.3. Análisis térmico de los nanosistemas y sus componentes.....	167
Tabla 5.4. Resultados de las NCLs sin fármaco y NCLs conteniendo BNZ.....	173
Tabla 6.1. Diseño de Plackett Burman de MP de FNZ construido para seleccionar factores.....	187

Tabla 6.2. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.....	187
Tabla 6.3. Diseño central compuesto construido para optimizar las respuestas.....	189
Tabla 6.4. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y probabilidad asociada obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.....	190
Tabla 6.5. Restricciones de la optimización para la formulación de MPs de FNZ.....	191
Tabla 6.6. Protocolos y resultados del experimento de optimización (valores teóricos y experimentales).....	195
Tabla 6.7. Resultados de las NCLs sin fármaco y NCLs conteniendo FNZ.....	201

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.1. Función de deseabilidad global.....	15
Ecuación 2.1. Eficacia de encapsulación de MPs y NPs.....	36
Ecuación 2.2. Eficacia de encapsulación de NCLs.....	36
Ecuación 2.3. Porcentaje de fármaco nanocristalizado.....	36
Ecuación 2.4. Rendimiento.....	37
Ecuación 2.5. Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	38
Ecuación 2.6. Modelo de Weibull modificado.....	38
Ecuación 2.7. Coeficiente de permeabilidad aparente.....	41
Ecuación 2.8. Porcentaje de inhibición del crecimiento.....	46

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ATC	Ácido tricarboxílico
PVA	Alcohol poli(vinílico)
ANOVA	Análisis de varianza
A	Área del filtro de los Transwell®s
BNZ	Benznidazol
$\Delta 15$	Cambio en el tamaño de la partícula luego de 15 días
$\Delta 30$	Cambio en el tamaño de la partícula luego de 30 días
$\frac{dQ}{dt}$	Cambio en la cantidad de fármaco permeado en el tiempo
Q_t	Cantidad de fármaco disuelto en el tiempo (Se agrega la abreviatura del fármaco y “t” se reemplaza por el valor correspondiente)
Q_0	Cantidad de fármaco inicial
FNZ_c	Cantidad de fenbendazol en las micropartículas (μg de fenbendazol/mg total de sólido)
$Fármaco_{NC}$	Cantidad de principio activo nanocristalizado (se reemplaza “Fármaco” por la abreviatura del fármaco según corresponda)
D_{FNZ}	Cantidad disuelta de fenbendazol luego de 30 minutos
mg_E	Cantidad en mg de excipientes empleados
$mg_{empleado}$	Cantidad en mg de fármaco empleado
mg_{SN}	Cantidad en mg de fármaco en el sobrenadante de preparación
$mg_{encapsulado}$	Cantidad en mg de fármaco encapsulado
mg_P	Cantidad en mg de producto obtenido
r^2	Coefficiente de correlación
CL_{50}	Concentración de fármaco a la que se lisó el 50 % de los parásitos
C_0	Concentración inicial de fármaco
CMC	Concentración micelar crítica
a	Constante de velocidad del ajuste cinético
k	Constante del ajuste cinético que otorga la dependencia en el tiempo (k es la inversa de a)
C_m	Cristalinidad total
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia

d_i	Deseabilidad individual
DRX	Difracción de rayos X
DOE	Diseño de experimentos
<i>E. multilocularis</i>	Echinococcus multilocularis
$E_f E$	Eficacia de encapsulación
MTT	Ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
ΔH_m	Entalpía de fusión
EuRLPO	Eudragit RLPO
n	Exponente de liberación del ajuste cinético
FNZ	Fenbendazol
PGI	Fosofoglucosa isomerasa
$\frac{Q_t}{Q_m}$	Fracción del fármaco liberado en el tiempo t
D	Función de deseabilidad global
GB	Glibenclamida
gpP	Glicoproteína P
IPd	Índice de polidispersidad
IC	Inhibición del crecimiento
K-HS15	Kolliphor® HS 15
LDH	Lactato deshidrogenasa
MP/MPs	Micropartícula/micropartículas
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MC	Miocytes cardíacos
NCL/NCLs	Nanocápsula lipídica/nanocápsulas lipídicas
NP/NPs	Nanopartícula/nanopartículas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OE	Óxido de etileno
OP	Óxido de propileno
P_{ap}	Permeabilidad aparente
Wn	Peso de cada factor del diseño sobre la deseabilidad

PM/PMs	Peso molecular/Pesos moleculares
PEG/PEGs	Polietilenglicol/polietilenglicoles
<i>Bomba</i>	Potencia de la bomba del rociador
<i>PZ</i>	Potencial zeta
PZQ	Praziquantel
<i>p</i>	Probabilidad asociada
<i>R</i>	Rendimiento
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
<i>S. mansoni</i>	Schistosoma mansoni
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
$S_{\text{Fármaco}}$	Solubilidad del fármaco (se reemplaza “Fármaco” por la abreviatura del fármaco al que corresponde)
SHN	Suero humano normal
<i>T. crassiceps</i>	Taenia crassiceps
$T_{\text{partícula}}$	Tamaño de partícula
T_{entrada}	Temperatura de entrada del aspersor
<i>T</i>	Tiempo de retardo
<i>T. cruzi</i>	Trypanosoma cruzi
TcN	Trypanosoma cruzi Nicaragua
UV	Ultravioleta
V_{Sipernat}	Volumen de solución de Sipernat

LENGUAJE ESPECIAL

Las siguientes palabras fueron tomadas del idioma inglés:

- *Buffer*: solución amortiguadora que sufre un cambio limitado de pH al agregar una cantidad pequeña de ácido o base.
- *Outliers*: es un valor en un conjunto de datos que es muy diferente de los otros valores; son valores excepcionalmente lejanos del centro.
- *Screening*: es una etapa del diseño en la que el objetivo es detectar qué factores son significativos (o interacciones entre factores) realizando un número mínimo de experimentos.
- *Sweeling*: fenómeno mediante el cual un medio líquido penetra en la matriz de un polímero causando un aumento del volumen de la matriz por absorción.
- *Uptake process*: proceso mediante el cual las células puede captar o fagocitar sustancias de su entorno.

PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

- 1. Elucidating the guest-host interactions and complex formation of praziquantel and cyclodextrin derivatives by (13)C and (15)N solid-state NMR spectroscopy.** Eva Carolina Arrua, MJ Ferreira, CJ Salomon, TG Nunes. International Journal of Pharmaceutics.
- 2. Elucidating the influence of praziquantel nanosuspensions on the *in vivo* metabolism of *Taenia crassiceps* cysticerci.** LD Silva, Eva Carolina Arrua, DA Pereira, CM Fraga, TL Costa, A Hemphill, CJ Salomon, MC Vinaud. Acta Tropica.
- 3. Promising Efficacy of Benznidazole Nanoparticles in Acute *Trypanosoma cruzi* Murine Model: *In-Vitro* and *In-Vivo* Studies.** ML Scalise, Eva Carolina Arrua, MS Rial, MI Esteva, CJ Salomon, ME Fichera. American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- 4. Elucidating the impact of low doses of nano-formulated benznidazole in acute experimental Chagas disease.** MS Rial, ML Scalise, Eva Carolina Arrua, MI Esteva, ME Fichera, CJ Salomon. PLOS Neglected Tropical Diseases.
- 5. *In-vivo* treatment of experimental neurocysticercosis with praziquantel nanosuspensions - a metabolic approach.** LD Silva, NF Lima, Eva Carolina Arrua, CJ Salomon, MC Vinaud. Drug Delivery and Translational Research.

PREMIOS Y DISTINCIONES

1. Premio Swiss Medical – Qualitas 2018 - Enfermedades desatendidas y enfermedades transmitidas por vectores en la Argentina, por el trabajo: “Desarrollo y ensayos *in-vivo* de nanopartículas de benznidazol en el modelo experimental de la enfermedad de Chagas. Evaluación del daño cardíaco en tratamientos continuos e intermitentes”.

PRESENTACIÓN A REUNIONES CIENTÍFICAS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS

1. Formulation of glibenclamide nanocrystals by a solvent change process. Influence of polymers on the dissolution rate. 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. (2014). Córdoba, Argentina. Eva Carolina Arrua, Claudio Salomón.

2. Energetic metabolism evaluated in *Taenia crassiceps* cysticerci after administration of praziquantel nanoparticles. X Congreso de Protozoología y Enfermedades parasitarias. (2014). Mar del Plata, Argentina. Eva Carolina Arrua, Luciana Damacena Silva, Marina Clare Vinaud, Claudio Salomon.

3. Desarrollo de sistemas microparticulados de chitosan- benznidazol. XII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. (2015). Buenos Aires, Argentina. Eva Carolina Arrua, Claudio Salomon.

4. Formulation and characterization of praziquantel nanocrystals by a gelation process. 12° International Conference of the European Chitin Society/ 13° International Conference on Chitin and Chitosan. (2015). Münster, Alemania. Eva Carolina Arrua, Claudio Salomón.

5. Hymenolepis microstoma en ratón: nuevo modelo farmacológico para estudios de eficacia de antihelmínticos. Cuarto Encuentro Nacional de Química. (2015). Montevideo, Uruguay. Jenny Saldaña, Mahia Minteguiaga, Eva Carolina Arrua, Claudio Salomón, Laura Domínguez.

6. Application of central composite design for optimization of spray dried fenbendazole- polyvinyl alcohol microparticles. 4° Reunion Internacional de Ciencias Farmacéuticas. (2016). Rosario, Argentina. Eva Carolina Arrua, Claudio Salomon.

7. Formulation and characterization of praziquantel and benznidazole-loaded lipid nanocapsules. 4° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. (2016). Rosario, Argentina. Eva Carolina Arrua, Guillaume Bastiat, Claudio Salomon.

8. Formulación y estudios *in-vitro* de nanocápsulas lipídicas de praziquantel para el tratamiento de la esquistosomiasis. Jornada Científica de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. (2017). Buenos Aires, Argentina. Eva Carolina Arrua, Guillaume Bastiat, Conor Caffrey, Claudio Salomon.

9. Formulación de nanopartículas de glibenclamida usando diseño experimental. XIII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. (2017). Buenos Aires, Argentina. Eva Carolina Arrua, Claudio Salomon.

10. Nanoformulaciones de Benznidazol en la infección crónica murina por *Trypanosoma cruzi*. XVIII Simposio Internacional sobre Enfermedades Desatendidas. (2017). Buenos Aires, Argentina. Marcela Rial, Eva Carolina Arrua, Monica Esteva, Claudio Salomon, Laura Fchera.

11. Diseño y optimización en la formulación de nanopartículas de benznidazol por un método de nanoprecipitación. Estudios *in-vitro/in-vivo* en modelo murino. Nanomercosur. (2017). Buenos Aires, Argentina. Eva Carolina Arrua, María Scalise, Marcela Rial, Monica Esteva, Laura Fchera, Claudio Salomon.

12. Effects of low doses of benznidazole nanosystems in both acute and chronic experimental Chagas disease. A new promising treatment regimen. AAPS Annual Meeting and Exposition. (2017). San Diego, Estados Unidos. Marcela Rial, Eva Carolina Arrua, María Scalise, Laura Fchera, Claudio Salomon.

13. Tratamiento con nanopartículas de benznidazol en la infección crónica murina por *Trypanosoma cruzi* nicaragua. Congreso Latinoamericano de Parasitología. FLAP XXIV. (2017). Santiago de Chile, Chile. Marcela Rial, Eva Carolina Arrúa, Yésica Nana, Mónica Esteva, Jacqueline Bua, Nilda Prado, Claudio Salomon, Laura Fichera.

14. Formulación de micropartículas de praziquantel. Ensayos *in-vitro* sobre *Echinococcus multilocularis*. Congreso Latinoamericano de Parasitología. FLAP XXIV. (2017). Santiago de Chile, Chile. Eva Carolina Arrua, Britta Lundström, Andrew Hemphill, Claudio Salomon.

15. Effect of fenbendazole nanocapsules against *Echinococcus multilocularis*. Fronteras en Biociencia 3. (2018). Buenos Aires, Argentina. Eva Carolina Arrua, Britta Lundström, Guillaume Bastiat, Andrew Hemphill, Claudio Salomon.

16. Formulación y caracterización de nanocápsulas lipídicas de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. (2018). San Luis, Argentina. Eva Carolina Arrua, Olga Hartwig, Duy-Khiet Ho, Brigitta Lotetz, Guillaume Bastiat, Xabier Murgia, Claus-Michael Lehr, Claudio Salomon.

17. Formulación y caracterización de nanocápsulas lipídicas de praziquantel para el tratamiento de la esquistosomiasis. VIII Escuela Internacional NanoAndes. (2018). Monterrey, México. Eva Carolina Arrua, Guillaume Bastiat, Conor Caffrey, Claudio Salomon.

CURSOS REALIZADOS DURANTE LA TESIS

- 1. Curso Intensivo Teórico y Práctico Determinación de tamaño de Partículas por Difracción Láser Estática.** D'AMICO Sistemas. Dictado por: Oscar Quattrocchi. (2014).
- 2. Curso Tópicos de Espectroscopia Orgánica e inorgánica.** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2014)
- 3. Curso Análisis farmacéutico I: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia y su aplicación al análisis farmacéutico.** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2014).
- 4. Curso Estadística aplicada.** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2015).
- 5. Curso Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2015).
- 6. Curso Análisis Instrumental.** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2015).
- 7. Curso Introducción a los gestores de Referencias.** Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2015).
- 8. Curso Formulación de modelos matemáticos de sistemas biológicos.** Facultad de Ciencias Médicas. UNR. (2016).
- 9. Curso Dispersión de rayos X y neutrones a pequeños ángulos (SAXS/SANS): Teoría, análisis de datos y aplicaciones. Instituto Sábado.** Universidad Nacional de San Martín. CNEA. (2016).
- 10. VII Escuela Nanoandes: Nanomateriales y Nanoestructuras para energía y salud.** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (2017).
- 11. VIII Escuela Internacional Nanoandes.** CIMAV Unidad Monterrey, Mexico. (2018).

PASANTÍAS EN LABORATORIOS EXTERNOS DURANTE LA TESIS

1. Universidad de Angers, Francia. Objetivo: formulación y caracterización *in-vitro/in-vivo* de nanocápsulas lipídicas cargadas con fármacos. Del 15/11/2015 al 29/12/2015.

2. Universidad de Angers, Francia. Objetivo: formulación y caracterización de nanocápsulas lipídicas. Del 20/11/2016 al 23/12/2016.

3. Instituto Helmholtz de Investigación Farmacéutica de Saarland, Alemania. Objetivo: “Desarrollo y caracterización *in-vitro* de nanoformulaciones para el tratamiento oral de enfermedades parasitarias desatendidas del continente americano”. Del 01/03/2018 al 31/05/2018.

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Índice

1.1.	Índice.....	2
1.2.	Introducción	3
1.2.1.	Desarrollo de formulaciones farmacéuticas	3
1.2.2.	Empleo de biomateriales como transportadores de fármacos	5
1.2.2.1.	Biomateriales empleados en este trabajo de tesis.....	7
1.2.3.	Micro- y nanosistemas farmacéuticos.....	8
1.2.4.	Fármacos modelos.....	11
1.2.4.1.	Glibenclamida	11
1.2.4.2.	Benznidazol.....	12
1.2.4.3.	Praziquantel.....	13
1.2.4.4.	Fenbendazol	14
1.2.5.	Diseño y optimización de experimentos	14
1.3.	Objetivos	16
1.3.1.	Objetivo general	16
1.3.2.	Objetivos específicos.....	16
1.4.	Bibliografía	17

1.2. Introducción

1.2.1. Desarrollo de formulaciones farmacéuticas

Se estima que más del 40% de las nuevas entidades químicas son insolubles o poco solubles en agua y debido a ello muchas de estas moléculas potencialmente activas no llegan nunca a la clínica dado los problemas que supone desarrollar una formulación segura y eficaz. A pesar de ello, en las últimas décadas se ha producido un avance fundamental en la innovación farmacéutica que ha tenido un impacto fundamental en el desarrollo y producción de medicamentos que permiten tratar y prevenir enfermedades con mayor eficacia y seguridad, y como consecuencia de ello es posible mejorar e incrementar la calidad y la sobrevida del paciente¹.

La investigación y el descubrimiento de nuevos medicamentos es un reto global en el que tanto la academia como la industria farmacéutica tienen un papel fundamental. El procedimiento para desarrollar una forma farmacéutica conteniendo un nuevo fármaco (o, como lo define Farmacopea Argentina en su 7^o edición, ingrediente farmacéutico activo) involucra muchas etapas y tiempo y requiere una gran inversión, sin olvidar que antes de que un medicamento llegue al mercado, ha de pasar por un largo proceso que implica el descubrimiento y la experimentación con la molécula elegida, ensayos en animales y pruebas en humanos.

En relación a estos avances de la terapéutica moderna y diseño de medicamentos, la solubilidad, velocidad de disolución, y permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales que controlan la velocidad y extensión de la absorción de los fármacos y su biodisponibilidad a partir de la administración por vía oral².

En este sentido, y tomando en consideración las dificultades encontradas en el desarrollo de medicamentos conteniendo fármacos con propiedades lipofílicas, en 1995 se desarrolla un sólido fundamento científico, que establece la posibilidad de reemplazar los estudios realizados *in-vivo* por ensayos *in-vitro* (bioexención), siempre y cuando el fármaco reúna ciertas condiciones y se presente como una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata. Esta opción de realizar los estudios *in-vitro* propone un camino más sencillo a la hora de efectuar los trámites de registros sanitarios, generando así una contribución en el campo regulatorio que garantiza la seguridad, calidad y eficacia del medicamento a un costo menor. Estos aspectos forman la base del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB). De acuerdo con dicho Sistema, un fármaco se

considera altamente soluble cuando la mayor concentración a la cual se dosifica es soluble en un volumen de medio acuoso de 250 ml (este volumen se deriva de protocolos de estudios de bioequivalencia) en un rango de pH de 1,0 a 7,5. En caso contrario, este fármaco se considera poco soluble. Por otra parte, la clasificación de permeabilidad se basa directamente en el grado de absorción intestinal de un fármaco en seres humanos o indirectamente en las proporciones (en peso) que atraviesan una membrana, ya sea intestinal humana, de animales o de modelos *in-vivo*. Se considera que un fármaco es altamente permeable cuando se determina un grado de absorción intestinal de 90% o superior basado en el balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa³.

Según el SCB, se distinguen los cuatro tipos diferentes de regímenes de absorción del fármaco que se nombran a continuación:

- 1) Clase I: los fármacos se disuelven rápidamente en un ambiente acuoso y son rápidamente transportados y adsorbidos a través de la membrana
- 2) Clase II: la velocidad de disolución *in-vivo* es el paso limitante en la absorción del fármaco, siendo para este grupo poco solubles en agua
- 3) Clase III: se disuelven fácilmente, pero no pueden penetrar en biomembranas de tracto gastrointestinal
- 4) Clase IV: se caracterizan por una baja solubilidad y permeabilidad altamente deficiente.

Para mejorar la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución de fármacos hidrófobos en el sitio de absorción han surgido numerosas metodologías. Algunos de los métodos más frecuentemente empleados (alteración de la composición solvente, formación de complejos, modificación química y modificación física, entre otros)⁴ se muestran en la Figura 1.1.

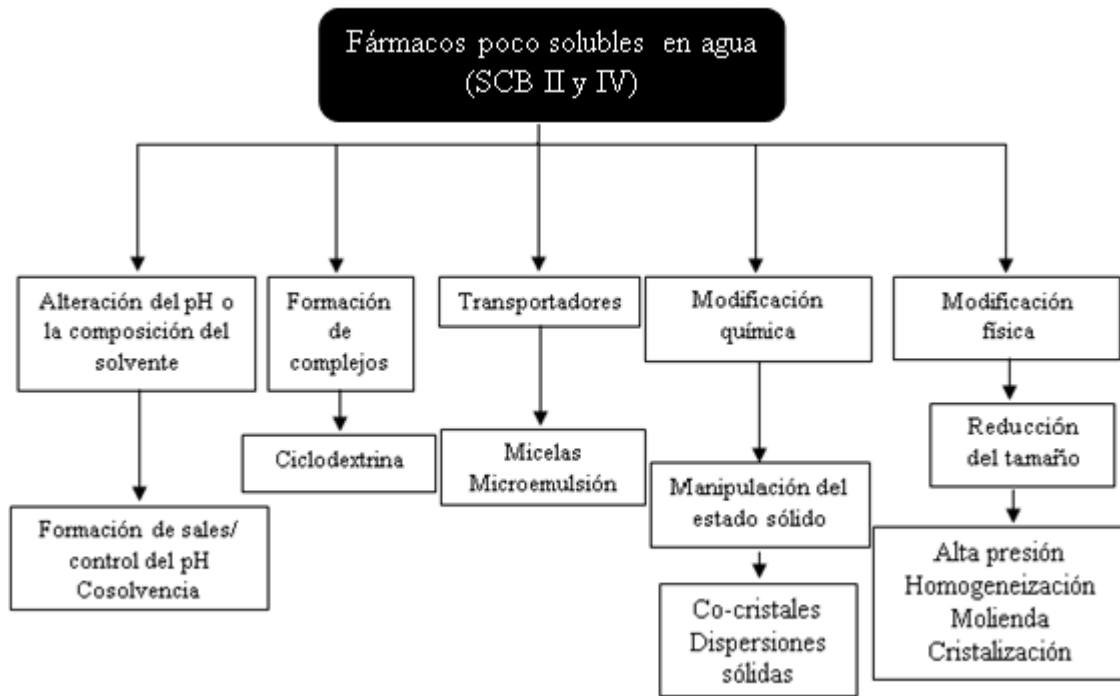


Figura 1.1. Metodologías empleadas para aumentar la solubilidad y mejorar la disolución de fármacos poco solubles.

En este contexto, el desarrollo y empleo de los sistemas micro- y nanoparticulados de fármacos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se han utilizado para reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos, así como para otorgarles protección frente a diferentes condiciones externas (pH, humedad, luz, temperatura, entre otras^{5,6}). Además, el uso de dichos sistemas permite el biodireccionamiento a células, órganos o tejidos blanco específicos y, en el caso de los nanovectores, su tamaño subcelular les permite una mayor captación intracelular comparada con la de partículas de mayor tamaño^{7,8}. Debido a su aplicación en clínica médica, los materiales que constituyen el nanotransportador deben ser biocompatibles, estables en condiciones fisiológicas, con gran capacidad de carga de fármacos⁸ y baja toxicidad⁹.

1.2.2. Empleo de biomateriales como transportadores de fármacos

Los biomateriales se definen como cualquier sustancia o combinación de sustancias no farmacológicas, de origen natural o sintético, diseñadas para actuar en la interfase con sistemas biológicos, que potencian o sustituyen las funciones de los órganos y tejidos corporales con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano¹⁰. Los polímeros son utilizados cada vez más como

soporte y herramienta para la liberación controlada de fármacos o sustancias activas. Estos materiales deben ser biocompatibles y en el caso de sistemas parenterales, también biodegradables.

Las propiedades fisicoquímicas de los polímeros influyen en la elaboración de los sistemas farmacéuticos, en la estructura de los mismos, en la relación del principio activo con el polímero y en el proceso de liberación del fármaco. La característica más destacable de los polímeros en estos sistemas es que pueden brindarles protección, además de soporte, buena procesabilidad, carácter hidrofílico o hidrofóbico según el requerimiento, liberación rápida o sostenida de la sustancia activa y mejorar la estabilidad de la formulación, así como también su absorción, biodisponibilidad y aceptabilidad del medicamento por parte del paciente, y finalmente, su uso seguro.

Dentro de los materiales poliméricos que se conocen, aquellos con propiedades biodegradables son los más importantes en el campo biológico. Las principales condiciones que afectan su proceso de degradación son temperatura, humedad y pH¹¹.

Estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse, dando lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por este. Por lo tanto pueden ser definidos como aquellos polímeros que son degradados en un ambiente biológico a través de hidrólisis enzimática y no enzimática¹².

Las principales características que han de considerarse en los materiales biodegradables para poder ser utilizados en aplicaciones clínicas son: la velocidad de degradación, la resistencia mecánica del material, sus sub-productos no deben ser mutágenos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos ni teratogénicos; y lógicamente deben ser esterilizables y biocompatibles con el tejido receptor¹³.

Dependiendo de su origen, los materiales biodegradables pueden clasificarse en:

- 1) Naturales: son materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables (Ej.: catgut, colágeno reconstituido, celulosa, quitina, quitosano y albumina)
- 2) Sintéticos: pueden ser metales, cerámicas o polímeros y comúnmente se denominan materiales biomédicos (Ej.: poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polietilenglicoles (PEGs), alcohol poli(vinílico) (PVA), copolímeros a base de ácido metacrílico y policaprolactona).

1.2.2.1. Biomateriales empleados en este trabajo de tesis

Los Eudragits®: son polímeros sintéticos obtenidos por polimerización del ácido acrílico y ácidos metacrílicos o sus ésteres como éster butílico o éster dimetilamino. En este trabajo hemos utilizado Eudragit® RLPO (EuRLPO): se trata de un copolímero de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y un bajo contenido de éster de ácido metacrílico con grupos de amonio cuaternario. Los grupos amonio están presentes como sales y hacen que el polímero sea permeable. El EuRLPO es insoluble en agua y jugos digestivos; pero al hidratarse se hincha y es permeable, lo que permite que los fármacos incluidos en sus matrices puedan liberarse por difusión¹⁴.

Los PEGs: son polímeros hidrófilos, que se pueden sintetizar mediante polimerización aniónica, por apertura del anillo de óxido de etileno, en un rango de pesos moleculares y con diversos grupos finales. Cuando se reticulan en redes (mediante radiación ionizante o mediante la reticulación covalente de macrómeros de PEG con extremos de cadena reactiva), el PEG puede tener un alto contenido de agua, formando "hidrogeles". A medida que su peso molecular aumenta también lo hace su viscosidad. Pesos moleculares menores a 800 son líquidos, mayores a 1500 semisólidos, y cuando su peso molecular es superior a 3000 se presentan como escamas sólidas. Los PEGs son solubles en agua, solventes orgánicos, y son miscibles con otros PEGs, lo que permite obtener mezclas poliméricas de distintas viscosidades y con distintas capacidades solubilizantes. Estos polímeros exhiben la propiedad de ser química, física y térmicamente estables, fisiológicamente inertes y no tóxicos. Estos polímeros tienen la particularidad de mejorar la humectabilidad de los fármacos poco solubles incrementando así su solubilidad y velocidad de disolución¹⁵. Es importante destacar que el PEG es un material adecuado para aplicaciones biológicas porque no desencadena una respuesta inmune^{16,17}.

PVA: se trata de un polímero lineal hidrofílico que se forma a partir de copolímeros de alcohol vinílico y acetato de vinilo. Sus propiedades estructurales dependen del grado de polimerización e hidrólisis. Dichos cambios causan modificaciones químicas y físicas, tales como la esterificación, la eterificación, la cristalización y la formación de complejos, entre otras. Las estructuras de PVA modificadas son útiles en aplicaciones biofarmacéuticas¹⁸.

El Kolliphor® HS15 (K-HS15): es un detergente no iónico obtenido a partir de óxido de etileno y ácido hidroxisteárico. Es un potente solubilizante no iónico y un agente emulsionante, con baja toxicidad. Es muy empleado para solubilizar sustancias de baja

solubilidad en microemulsiones. También se utiliza para la preparación de soluciones parenterales acuosas¹⁹.

Los poloxámeros: son copolímeros formados por bloques de óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP) organizados en una estructura del tipo OE-OP-OE. Esta disposición resulta en un compuesto de características anfifílicas no iónicas donde una parte de la molécula exhibe afinidad por el agua y la otra por los lípidos²⁰.

El número de unidades de OE (hidrofílicos) y OP (hidrofóbicos) pueden variar, lo que determina su peso molecular. La distribución de los grupos OE en la molécula y la estructura del segmento hidrofóbico OP afectan las características del copolímero. Su solubilidad en agua dependerá del largo de la cadena alquílica y del número de unidades de OE en la molécula. A medida que aumenta su concentración en solución tienden a autoensamblarse en la interfase hasta alcanzar la concentración micelar crítica (CMC) donde forman agregados llamados “micelas”²¹. En soluciones acuosas, estas micelas presentan un interior hidrofóbico conformado por las cadenas de OP que sirve de reservorio para fármacos poco afines al agua, y exhiben su parte exterior hidrofílica, constituida por los bloques de OE en contacto con el medio acuoso²²⁻²⁴. La diferencia entre P-188 y P-407 depende de la longitud de los bloques del polímero, lo que le otorga distintas propiedades. El peso molecular se obtiene se multiplicar los dos primeros dígitos por 100, y el último dígito multiplicado por 10 hace referencia al porcentaje de contenido de polioxietileno (P-188 tiene una masa molecular de 1800 g/mol y 80 % de polioxietileno, mientras que P-407 es un poloxámero con masa molecular 4000 g/mol y un contenido de polioxietileno del 70%).

Biomateriales lipídicos: LabrafacTM WL 1349, LabrafacTM PG, Labrasol® ALF, y CapryolTM 90. Se trata de aceites usados frecuentemente como fase oleosa, ya que tienen la capacidad de solubilizar una gran cantidad de compuestos hidrofóbicos. Estas biomoléculas lipídicas se han empleado en este trabajo para la formulación de nanosistemas para el transporte de los fármacos modelos.

1.2.3. Micro- y nanosistemas farmacéuticos

Las micropartículas (MPs) se definen como estructuras con un tamaño entre 1 y 1000 µm, mientras que las nanopartículas (NPs) son sistemas de menos de 1 µm, ambas compuestas principalmente por agentes encapsulantes o precipitantes que puede ser de variada naturaleza: proteínas, lípidos, tensioactivos, polímeros naturales y derivados sintéticos, capaces de formar una estructura sólida que puede contener moléculas de

distinta naturaleza^{25,26}.

Estos sistemas poseen muchas ventajas para su uso como sistemas de vehiculización de fármacos, entre las que se destacan:

- 1) Protección de compuestos inestables al medio ambiente (por ejemplo inestables frente al oxígeno, luz o humedad, entre otros)
- 2) Permiten transformar compuestos líquidos en sólidos, facilitando su manejo
- 3) Pueden ser modificadas químicamente para actuar en un sitio específico
- 4) Admiten la disminución de la dosis de fármaco administrado
- 5) Mejoran la utilización de los fármacos
- 6) Al disminuir la cantidad de fármaco utilizada disminuyen los costos de fabricación
- 7) Disminución de fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas
- 8) Mejoramiento sustancial de la biodisponibilidad del fármaco
- 9) Optimización del tratamiento y aceptación por el paciente
- 10) Enmascaramiento de olores o sabores.

Estas partículas pueden ser preparadas mediante diferentes técnicas, todas con distintos requerimientos, ventajas y desventajas. Cabe destacar que no todos los materiales encapsulantes son compatibles con todas las técnicas de encapsulación, por lo que este aspecto debe ser considerado al momento de planificar la formulación a desarrollar. En muchos casos el objetivo de desarrollar este tipo de sistemas, es modular la liberación de fármacos en el tiempo, haciéndola más lenta y controlada^{27,28}.

En particular, las NPs se clasifican, atendiendo a su composición, en NPs orgánicas (poliméricas, dendrímeros, micelas y liposomas) y en NPs inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono), tal como se representa en la Figura 1.2. También hay nanotransportadores que combinan los dos tipos de componentes, son NPs híbridas. Los fármacos pueden incorporarse por encapsulación (en cuyo caso quedan recluidos en el interior del sistema), por adsorción a su superficie, por absorción y por conjugación (de este modo el principio activo queda unido covalentemente al nanotransportador)²⁹.

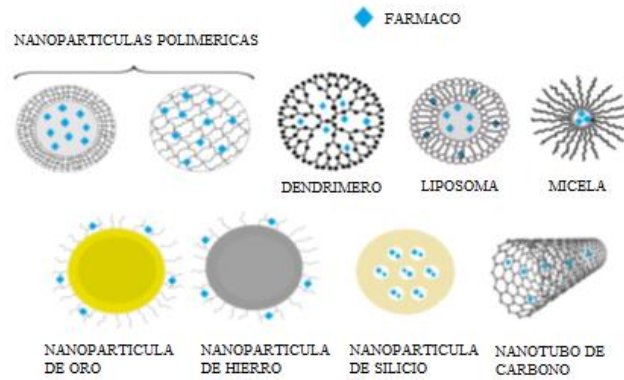


Figura 1.2. Representación de los distintos tipos de NPs utilizados como sistemas de liberación de fármacos.

Dentro de la gran variedad de nanovectores que han sido desarrollados en las últimas décadas (como micelas³⁰⁻³⁴, liposomas³⁵⁻³⁸), uno de los más interesantes, desde el punto de vista fisicoquímico y biológico, son las nanocápsulas lipídicas sólidas (NCLs)³⁴. Las NCLs, son una nueva generación de nanovectores vesiculares formados por un reservorio interno, que puede estar constituido por agua o aceite, rodeado de una cubierta polimérica. El núcleo tiene la función de favorecer la encapsulación del fármaco y protegerlo del entorno fisiológico. La cubierta polimérica, además de aportar estabilidad al sistema dentro y fuera del organismo, puede tener distintas funciones: interaccionar con membranas celulares y favorecer el transporte del fármaco, su acceso a las células diana, y/o controlar la liberación del fármaco³⁹.

Estas NCLs se obtienen por un método de emulsificación de baja energía y se puede formular en ausencia de disolvente orgánico y con excipientes reconocidos como seguros²⁷. Por otra parte, estudios previos demostraron su capacidad para aumentar la biodisponibilidad oral de diversos fármacos^{34,40}, lo que puede explicarse por una mayor estabilidad gastrointestinal de las partículas respecto al fármaco sólo⁴¹ además de una mejora de la permeabilidad intestinal⁴².

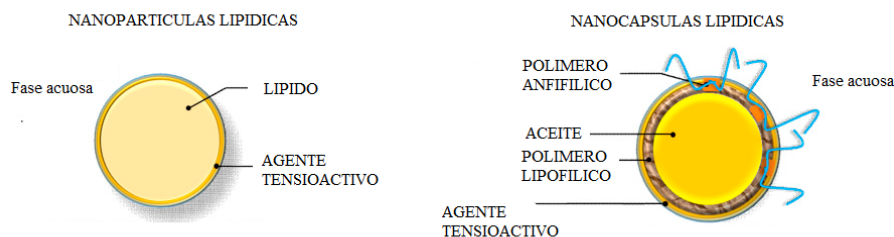


Figura 1.3. Representación de los distintos tipos de nanosistemas lipídicos utilizados como sistemas de liberación de fármacos.

1.2.4. Fármacos modelos

Los fármacos modelos seleccionados en este trabajo poseen similares propiedades fisicoquímicas en relación al comportamiento frente al agua. Son todos lipofílicos y su principal desventaja es la escasa solubilidad que presentan y que posee una directa influencia sobre la absorción, biodisponibilidad y eficacia terapéutica. Otra característica en común es que se emplean en el tratamiento de distintas infecciones producidas por parásitos.

Las parasitosis, o enfermedades parasitarias, se definen como una asociación biológica entre dos o más seres vivos, donde un ser de organización simple, conocido como "parásito", vive a expensas de otro de estructura más compleja, conocido como "hospedador o huésped", causándole o pudiéndole causar algún perjuicio. Los parásitos se pueden clasificar de diferentes maneras, según la localización de los mismos en el organismo hospedador, encontramos así, ectoparásitos (aquellos que se ubican en la superficie exterior de su huésped) o endoparásitos (se ubican en tejidos, sangre o cavidades internas)⁴³. En general, la mayoría de las parasitosis están incluidas en la lista de las enfermedades infecciones desatendidas⁴⁴. Las enfermedades desatendidas u olvidadas incluyen a un grupo de patologías las cuales reciben poca atención por parte de los sistemas de salud, debido a que los más afectados son poblaciones con escasos recursos económicos, que residen en zonas rurales remotas, barrios suburbanos, marginales, o zonas de conflicto⁴⁵.

1.2.4.1. Glibenclamida

La glibenclamida (GB), también conocida como gliburida (Figura 1.4), es un fármaco de administración oral de la clase de las sulfonilureas que se utiliza en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 ya que es un bloqueador de canales de K dependientes de ATP (K) y de glicoproteína P (gpP)⁴⁶⁻⁴⁸. Pertenece a la clase II del SCB debido a su baja solubilidad (menor a 8 µg/ml a pH 7,4 y 37 °C⁴⁹) y la lenta velocidad de disolución^{50,51}.

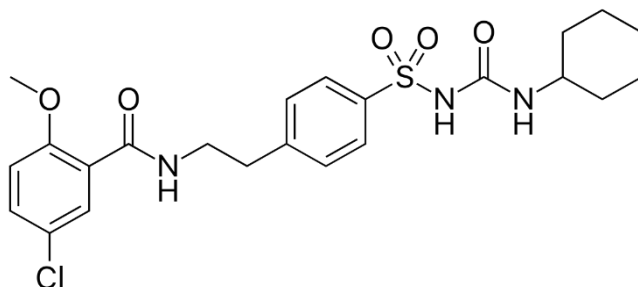


Figura 1.4. Estructura química de la GB. N- [4 -β - [2-metoxi-5- clorobenzamido] -etil] - bencenosulfonil] -N-ciclohexil-urea.

Además de ser uno de los fármacos de elección para el tratamiento de la diabetes, hay estudios que indican la susceptibilidad de *Leishmania sp.* a GB. *Leishmania sp.* son protozoos trematodos causantes de aproximadamente 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniasis por año en todo el mundo. La leishmaniasis (o leishmaniosis) es una enfermedad compleja causada por diferentes especies del parásito protozoario *Leishmania*. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo presentando un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Se estima que alrededor de 12 millones de personas se encuentran infectados con este parásito⁵²⁻⁵⁴.

El tratamiento de la leishmaniasis se lleva a cabo principalmente mediante quimioterapia, a través de la administración de agentes antimoniales pentavalentes, aunque dada la toxicidad y el desarrollo y expansión de resistencia a estos agentes, en los últimos años ha incrementado la demanda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad⁵⁴⁻⁵⁶.

1.2.4.2. Benznidazol

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una infección de protozoos potencialmente mortal causada por el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad muestra un notable impacto en comunidades de muy bajos recursos, principalmente en países en desarrollo en cuanto a la carga de morbilidad y calidad de vida, y se transmite a los humanos principalmente por los insectos *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

A pesar de que el control de vectores ha sido aplicado con éxito en varios países de América Latina, esta infección parasitaria sigue siendo un problema de salud pública importante y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en América Latina debido a que más de 10.000 personas mueren cada año y aproximadamente 25 millones de personas están en riesgo de adquirirla⁵⁷. Últimamente, se ha detectado la

enfermedad de Chagas en áreas no endémicas, como resultado de los procesos migratorios de la población infectada hacia Estados Unidos, Canadá y Europa.

Según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la quimioterapia es crucial para los pacientes que están en la fase aguda de la enfermedad, ya que en esas circunstancias la infección puede ser casi totalmente suprimida, especialmente en los niños. Hasta la fecha, el benznidazol (BNZ) y el nifurtimox son las únicas moléculas activas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas⁵⁸. Aunque el BNZ (Figura 1.5) se prescribe ampliamente en muchas regiones endémicas presenta una muy baja solubilidad acuosa (0,23 mg/ml) y una errática biodisponibilidad. La OMS lo ha incluido dentro de la lista de medicamentos esenciales aplicable a los planes internacionales de control de enfermedades tropicales⁵⁹.

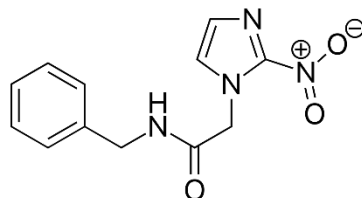


Figura 1.5. Estructura química del BNZ. N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida.

1.2.4.3. Praziquantel

El praziquantel (PZQ) (Figura 1.6) es un fármaco clínicamente activo contra trematodos del género *Schistosoma*, entre estos *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), donde es prácticamente el único tratamiento disponible y del que aún no se ha informado resistencia alguna⁶⁰. Además, es el fármaco de elección para el tratamiento de la cisticercosis, como la causada por *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) y ha sido informado que mejora significativamente la condición clínica de los pacientes⁶¹. Su actividad antiparasitaria se basa en un incremento en la actividad muscular del parásito seguido por contracciones y parálisis espástica. Este hecho puede inducir a que los parásitos se desprendan de los tejidos del huésped causando, en el caso del *Schistosoma*, el pasaje de las venas mesentéricas al hígado, la expulsión de los cestodos intestinales y la degeneración de su tegumento⁶².

Químicamente es un derivado de la pirazinoisoquinolina, desarrollado después que en 1972 se descubrió la actividad antihelmíntica de esta clase de compuestos⁶². Se presenta como un producto racémico de dos enantiómeros⁶³. Uno de ellos es llamado dextro-PZQ, el otro levo-PZQ, siendo el levo-PZQ quien posee la actividad farmacológica. La dosis necesaria por tratamiento es de aproximadamente 40 miligramos por kilo de peso

corporal⁶². Su solubilidad en agua es de aproximadamente 0,4 mg/ml a 20 °C.

Al igual que al BNZ, la OMS ha incluido al PZQ dentro de la lista de drogas esenciales aplicable a los planes internacionales de control de enfermedades tropicales⁵⁹.

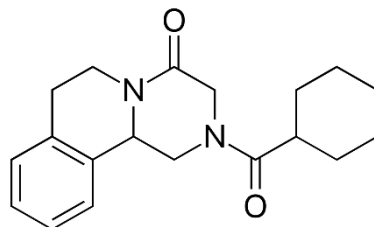


Figura 1.6. Estructura química del PZQ. 2-(Ciclohexilcarbonyl)-1, 2, 3, 6, 7,11b- hexahidro-4H-piracino[2,1-a]isoquinolina-4-ona.

Este fármaco es de fácil absorción por vía oral y con pocos efectos secundarios, es efectivo y de bajo costo, pero es muy poco soluble en agua y por ende en los líquidos biológicos, lo que limita su biodisponibilidad. El PZQ, al igual que la GB, pertenece a la Clase II del SCB⁶⁴.

1.2.4.4. Fenbendazol

El fenbendazol (FNZ) (Figura 1.7) se presenta como un polvo cristalino insoluble en agua (0,01 µg/ml a 37 °C) y muy poco soluble en la mayoría de los solventes orgánicos⁶⁵. Se trata de un benzimidazol con actividad antiparasitaria antihelmíntica de amplio espectro que mostró ser eficaz contra nematodos y cestodos. En este sentido, se ha demostrado que el FNZ es eficiente en la inhibición de la formación de vesículas de *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), además de favorecer la la reducción de la carga de gusanos y en el número de protoescoles en infecciones con dicho parásito⁶⁶. Adicionalmente, FNZ es ampliamente empleado en animales de granja para el tratamiento de helmintiasis gastrointestinales⁶⁷.

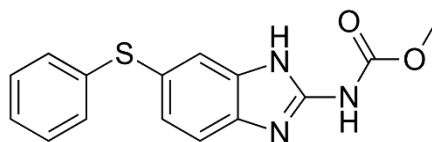


Figura 1.7. Estructura química del FNZ. Metil-(5-fenil-tío)- benzimidazol-2-carbamato.

1.2.5. Diseño y optimización de experimentos

El diseño y optimización de experimentos (DOE) consiste en una herramienta estadística para determinar las condiciones ideales (u óptimas) para diseñar un producto, proceso o servicio que cumpla con las expectativas usando el mínimo número de

experimentos o pruebas.

Esta metodología de diseño y posterior optimización es sumamente útil cuando un producto (proceso o servicio) es complejo y cuyo resultado puede depender de una gran cantidad de variables que no controlamos y que se deben ajustar para optimizarlo.

En nuestro grupo se han aplicado distintas metodologías de DOE para el desarrollo y formulación de sistemas farmacéuticos^{68,69}, permitiendo así predecir el comportamiento de los sistemas y optimizar las respuestas múltiples mejorando de esta manera las propiedades de las formulaciones desarrolladas.

En este trabajo se emplearon dos tipos de diseño de experimentos. El primero consistió de dos etapas, una primer fase conocida como “*screening*” dónde se seleccionaron los factores y las respuestas, empleando para ello el diseño de Plackett-Burman. Luego de esto, aquellos factores y respuestas que resultaron significativos fueron sometidos a la segunda fase, la de optimización, empleando un diseño Central Compuesto.

El segundo tipo consistió en un diseño de una única etapa, dónde un único factor fue variado cuantitativamente. Para este trabajo se empleó un diseño de tipo Simple Centrado.

En ambos casos detallados, cuando una única respuesta es estudiada, el análisis del modelo indica cuales son las áreas en la región del diseño en las que es probable que el sistema arroje resultados deseables. Sin embargo, cuando se necesita optimizar varias respuestas simultáneamente puede ser empleada la función de deseabilidad, que es una función de más de una respuesta.

La función de deseabilidad incluye las prioridades de optimización para la investigación que se lleva a cabo. El procedimiento implica la creación de una función para cada respuesta individual (deseabilidad individual, d_i) y la obtención de una función de deseabilidad global (D), en esta se debe maximizar la elección de las mejores condiciones de las variables diseñadas. La función D oscila entre 0 (valor totalmente indeseable) a 1 (cuando todas las respuestas están en un rango deseable simultáneamente) y se define como se muestra en la Ecuación 1.1, donde d_1, d_2, \dots, d_N corresponden a la función de deseabilidad individual para cada respuesta que se está optimizando. Por otro lado W_n es el peso de cada uno de los factores analizados sobre la deseabilidad, y está dado por la importancia relativa de cada uno⁶⁹.

$$D = \left[\prod_{n=1}^N (d_n)^{W_n} \right]^{1/\sum_{n=1}^N W_n} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue incrementar la solubilidad y la velocidad de disolución del fármacos modelos lipofílicos mediante la aplicación de alternativas tecnológicas empleando diversos biomateriales y evaluar el impacto resultante sobre la actividad biológica en modelos *in-vitro* y en modelos de animales infectados.

1.3.2. Objetivos específicos

- Formular micro- y nanocristales de glibenclamida, benznidazol, praziquantel y fenbendazol mediante cristalización controlada
- Desarrollar nanocápsulas de benznidazol, praziquantel y fenbendazol empleando diferentes lípidos
- Aplicar diseño de experimentos para optimizar la formulación de los distintos sistemas
- Caracterizar fisicoquímicamente los sistemas obtenidos en estado sólido y en suspensión
- Evaluar la influencia de las nanocápsulas sobre la activación del sistema del complemento
- Caracterizar *in-vitro* los sistemas empleando células Caco-2
- Evaluar *in-vitro* la eficacia antiparasitaria de las nanocápsulas lipídicas de fenbendazol sobre cultivos de *Echinococcus multilocularis*
- Evaluar *in-vitro* la eficacia antiparasitaria de las nanocápsulas lipídicas de praziquantel sobre gusanos *Schistosoma mansoni*
- Evaluar *in-vivo* el efecto de los nanosistemas de praziquantel sobre el metabolismo de ratones infectados con *Taenia crassiceps*
- Evaluar *in-vivo* la eficacia de los nanosistemas de benznidazol en ratones infectados con la cepa *Trypanosoma cruzi* Nicaragua

1.4. Bibliografía

- (1) Leuner, C. “Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, 50 (1), 47–60.
- (2) Kawabata, Y.; Wada, K.; Nakatani, M.; Yamada, S.; Onoue, S. “Formulation Design for Poorly Water-Soluble Drugs Based on Biopharmaceutics Classification System: Basic Approaches and Practical Applications.” *Int. J. Pharm.* **2011**, 420 (1), 1–10.
- (3) Yasir, M.; Asif, M.; Kumar, A.; Aggarwal, A. Biopharmaceutical Classification System: An Account. *Int J PharmTech Res.* **2010**, 2 (3), 1681–1690.
- (4) Bergese, P.; Colombo, I.; Gervasoni, D.; Depero, L. E. “Microwave Generated Nanocomposites for Making Insoluble Drugs Soluble.” *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, 23 (6–8), 791–795.
- (5) Cruz, L.; Soares, L. U.; Costa, T. D.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. “Diffusion and Mathematical Modeling of Release Profiles from Nanocarriers.” *Int. J. Pharm.* **2006**, 313 (1–2), 198–205.
- (6) Leite, E. A.; Grabe-Guimarães, A.; Guimarães, H. N.; Machado-Coelho, G. L. L.; Barratt, G.; Mosqueira, V. C. F. “Cardiotoxicity Reduction Induced by Halofantrine Entrapped in Nanocapsule Devices.” *Life Sci.* **2007**, 80 (14), 1327–1334.
- (7) Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barratt, G. “Relationship between Complement Activation, Cellular Uptake and Surface Physicochemical Aspects of Novel PEG-Modified Nanocapsules.” *Biomaterials* **2001**, 22 (22), 2967–2979.
- (8) Ourique, A. F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R. “Tretinoin-Loaded Nanocapsules: Preparation, Physicochemical Characterization, and Photostability Study.” *Int. J. Pharm.* **2008**, 352 (1–2), 1–4.

- (9) Guinebretière, S.; Briançon, S.; Fessi, H.; Teodorescu, V. .; Blanchin, M. . “Nanocapsules of Biodegradable Polymers: Preparation and Characterization by Direct High Resolution Electron Microscopy.” *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, 21 (1–2), 137–142.
- (10) Kulkarni, R. K.; Pani, K. C.; Neuman, C.; Leonard, F. “Polylactic Acid for Surgical Implants.” *Arch. Surg.* **1966**, 93 (5), 839–843.
- (11) Lendlein, A. “Biodegradable, Elastic Shape-Memory Polymers for Potential Biomedical Applications.” *Science*. **2002**, 296 (5573), 1673–1676.
- (12) Kura, A.; Fakurazi, S.; Hussein, M.; Arulselvan, P. “Nanotechnology in Drug Delivery: The Need for More Cell Culture Based Studies in Screening.” *Chem. Cent. J.* **2014**, 8 (1), 46.
- (13) Lu, Y.; Chen, S. C. Micro and Nano-Fabrication of Biodegradable Polymers for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56 (11), 1621–1633.
- (14) Gandhi, A.; Jana, S.; Sen, K. K. “In-Vitro Release of Acyclovir Loaded Eudragit RLPO® Nanoparticles for Sustained Drug Delivery.” *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 67, 478–482.
- (15) D’souza, A. A.; Shegokar, R. “Polyethylene Glycol (PEG): A Versatile Polymer for Pharmaceutical Applications.” *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, 13 (9), 1257–1275.
- (16) Craig, D. Q. M. “Polyethyelene Glycols and Drug Release.” *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, 16 (17), 2501–2526.
- (17) Doshi, D. H.; Ravis, W. R.; Betageri, G. V. “Carbamazepine and Polyethylene Glycol Solid Dispersions: Preparation, in Vitro Dissolution, and Characterization.” *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, 23 (12), 1167–1176.
- (18) Muppalaneni, srinath. “Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective.” *J. Dev. Drugs* **2013**, 02 (03), 1–5.

- (19) Bley, H.; Fussnegger, B.; Bodmeier, R. “Characterization and Stability of Solid Dispersions Based on PEG/Polymer Blends.” *Int. J. Pharm.* **2010**, *390* (2), 165–173.
- (20) Keck, C. M.; Müller, R. H. “Drug Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs Produced by High Pressure Homogenisation.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *62* (1), 3–16.
- (21) Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Miller, D. W. Pluronic® Block Copolymers as Modulators of Drug Efflux Transporter Activity in the Blood-Brain Barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (1), 151–164.
- (22) Passerini, N.; Albertini, B.; González-Rodríguez, M. L.; Cavallari, C.; Rodriguez, L. “Preparation and Characterisation of Ibuprofen-Poloxamer 188 Granules Obtained by Melt Granulation.” *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15* (1), 71–78.
- (23) Vilhelmsen, T.; Eliassen, H.; Schæfer, T. “Effect of a Melt Agglomeration Process on Agglomerates Containing Solid Dispersions.” *Int. J. Pharm.* **2005**, *303* (1–2), 132–142.
- (24) Urbán-Morlán, Z.; Castro-Ríos, R.; Chávez-Montes, A.; Melgoza-Contreras, L. M.; Piñón-Segundo, E.; Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D. “Determination of Poloxamer 188 and Poloxamer 407 Using High-Performance Thin-Layer Chromatography in Pharmaceutical Formulations.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46* (4), 799–803.
- (25) Kumar, P.; Chandiran, S.; Bhavya, S. “Microparticles Drug Delivery System: A Review.” *Indian J. Pharm. Sci. Res.* **2011**, *1* (1), 19–37.
- (26) Madhav, S.; Kala, S. “Review on Microparticulate Drug Delivery System.” *Int. J. PharmaTech* **2011**, *3* (3), 1242–1254.
- (27) Kohane, D. S. “Microparticles and Nanoparticles for Drug Delivery.” *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96* (2), 203–209.

- (28) Brannon-Peppas, L. “Recent Advances on the Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in Controlled Drug Delivery.” *Int. J. Pharm.* **1995**, *116* (1), 1–9.
- (29) Lee, B. K.; Yun, Y. H.; Park, K. “Smart Nanoparticles for Drug Delivery: Boundaries and Opportunities.” *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *125*, 158–164.
- (30) Koizumi, F.; Kitagawa, M.; Negishi, T.; Onda, T.; Matsumoto, S. I.; Hamaguchi, T.; Matsumura, Y. “Novel SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Bulky Tumors.” *Cancer Res.* **2006**, *66* (20), 10048–10056.
- (31) Matsumura, Y. “Poly (Amino Acid) Micelle Nanocarriers in Preclinical and Clinical Studies.” *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (8), 899–914.
- (32) Nakajima, T. E.; Yasunaga, M.; Kano, Y.; Koizumi, F.; Kato, K.; Hamaguchi, T.; Yamada, Y.; Shirao, K.; Shimada, Y.; Matsumura, Y. “Synergistic Antitumor Activity of the Novel SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Combined with 5-Fluorouracil in a Mouse Model of Colorectal Cancer, as Compared with That of Irinotecan plus 5-Fluorouracil.” *Int. J. Cancer* **2008**, *122* (9), 2148–2153.
- (33) Peng, C. L.; Lai, P. S.; Lin, F. H.; Yueh-Hsiu Wu, S.; Shieh, M. J. “Dual Chemotherapy and Photodynamic Therapy in an HT-29 Human Colon Cancer Xenograft Model Using SN-38-Loaded Chlorin-Core Star Block Copolymer Micelles.” *Biomaterials* **2009**, *30* (21), 3614–3625.
- (34) Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J. P. “Development and Characterization of a Novel Lipid Nanocapsule Formulation of Sn38 for Oral Administration.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 181–188.
- (35) Peikov, V.; Ugwu, S.; Parmar, M.; Zhang, A.; Ahmad, I. “PH-Dependent Association of SN-38 with Lipid Bilayers of a Novel Liposomal Formulation.” *Int. J. Pharm.* **2005**, *299* (1–2), 92–99.
- (36) Sadzuka, Y.; Takabe, H.; Sonobe, T. “Liposomalization of SN-38 as Active Metabolite of CPT-11.” *J. Control. Release* **2005**, *108* (2–3), 453–459.

- (37) Zhang, H.; Chen, W.; Zhao, Z.; Dong, Q.; Yin, L.; Zhou, J.; Ding, Y. “Lyophilized Nanosuspensions for Oral Bioavailability Improvement of Insoluble Drugs: Preparation, Characterization, and Pharmacokinetic Studies.” *J. Pharm. Innov.* **2017**, *12* (3), 271–280.
- (38) Lei, Y.-G.; Cheung, Z.-L.; Ng, K.-M.; Li, L.; Weng, L.-T.; Chan, C.-M. “Surface Chemical and Morphological Properties of a Blend Containing Semi-Crystalline and Amorphous Polymers Studied with ToF-SIMS, XPS and AFM.” *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (14), 3883–3890.
- (39) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.; Benoit, J. “A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers.” *Pharm. Res.* **2002**, *19* (6), 875–880.
- (40) Peltier, S.; Oger, J.-M.; Lagarce, F.; Couet, W.; Benoît, J.-P. “Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules.” *Pharm. Res.* **2006**, *23* (6), 1243–1250.
- (41) Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J.-P. “The Gastrointestinal Stability of Lipid Nanocapsules.” *Int. J. Pharm.* **2009**, *379* (2), 260–265.
- (42) Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J.-P. “Lipid Nanocarriers Improve Paclitaxel Transport throughout Human Intestinal Epithelial Cells by Using Vesicle-Mediated Transcytosis.” *J. Control. Release* **2009**, *140* (2), 174–181.
- (43) Gonçalves, M. L. C.; Araújo, A.; Ferreira, L. F. “Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98* (Suppl. I), 103–118.
- (44) Molyneux, D. H.; Savioli, L.; Engels, D. Neglected Tropical Diseases: Progress towards Addressing the Chronic Pandemic. *The Lancet*. **2017**, *389* (10066), 312–325.
- (45) Savioli, L.; Daumerie, D. “Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases.” *WHO* **2013**.
https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/

- (46) Ponte-Sucre, A.; Campos, Y.; Fernandez, M.; Moll, H.; Mendoza-León, A. “Leishmania Sp.: Growth and Survival Are Impaired by Ion Channel Blockers.” *Exp. Parasitol.* **1998**, 88 (1), 11–19.
- (47) Ponte-Sucre, a; Mendoza-León, a; Moll, H. “Experimental Leishmaniasis: Synergistic Effect of Ion Channel Blockers and Interferon-Gamma on the Clearance of Leishmania Major by Macrophages.” *Parasitol. Res.* **2001**, 87 (0049), 27–31.
- (48) Golstein, P. E.; Boom, A.; Van Geffel, J.; Jacobs, P.; Masereel, B.; Beauwens, R. “P-Glycoprotein Inhibition by Glibenclamide and Related Compounds.” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **1999**, 437 (5), 652–660.
- (49) Seedher, N.; Kanojia, M. “Co-Solvent Solubilization of Some Poorly-Soluble Antidiabetic Drugs Solubilization Antidiabetic Drugs.” *Pharm. Dev. Technol.* **2009**, 14 (2), 185–192.
- (50) Arnqvist, H. J.; Karlberg, B. E.; Melander, A. “Pharmacokinetics and Effects of Glibenclamide in Two Formulations, HB 419 and HB 420, in Type 2 Diabetes.” *Ann Clin Res* **1983**, 15 Suppl 3, 21–25.
- (51) Chalk, J. B.; Patterson, M.; Smith, M. T.; Eadie, M. J. “Correlations between in Vitro Dissolution, in Vivo Bioavailability and Hypoglycaemic Effect of Oral Glibenclamide.” *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1986**, 31 (2), 177–182.
- (52) Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C. “Leishmaniasis and Poverty.” *Trends Parasitol.* **2006**, 22 (12), 552–557.
- (53) Kropf, P.; Müller, I.; Brunson, K.; Etges, R. “The Leishmaniasis Model.” *Methods Microbiol.* **1998**, 25, 419–458.
- (54) Croft, S. L.; Coombs, G. H. “Leishmaniasis– Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs.” *Trends Parasitol.* **2003**, 19 (11), 502–508.
- (55) Mohapatra, S. “Drug Resistance in Leishmaniasis: Newer Developments.” *Trop. Parasitol.* **2014**, 4 (1), 4.

- (56) Orué, A.; Pérez C, J. L.; Fuentes, J.; Odremán, I.; Serrano-Martín, X.; Mendoza-León, A. “Leishmania Sp .: Efecto de La Glibenclamida , Un Bloqueador de Canales de K + ATP , Sobre El Ciclo de Vida in Vitro .” *Salus* **2007**, *11* (1), 32–36.
- (57) Garcia, M. N.; Woc-Colburn, L.; Aguilar, D.; Hotez, P. J.; Murray, K. O. “Historical Perspectives on the Epidemiology of Human Chagas Disease in Texas and Recommendations for Enhanced Understanding of Clinical Chagas Disease in the Southern United States.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9* (11), e0003981.
- (58) Assíria Fontes Martins, T.; de Figueiredo Diniz, L.; Mazzeti, A. L.; da Silva do Nascimento, Á. F.; Caldas, S.; Caldas, I. S.; de Andrade, I. M.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T. “Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-Trypanosoma Cruzi Activity in Experimental Chagas Disease.” *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0128707.
- (59) Passerini, N.; Albertini, B.; Perissutti, B.; Rodriguez, L. “Evaluation of Melt Granulation and Ultrasonic Spray Congealing as Techniques to Enhance the Dissolution of Praziquantel.” *Int. J. Pharm.* **2006**, *318* (1–2), 92–102.
- (60) Meyer, T.; Sekljic, H.; Fuchs, S.; Bothe, H.; Schollmeyer, D.; Miculka, C. “Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3* (1), e357.
- (61) Fraga, C. M.; Costa, T. L.; Bezerra, J. C. B.; De Souza Lino, R.; Vinaud, M. C. “Taenia Crassiceps: Host Treatment Alters Glycolysis and Tricarboxylic Acid Cycle in Cysticerci.” *Exp. Parasitol.* **2012**, *130* (2), 146–151.
- (62) Hardman, J.; Limbird, L.; Goodman Gilman, A. *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*, 9. ed.; Mc Graw-Hill Interamericana, Ed.; Ciudad de México, **1996**.
- (63) El-Arini, S. K.; Leuenberger, H. “Dissolution Properties of Praziquantel-PVP Systems.” *Pharm. Acta Helv.* **1998**, *73* (2), 89–94.

- (64) Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. “Classification of Orally Administered Drugs on the World Health Organization Model List of Essential Medicines According to the Biopharmaceutics Classification System.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 58 (2), 265–278.
- (65) Horvat, A. J. . M.; Petrović, M.; Babić, S.; Pavlović, D. M.; Ašperger, D.; Pelko, S.; Mance, A. D.; Kaštelan-Macan, M. “Analysis, Occurrence and Fate of Anthelmintics and Their Transformation Products in the Environment.” *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2012**, 31, 61–84.
- (66) Hinz, E. “[Fenbendazole Therapy of Experimental Larval Echinococcosis. I. The Effect of Fenbendazole on Worm Burden and Protoscolex Development of Echinococcus Multilocularis (Author’s Transl)].” *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* **1978**, 240 (4), 542–548.
- (67) Marriner, S. E.; Bogan, J. A. “Plasma Concentrations of Fenbendazole and Oxfendazole in the Horse.” *Equine Vet. J.* **1985**, 17 (1), 58–61.
- (68) Leonardi, D.; Lamas, M. C.; Olivieri, A. C. “Multiresponse Optimization of the Properties of Albendazole-Chitosan Microparticles.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48 (3), 802–807.
- (69) Leonardi, D.; Salomón, C. J.; Lamas, M. C.; Olivieri, A. C. “Development of Novel Formulations for Chagas’ Disease: Optimization of Benznidazole Chitosan Microparticles Based on Artificial Neural Networks.” *Int. J. Pharm.* **2009**, 367 (1–2), 140–147.

Capítulo 2.

Materiales y Métodos

2.1. Índice

2.1.	Índice.....	26
2.2.	Materiales y metodología	27
2.2.1.	Materiales	27
2.2.2.	Metodología	27
2.2.2.1.	Formulación de sistemas farmacéuticos.....	28
2.2.2.2.	Cuantificación de fármacos	32
2.2.2.3.	Caracterización fisicoquímica de los sistemas	34
2.2.2.4.	Caracterización <i>in-vitro</i> de los sistemas.....	37
2.2.2.5.	Eficacia antiparasitaria <i>in-vitro</i>	41
2.2.2.6.	Estudios <i>in-vivo</i> de los sistemas empleando animales de experimentación.....	43
2.2.2.7.	Diseño de experimentos y optimización en la formulación de micro- y nanopartículas	47
2.2.2.8.	Análisis estadístico	48
2.3.	Bibliografía	50

2.2. Materiales y metodología

2.2.1. Materiales

BNZ fue provisto por el Instituto Nacional de Parasitología, ANLIS Malbrán, Ministerio de Salud de la Nación, (Argentina). PZQ y FNZ fueron suministrados por el Laboratorio Proagro (Argentina), mientras que GB fue proporcionado por Parafarm (Argentina).

EuRLPO, Tween® 20, PVA, dióxido de silicio (Sipernat® 50), PEGs y todos los solventes empleados fueron de grado analítico. P-188, P-407, K-HS15, Labrafac™ WL 1349, Labrafac™ PG, Labrasol® ALF y Capryol™ 90 fueron donados por BASF SE (Alemania). Lipoid S75-3 fue proporcionado por Lipoid GmbH (Alemania).

Los reactivos empleados para el cultivo fueron obtenidos de Lonza (Verviers, Bélgica). Todos los otros reactivos químicos empleados fueron de grado analítico.

2.2.2. Metodología

La metodología llevada a cabo en este trabajo se separó en 6 etapas:

- 1) Formulación de sistemas farmacéuticos

Desarrollo de micro y NPs, y NCLs de GB, BNZ, PZQ y FNZ.

- 2) Cuantificación de fármacos

Cuantificación de los fármacos empleados por medidas de absorbancia y HPLC.

- 3) Caracterización fisicoquímica de los sistemas

Determinación del tamaño de partícula ($T_{particula}$), índice de polidispersidad (IPd) y potencial zeta (PZ). Ensayos de microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB), calorimetría diferencial de barrido (CDB), análisis de difracción de rayos X (DRX), eficacia de entrapado ($E_f E$) o cantidad de fármaco nanocristalizado ($Fármaco_{NC}$), rendimiento (R) y ensayos de estabilidad.

- 4) Caracterización *in-vitro* de los sistemas

Análisis de la solubilidad acuosa ($S_{Fármaco}$), equilibrio de disolución en diferentes medios simulando tracto gastrointestinal y modelado matemático de los perfiles.

Evaluación de la activación del sistema del complemento, comportamiento frente proteínas del mucus y la interacción con cultivos celulares de células Caco-2 (viabilidad, integridad epitelial, permeabilidad y control de la captación de fármacos a

través de membrana celular).

5) Eficacia antiparasitaria *in-vitro*

Ensayos *in-vitro* sobre *E. multilocularis* empleando NCLs de FNZ.

Ensayos *in-vitro* sobre gusanos *S. mansoni* empleando NCLs de PZQ.

6) Estudios *in-vivo* de los sistemas formulados empleando animales de experimentación

Ensayos *in-vivo* del efecto de NPs de PZQ sobre el metabolismo de *T. crassiceps* y evaluación antiparasitaria *in-vivo* de NPs de BNZ sobre *T. cruzi*.

7) Diseño de experimentos y posterior optimización

DOE para la formulación de MPs de FNZ, NPs de GB, NPs y NCLs de BNZ.

8) Análisis estadístico de los resultados

2.2.2.1. Formulación de sistemas farmacéuticos

2.2.2.1.1. Elaboración de micro y nanopartículas de glibenclamida

2.2.2.1.1.1. Formulación de nanopartículas de glibenclamida para la evaluación del tipo y concentración de estabilizante

Las partículas fueron elaboradas mediante la técnica de cristalización controlada. A partir de 18 ml de fase orgánica (etanol: acetona 1:2) conteniendo 200 mg de GB y Eudragit® RLPO (de 0 a 200 mg). Esta solución fue adicionada por un sistema de goteo sobre 80 ml de agua destilada conteniendo P-188, P-407 o PVA (400 mg) y PEG 400, 1500, 3000 y 6000 (0, 100 o 200 mg) a una velocidad de 1 ml/min. Se evaluó el efecto del tipo y la velocidad de agitación, trabajando con agitación magnética a 300 rpm o mediante un homogeneizador a 7.000 rpm (dispersor Ultraturrax®, Alemania), durante 30 minutos. Luego se eliminó el solvente orgánico mediante agitación magnética (250 rpm) durante 16 horas en campana de extracción de gases.

Las suspensiones obtenidas fueron centrifugadas (centrífuga MIKRO 220 Hettich, Alemania) a 15.000 rpm durante 20 minutos a 15 °C para separar la fase acuosa de las partículas de GB. En la Tabla 2.1 se detallan los ensayos realizados para evaluar el tipo y concentración de estabilizante. En todos los casos el precipitado fue separado en dos partes: una parte de cada muestra se secó en estufa a 80 °C durante 16 horas y la otra parte se liofilizó.

Tabla 2.1. Protocolo de las muestras de GB ensayadas para comparar el tipo y concentración de estabilizante.

Muestra	GB (mg)	PEG 6000 (mg)	EuRLPO (mg)	P-188 (mg)	P-407 (mg)	Agitación
GB 1M	200	0	0	400	0	Magnética
GB 1H	200	0	0	400	0	Homogeneizador
GB 2M	200	0	0	0	400	Magnética
GB 2H	200	0	0	0	400	Homogeneizador
GB 3M	200	200	0	400	0	Magnética
GB 3H	200	200	0	400	0	Homogeneizador
GB 4M	200	200	0	0	400	Magnética
GB 4H	200	200	0	0	400	Homogeneizador
GB 5M	200	0	200	400	0	Magnética
GB 5H	200	0	200	400	0	Homogeneizador
GB 6M	200	0	200	0	400	Magnética
GB 6H	200	0	200	0	400	Homogeneizador
GB 7M	200	100	200	400	0	Magnética
GB 7H	200	100	200	400	0	Homogeneizador
GB 8M	200	100	200	0	400	Magnética
GB 8H	200	100	200	0	400	Homogeneizador
GB 9M	200	200	200	400	0	Magnética
GB 9H	200	200	200	400	0	Homogeneizador
GB 10M	200	200	200	0	400	Magnética
GB 10H	200	200	200	0	400	Homogeneizador
GB 11M	200	200	200	0	0	Magnética
GB 11H	200	200	200	0	0	Homogeneizador

2.2.2.1.1.2. Formulación de nanopartículas de glibenclamida empleando polietilenglicoles de diferente peso molecular

Por otro lado se comparó el efecto del peso molecular (PM) del PEG empleado sobre las NPs que fueron formuladas también mediante cristalización controlada. Los ensayos realizados se muestran en la Tabla 2.2. Para estas muestras el secado se llevó a cabo por liofilización.

Tabla 2.2. Protocolo de las muestras de GB ensayadas para estudiar el efecto del PM del PEG.

Muestra	Agitación	GB (mg)	EuRLPO (mg)	PEG 400 (mg)	PEG 1500 (mg)	PEG 3000 (mg)	PEG 6000 (mg)
GB 11M	Magnética	200	200	0	0	0	200
GB 11H	Homogeneizador	200	200	0	0	0	200
GB 12M	Magnética	200	200	0	0	200	0
GB 12H	Homogeneizador	200	200	0	0	200	0
GB 13M	Magnética	200	200	0	200	0	0
GB 13H	Homogeneizador	200	200	0	200	0	0
GB 14M	Magnética	200	200	200	0	0	0
GB 14H	Homogeneizador	200	200	200	0	0	0
GB 15M	Magnética	200	200	0	0	0	0
GB 15H	Homogeneizador	200	200	0	0	0	0

2.2.2.1.2. Elaboración de las nanopartículas de praziquantel. Evaluación del tipo y concentración de estabilizante.

Las NPs de PZQ fueron elaboradas empleando nanocrystalización controlada. Para esto, el PZQ (800 mg) se disolvió en 20 ml de etanol y la solución se adicionó por goteo a una velocidad de 1 ml/min en 50 ml de agua destilada conteniendo 250 mg de P-188, P-407 o PVA. Estos sistemas se mezclaron por medio de agitación magnética a 300 rpm o mediante homogeneizador a 7.000 rpm, durante 30 minutos. Luego se eliminó el solvente orgánico mediante agitación durante toda la noche. De la misma manera que con los sistemas de GB, las nanosuspensiones de PZQ obtenidas fueron centrifugadas a 15.000 rpm durante 20 minutos a 10 °C para separar la fase acuosa de las partículas de PZQ.

Tabla 2.3. Protocolo resumido de las nanosuspensiones de PZQ elaboradas.

Muestra	Agitación	PZQ (mg)	P-188 (mg)	P-407 (mg)	PVA (mg)
1	Magnética	800	250	0	0
2	Magnética	800	0	250	0
3	Magnética	800	0	0	250
4	Homogeneizador	800	250	0	0
5	Homogeneizador	800	0	250	0
6	Homogeneizador	800	0	0	250

En la Tabla 2.3 se muestran los ensayos llevados a cabo durante este estudio. En este caso, todos los sistemas fueron secados empleando liofilización.

2.2.2.1.3. Elaboración de nanopartículas de benznidazol

Las NPs de BNZ fueron preparadas mediante una metodología de nanocrystalización. Para esto se empleó P-188 como estabilizante de las partículas. Una solución de BNZ en

etanol (concentraciones entre 5 y 25 mg/ml) se adicionó gota a gota (1,5 ml/min) sobre una solución acuosa del estabilizante P-188 (en concentración entre 0,005 y 0,05 g/ml) disuelto en agua destilada previamente filtrada. El volumen relativo de fase orgánica empleado con respecto al de la fase acuosa estuvo entre 10 y 25 %. La suspensión se mantuvo en agitación por medio de un equipo de paletas (IKA, Alemania) durante 60 minutos a velocidades entre 140 y 2.000 rpm, y luego se eliminó el solvente orgánico mediante agitación magnética (250 rpm) durante 16 horas en campana de extracción de gases.

A continuación, el sistema fue centrifugado a 15.000 rpm, y el sobrenadante se analizó por espectroscopía UV-Vis (Boeco S-26, Boeco, Alemania) para determinar, de manera indirecta, el porcentaje de BNZ nanocristalizado. Posteriormente el precipitado fue liofilizado. El sistema fue estudiado por triplicado.

2.2.2.1.4. Elaboración de micropartículas de fenbendazol

El FNZ (3 mg/ml) se disolvió en 150 ml de una mezcla de etanol, acetona y ácido acético 20 % (4:4:1) y se agregó a una solución acuosa conteniendo PVA (de 0,5 a 3 g). La suspensión formada se mantuvo en agitación magnética (250 rpm) en un vaso con tapa durante 60 minutos, posteriormente se retiró la tapa del vaso y el solvente orgánico se eliminó mediante agitación magnética (250 rpm) durante 16 horas en campana extractora de gases. El sistema obtenido se mezcló con una solución de Sipernat® 0.75 % p/v (desde 50 a 200 ml), y la suspensión resultante se secó con un equipo de rociado por aspersión, empleado los siguientes parámetros, modificando la potencia de la bomba (desde 10 a 17) y la temperatura de entrada (entre 100 y 140 °C). El sistema fue ensayado por triplicado.

2.2.2.1.5. Desarrollo de nanocápsulas lipídicas a través del método de inversión de fase

Las NCLs se obtuvieron a través del método de inversión de fase. Para esto, se pesaron los componentes (Tabla 2.4), previamente reportadas por Moysan y colaboradores¹, diferenciando entre tres diferentes tipos de NCLs (de tamaños aproximados de 25, 50 y 100 nm). Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la emulsión resultante fue sometida a 3 ciclos de aumento y descenso de temperatura de entre 55 a 90 °C. En el tercer ciclo, durante la fase de descenso de la temperatura se hizo el último agregado de agua a 4 °C en la zona en que se da la inversión de fases para producir un golpe térmico y diluir las NCLs. Todas las NCLs

fueron ensayadas por triplicado.

Tabla 2.4. Composición de las NCLs convencionales sin fármacos.

Muestra	K-HS15 (mg)	Lipoid S 75-3 (mg)	NaCl (mg)	Labrafac (mg)	H ₂ O destilada (mg)	H ₂ O destilada a 4 °C (ml)
S1	1934	75	156	846	4055	3
S2	846	75	156	1028	2962	5
S3	484	75	156	1209	3143	5

2.2.2.1.5.1. Nanocápsulas lipídicas conteniendo benznidazol, praziquantel, y fenbendazol

Las NCLs se prepararon empleando las cantidades mencionadas para las NCLs sin fármaco (Tabla 2.4) se prepararon nanosuspensiones conteniendo los fármacos hidrofóbicos: BNZ (S4, S5 y S6) con las cantidades empleadas para S1, S2 y S3 respectivamente, PZQ (S7) y FNZ (S8), con las proporciones empleadas para S2.

Se prepararon soluciones saturadas de los fármacos en acetona (BNZ y PZQ 20 mg/ml; FNZ 0,8 mg/ml) que fueron incorporadas sobre las fases oleosas, y se mantuvieron en M. Luego se eliminó completamente la acetona y se sometió a los tres ciclos de temperatura de 55 a 90 °C. Todos los sistemas fueron ensayados por triplicado.

2.2.2.1.5.2. Nanocápsulas lipídicas con diferentes excipientes oleosos

Adicionalmente fueron ensayados otros tipos de NCLs, en las que se emplearon diferentes proporciones de los siguientes: LabrafacTM WL, LabrafacTM PG, Labrasol[®] ALF y CapryolTM 90.

2.2.2.2. Cuantificación de fármacos

2.2.2.2.1. Cuantificación de glibenclamida

2.2.2.2.1.1. Cuantificación por medidas de absorbancia

Se llevaron a cabo dos curvas de calibración para GB a las longitudes de onda donde se encuentran los picos máximos de absorción en el espectro ultravioleta (UV) del fármaco (230 y 300 nm) partiendo de soluciones de 1 mg/ml y haciendo sucesivas diluciones de las mismas en los diferentes medios de trabajo.

Para los estudios de solubilidad y cantidad de GB encapsulada se emplearon las medidas de absorbancia a 300 nm, mientras que para la cuantificación de GB en ensayos disolución se basaron en absorbancias a 230 nm. Estas diferencias fueron debido a la diferencia en la sensibilidad de GB a cada longitud de onda².

2.2.2.2.1.2. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia

Para determinar las cantidades de GB en las muestras también se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con detección UV a 230 nm. La fase móvil consistió en metanol: *buffer* fosfato 0,2 M pH 7,0 (70:30) y el flujo fue fijado en 1 ml/min. Se empleó una columna C18 (100 mm x 4,6 mm, 5µm)³.

2.2.2.2.2. Cuantificación de benznidazol

2.2.2.2.2.1. Cuantificación por medidas de absorbancia

Con el objetivo de determinar las cantidades de BNZ en los sistemas se llevó a cabo una curva de calibración a la longitud de onda donde se encuentran el pico máximo de absorción en el espectro UV del fármaco (324 nm) partiendo de soluciones de 1 mg/ml y haciendo sucesivas diluciones de las mismas en los medios de trabajo.

2.2.2.2.2.2. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia

En algunos casos la cantidad de BNZ fue determinado empleando HPLC, con detección UV a 316 nm. La fase móvil consistió en una mezcla en iguales proporciones de acetonitrilo: agua (1:1). El flujo del proceso cromatográfico fue fijado en 1 ml/min. Como fase estacionaria se empleó una columna C18 (125 mm x 4 mm, 5µm)⁴.

2.2.2.2.3. Cuantificación de praziquantel

2.2.2.2.3.1. Cuantificación por medidas de absorbancia

Se construyó una curva de calibración para el PZQ a la longitud de onda donde se encuentran el pico máximo de absorción en el espectro UV del fármaco (263 nm) partiendo de soluciones de 1mg/ml y haciendo sucesivas diluciones de las mismas en los medios de trabajo.

2.2.2.2.3.2. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia

La cantidad de PZQ en las diferentes muestras fue determinado también mediante HPLC (Agilent Technologies, Estados Unidos), empleando un detector UV a 263 nm. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo: agua (3:2) y el flujo fue fijado en 1 ml/min. Se empleó una columna C18 (240 mm x 4 mm, 5µm)⁵.

2.2.2.2.4. Cuantificación de fenbendazol

2.2.2.2.4.1. Cuantificación por medidas de absorbancia

La cantidad de FNZ en los sistemas fue determinada empleando medidas de

absorbancia a 292 nm. Se partió de soluciones saturadas del fármaco en los diferentes medios de trabajo y se realizaron sucesivas diluciones.

2.2.2.2.4.2. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia

Las determinaciones de FNZ mediante HPLC fueron llevadas a cabo empleando detección UV a 292 nm. La fase móvil consistió en la mezcla de acetonitrilo: agua, con agregados de ácido acético glacial (0,5 % v/v). La fase estacionaria empleada fue una columna C18 (150 mm x 4,6 mm, 4 μ m). El flujo de la corrida fue de 1 ml/min empleando un gradiente lineal desde 35:65 (acetonitrilo:agua) a 60:40 durante 9 minutos; de 60:40 a 35:65 por 1 minuto y 35:65 durante 2 minutos⁶.

2.2.2.3. Caracterización fisicoquímica de los sistemas

2.2.2.3.1. Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad

Para estimar el $T_{partícula}$, IPd y el PZ de las partículas se realizaron experimentos de dispersión de luz dinámica. Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando un Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba, Japón) a un ángulo de dispersión de 90 ° a 25 °C.

Se determinó el radio hidrodinámico empleando diluciones de las partículas previamente formuladas en medios previamente filtrados de Tween® 20 0,1 % p/v o en agua. Se empleó una cubeta con las cuatro caras transparentes. La muestra fue ligeramente turbia, sin ser opaca o completamente clara y no contenía más del 0,01 % en volumen de partículas. El programa que controla el equipo suministra valor del radio hidrodinámico y potencial zeta de las partículas en suspensión.

Mediante este ensayo se logró obtener el valor de tamaño de partícula solo de aquellas cuyo radio hidrodinámico no era superior a los 3 μ m.

2.2.2.3.2. Ensayos de microscopía electrónica de barrido

La morfología superficial de las MPs y NPs conteniendo los diversos fármacos fue estudiada mediante el empleo de MEB, se empleó un Leitz SEM AMR 1000T (Amray, Bedford, Estados Unidos) y las observaciones se realizaron a 3 kV. En todos los casos se compararon las micrografías obtenidas con las del fármaco de origen.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el programa Image-pro Plus software 6.0.

2.2.2.3.2.1. Fijación apical de células Caco-2

Por otro lado, el epitelio celular fue observado también empleando MEB. Para ello las células fueron fijadas (luego de los ensayos de transporte que se detallan más adelante) siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

En todos los casos el buffer fue eliminado de los compartimientos apical y basolateral. Se adicionó glutaraldehído 3% (en *buffer* fosfato salino) y se dejó durante 2 horas. Luego de remover el glutaraldehído el compartimiento apical fue lavado con etanol al 30%, se repitió esto para otras diluciones de etanol (40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%), en todos los casos se dejó actuar durante 10 minutos. Finalmente se agregaron 200 μ l de dodecilsulfato sódico y se dejó secar durante toda la noche bajo campana.

Luego del pulverizado con oro las células fueron observadas empleando MEB.

2.2.2.3.3. Estudios de microscopia electrónica de transmisión

Se llevaron a cabo experimentos de MET usando un instrumento JEOL 100 CX (JEOL-France, Francia), para el análisis de la estructura de las NCLs con diferente composición de sus fases oleosas. Todos los ensayos se llevaron a cabo directamente sobre las suspensiones preparadas.

2.2.2.3.4. Evaluación de los sistemas por calorimetría diferencial de barrido

Se evaluaron mediante CDB los fármacos de partida y los sistemas formulados. Los termogramas se registraron con un calorímetro diferencial de barrido (Shimadzu DSC-50, Japón). Se utilizó nitrógeno ultra puro a una velocidad de flujo de 50 ml/min. Las muestras se analizaron en cubetas de aluminio ondulado y se calentaron de 20 a 250 °C a una velocidad de calentamiento lineal de 10 °C min⁻¹.

2.2.2.3.5. Ensayos de difracción de rayos X

Los patrones de DRX se registraron con un difractómetro X'Pert Phillips 5000 (Holanda) a temperatura ambiente, con una fuente de rayos X monocromática de Cu (K) operando a 40 kV y 20 mA para todos los datos obtenidos. Se analizaron mediante esta técnica los fármacos puros y los sistemas formulados previamente.

2.2.2.3.6. Determinación de la eficacia de encapsulación o contenido de fármaco en los sistemas

2.2.2.3.6.1. Eficacia de encapsulación

La *EfE* se calculó, a partir de la Ecuación 2.1, empleando la cantidad de fármaco en el

sobrenadante de las suspensiones.

$$E_f E = \frac{mg_{empleado} - mg_{SN}}{mg_{empleado}} * 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde $mg_{empleado}$ es la cantidad de fármaco empleada (en mg) y mg_{SN} es la cantidad de fármaco que se encuentra en el sobrenadante (en mg).

Por otro lado, en el caso de las NCLs, las cantidades de fármaco no incorporadas fueron determinadas después de separar las NCLs mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 30 minutos. Luego de esto, las NCLs fueron disueltas en metanol para liberar el fármaco del interior y las cantidades de los mismos fueron determinados mediante el uso de HPLC, empleando la ecuación que se muestra a continuación. Las cantidades iniciales también fueron determinadas por HPLC, disolviendo las nanosuspensiones sin centrifugar en metanol. Luego de esto se calculó la $E_f E$ empleando la Ecuación 2.2.

$$E_f E = \frac{mg_{empleado} - mg_{encapsulado}}{mg_{empleado}} * 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde $mg_{encapsulado}$ es la cantidad de fármaco en el interior de las NCLs y $mg_{empleado}$ es la cantidad total de fármaco empleado, que se obtiene de sumar la cantidad encapsulado y la cantidad de fármaco libre.

2.2.2.3.6.2. *Determinación del porcentaje de fármaco nanocristalizado*

Empleando medidas de absorbancia se determina la cantidad de fármaco en los sobrenadantes obtenidos luego de separar las NPs. La cantidad de fármaco cristalizado (%) fue calculada entonces por diferencia con la cantidad de partida empleando la Ecuación 2.3.

$$Fármaco_{NP} = \frac{mg_{empleado} - mg_{SN}}{mg_{empleado}} * 100 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde $Fármaco_{NP}$ es el porcentaje de principio activo nanocristalizado en forma de nanopartícula, $mg_{empleado}$ es la cantidad de fármaco de partida y mg_{SN} es la masa de fármaco que se encuentra en el sobrenadante.

2.2.2.3.7. *Determinación del rendimiento*

El rendimiento (R) fue calculado como la relación entre el peso del producto obtenido experimentalmente y la suma de los pesos de todos los componentes, como se muestra en la Ecuación 2.4.

$$R(\%) = \frac{mg P}{mg_{empleado} + mg E} * 100 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

donde $mg P$ es el peso total del producto obtenido, mg_e es la cantidad de fármaco empleado en mg y $mg E$ es la suma de las masas de los excipientes empleados en cada caso.

2.2.2.3.8. Ensayos de estabilidad

Se realizaron ensayos de envejecimiento acelerado y se compararon con los resultados obtenidos por envejecimiento natural. Para este análisis se empleó la ecuación de Arrhenius que permitió determinar el valor de las constantes de degradación determinadas a temperaturas superiores a la ambiente.

2.2.2.4. Caracterización *in-vitro* de los sistemas

2.2.2.4.1. Estudio del equilibrio de solubilidad de los fármacos

Una masa de aproximadamente 100 mg de cada una de las muestras ensayadas se colocó en un frasco con 5 ml de agua destilada. Se mantuvo en agitación orbital a 150 rpm durante 72 horas a temperatura ambiente. Luego de pasado ese tiempo, el contenido de los frascos fue centrifugado, a 13.600 rpm a 25°C durante 10 minutos, para separar las partículas de la solución. En todos los casos a los sobrenadantes se les determinó la concentración de fármaco mediante espectroscopia UV o HPLC, para determinar la cantidad de fármaco disuelto en cada caso. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con las partículas ensayadas y con los fármacos de partida.

2.2.2.4.2. Ensayos de disolución o liberación de fármacos en diferentes medios. Modelado matemático de la cinética de disolución

2.2.2.4.2.1. Ensayos de disolución o liberación

Se colocaron las muestras los diferentes medios: 1) 500 ml de buffer fosfato regulado a pH 7,5; 2) ácido clorhídrico 0,1 N con agregado en algunos casos de lauril sulfato de sodio 0,2 % p/v; 3) fluido gástrico simulado a pH 1,6; 4) fluido intestinal simulado a pH 6,5; 5) fluido intestinal simulado a pH 6,5 con agregado de enzimas (incluidas lipasas).

Para los ensayos de disolución de los fármacos, los sistemas se mantuvieron en agitación a 50 rpm mediante el método de paletas a 37 °C. A tiempos fijos predeterminados se tomaron alícuotas (por triplicado) que fueron filtradas y la concentración de fármaco en solución se determinó por espectroscopia UV.

Los estudios de liberación de los fármacos fueron llevados a cabo empleando la

técnica de la bolsa de diálisis⁷. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C con agitación magnética a 250 rpm. Las alícuotas fueron extraídas (por triplicado) a tiempos prefijados, fueron filtradas y la concentración de fármaco en solución se determinó por HPLC.

Cada experimento se realizó con una masa constante de fármaco para todos los sistemas y el fármaco de partida.

2.2.2.4.2.2. Modelado cinético de disolución de fármacos en sistemas poliméricos

Todos los ajustes matemáticos del fenómeno de disolución de los fármacos a partir de las formulaciones ensayadas fueron llevados a cabo empleando el programa Sigma Plot 12.0.

1) Modelo de Korsmeyer–Peppas

Korsmeyer y colaboradores⁸ desarrollaron una simple relación para describir la liberación de un fármaco desde un sistema polimérico, descrito por la Ecuación 2.5.

$$\frac{Q_t}{Q_m} = a * t^n \quad \text{Ecuación 2.5}$$

dónde: $\frac{Q_t}{Q_m}$ es la fracción de fármaco liberado en el tiempo t , a es la constante de velocidad y n el exponente de liberación⁹.

En este modelo el valor de n es empleado para definir los diferentes mecanismos de liberación de fármacos.

Se diferencian dos tipos de mecanismos de difusión: el de Fick que se caracteriza por un n menor a 0,45, mientras que para transportes de tipo no Fickiano el valor de n va de 0,45 a 0,89^{9,10}.

2) Modelo de Weibull modificado

Este modelo refiere para diversos procesos de disolución la Ecuación 2.6.

$$Q_t = Q_0[1 - e^{-k(t-T)}] \quad \text{Ecuación 2.6}$$

dónde: Q_t es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco empleada, T representa el tiempo de retardo medido del proceso de disolución, con $k = \frac{1}{a}$, siendo a un parámetro del ajuste que denota la dependencia en el tiempo.

Los perfiles de disolución que caracterizan este modelo son representados por curvas de tipo sigmoideas. El modelo de Weibull es más útil para comparar los perfiles de liberación de fármacos de tipo matricial⁹.

2.2.2.4.3. Evaluación de la activación del sistema del complemento

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Guillaume Bastiat (Universidad de Angers, Francia).

La activación del sistema del complemento fue evaluado en suero humano normal (SHN), proporcionado por el Etablissement Francais du Sang (CHU, Francia) mediante la medición de la capacidad hemolítica residual del sistema en presencia de los nanosistemas ensayados.

La técnica consiste en determinar la cantidad de suero capaz de lisar el 50 % de un número fijo de eritrocitos de oveja previamente sensibilizados, según un procedimiento descrito previamente por Vonarbourg y colaboradores¹¹.

La activación del complemento se expresó como una función del área de la superficie de las NCLs para comparar partículas con diferentes diámetros. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

2.2.2.4.4. Evaluación de la interacción entre sistemas nanoparticulados y mucinas

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Claus Michael Lehr (Universidad de Saarland, Alemania).

Con el objetivo de determinar posibles interacciones entre sistemas nanoparticulados y las proteínas que componen el mucus fueron realizados ensayos *in-vitro* donde se determinó la capacidad de formar complejos entre las mucinas y los nanosistemas. Para ello se formularon los nanosistemas con las mismas proporciones estudiadas y se reemplazó en cada caso el fármaco por NileRed. Se determinó el tamaño de dichos sistemas, empleando el equipo NanoSight LM10 Malvern (Reino Unido), en ausencia y en presencia de mucinas.

En presencia de las proteínas del mucus los sistemas pueden disminuir su movilidad relativa ya que interaccionan con las mismas, obteniéndose como resultado tamaños relativos más elevados. Aquellos sistemas que no interaccionan o interaccionan poco con mucinas tienden a mantener los valores de tamaños similares a los obtenidos en ausencia de las mismas. Se llevaron a cabo diferentes diluciones de los nanosistemas en presencia de 0,1 % p/v de mucinas en todos los casos.

Cada sistema fue comparado con NPs comerciales (controles positivos y negativos respecto a la interacción) de tamaños aproximadamente similares a los sistemas formulados.

2.2.2.4.5. Cultivo celular

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Claus Michael Lehr (Universidad de Saarland, Alemania).

Los cultivos celulares se realizaron con células Caco-2, las células fueron crecidas en incubadoras con 5% de CO₂ a 37 °C. Con fines experimentales las células fueron sembradas en placas para ensayos de viabilidad (96 pocillos, de los cuales fueron sembrados 60 dejando en todos los casos el pocillo del borde libre) y placas para estudios de transporte (Transwells® permeables de 12 pocillos con 2 compartimientos: apical y basolateral). Los Transwells® presentaban un área de 1,12 cm² y un tamaño de poro de 0,4 µm. Los volúmenes de fluido apical/ basolateral fueron de 500 µl/ 1.100 µl, respectivamente. El medio de cultivo se reemplazó cada 2 o 3 días.

2.2.2.4.6. Ensayos de viabilidad celular

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Claus Michael Lehr (Universidad de Saarland, Alemania).

Los nanosistemas preparados se diluyeron y se incubaron con células Caco-2 durante 24 y 48 horas. Luego de ese tiempo se llevó a cabo el ensayo conocido como MTT. Este procedimiento se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Se consideró 100 % de viabilidad a las medidas obtenidas de las células en presencia del medio de cultivo, y 0 % a las obtenidas luego de tratarlas con Tritón X-100 0,1 %.

2.2.2.4.7. Interacción de los fármacos contenidos en los nanosistemas con de células Caco-2

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Claus Michael Lehr (Universidad de Saarland, Alemania).

Monocapas de células Caco-2 fueron cultivadas en medios sumergidos durante 7 días, y la integridad final de la monocapa fue controlada con medidas de resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Los controles se llevaron a cabo empleando el mismo buffer de crecimiento. Durante todo el ensayo (hasta 24 horas) las células fueron incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂ en posición horizontal y agitación suave. Diferentes diluciones de los nanosistemas (en todos los casos concentraciones por debajo del límite de toxicidad celular de los mismos según los resultados obtenidos en el punto anterior) fueron incubadas.

Se llevaron a cabo 3 controles:

- 1) Integridad epitelial: por medidas de TEER en diferentes tiempos, durante el experimento completo y visualización del epitelio por MEB (ver punto 2.2.2.3.2.1.)
- 2) Permeabilidad de los fármacos a través de la membrana celular: en este caso se determinó la cantidad de fármaco que atravesó la membrana celular por HPLC, tomando a distintos tiempos muestras del compartimiento basolateral
- 3) Control de la captación de fármaco por parte de las células: empleando citometría de flujo y microscopía confocal.

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{ap}) se calculó aplicando la ecuación:

$$P_{ap} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \% (A * C_0) \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde $\frac{dQ}{dt}$ es el cambio en la cantidad de fármaco permeado en el tiempo (μg de fármaco permeado por segundo, obtenido de la pendiente de la región lineal de cada perfil de permeación individual), A es el área del filtro (cuyo valor fue $1,12 \text{ cm}^2$) y C_0 la concentración inicial del fármaco.

2.2.2.5. Eficacia antiparasitaria *in-vitro*

2.2.2.5.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria *in-vitro* sobre *Schistosoma mansoni* empleando nanocápsulas lipídicas de praziquantel

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Conor Caffrey (Universidad de California San Diego, Estados Unidos).

Se llevaron a cabo ensayos *in-vitro* sobre gusanos adultos *S. mansoni* en placas. En este trabajo se estudió el efecto del PZQ de partida y de las NCLs de PZQ en diferentes concentraciones y distintos tiempos (1 hora, 5 horas y 24 horas). Además, estos resultados fueron comparados con los obtenidos para las NCLs sin fármaco.

Gusanos adultos *S. mansoni* fueron incubados con los nanosistemas o el PZQ sin tratar. Se estudió la movilidad de los gusanos según el protocolo descrito previamente por Marcellino y colaboradores¹².

2.2.2.5.2. Evaluación de la actividad antiparasitaria *in-vitro* de sobre *Echinococcus multilocularis* empleando nanoacapsulas lipídicas de fenbendazol

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Andrew Hemphill (Universidad de Berna, Suiza).

En esta parte del trabajo se estudió la eficacia antiparasitaria de NCLs de FNZ sobre *E. multilocularis*, llevándose a cabo los ensayos enzimático de la fosfoglucoasa isomerasa (PGI), Alamar Blue y ensayos de movilidad, como se explican a continuación.

2.2.2.5.2.1. Ensayo enzimática de la fosfoglucoasa isomerasa

Se llevaron a cabo ensayos *in-vitro* contra metacestodos de *E. multilocularis* basado en el control de la liberación de la enzima PGI. La preparación de metacestodos de *E. multilocularis* se desarrolló a partir de ratones BALB/c infectados intraperitonealmente. Luego, se midió la liberación de la enzima en base al deterioro físico de los metacestodos.

Este ensayo permite identificar daño en las vesículas del metacestodo a causa de algún tratamiento. La etapa metacestodo de *E. multilocularis* fue cultivada como vesículas de hasta 8 mm *in-vitro*. Estas vesículas se llenan con un fluido denominado fluido vesicular. La enzima PGI está presente en el fluido vesicular, pero no en el medio en el que se cultivan las vesículas del parásito.

Aquellos fármacos que son activos frente al parásito conducen a la liberación de la enzima al medio¹³.

Se tomaron muestras de los sobrenadantes de los medios luego de 5 y 12 días de incubación con los sistemas probados y el fármaco de partida. La actividad de PGI se determinó agregando fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que cataliza la formación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). El NADH absorbe a 340 nm, y la absorción medida es proporcional a la cantidad de PGI liberada, y por lo tanto al daño vesicular. Se empleó Triton X-100 como control positivo, ya que destruye todas las vesículas (fue considerado un daño del 100 %).

2.2.2.5.2.2. Ensayo Alamar Blue

También se evaluó la viabilidad del metacestodo mediante el ensayo Alamar Blue.

Alamar Blue (o Resazurin) es un indicador redox ampliamente empleado para medir la función metabólica y la viabilidad celular en bioensayos. El producto de oxidación de Resazurin se puede detectar mediante medición de fluorescencia¹⁴.

La configuración general de las vesículas y los fármacos fue la misma que para el *Ensayo PGI*. Estas células se incubaron con Resazurin durante 5 h, en presencia de células vivas esta se oxida (a través de la actividad mitocondrial).

La fluorescencia se midió a 586 nm, excitando a 572 nm, (Resazurin no emite luz a esta longitud de onda). Se usó medio de cultivo como control negativo, ya que las

células permanecen vivas en dichas condiciones (se consideró el 100% de viabilidad).

2.2.2.5.2.3. Ensayo de movilidad

Esta prueba es llevada a cabo sobre otra etapa de la vida del parásito, que representa la preforma de tenia adulta y son empleadas para identificar sustancias con potencial actividad frente a cestodos intestinales.

Se basa en que la movilidad durante esta etapa presenta una configuración automática, y los compuestos pueden reducir dicha movilidad en función de la dosis y el tiempo cuando son activos¹⁵.

Para esto, los parásitos fueron extraídos del tejido metacestodo de los roedores. Los mismos fueron incubados en placas de 384 pocillos (15 por pocillo) con 20 μ M de los compuestos evaluar durante 12 horas. Cada análisis se realizó con 6 réplicas y 2 controles (establecidos como 100% de movimiento).

2.2.2.6. Estudios *in-vivo* de los sistemas empleando animales de experimentación

2.2.2.6.1. Ensayos *in-vivo* de sobre *Taenia crassiceps* empleando nanopartículas de praziquantel

Este estudio se llevó cabo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Marina Vinaud (Universidad Federal de Goias, Brasil).

2.2.2.6.1.1. Evaluación del metabolismo energético, infección de ratones y tratamiento

Se estudió el efecto de NPs de PZQ sobre el metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* (se emplearon las NPs 1, 2 y 3 detalladas en la Tabla 2.3). Para esto, ratones hembras BALB/c fueron inoculados de manera intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps* en fase inicial. Treinta días después de la infección fueron tratados con cada una de las formulaciones, luego de 24 horas del tratamiento fueron sacrificados y se estudiaron los efectos bioquímicos de los fármacos sobre los cisticercos. Los ratones infectados se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) Control negativo: ratones infectados que no recibieron tratamiento
- 2) Control positivo: 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de PZQ
- 3) Poloxamero188 (P-188): 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de P-188
- 4) Poloxámero 407 (P-407): 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de p-407
- 5) Alcohol de polivinilo (PVA): 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de PVA
- 6) NPs 1: 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de NPs de PZQ: P-188 (800: 250)
- 7) NPs 2: 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de NPs de PZQ: P-407 (800: 250)
- 8) NPs 3: 5 ratones infectados tratados con 50 mg/kg de NPs de PZQ: PVA (800: 250).

2.2.2.6.1.2. Análisis bioquímicos de los cisticercos

Los cisticercos removidos de los ratones se fijaron en nitrógeno líquido, y fueron homogeneizados con *buffer* tris-HCl 0,5 M, a pH 7,6 con inhibidor de proteasa. El extracto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. 500 µl del sobrenadante fueron pasados por una columna de extracción en fase sólida para la extracción de ácidos orgánicos y el posterior análisis por HPLC. Otros 500 µl del sobrenadante se analizaron en un espectrofotómetro para la cuantificación de glucosa, urea, creatinina y lactato deshidrogenasa (LDH).

Los ácidos orgánicos se identificaron a través de HPLC de acuerdo con el tiempo de retención determinado previamente durante la calibración. Los ácidos orgánicos analizados fueron los indicadores de glucólisis: piruvato y lactato; del ciclo de ácido cítrico: citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato; del metabolismo de los ácidos grasos, tales como acetato, acetoacetato, β - hidroxibutirato y propionato. El análisis cromatográfico fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito por Vinaud y colaboradores¹⁶.

2.2.2.6.2. Eficacia antiparasitaria *in-vivo* de nanopartículas de benznidazol sobre *Trypanosoma cruzi*

Este estudio se llevó cabo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Laura Fichera (Instituto de Parasitología “Fátala Chaben”, Buenos Aires).

2.2.2.6.2.1. Ensayos de toxicidad celular

Se sembraron las células (1×10^5) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante

toda la noche a 37 °C, aumentando las concentraciones de las NPs de BNZ (10, 25 y 50 µg/ml). La viabilidad de las células Vero (células epiteliales de riñón) fue determinada por la reducción de la sal de bromuro de difeniltetrazolio (desde amarillo) a su producto cristalino (azul). El color desarrollado se midió a 540 nm en un lector de microplacas (modelo 3550, Bio-Rad). Cada experimento se realizó por triplicado.

2.2.2.6.2.2. Ensayos de hemólisis

Se preparó una suspensión al 4% de sangre humana fresca desfibrinada en una solución estéril de glucosa al 5% y fue tratada con las NPs de BNZ (100, 50, 25 y 10 µg/ml) durante 24 horas a 37 °C. Después de la centrifugación, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm para evaluar el porcentaje de hemólisis. Se utilizó BNZ de partida como referencia hemolítica y Triton X-100 como control positivo.

2.2.2.6.2.3. Actividad tripanocida

Los tripomastigotes de *T. cruzi* Nicaragua (TcN), se obtuvieron a partir del cultivo de células Vero. El ensayo se realizó en microplaca estéril de 96 pocillos con 50.000 tripomastigotes por pocillo. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas bajo una atmósfera de CO₂ al 5% con 90 µl de medio fresco suplementado con 20% de suero fetal bovino al 20% y 10% de sangre de ratón y con 10 µl de cada dilución del BNZ de partida y las NPs de BNZ para obtener la concentración deseada (de 5-100 µg/ml). La concentración de fármaco a la que se lisó el 50% de los parásitos (CL₅₀) se calculó contando las células de acuerdo con el método Brener¹⁷. Para detectar una potencial actividad tripanocida del excipiente, se llevó a cabo este estudio además utilizando solo P-188. El ensayo se realizó por duplicado para cada uno de los tres experimentos.

2.2.2.6.2.4. Preparación de miocitos ventriculares

Los miocitos ventriculares se aislaron a partir de ratones de 5 días. Los fragmentos de corazón se disociaron con *buffer* en presencia de tripsina al 0,02% a 37 °C durante cuatro ciclos de 15 minutos cada uno. Las células se resuspendieron en el medio con 10% de suero fetal bovino y 10% de suero de caballo y se transfirieron a cubreobjetos de 12 mm contenidos en placas de cultivo de 24 pocillos. Estos cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C para permitir que las células se adhieran firmemente a los cubreobjetos.

2.2.2.6.2.5. *Ensayo de inhibición del crecimiento de amastigotes*

Se incubaron los miocitos cardíacos (MC) y células Vero en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en cubreobjetos de 12 mm como se describe en la sección anterior (punto 2.2.2.6.2.4). Después de 48 horas, las células cultivadas se infectaron con tripomastigotes de TcN (relación parásitos: células 10:1) y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un 5 % de atmósfera de CO₂. Después de lavar los MC y las células Vero para eliminar los parásitos no internalizados, se incubaron con 10, 25 y 50 µg/ml de NPs BNZ durante 24 y 48 horas, respectivamente. Se retiraron los cubreobjetos, se lavaron con *buffer*, se fijaron en metanol y se tiñeron con Giemsa. En cada experimento, se evaluaron un total de 300 células para cada tratamiento seleccionadas aleatoriamente. El porcentaje de inhibición del crecimiento (*IC*) se calculó como se muestra en la Ecuación 2.8.

$$IC = \frac{\text{células infectadas}_{\text{experimentalmente}} - \text{células infectadas}_{\text{control}}}{\text{células infectadas}_{\text{control}}} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

2.2.2.6.2.6. *Modelo animal*

Ocho grupos, cada uno compuesto por 10 ratones hembra de 1 mes de edad, fueron inoculados intraperitonealmente con 1.000 tripomastigotes derivados del cultivo de TcN. Los ratones infectados se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) Ratones infectados sin tratamiento
- 2) Ratones tratados con BNZ de partida con dosis diarias de 50 mg/kg de peso corporal durante 15 días (de 2 a 17 días después de la infección)
- 3) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 15 días con dosis diarias de 50 mg/kg/día
- 4) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 30 días con dosis diarias de 50 mg/kg/día
- 5) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 15 días con dosis diarias de 25 mg/kg/día
- 6) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 30 días con dosis diarias de 25 mg/kg/día
- 7) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 15 días con dosis diarias de 10 mg/kg/día
- 8) Ratones tratados con NPs de BNZ durante 30 días con dosis diarias de 10 mg/kg/día
- 9) Ratones sin infección tratados con NPs de BNZ durante 30 días con dosis diarias de 50 mg/kg/día.

El BNZ de partida y las NPs de BNZ se dispersaron en aceite de oliva y se

administraron a ratones a través de sonda oral. La sobrevida de los ratones se registró diariamente. Todos los procedimientos que involucran protocolos experimentales en animales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación ética y las entidades reguladoras establecidas en Argentina y fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben" (registrado RENIS N°: 000028), y cumplió con las recomendaciones internacionales para el uso de animales de laboratorio (Asociación Médica Mundial en la Declaración de Helsinki).

2.2.2.7. Diseño de experimentos y optimización en la formulación de micro- y nanopartículas

2.2.2.7.1. Diseño y optimización en la elaboración de nanopartículas poliméricas de glibenclamida

Se formularon, mediante la metodología de DOE, NPs de GB optimizando las condiciones de producción, para esto se utilizó el programa Design Expert® 7.0.0.

Se llevó a cabo una primera fase de *screening* empleando un factor categórico: el tipo de agitación empleado, y cuatro factores numéricos: la cantidad de P-188, la cantidad de P-407 y la cantidad de PEG 6000 que conforman la fase acuosa, y la cantidad de EuRLPO que forma parte de la fase orgánica. Las respuestas que se evaluaron fueron: R total en masa obtenido y la $E_f E$ ambos en %, el $T_{particula}$ en nm y la S_{GB} en $\mu\text{g/ml}$.

2.2.2.7.2. Diseño y optimización en la elaboración de nanopartículas de benznidazol

Se llevó a cabo la elaboración de NPs poliméricas de BNZ y P-188 mediante el DOE empleando el programa "Design Expert".

Al igual que en la sección anterior se llevó a cabo una primera fase de *screening* empleando como factores: la concentración de BNZ empleada y la concentración del estabilizante P-188, el porcentaje de fase orgánica usada, la velocidad de agitación en rpm y la temperatura de cristalización en °C. Las respuestas evaluadas fueron: R total en masa obtenido y el porcentaje de BNZ_{NC} en %, el $T_{particula}$ en nm y la S_{BNZ} en mg/ml. Luego de esto, aquellos factores que resultaron ser significativos sobre alguna de las respuestas estudiadas fueron sometidos a la fase de optimización empleando un diseño del tipo Central Compuesto.

2.2.2.7.3. Diseño y optimización en la elaboración de nanocápsulas lipídicas de benznidazol

Para determinar la proporción óptima de aceites para elaborar NCLs se llevó a cabo un DOE, empleando el programa Design Expert® 7.0.0.

Se emplearon como factores las cantidades de: Labrafac™ WL 1349, Labrafac™ PG, Labrasol® ALF y Capryol™ 90, variando de 0 a 1.028 mg de cada una (la masa final de aceites se mantuvo fija en 1.028 mg). Las respuestas que se evaluaron fueron: $T_{particula}$ e IPd ambos en nm, además del cambio de tamaño de las NCLs luego de 15 y 30 días almacenadas en heladera de 2 a 4 °C ($\Delta 15$ y $\Delta 30$ respectivamente) también en nm.

Luego, se seleccionó el sistema que el programa calcula con mayor deseabilidad y se estudiaron sus propiedades. Se buscaron NCLs con un bajo diámetro, IPd pequeño y mínimos cambios de tamaño a los 15 y 30 días.

2.2.2.7.4. Diseño y optimización en la elaboración de micropartículas de fenbendazol

Se llevó a cabo la elaboración de MPs de FNZ y PVA mediante es secado por rociado, empleando DOE y la posterior optimización empleando el programa “Design Expert”.

Para esto se desarrolló una primera fase de *screening* empleando un diseño de tipo Plackett-Burman, siendo los factores: la cantidad de PVA en fase acuosa, el volumen usado de solución de Sipernat® (V_{Sip}), la potencia de la bomba del rociador (*Bomba*) y la temperatura de entrada del rociador ($T_{entrada}$). Las respuestas evaluadas fueron: el R total en masa obtenido en %, la cantidad de FNZ en el sólido (FNZ_c) en $\mu\text{g}/\text{mg}$ sólido, la S_{FNZ} en $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la cantidad de FNZ disuelta durante los primeros 30 minutos (D_{FNZ}).

Luego de esta primera fase, aquellos factores que resultaron ser significativos sobre alguna de las respuestas estudiadas fueron sometidos a la etapa de optimización empleando un diseño del tipo Central Compuesto.

2.2.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando la plataforma *Sigma Plot 12.0*.

Se aplicaron estadísticas descriptivas para determinar la media y la desviación estándar y para evaluar las diferencias entre los grupos analizados.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de *Student* y el análisis de prueba de varianza. Fueron ensayadas las variables para determinar distribución normal y varianza homogénea. Cuando estas presentaron distribución normal, se llevó a cabo un análisis

de varianza seguido por el test de *Holm-Sidak*. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad asociada (p) fue menor a 0,05.

2.3. Bibliografía

- (1) Moysan, E.; González-Fernández, Y.; Lautram, N.; Béjaud, J.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P. “An Innovative Hydrogel of Gemcitabine-Loaded Lipid Nanocapsules: When the Drug Is a Key Player of the Nanomedicine Structure.” *Soft Matter* **2014**, *10* (11), 1767–1777.
- (2) Eapen, C.; Prasanth, V. G.; Rai, A. “Development of UV Spectrometric Method of Glibenclamide (Glyburide) in Bulk and Pharmaceutical Formulations.” *Int. J. ChemTech Res.* **2012**, *4* (1), 356–360.
- (3) Mohd., A. B.; Swathimutyam, P.; Rao, a P.; Shastri, N.; Diwan, P. V. “Development and Validation of Glibenclamide in Nanoemulsion Formulation by Using RP-HPLC.” *J. Pharm. Biomed. Sci.* **2011**, *08* (08), 1–5.
- (4) Silva, A. L. M. da; Soares Sobrinho, J. L.; Rolim Neto, P. J.; Silva, R. M. F. da; Medeiros, F. P. M. de; Lima, L. G. de. “Desenvolvimento de Método Analítico Por CLAE Em Comprimidos de Benznidazol Para a Doença de Chagas.” *Quim. Nova* **2007**, *30* (5), 1163–1166.
- (5) Mainardes, R. M.; Evangelista, R. C. “PLGA Nanoparticles Containing Praziquantel: Effect of Formulation Variables on Size Distribution.” *Int. J. Pharm.* **2005**, *290* (1–2), 137–144.
- (6) McKellar, Q. A.; Gokbulut, C.; Muzandu, K.; Benchaoui, H. “Fenbendazole Pharmacokinetics, Metabolism, and Potentiation in Horses.” *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30* (11), 1230–1239.
- (7) Seremeta, K. P.; Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. “Poly(ϵ -Caprolactone), Eudragit® RS 100 and Poly(ϵ -Caprolactone)/Eudragit® RS 100 Blend Submicron Particles for the Sustained Release of the Antiretroviral Efavirenz.” *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *102*, 441–449.
- (8) Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. “Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers.” *Int. J. Pharm.* **1983**, *15* (1), 25–35.

- (9) Rouget, M.; Richardson, D. M.; Lavorel, S.; Vayreda, J.; Gracia, C.; Milton, S. J. “Determinants of Distribution of Six Pinus Species in Catalonia, Spain.” *J. Veg. Sci.* **2001**, *12* (4), 491–502.
- (10) Dokoumetzidis, A.; Macheras, P. “A Century of Dissolution Research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System.” *Int. J. Pharm.* **2006**, *321* (1–2), 1–11.
- (11) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. “Evaluation of Pegylated Lipid Nanocapsules versus Complement System Activation and Macrophage Uptake.” *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *78A* (3), 620–628.
- (12) Marcellino, C.; Gut, J.; Lim, K. C.; Singh, R.; McKerrow, J.; Sakanari, J. “WormAssay: A Novel Computer Application for Whole-Plate Motion-Based Screening of Macroscopic Parasites.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (1), 1–8.
- (13) Stadelmann, B.; Scholl, S.; Muller, J.; Hemphill, A. “Application of an in Vitro Drug Screening Assay Based on the Release of Phosphoglucose Isomerase to Determine the Structure-Activity Relationship of Thiazolides against *Echinococcus Multilocularis* Metacestodes.” *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65* (3), 512–519.
- (14) Stadelmann, B.; Rufener, R.; Aeschbacher, D.; Spiliotis, M.; Gottstein, B.; Hemphill, A. “Screening of the Open Source Malaria Box Reveals an Early Lead Compound for the Treatment of Alveolar Echinococcosis.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (3), 1–19.
- (15) Ritler, D.; Rufener, R.; Sager, H.; Bouvier, J.; Hemphill, A.; Lundström-Stadelmann, B. “Development of a Movement-Based in Vitro Screening Assay for the Identification of New Anti-Cestodal Compounds.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (5), 1–23.
- (16) Vinaud, M. C.; Ferreira, C. S.; Lino Junior, R. de S.; Bezerra, J. C. B. “*Taenia Crassiceps*: Fatty Acids Oxidation and Alternative Energy Source in in Vitro *Cysticerci* Exposed to Anthelmintic Drugs.” *Exp. Parasitol.* **2009**, *122* (3), 208–211.

- (17) Brener, Z. “Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma Cruzi*.” *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1962**, *4*, 389–396.

Capítulo 3.

Glibenclamida

3.1. Índice

3.1.	Índice.....	54
3.2.	Introducción	56
3.3.	Formulaciones	57
3.4.	Resultados	58
3.4.1.	Nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros	58
3.4.1.1.	Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta	58
3.4.1.2.	Microscopía electrónica de barrido.....	60
3.4.1.3.	Eficacia de encapsulación.....	62
3.4.1.4.	Solubilidad en agua	63
3.4.1.5.	Ensayo de disolución	65
3.4.2.	Nanopartículas formuladas con Eudragit y polietilenglicoles de diferente peso molecular	67
3.4.2.1.	Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta	67
3.4.2.2.	Microscopía electrónica de barrido.....	69
3.4.2.3.	Calorimetría diferencial de barrido	71
3.4.2.4.	Análisis de difracción de rayos X	72
3.4.2.5.	Eficacia de encapsulación.....	72
3.4.2.6.	Solubilidad en agua	73
3.4.2.7.	Ensayo de disolución de glibenclamida	74
3.4.2.8.	Ensayo de liberación de glibenclamida.....	76
3.4.2.9.	Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus	79
3.4.2.10.	Viabilidad celular	81
3.4.2.11.	Ensayos de transporte	82
3.4.3.	Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros	83
3.4.3.1.	Fase de <i>screening</i>	83
3.4.3.2.	Fase de optimización	85
3.4.3.3.	Verificación de la optimización.....	92

3.4.3.4.	Evaluación de la disolución de glibenclamida en el sistema optimizado	93
3.5.	Conclusiones	95
3.6.	Bibliografía	96

3.2. Introducción

La GB, como se dijo en el Capítulo 1, es un medicamento oral que se utiliza en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. La GB actúa principalmente estimulando la liberación de insulina endógena del páncreas¹. Debido a ello el nivel de insulina comienza a aumentar en suero dentro de los 15 a 60 minutos después de una dosis única. Los estudios también indican que el fármaco disminuye la producción de glucosa del hígado y aumenta la sensibilidad a la insulina en los sitios diana periféricos². Este medicamento generalmente se administra como una dosis diaria única cada mañana con el desayuno o la primera comida principal. La dosis inicial recomendada para adultos es de 2,5 a 5 mg al día. La dosis diaria única máxima recomendada es de 10 mg³. Algunos pacientes que requieren más de 10 mg al día tienen una respuesta más satisfactoria cuando se administra GB en dos dosis divididas. La dosis diaria total máxima recomendada en estas circunstancias es de 20 mg. El régimen de dosificación óptimo de GB para cada paciente se obtiene por titulación^{3,4}.

Estudios previos demostraron el efecto de GB se debe a su unión a las subunidades SUR1, permitiendo el bloqueo de canales de K. Sin embargo, GB es un fármaco poco soluble (su solubilidad es menor a 8 µg/ml en *buffer* fosfato a pH 7,4)⁵ con una permeabilidad relativamente alta a través de monocapas de células CaCo-2^{6,7}, lo que justifica su posicionamiento en clase II del SCB⁸.

Por otro lado, como también se mencionó en el Capítulo 1, GB posee cierta eficacia biológica sobre *Leishmania sp.*, protozoo causante de la leishmaniasis. Se demostró que redujo la tasa de crecimiento de la lesión en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*, y que el efecto fue dependiente de la dosis^{9,10}.

En un sentido amplio, las NPs son sistemas sobre los cuales se ha aplicado algún proceso para disminuir su tamaño a la escala nanométrica (nm). El uso de los sistemas de liberación nanoparticulados para el transporte de fármacos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se han utilizado para incrementar la solubilidad y velocidad de disolución de fármacos poco solubles, como la GB, que a su vez tiene una directa correlación con la absorción y biodisponibilidad de los mismos.

En consecuencia, es posible reducir la toxicidad y los efectos secundarios de dichos fármacos¹¹.

3.3. Formulaciones

Con el objetivo de mejorar la solubilidad y disolución de GB, se formularon diferentes sistemas nanoparticulados.

Se evaluó el uso de diversos biomateriales en la formulación de NPs. Para esto fueron evaluados: EuRLPO, P-188, P-407 y PEG 6000, empleando diferentes metodologías de agitación y secado posterior. El detalle de la composición de cada sistema se muestra en el Capítulo 2, Tabla 2.1 (Página 29).

Luego, se formularon NPs de GB empleando estas proporciones y cambiando el PEG 6000, por PEGs de diferentes PMs, como se menciona en el Capítulo 2, Tabla 2.2 (Página 30).

Finalmente, se llevó a cabo un DOE la preparación de NPs de GB, seleccionando las mejores condiciones de formulación.

Todos los sistemas formulados fueron luego caracterizados fisicoquímicamente e *in-vitro*.

3.4. Resultados

3.4.1. Nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros

3.4.1.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

La disminución del $T_{particula}$ de un fármaco da lugar a un aumento de la superficie de contacto entre el fármaco no disuelto y el medio de disolución y por lo tanto, a una mayor velocidad de disolución del mismo¹².

En general, la formación de NPs a partir de una solución de un fármaco se produce en tres pasos: nucleación, crecimiento y agregación. La correcta separación entre la nucleación y el crecimiento es el factor clave para la formación de partículas uniformes. Se debe lograr una alta tasa de nucleación, la cual generará la saturación necesaria para evitar la agregación de las nuevas NPs¹³.

En relación a este trabajo, los sistemas poliméricos de GB que fueron secados en estufa mostraron un diámetro promedio para las partículas formadas que superó el límite de determinación del equipo (el analizador de NPs empleado mide el tamaño de partículas menores de 8 μm), por lo que podría decirse que se trata de MPs de diámetro superior a 8 μm . Esto estaría relacionado con la formación de aglomerados o agregados durante el proceso de secado¹⁴.

La medición de los sistemas secados por liofilización indicó que se obtuvieron NPs. Tal como se puede observar en la Tabla 3.1, el tamaño de partícula de los sistemas obtenidos estuvo en el rango de 56 a 400 nm. Se debe destacar que en ausencia de los polímeros PEG y EuRLPO (empleando únicamente los poloxámeros) se obtuvieron tamaños de partículas más bajos (muestras 1 y 2, con diámetros de entre 50 y 60 nm). Este resultado está relacionado con la formación de nanocristales de GB por medio del proceso de nanocristalización, durante el cual P-188 y P-407 estabilizan las partículas en el proceso de nucleación. Dicha estabilización evita la formación de agregados o aglomerados y por lo tanto el tamaño de partícula se encuentra en la escala nanométrica. Además es necesario mencionar que varios estudios *in-vitro* han demostrado que NPs con un tamaño menor a 60 nm son fácilmente fagocitadas (*uptake process*). Este fenómeno estaría directamente relacionado con un posterior efecto biológico¹⁵.

Tabla 3.1. $T_{particula}$, IPd y PZ de las muestras liofilizadas. ^{1/2} se emplea para indicar que la formulación presenta la mitad de dicho compuesto respecto al resto de los componentes usados.

Muestras	$T_{particula}$ (nm)	IPd (nm)	PZ (mV)
1M (P-188)	56,2±0,1	0,021±0,005	16,9±0,6
1H (P-188)	49,0±0,5	0,015±0,002	16,8±0,5
2M (P-407)	61,8±0,6	0,054±0,004	17,5±0,5
2H (P-407)	59,0±0,7	0,013±0,005	17,1±0,6
3M (PEG/P-188)	286,2±0,5	0,022±0,001	25,1±0,6
3H (PEG/P-188)	233,3±0,1	0,020±0,009	24,7±0,5
4M (PEG/P-407)	364,1±0,4	0,045±0,005	23,3±0,8
4H (PEG/P-407)	345,7±0,9	0,026±0,007	23,5±0,4
5M (EuRLPO/P-188)	355,2±0,1	0,014±0,006	33,2±0,5
5H (EuRLPO/P-188)	378,1±0,7	0,032±0,004	31,4±0,5
6M (EuRLPO/P-407)	384,1±0,1	0,031±0,002	30,9±0,3
6H (EuRLPO/P-407)	394,2±0,5	0,040±0,008	34,6±0,1
7M (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-188)	215,4±0,3	0,019±0,009	29,7±0,2
7H (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-188)	225,9±0,1	0,020±0,006	27,6±0,5
8M (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-407)	237,5±0,6	0,055±0,004	22,7±0,3
8H (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-407)	258,8±0,2	0,021±0,004	26,5±0,4
9M (PEG/EuRLPO/P-188)	266,4±0,1	0,023±0,003	29,7±0,3
9H (PEG/EuRLPO/P-188)	253,1±0,2	0,031±0,008	30,1±0,6
10M (PEG/EuRLPO/P-407)	287,3±0,3	0,014±0,004	20,2±0,5
10H (PEG/EuRLPO/P-407)	269,4±0,2	0,041±0,001	21,4±0,3
11M (PEG/EuRLPO)	140,6±0,1	0,037±0,006	24,7±0,6
11H (PEG/EuRLPO)	178,1±0,4	0,028±0,008	24,1±0,4

La formulación de las NPs de GB empleando los polímeros PEG 6000 y EuRLPO (11M y 11H) dio como resultado la formación de sistemas con un tamaño promedio de 140 a 180 nm, mientras que aquellos sistemas conteniendo PEG 6000 y EuRLPO combinados con los poloxámeros dieron como resultado partículas en el orden de 200 a 400 nm (ver Tabla 3.1). Resultados similares en términos de tamaño de partícula se obtuvieron durante la formulación de NPs de aciclovir, fármaco antiviral de amplio espectro, con Eudragit RLPO y P-188¹⁶. En todos los casos los sistemas formulados mostraron IPd bajos (menores a 0,08 nm), demostrando homogeneidad en el tamaño determinado.

El PZ es una propiedad de los materiales que miden el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern. Es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unida a la partícula dispersada¹⁷⁻¹⁹.

El PZ está relacionado con la estabilidad de las dispersiones, ya que indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión²⁰. Para sistemas con

un tamaño bajo, un alto *PZ* le confiere estabilidad, ya que la suspensión se resistirá a la agregación, mientras que cuando el potencial es bajo, se tiende a cierta atracción entre partículas, se supera a la repulsión y se podrían formar flóculos²¹.

Los resultados de *PZ* obtenidos para las NPs de GB se muestran en la última columna de la Tabla 3.1. En todos los casos los valores son elevados (mayores a 16 mV), siendo los más bajos los alcanzados con NPs formuladas con los poloxámeros únicamente. Los valores de *PZ* indican una alta carga positiva en la superficie de las NPs, que produce una repulsión entre las partículas y evita su agregación. Los valores de *PZ* positivo obtenidos en este estudio se relacionan con la presencia de grupos amonio cuaternario presentes en el EuRLPO. Estos resultados eran esperables y coinciden con la formulación de NPs de glimepirida, otro fármaco hipoglucemiante de la familia de las sulfonilureas, empleando EuRLPO como polímero formador de la nanomatríz y P-188 como estabilizante²². A partir de estos resultados se pudo confirmar que EuRLPO puede formar nanodispersiones con tamaño de partículas menores a 500 nm, y con carga superficial positiva, la cual es favorable para impartir propiedades mucoadherentes para estos sistemas.

3.4.1.2. Microscopía electrónica de barrido

La MEB es una herramienta muy útil para observar cambios morfológicos de los sistemas preparados, así como de las superficies luego de la solidificación de los mismos.

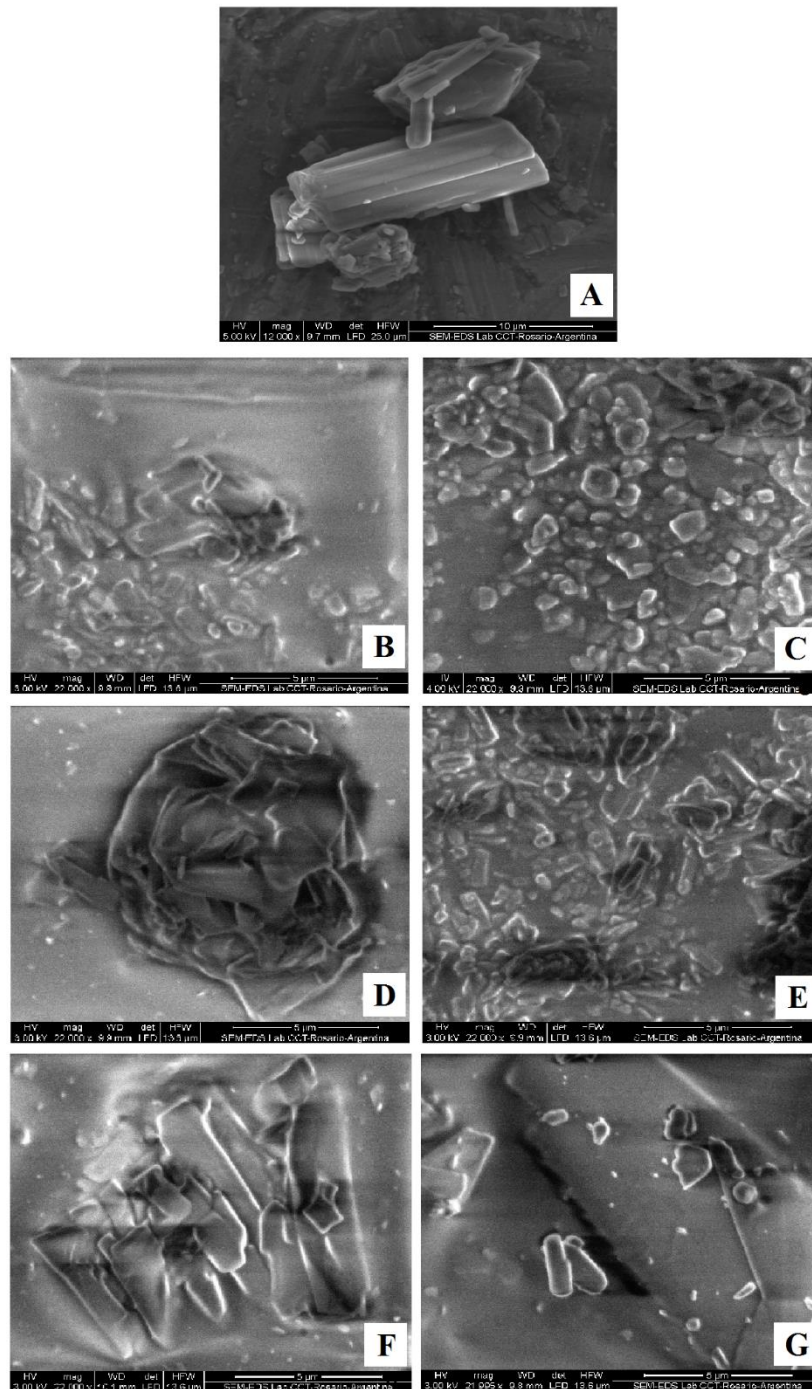


Figura 3.1. Micrografías de MEB de GB pura (A), las muestras 5H (B: estufa, C: liofilizada), 6H (D: estufa, E: liofilizada) y 11H (F: estufa y G: liofilizada).

En la Figura 3.1 se observan micrografías de GB pura y de las muestras 5H (EuRLPO/P-188), 6H (EuRLPO/P-407) y 11 H (PEG/EuRLPO), obtenidas empleando microscopía electrónica de barrido. En este ensayo se buscó analizar el efecto de los diferentes tipos de poloxámeros sobre las estructuras de las partículas formadas a partir de ellos, por este motivo se seleccionaron muestras que contuvieran P-188, P-407 y sistemas sin poloxámeros conteniendo PEG 6000.

El fármaco sin tratamiento se observó en forma de cristales irregulares. Las micrografías de las muestras con P-188 y P-407, y aquellas elaboradas con PEG 6000 evidencian diferencias en los tamaños de las partículas entre las elaboradas por secado en estufa y por liofilizado, siendo estas últimas en todos los casos, cristales nanométricos. Estos resultados coinciden con los mostrados previamente por difracción de luz dinámica (ver Tabla 3.1), demostrando que al emplear secado por estufa se obtienen cristales de mayor tamaño.

Para todos los sistemas, las imágenes de MEB demuestran que las partículas de GB han cambiado de forma, de superficie y disminuido su tamaño, luego de los diferentes procesos tecnológicos aplicados.

3.4.1.3. Eficacia de encapsulación

En la Tabla 3.2 se muestran los valores de la eficacia de encapsulación calculados para las MPs y NPs de GB obtenidas mediante la técnica de precipitación. De acuerdo con los resultados obtenidos es posible determinar que el estabilizante (P-188 o P-407) empleado afecta en gran medida la eficacia de encapsulación, así como también los rendimientos que se alcanzaron.

Los rendimientos obtenidos con esta técnica estuvieron por debajo del 35%. En general con el poloxámero P-407 se encontraron los rendimientos más altos. La eficacia de encapsulación en casi todos los casos fue ampliamente superior al 30%, a excepción de la muestra 3H (PEG 6000/P-188).

Tabla 3.2. R y E_fE de las muestras.

Muestras	Composición	E_fE (%)		R (%)	
		M	H	M	H
1M/1H	P-188	51,68±0,09	47,24±0,06	27,98±0,07	24,55±0,09
2M/2H	P-407	59,03±0,07	63,40±0,05	30,60±0,08	33,18±0,06
3M/3H	PEG 6000/P-188	36,79±0,04	27,05±0,08	12,50±0,07	12,50±0,04
4M/4H	PEG 6000/P-407	92,07±0,09	98,23±0,03	27,87±0,04	27,00±0,06
5M/5H	EuRLPO/P-188	68,01±0,08	61,76±0,06	20,00±0,05	17,75±0,05
6M/6H	EuRLPO/P-407	59,90±0,06	36,90±0,04	27,37±0,07	18,12±0,04
7M/7H	PEG 6000/EuRLPO/P-188	48,69±0,06	54,69±0,08	18,44±0,09	23,67±0,07
8M/8H	PEG 6000/EuRLPO/P-407	96,86±0,04	97,35±0,08	24,11±0,07	31,00±0,08
9M/9H	PEG 6000/EuRLPO/P-188	67,99±0,09	72,53±0,09	21,00±0,08	21,30±0,07
10M/10H	PEG 6000/EuRLPO/P-407	97,88±0,08	65,75±0,09	19,50±0,07	18,60±0,05
11M/11H	PEG 6000/EuRLPO	60,36±0,05	53,14±0,05	28,83±0,06	25,17±0,04

Los valores más altos fueron de un: 98,23; 97,35 y 97,88 %; para las muestras 4, 8 y 10 respectivamente (todas elaboradas a partir de P-407). Los resultados aquí presentados estarían indicando que el empleo de P-407 en la elaboración de partículas llevando a cabo esta metodología sería más recomendable (en cuestiones de rendimiento y eficacia de encapsulación) que el empleo de P-188 o la ausencia de ambos poloxámeros utilizando únicamente EuRLPO y PEG 6000. Esto se debería, posiblemente, a que el P-407 forma micelas esféricas donde el núcleo de las micelas se compone de 65 unidades de OP (hidrofóbicos), mientras que la corona está formada por bloques de 200 unidades de OE (hidrofílicos). En el caso del P-188 hay 29 unidades de OP y 153 de OE. Estas diferencias hacen que el P-407 tenga mayor capacidad de formar micelas con fármacos hidrofóbicos como GB y debido a ello la eficacia de encapsulación con este poloxámero es mayor²³.

3.4.1.4. Solubilidad en agua

Se estudió la S_{GB} en las partículas obtenidas en agua a 25 °C, los resultados se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. S_{GB} de las muestras.

Muestras	S_{GB} ($\mu\text{g/ml}$)	
	Estufa	Liofilizado
GB sin tratar	22,3 \pm 0,2	
1M (P-188)	182,6 \pm 0,7	184,0 \pm 0,4
1H (P-188)	176,2 \pm 0,5	188,6 \pm 0,5
2M (P-407)	177,1 \pm 0,9	192,2 \pm 0,9
2H (P-407)	173,5 \pm 0,7	189,9 \pm 0,6
3M (PEG/P-188)	27,3 \pm 0,2	51,4 \pm 0,6
3H (PEG/P-188)	96,4 \pm 0,1	115,2 \pm 0,2
4M (PEG/P-407)	140,3 \pm 0,7	189,9 \pm 0,3
4H (PEG/P-407)	157,4 \pm 0,3	190,1 \pm 0,6
5M (EuRLPO/P-188)	28,2 \pm 0,1	56,10 \pm 0,7
5H (EuRLPO/P-188)	97,8 \pm 0,5	121,9 \pm 0,4
6M (EuRLPO/P-407)	144,7 \pm 0,3	186,3 \pm 0,8
6H (EuRLPO/P-407)	140,1 \pm 0,1	158,9 \pm 0,6
7M (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-188)	26,5 \pm 0,4	49,3 \pm 0,2
7H (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-188)	94,7 \pm 0,6	110,2 \pm 0,3
8M (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-407)	149,8 \pm 0,4	187,4 \pm 0,5
8H (^{1/2} PEG/EuRLPO/P-407)	166,2 \pm 0,1	191,4 \pm 0,4
9M (PEG/EuRLPO/P-188)	26,4 \pm 0,4	55,1 \pm 0,5
9H (PEG/EuRLPO/P-188)	94,3 \pm 0,7	114,1 \pm 0,3
10M (PEG/EuRLPO/P-407)	155,2 \pm 0,7	188,3 \pm 0,5
10H (PEG/EuRLPO/P-407)	179,5 \pm 0,4	192,1 \pm 0,3
11M (PEG/EuRLPO)	25,0 \pm 0,2	47,4 \pm 0,1
11H (PEG/EuRLPO)	95,7 \pm 0,6	121,3 \pm 0,7

En todas las NPs la solubilidad de GB fue superior a la solubilidad de la GB sin tratar. Los valores de solubilidad obtenidos van desde 22,3 $\mu\text{g/ml}$ para la GB pura, a 192 $\mu\text{g/ml}$.

En las muestras 3M, 5M, 7M, 9M y 11M secadas en estufa no se evidenció un gran incremento en la solubilidad, mientras que las mismas secadas por liofilización mostraron valores de solubilidad algo más elevados. Este resultado era esperado debido a la reducción de tamaño de partícula que aumenta la superficie de contacto con el medio acuoso e induce una mayor solubilización. Cabe señalar que una mayor solubilidad permitiría aumentar el gradiente de concentración entre el lumen y la sangre y, en consecuencia, es posible que se incremente la capacidad de absorción del fármaco²⁴.

Por otro lado al cambiar el tipo de agitación durante el preparado de dichas muestras, empleando el homogeneizador en lugar de agitador magnético (sistemas: 3H, 5H, 7H, 9H y 11H), la solubilidad acuosa aparente de GB aumenta hasta 5 veces con respecto a la solubilidad de GB pura. Estos resultados, además de estar relacionados con la

reducción del tamaño de partícula, responderían a que durante la agitación a alta velocidad se favorece la dispersión de GB en la solución y un mayor contacto con los poloxámeros, que poseen propiedades tensioactivas. De esta manera, las partículas quedarían mejor recubiertas por estas moléculas, lo que favorece su solubilidad.

Es importante destacar que los sistemas formulados con P-407 mostraron valores de solubilidad mayores en comparación con los otros sistemas y en particular se incrementó en 6 veces la solubilidad respecto a la GB de partida.

Además y como era de esperar, se observaron mayores valores de solubilidad en las muestras liofilizadas respecto a las secadas en estufa, debido al menor tamaño de partícula obtenido en dichos sistemas.

3.4.1.5. Ensayo de disolución

El ensayo de disolución es una herramienta fundamental para analizar si los procesos de obtención de MPs y NPs tienen algún impacto favorable sobre el fenómeno de la disolución. Su importancia se basa en el hecho que una muestra sólida debe disolverse para atravesar las barreras biológicas y mejorar la biodisponibilidad.

En este estudio se analizaron los perfiles de disolución de GB sin tratar y de las muestras 5H (GB-EuRLPO/P-188), 6H (GB-EuRLPO/P-407) y 11H (GB-EuRLPO/PEG).

Tal como se observa en la Figura 3.2 los sistemas que fueron liofilizados presentaron un mayor perfil de disolución que las muestras secadas en estufa y esa tendencia se mantuvo durante todo el ensayo (durante 6 horas). Se podría postular que este fenómeno se basa en las diferencias en el tamaño de partícula entre los sistemas secados en estufa y por liofilización, siendo estos últimos valores menores a escala nanométrica.

Si bien, para aquellas muestras secadas en estufa se obtuvieron buenos porcentajes de GB disuelta respecto a la disolución de GB sin tratar, no fue posible lograr una disolución mucho mayor al 60% luego de 6 h. Este resultado se podría interpretar como una potencial disolución controlada del fármaco, que si bien no es el objetivo de este trabajo, se podría considerar en el futuro, tomando en cuenta la necesidad de formulaciones de GB de liberación controlada. De todas maneras, estos resultados coinciden con el trabajo de Dora y colaboradores²⁵, que formularon NPs de GB con P-188 y Eudragit L100, otro derivado polimérico de características similares a los empleado en esta tesis. Los autores describieron una rápida disolución en los primeros

minutos, similares a los perfiles de la Figura 3.2, pero luego se produjo una disolución más controlada hasta el final del ensayo.

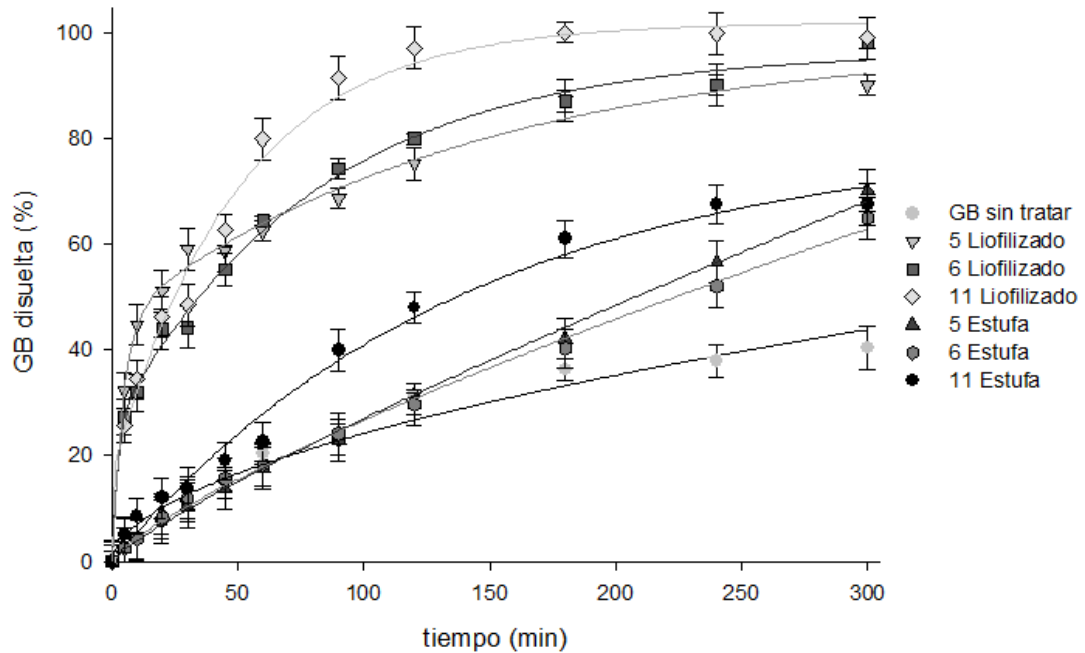


Figura 3.2. Perfiles de disolución de GB en *buffer* fosfato a pH 7,5 y 37 °C para las NPs formuladas por homogeneización.

Contrariamente a lo que ocurre con los sistemas secados en estufa, las muestras que fueron liofilizadas presentan perfiles de disolución de GB elevados, que alcanzan el 100 % de eficacia luego de 2 horas para la muestra con PEG (11), y al 80 % en ese tiempo para las muestras 5 (GB-EuRLPO/P-188) y 6 (GB-EuRLPO/P-407).

A pesar de la falta de referencias a modelos matemáticos aplicados sobre sistemas compuestos por tensioactivos, en este trabajo se aplicaron ecuaciones para analizar la liberación y disolución de GB desde los sistemas formulados. En todos los casos los perfiles de disolución fueron ajustados al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, cuyas curvas son representadas en la Figura 3.2, y los parámetros estadísticos (coeficiente de correlación r^2) y cinéticos obtenidos del ajuste se resumen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos (a y n) y estadísticos (r^2) del ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas.

Parámetros	GB s/tratar	5H L	6H L	11H L	5H E	6H E	11H E
a	0,02	0,18	0,10	0,40	0,18	0,08	0,04
n	0,42	0,35	0,44	0,19	0,26	0,44	0,43
r^2	0,99	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99

El modelo Kosmeyer-Peppas generalmente se utiliza para analizar la liberación de fármacos desde formas farmacéuticas en las cuales el fármaco se encuentra en una

matriz polimérica. En este tipo de matrices, el medio líquido (fluido biológico) penetra en la matriz causando una relajación de los enlaces poliméricos o un aumento del volumen de la matriz por absorción (*sweeling*) del medio líquido, lo que posteriormente produce la liberación de una manera específica²⁶.

De acuerdo a los resultados de este ensayo, los valores de r^2 lineal fueron elevados (mayores a 0,97). Los valores de n fueron menores a 0,45, por lo que el mecanismo de difusión que se propone para la disolución de GB, partiendo de este tipo de sistemas como de GB sin tratar, es de tipo Fickiano, que implica que la velocidad de difusión a través de una membrana es directamente proporcional al gradiente de concentración del fármaco a ambos lados de la misma e inversamente proporcional al grosor de la membrana, en este caso, de la matriz polimérica.

3.4.2. Nanopartículas formuladas con Eudragit y polietilenglicoles de diferente peso molecular

3.4.2.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

Considerando los resultados obtenidos previamente (punto 3.4.1), se formularon NPs de GB con EuRLPO y PEGs de distinto peso molecular (400, 1500 y 3000) como formadores de matriz. Los sistemas se prepararon empleando agitación magnética y homogeneización y se secaron únicamente por liofilización.

Se determinó el $T_{partícula}$ e IPd de las NPs de GB formuladas y se determinó el PZ en cada uno de los casos, tal como se describe en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. $T_{partícula}$, IPd y PZ de las NP de GB.

Muestras	$T_{partícula}$ (nm)	IPd (nm)	PZ (mV)
11M (PEG 6000)	140,6±0,1	0,037±0,006	24,7±0,6
11H (PEG 6000)	178,1±0,4	0,028±0,008	24,1±0,4
12M (PEG 3000)	197,3±0,2	0,015±0,004	19,2±0,4
12H (PEG 3000)	201,9±0,4	0,014±0,008	18,4±0,1
13M (PEG 1500)	225,2±0,7	0,050±0,007	14,1±0,3
13H (PEG 1500)	264,1±0,5	0,012±0,004	12,7±0,5
14M (PEG 400)	298,4±0,4	0,022±0,009	5,7±0,4
14H (PEG 400)	317,5±0,6	0,013±0,007	5,9±0,9
15M (sin PEG)	358,6±0,3	0,061±0,005	-21,1±0,6
15H (sin PEG)	459,7±0,2	0,024±0,004	-11,9±0,1

Los resultados presentados en la Tabla 3.5 muestran que a medida que disminuye el peso molecular de PEG, las NPs poseen un mayor $T_{partícula}$.

En la Figura 3.3 se representa la relación entre el $T_{partícula}$ obtenido y el peso molecular de PEG empleado. Puede observarse que el tamaño disminuye de manera exponencial ($r^2 = 0,9876$) con el aumento del peso molecular para el rango ensayado. Esto podría deberse a que al aumentar el peso molecular del PEG es mayor la cantidad del polímero que se disuelve en la fase acuosa, ya que aumenta su solubilidad en agua, y queda menos cantidad de PEG libre para formar las NPs de GB. También podría considerarse que una mayor cantidad de cadenas poliméricas de PEG 400 (de menor PM) podrían recubrir las partículas, en comparación aquellas muestras en las que se usan PEGs de mayor peso molecular (PEG 1500, 3000 y 6000), que a su vez incrementaría el tamaño de partícula de GB. Es necesario mencionar que no hay datos en la literatura relacionados con este fenómeno, lo que transforma estos resultados en novedosos, siendo necesario realizar más estudios en el futuro para confirmar las hipótesis mencionadas.

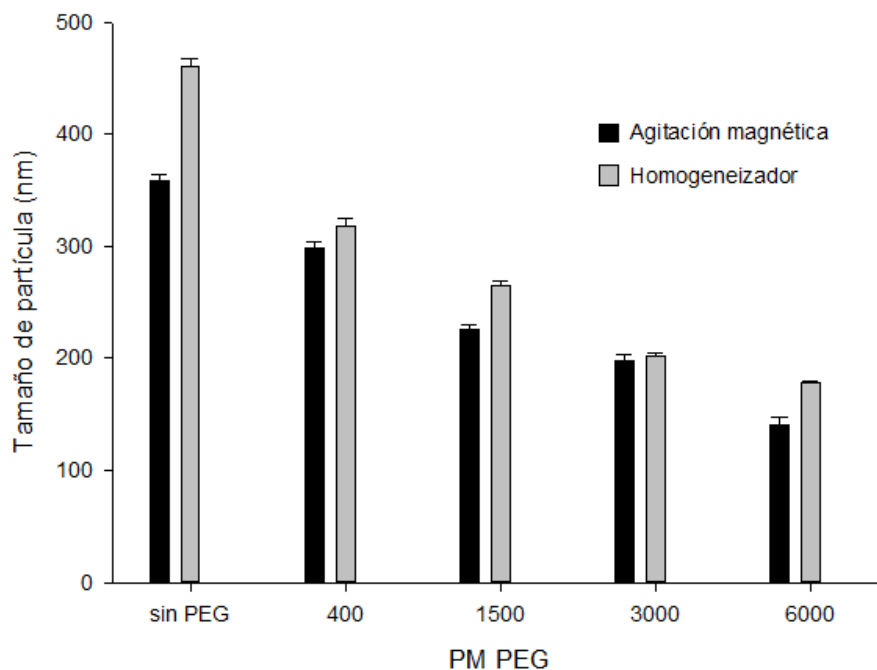


Figura 3.3. Correlación entre el $T_{partícula}$ y el PM de PEG empleado.

Por otro lado, en la Tabla 3.5, se observa que el PZ en ausencia de PEG (en el caso en que solo se trabajó con EuRLPO) presentó valores negativos, mientras que a partir del empleo de PEG y a medida que aumentó el peso molecular del mismo el potencial zeta

promedio de las partículas de GB fue aumentando. Es posible que el PEG esté influenciando la carga superficial de la partícula, ubicándose probablemente en la superficie externa de la misma.

Se han encontrado en la bibliografía trabajos previos en los que, empleando PEG en combinación con otros polímeros, el *PZ* fue pasando desde valores positivos a negativos²⁷.

3.4.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Luego del proceso de secado se empleó MEB para analizar la morfología y superficie de los nanosistemas obtenidos a partir de los dos métodos de agitación (magnética y homogeneizador). Las micrografías de las NPs se muestran en la Figura 3.4. Las imágenes se muestran con una ampliación de 20 kX, y en todos los casos, la barra representa un tamaño de 1µm.

Las NPs formuladas mediante agitación magnética presentaron una estructura cuasi esférica, con asociaciones en forma de ramificación. En general, el tamaño obtenido mediante esta técnica fue similar al determinado previamente en las NPs (ver Tabla 3.5) y no se detectaron partículas de mayor tamaño o diferente estructura.

Por el contrario, las NPs preparadas empleando homogeneizador mostraron una estructura cúbica con una superficie irregular y el tamaño fue ligeramente diferente al obtenido en el punto anterior.

En ningún caso se alcanzó a detectar la presencia de poros que podrían modificar la disolución de GB.

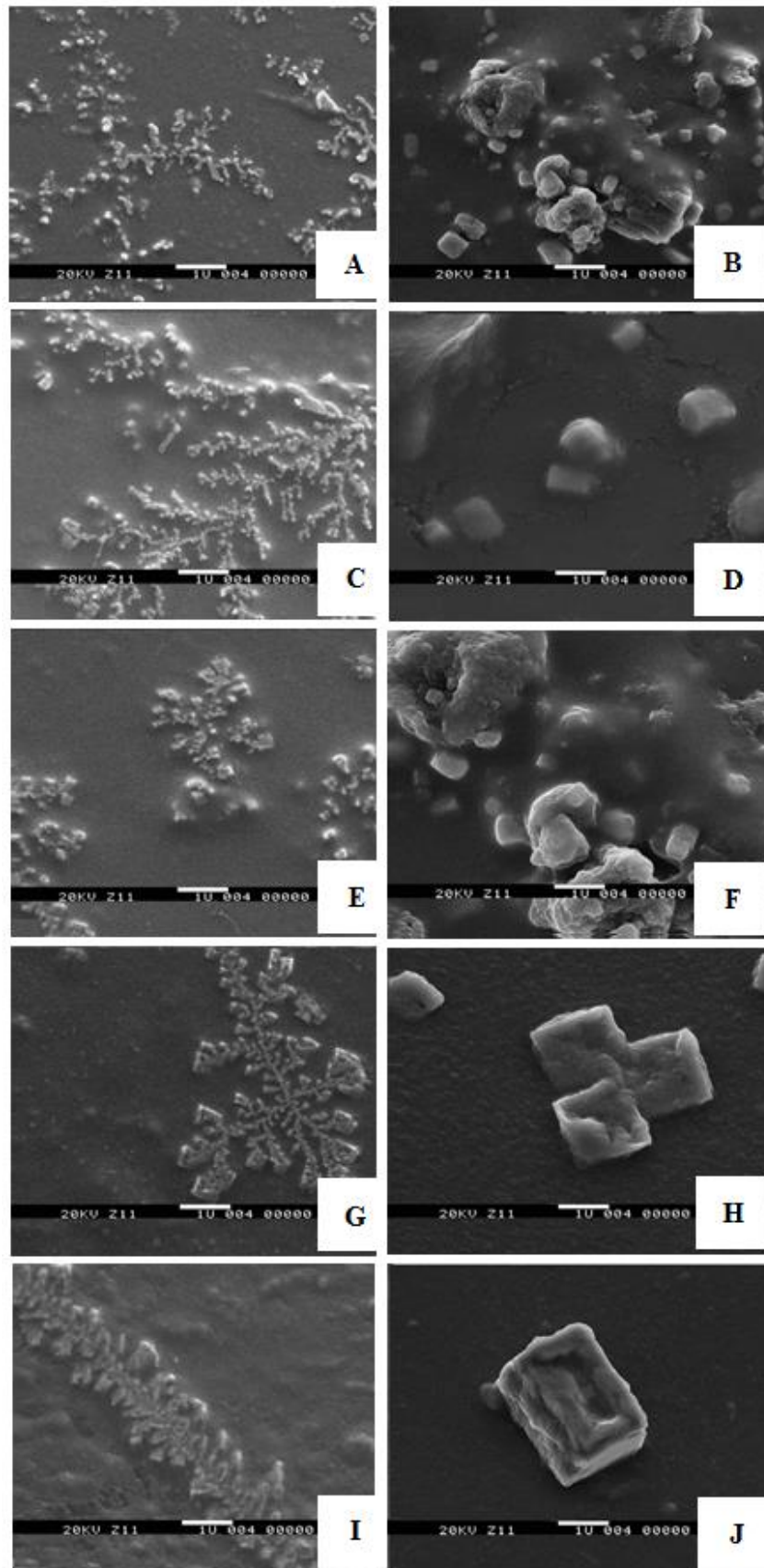


Figura 3.4. Micrografías de MEB de las NPs de GB y PEG de diferentes PM. 11M (A), 11H (B), 12M (C), 12H (D), 13M (E), 13H (F), 14M (G), 14H (H), 15M (I) y 15H (J).

3.4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido

En general, las interacciones entre un fármaco y distintos excipientes pueden influir en las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y el comportamiento del mismo. Una de las técnicas más empleadas para evaluar esas interacciones es la CDB, que por medio de un análisis térmico es posible observar los posibles estados de transición vítrea de un sólido frente al incremento de la temperatura.

También es posible evaluar potenciales transiciones de un estado cristalino a amorfo si se producen cambios en el punto de fusión del fármaco²⁸.

Tabla 3.6. Análisis térmico de los nanosistemas y sus componentes.

Muestras	ΔH_m (J/g)			C_m (%)
	EuRLPO	PEG	GB (Temperatura de fusión: 173 °C)	
GB sin tratar	-	-	138,87	100,00
Eu RLPO	22,85	-	-	-
PEG 400	-	154,30	-	-
PEG 1500	-	168,74	-	-
PEG 3000	-	175,84	-	-
PEG 6000	-	205,43	-	-
11M (PEG 6000)	5,36	54,88	102,48	73,80
11H (PEG 6000)	4,98	57,41	107,26	77,24
12M (PEG 3000)	4,94	52,93	84,83	61,09
12H (PEG 3000)	5,75	48,75	87,40	62,94
13M (PEG 1500)	2,28	22,96	55,01	39,61
13H (PEG 1500)	4,59	24,81	58,33	42,00
14M (PEG 400)	4,81	12,16	51,34	36,97
14H (PEG 400)	3,35	13,94	49,75	35,82
15M (sin PEG)	10,18	-	42,64	30,70
15H (sin PEG)	9,85	-	45,73	32,93

Los valores de entalpía de fusión (ΔH_m) de GB, las NPs y los componentes de las mismas se muestran en la Tabla 3.6. El análisis térmico del fármaco sin tratamiento indicó un pico endotérmico a 173 °C (con un valor de ΔH_m de 138,87 J/g). La entalpía para los nanosistemas mostró en todos los casos valores más bajos que los obtenidos para GB sin tratar. Sin embargo, cuando fueron empleadas NPs formuladas con PEG de alto PM, como PEG 6000 o 3000 (muestras 11 y 12) los valores de entalpía de fusión para GB fueron más altos y cercanos a lo obtenido con GB sin tratamiento.

Se calculó el 100 % de cristalinidad total (C_m) en base al valor obtenido para GB pura. El análisis térmico de las NPs exhibió resultados que se relacionan con el PM de los

PEGs. A medida que se incrementó el PM se observó un mayor grado de cristalinidad de GB.

Es posible postular, en este caso, que el estado cristalino del fármaco se podría estabilizar con mayor grado a medida que se incrementa el PM de los PEGs estudiados, sin embargo no hemos hallado datos en la literatura que avalen este postulado.

3.4.2.4. Análisis de difracción de rayos X

La Figura 3.5 se muestran los espectros de rayos X de GB y de las NPs de GB obtenidas con agitación magnética (3.5 A) y homogeneizador (3.5 B).

GB presentó dos picos intensos y característicos alrededor de 20 2θ , coincidentes con los datos de la bibliografía. Los mismos picos se observaron en los todos los nanosistemas estudiados, sin embargo la intensidad en estos casos es significativamente menor, lo que podría deberse a una reducción de la cristalinidad. Este efecto se ve más claramente en las NPs elaboradas con agitación magnética (Figura 3.5 A).

Estos resultados y los obtenidos a partir del análisis térmico sugieren que la cristalinidad del fármaco se ha reducido de manera parcial.

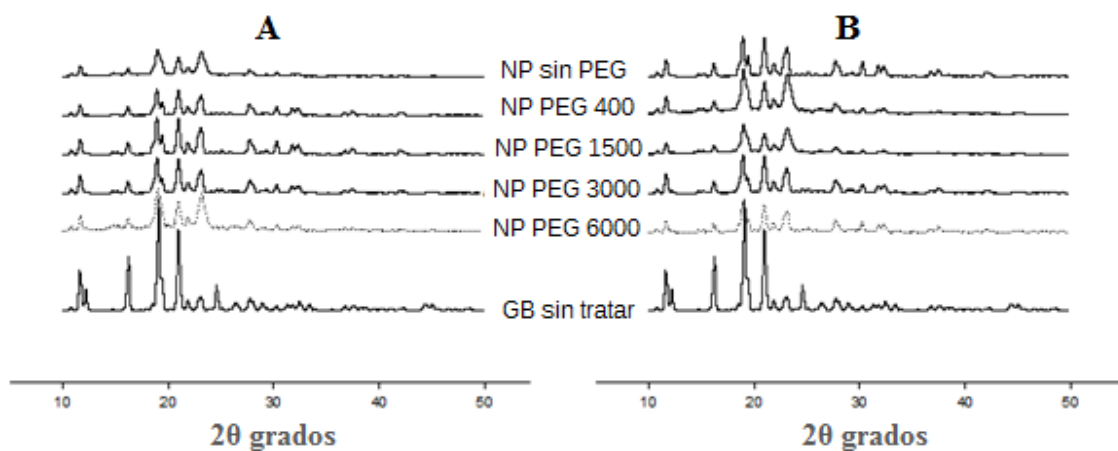


Figura 3.5. Patrones de DRX de GB sin tratar y las NPs elaboradas empleando agitación magnética (A) y homogeneizador (B).

3.4.2.5. Eficacia de encapsulación

Se calculó la $E_f E$ de GB para cada una de las NPs formuladas, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. E_fE de GB para las NPs.

Muestras	E_fE (%)
11 M	60,36±0,06
11 H	53,15±0,04
12 M	91,00±0,05
12H	90,79±0,08
13M	94,26±0,05
13H	93,77±0,02
14M	95,93±0,03
14H	90,40±0,05
15M	96,58±0,07
15H	93,81±0,05

Los porcentajes de GB encapsulada para la elaboración de NPs fue superior al 90%, excepto en los casos en que se empleó como estabilizante el PEG 6000 (11M y 11H), en el cual la eficacia fue significativamente inferior (M: 60% y H: 53%). Estos resultados pueden deberse a que el PEG se ubicaría en la interface entre el polímero y el fármaco y al aumentar el PM, aumenta también la capacidad para excluir a la GB, disminuyendo así la eficacia de entrapado, Peracchia y colaboradores han postulado previamente la influencia del PEG en la eficacia de encapsulación²⁹.

3.4.2.6. Solubilidad en agua

En la Tabla 3.8 puede observarse que en las NPs formuladas la S_{GB} fue superior a la solubilidad de la GB sin tratar (excepto en la muestra 15M, elaborada con GB y EuRLPO sin PEG con M, donde la solubilidad no fue superior).

Tabla 3.8. S_{GB} en las NPs.

Muestras	S_{GB} (µg/ml)
GB s/tratar	22,3±0,2
11M	47,5±0,1
11H	121,3±0,1
12M	45,5±0,1
12H	67,9±0,2
13M	38,5±0,1
13H	41,5±0,5
14M	30,0±0,1
14H	38,0±0,1
15M	22,0±0,1
15H	31,8±0,3

Se puede observar en la Tabla 3.8 que a medida que aumenta el peso molecular del PEG empleado también aumenta la solubilidad en agua de la GB. Estos resultados

estarían directamente relacionados con la disminución en el radio promedio de las NPs; es decir, a menor tamaño se observa una mayor solubilidad acuosa de GB.

Cabe destacar que el aumento en la solubilidad fue más significativo para aquellas muestras que fueron elaboradas por agitación a altas velocidades. Como se mostró previamente por MEB (ver Figura 3.4 en la Página 70), las NPs elaboradas empleando el homogeneizador mostraron una estructura superficial diferente a las formuladas por agitación magnética, lo que explicaría las diferencias significativas en la solubilidad acuosa de GB obtenidas para las NPs. Sin embargo no se han encontrado antecedentes en la bibliografía en dónde se evalúe el tipo de agitación durante la formulación con la solubilidad acuosa final del fármaco.

3.4.2.7. Ensayo de disolución de glibenclamida

En la Figura 3.6 se muestran los perfiles de disolución de GB desde las NPs y se compara con el obtenido para GB sin tratamiento previo. En la parte A se exhiben los perfiles de disolución de las NPs preparadas con agitación magnética y en la sección B los perfiles de las NPs preparadas con homogeneizador. Los resultados presentan un incremento de la velocidad de disolución de GB para todas las NPs respecto a la obtenida con GB sin tratar.

Tal como se puede observar, el incremento de la velocidad de disolución de GB se correlaciona directamente con el incremento del PM del PEG. Este fenómeno podría deberse a una mayor capacidad de humectación a medida que aumenta el PM, y por ende mayor disolución a los largo del tiempo. Por otro lado, las NPs formuladas con PEG de mayor peso molecular presentaron tamaños de partícula menores y, como se ha encontrado previamente, el tamaño es uno de los factores que afectan de manera más significativa la velocidad de disolución de diversos sistemas^{30,31}.

Además, en la Figura 3.6 se pueden diferenciar claramente dos mecanismos de disolución distintos.

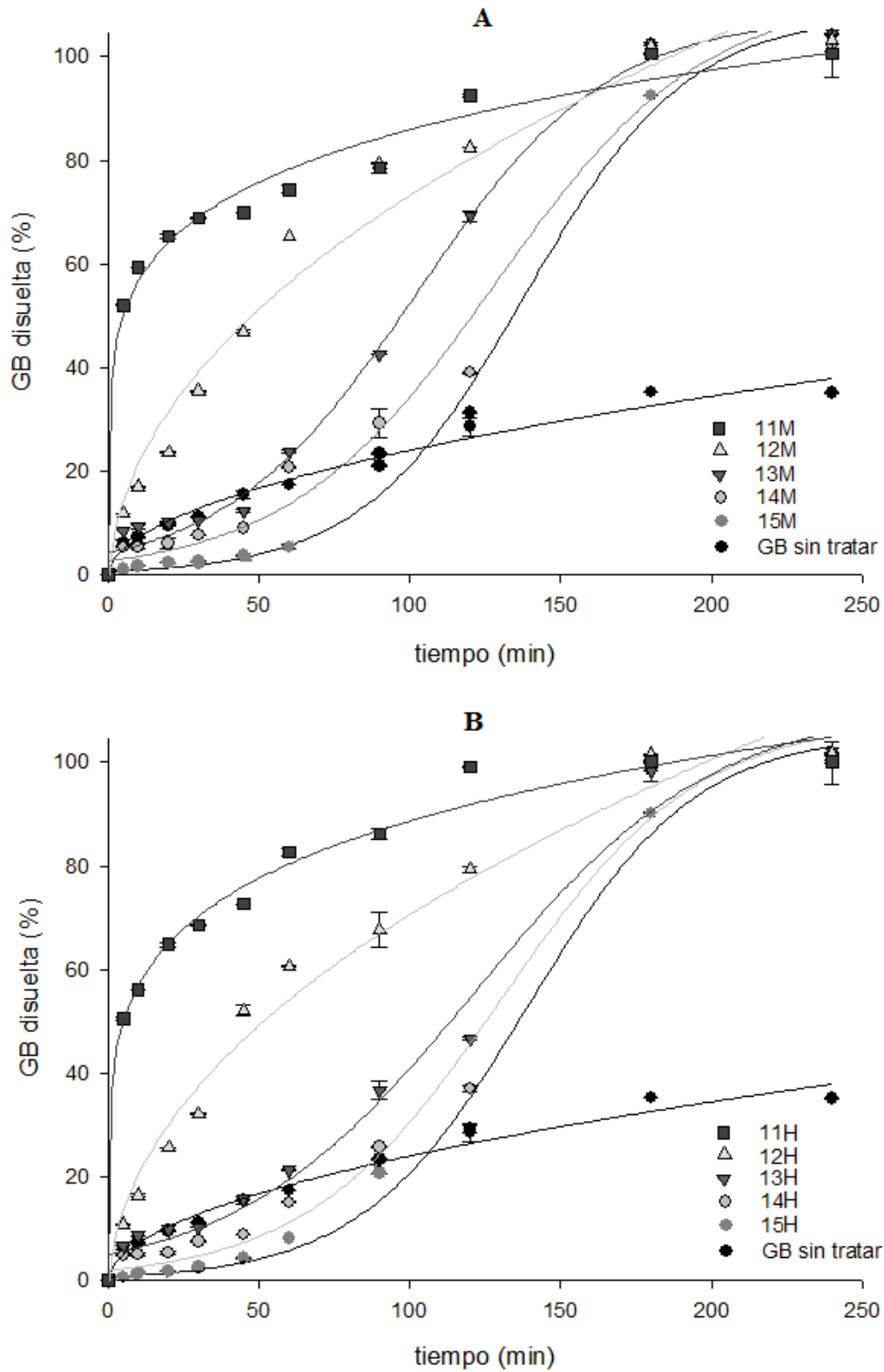


Figura 3.6. Perfiles de disolución de NPs de GB con PEGs de diferente PM, empleando agitación magnética (A) y homogeneizador (B) durante su formulación.

En el caso de las NPs 11 y 12, formuladas con PEGs 6000 y 3000 respectivamente, los perfiles de disolución son correlativos con el modelo de disolución de Korsmeyer-Peppas, el mismo intenta explicar mecanismos de disolución de fármacos donde se presenta una erosión y/o disolución de la matriz, siendo común en sistemas poliméricos³².

Por el contrario las NPs formuladas con PEGs de bajo PM (13 y 14) o sin PEG (15) mostraron perfiles de disolución de tipo sigmoideos que fueron ajustados al modelo de Weibull. Este modelo representa la disolución de fármacos a partir de estructuras de tipo matriciales, ya que en principio la disolución es lenta, y a un determinado tiempo (cuando la matriz logra romperse) aumenta repentinamente la disolución hasta llegar a su valor máximo. Esto podría indicar las NPs elaboradas sin PEG o con PEGs de bajo PM presentan una estructura matricial.

3.4.2.8. Ensayo de liberación de glibenclamida

En las Figuras 3.7 y 3.8 se exhiben los perfiles de liberación de GB desde las NPs y para GB sin tratar en dos soluciones de distinto pH: fluido gástrico simulado a pH 1,6 (Figura 3.7) y fluido intestinal simulado a pH 6,5 (Figura 3.8).

En las Figuras 3.7 (A y B) se exhiben los perfiles de liberación de GB para las NPs preparadas con agitación magnética (A) y homogeneizador (B) en el medio que simula fluido gástrico. Los perfiles de liberación de GB a partir de las NPs son ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas descrito previamente.

En la Figura 3.8 se observan los perfiles de disolución de GB a partir de las NPs, en medio simulado de fluido intestinal. Nuevamente se separa el análisis entre aquellas muestras formuladas mediante agitación magnética (A) y homogeneizador (B).

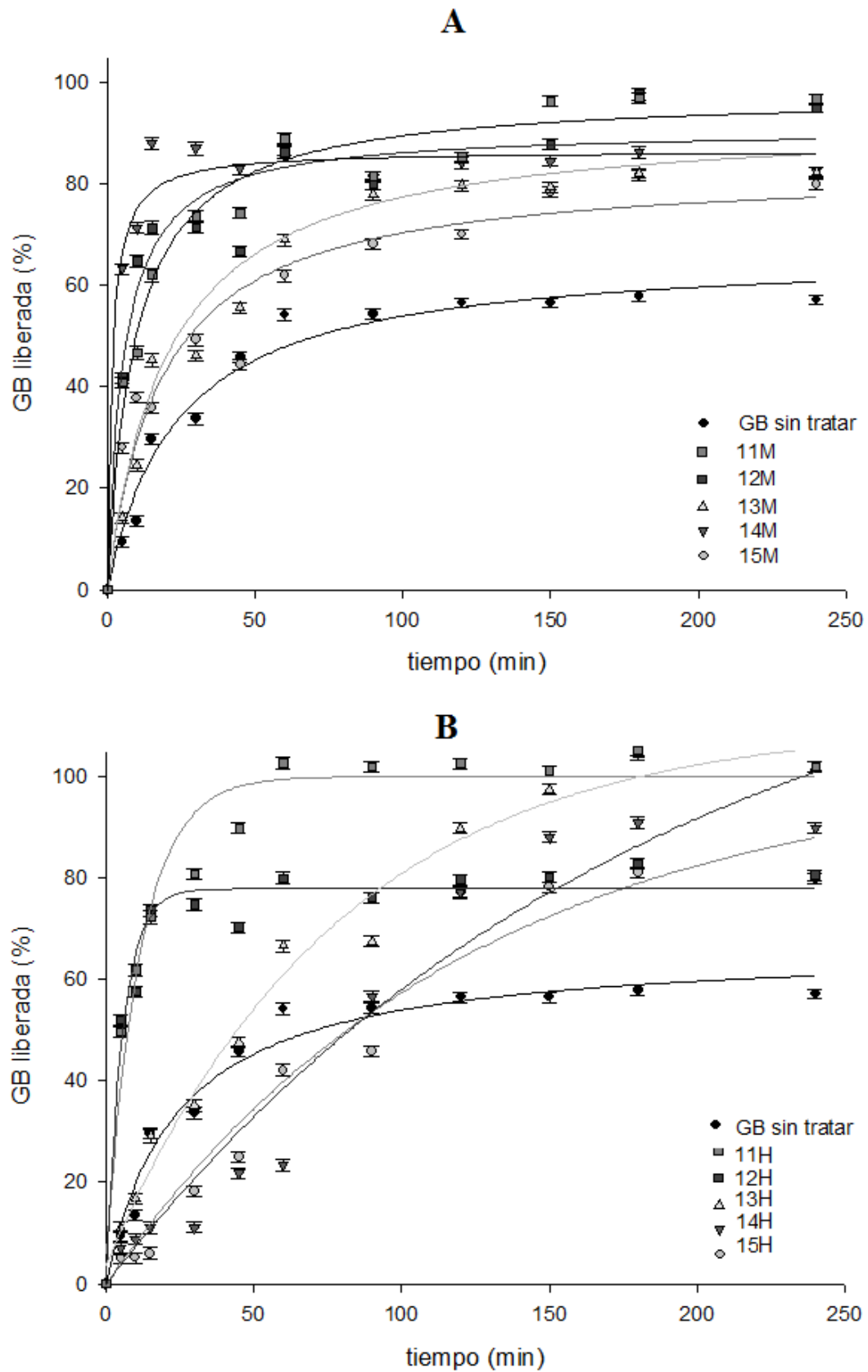


Figura 3.7. Perfiles de liberación, en medio simulado de fluido gástrico, de GB desde las NPs formuladas empleando agitación magnética (A) y homogeneizador (B) durante su formulación.

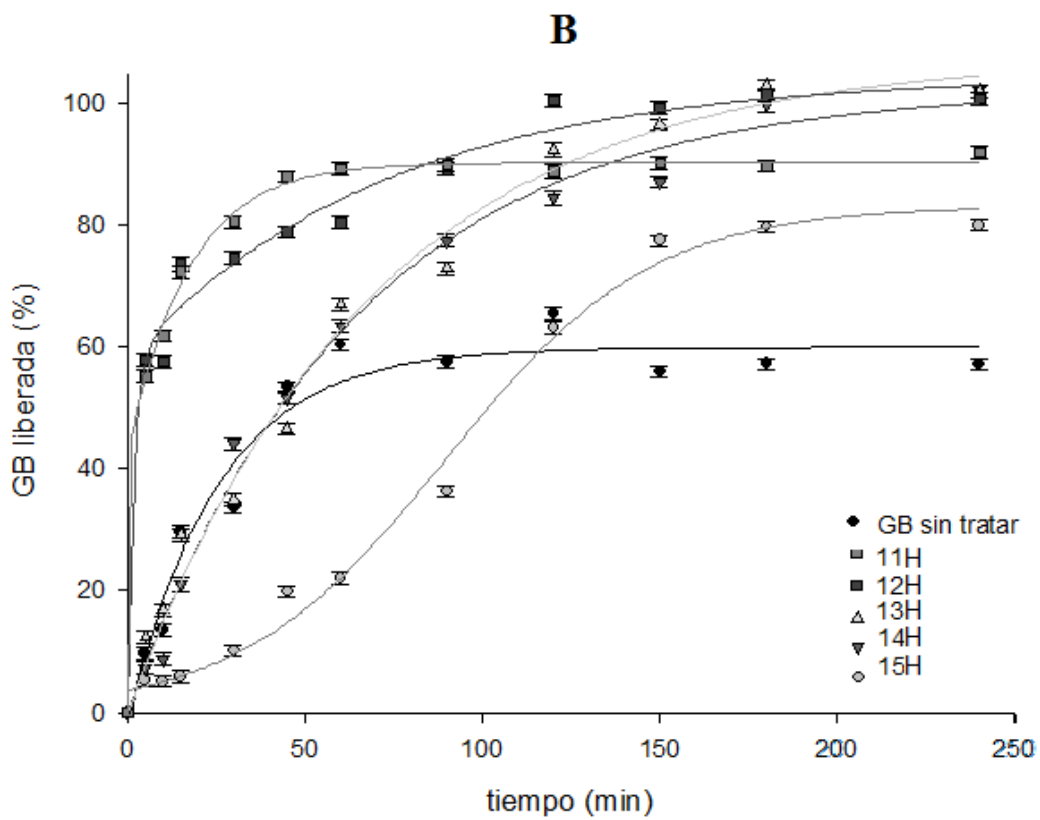
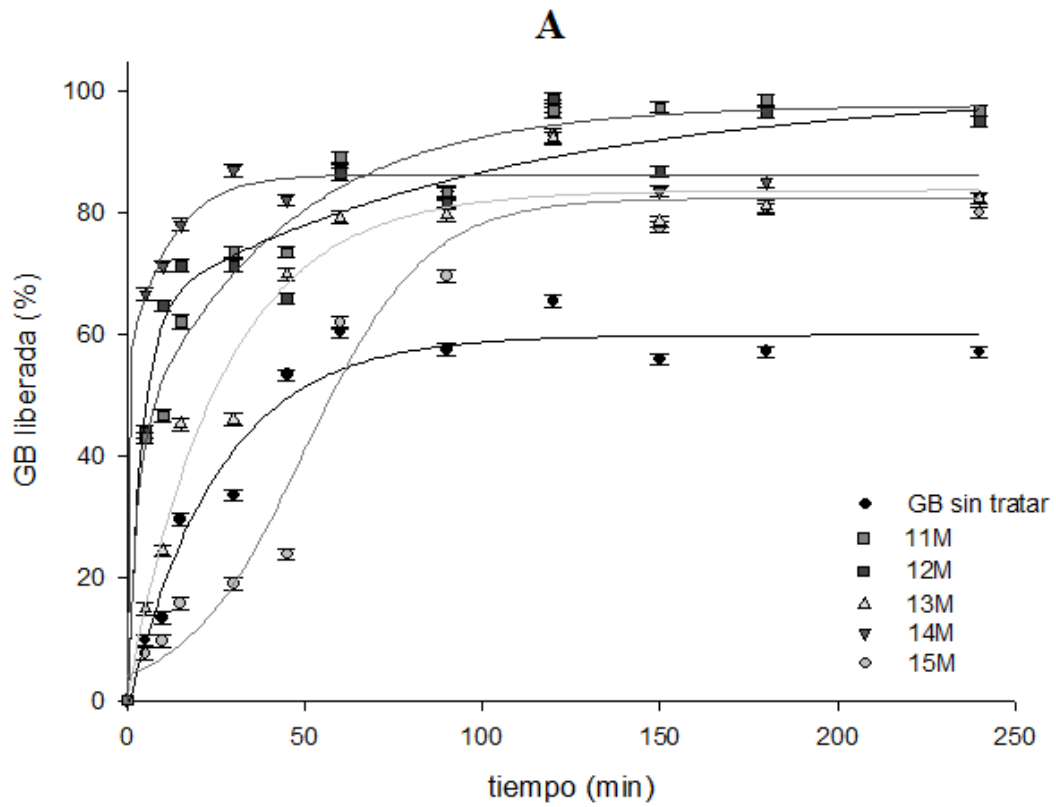


Figura 3.8. Perfiles de liberación, en medio simulado de fluido intestinal, de GB desde las NPs formuladas empleando agitación magnética (A) y homogeneizador (B) durante su formulación.

Los resultados obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos matemáticos para explicar el fenómeno de liberación de GB. En ambos casos (muestras formuladas por agitación magnética y por homogeneizador) se evidenció un modelo sigmoideal de liberación de GB para aquellos nanosistemas elaborados sin PEG. Para el resto de las muestras los perfiles de disolución de GB fueron correctamente ajustados a la cinética de Korsmeyer-Peppas.

Si se comparan los resultados obtenidos para las NPs respecto a la disolución y la liberación podemos observar una importante diferencia respecto al tipo de ajuste para los casos en los que se emplea PEG de bajo PM. La disolución ajusta a modelos de tipo sigmoideos, mientras que la liberación fue modelada empleando la ecuación de Korsmeyer-Peppas. Esto podría deberse al empleo de diferentes medios en la evaluación de cada uno de los fenómenos, pero el motivo principal podría ser el empleo de las bolsas de diálisis (durante el ensayo de liberación) que permitiría que el fármaco se libere de forma continua.

3.4.2.9. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus

Como se explicó en el Capítulo 2 punto 2.2.2.4.4, ciertas NPs pueden disminuir su movilidad en presencia de proteínas del mucus (mucinas), debido a que interaccionan con estas, reduciendo así la capacidad de dichos sistemas de atravesar la membrana celular.

En base a ello, y en una primer instancia, se decidió evaluar el comportamiento de dos NPs comerciales, con diferentes capacidades de adhesión a mucinas: NPs control que no interaccionan con las proteínas del mucus (Figura 3.9 A) y NPs control que interaccionan fuertemente con mucinas (Figura 3.9 B). En ambos casos en la parte superior se observan los resultados del tamaño estimado en base a la movilidad de las NPs en ausencia de mucinas y en la parte inferior en presencia de las mismas.

En el caso de las NPs de la Figura 3.9 A se observa que el perfil de distribución de tamaño no se ve modificado en presencia de las mucinas. Por el contrario cuando las NPs interaccionan con las proteínas del mucus, la movilidad de las NPs se ve disminuida, aparentando un mayor tamaño, como puede observarse en la Figura 3.9 B.

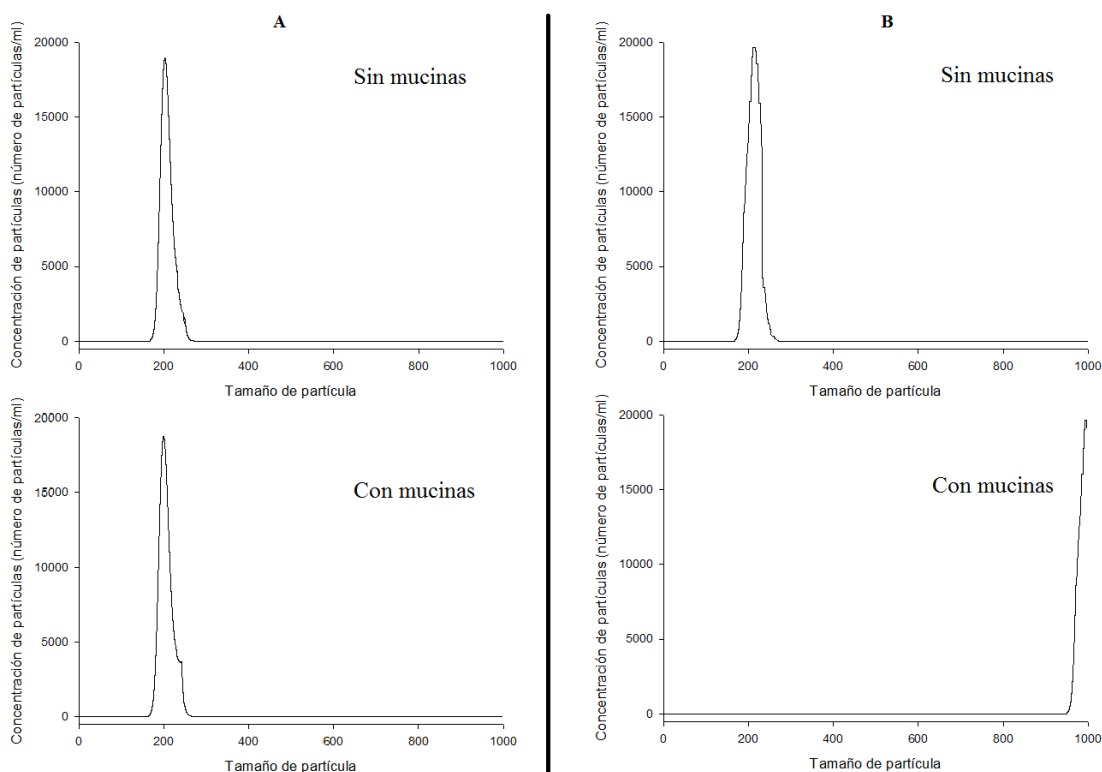


Figura 3.9. Distribución del $T_{particula}$ para dos NPs control de 200 nm en ausencia y presencia de proteínas del mucus.

Luego, para el análisis de las partículas desarrolladas se llevó a cabo el mismo análisis. Los resultados se observan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. $T_{particula}$ estimado por desplazamiento relativo y el efecto de mucinas sobre el mismo.

NP	Agitación magnética		Homogeneizador	
	Sin mucinas	Con mucinas	Sin mucinas	Con mucinas
11	150±50	184±40	189±30	204±50
12	201±40	220±20	190±30	230±20
13	214±20	209±30	266±10	259±30
14	283±30	292±10	301±30	317±20
15	328±20	382±20	496±20	504±30

Como puede verse en la Tabla 3.9 los tamaños obtenidos para las NPs en ausencia de mucinas mediante esta técnica no varía significativamente de los obtenidos por dispersión de luz dinámica (ver Tabla 3.5, Página 67).

Respecto a la interacción con mucinas, las NPs elaboradas con PEG de bajo peso molecular como PEG 1500 y PEG 400 o sin PEG (muestras 13, 14 y 15 respectivamente) no mostraron cambios significativos en el tamaño relativo obtenido, lo que podría indicar una interacción nula con las proteínas del mucus. Esto puede deberse principalmente a la carga que presentan dichas partículas (ver valores de PZ en Tabla

3.5), ya que presentan carga negativa (al igual que las mucinas) o carga positiva baja, no permitiendo así interacciones electrostáticas fuertes entre sí.

Por otro lado aquellas NPs formuladas con PEG de peso molecular alto mostraron ciertas diferencias entre su tamaño relativo antes y después de ponerse en contacto con mucinas. Si bien los cambios fueron poco significativos, se observa una tendencia al aumento de la desviación estándar de los valores de tamaño obtenidos, pudiendo indicar que algunas NPs se encuentran interaccionando con las proteínas. En este sentido es importante destacar que las NPs mencionadas presentaron valores de *PZ* (ver Tabla 3.5) positivos y algo más elevados que el resto de los nanosistemas estudiados.

3.4.2.10. Viabilidad celular

Para evaluar la presencia de un potencial efecto tóxico de las NPs sobre las células, se realizó el ensayo MTT (ver Capítulo 2, sección 2.2.2.4.6) en células Caco-2 en proliferación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, después de 24 y 48 horas de incubación de las células con las NPs, la viabilidad celular fue similar a la de las células control (aquellas no tratadas con NPs) a altas concentraciones de NPs (2 mg/ml), lo que sugiere la ausencia de daño celular, en tales condiciones.

Los resultados se pueden ver en la Figura 3.10.

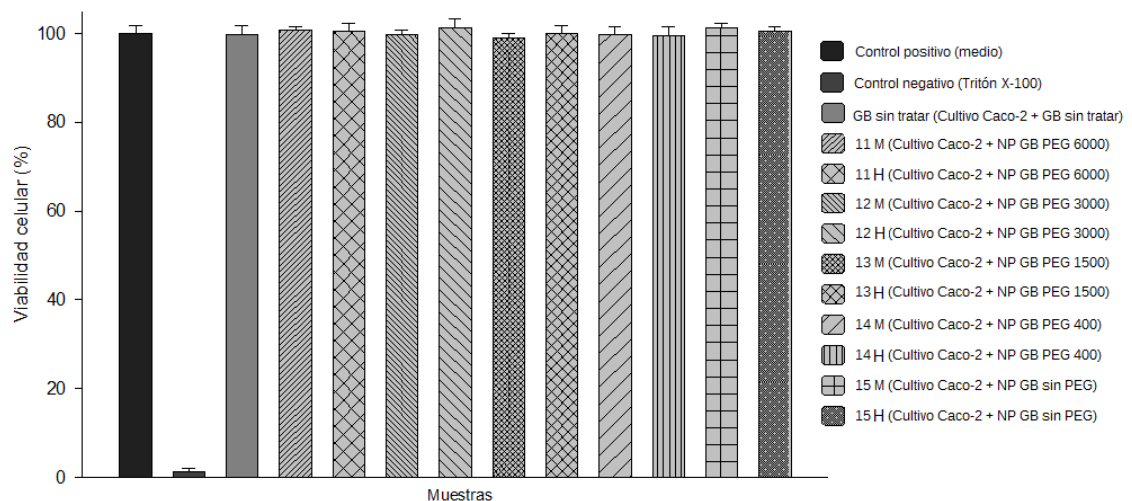


Figura 3.10. Sobrevida celular de cultivos de células Caco-2 en presencia de las NPs.

3.4.2.11. Ensayos de transporte

3.4.2.11.1. Control de resistencia epitelial transmembrana

Los cultivos de células Caco-2, en las condiciones estudiadas, mostraron altos valores de TEER luego de solo 5 días posteriores a ser sembradas en los Transwells®. Los valores TEER se estabilizaron después del día 8 en un valor cercano a $1400 \Omega \text{ cm}^2$, lo que indica que la barrera epitelial se encuentra en óptimas condiciones.

Estudios anteriores sugirieron la formación de uniones estrechas funcionales pocos días después de la siembra de células en membranas Transwells®^{33,34}, en este caso el cultivo de Caco-2 observó propiedades bioeléctricas equivalentes a las que se habían descrito.

Se evaluaron los sistemas formulados con agitación magética (Figura 3.11 A) y con homogeneizador (Figura 3.11 B). También se compararon con los controles del medio celular y con el fármaco de partida.

Tal como se puede observar, los valores TEER no se alteran significativamente durante la prueba de transporte, lo que indica el mantenimiento de la integridad de la membrana de las células Caco-2.

Para las muestras elaboradas por agitación magnética y en la 3.11 B para homogeneizador, además en ambos casos se presentan los controles llevados a cabo con el cultivo celular y el medio o GB sin tratar.

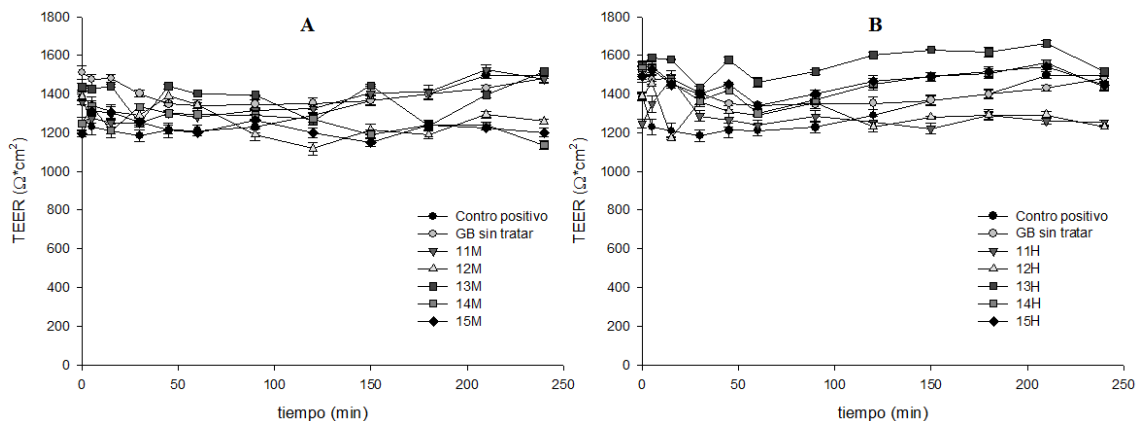


Figura 3.11. Evolución de los valores de TEER para cultivos de células Caco-2 durante el tratamiento con GB sin tratar, las NPs y medio de cultivo (control positivo).

3.4.2.11.2. Control de la permeabilidad de glibenclamida

La membrana celular es una barrera selectiva que permite la penetración de moléculas pequeñas como nutrientes, factores de crecimiento y anticuerpos.

En esta parte del trabajo se estudió el transporte de GB desde el compartimiento apical al basolateral pasando por una monocapa celular de Caco-2. Para ello se calculó la permeabilidad aparente de GB (ver Capítulo 2, Página 41) a partir de GB sin tratar y a partir de las NPs formuladas, los resultados se muestran en la Figura 3.12.

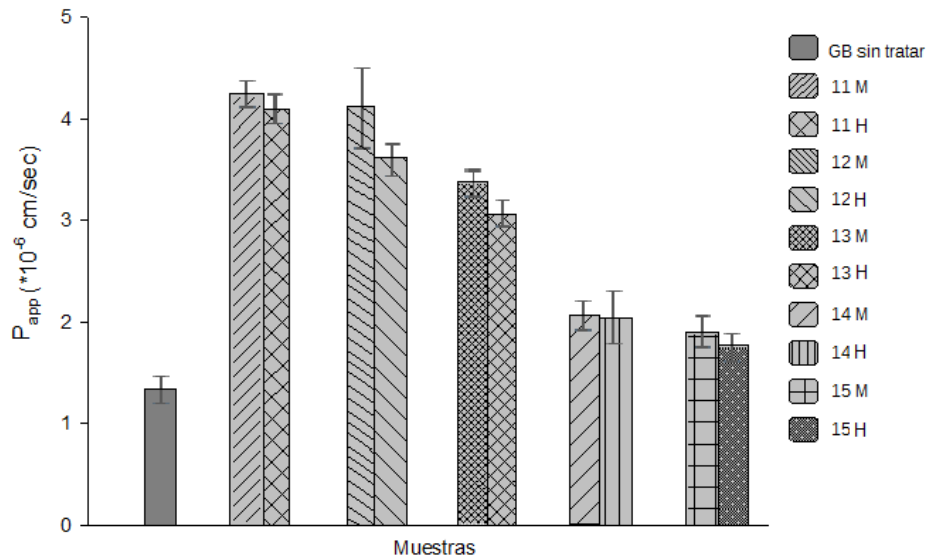


Figura 3.12. P_{app} de GB sin tratar y las NPs de GB y PEG a través de una monocapa de células Caco-2.

Los resultados muestran que la permeabilidad aparente de GB aumenta significativamente al emplear cualquiera de las NPs formuladas. Sin embargo, el aumento de la P_{app} fue más importante para aquellas NPs elaboradas con PEGs de mayor peso molecular. Esto podría deberse al menor tamaño de las NPs formuladas en dichas condiciones, que les permitiría atravesar la membrana celular de forma más efectiva.

En adición, cuando PEGs de alto PM fueron empleados, la velocidad de liberación mostró ser mayor, por lo tanto, una vez atravesada la membrana celular, las NPs tendrán una gran capacidad de liberar el fármaco.

3.4.3. Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con Eudragit, polietilenglicol 6000 y poloxámeros

3.4.3.1. Fase de *screening*

El DOE es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental de forma que con el mínimo número de pruebas se consiga obtener información útil para llegar a conclusiones que permitan

optimizar la configuración de un proceso o producto. En consecuencia, durante la primera etapa de este trabajo se llevó a cabo un diseño de Plackett-Burman para estudiar los factores que podrían afectar a las propiedades de las NPs.

Cada uno de los factores (cantidades de P-188, P-407, EuRLPO y PEG 6000, y el tipo de agitación empleado) fue evaluado a dos niveles (el máximo y el mínimo propuestos para la elaboración de NPs). La evaluación consistió en el análisis de los distintos factores sobre las respuestas (rendimiento, eficacia de entrapado, tamaño de partícula y solubilidad), se realizaron 12 experimentos independientes, y con estos resultados se llevó a cabo un ensayo de análisis de varianza (ANOVA), cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.

	R (%)	E_fE (%)	$T_{partícula}$ (nm)	S_{GB} ($\mu\text{g/ml}$)
Modelo	0,0001	0,0009	0,0013	<0,0001
P-188 (mg)	<0,0001	0,0086	0,0009	<0,0001
P-407 (mg)	0,0110	0,0060	0,0009	<0,0001
EuRLPO (mg)	0,1775	0,0002	0,9920	<0,0001
PEG 6000 (mg)	0,0141	0,0070	08968	<0,0001
Agitación	0,7152	0,6279	0,0042	0,9012

En la Tabla 3.10 puede observarse que para todas las respuestas estudiadas se logró modelar su comportamiento de manera significativa. Sobre el R los factores significativos fueron: la cantidad de P-188, de P-407 y de PEG 6000; esto estaría indicando que la cantidad del polímero EuRLPO no afectaría significativamente el R obtenido.

Se encontró que la E_fE se ve afectada significativamente por las cantidades de los excipientes usados. Estos factores estarían alterando la capacidad de que GB forme parte de las NPs, es decir que los componentes y sus cantidades influyen significativamente durante el proceso de nucleación en el que se forma la NP.

Los factores que tendrían un efecto significativo sobre el $T_{partícula}$ son el tipo de agitación y las cantidades de los poloxámeros usadas.

Finalmente la S_{GB} , estaría siendo influenciada significativamente por las cantidades de los componentes usados, resultados que coinciden con los encontrados en la bibliografía³⁵.

A partir de los resultados obtenidos en la fase de *screening* podemos afirmar que el modelo fue significativo en las 4 respuestas ensayadas: R , E_fE , $T_{partícula}$ y S_{GB} . Por otro lado, todos los factores estudiados resultaron significativos para al menos una de

las respuestas ensayadas. Esta información fue empleada para la fase de optimización final.

3.4.3.2. Fase de optimización

Para la optimización se llevó a cabo un diseño de superficie de respuesta de tipo Central Compuesto, con la información obtenida previamente en el *screening*.

Para el proceso de optimización se buscó formular un sistema nanoparticulado de GB con un elevado R , alta E_fE , bajo $T_{partícula}$ y que aumentara al máximo la solubilidad acuosa relativa de GB.

Para el diseño Central Compuesto se llevaron a cabo 42 experimentos, con repeticiones del punto central. Para esto, se formaron combinaciones de los factores seleccionados: cantidad de P-188 y P-407 (desde 0 a 536 mg), cantidad de EuRLPO (de 0 a 268 mg) y cantidad de PEG 6000 (de 0 a 200 mg), variando el tipo de agitación empleado (magnética y homogeneización).

Luego de eliminar los posibles *outliers*, las respuestas obtenidas fueron ajustadas a modelos polinomiales, los resultados de los ensayos ANOVA para la optimización de las respuestas arrojan buenos indicadores estadísticos, la falta de ajuste en todos los casos fue no significativa, siendo el modelo significativo y r^2 ajustado similar al r^2 predicho, esto se muestra en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas estudiadas.

	R (%)	E_fE (%)	$T_{partícula}$ (nm)	Solubilidad ($\mu\text{g/ml}$)
Modelo	<0,0001 Cuadrático	<0,0001 Cuadrático	<0,0001 Cuadrático	<0,0001 Lineal
P-188 (mg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
P-407 (mg)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
EuPLPO (mg)	<0,0001	<0,0001	0,4786	<0,0001
PEG 6000 (mg)	<0,0001	<0,0001	0,2010	<0,0001
Agitación	0,0503	0,6196	0,1081	0,6883
Falta de ajuste	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
r^2 ajustado	0,9999	0,9956	0,9990	0,9928
r^2 predicho	0,9995	0,9845	0,9975	0,9909

Los resultados del análisis arrojaron que el modelo lineal es apropiado para explicar el comportamiento de la S_{GB} al modificar los factores que se estudian en este trabajo. Mientras que el resto de las respuestas (R , E_fE y $T_{partícula}$) son explicadas a través de modelos cuadráticos.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 3.11 podemos concluir que el rendimiento es fuertemente dependiente de las cantidades de poloxámeros, PEG 6000 y EuRLPO usadas, además parece estar levemente influenciado por el tipo de agitación empleado. Por otro lado, la E_fE mostró una importante dependencia por las cantidades de poloxámeros, de PEG 6000 y de EuRLPO. El $T_{particula}$ mostró ser dependiente de las cantidades de P-188 y P-407 empleadas en las NPs, estos resultados eran de esperarse debido a los estabilizantes tienen como función definir el tamaño de las partículas en los sistemas al impedir o disminuir el efecto de agregado o de aglomeración.

Por último la S_{GB} estaría siendo afectada de manera significativa por las cantidades de P-188, P-407, PEG 6000 y EuRLPO.

Tabla 3.12. Restricciones de la optimización para la formulación de NPs de GB.

Factor/Respuesta	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
P-188 (mg)	En el rango	0	400	3
P-407 (mg)	En el rango	0	400	3
EuPLPO (mg)	En el rango	0	200	3
PEG 6000 (mg)	En el rango	0	200	3
Agitación	En el rango	Magnética	Homogeneizador	3
R (%)	Máxima	1,87	92,40	5
E_fE (%)	En el rango	94,53	99,43	3
$T_{particula}$ (nm)	Mínima	56	255	2
S_{GB} (µg/ml)	Máxima	23,79	157,81	5

En la Tabla 3.12 se observan las condiciones en las que se llevó a cabo la optimización para la elaboración de las NPs de GB. Para todos los factores estudiados se permiten valores que estén en el rango en el cual se trabajó.

Se muestra también la importancia relativa de las respuestas para la fase de optimización. Con respecto al R y la S_{GB} se pone como objetivo maximizarlas con una importancia relativa de 5. En el caso de la E_fE los valores obtenidos en todos los sistemas fueron elevados, siendo el límite inferior mayor al 94 %, valor aceptable para este trabajo, por lo que se permitió que esta respuesta pueda variar en el rango de los resultados obtenidos. Por otro lado, como se dijo previamente, un menor $T_{particula}$ podría modificar las propiedades biofarmacéuticas de un fármaco, por lo que se buscó minimizar esa respuesta, con una importancia relativa baja, de 2, ya que el objetivo principal fue aumentar significativamente la S_{GB} en los sistemas.

Una vez llevado a cabo el procedimiento de optimización, con los resultados obtenidos se construyó la D en función de los factores que influyen en las respuestas. Se

seleccionaron las mejores condiciones de elaboración para las NPs de GB según lo obtenido del diseño. En las condiciones mencionadas, la D alcanza un valor máximo de 0,83, el que fue considerado adecuado para los propósitos de este trabajo.

A continuación, en las Figuras 3.13 a 3.19 se muestran las variaciones de las respuestas en función de los factores que fueron significativos sobre cada una de ellas. En las gráficas se representan solo los factores de tipo numéricos.

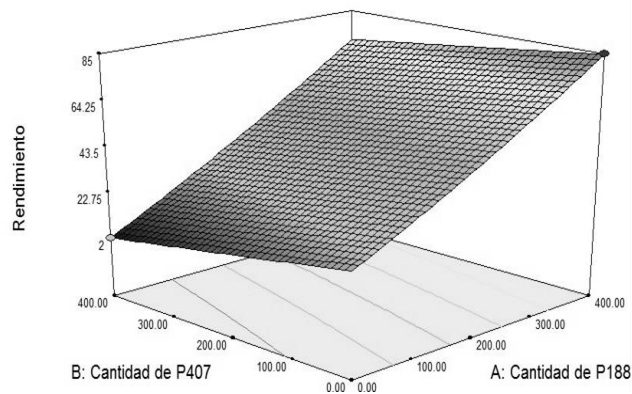


Figura 3.13. Variación del R en función de las cantidades de P-188 y P-407.

En la Figura 3.13 se representó el R en función de dos de los tres factores que influyen en su comportamiento, cantidades de P-407 y P-188. Mientras que en la Figura 3.14 se observa la influencia sobre el rendimiento del tercer factor que fue considerado significativo, la cantidad de PEG 6000, y la cantidad de EuRLPO. Esto puede corroborarse en la gráfica presentada, ya que el polímero no estaría afectando el rendimiento total del proceso, más notable aún si lo comparamos con el efecto de modificar la cantidad de PEG 6000. En este caso puede observarse que al aumentar la cantidad de éste polímero aumenta el rendimiento obtenido.

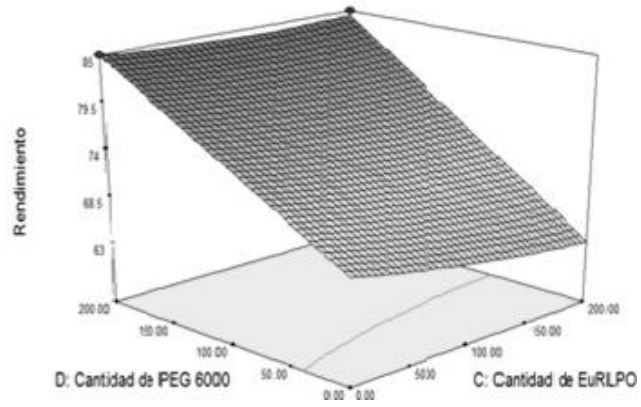


Figura 3.14. Variación del R en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.

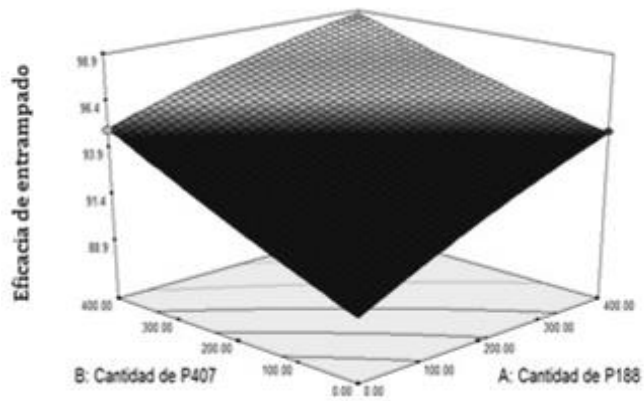


Figura 3.15. Variación de la E_fE en función de las cantidades de P-188 y P-407.

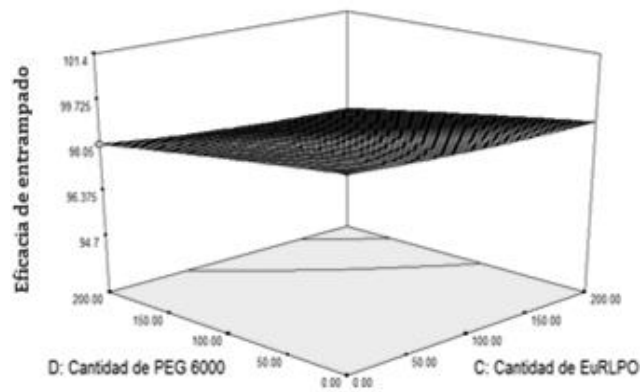


Figura 3.16. Variación de la E_fE en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.

En las figuras anteriores se observa la variación de la eficacia de atrapado en función de los factores que influenciaron significativamente esta respuesta, las cantidades de P-188 y P407 (Figura 3.15) y las cantidades de EuRLPO y PEG 6000 (Figura 3.16).

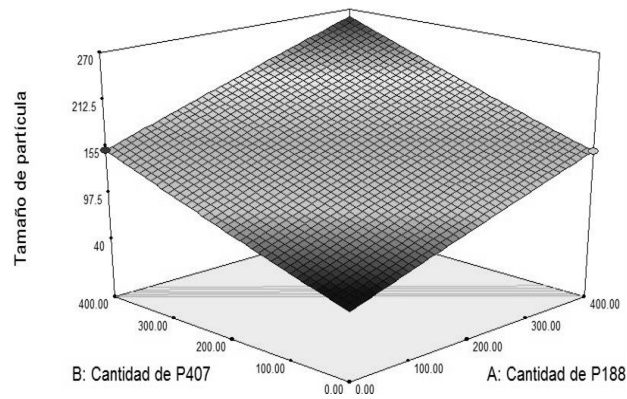


Figura 3.17. Variación del $T_{partícula}$ en función de las cantidades de P-188 y P-407.

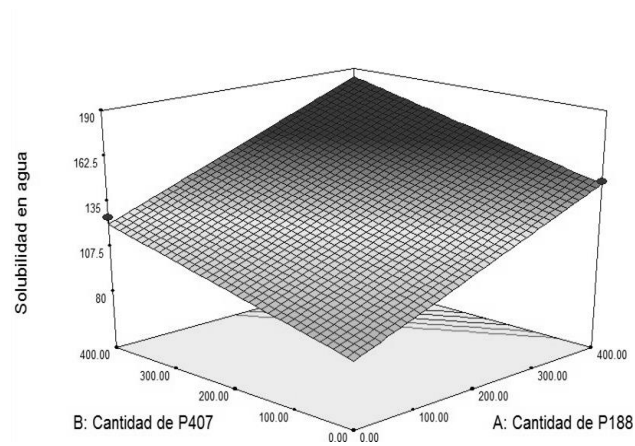


Figura 3.18. Variación en la S_{GB} en los sistemas en función de las cantidades de P-188 y P-407.

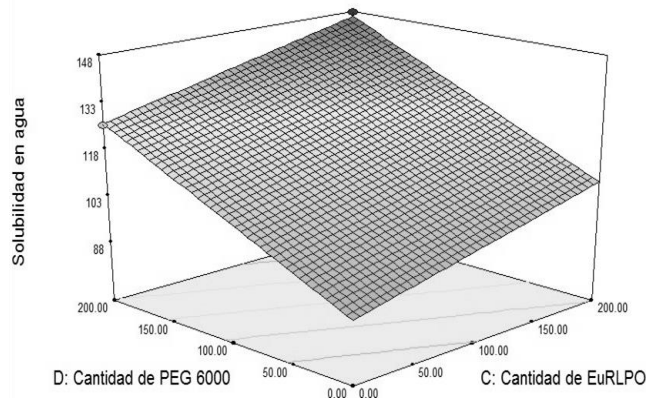


Figura 3.19. Variación de la S_{GB} en los sistemas en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.

El $T_{particula}$, cuya variación puede observarse en la Figura 3.17, se vio altamente influenciado por las cantidades de P-188 y P-407 como se explicó previamente.

En las Figuras 3.18 y 3.19 se muestra la influencia de los factores cantidades de P-188 y P-407 y cantidades de EuRLPO y PEG 6000 respectivamente, sobre la S_{GB} en agua. Los cuatro factores mencionados mostraron tener efectos significativos sobre dicha respuesta.

En las Figuras 3.20 a 3.25 se observan los gráficos de la deseabilidad en función de cada una de las respuestas optimizadas.

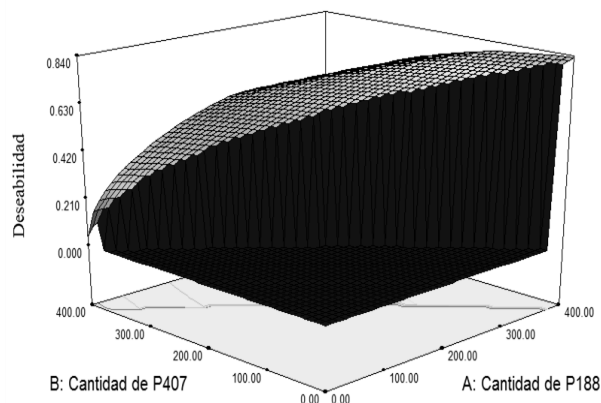


Figura 3.20. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y P-407.

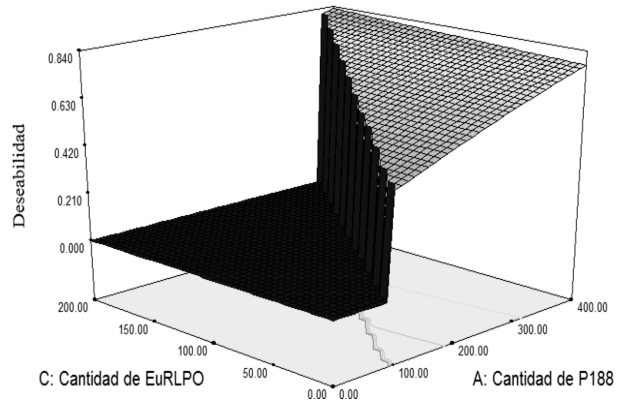


Figura 3.21. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y EuRLPO.

En todos los casos los gráficos de deseabilidad en función de los factores estudiados mostraron ser complejos y dependientes de todas las condiciones ensayadas.

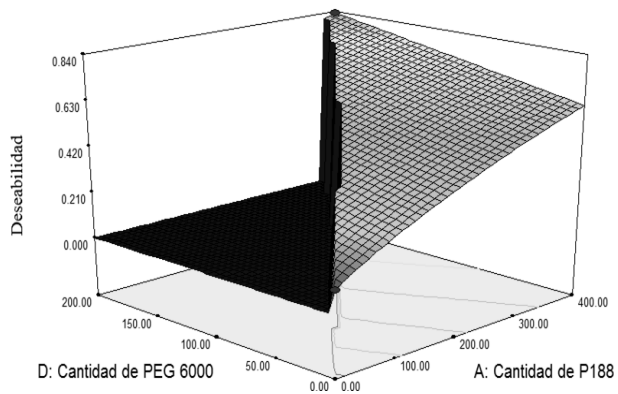


Figura 3.22. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-188 y PEG 6000.

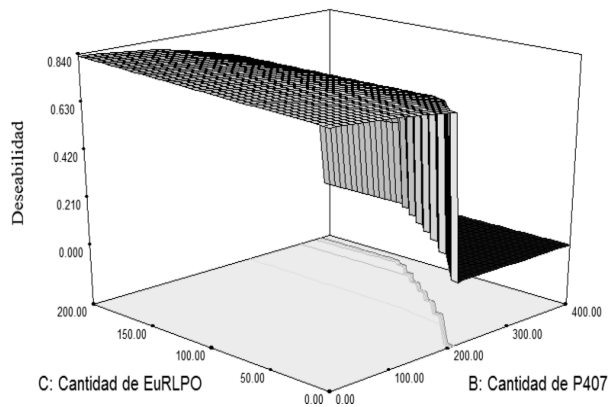


Figura 3.23. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de P-407 y EuRLPO.

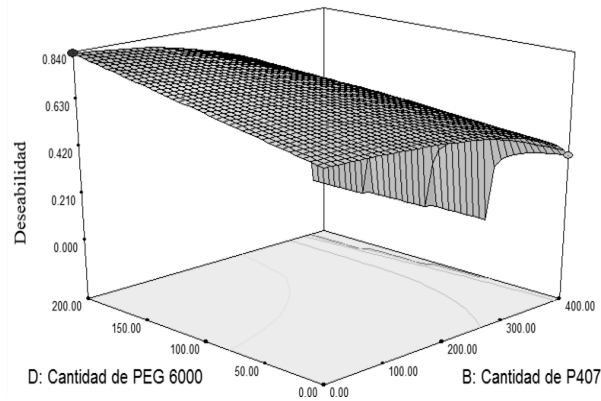


Figura 3.24. Gráfico de deseabilidad en función de P-407 y PEG 6000.

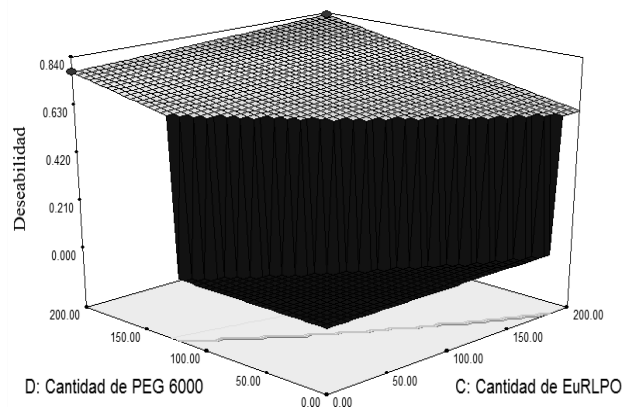


Figura 3.25. Gráfico de deseabilidad en función de las cantidades de EuRLPO y PEG 6000.

3.4.3.3. Verificación de la optimización

En la Tabla 3.13 se muestran los protocolos para la elaboración del ensayo optimizado y el que contiene las condiciones reales en que se pudo trabajar.

Tabla 3.13. Protocolos y resultados del experimento de optimización (valores teóricos y experimentales).

Factores	P-188 (mg)	P-407 (mg)	EuRLPO (mg)	PEG 6000 (mg)	Agitación
Teórica	399,90	7,95	200,00	200,00	M
Experimental	400,00	8,00	200,00	200,00	M
Respuestas	R (%)		$E_f E$ (%)	$T_{particula}$ (nm)	S_{GB} ($\mu\text{g/ml}$)
Teórica	84,41		94,83	153	147,28
Experimental	84,33		94,50	155	151,32

En todos los casos los resultados fueron satisfactoriamente predichos, no observándose diferencias significativas entre lo esperado y lo obtenido. Por otro lado, los resultados

demuestran que el proceso de optimización fue exitoso, ya que los parámetros obtenidos son los deseables. En el caso de la solubilidad de GB en el sistema optimizado se observa un incremento de casi 7 veces la solubilidad acuosa evidenciada para GB sin tratar (de 22 $\mu\text{g/ml}$).

3.4.3.4. Evaluación de la disolución de glibenclamida en el sistema optimizado

Se buscó determinar si la velocidad de disolución de GB efectivamente se veía afectada por las respuestas optimizadas previamente (Figura 3.26). Para ello, se compararon los perfiles de disolución de GB sin tratar y la optimizada.

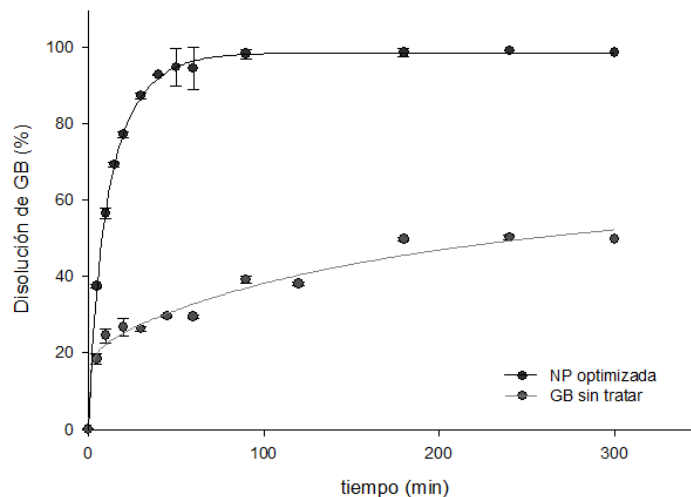


Figura 3.26. Perfiles de disolución de GB desde las NPs optimizadas y desde GB sin tratar.

Puede observarse que la velocidad de disolución de GB en el sistema nanoparticulado es ampliamente superior a la de GB sin tratar. Esto se debería a que, efectivamente, las respuestas optimizadas para la formulación de estas NPs tienen una influencia significativa en la velocidad de disolución de GB, principalmente el menor tamaño de partícula y una mayor eficiencia en la solubilidad que fueron importantes para obtener un nanosistema con mejores capacidades disolutivas.

Finalmente en la Tabla 3.14 se muestran las cantidades de GB disuelta (Q_{GB}) a 3 diferentes tiempos (10, 30 y 60 minutos) desde las NPs optimizadas y GB sin tratar.

Tabla 3.14. Cantidades de GB disuelta a diferentes tiempos para las NPs optimizadas y GB sin tratamiento.

Q_{GB} (%)	GB sin tratar	NP optimizada
Q_{GB} 10	24,5	56,5
Q_{GB} 30	26,3	87,2
Q_{GB} 60	29,5	94,5

Se demuestra que la velocidad de disolución de GB para las NPs fue superior a la de GB sin tratamiento. Obteniéndose a los 10 minutos de comenzado el ensayo el doble de la capacidad disolutiva.

3.5. Conclusiones

Se formularon partículas de GB con poloxámeros, EuRLPO y PEGs que permitieron un aumento en la solubilidad acuosa de dicho fármaco de hasta más de 6 veces. Los resultados indican que la velocidad de disolución de GB en todas las muestras fue superior a la del fármaco sin tratar. Tanto las metodologías de agitación como el tipo de secado aplicados en este estudio dieron como resultado la obtención de NPs con diferentes características fisicoquímicas. A partir de todas las muestras que fueron secadas por liofilizado se obtuvieron partículas submicrómicas, con tamaños desde 49 a 394 nm, mientras que cuando el secado fue llevado a cabo en estufa las partículas exhibieron un tamaño micrométrico.

En relación a la influencia del PM del PEG, los resultados demostraron que el incremento del mismo dio como resultado la formación de NPs de menor tamaño, y que a su vez aumentaba la S_{GB} . Además, el incremento del PM del PEG se correlacionó de manera directamente proporcional con la velocidad de disolución de las correspondientes NPs.

Se demostró que las NPs desarrolladas no interaccionaban significativamente con las proteínas del mucus y los ensayos de viabilidad celular indicaron que las NPs no presentaron citotoxicidad frente a células Caco-2.

Finalmente se llevó a cabo un diseño de experimentos para optimizar la formulación de NPs. En base a los resultados obtenidos previamente se llevaron a cabo dos etapas (*screening* y la fase de optimización). Las NPs optimizadas de GB fueron preparadas empleando 400 mg de P-188, 8 mg de P-407, 200 mg de EuRLPO e igual cantidad de PEG 6000, y M. Este sistema, que brindó la mayor deseabilidad ($D=0,83$), alcanzó un R del 84 %, la E_fE fue 94 %, el $T_{partícula}$ de 155 nm y una S_{GB} 151,32 $\mu\text{g/ml}$.

3.6. Bibliografía

- (1) Melander, A.; Lebovitz, H. E.; Faber, O. K. “Sulfonylureas. Why, Which, and How?” *Diabetes Care* **1990**, *13 Suppl 3*, 18–25.
- (2) Groop, L.; Groop, P. H.; Stenman, S.; Saloranta, C.; Tötterman, K. J.; Fyhrquist, F.; Melander, A. “Comparison of Pharmacokinetics, Metabolic Effects and Mechanisms of Action of Glyburide and Glipizide during Long-Term Treatment.” *Diabetes Care* **1987**, *10* (6), 671–678.
- (3) Groop, L. C. “Sulfonylureas in NIDDM.” *Diabetes Care* **1992**, *15* (6), 737–754.
- (4) Groop, L. C.; Barzilai, N.; Ratheiser, K.; Luzi, L.; Wåhlin-Boll, E.; Melander, A.; DeFronzo, R. A. “Dose-Dependent Effects of Glyburide on Insulin Secretion and Glucose Uptake in Humans.” *Diabetes Care* **1991**, *14* (8), 724–727.
- (5) Seedher, N.; Kanojia, M. “Co-Solvent Solubilization of Some Poorly-Soluble Antidiabetic Drugs Solubilization Antidiabetic Drugs.” *Pharm. Dev. Technol.* **2009**, *14* (2), 185–192.
- (6) Arnqvist, H. J.; Karlberg, B. E.; Melander, A. “Pharmacokinetics and Effects of Glibenclamida in Two Formulations, HB 419 and HB 420, in Type 2 Diabetes.” *Ann Clin Res* **1983**, *15 Suppl 3*, 21–25.
- (7) Chalk, J. B.; Patterson, M.; Smith, M. T.; Eadie, M. J. “Correlations between in Vitro Dissolution, in Vivo Bioavailability and Hypoglycaemic Effect of Oral Glibenclamida.” *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1986**, *31* (2), 177–182.
- (8) Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B. “Classification of Orally Administered Drugs on the World Health Organization Model List of Essential Medicines According to the Biopharmaceutics Classification System.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58* (2), 265–278.
- (9) Orué, A.; Pérez C, J. L.; Fuentes, J.; Odremán, I.; Serrano-Martín, X.; Mendoza-León, A. “Leishmania Sp .: Efecto de La Glibenclamida , Un Bloqueador de Canales de K + ATP , Sobre El Ciclo de Vida in Vitro .” *Salus* **2007**, *11* (1), 32–36.

- (10) Serrano-Martín, X.; Payares, G.; Mendoza-León, A. “Glibenclamide, a Blocker of K⁺(ATP) Channels, Shows Antileishmanial Activity in Experimental Murine Cutaneous Leishmaniasis.” *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (12), 4214–4216.
- (11) Yang, J.; Han, S.; Zheng, H.; Dong, H.; Liu, J. “Preparation and Application of Micro/Nanoparticles Based on Natural Polysaccharides.” *Carbohydr. Polym.* **2015**, *123*, 53–66.
- (12) Swain, S.; Sahu, P. K.; Beg, S.; Babu, S. M. “Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions.” *Curr. Drug Deliv.* **2016**, *13* (8), 1290–1302.
- (13) Martínez Rivas, C. J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q. A.; Galindo Rodríguez, S. A.; Román, R. Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. “Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery.” *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (1), 66–81.
- (14) Zook, J. M.; MacCuspie, R. I.; Locascio, L. E.; Halter, M. D.; Elliott, J. T. “Stable Nanoparticle Aggregates/Agglomerates of Different Sizes and the Effect of Their Size on Hemolytic Cytotoxicity.” *Nanotoxicology* **2011**, *5* (4), 517–530.
- (15) Liu, X.; Huang, N.; Li, H.; Jin, Q.; Ji, J. “Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells.” *Langmuir* **2013**, *29* (29), 9138–9148.
- (16) Gandhi, A.; Jana, S.; Sen, K. K. “In-Vitro Release of Acyclovir Loaded Eudragit RLPO® Nanoparticles for Sustained Drug Delivery.” *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *67*, 478–482.
- (17) Overbeek, J. T. G. “Interparticle Forces in Colloid Science.” *Powder Technol.* **1984**, *37* (1), 195–208.
- (18) Fawcett, W. R. “Interfacial Electrochemistry. Theory, Experiment, and Application.” *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (25), 6139–6139.
- (19) Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid*; **2000**; Vol. 53.

- (20) Vold, M. J. “Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications.” *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, 88 (2), 608.
- (21) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. “Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations.” *Electrophoresis* **2004**, 25 (2), 187–202.
- (22) Yadav, S. K.; Mishra, S.; Mishra, B. “Eudragit-Based Nanosuspension of Poorly Water-Soluble Drug: Formulation and In Vitro–In Vivo Evaluation.” *AAPS PharmSciTech* **2012**, 13 (4), 1031–1044.
- (23) Basak, R.; Bandyopadhyay, R. “Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and PH.” *Langmuir* **2013**, 29 (13), 4350–4356.
- (24) Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G. G.; Cooper, E. R. “Nanosizing: A Formulation Approach for Poorly-Water-Soluble Compounds.” *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 18 (2), 113–120.
- (25) Dora, C. P.; Singh, S. K.; Kumar, S.; Datusalia, A. K.; Deep, A. “Development and Characterization of Nanoparticles of Glibenclamide by Solvent Displacement Method.” *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2010**, 67 (3), 283–290.
- (26) Lao, L. L.; Peppas, N. A.; Boey, F. Y. C.; Venkatraman, S. S. “Modeling of Drug Release from Bulk-Degrading Polymers.” *Int. J. Pharm.* **2011**, 418 (1), 28–41.
- (27) Moretton, M. A.; Glisoni, R. J.; Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. “Molecular Implications in the Nanoencapsulation of the Anti-Tuberculosis Drug Rifampicin within Flower-like Polymeric Micelles.” *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, 79 (2), 467–479.
- (28) Seremeta, K. P.; Höcht, C.; Taira, C.; Cortez Tornello, P. R.; Abraham, G. A.; Sosnik, A. “Didanosine-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Microparticles by a Coaxial Electrohydrodynamic Atomization (CEHDA) Technique.” *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3 (1), 102–111.

- (29) Peracchia, M. T.; Gref, R.; Minamitake, Y.; Domb, A.; Lotan, N.; Langer, R. “PEG-Coated Nanospheres from Amphiphilic Diblock and Multiblock Copolymers: Investigation of Their Drug Encapsulation and Release Characteristics.” *J. Control. Release* **1997**, *46* (3), 223–231.
- (30) Leonardi, D.; Lamas, M. C.; Olivieri, A. C. “Multiresponse Optimization of the Properties of Albendazole-Chitosan Microparticles.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48* (3), 802–807.
- (31) Leonardi, D.; Salomón, C. J.; Lamas, M. C.; Olivieri, A. C. “Development of Novel Formulations for Chagas’ Disease: Optimization of Benznidazole Chitosan Microparticles Based on Artificial Neural Networks.” *Int. J. Pharm.* **2009**, *367* (1–2), 140–147.
- (32) Aragon. “Estudio Cinético De Liberación in Vitro En Un Biomaterial.” *Rev. Iberoamer Polim* **2009**, *10* (2), 119–130.
- (33) Ehrhardt, C.; Collnot, E.-M.; Baldes, C.; Becker, U.; Laue, M.; Kim, K.-J.; Lehr, C.-M. “Towards an in Vitro Model of Cystic Fibrosis Small Airway Epithelium: Characterisation of the Human Bronchial Epithelial Cell Line CFBE41o-.” *Cell Tissue Res.* **2006**, *323* (3), 405–415.
- (34) Murgia, X.; Yasar, H.; Carvalho-Wodarz, C.; Loretz, B.; Gordon, S.; Schwarzkopf, K.; Schaefer, U.; Lehr, C.-M. M. “Modelling the Bronchial Barrier in Pulmonary Drug Delivery: A Human Bronchial Epithelial Cell Line Supplemented with Human Tracheal Mucus.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *118*, 79–88.
- (35) Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. “Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles.” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2006**, *2* (1), 8–21.

Capítulo 4.

Benznidazol

4.1. Índice

4.1.	Índice	101
4.2.	Introducción	102
4.3.	Formulaciones.....	104
4.4.	Resultados.....	105
4.4.1.	Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con poloxámero	105
4.4.1.1.	Fase de <i>screening</i>	105
4.4.1.2.	Fase de optimización.....	106
4.4.1.3.	Verificación de la optimización	113
4.4.1.4.	Ensayo de disolución de las nanopartículas optimizadas.....	114
4.4.1.5.	Caracterización de las nanopartículas optimizadas	114
4.4.2.	Nanocápsulas lipídicas	128
4.4.2.1.	Nanocápsulas lipídicas convencionales	128
4.4.2.2.	Diseño y optimización durante la elaboración de nanocápsulas lipídicas de benznidazol.....	142
4.5.	Conclusiones.....	155
4.6.	Referencias.....	157

4.2. Introducción

La enfermedad de Chagas es la principal infección parasitaria endémica en Argentina, con casi 2,5 millones de personas infectadas y más de 7 millones en riesgo de infección. En América del Norte, particularmente en el sur de los Estados Unidos, se ha detectado en los últimos años un aumento de esta enfermedad parasitaria, principalmente debido a la migración de la población infectada que vive en América Latina¹ como se mencionó en el Capítulo 1. A pesar de que la incidencia de esta enfermedad sigue siendo muy alta, por el momento, solo hay dos fármacos disponibles para su tratamiento: nifurtimox y BNZ².

El BNZ es el fármaco de elección en muchas regiones de América Latina y Europa, se recomienda ampliamente en la fase aguda de la enfermedad para cualquier paciente infectado. Según la OMS, la dosis oral de BNZ en adultos es de 5 a 7 mg/kg/día durante 60 días, y para niños (de hasta 12) es 10 mg/kg/día³. A pesar de que la mayoría de las infecciones se producen durante la infancia, hasta la fecha el único tratamiento disponible con BNZ se basa en tabletas de 50 y 100 mg, una forma de dosificación altamente inapropiada para los recién nacidos y los niños. En estos casos, los comprimidos generalmente se dividen o se fraccionan a mano, lo que puede resultar en una dosis inadecuada que aumenta el riesgo de efectos secundarios. Por lo descrito, el desarrollo de una alternativa segura y efectiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, particularmente para pacientes pediátricos, tendría un impacto tanto social como económico significativo ya que podría mejorar y ampliar el tratamiento a los recién nacidos y los bebés, y reducir la mortalidad vinculada a la infección.

El BNZ es muy poco soluble en solución acuosa (0,4 mg/ml) y debido a sus características lipofílicas su solubilidad se ve afectada negativamente en fluidos biológicos. En consecuencia, también se ven disminuida la absorción y posterior biodisponibilidad. En los últimos años se han desarrollado distintas alternativas tecnológicas para incrementar la solubilidad de BNZ, entre los que se pueden mencionar a las dispersiones sólidas, micropartículas y complejos con ciclodextrinas, entre otros⁴⁻⁷.

A pesar de la incesante innovación nanotecnológica dentro de las ciencias farmacéuticas, se han desarrollado escasas nanoformulaciones para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, entre las cuales podemos mencionar liposomas y NPs poliméricas^{8,9}. En particular,

una alternativa nanotecnológica que podría ser empleada para el transporte de BNZ son las NCLs. Estos sistemas recientemente fueron desarrollados para para encapsular paclitaxel, fármaco empleado para el tratamiento de cáncer, mediante un novedoso método de emulsificación a baja energía¹⁰. Estudios previos demostraron su capacidad para aumentar la biodisponibilidad oral de otros fármacos poco solubles¹¹, lo que puede explicarse debido a la mayor estabilidad de las partículas en el tracto gastrointestinal¹² y una mejora de la permeabilidad intestinal¹³.

4.3. Formulaciones

Se prepararon NPs de BNZ y poloxámero P-188, formuladas mediante un método de diseño con posterior optimización de experimentos, como se explica en el Capítulo 2, puntos 2.2.2.1.3 (Página 30) y 2.2.2.7.2 (Página 47). Estos sistemas fueron caracterizados *in-vitro* y además se comprobó la eficacia antiparasitaria *in-vivo* en ratones.

Por otro lado fueron formuladas NCLs de BNZ mediante el método de inversión de fase, variando las cantidades de los mismos componentes con el objetivo de obtener sistemas con características diferentes. Esto se detalla en el Capítulo 2, punto 2.2.2.1.5.1 (Página 32). Finalmente se optimizó la cantidad y el tipo de aceite empleado para el desarrollo de NCLs, como se muestra en el Capítulo 2, punto 2.2.2.7.3 (Página 48).

Todas las NCLs fueron caracterizadas *in-vitro*.

4.4. Resultados

4.4.1. Diseño y optimización de nanopartículas formuladas con poloxámero

4.4.1.1. Fase de *screening*

Las propiedades de una NP dependen de muchos factores, es por esto que se llevó a cabo un diseño de Plackett-Burman para estimar los principales factores que durante la formulación de este tipo de NPs tienen incidencia significativa en las propiedades de dichos sistemas. Cada uno de los factores fue evaluado a dos niveles (el máximo y el mínimo propuestos para la elaboración de NPs). La evaluación consistió en el análisis de los distintos factores (concentraciones empleadas de BNZ y P-188, porcentaje de fase orgánica, velocidad de agitación y temperatura de cristalización) sobre las respuestas (R , BNZ_{NC} , $T_{particula}$ y S_{BNZ}), y se llevó a cabo una prueba ANOVA sobre los datos experimentales, los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas ensayadas.

	R (%)	BNZ_{NC} (%)	$T_{particula}$ (nm)	S_{BNZ} (mg/ml)
Modelo	0,8078	<0,0001	<0,0001	<0,0001
BNZ (mg/ml)	0,8743	<0,0001	<0,0001	0,6185
P-188 (mg/ml)	0,3589	0,5921	<0,0001	<0,0001
Fase orgánica (%)	0,8457	0,2273	0,4018	<0,0001
Velocidad agitación (rpm)	0,3448	0,4127	0,4710	0,7181
Temperatura de cristalización (°C)	0,7760	0,5148	0,5239	0,4383

En la Tabla 4.1 se puede observar que para la respuesta R no se encontraron, entre los ensayados, factores significativos. Esto podría deberse a que sobre este pueden estar actuando de manera significativa otros factores no tenidos en cuenta en este primer estudio. Por otro lado es importante destacar que se observa cierta dependencia del R por la cantidad de poloxámero empleado, por lo tanto la formulación de un modelo que describa su comportamiento sería sumamente complejo, lo que podría ser otro motivo por el cual no se hallaron factores significativos, ya que los valores de p fueron ampliamente superiores a 0,05 (nivel de significación seleccionado para el análisis) en todos los casos.

En la segunda respuesta: BNZ_{NC} se encontró una dependencia significativa por la concentración de BNZ ($p < 0,0001$); esto estaría indicando que la cantidad de BNZ de

partida esta influyendo sobre su capacidad de nanocrystalizar, es decir, de formar parte de las NPs.

Los factores que influyen de forma importante sobre el $T_{particula}$ fueron la concentración de BNZ y la concentración de estabilizante ($p < 0,0001$); ambas concentraciones estarían afectando de forma directa el $T_{particula}$ obtenido. Al aumentar la concentración de P-188 aumenta el $T_{particula}$ de los nanocristales obtenidos. Lo contrario sucede con la concentración de BNZ, al aumentar disminuye el $T_{particula}$, esto último puede deberse a la formación de un mayor número de núcleos de BNZ cuando se parte de soluciones de mayor concentración, lo que favorece a la obtención de partículas de menor tamaño.

Para la última respuesta estudiada: S_{GB} , también con una p menor a 0,0001 fueron significativos los factores concentración de P-188 y proporción de fase orgánica empleada.

A partir de los resultados obtenidos en la fase de *screening* podemos decir que el modelo fue significativo para 3 de las 5 respuestas ensayadas: BNZ_{NC} , $T_{particula}$ y S_{BNZ} , y los factores que se hallaron significativos sobre estas fueron: concentración de BNZ, concentración de P-188 y la proporción de fase orgánica.

Los factores que mostraron ser significativos para alguna de las respuestas fueron seleccionados para la fase de optimización posterior, y se optimizaron las tres respuestas que fueron influenciadas por al menos uno de los factores.

4.4.1.2. Fase de optimización

Para la optimización se llevó a cabo un diseño de superficie de respuesta Central Compuesto, con la información obtenida previamente en el *screening*.

Se optimizaron: BNZ_{NC} , $T_{particula}$ y S_{BNZ} en función de los factores: concentración de BNZ, concentración de P-188 y proporción de fase orgánica. Los experimentos realizados así como los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Diseño Central Compuesto construido para optimizar las respuestas.

Ensayos	Factores			Respuestas		
	BNZ (mg/ml)	P-188 (mg/ml)	Fase orgánica (%)	BNZ_{NC} (%)	$T_{particula}$ (nm)	S_{BNZ} (mg/ml)
1	15,50	27,50	14	77,76	159	1,90
2	6,00	5,00	20	35,74	250	2,56
3	25,00	50,00	20	97,46	68	2,50
4	25,00	5,00	20	98,73	63	2,51
5	15,50	27,50	14	76,25	158	1,87
6	15,50	65,34	14	76,58	160	1,82
7	25,00	5,00	8	99,55	64	1,20
8	25,00	50,00	8	99,07	67	1,19
9	6,00	50,00	8	36,25	255	1,14
10	6,00	5,00	8	35,97	252	1,13
11	15,50	27,50	24	77,03	156	3,00
12	15,50	27,50	4	78,89	160	0,68
13	6,00	50,00	20	36,44	257	2,51
14	15,50	0,00	14	78,23	150	1,80
15	26,20	27,50	14	99,96	55	1,81
16	15,50	27,50	14	78,53	158	1,82
17	15,50	27,50	14	77,97	159	1,80
18	15,50	27,50	14	78,06	157	1,85
19	5,00	27,50	14	32,06	260	1,85
20	15,50	27,50	14	78,80	156	1,79

Se llevó a cabo un diseño Central Compuesto, que constó de 20 experimentos, los que incluían 6 réplicas del punto central. Para los experimentos se generaron combinaciones de los factores seleccionados: concentración de BNZ (desde 5 a 26,2 mg/ml), concentración de estabilizante (de 0 a 0,0653 g/ml) y proporción de fase orgánica (de 4,9 a 30,1%). En la Tabla 4.2 se incluyen además los resultados obtenidos.

Todas las respuestas fueron ajustadas a patrones polinomiales, para encontrar los mejores modelos. Los resultados de los ensayos ANOVA para la optimización de las respuestas arrojan buenos indicadores estadísticos, la falta de ajuste fue no significativa, el modelo fue significativo y el r^2 ajustado mostró ser similar al r^2 predicho, como puede verse en la Tabla 4.3.

Por otro lado, los resultados del análisis arrojaron que el modelo lineal es apropiado para explicar el comportamiento del $T_{particula}$ y la S_{BNZ} al modificar los factores estudiados. Mientras que la respuesta BNZ_{NC} es explicada a través de un modelo cuadrático.

Tabla 4.3. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.

	$BNZ_{NC}(\%)$	$T_{partícula}$ (nm)	S_{BNZ} (mg/ml)
Modelo	<0,0001 Cuadrático	<0,0001 Lineal	<0,0001 Lineal
BNZ (mg/ml)	0,2416	<0,0001	0,9049
P-188 (mg/ml)	0,1662	0,0008	0,6710
Fase orgánica (%)	0,8918	0,4066	<0,0001
Falta de ajuste	No significativa	No significativa	No significativa
r^2 ajustado	0,9990	0,9991	0,9969
r^2 predicho	0,9983	0,9987	0,9961

Como se esperaba, el BNZ_{NC} fue dependiente del cuadrado de la concentración de BNZ en la fase orgánica (p al factor concentración de BNZ 0,001). El $T_{partícula}$ mostró ser dependiente de las concentraciones de BNZ y de P-188 con las que se prepararon las NPs. Por último la S_{BNZ} , según este modelo, fue afectada de manera significativa por la proporción de fase orgánica con que se trabajó, demostrando una fuerte dependencia entre la cantidad de agua empleada en la elaboración de las NPs y la S_{BNZ} resultante de las mismas. La relación entre la cantidad de agua empleada en la elaboración de NPs por cristalización controlada y la S_{BNZ} no fue reportada hasta el momento.

A continuación, en la Tabla 4.4, se exhiben las condiciones en las que se llevó a cabo la optimización. Para los factores concentración de BNZ y de estabilizante se aceptan valores que estén en el rango en el cual se trabajó, mientras que para el tercer factor, fase orgánica, se decidió maximizar su volumen para disminuir el tiempo de preparación de las partículas (mayor proporción de fase orgánica supone el empleo de menor cantidad de agua lo que acorta los tiempos durante la etapa de liofilizado). Todos los factores se optimizan con una importancia relativa de 3.

Tabla 4.4. Restricciones de la optimización para la formulación de NPs de BNZ.

Factor/Respuesta	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
BNZ (mg/ml)	En el rango	5	27	3
P-188 (mg/ml)	En el rango	0	282	3
Fase orgánica (%)	Máxima	0	30	3
BNZ_{NC} (%)	Máxima	32	100	3
$T_{particula}$ (nm)	En el rango	55	260	3
S_{BNZ} (mg/ml)	Máxima	67,5	300	5

En la Tabla 4.4 también se muestra la importancia relativa de las respuestas para la fase de optimización. La cantidad de BNZ_{NC} que se desea es la máxima, con una importancia relativa de 3, para evitar el gasto en exceso del fármaco y maximizar la proporción del mismo en el sólido final. Dado que en todos los experimentos las partículas preparadas presentaban un tamaño dentro de los límites deseables, se permitió que el mismo se mantenga en el rango, también con una importancia relativa de 3. Por último se buscó maximizar la S_{BNZ} , con la más alta importancia relativa (5).

Después de que el procedimiento de optimización se llevó a cabo, se construyó la D en función de los factores que influyen en las respuestas estudiadas. Como se explicó previamente (ver Capítulo 1, Ecuación 1.1) la D consiste en una relación entre las respuestas evaluadas y los factores que fueron afectados por ellas, para conseguir las condiciones deseadas para la formulación de las NPs. Se seleccionaron las mejores condiciones de elaboración correspondientes a lo obtenido del diseño. La D en este punto alcanza un valor de 0,99, que fue considerado bueno para los propósitos de este trabajo.

En las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se muestran las variaciones de las respuestas en función de los factores que fueron significativos sobre cada una de ellas.

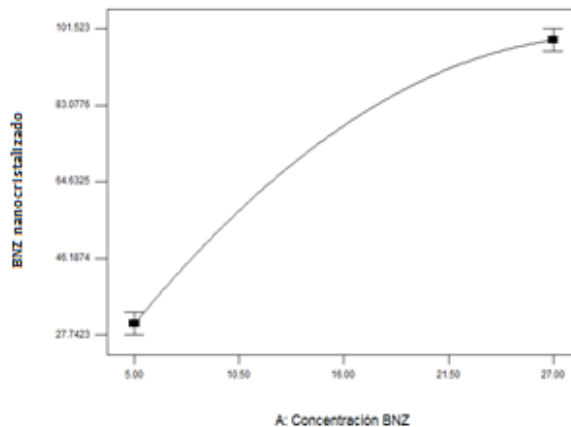


Figura 4.1. Variación del porcentaje de BNZ_{NC} en función de la concentración de BNZ.

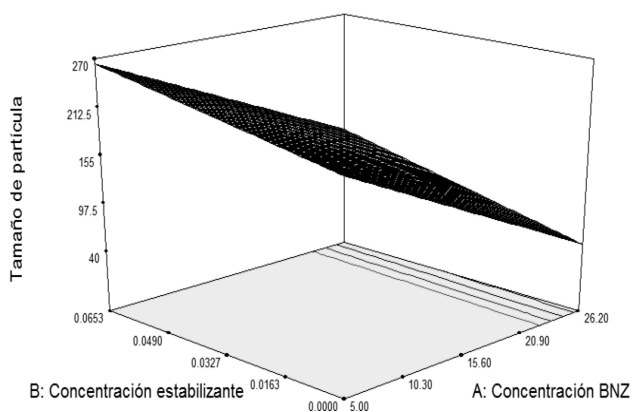


Figura 4.2. Variación del $T_{partícula}$ en función de las concentraciones de BNZ y P-188.

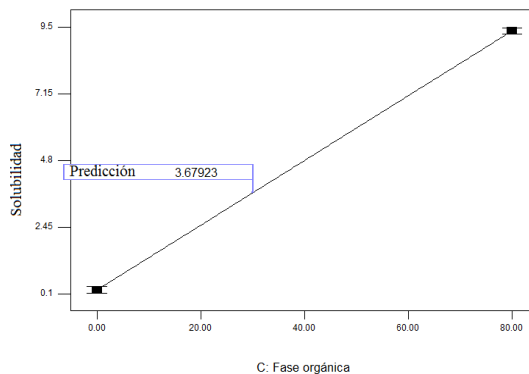


Figura 4.3. Variación de la S_{BNZ} en función de la proporción de fase orgánica.

En la Figura 4.1, podemos ver la influencia de la concentración de BNZ sobre el porcentaje de BNZ_{NC} , al aumentar la concentración de BNZ la respuesta mencionada tiene una tendencia a crecer, esto podría deberse a que la concentración máxima de BNZ empleada para la preparación de las NPs (si bien es muy cercana a la solubilidad máxima del fármaco en etanol) no llegó a saturar el sistema y permite una nanocristalización sostenida.

En la Figura 4.2 se muestra en un gráfico de tres dimensiones la relación entre el $T_{particula}$ y los factores concentración de BNZ y de estabilizante. En el mismo se observa que, como se demostró previamente el tamaño disminuye al disminuir la concentración del estabilizante, mientras que aumenta al aumentar la concentración de BNZ empleada.

Finalmente, en la Figura 4.3, se muestra la influencia de la proporción de fase orgánica que se empleó sobre la S_{BNZ} en los sistemas. Nuevamente podemos notar que la S_{BNZ} en los sistemas aumenta al aumentar la proporción de fase orgánica empleada para la preparación de las NPs.

En las Figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se observan los gráficos de la deseabilidad en función de las tres respuestas optimizadas.

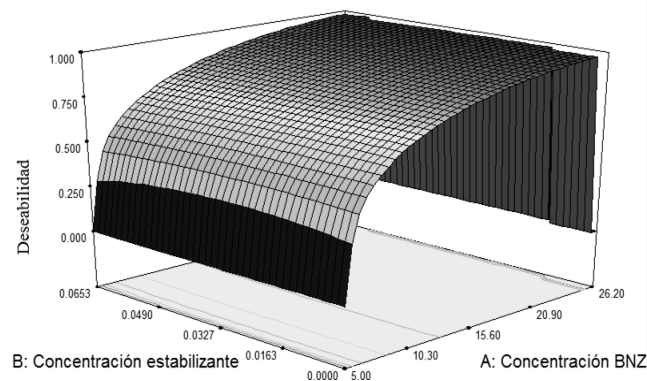


Figura 4.4. Gráfico de deseabilidad en función de las concentraciones de BNZ y P-188.

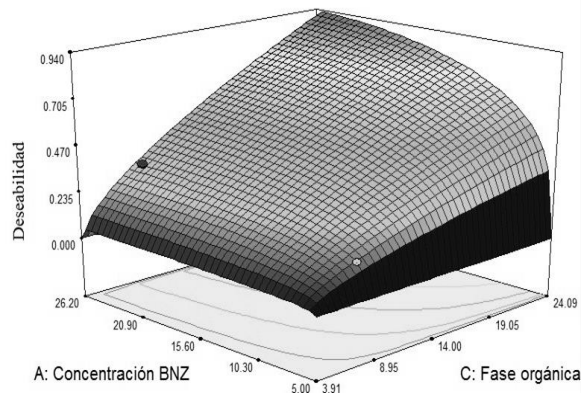


Figura 4.5. Gráfico de deseabilidad en función de la concentración de BNZ y la proporción de fase orgánica.

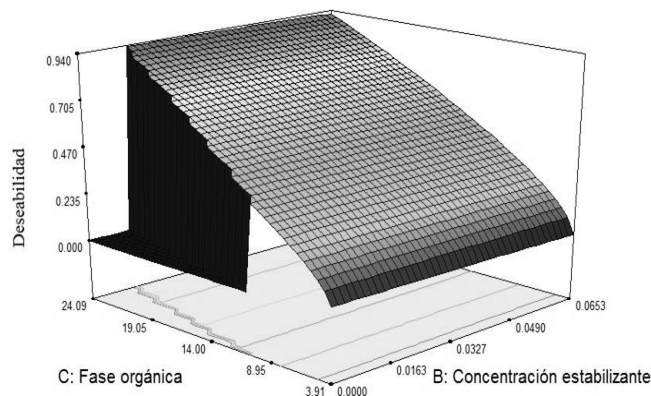


Figura 4.6. Gráfico de deseabilidad en función de la concentración de P-188 la proporción de fase orgánica.

En la Figura 4.4, se observa la deseabilidad en función de la variación de concentración de BNZ y P-188 en los rangos seleccionados previamente, manteniendo el porcentaje de fase orgánica fijo en 30,10 %. En este caso, la concentración de BNZ ejerce una influencia marcada sobre la función deseabilidad principalmente comparándola con los efectos de los cambios en la concentración de estabilizante.

Además se logra observar en la Figura 4.4 un pronunciado aumento en la deseabilidad al aumentar la concentración de BNZ hasta alcanzar concentraciones de 25 mg/ml aproximadamente.

En el caso del análisis de la función deseabilidad variando la concentración de BNZ y la proporción de fase orgánica, manteniendo la concentración de P-188 fija y en 0,0147 g/ml, se obtuvo una gráfica como la que se muestra en la Figura 4.5.

En la Figura 4.6 se muestra la variación de la deseabilidad, manteniendo la concentración de BNZ constante en 25,71 mg/ml, y modificando la concentración de estabilizante y el porcentaje de fase orgánica con la que se trabaja. Este gráfico es más complejo que los obtenidos previamente, sin embargo puede observarse con claridad como en un amplio rango de concentraciones de P-188 al disminuir la proporción de fase orgánica la deseabilidad desciende marcadamente, ya que una de las condiciones impuestas para el modelo fue la de disminuir el tiempo de secado por liofilización, aumentando la cantidad de fase orgánica con respecto a la acuosa.

4.4.1.3. Verificación de la optimización

En la Tabla 4.5 se muestran los protocolos del ensayo optimizado (se seleccionó la solución cuya deseabilidad fue de 0,9908), y del que contiene las condiciones reales en las que se trabajó. Además, ambos se comparan con los resultados de un experimento de características similares (experimento 3) realizado durante la etapa de diseño de la superficie de respuesta.

Tabla 4.5. Protocolos y resultados del experimento de optimización (valores teóricos y experimentales) y de un sistema preparado sin optimización previa (experimento 3 empleado en la elaboración de la superficie de respuesta).

Muestra	BNZ (mg/ml)	P-188 (mg/ml)	Fase orgánica (%)	BNZ_{NC} (%)	$T_{particula}$ (nm)	S_{BNZ} (mg/ml)
Teórica	25,71	0,014	30,10	97,76	55	3,68
Experimental	26,00	0,010	30,00	98,00	57	3,75
Experimento 3	25,00	0,050	20,00	97,46	48	2,50

Puede observarse que el protocolo de elaboración para la muestra optimizada no se diferencia en gran medida con el del experimento 3, sin embargo, pequeñas modificaciones en los factores generan significativos cambios en las respuestas obtenidas, principalmente en la S_{BNZ} y en el $T_{particula}$. Con respecto al BNZ_{NC} las diferencias observadas no serían significativas.

4.4.1.4. Ensayo de disolución de las nanopartículas optimizadas

Por último, se quiso determinar si efectivamente la velocidad de disolución *in-vitro* de BNZ se veía afectada por las respuestas optimizadas previamente. Para ello, se compararon los perfiles de disolución del BNZ de partida, de la muestra 3 (no optimizado) y la optimizada, los resultados se representan en la Figura 4.7.

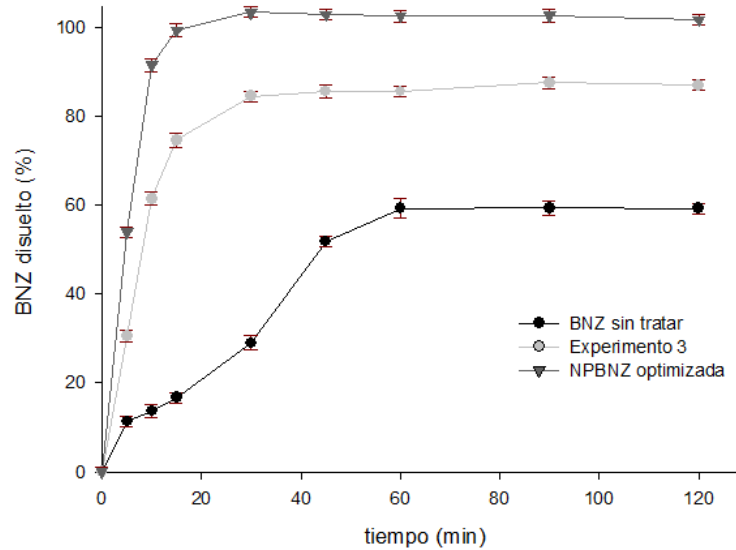


Figura 4.7. Perfiles de disolución de BNZ sin tratar, NPs no optimizadas (experimento 3) y NPs optimizadas.

En la Figura 4.7 se comparan los perfiles de disolución de BNZ obtenidos para la muestra optimizada, y el BNZ sin tratar y la muestra sin optimizar. Estos resultados demuestran que las mayores velocidades de disolución son obtenidas con la muestra optimizada, ya que aproximadamente el 100% de BNZ se disolvió antes de los 30 minutos, mientras que en las NPs del experimento 3 cerca del 84 % de BNZ es disuelto en ese tiempo, y el BNZ sin tratar es disuelto en estas condiciones solo en un 30 %. Esto podría deberse principalmente a la optimización de 2 propiedades que tienen directa influencia sobre la disolución, como son el $T_{partícula}$ y la S_{BNZ} .

4.4.1.5. Caracterización de las nanopartículas optimizadas

Después de obtener las NPs de BNZ con características optimizadas ($T_{partícula}$, BNZ_{NC} , y S_{BNZ}), se evaluó la eficacia para liberar BNZ y en distintos medios biológicos simulados, que podrían dar información sobre las propiedades farmacocinéticas correspondientes.

De esta manera se evaluó la estabilidad en diferentes fluidos gastrointestinales simulados y la estabilidad durante el almacenamiento, con control del *IPd* y liberación de BNZ.

Luego, se estudió el efecto de las NPs en cultivos de células Caco-2; analizando la integridad epitelial (con control de TEER y MEB) y la permeabilidad celular de BNZ.

4.4.1.5.1. Estabilidad de las nanopartículas en diferentes medios

En este trabajo, se utilizaron medios de fluido gastrointestinal simulados para evaluar la liberación de BNZ desde las NPs optimizadas. Cuando el *IPd* fue inferior a 0,3 nm, las muestras fueron consideradas homogéneas, siendo esto una medida de la estabilidad de las mismas, ya que aumentos significativos en el *IPd* indicaría condensación o ruptura de las NCLs.

La Figura 4.8 muestra los valores de *IPd* obtenidos para las NPs en los diferentes medios. Las NPs de BNZ presentaron valores de *IPd* bajos en presencia de fluido intestinal (con o sin agregado enzimático) simulado solo durante los primeros 10 minutos.

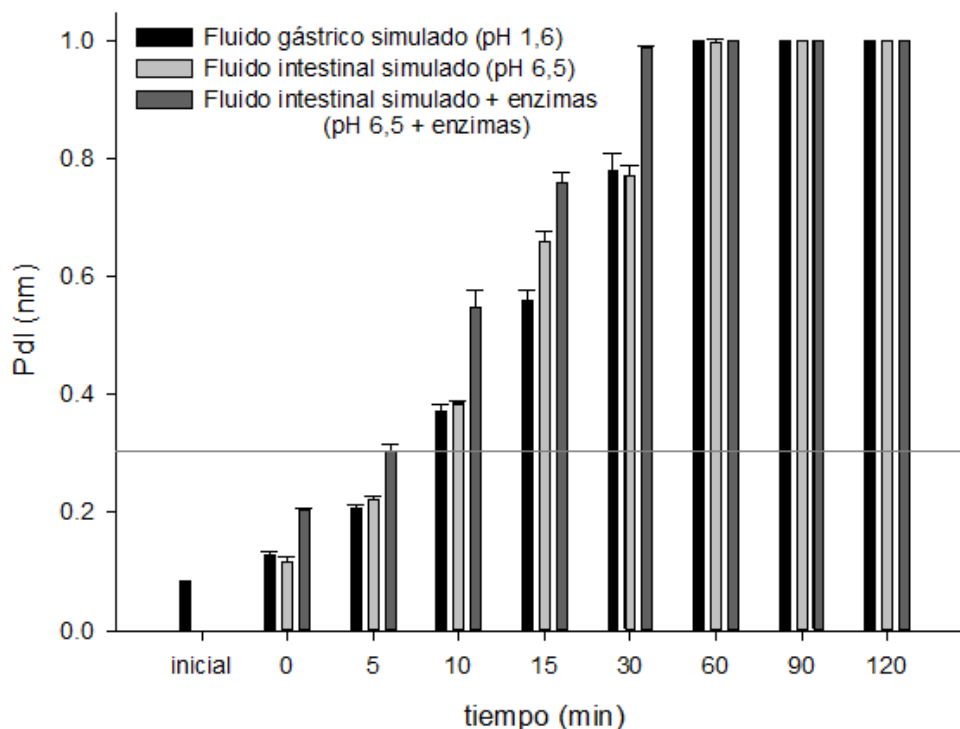


Figura 4.8. *IPd* de las NPs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.

Los nanosistemas fueron menos estables en el fluido gástrico simulado, mostrando valores de *IPd* más altos que en los otros medios y mayores de 0,3 nm luego de 10 minutos.

En la Figura 4.9 se representa la liberación de BNZ en medios de fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado y fluido intestinal simulado con el agregado de enzimas. Durante las primeras 2 horas la cantidad de BNZ liberado a partir de las NPs mostró ser mayor en el fluido intestinal simulado que contaba con el agregado de enzimas, sin embargo a partir de las 3 horas la liberación se equilibra y para los 3 medios resulta similar durante el tiempo que duró el ensayo. Es importante destacar que no se evidenciaron diferencias significativas para la liberación de BNZ entre los medios que simulan fluidos intestinales. Estos resultados indican que ninguno de los distintos medios simulados y evaluados en este estudio ejerce influencia distintiva sobre la liberación de BNZ, la cual estaría directamente relacionada con el tamaño y la presencia del estabilizante, de manera independiente a los cambios de pH y la presencia de enzimas.

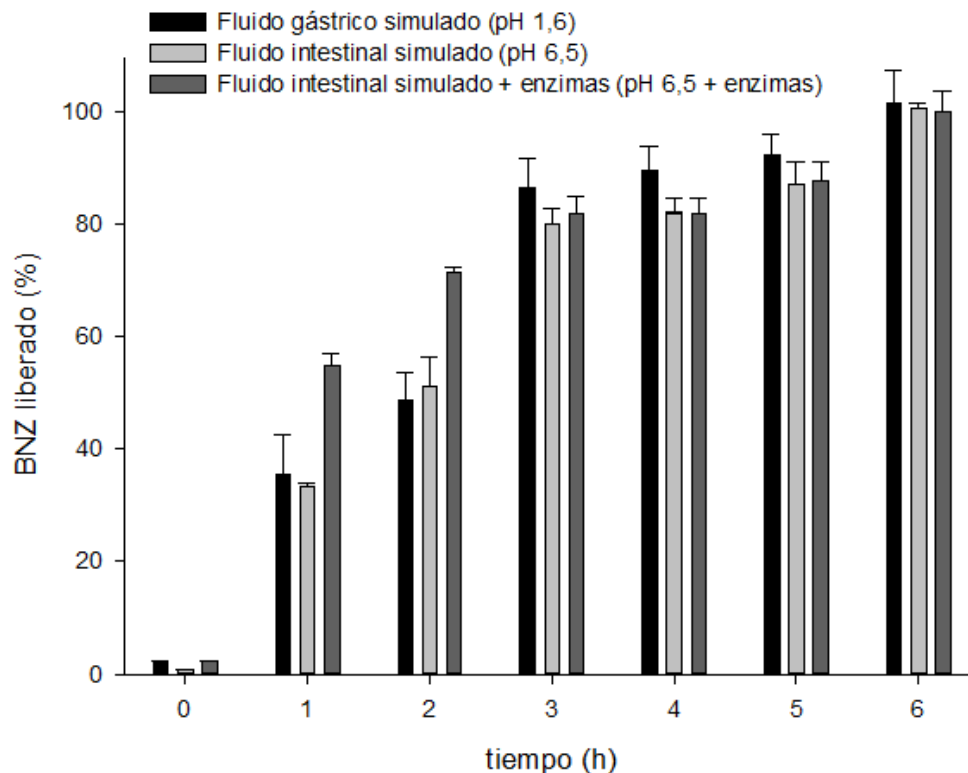


Figura 4.9. Liberación de BNZ a partir de las NPs en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.

4.4.1.5.2. Estabilidad de las nanopartículas durante el almacenamiento

Para estudiar el efecto del envejecimiento de las NPs de BNZ optimizadas, se estudiaron los sistemas (NPs y las nanosuspensiones obtenidas previas al secado) en diferentes condiciones de almacenamiento.

En la Figura 4.10 se presentan los resultados obtenidos para las nanosuspensiones (A, B y C) y las NPs (D).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del tamaño de los sistemas (ver Figura 4.10. A), la solubilidad de BNZ (Figura 4.10. B) y el contenido de BNZ (Figura 4.10. C), se pudo demostrar que las NPs son estables bajo las distintas condiciones de almacenamiento (4, 25 y 50 °C) analizadas en este trabajo.

Por otro lado las nanosuspensiones se analizaron en dos condiciones de almacenamiento diferentes (4 y 25 °C) y el tamaño se determinó a diferentes tiempos. A temperatura ambiente, las nanosuspensiones aumentaron su tamaño (Figura 4.10 D), lo que muestra una cierta inestabilidad debida, posiblemente, a un aumento de la movilidad de las partículas en solución, que conlleva a la formación de aglomerados. Este resultado está de acuerdo con los estudios de Martena y colaboradores quienes demostraron que los nanocristales de nicergolina, fármaco activador del metabolismo cerebral, exhibieron un aumento de tamaño de las partículas después de almacenamiento a 40 °C¹⁴ y de Sahu y colaboradores, quienes describieron un aumento del tamaño de las NPs de felodipina, un antagonista del canal del calcio oral utilizado en el tratamiento de la hipertensión, almacenadas a 40 °C durante 6 meses¹⁵.

Sin embargo, durante el almacenamiento en el refrigerador (a 4°C), las nanosuspensiones no mostraron cambios significativos en el tamaño. Dicho fenómeno podría atribuirse a la presencia del estabilizante, que, a baja temperatura podría mejorar su capacidad de inhibir el crecimiento cristalino. Además, a la reducción de la movilidad de las partículas en suspensión a baja temperatura. Este resultado es coincidente con el estudio de Singh y colaboradores, en el cual no se observó ningún cambio significativo en relación al tamaño de nanocristales de trans-resveratrol, polifenol con actividad antioxidante, formulado con P-407, después de 3 meses de almacenamiento¹⁶.

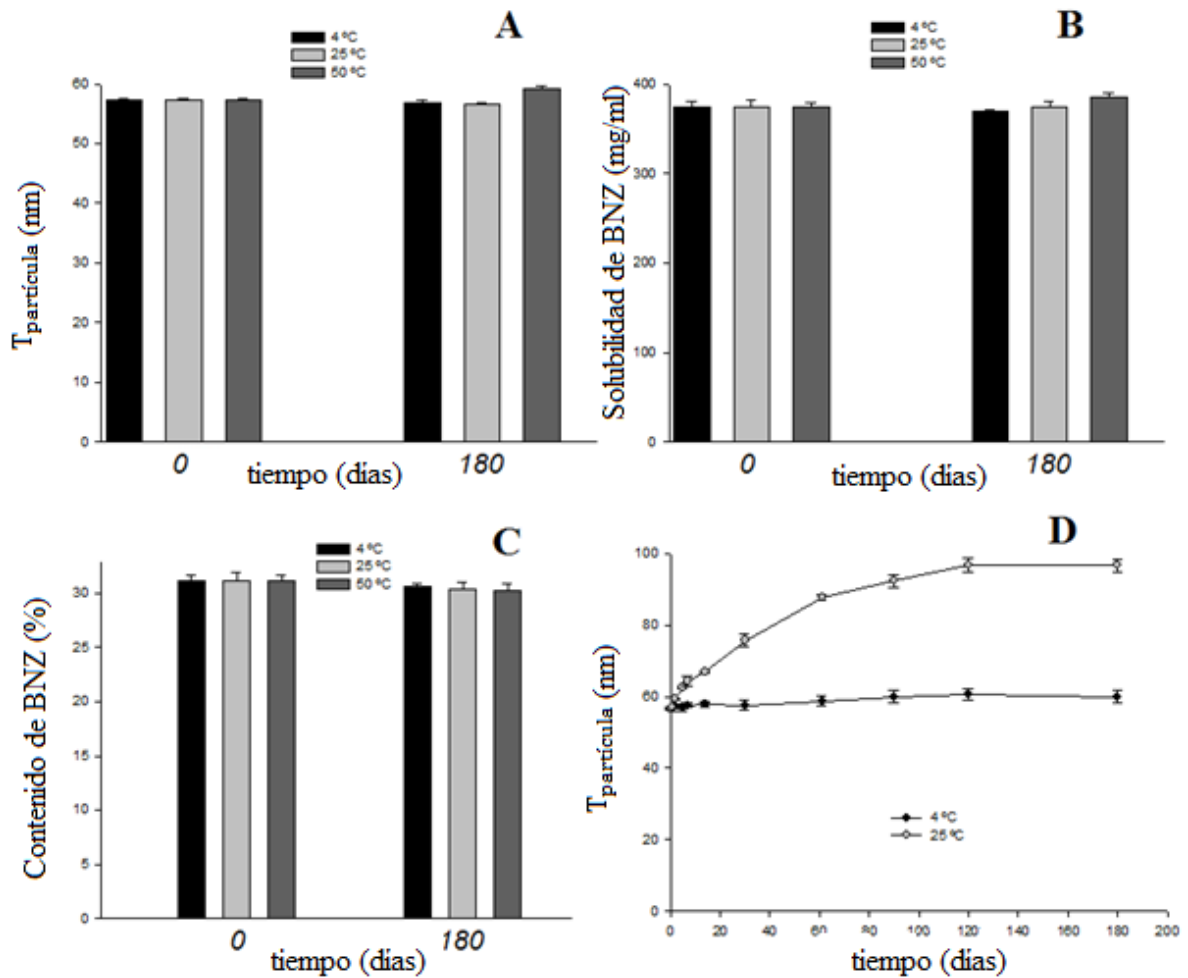


Figura 4.10. Estabilidad de almacenamiento de las NPs con control del (A) $T_{partícula}$, (B) la solubilidad y (C) el contenido de BNZ, y (D) control del $T_{partícula}$ para las nanosuspensiones.

4.4.1.5.3. Viabilidad celular de las nanosuspensiones

Para evaluar cualquier efecto potencialmente tóxico de las NPs sobre las células, se realizó el ensayo MTT en cultivos de células Caco-2.

Como puede observarse en la Figura 4.11, luego de 24 horas de incubación las células con las NPs de BNZ, la viabilidad fue similar a la de las células control (aquellas que fueron puestas en contacto solo con medio de cultivo), lo que sugiere la ausencia de efectos negativos de las NPs sobre las células en tales condiciones. También se muestran los resultados obtenidos para el BNZ de partida, el cual no presentó efectos citotóxicos durante este ensayo.

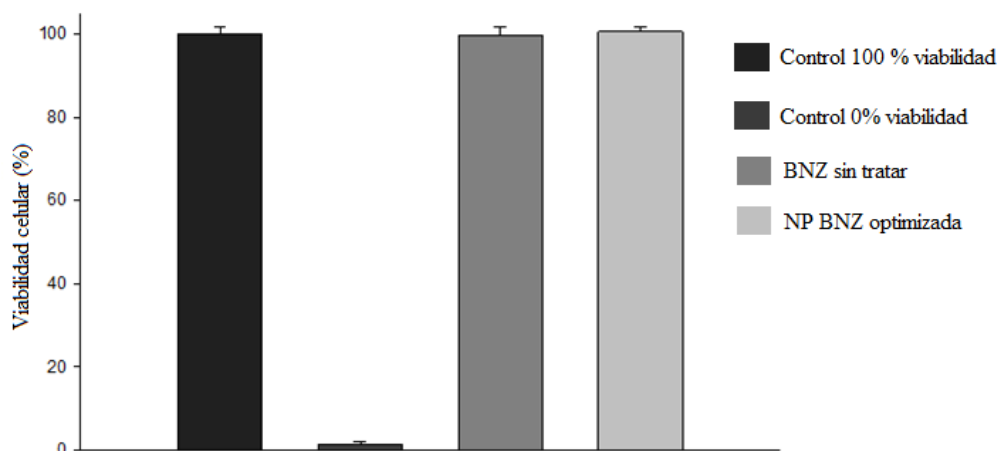


Figura 4.11. Viabilidad celular de Caco-2 en presencia de BNZ sin tratar y NPs de BNZ optimizadas.

4.4.1.5.4. Ensayos de integridad epitelial

Las barreras celulares, como la piel, el epitelio del pulmón o el epitelio intestinal, constituyen uno de los primeros obstáculos que impiden la penetración en el organismo de los sistemas nanoparticulados. Debido a que los mismos poseen la propiedad de incrementar la eficacia de fármacos a partir de un aumento de la solubilidad, estabilidad, tiempo de circulación, focalización y liberación de los fármacos, en este ensayo se evaluó la capacidad de las NPs para ingresar y ser transportadas a través de dichas barreras, empleando el cultivo de células Caco-2, como modelo¹⁷.

4.4.1.5.4.1. Evolución de los valores de resistencia eléctrica transepitelial de cultivos de células Caco-2 durante las pruebas de permeabilidad

La formación de una barrera de células para evaluar permeabilidad de BNZ se analizó por la medición de la TEER. Los cultivos celulares Caco-2 en condiciones sumergidas mostraron valores altos de TEER luego de 5 días de ser sembradas en soportes Transwells®. Los valores TEER se estabilizaron después del día 8 a aproximadamente en valores cercanos a $1400 \Omega \text{ cm}^2$, lo que indica la existencia de propiedades óptimas para la barrera epitelial, debido a que esta medida implica la presencia de una monocapa celular continua¹⁸.

En la Figura 4.12 se puede ver que los valores TEER no se alteran significativamente durante la prueba de transporte, lo que indica el mantenimiento de la integridad de la membrana de la célula Caco-2 durante el desarrollo del experimento de transporte así como

la ausencia de algún tipo de fisura en la barrera celular empleada como modelo de permeación, como se describió previamente para otros sistemas nanoparticulados¹⁹.

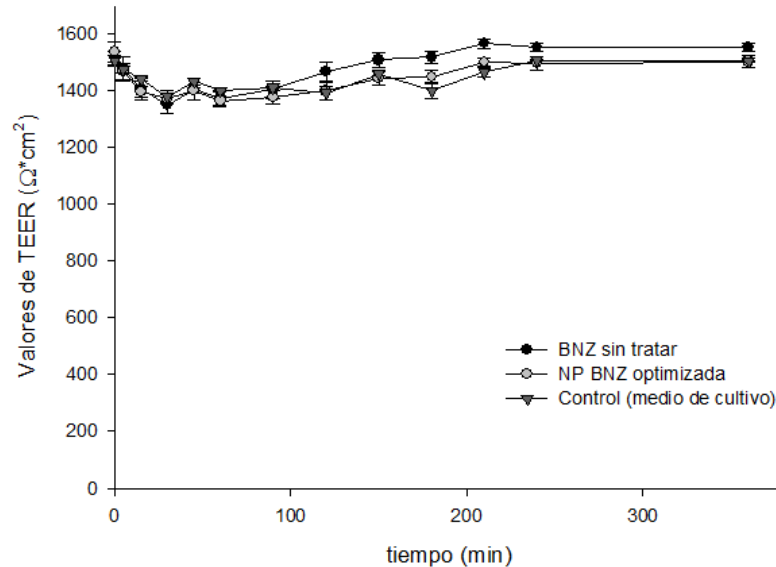


Figura 4.12. Evolución en los valores de TEER de cultivos de células Caco-2 durante ensayos de transporte con BNZ sin tratar y NPs de BNZ optimizadas.

4.4.1.5.4.2. Control de integridad mediante microscopía electrónica de barrido

La integridad de la membrana de las células Caco-2 durante la prueba de transporte empleando NPs de BNZ se estudió adicionalmente por MEB.

En la Figura 4.13 se muestran las micrografías obtenidas de la monocapa celular de Caco-2 después de las pruebas de transporte. Se muestran los cultivos previo a la formación de uniones estrechas entre células (luego de 2 días de iniciado el cultivo celular), la misma se emplea para comparar con las otras imágenes donde se observan claramente las uniones celulares (Figura 4.13 A). En la Figura 4.13 B se observa el resultado obtenido luego de 6 horas de tratamiento con el medio de cultivo. En la Figura 4.13 C se muestran los resultados obtenidos posteriormente al ensayo de transporte empleando BNZ de partida. Finalmente, las células luego del tratamiento con NPs optimizadas de BNZ (Figura 4.13 D). En todos los casos se evidencian uniones estrechas funcionales entre células vecinas. Esto permitiría concluir que la cantidad de BNZ que se pudiera censar durante el ensayo de permeabilidad consiste en el fármaco que fue captado, interiorizado y posteriormente liberado por las células al compartimiento apical.

Por otro lado, es importante destacar que en el caso en que se empleó BNZ sin tratar (ver Figura 4.13 C) es notable la presencia los cristales del fármaco que no atravesaron la membrana debido a su tamaño.

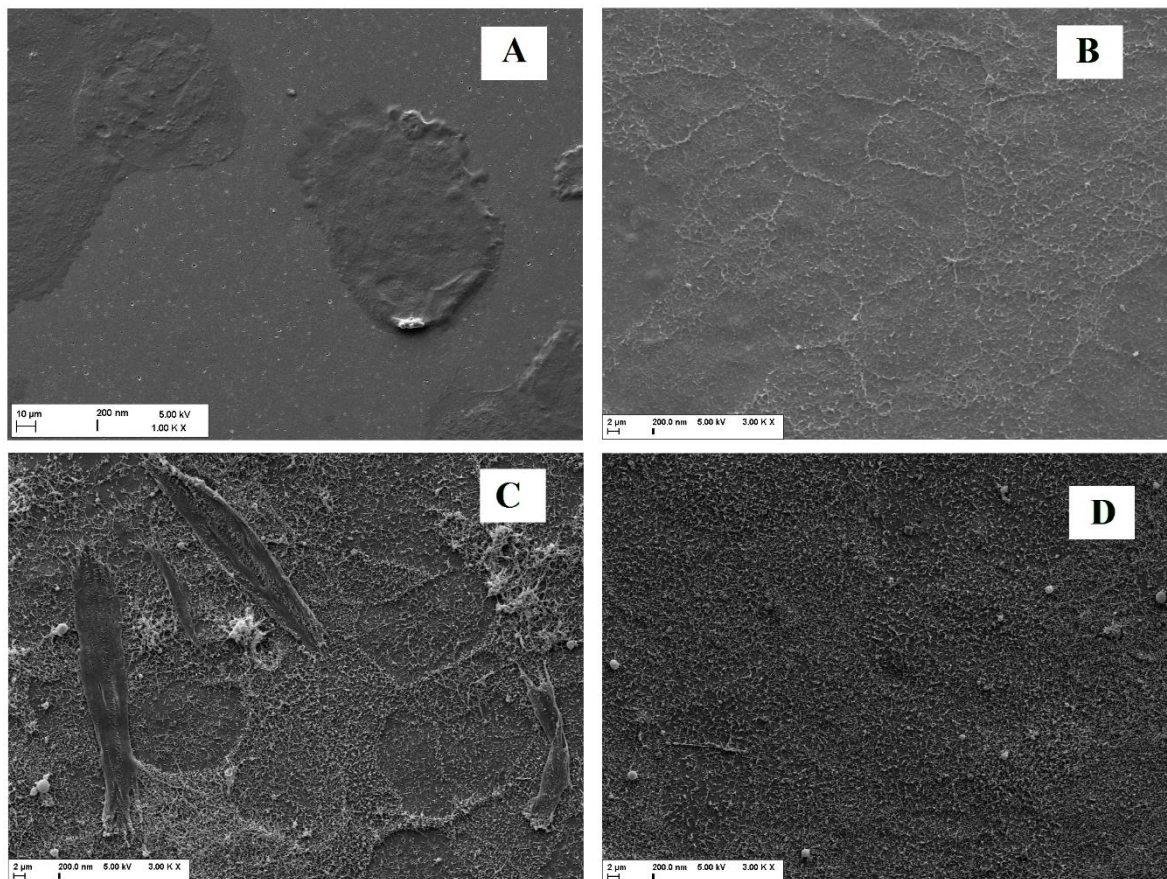


Figura 4.13. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2. (A) Luego de 2 días de cultivo (la barra representa 10 µm), (B) posterior a los ensayos de transporte con medio, (C) luego del tratamiento con BNZ de partida y (D) posterior a ensayos con NPs de BNZ optimizadas. La barra representa 10 µm para la (A) y 2 µm para (B), (C) y (D).

4.4.1.5.5. Evaluación de la permeabilidad de las nanopartículas

En este trabajo se estudió el transporte desde el compartimiento apical al basolateral de BNZ a través de membranas de células Caco-2. Para esto, se comparó la P_{ap} de BNZ a partir de BNZ sin tratar y NPs de BNZ optimizadas.

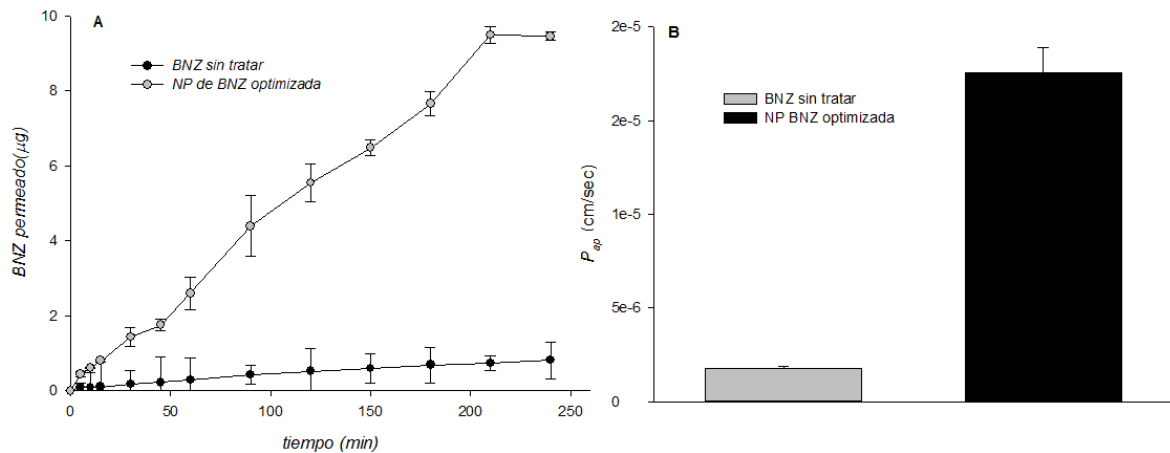


Figura 4.14. (A) Cantidad total de BNZ que pasa a través de la monocapa celular de Caco-2 partiendo de BNZ sin tratar y de las NPs de BNZ optimizadas; (B) P_{ap} de BNZ desde BNZ sin tratar y NPs optimizadas de BNZ.

El transporte a través de monocapas celulares de Caco-2 se evaluaron, como se muestra en la Figura 4.14 A, mediante el análisis de BNZ permeado en el tiempo, partiendo de BNZ sin tratar y las NPs, se observa un marcado incremento de la P_{ap} de BNZ cuando se emplean las NPs optimizadas. Adicionalmente fue determinada la P_{ap} de BNZ (Figura 4.14 B), la cual fue significativamente más elevada para las NPs optimizadas que para el BNZ sin procesar.

Estos resultados están indicando que la P_{ap} del BNZ mejora significativamente al emplear NPs de BNZ, respecto al uso de BNZ sin tratamiento, tal como fue previamente descrito²⁰.

4.4.1.5.6. Evaluación *in-vitro/ in-vivo* de eficacia antiparasitaria de las nanopartículas optimizadas

4.4.1.5.6.1. Ensayos de toxicidad para células Vero

En cualquier estudio de preformulación empleando nuevas metodologías o potenciales sistemas terapéuticos, es esencial determinar la compatibilidad de los mismos frente a líneas celulares normales a fin de descartar problemas relacionados con toxicidad celular y poder continuar con los ensayos *in-vitro/in-vivo*. En el presente estudio, tanto la biocompatibilidad como la toxicidad de las NPs fueron factores importantes a evaluar y debido a ello se realizó el ensayo de toxicidad frente a células Vero. Para esto se realizaron estudios de viabilidad celular de las NPs de BNZ en tres concentraciones diferentes, empleando el ensayo MTT.

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de densidad óptica obtenidos para los ensayos de viabilidad de células Vero en presencia de BNZ sin tratar y diferentes concentraciones de las NPs de BNZ optimizadas.

Tabla 4.6. Resultados de toxicidad de células Vero frente a las NPs de BNZ.

	Medida de densidad óptica	Desviación estándar
Células Vero	0,765	0,104
BNZ sin tratar (50 µg/ml)	0,782	0,098
NPs BNZ (50 µg/ml)	0,672	0,026
NPs BNZ (25 µg/ml)	0,695	0,009
NPs BNZ (10 µg/ml)	0,717	0,015

No se observaron diferencias significativas entre las densidades ópticas de las células tratadas con NPs de BNZ (10, 25 y 50 µg/mL) y con BNZ de partida (50 µg/mL) y las densidades ópticas de las células no tratadas. Además, no se observó ningún cambio morfológico o de desestabilización de la membrana celular, lo que fue comprobado por microscopía óptica. Esto estaría indicando que estas NPs presentan propiedades deseables en términos de viabilidad celular *in-vitro* también para células Vero.

4.4.1.5.6.2. Ensayo hemolítico

Debido a la potencial importancia de estas NPs optimizadas en la investigación clínica, se llevó a cabo un ensayo hemolítico *in-vitro* para evaluar si las NPs podrían ocasionar daños en los glóbulos rojos.

Tabla 4.7. Resultados del control de hemólisis causada por NPs de BNZ.

	Medida de densidad óptica	Desviación estándar
Sangre control	0,466	0,092
BNZ sin tratar (50 µg/ml)	0,659	0,35
NPs BNZ (100 µg/ml)	0,592	0,328
NPs BNZ (50 µg/ml)	0,384	0,028
NPs BNZ (25 µg/ml)	0,413	0,013
NPs BNZ (10 µg/ml)	0,454	0,03
Tritón X-100 (10 %)	2,617	0,039

Los valores de densidad óptica de las células tratadas con NPs de BNZ y el BNZ de partida, fueron similares a los valores de densidad óptica de las células sanguíneas no tratadas, mientras que el control con Triton X-100, condujo a una lisis completa de los eritrocitos, estos resultados se muestran en la Tabla 4.7. La ausencia de cambios en los valores de densidad óptica sugiere que estas NPs de BNZ no producen lisis y por lo tanto podrían ser utilizadas en futuros ensayos *in-vivo*.

4.4.1.5.6.3. Actividad antitripanosida *in-vitro*

A continuación, se llevó a cabo un ensayo para determinar la actividad antitripanosida *in-vitro* de las NPs de BNZ.

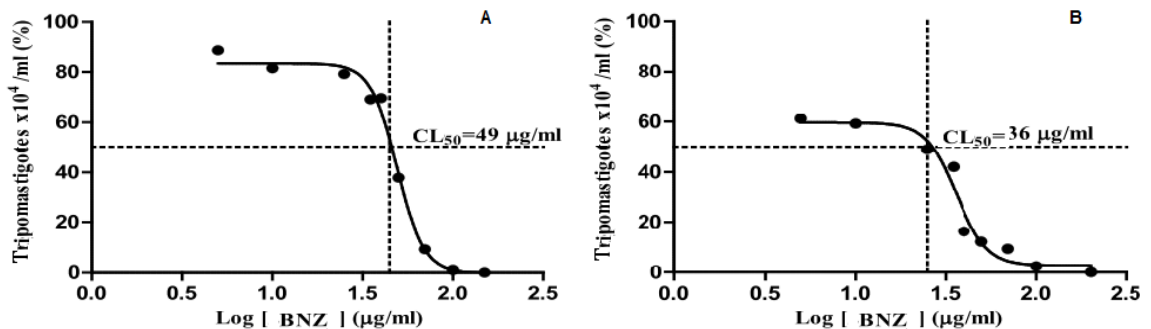


Figura 4.15. (A) Efectos del BNZ sin tratar y (B) las NPs de BNZ sobre los tripomastigotes obtenidos de los cultivos de células.

Se exhiben los resultados obtenidos luego de un estudio de 24 horas con BNZ sin tratar (Figura 4.15 A) y las NPs de BNZ optimizadas (Figura 4.15 B). La actividad antitripanosida se evaluó teniendo en cuenta la cantidad de fármaco que lisó el 50 % de los parásitos. Las curvas representan el registro de la concentración del fármaco en relación al porcentaje de tripomastigotes. Puede observarse que el BNZ sin tratar disminuyó la tasa de supervivencia con un CL_{50} de 49 $\mu\text{g/ml}$, en contraste, se obtuvo una CL_{50} de 36 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de las NPs de BNZ, lo que indicaría una mayor capacidad de las NPs para tratar las infecciones de fase aguda y crónica. Es importante mencionar que el P-188 no produjo ningún efecto lítico en los tripomastigotes no proliferativos de TcN y los controles sin tratamiento mostraron el 100% de supervivencia de los tripomastigotes (datos no mostrados).

La concentración más baja de BNZ redujo el número de parásitos al 80% con respecto a los controles no tratados, mientras que las NPs lograron una reducción los parásitos al 60% con la misma concentración de fármaco.

Se sabe que el rango de susceptibilidad de los parásitos al BNZ depende de la cepa que prevalece en las diferentes áreas geográficas, y que la unidad de tipificación discreta de *T. cruzi*, frecuente en las áreas endémicas del norte de Sudamérica, es generalmente resistente al BNZ mientras que los aislados de *T. cruzi* fueron parcialmente resistentes a BNZ^{21,22}. En este sentido, aunque existen límites para determinar la eficacia del BNZ, la afinidad del parásito por el tejido cardíaco y la resistencia al BNZ hace que sea interesante estudiar el efecto de las NPs en TcN aislado.

4.4.1.5.6.4. Ensayo de inhibición del crecimiento de amastigotes

Por otro lado, considerando que TcN también invade las células cardíacas, se estudiaron los efectos de las NPs de BNZ en cultivos primarios de miocitos cardíacos infectados y se compararon con células Vero infectadas²². Como se muestra en la Figura 4.16, los tratamientos con 25 y 50 μg de BNZ/ml de NPs y 50 $\mu\text{g/ml}$ de BNZ sin tratar no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de IC en células Vero y miocitos cardíacos. Es importante destacar que con la mitad de la dosis de NPs se logra el mismo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los amastigotes. Este resultado puede sugerir que las NPs mejoran la solubilidad y/o absorción de BNZ y, por lo tanto, se incrementa la actividad inhibitoria contra estas líneas celulares infectadas^{6,23}. Por otro lado, se observó una

actividad inhibitoria más baja contra las células infectadas para ambos cultivos celulares cuando se realizó el ensayo empleando 10 μg de BNZ/ml de NPs. De todas maneras este resultado es promisorio tomando en consideración que hemos evaluado concentraciones muy bajas de BNZ y aún en este caso, se ha detectado cierta IC del parásito.

Teniendo en cuenta los efectos adversos del BNZ informados en pacientes infectados, estos resultados son notablemente importantes en términos de una posible reducción de la dosis de BNZ hasta 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin perder su eficacia. Además, los efectos inhibidores de la formulación observados en las células infectadas pueden confirmar la capacidad de tales NPs para cruzar la vasculatura coronaria para inhibir el crecimiento intracelular de amastigotes de *T. cruzi*.

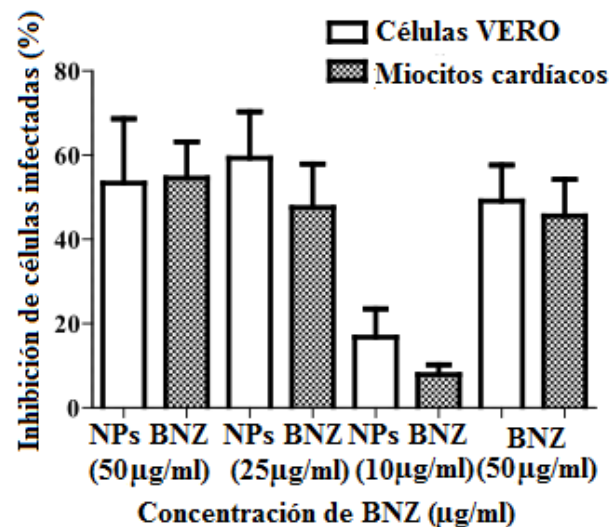


Figura 4.16. Porcentaje de inhibición de células Vero y miocitos cardíacos infectados con TcN expuestos a BNZ sin tratamiento y NPs de BNZ optimizadas.

4.4.1.5.6.5. Análisis de la eficacia de las nanopartículas sobre animales

Para determinar si las NPs de BNZ podrían usarse como un nuevo tratamiento de la enfermedad de Chagas, se llevó a cabo un ensayo en ratones infectados durante la fase aguda con TcN.

Como se muestra en la Figura 4.17 A, los ratones infectados fueron tratados con 50, 25 y 10 mg de BNZ/kg/día de NPs durante 30 días y mostraron una supervivencia de, al menos, 50 días. En un ensayo paralelo (Figura 4.17 B), el efecto antiparasitario de las NPs también se evaluó para un tratamiento de 15 días consecutivos. Los ratones infectados tratados con

dosis de 50 y 25 mg/kg/día de los nanosistemas sobrevivieron el mismo período de tiempo (50 días) que el grupo tratado durante un mes (Figura 4.17 A). Por otro lado, el grupo de ratones infectados tratados con 10 mg de BNZ/kg/día de las NPs exhibió una tasa de supervivencia del 70% después de 38 días y hasta el final del experimento, lo que confirma que estas formulaciones de BNZ tienen un efecto antiparasitario *in-vivo* dependiente de la dosis.

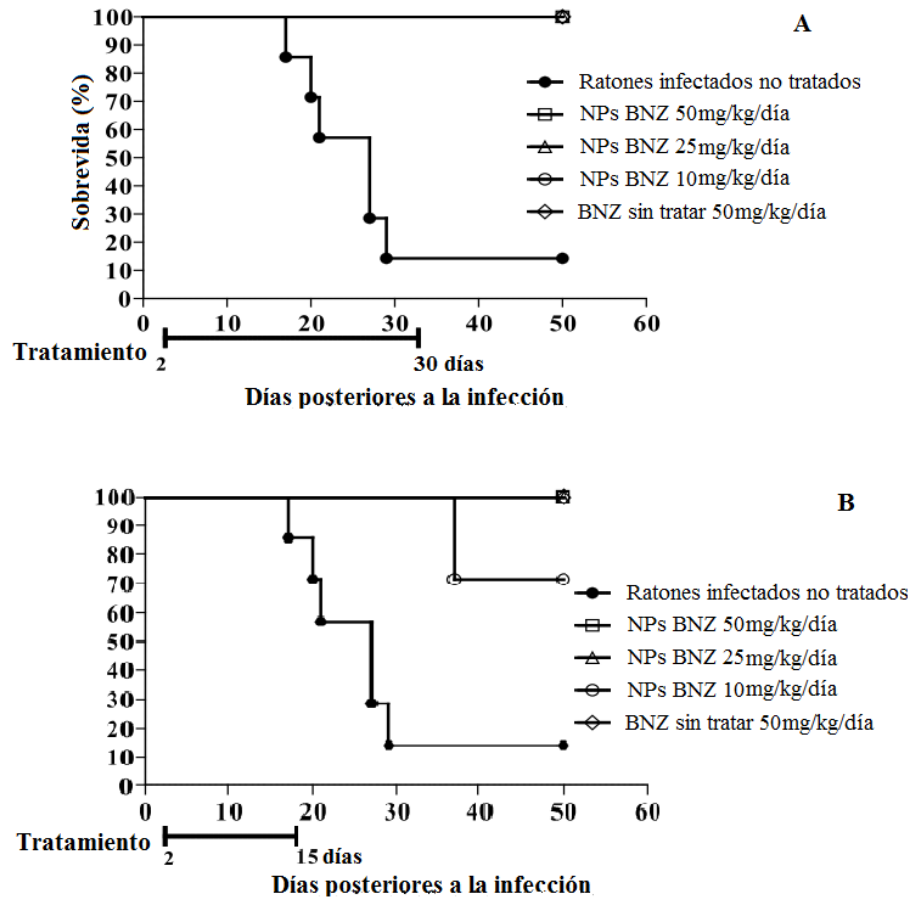


Figura 4.17. Efectos de las NPs de BNZ optimizadas en el tratamiento de ratones infectados durante la fase aguda. (A) Tratamiento de 30 días. (B) Tratamiento de 15 días.

En base a los resultados obtenidos podríamos concluir que el tratamiento con NPs de BNZ podría ser una alternativa conveniente para tratar con éxito la enfermedad de Chagas, ya que permitiría reducir la dosis en comparación al empleo de BNZ sin tratar.

4.4.2. Nanocápsulas lipídicas

4.4.2.1. Nanocápsulas lipídicas convencionales

De acuerdo a la metodología de inversión de fase se obtuvieron NCLs de diferentes tamaños cargadas con BNZ.

4.4.2.1.1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad

La caracterización fisicoquímica de las NCLs se llevó a cabo mediante la determinación del $T_{partícula}$, IPd , PZ y conductividad de los sistemas.

En la Tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos en promedio para las NCLs sin fármaco.

Tabla 4.8. Resultados de las NCLs de S1, S2 y S3.

Resultados	S1	S2	S3
$T_{partícula}$ (nm)	30,33±0,05	58,14±0,03	119,57±0,07
IPd (nm)	0,090±0,005	0,040±0,004	0,120±0,008
PZ (mV)	-7,93±0,02	-5,44±0,08	-6,79±0,06
Conductividad (mS/cm)	0,623±0,005	0,598±0,005	0,583±0,009

Los tamaños de las NCLs fueron determinados mediante dispersión de luz dinámica, se muestran los distintos diámetros obtenidos empleando diferentes proporciones de los mismos excipientes. Los valores promedios resultantes (30,33; 58,14 y 119,57 nm) fueron cercanos a los esperados (25, 50 y 100 nm), demostrando la factibilidad del método de inversión de fase para la formulación de NCLs.

El IPd fue usado como parámetro para evaluar la distribución del tamaño de las NCLs. En la Tabla 4.8 se observa que en todos los sistemas los valores de IPd fueron iguales o inferiores a 0,15 nm, demostrado una distribución estrecha del tamaño de las nanocápsulas. Con estos resultados podríamos afirmar que las NCLs S1, S2 y S3 tienen tamaños homogéneos¹⁰.

Como se describió en el Capítulo 3, el PZ es una medida de la magnitud de la carga superficial de las partículas, lo que tiene influencia en la repulsión o atracción electrostática entre las mismas, y por lo tanto es uno de los parámetros que afecta la estabilidad de los sistemas. En este caso, los valores de PZ de todos los sistemas analizados fueron negativos

(entre -7 y -5 mV), resultados similares fueron reportados por Roger y colaboradores¹⁰ en el diseño de NCLs de 7-etil-10hidroxi-camptotecina, un fármaco activo contra distintos tumores que es metabolizado enzimáticamente en el hígado.

En la última fila de la Tabla 4.8 se muestran los valores de conductividad obtenidos. En todos los casos fueron similares entre sí y cercanos a 0,6 mS/cm. Dicho valor fue el esperado, basándonos en la cantidad de NaCl empleado, siendo la medida de conductividad un parámetro de control para los sistemas.

Seguidamente se ensayaron NCLs conteniendo BNZ (S4, S5 y S6). En la Tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos del $T_{partícula}$, IPd , PZ y conductividad.

Tabla 4.9. Resultados de las NCLs conteniendo BNZ.

Resultados	S4	S5	S6
$T_{partícula}$ (nm)	28,45±0,04	47,86±0,06	103,10±0,09
IPd (nm)	0,049±0,005	0,039±0,007	0,071±0,004
PZ (mV)	-0,956±0,003	-0,858±0,004	-1,59±0,06
Conductividad (mS/cm)	0,652±0,008	0,529±0,005	0,590±0,002

De acuerdo a lo observado en la Tabla 4.9 el $T_{partícula}$ de las NCLs conteniendo BNZ mostró ser similar al diámetro obtenido en las NCLs sin fármacos empleando igual composición. Esto indica que la incorporación del fármaco en las NCLs es una metodología efectiva que permite mantener el tamaño original de los sistemas. Resultados similares para otros fármacos fueron previamente reportados por Gamboa y colaboradores²⁴.

En la Tabla 4.9 se muestran los valores de IPd obtenidos, siendo para todas las muestras inferiores a 0,08 nm, de esta manera podemos afirmar que los sistemas obtenidos presentan un tamaño homogéneo.

Los valores de PZ fueron en todos los casos bajos, las partículas mostraron ser prácticamente neutras, a diferencia de las NCLs blanco que si bien mostraron valores de PZ bajos, fueron más elevados que para estos sistemas.

Nuevamente, y al igual que en el caso de las NCLs blanco, el valor de conductividad para todas las suspensiones ensayadas fue similar y cercano a 0,6 mS/cm. De esta manera la incorporación de BNZ permite mantener los valores de conductividad en el rango deseado.

4.4.2.1.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las NCLs fueron observadas empleando MET y las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 4.18.

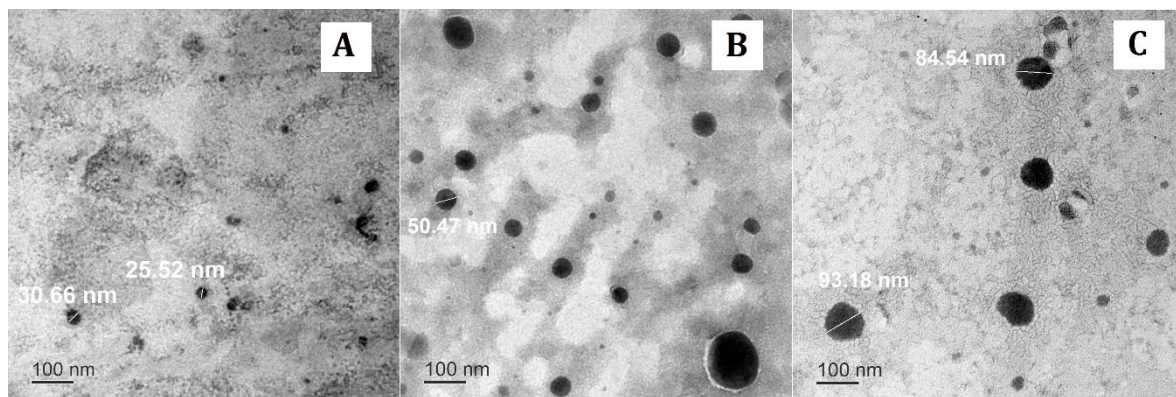


Figura 4.18. Micrografías electrónicas de transmisión de las NCLs de BNZ, (A) S4, (B) S5 y (C) S6. La barra representa 100 nm.

El diámetro observado mediante MET para las NCLs cargadas con BNZ mostró ser similar al obtenido por dispersión de luz dinámica (ver en Tabla 4.9). Sin embargo se observaron algunas partículas más grandes (ver Figura 4.18 B), posiblemente formadas por un proceso de fusión de una o más cápsulas. Las NCLs mostraron una superficie circular, estos resultados son consistentes a los obtenidos previamente para este tipo de sistemas²⁵.

4.4.2.1.3. Eficiencia de encapsulación

Se calculó la $E_f E$ de las muestras ensayadas como la relación entre la cantidad de fármaco total y la cantidad de fármaco que se obtiene de las NCLs previamente separadas del fármaco libre.

Tabla 4.10. $E_f E$ obtenida para cada NCL.

Muestras	$E_f E$ (%)
S4	91,82 ± 0,05
S5	83,33 ± 0,03
S6	87,53 ± 0,08

En la Tabla 4.10 se muestra la eficiencia de encapsulación de las NCLs de BNZ, que fue de 91,82; 83,33 y 87,53 % para los sistemas S4, S5 y S6 respectivamente. En todos los casos los resultados fueron elevados y similares a los reportados previamente para este tipo de NCL^{10,12}.

En base a estos resultados podemos afirmar que la formación de NCLs de BNZ mediante el método de inversión de fase mostró ser un mecanismo eficiente, permitiendo que una gran cantidad de fármaco sea encapsulado en el interior de dichos sistemas. Resultados similares fueron observados en estas NCLs conteniendo otros fármacos²⁴.

4.4.2.1.4. Estabilidad de las nanocápsulas en diferentes medios

Nuevamente se estudió el comportamiento de los sistemas desarrollados en diferentes medios de fluido gastrointestinal simulado, mediante la medición de *IPd* y el control de liberación de BNZ. Cuando el *IPd* fue inferior a 0,3 nm, las muestras fueron consideradas homogéneas, siendo esto una medida de la estabilidad de las mismas.

En este sentido en la Figura 4.19 se presentan los resultados de *IPd* obtenidos para los 3 tipos de NCLs en los diferentes medios.

Las NCLs de menor tamaño (S4) mostraron ser estables en el medio que simula fluido gástrico durante al menos 2 horas, mientras que en medios simulando fluidos intestinales las cápsulas mostraron ser inestables, siendo más pronunciados los cambios en los *IPd* en aquel medio que contenía enzimas. En estas enzimas están incluidas las lipasas, las cuales podrían estar favoreciendo a la inestabilidad que se evidencia.

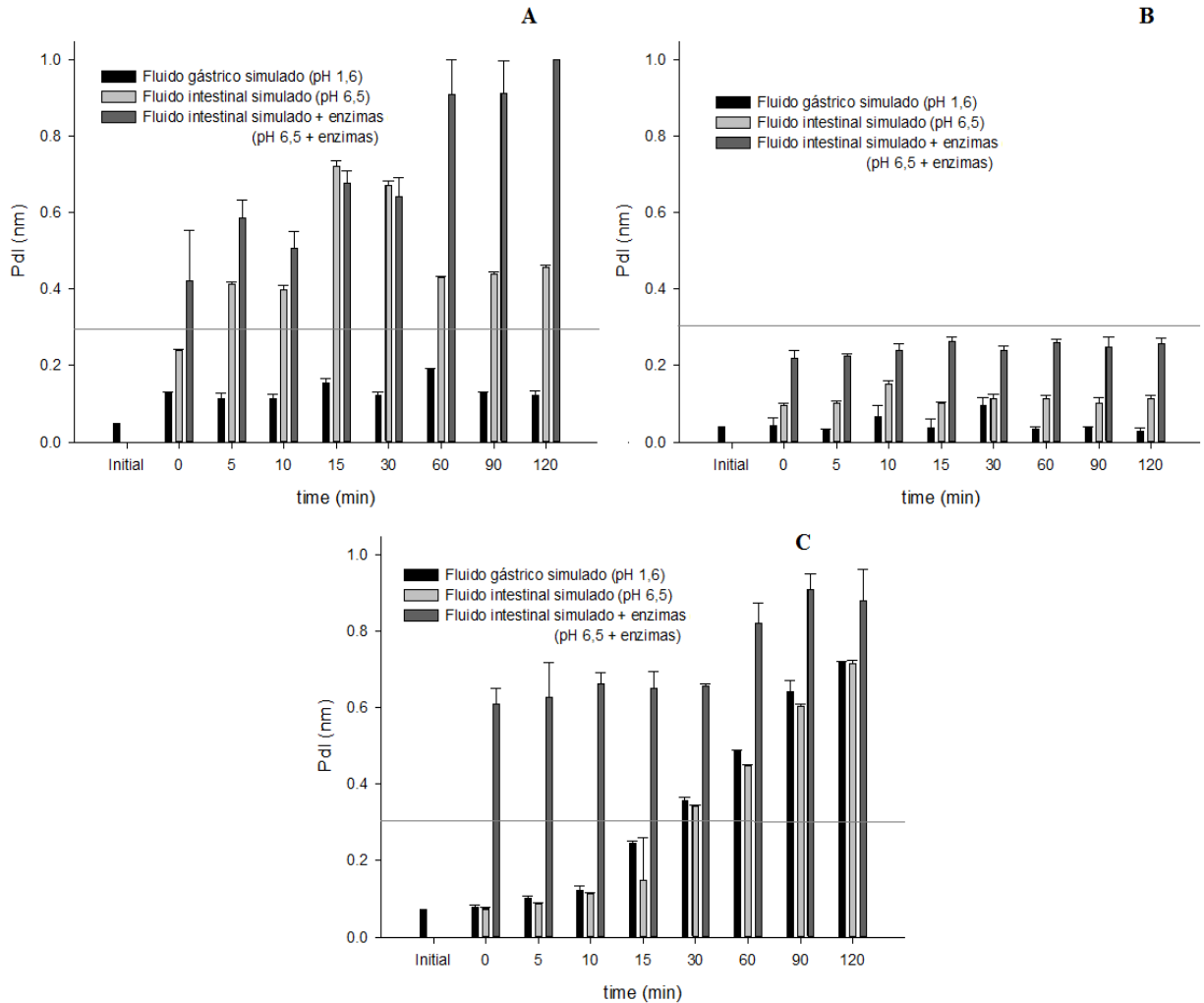


Figura 4.19. *IPd* de las NCLs de BNZ en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados. (A) S4, (B) S5 y (C) S6.

Por otro lado las NCLs S5 mostraron ser estables durante al menos dos horas en todos los fluidos simulados empleados.

Finalmente, las NCLs S6 mostraron ser inestables en los 3 medio ensayados a partir de los 30 minutos de comenzado el ensayo. Sin embargo en presencia de lipasas desde la primer toma de muestra se observan alteraciones en los valores de *IPd*.

En la Figura 4.20 se observan las curvas de liberación de BNZ a partir de las NCLs S4 (A), S5 (B) y S6 (C).

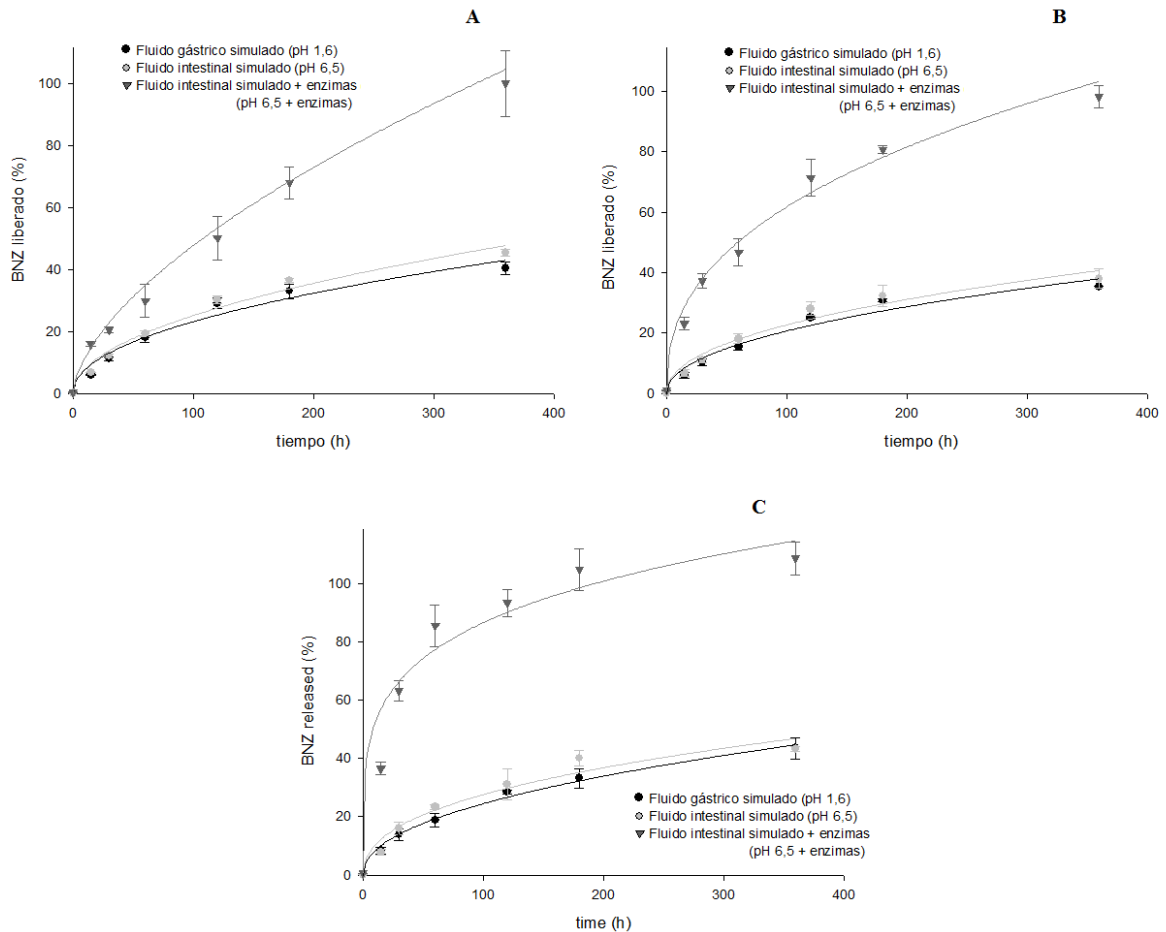


Figura 4.20. Perfiles de liberación de BNZ a partir de las NCLs de BNZ en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados. (A) S4, (B) S5 y (C) S6.

Se observa que la liberación de BNZ a partir de los diferentes tipos de NCLs en presencia de los medios gástricos e intestinales (sin agregado de enzimas) muestra perfiles similares durante las 6 horas que dura el ensayo. Contrariamente, en presencia de enzimas la liberación de BNZ desde las NCLs es significativamente más rápida, alcanzando en todos los casos el 100 % de liberación hacia el final del experimento (6 horas). Esto se debe a que dentro del conjunto de las enzimas se encuentran las lipasas, proteínas que se encargan de degradar lípidos, por lo que es posible que contribuyan con la ruptura de las NCL, situación que fue previamente reportada por Roger y colaboradores¹².

4.4.2.1.5. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus

Como se mencionó en capítulos anteriores, las proteínas que componen el mucus podrían interactuar con las NCLs y de esa manera disminuir su movilidad, reduciendo así la capacidad de dichos sistemas de atravesar la membrana celular.

En la Tabla 4.11 se observan los resultados de los tamaños promedio obtenidos para las NCLs en presencia y ausencia de mucinas empleando el NanoSight.

Tabla 4.11. $T_{particula}$ estimado por desplazamiento relativo y el efecto de mucinas sobre el mismo.

NCL	Sin mucinas	Con mucinas
S1	45±10	41±10
S2	59±20	57±10
S3	138±40	143±30
S4	41±10	48±10
S5	68±10	70±10
S6	145±30	131±20

Como puede verse en la Tabla 4.11 los tamaños obtenidos para las NCLs en ausencia de mucinas mediante esta técnica no varía significativamente de los obtenidos por dispersión de luz dinámica (ver $T_{particula}$ obtenidos en las Tablas 4.8 y 4.9).

Las NCLs (sin fármaco o cargadas con BNZ) no mostraron cambios significativos en el tamaño relativo obtenido, lo que podría indicar una interacción nula con las proteínas del mucus. Esto puede deberse principalmente a la carga que presentan dichas partículas (ver valores de PZ de las Tablas 4.8 y 4.9), ya que en el caso de las NCLs sin fármaco (S1, S2 y S3) presentan una baja intensidad de carga negativa (al igual que las mucinas) o en el caso de las NCLs de BNZ (S4, S5 y S6) carga prácticamente neutra, no favoreciendo así interacciones electrostáticas fuertes entre las proteínas y dichos sistemas.

4.4.2.1.6. Activación del complemento

El consumo del complemento fue expresado como función de la superficie de nanocápsulas (cm^2) que representa un aumento en la concentración de las mismas. En este ensayo, el mecanismo clásico del complemento del SHN es activado posteriormente al contacto con eritrocitos de oveja sensibilizados, lo que conduce a la lisis de éstos y la liberación de hemoglobina. Cuando el suero está en presencia de NPs activadoras, se

encuentran menos proteínas del complemento para lisar los eritrocitos de oveja, lo que provoca una reducción de las unidades del sistema del complemento²⁶.

En general, se postula que el sistema del complemento puede influir en la farmacocinética y la biodistribución de las NPs, a través de las proteínas del complemento que actuarían como un puente entre las NPs y una gama de células inmunes innatas y adaptativas.

Esta interacción podría producir una eliminación de las NPs por parte de las células fagocíticas así como influir en la respuesta inflamatoria del sistema inmune²⁷.

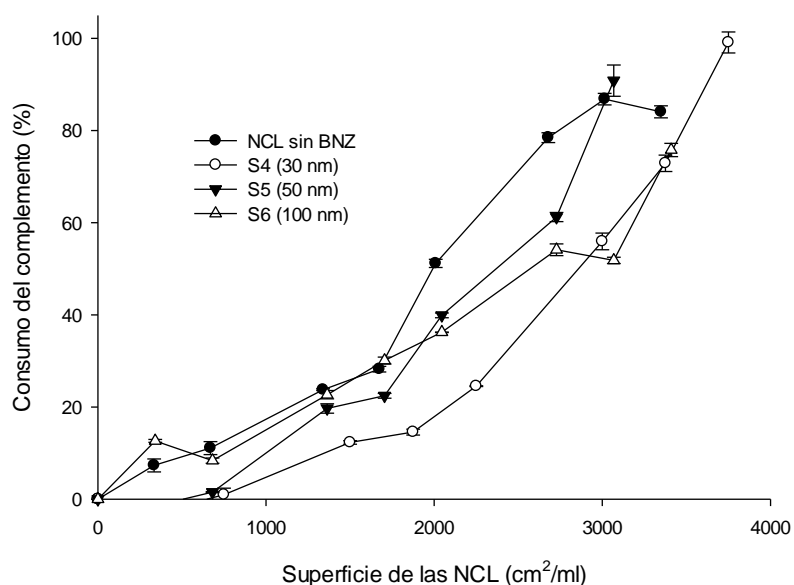


Figura 4.21. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm²/ml) de BNZ.

En la Figura 4.21 se compara el consumo del sistema de complemento para las NCLs sin fármaco y las NCLs de BNZ. Puede observarse que los perfiles son similares y que tanto las NCLs vacías como las NCLs con BNZ activan el complemento de manera casi igual. Si se comparan estos resultados con la bibliografía, se puede postular que la activación del complemento es dependiente del tamaño de las NPs. A partir de estos resultados podríamos postular que la inclusión de BNZ en las NCLs estaría siendo en el interior de las NCLs y que no existiría interacción alguna con las proteínas correspondientes del complemento. Gamboa y colaboradores han obtenidos resultados similares empleando NCLs de ivermectina²⁴.

4.4.2.1.7. Ensayos de citotoxicidad de las nanocápsulas lipídicas para cultivos de células Caco-2

Con el objetivo de determinar el efecto de las NCLs sobre las células se ensayó la supervivencia de un cultivo de células Caco-2 en presencia de distintas concentraciones de las NCLs sin fármacos y las cápsulas de BNZ. A continuación se muestran resultados obtenidos a 24 y 48 horas posteriores a la exposición.

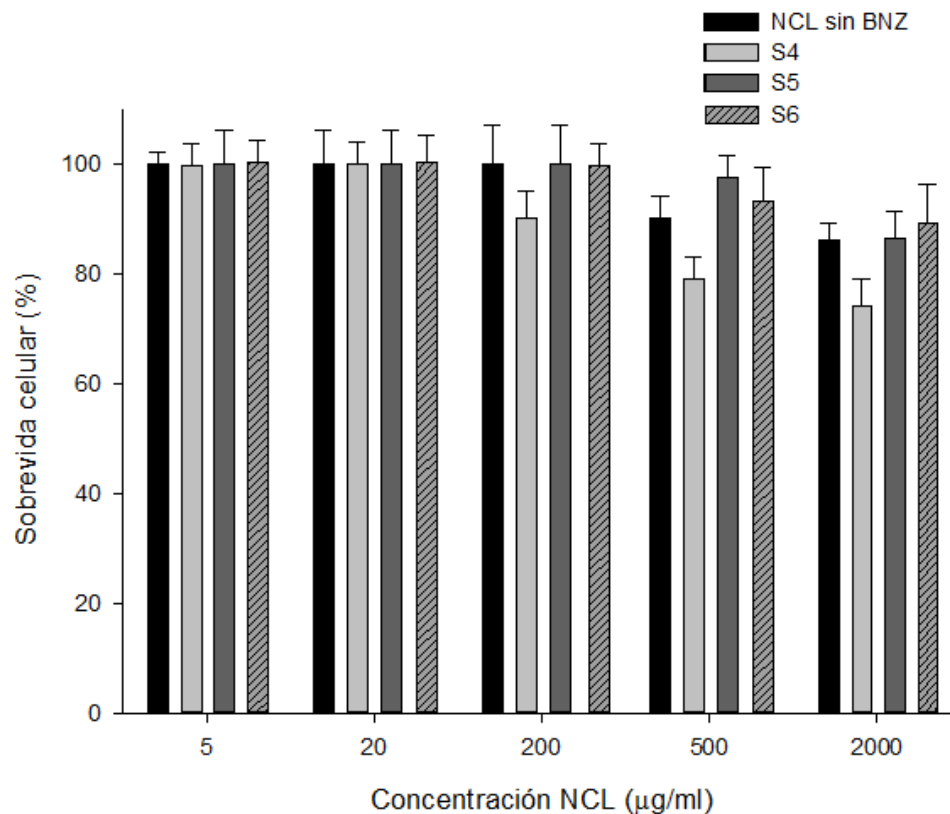


Figura 4.22. Supervivencia celular luego de 24 horas de exposición a NCLs sin fármaco y las cápsulas de BNZ.

En la Figura 4.22 se observan los perfiles de supervivencia celular en función de concentración de las NCLs con y sin BNZ. Puede observarse que luego de 24 horas de exposición a concentraciones de hasta 500 µg/ml de NCLs cargadas con BNZ la viabilidad de células Caco-2 es alta y cercana a la obtenida para las NCLs sin BNZ. Al emplear concentraciones más elevadas, la viabilidad se reduce en todos los sistemas ensayados, sin embargo, el sistema S4 (el de menor tamaño) presenta una supervivencia significativamente más baja en estas condiciones. Estos resultados son coincidentes con el trabajo de Thwala y

colaboradores, quienes describieron que la viabilidad celular de células Caco-2 incubadas con NCLs de insulina fue dependiente del tamaño y la concentración de las mismas²⁸.

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron luego de incubar durante 48 horas los cultivos celulares con las NCLs de BNZ.

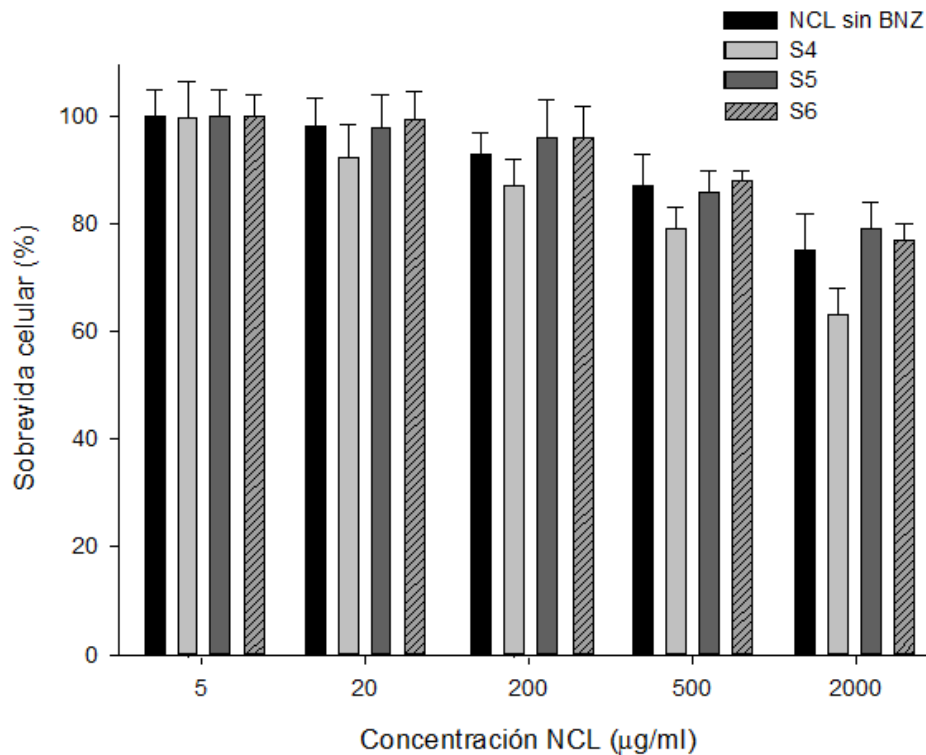


Figura 4.23. Supervivencia celular luego de 48 horas de exposición a NCLs sin fármaco y las NCLs de BNZ.

En la Figura 4.23 se observa la supervivencia celular en función de concentración de las NCLs vacías y NCLs de BNZ luego de 48 horas de exposición a las mismas. Nuevamente, puede observarse que la sobrevivencia celular es similar para las NCLs vacías y las cargadas con BNZ hasta concentraciones de 500 µg/ml. Sin embargo puede observarse una baja en la supervivencia celular cuando la concentración de NCLs es más elevada siendo, al igual que a 24 horas, menor para el sistema S4 (el de menor tamaño). Se han llevado a cabo ensayos de supervivencia celular para NCLs similares pero conteniendo otros fármacos, donde luego de 48 horas de exposición se obtuvieron resultados similares, a los observados en este trabajo en relación a la supervivencia celular²⁹.

4.4.2.1.8. Ensayos de integridad epitelial

4.4.2.1.8.1. Evolución de los valores de resistencia eléctrica transepitelial de cultivos de células Caco-2 durante las pruebas de permeabilidad

Una vez que los valores de TEER se estabilizaron, luego de aproximadamente 8 días, en valores cercanos a $1400 \Omega \text{ cm}^2$, se llevaron a cabo los ensayos de transporte. Se inició con la evaluación de la integridad epitelial con el control de los valores de TEER.

En la Figura 4.24 se puede ver que los valores TEER no se alteran significativamente durante la prueba de transporte, lo que indica el mantenimiento de la integridad de la membrana de la célula Caco-2 durante el desarrollo del experimento de transporte para todos los sistemas analizados.

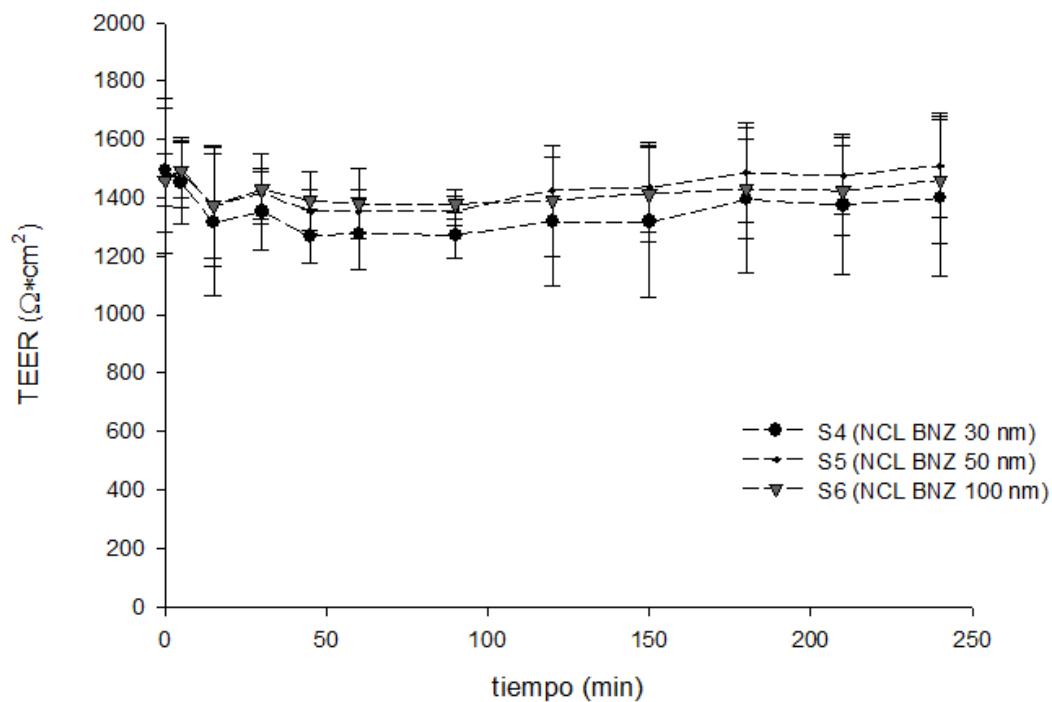


Figura 4.24. Evolución en los valores de TEER de cultivos de células Caco-2 durante ensayos de transporte con las NCLs de BNZ.

4.4.2.1.8.2. Control de integridad mediante microscopía electrónica de barrido

La integridad de la membrana de las células Caco-2 durante la prueba de transporte empleando NCLs de BNZ se estudió adicionalmente por MEB (Figura 4.25).

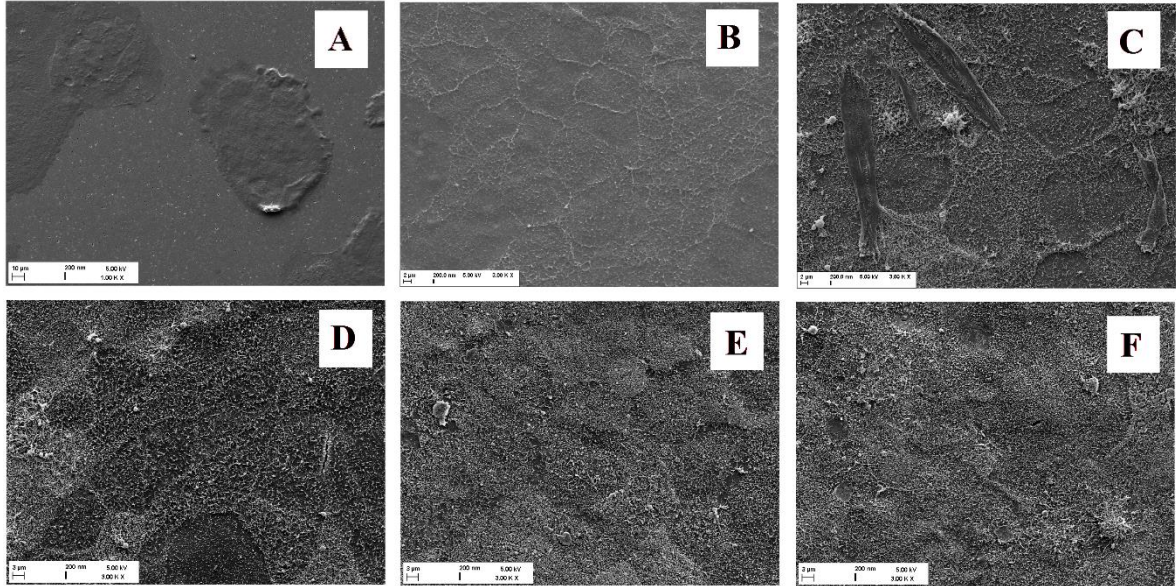


Figura 4.25. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2. (A) Luego de 2 días de cultivo (la barra representa 10 μm) y (B) posterior a los ensayos de transporte con medio (la barra representa 2 μm), BNZ sin tratar (C) y las NCLs S4 (D), S5 (E) y S6 (F), (la barra representa 3 μm).

En el caso de la Figura 4.25 A se muestran las células previo a la formación de uniones estrechas entre células (luego de 2 días de iniciado el cultivo celular), la misma se emplea para comparar con las otras imágenes donde se observan claramente las uniones celulares.

En la Figura 4.25 B se observa el control, obtenido luego de 6 horas de tratamiento con el medio de cultivo, y en la Figura 4.25 C se muestran los resultados obtenidos posteriormente al ensayo de transporte empleando el BNZ de partida. Como se mencionó previamente, en este caso es notable la presencia los cristales de BNZ, los cuales no alteran las conexiones entre las células que forman la monocapa.

Finalmente las Figuras 4.25 D, E y F fueron obtenidas luego de los ensayos de transporte con los 3 tipos de NCLs, en todos los casos se observan las uniones estrechas entre las células vecinas conservadas. Como se mencionó previamente, el control de las uniones entre células permite pensar que el BNZ que se transporta del lado apical al basolateral lo hace a través de la membrana celular y no por posibles poros formados entre células.

4.4.2.1.9. Evaluación de la permeabilidad de la monocapa celular de benznidazol a partir de nanopartículas

En este trabajo se estudió el transporte de BNZ desde el compartimiento apical al basolateral de los Transwells® donde se cultivaron células Caco-2. Para esto, se estudió la P_{ap} de BNZ a partir de BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ.

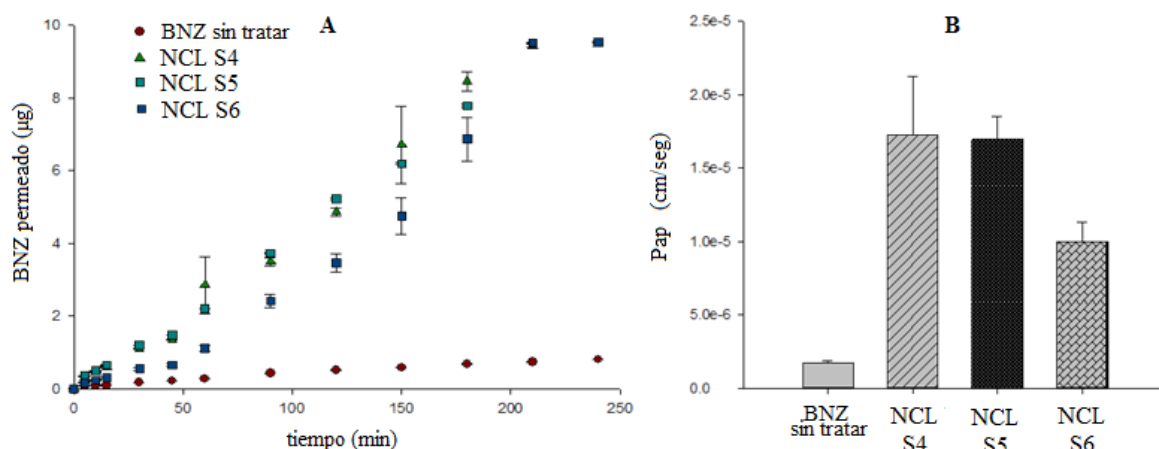


Figura 4.26. (A) Cantidad total de BNZ que pasa a través de la monocapa de células Caco-2 empleando el BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ. (B) P_{ap} de BNZ desde BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ.

El transporte a través de monocapas celulares de Caco-2 se evaluó, como se muestra en la Figura 4.26 A, mediante el análisis de BNZ permeado en el tiempo partiendo de BNZ sin tratar que se comparó con los resultados obtenidos para las NCLs. Tal como se observa, se produce un notable aumento de la permeación de BNZ cuando se encuentra encapsulado. Es probable que esto tenga relación con las propiedades previamente evaluadas de las NCLs de BNZ, principalmente el tamaño demostrado y la baja interacción con las mucinas.

En adición, fue calculada la P_{ap} de BNZ como se detalla en el Capítulo 2, Ecuación 2.7 (Página 41). La P_{ap} fue significativamente más elevada para las NCLs que para el BNZ sin tratamiento (ver Figura 4.26 B).

4.4.2.1.10. Evaluación de la captación celular de las nanocápsulas lipídicas

La capacidad de captación de las NCLs fue evaluada empleando citometría de flujo y microscopía confocal. Para ello se emplearon las NCLs fluorescentes, preparadas con NileRed.

4.4.2.1.10.1. Control de la captación de las nanocápsulas lipídicas empleando citometría de flujo

A través de la técnica de citometría de flujo se analizaron las características físicas y químicas de las NCLs a través de capacidad de ser captadas por un modelo celular. Se determinó el porcentaje de captación de las NCLs por parte de células Caco-2 en base a la fluorescencia de las mismas.

En la Figura 4.27 se comparan los resultados obtenidos para las células tratadas y no tratadas con los diferentes tipos de NCL.

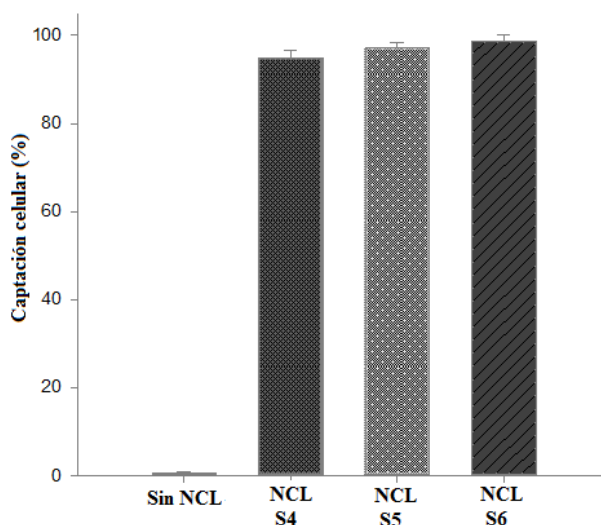


Figura 4.27. Eficiencia en la captación de NCLs por parte de células Caco-2.

A partir de los resultados de captación mostrados, puede verse que cerca del 100 % de las NCLs empleadas para este ensayo fueron captadas por las células y confirmaría que la selección de los excipientes lipídicos fue correcta y adecuada para este tipo de sistemas. Además, es importante destacar que los resultados mostrados representan sólo las células vivas.

4.4.2.1.10.2. Control de la captación de las nanocápsulas lipídicas empleando microscopía confocal

En la Figura 4.28 se observan las imágenes obtenidas por microscopía confocal (A: S4, B: S5 y C: S6), donde pueden observarse las NCLs y la monocapa celular. Las NCLs se observan en color rojo debido a que están cargadas con NileRed, la membrana celular, que

fue teñida con el colorante WGA, se visualiza en color verde y los núcleos de las células de color azul ya que fueron teñidos con DAPI.

Luego del tratamiento con las NCLs las células son lavadas y se observan por microscopía confocal. En las imágenes obtenidas se muestra claramente como las NCLs atravesaron la membrana celular y quedan en el interior de las células. Las imágenes también muestran una cierta acumulación de las partículas en las uniones entre las células, lo que plantea la potencial importancia de los mecanismos paracelulares en el transporte de fármacos a través de la monocapa.

Estos resultados son coincidentes con los descritos en el estudio por citometría de flujo (Figura 4.27) y demuestra la capacidad de las NCLs de BNZ de ser captadas por las células.

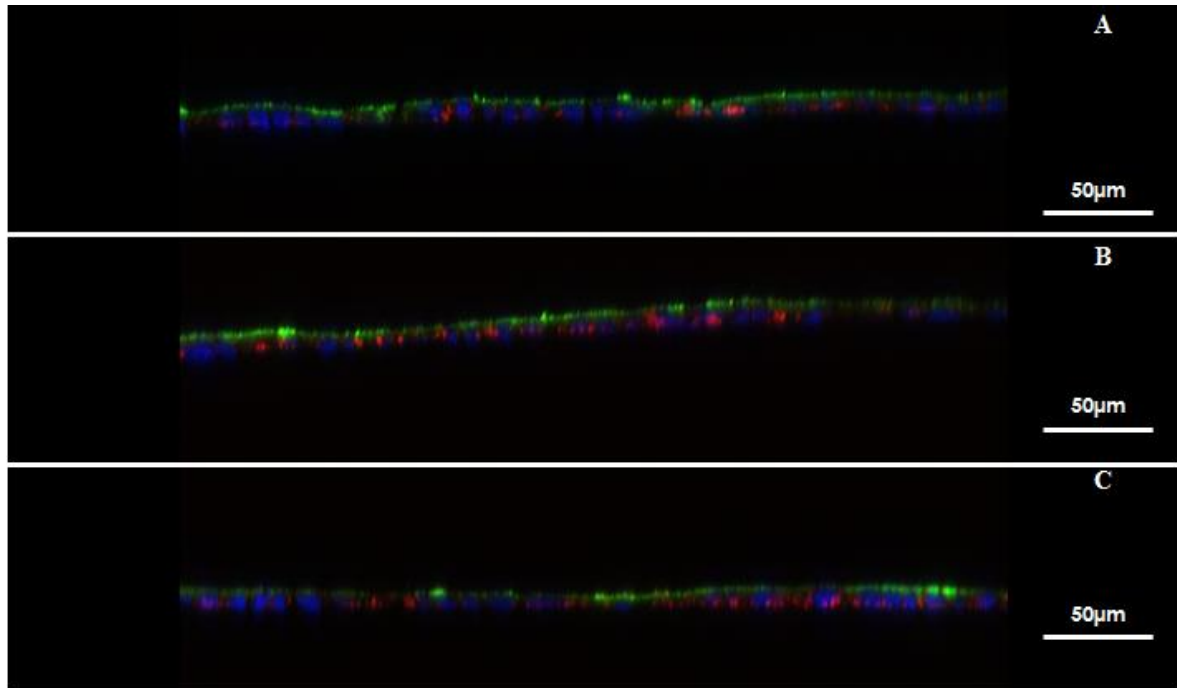


Figura 4.28. Micrografías obtenidas por microscopía confocal. Las NCLs se muestran en color rojo, las membranas celulares de verde y los núcleos de las células en azul. (A) NCLs S4, (B) NCLs S5 y (C) NCLs S6. La barra representa 50 μm .

4.4.2.2. Diseño y optimización durante la elaboración de nanocápsulas lipídicas de benznidazol

Luego de determinar que los mejores excipientes oleosos para este tipo de NCLs son aceites se buscó determinar la proporción de estos para obtener sistemas con características óptimas. Para ello se aplicó un diseño simple centrado que consistió de 24 ensayos.

Se estudiaron distintas proporciones de 4 diferentes aceites: Labrafac WL, Labrafac PG, Labrasol ALF y Capryol.

En la Tabla 4.12 se observan los experimentos realizados con diferentes proporciones de cada aceite, siendo la cantidad final constante e igual a 1,028 mg.

Tabla 4.12. Ensayos realizados y resultados obtenidos en el diseño.

Ensayo	Labrafac WL (mg)	Labrafac PG (mg)	Labrasol ALF (mg)	Capryol (mg)	$T_{particula}$ (nm)	IPd (nm)	Δ 15 (nm)	Δ 30 (nm)
1	514,00	0,00	514,00	0,00	28,1	0,099	0,0	51,5
2	0,00	0,00	514,00	514,00	297,7	0,453	258,0	1039,0
3	128,50	128,50	128,50	642,50	42,4	0,953	347,9	1488,8
4	0,00	0,00	1028,00	0,00	141,1	0,454	0,9	1,5
5	1028,00	0,00	0,00	0,00	55,8	0,084	0,2	103,4
6	514,00	514,00	0,00	0,00	55,8	0,036	103,0	776,2
7	514,00	0,00	0,00	514,00	41,6	0,252	257,7	1088,6
8	1028,00	0,00	0,00	0,00	54,5	0,092	0,5	103,7
9	128,50	642,50	128,50	128,50	36,7	0,108	193,8	1171,8
10	0,00	514,00	514,00	0,00	73,3	0,568	103,6	723,1
11	342,67	342,67	0,00	342,67	38,2	0,18	240,8	1206,4
12	642,50	128,50	128,50	128,50	42,4	0,332	90,1	504,4
13	0,00	342,67	342,67	342,67	48,4	0,542	249,6	1177,4
14	0,00	0,00	1028,00	0,00	255,5	0,367	0,8	1,9
15	0,00	514,00	0,00	514,00	123,3	0,642	359,9	1755,7
16	514,00	0,00	0,00	514,00	38,7	0,641	257,2	1081,9
17	0,00	1028,00	0,00	0,00	49,1	0,098	206,2	1450,9
18	342,67	0,00	342,67	342,67	37,6	0,246	173,0	722,0
19	0,00	0,00	0,00	1028,00	270,5	0,424	514,2	2066,0
20	0,00	0,00	0,00	1028,00	339,1	0,578	511,3	2060,4
21	0,00	1028,00	0,00	0,00	51,4	0,141	205,5	1445,3
22	128,50	128,50	642,50	128,50	32,5	0,865	90,8	452,7
23	257,00	257,00	257,00	257,00	26,6	0,335	183,4	905,5
24	342,67	342,67	342,67	0,00	31,4	0,118	68,4	516,4

Con estos resultados se analizó estadísticamente el modelo, en este sentido, en la Tabla 4.13 se detallan los indicadores del ensayo ANOVA para el diseño.

Tabla 4.13. Valores de indicadores estadísticos obtenidos del diseño.

	$T_{partícula}$ (nm)	IPd (nm)	$\Delta 15$ (nm)	$\Delta 30$ (nm)
Modelo	0,0001	0,0065	<0,0001	0,0001
Falta de ajuste	No significativo	No significativo	No significativo	No significativo
r^2 ajustado	0,762	0,369	0,99	0,99
r^2 predicho	0,745	0,256	0,97	0,99

Puede observarse que el modelo fue significativo para todas las respuestas estudiadas (los valores de p estuvieron por debajo de 0,05).

En todos los casos la falta de ajuste fue considerada no significativa, siendo el error bajo.

Por último para todas las respuestas los valores de los valores de r^2 ajustado y r^2 predicho fueron similares, estos parámetros comparan los valores obtenidos con los predichos por el programa.

Luego de comprobar que los indicadores estadísticos se encontraban dentro de los rangos deseados se procedió a la etapa de optimización. Las condiciones bajo las que se llevó a cabo este paso se muestran en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Restricciones de la optimización para la formulación de NCLs de BNZ.

Factor/Respuesta	Objetivo	Importancia
Labrafac WL	En el rango	3
Labrafac PG	En el rango	3
Labrasol ALF	En el rango	3
Capryol	En el rango	3
$T_{partícula}$ (nm)	Mínimo	4
IPd (nm)	Mínimo	4
$\Delta 15$ (nm)	Mínimo	3
$\Delta 30$ (nm)	Mínimo	3

Por último se obtuvieron las NCLs siguiendo el protocolo devuelto por el programa, el mismo es el sistema con mayor deseabilidad que se logró obtener ($D= 0,96$). En la Tabla 4.15 se observan los valores teóricos predichos por el programa y los resultados reales obtenidos.

Tabla 4.15. Protocolos y resultados del ensayo de optimización.

Factores	Labrafac WL (mg)	Labrafac PG (mg)	Labrasol ALF (mg)	Capryol (mg)
Teórica	883,71	0,00	144,29	0,00
Experimental	884,00	0,00	144,00	0,00
Respuestas	$T_{particula}$ (nm)	IPd (nm)	$\Delta 15$ (nm)	$\Delta 30$ (nm)
Teórica	26,60	0,126	0,163	89,20
Experimental	27,00	0,105	0,160	93,00

Como puede observarse en la Tabla 4.15 los resultados obtenidos para las NCLs de BNZ optimizadas fueron similares a los predichos por el programa.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que el diseño de experimentos y posterior proceso de optimización para la formulación de NCLs con diferente composición mostró ser un procedimiento eficaz.

4.4.2.2.1. Evaluación *in-vitro* de las nanocápsulas lipídicas de benznidazol optimizadas

4.4.2.2.1.1. Microscopía electrónica de transmisión

Las NCLs fueron observadas empleando MET y la imagen obtenida se muestra en la Figura 4.29.

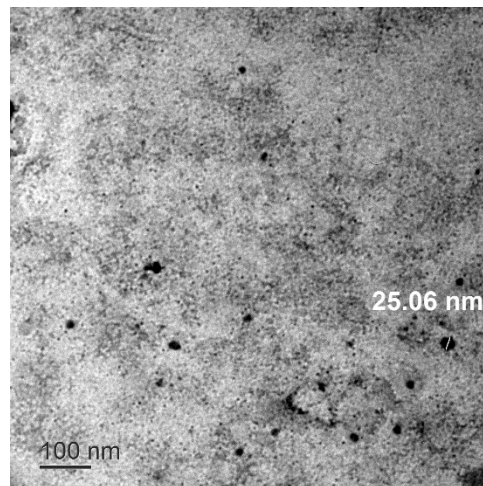


Figura 4.29. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de BNZ optimizadas. La barra representa 100 nm.

El diámetro observado mediante MET para las NCLs de BNZ optimizadas mostró ser similar al obtenido por dispersión de luz dinámica de 27 nm (ver en Tabla 4.15).

Por otro lado, se observa que las NCLs presentaron un tamaño y estructura homogénea, como puede evidenciarse en la Figura 4.29.

4.4.2.2.1.2. Eficiencia de encapsulación

Se calculó la E_fE de las cápsulas optimizadas, igual que para las NCLs de diferentes tamaños, en base a la relación entre la cantidad de fármaco total y la cantidad de fármaco que se obtiene de las NCLs.

En este caso el valor de E_fE obtenido fue de $93,21 \pm 0,03 \%$, lo cual indica que gran parte del BNZ empleado fue encapsulado dentro de las NCLs, siendo este valor superior también al obtenido para las NCLs S4, las cuales habían presentado la mayor E_fE previamente, además de tener un tamaño similar a las NCLs optimizadas.

4.4.2.2.1.3. Estabilidad de las nanocápsulas en diferentes medios

En este punto fue estudiado el comportamiento de los sistemas desarrollados en presencia de diferentes medios gastrointestinales simulados, mediante la medición de IPd y el control de la liberación de BNZ. Nuevamente, en los casos en que el IPd fue inferior a 0,3 nm, las muestras fueron consideradas homogéneas, siendo esto una medida de la estabilidad de las mismas.

En este sentido en la Figura 4.30 se presentan los resultados de IPd obtenidos para las NCLs optimizadas en los diferentes medios durante las 2 horas en las que se llevó a cabo el ensayo.

Las NCLs de BNZ optimizadas mostraron IPd menores a 0,3 nm en todos los medios estudiados, demostrando cierta estabilidad durante al menos las 2 horas que duró el ensayo.

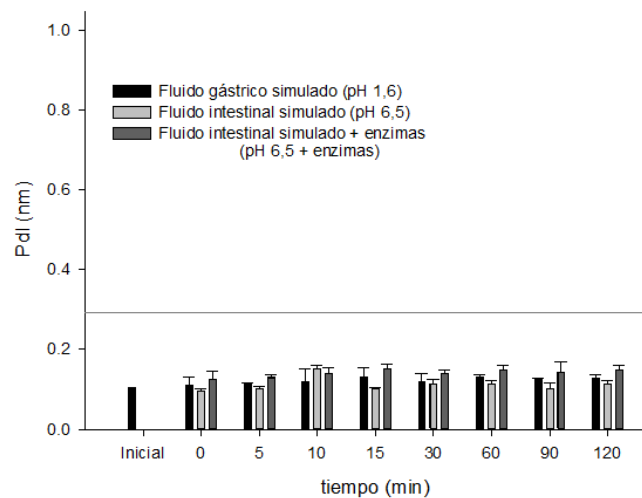


Figura 4.30. IPd de las NCLs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.

Por otro lado, en la Figura 4.31 se exhibe la liberación de BNZ a partir de estas NCLs en presencia de distintos medios. Claramente se puede ver que en el medio fluido intestinal simulado con enzimas, la velocidad de liberación de BNZ es mayor en comparación con los otros medios (fluidos gastrointestinales simulados sin el agregado de enzimas).

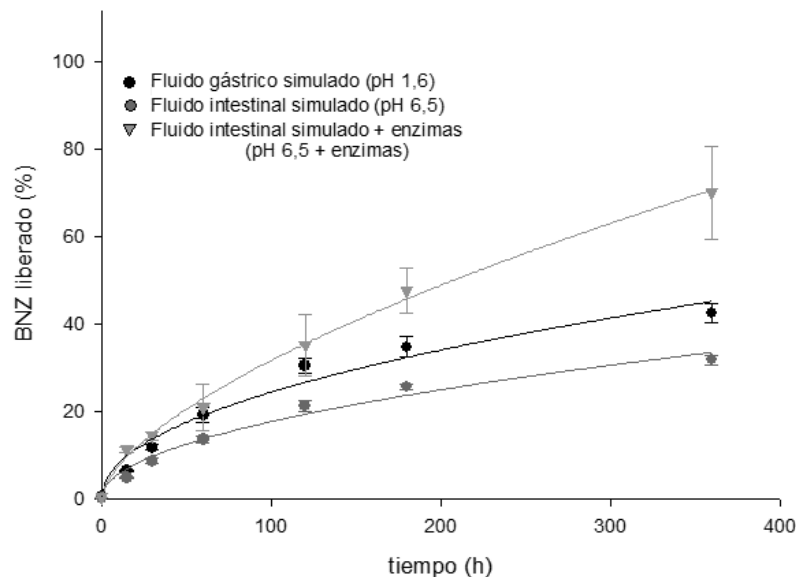


Figura 4.31. Perfiles de liberación de BNZ a partir de las NCLs de BNZ optimizadas en función del tiempo en presencia de fluidos gastrointestinales simulados.

Nuevamente se observa, en la Figura 4.31, que la liberación de BNZ a partir de estas NCLs en presencia del fluido intestinal simulado con enzimas muestra la mayor velocidad de liberación de BNZ. En presencia de los otros medios (fluidos gastrointestinales simulados sin el agregado de enzimas) la liberación de BNZ muestra perfiles con velocidades de disolución más bajas.

Sin embargo, a diferencia de lo observado para las NCLs sin optimizar, la liberación de BNZ no es completa en ninguno de los medios empleados, durante al menos las 6 horas de duración del ensayo, esto podría deberse a la estabilidad que presentan las NCLs optimizadas, una de las respuestas que se buscó optimizar en este trabajo.

4.4.2.2.1.4. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus

Las mucinas, o proteínas del mucus, podrían interactuar con las NCLs y de esa manera disminuir su movilidad, reduciendo así la capacidad de dichos sistemas de atravesar la membrana celular.

En la Figura 4.32 se observan los perfiles de distribución de tamaño obtenidos para las NCLs en presencia y ausencia de mucinas empleando el NanoSight. Previamente, se observó que las mucinas no interactúan con las NCLs convencionales (ver Tabla 4.11, Página 134), en esta sección se demostró que las NCLs optimizadas tampoco interactúan con las proteínas del mucus.

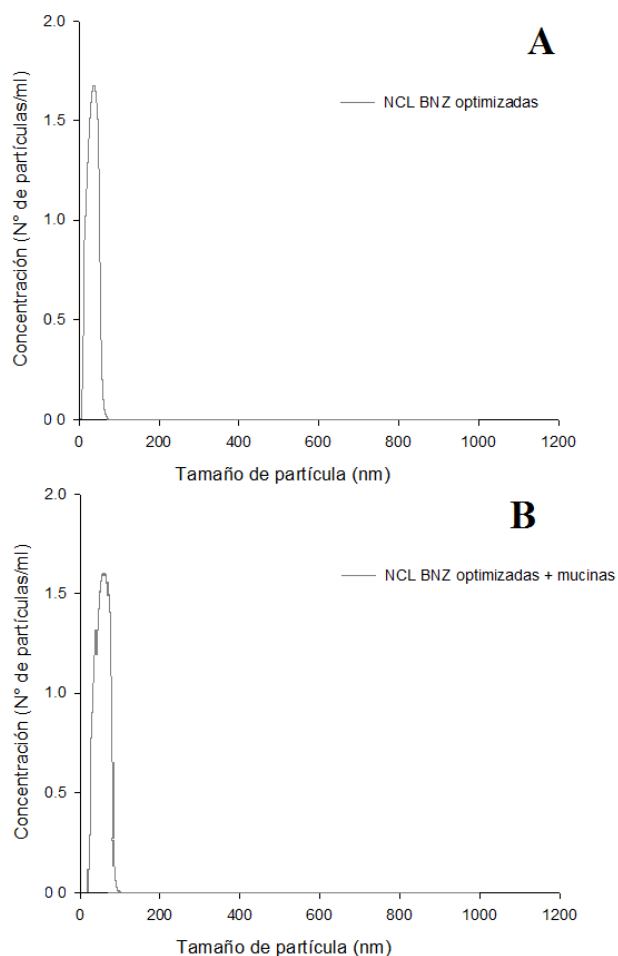


Figura 4.32. Perfiles de distribución del tamaño de (A) las NCLs y (B) las NCLs en presencia de proteínas del mucus.

Según los resultados obtenidos, las NCLs optimizadas parecerían no interactuar con las mucinas, dado que no mostraron cambios significativos en el tamaño relativo obtenido.

Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en relación a la interacción con las células Caco-2 y que muestran una buena permeación y captación de estas NCLs.

4.4.2.2.1.5. Activación del complemento

En la Figura 4.33 se compara el consumo del sistema de complemento para las NCLs sin fármaco (resultados mostrados previamente en la Figura 4.21) y las NCLs de BNZ optimizadas.

Las curvas son similares entre sí, demostrando que la carga de BNZ en las NCLs no estaría afectando significativamente la activación del complemento, por lo que el BNZ posiblemente se encontraría en el interior de las mismas.

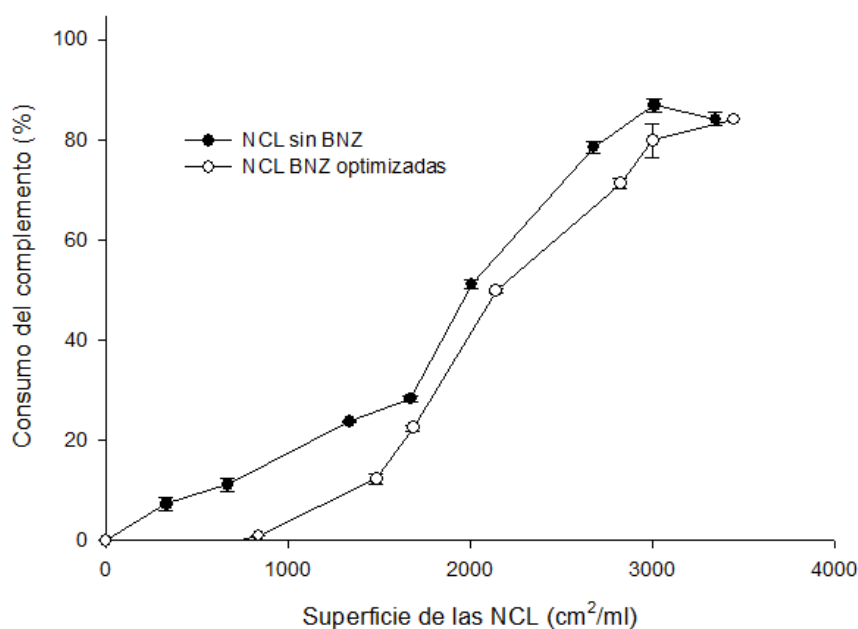


Figura 4.33. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs de BNZ

4.4.2.2.1.6. Ensayos de citotoxicidad de las nanocápsulas lipídicas para cultivos de células Caco-2

Con el objetivo de determinar el efecto de las NCLs sobre las células se ensayó la supervivencia de un cultivo de células Caco-2 en presencia de distintas concentraciones de las NCLs sin fármacos y las cápsulas de BNZ. A continuación se muestran resultados obtenidos a 24 y 48 horas posteriores a la exposición.

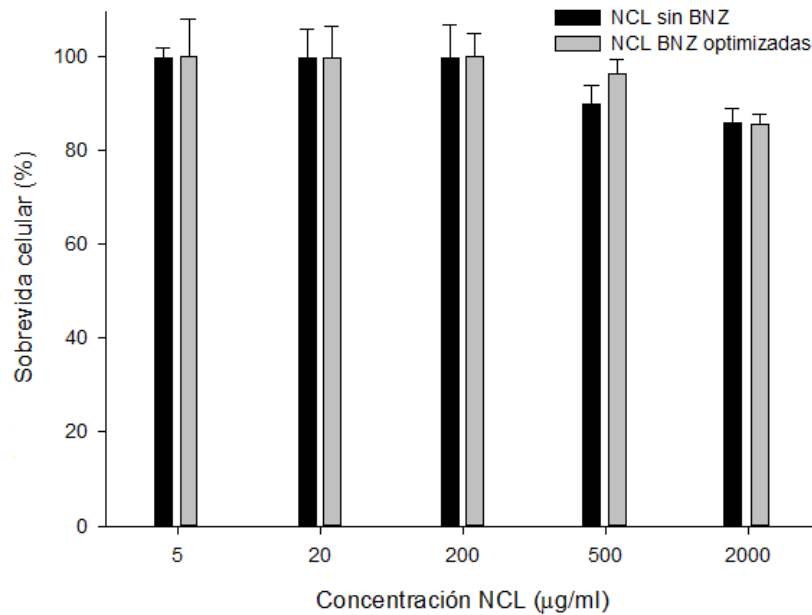


Figura 4.34. Supervivencia celular luego de 24 h de exposición a las NCLs.

En la Figura 4.34 se observan los perfiles de supervivencia celular en función de concentración de las NCLs sin BNZ y las NCLs de BNZ optimizadas. Puede observarse que luego de 24 horas de exposición a concentraciones de hasta 2000 µg/ml de NCLs la viabilidad de células Caco-2 es alta y similar para las NCLs sin fármaco y NCLs optimizadas. A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron luego de tratar durante 48 horas los cultivos celulares con las NCLs ensayadas.

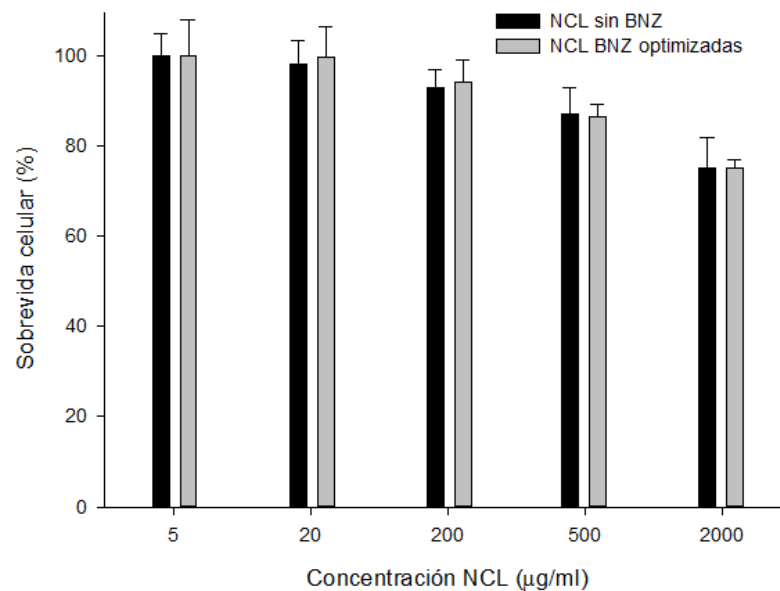


Figura 4.35. Supervivencia celular luego de 48 h de exposición a las NCLs.

En la Figura 4.35 se observa la supervivencia celular en función de las concentraciones de NCLs vacías y NCLs de BNZ optimizadas luego de 48 horas de exposición a las mismas. Puede observarse que la sobrevivencia celular es similar para las NCLs vacías y las cargadas con BNZ para todas las concentraciones en las que se trabajó.

4.4.2.2.1.7. Ensayos de integridad epitelial

4.4.2.2.1.7.1. Evolución de los valores de resistencia eléctrica transepitelial de cultivos de células Caco-2 durante las pruebas de permeabilidad

Los valores TEER no se alteraron significativamente durante la prueba de transporte, lo que indica el mantenimiento de la integridad de la membrana de la célula Caco-2 durante el desarrollo del experimento de transporte para las NCLs de BNZ optimizadas.

4.4.2.2.1.7.2. Control de integridad mediante microscopía electrónica de barrido

La integridad de la membrana de las células Caco-2 durante la prueba de transporte empleando NCLs de BNZ optimizadas se estudió también por MEB.

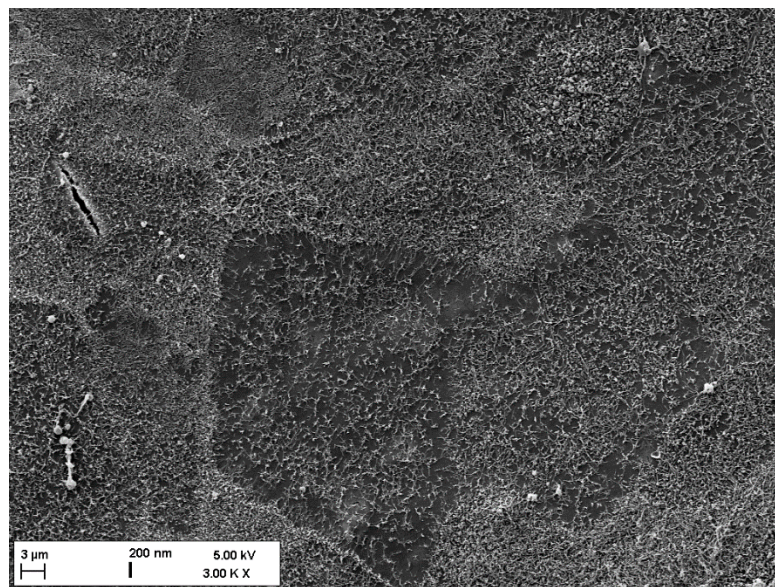


Figura 4.36. Micrografías obtenidas por MEB de los cultivos de células Caco-2 posterior a los ensayos de transporte con las NCLs de BNZ optimizadas. La barra representa 3 µm.

En la Figura 4.36 se muestran las micrografías obtenidas de la monocapa celular de Caco-2, en la cual se pueden observar las células posterior al ensayo de transporte empleando

NCLs optimizadas, donde son notables las conexiones entre las células vecinas que forman la monocapa.

4.4.2.2.1.8. Evaluación de la permeabilidad de la monocapa celular de benznidazol a partir de nanopartículas optimizadas

En este trabajo se estudió el transporte de BNZ desde el compartimiento apical al basolateral de los Transwells® donde se cultivaron células Caco-2. Para esto, se compararon los resultados obtenidos para el BNZ sin tratar y las NCLs optimizadas.

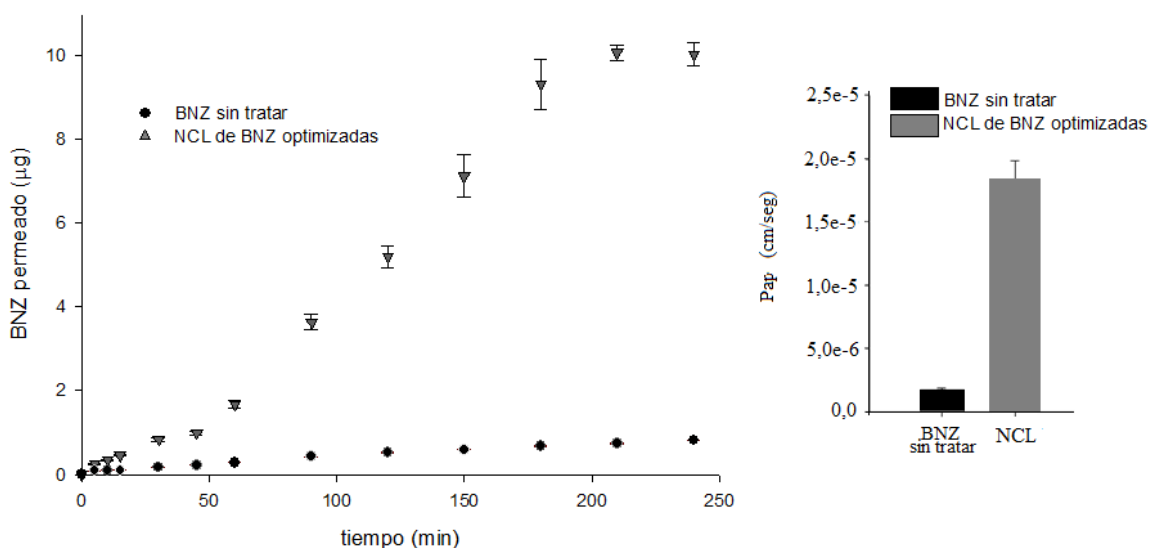


Figura 4.37. Cantidad de BNZ permeado a través de la monocapa de células Caco-2 empleando BNZ sin tratar y las NCLs de BNZ optimizadas (A). P_{ap} de BNZ partiendo de BNZ sin tratar y NCLs de BNZ (B).

El transporte a través de monocapas celulares de Caco-2 se evaluó, como se muestra en la Figura 4.37 A, mediante el análisis de la cantidad de BNZ permeado en el tiempo partiendo de BNZ sin tratar y las NCLs optimizadas. En este sentido, se observa una mejora significativa de la P_{ap} de BNZ cuando se emplean las NCLs.

En relación con lo mencionado previamente, la P_{ap} de BNZ, fue significativamente más elevada para las NCLs optimizadas que para el BNZ sin tratamiento (Figura 4.37 B), demostrando una vez más que este tipo de nanovectores permiten aumentar de manera significativa la permeabilidad del fármaco.

4.4.2.2.1.9. Evaluación de la captación celular de las nanocápsulas lipídicas

La capacidad de captación de las NCLs fue evaluada empleando citometría de flujo y microscopía confocal. Para ello se emplearon las NCLs optimizadas que fueron preparadas reemplazando el BNZ por NileRed.

4.4.2.2.1.9.1. Control de la captación de las nanocápsulas lipídicas empleando citometría de flujo

Se determinó el porcentaje de captación de las NCLs optimizadas por parte de células Caco-2 en base a la fluorescencia de las células, determinada por citometría de flujo. En la Figura 4.38 se comparan los resultados obtenidos para las células no tratadas con NCLs y las tratadas con las NCLs optimizadas.

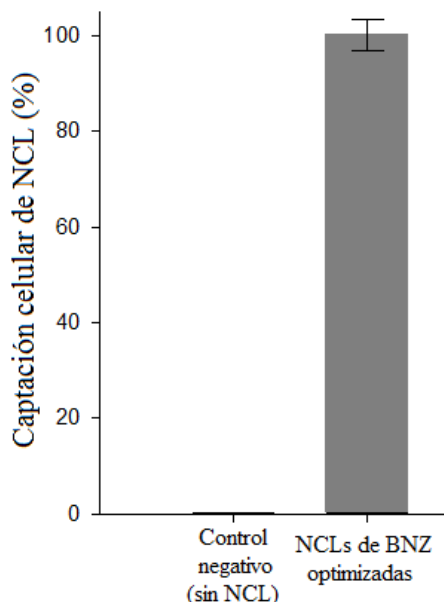


Figura 4.38. Eficiencia de captación de NCLs optimizadas por parte de células Caco-2.

A partir de los resultados de captación mostrados, puede verse que cerca del 100 % de las NCLs empleadas para este ensayo fueron captadas por las células. En este sentido, se demuestra que las NCLs optimizadas de BNZ sería una alternativa tecnológica eficaz para aumentar la permeabilidad del fármaco, al menos en este ensayo *in-vitro*.

4.4.2.2.1.9.2. Control de la captación de las nanocápsulas lipídicas empleando microscopía confocal

En la Figura 4.39 se observan la imagen obtenida por microscopía confocal, donde pueden observarse las NCLs y la monocapa celular. Nuevamente, las NCLs se observan en color rojo debido a que están cargadas con NileRed, la membrana celular, teñida con WGA se visualiza en color verde y los núcleos de las células de color azul ya que fueron teñidos con DAPI.

Luego del tratamiento con las NCLs las células son lavadas y se observan por microscopía confocal. En la Figura 4.39 se muestra claramente como las NCLs atraviesan la membrana celular y quedan retenidas en el interior de las células.

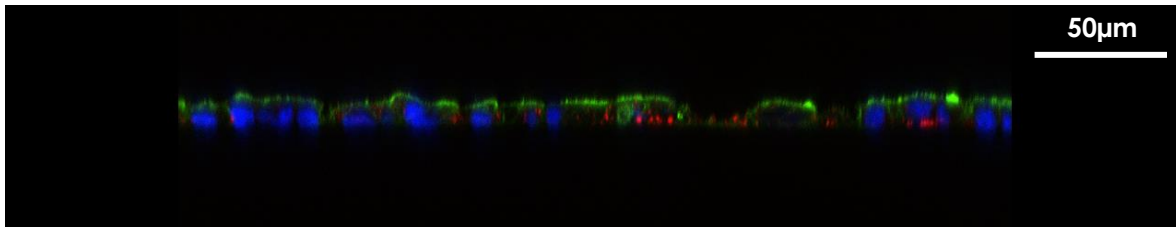


Figura 4.39. Imagen obtenida por microscopía confocal. Las NCLs se muestran en color rojo, las membranas celulares de verde y los núcleos de las células en azul. La barra representa 50 μm .

4.5. Conclusiones

Se desarrollaron NPs de BNZ mediante el diseño de experimentos con posterior optimización. Este trabajo demuestra que las condiciones para llevar a cabo la preparación de los nanosistemas de BNZ y P-188 fueron significativamente críticas en las características finales obtenidas.

El $T_{particula}$ se redujo, mientras que la BNZ_{NC} y la S_{BNZ} se incrementaron mediante el procedimiento de optimización.

Las condiciones óptimas para la preparación de NPs incluyeron el uso de una solución de BNZ de 26 mg/ml, de 15 mg/ml de P-188 y el 30% de fase orgánica. Tanto la temperatura de cristalización como la velocidad de agitación no pudieron ser modeladas como factores significativos sobre las respuestas estudiadas.

En las condiciones de deseabilidad ($D = 0,99$), el BNZ_{NC} fue del 98 %, el $T_{particula}$ 57 nm y la S_{BNZ} 3,75 mg/ml. Finalmente, este sistema optimizado se caracterizó *in-vitro*, demostrando un aumento significativo de la P_{ap} de BNZ.

Por otro lado, se demostró que las NPs de BNZ formuladas a través de este proceso de optimización exhiben un notable efecto en la inhibición del crecimiento amastigotes de *T. cruzi* en miocitos cardiacos primarios. También se confirmó que todos los ratones sobrevivieron a la infección aguda con 15 dosis de 25 o 50 mg de BNZ/kg/día de NPs de BNZ durante el ensayo.

Estos hallazgos llevaron a la conclusión de que el tratamiento con NPs de BNZ es un enfoque muy conveniente, en diferentes dosis, para tratar con éxito la enfermedad de Chagas en un modelo experimental de infección aguda por *T. cruzi*. Adicionalmente, ya que esta formulación puede obtenerse como una suspensión estable en medios acuosos podría facilitar la administración de BNZ en neonatos y niños.

Se obtuvieron NCLs de BNZ de 28, 48 y 103 nm, empleando los mismos componentes en diferentes concentraciones. Las NCLs fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, demostrando no interaccionar con las proteínas del mucus y no generar cambios significativos en la activación del sistema del complemento. Además mostraron mantener una alta sobrevivencia celular luego de 24 y 48 hs de tratamiento. Las NCLs permitieron

aumentar la P_{ap} de BNZ hasta 10 veces, siendo controladas durante este proceso la integridad de la monocapa y la captación de las NCLs.

Por otro lado, se formularon cápsulas de BNZ empleando diseño y posterior optimización de experimentos, obteniéndose NCLs de 27 nm, con alta estabilidad controlada a 15 y 30 días. Nuevamente, las NCLs fueron estudiadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, demostrando no interactuar con las proteínas del mucus, y tampoco produjeron cambios significativos en la activación del sistema del complemento. Finalmente, demostraron una alta sobrevivencia celular tanto 24 como 48 hs posteriores al tratamiento. Las NCLs permitieron aumentar la P_{ap} de BNZ

En este sentido, se concluye que las NCLs de BNZ representan una alternativa atractiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

4.6. Referencias

- (1) Montgomery, S. P.; Starr, M. C.; Cantey, P. T.; Edwards, M. S.; Meymandi, S. K. “Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease.” *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90* (5), 814–818.
- (2) Urbina, J. A. “Specific Treatment of Chagas Disease: Current Status and New Developments.” *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2001**, *14* (6), 733–741.
- (3) Fundación Oswaldo Cruz. Tratamiento Etiológico de La Enfermedad de Chagas. Conclusiones de Una Consulta Técnica. In *Programa PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigación y Adiestramiento en Enfermedades Tropicales (TDR)*; **1998**; 1–33.
- (4) Fonseca-Berzal, C.; Palmeiro-Roldán, R.; Escario, J. A.; Torrado, S.; Arán, V. J.; Torrado-Santiago, S.; Gómez-Barrio, A. “Novel Solid Dispersions of Benznidazole: Preparation, Dissolution Profile and Biological Evaluation as Alternative Antichagasic Drug Delivery System.” *Exp. Parasitol.* **2015**, *149*, 84–91.
- (5) Leonardi, D.; Salomon, C. J. “Unexpected Performance of Physical Mixtures over Solid Dispersions on the Dissolution Behavior of Benznidazole from Tablets.” *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (3), 1016–1023.
- (6) Leonardi, D.; Bombardiere, M. E.; Salomon, C. J. “Effects of Benznidazole:Cyclodextrin Complexes on the Drug Bioavailability upon Oral Administration to Rats.” *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 543–548.
- (7) Soares-Sobrinho, J. L.; Santos, F. L. A.; Lyra, M. A. M.; Alves, L. D. S.; Rolim, L. A.; Lima, A. A. N.; Nunes, L. C. C.; Soares, M. F. R.; Rolim-Neto, P. J.; Torres-Labandeira, J. J. “Benznidazole Drug Delivery by Binary and Multicomponent Inclusion Complexes Using Cyclodextrins and Polymers.” *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89* (2), 323–330.

- (8) Morilla, M. .; Benavidez, P.; Lopez, M. .; Bakas, L.; Romero, E. . “Development and in Vitro Characterisation of a Benznidazole Liposomal Formulation.” *Int. J. Pharm.* **2002**, 249 (1–2), 89–99.
- (9) Sánchez, G.; Cuellar, D.; Zulantay, I.; Gajardo, M.; González-Martin, G. “Cytotoxicity and Trypanocidal Activity of Nifurtimox Encapsulated in Ethylcyanoacrylate Nanoparticles.” *Biol. Res.* **2002**, 35 (1), 39–45.
- (10) Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J. P. “Development and Characterization of a Novel Lipid Nanocapsule Formulation of Sn38 for Oral Administration.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, 79 (1), 181–188.
- (11) Peltier, S.; Oger, J.-M.; Lagarce, F.; Couet, W.; Benoît, J.-P. “Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules.” *Pharm. Res.* **2006**, 23 (6), 1243–1250.
- (12) Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J.-P. “The Gastrointestinal Stability of Lipid Nanocapsules.” *Int. J. Pharm.* **2009**, 379 (2), 260–265.
- (13) Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J.-P. “Lipid Nanocarriers Improve Paclitaxel Transport throughout Human Intestinal Epithelial Cells by Using Vesicle-Mediated Transcytosis.” *J. Control. Release* **2009**, 140 (2), 174–181.
- (14) Cornier, J.; Owen, A.; Kwade, A.; Van de Voorde, M. *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Alemania, **2017**.
- (15) Sahu, B. P.; Das, M. K. “Nanosuspension for Enhancement of Oral Bioavailability of Felodipine.” *Appl. Nanosci.* **2014**, 4 (2), 189–197.
- (16) Singh, S. K.; Makadia, V.; Sharma, S.; Rashid, M.; Shahi, S.; Mishra, P. R.; Wahajuddin, M.; Gayen, J. R. “Preparation and In-Vitro/in-Vivo Characterization of Trans-Resveratrol Nanocrystals for Oral Administration.” *Drug Deliv. Transl. Res.* **2017**, 7 (3), 395–407.

- (17) Salvati, A.; Aberg, C.; dos Santos, T.; Varela, J.; Pinto, P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. “Experimental and Theoretical Comparison of Intracellular Import of Polymeric Nanoparticles and Small Molecules: Toward Models of Uptake Kinetics.” *Nanomedicine - Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, 7, 818–826.
- (18) Murgia, X.; Yasar, H.; Carvalho-Wodarz, C.; Loretz, B.; Gordon, S.; Schwarzkopf, K.; Schaefer, U.; Lehr, C.-M. M. “Modelling the Bronchial Barrier in Pulmonary Drug Delivery: A Human Bronchial Epithelial Cell Line Supplemented with Human Tracheal Mucus.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, 118, 79–88.
- (19) Ghaffarian, R.; Muro, S. “Models and Methods to Evaluate Transport of Drug Delivery Systems Across Cellular Barriers.” *J. Vis. Exp.* **2013**, No. 80.
- (20) Khalil, N.; de Mattos, A.; Moraes Moreira Carraro, T.; Ludwig, D.; Mainardes, R. “Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases.” *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19 (41), 7316–7329.
- (21) Toledo, M. J. O.; Bahia, M. T.; Veloso, V. M.; Carneiro, C. M.; Machado-Coelho, G. L. L.; Alves, C. F.; Martins, H. R.; Cruz, R. E.; Tafuri, W. L.; Lana, M. “Effects of Specific Treatment on Parasitological and Histopathological Parameters in Mice Infected with Different *Trypanosoma Cruzi* Clonal Genotypes.” *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 53 (6), 1045–1053.
- (22) Grosso, N. L.; Bua, J.; Perrone, A. E.; Gonzalez, M. N.; Bustos, P. L.; Postan, M.; Fichera, L. E. “*Trypanosoma Cruzi*: Biological Characterization of a Isolate from an Endemic Area and Its Susceptibility to Conventional Drugs.” *Exp. Parasitol.* **2010**, 126 (2), 239–244.
- (23) Palmeiro-Roldán, R.; Fonseca-Berzal, C.; Gómez-Barrio, A.; Arán, V. J.; Escario, J. A.; Torrado-Durán, S.; Torrado-Santiago, S. “Development of Novel Benznidazole Formulations: Physicochemical Characterization and in Vivo Evaluation on Parasitemia Reduction in Chagas Disease.” *Int. J. Pharm.* **2014**, 472 (1–2), 110–117.

- (24) Gamboa, G. V. U.; Palma, S. D.; Lifschitz, A.; Ballent, M.; Lanusse, C.; Passirani, C.; Benoit, J. P.; Allemandi, D. A. “Ivermectin-Loaded Lipid Nanocapsules: Toward the Development of a New Antiparasitic Delivery System for Veterinary Applications.” *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (5), 1945–1953.
- (25) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.; Benoit, J. “A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers.” *Pharm. Res.* **2002**, *19* (6), 875–880.
- (26) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. “Evaluation of Pegylated Lipid Nanocapsules versus Complement System Activation and Macrophage Uptake.” *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *78A* (3), 620–628.
- (27) Moghimi, S. M.; Andersen, A. J.; Ahmadvand, D.; Wibroe, P. P.; Andresen, T. L.; Hunter, A. C. “Material Properties in Complement Activation.” *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (12), 1000–1007.
- (28) Thwala, L. N.; Beloqui, A.; Csaba, N. S.; González-Touceda, D.; Tovar, S.; Dieguez, C.; Alonso, M. J.; Prétat, V. “The Interaction of Protamine Nanocapsules with the Intestinal Epithelium: A Mechanistic Approach.” *J. Control. Release* **2016**, *243*, 109–120.
- (29) Moysan, E.; González-Fernández, Y.; Lautram, N.; Béjaud, J.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P. “An Innovative Hydrogel of Gemcitabine-Loaded Lipid Nanocapsules: When the Drug Is a Key Player of the Nanomedicine Structure.” *Soft Matter* **2014**, *10* (11), 1767–1777.

Capítulo 5.

PRAZIQUANTEL

5.1. Índice

5.1.	Índice.....	162
5.2.	Introducción	163
5.3.	Formulaciones.....	164
5.4.	Resultados	165
5.4.1.	Micro- y Nanopartículas.....	165
5.4.1.1.	Cantidad de praziquantel nanocristalizado y rendimiento.....	165
5.4.1.2.	Tamaño de partícula y solubilidad acuosa	165
5.4.1.3.	Calorimetría diferencial de barrido	166
5.4.1.4.	Análisis de difracción de rayos X	167
5.4.1.5.	Ensayos de disolución	168
5.4.1.6.	Evaluación del metabolismo energético en ratones Balb/c.	171
5.4.2.	Nanocápsulas lipídicas de praziquantel	173
5.4.2.1.	Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad.....	173
5.4.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión.....	174
5.4.2.3.	Eficiencia de encapsulación.....	175
5.4.2.4.	Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus	175
5.4.2.5.	Activación del complemento	175
5.4.2.6.	Ensayos de citotoxicidad de nanocápsulas lipídicas en cultivos de células Caco-2	176
5.4.2.7.	Evaluación de la eficacia antiparasitaria <i>in-vitro</i> de las nanocápsulas lipídicas de praziquantel.....	178
5.5.	Conclusiones	179
5.6.	Bibliografía	180

5.2. Introducción

El PZQ es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro utilizado, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, como agente quimioterapéutico contra endoparásitos, cestodos, incluyendo al género *Taenia* (tenias), y trematodos¹. En particular, es el fármaco de elección para el tratamiento de la esquistosomiasis, una enfermedad tropical desatendida causada por parásitos *Schistosoma*. Esta patología es la segunda enfermedad parasitaria más prevalente después de la malaria² y se estima que afecta a alrededor de 207 millones de personas³.

Como se mencionó en el Capítulo 1, en la actualidad PZQ se sintetiza y se administra como un racemato, pero solo el levo-PZQ tiene efecto farmacológico. El isómero dextro-PZQ aparentemente contribuye solo al sabor amargo de la droga⁴.

El PZQ se encuentra catalogado como Clase II en el SCB⁵, ya que su baja solubilidad dificulta su desempeño en sistemas biológicos⁶. Se requieren grandes dosis de PZQ para lograr concentraciones óptimas en el sitio de acción debido a su pobre solubilidad acuosa (0,04 g/100 ml)^{7,8}.

5.3. Formulaciones

Por lo mencionado en el punto anterior y con el objetivo de aumentar la absorción y la eficacia de PZQ se formularon sistemas que permitieron incrementar la solubilidad acuosa aparente del fármaco y la velocidad de disolución.

En la primera etapa y por medio del procedimiento de nanocristalización controlada se formularon NPs de PZQ empleando P-188 y P-407 y PVA como polímeros transportadores, los protocolos detallados se describen en el Capítulo 2, Tabla 2.3 (Pág. 30). El método de cristalización controlada se llevó a cabo empleando dos tipos de agitación: magnética (300 rpm) y homogeneizador (7000 rpm). Posteriormente, las NPs de PZQ fueron evaluadas *in-vivo* y sobre el metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps* en modelo animal.

Finalmente se desarrollaron NCLs de PZQ en base al método de inversión de fase descrito en el Capítulo 2, punto 2.2.2.1.5.1 (Página 32). Las mismas fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, y se evaluó su efecto frente a gusanos *S. mansoni*.

5.4. Resultados

5.4.1. Micro- y Nanopartículas

Se llevó a cabo el desarrollo de NPs de PZQ empleando la metodología descrita en el punto 2.2.2.1.2. Dichas NPs fueron obtenidas a partir de nanosuspensiones de PZQ y P-188, P-407 o PVA, mediante agitación magnética y homogeneización. Las mismas fueron secadas por liofilización.

5.4.1.1. Cantidad de praziquantel nanocristalizado y rendimiento

Se determinaron las cantidades de PZQ_{NC} y los R en las muestras ensayadas, estudiando el efecto de los estabilizantes empleados y las diferentes proporciones de los mismos, los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. PZQ_{NC} y R de los sistemas.

Sistema	Composición/Agitación	PZQ_{NC} (%)	R (%)
NP 1	P-188 / Ag. M	97,53±0,02	83,12±0,04
NP 2	P-407/ Ag. M	95,81±0,04	84,13±0,05
NP 3	PVA/ Ag. M	95,53±0,04	82,84±0,02
NP 4	P-188/ Ag. H	96,12±0,03	81,52±0,01
NP 5	P-407/ Ag. H	97,24±0,04	81,63±0,02
NP 6	PVA/ Ag. H	95,43±0,05	75,92±0,03

En todos los sistemas la proporción de PZQ cristalizada fue superior al 95 %, indicando que la carga de fármaco en las NPs es elevada. En el caso del cálculo del R , en todos los sistemas formulados este fue mayor al 75 %.

Tanto las cantidades de PZQ_{NC} como los valores de R asociados fueron elevados e independientes del estabilizante y de la metodología de agitación.

5.4.1.2. Tamaño de partícula y solubilidad acuosa

Se caracterizaron las partículas obtenidas en términos de $T_{partícula}$ y S_{PZQ} , los resultados se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. $T_{particula}$ y S_{PZQ} en agua de las partículas

Sistemas	Composición/Agitación	$T_{particula}$ (nm)	IP_d (nm)	S_{PZQ} (mg/l)
NP 1	P-188 / Ag. M	75,2±0,1	0,093±0,002	4610,2±0,5
NP 2	P-407/ Ag. M	107,6±0,5	0,031±0,002	7139,3±0,4
NP 3	PVA/ Ag. M	62,4±0,1	0,042±0,001	7978,2±0,6
NP 4	P-188/ Ag. H	74,6±0,4	0,193±0,004	4705,6±0,8
NP 5	P-407/ Ag. H	282,6±0,2	0,303±0,002	5340,5±0,1
NP 6	PVA/ Ag. H	105,4±0,5	0,243±0,001	6882,3±0,6

El $T_{particula}$ promedio de las partículas obtenidas estuvo entre 62 y 282 nm, como se muestra en la Tabla 5.2. En los sistemas en los que se empleó P-407 se obtuvieron los valores más altos (107 o 282 nm, con agitación magnética u homogeneizador respectivamente). En aquellos casos donde fue empleado el P-188, no se observaron diferencias en el $T_{particula}$ obtenido para las NPs entre los dos tipos de agitación. Es posible postular que la diferencia del tamaño cuando se emplean los poloxámeros, independientemente del sistema de agitación, estaría relacionado con el PM de los estabilizantes y la longitud de las cadenas que estabilizan a las NPs. A mayor longitud de cadenas poliméricas, mayor sería el tamaño de las NPs. Finalmente, al emplear PVA, el $T_{particula}$ aumentó en el caso en que las nanosuspensiones fueron realizadas empleando el homogeneizador (pasando de 62 a 105 nm). Estos resultados difieren de los reportados por Reddy y colaboradores, quienes formularon NPs poliméricas con P-188 mediante la aplicación de técnicas de optimización estadística para establecer la interrelación entre variables independientes y variables de respuesta. Uno de los parámetros evaluados fue la velocidad de agitación y los resultados mostraron que a mayor velocidad (2500 rpm), se formaron las NPs de menor tamaño⁹.

En todos los casos las partículas mostraron ser monodispersas con respecto al tamaño, siendo los valores de IP_d inferiores a 0,3 nm.

La formulación de este tipo de NPs permitió aumentar la S_{PZQ} aparente hasta 19 veces con respecto al fármaco de partida.

5.4.1.3. Calorimetría diferencial de barrido

Como se mencionó en el Capítulo 3 una de las técnicas más utilizadas para estudiar las interacciones entre los fármacos y los excipientes es la CDB, ya que a través de un análisis térmico es posible observar estados de transición vítrea de un sólido frente a incrementos en

la temperatura, además de evaluar potenciales transiciones de un estado cristalino a amorfo si se producen cambios en el punto de fusión del fármaco¹⁰.

Con el fin de evaluar la interacción entre los componentes que forman las NPs, se realizaron los estudios de CDB del PZQ sin tratar y los sistemas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Análisis térmico de los nanosistemas y sus componentes.

Muestras	ΔH_m (J/g)				C_m (%)
	P-188	P-407	PVA	PZQ (Temperatura de fusión: 143,25 °C)	
PZQ sin tratar	-	-	-	153,21	100,00
P-188	142,13	-	-	-	-
P-407	-	107,93	-	-	-
PVA	-	-	151,44	-	-
NPs PZQ-P188 M	58,36	-	-	101,22	66,07
NPs PZQ-P188 H	63,47	-	-	107,94	70,45
NPs PZQ-P407 M	-	55,75	-	102,62	66,98
NPs PZQ-P407 H	-	78,36	-	114,31	74,61
NPs PZQ-PVA M	-	-	44,37	54,51	35,58
NPs PZQ-PVA H	-	-	64,41	63,25	41,28

Los valores de ΔH_m de PZQ, las NPs y los componentes de las mismas se muestran en la Tabla 5.3. El análisis térmico del fármaco sin tratamiento indicó un pico endotérmico a 143,25 °C (con un valor de ΔH_m de 153,21 J/g). La entalpía para los nanosistemas mostró en todos los casos valores más bajos que los obtenidos para PZQ sin tratar. Sin embargo, cuando fueron empleadas NPs formuladas con los poloxámeros los valores de ΔH_m para PZQ fueron más altos y cercanos a lo obtenido para PZQ sin tratamiento, respecto a las NPs formuladas con PVA.

Se calculó el 100 % de C_m en base al valor obtenido para PZQ de partida. Como puede observarse en la Tabla 5.3, si bien hubo una disminución de la cristalinidad del PZQ en los sistemas formulados, este no se encontró en un estado completamente amorfo en ninguno de los sistemas estudiados.

5.4.1.4. Análisis de difracción de rayos X

La Figura 5.1 se muestran los espectros de DRX de PZQ sin tratar y de las NPs de PZQ obtenidas con agitación magnética y homogeneización, empleando P-188, P-407 y PVA.

El PZQ de partida presentó un pico intenso alrededor de 20°. El mismo pico se observó en todos los nanosistemas estudiados, con intensidad similar para los sistemas formulados con los poloxámeros, y de menor intensidad en aquellos sistemas en los que se empleó PVA. Estos resultados coinciden con los obtenidos por CDB, en donde queda demostrado que el fármaco no pierde completamente su cristalinidad, y de que en aquellas NPs formuladas con PVA la cristalinidad del PZQ se muestra más reducida que en el resto de los sistemas. Un resultado similar fue obtenido en la formulación con poloxámeros de nanocristales de ezetimib, fármaco que inhibe selectivamente la absorción de colesterol. En ese trabajo se demostró que la cristalinidad de ezetimib no se modificó luego del proceso de nanoprecipitación al estar estilizado con P-407¹¹.

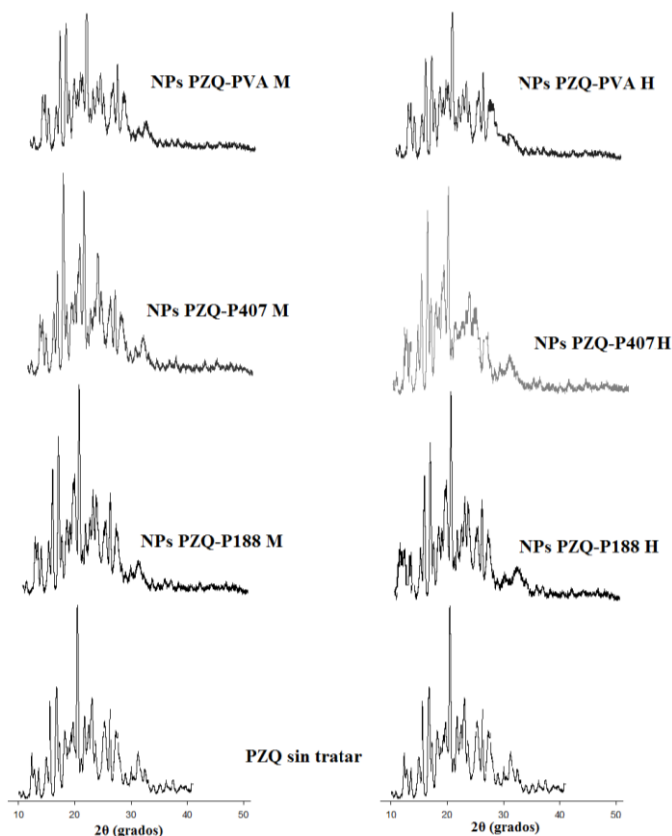


Figura 5.1. Difractogramas de PZQ sin tratar y las NPs de PZQ formuladas.

5.4.1.5. Ensayos de disolución

En las Figuras 5.2, 5.3 y 5.4 se muestran los perfiles de disolución del PZQ nanoformulado y del PZQ sin tratar. Los resultados obtenidos son representados por puntos y los ajustes correspondientes por líneas.

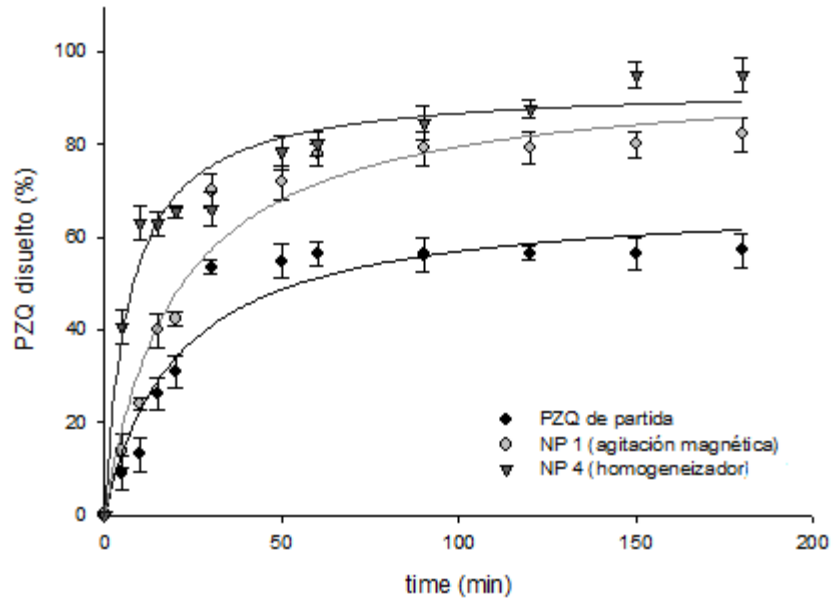


Figura 5.2. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de P-188.

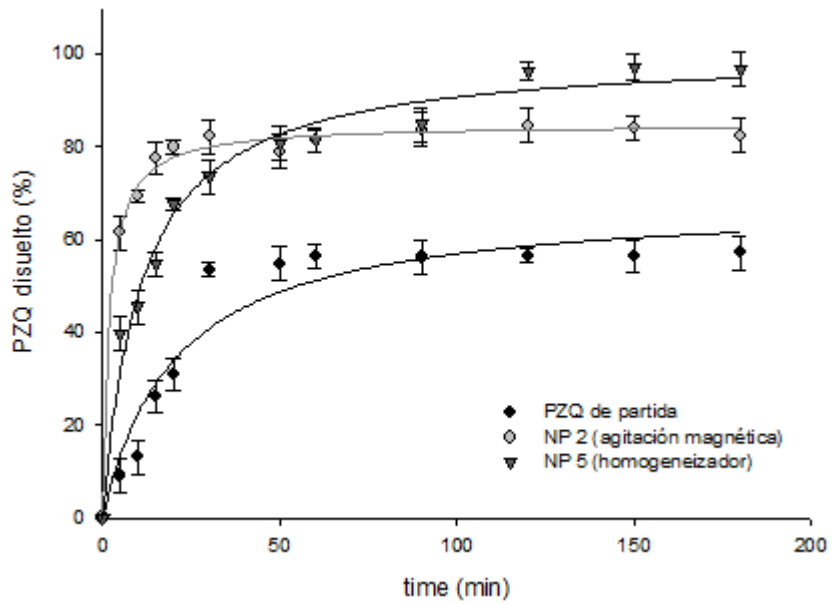


Figura 5.3. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de P-407.

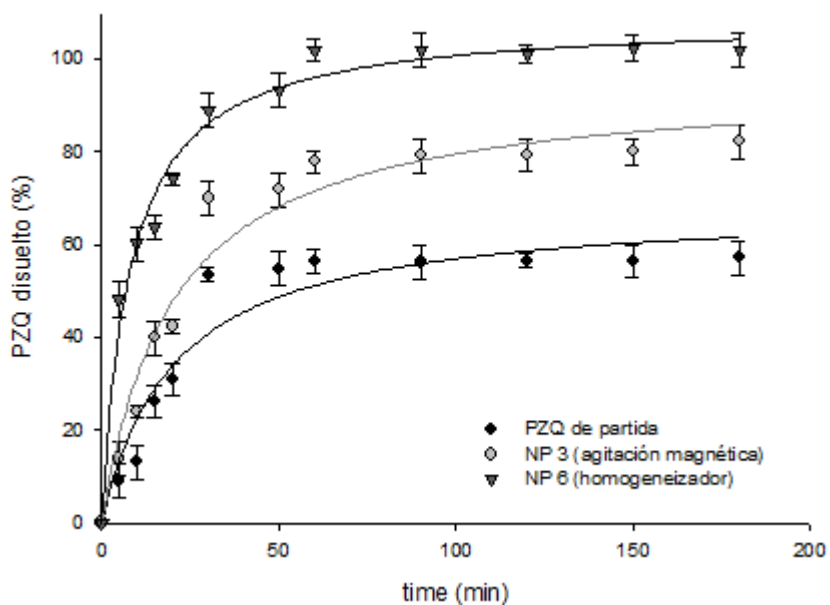


Figura 5.4. Perfil de disolución de PZQ en las NPs de PVA.

En todos los sistemas formulados la velocidad de disolución de PZQ fue superior a la obtenida a partir de PZQ sin tratar.

En la Figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos para los nanosistemas formulados con P-188. Durante los primeros 30 minutos del ensayo, las NPs formulados con agitación magnética disolvieron menor cantidad de PZQ en comparación con las NPs formuladas a alta velocidad (homogeneizador). A partir de los 60 minutos, las diferencias entre los perfiles de disolución resultaron menores. Este fenómeno se debería al marcado efecto tensioactivo que ejerce el P-188, que posiblemente se deposita en mayor cantidad en las partículas de mayor tamaño, obtenidas por homogeneización, y que favorece la disolución del PZQ.

Con respecto a las NPs obtenidas a partir de P-407 (Figura 5.3) la velocidad de disolución fue significativamente superior durante los primeros 30 minutos del experimento para aquellas desarrolladas empleando agitación magnética respecto al empleo de homogeneizador, que se podría relacionar con el menor tamaño de partícula de esos nanocrisales, que favorece una rápida disolución. A partir de los 60 minutos, los perfiles de disolución resultaron similares hasta el final del ensayo.

Por último, en la Figura 5.4 se observan los perfiles de disolución de las NPs formuladas a partir de PVA. Al igual que los resultados obtenidos con P-188, la agitación magnética genera

NPs que presentan una menor velocidad de disolución que las desarrolladas empleando el homogeneizador.

5.4.1.6. Evaluación del metabolismo energético en ratones Balb/c.

Durante este estudio *in-vivo* se analizó el efecto metabólico de diferentes formulaciones de PZQ en el metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps* dentro de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c hembras infectados con ese modelo experimental.

5.4.1.6.1. Glucólisis

La concentración de glucosa en los grupos P-188 y NPs 2 (NPs de PZQ/P-407) se vio aumentada ($p < 0,05$). En los grupos NPs 1 (NPs de PZQ/P-188) y NPs 2 fue posible detectar un aumento de 100 veces en la producción de piruvato por parte de los cisticercos ($p < 0,05$). La actividad de LDH aumentó 10 veces en los grupos tratados con P-188 y P-407, y 70 veces en el grupo NPs 3 (NPs de PZQ/PVA) ($p < 0,05$). Aunque la producción de lactato se incrementó ligeramente en los grupos tratados, no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

El incremento en la concentración de glucosa en cisticercos de *T. crassiceps* tratados con PZQ ha sido reportado previamente¹². Sin embargo, es interesante observar que el grupo tratado con PZQ presentó un aumento de 1,46 veces en la concentración de glucosa y el grupo NPs 2 presentó un aumento de 7,25 veces en la concentración de glucosa. Asimismo, la concentración de piruvato presentó un aumento de 110 veces en el mismo grupo tratado (NPs 2). Este patrón puede ser observado en todos los parámetros evaluados en este estudio. Esto puede explicarse por la disminución en el tamaño en las partículas de PZQ, que aumentan su solubilidad y con ello la absorción del fármaco por las células diana. Por lo tanto, debido a la observación de mayores concentraciones de glucosa, piruvato, lactato y de LDH, es posible concluir que las nano-formulaciones aumentaron la glucólisis en cisticercos de *T. crassiceps*, en comparación con los grupos tratados con PZQ convencional y el grupo de control.

5.4.1.6.2. Ciclo del ácido tricarboxílico

Los cisticercos del grupo control negativo, los cuales no recibieron tratamiento, presentaron un ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) completo, evidenciado por la presencia de α -cetoglutarato. Todos los tratamientos indujeron la fumarato reductasa reversa del ciclo ATC, que no produce α -cetoglutarato. No fue posible detectar la producción de citrato y malato en

los grupos de NPs 1 y NPs 2. Sin embargo, en los grupos tratados con P-188 y P-407 se incrementaron estos dos ácidos orgánicos. La producción de oxaloacetato se incrementó en todos los grupos tratados ($p < 0,05$) pero el grupo NPs 2 fue el que mostró una mayor producción de este ácido orgánico con un aumento de 32 veces su producción en comparación con el grupo de control y el aumento de 3 veces en comparación al grupo tratado con PZQ. La producción de succinato se incrementó ($p < 0,05$) en todos los grupos tratados. En el grupo NPs 3 no fue posible detectar este ácido orgánico; también el fumarato y la producción de malato, que son precursores para la producción de succinato través de la vía fumarato reductasa, fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los grupos de control y PZQ.

La inversión parcial del ciclo ATC se puede detectar debido a la ausencia o la disminución de la producción de citrato y α -cetoglutarato, tal como se observa en los grupos NPs 1 y NPs 2. Esto también se conoce como la vía de la fumarato reductasa, ya que conduce a la producción mitocondrial de succinato, por la conversión de piruvato en malato, malato en fumarato y fumarato en succinato que puede utilizarse en la cadena transportadora de electrones o puede ser excretada, como se informó anteriormente, en cisticercos de *T. crassiceps*^{13,14}. Una vez más los grupos NPs 1 y NPs 2 presentaron diferencias significativas en la producción de ácidos orgánicos de esta vía cuando se compara con el grupo tratado con el PZQ de partida y el grupo control, lo que refuerza la conclusión de que estas formulaciones presentan un mayor impacto en el metabolismo de los cisticercos que el PZQ convencional.

5.4.1.6.3. Producción de cuerpos cetónicos y ciclo de la urea

La producción de acetato fue significativamente mayor en el grupo tratado con P-188 comparado con el grupo control ($p < 0,05$) pero esto no fue detectado en ningún otro grupo tratado. La producción de acetoacetato y β -hidroxibutirato (β -HB) fue incrementada en los grupos tratados con las nano-formulaciones ($p < 0,05$) cuando se las comparó con el grupo control, y los grupos tratados con los polímeros o el PZQ de partida. Además, la producción de urea fue aumentada en los grupos tratados con los polímero y en el grupo NPs 2, comparados con el control y el tratamiento con PZQ de partida ($p < 0,05$).

La no detección de acetato en los grupos PZQ, P-407 y los tratados con las nano-formulaciones puede haber ocurrido debido al uso de acetil-CoA en la producción de acetoacetato y β -hidroxibutirato. Esta vía es una alternativa para la producción de energía

que es especialmente utilizada cuando hay deficiencia en la absorción de la glucosa debido al bloqueo de los transportadores de glucosa o debido a daños que pueden ser observados cuando el parásito está expuesto a PZQ¹⁴.

5.4.2. Nanocápsulas lipídicas de praziquantel

Mediante el método de inversión de fase se formularon NCLs de PZQ. Estos sistemas fueron caracterizados fisicoquímicamente e *in-vitro*, y se estudió la eficacia contra gusanos *S. mansoni*.

5.4.2.1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad

El $T_{partícula}$, IPd , PZ y conductividad de las NCLs fue determinado empleando dispersión de luz dinámica. En la Tabla 5.4 se observan los resultados obtenidos para las NCLs de PZQ (S7) y se muestran nuevamente los resultados para las NCLs sin fármaco de igual proporciones que la muestra S7.

Tabla 5.4. Resultados de las NCLs sin fármaco y NCLs conteniendo BNZ.

Resultados	S2 (sin fármaco)	S7 (PZQ)
$T_{partícula}$ (nm)	58,1±0,3	55,0±0,1
IPd (nm)	0,040±0,004	0,057±0,006
PZ (mV)	-5,4±0,8	-7,7±0,9
Conductividad (mS/cm)	0,60±0,02	0,63±0,05

El valor promedio obtenido para el tamaño de las NCLs de PZQ fue de 55 nm, se observó un valor similar al obtenido para las NCLs sin fármaco de igual proporción, demostrando que la incorporación del fármaco no estaría alterando el tamaño de las NCLs. Este fenómeno ya fue reportado por Roger y colaboradores durante la formulación de NCLs de paclitaxel¹⁵.

Para evaluar la homogeneidad de las NCLs fue estudiado el IPd (ver en Tabla 5.4) demostrando que las NCLs presentan una distribución de tamaño considerada homogéneas, con un IPd de 0,057 nm.

Para determinar la carga superficial de las NCLs S7 se empleó la medida del PZ , siendo en este caso de -7,7 mV. Este valor cercano al obtenido para las NCLs sin fármaco de igual tipo (-5,4 mV). Tal como se mencionó con anterioridad, el PZ es una medida de la magnitud de la carga superficial de las partículas, y esto tiene influencia en la repulsión o atracción

electrostática entre las mismas, y por lo tanto es uno de los parámetros que afecta la estabilidad de los sistemas.

Estos resultados coinciden también con los obtenidos para las NCLs de BNZ de iguales componentes (S5), caracterizadas en el Capítulo 4.

Finalmente, en la Tabla 5.4 se muestran los valores de conductividad obtenidos para las NCLs de PZQ y las NCLs sin fármaco. Se observa que la conductividad no presenta diferencias significativas cuando se encapsula el PZQ, siendo tanto para las NCLs sin fármaco como para las NCLs de PZQ cercana a 0,6 mS/cm.

5.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las NCLs de PZQ fueron estudiadas empleando MET y las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 5.5.

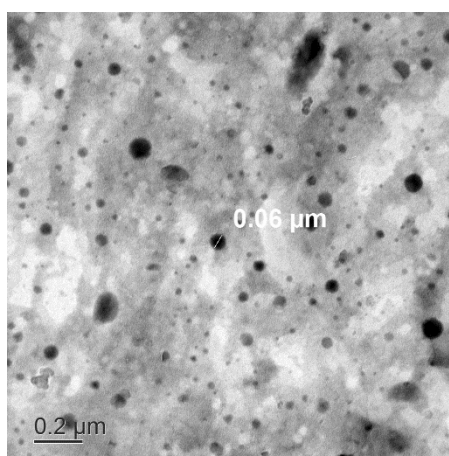


Figura 5.5. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de PZQ (S7). La barra representa 0,2 μm.

En la Figura 5.5 se puede observar que el diámetro de las NCLs S7 mostró ser similar al obtenido por dispersión de luz dinámica (ver en Tabla 5.4). A pesar de esto, se evidencia la presencia de algunas pocas partículas de un tamaño superior. Estos resultados fueron consistentes a los obtenidos previamente para los otros tipos de NCLs formuladas, y pueden ser a causa de procesos de fusión de una o más nanocápsulas durante la manipulación de la muestra para prepararla para este ensayo.

Finalmente, las NCLs mostraron una superficie circular, siendo estos resultados similares a los obtenidos previamente para este tipo de sistemas cuando se encapsuló por ejemplo ivermectina (fármaco antiparasitario)¹⁶.

5.4.2.3. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de PZQ en las NCLs fue calculada como se describió en el Capítulo 2, resultando de 93,24 %. En base a este resultado podemos afirmar que la formación de NCLs de PZQ mediante el método de inversión de fase mostró ser un mecanismo válido, permitiendo que una gran cantidad de fármaco (más del 90 % del PZQ de partida) sea encapsulado en el interior de dichos sistemas. Resultados similares fueron observados en estas NCLs conteniendo otros fármacos¹⁶.

5.4.2.4. Interacción de nanopartículas con proteínas del mucus

Como se mencionó en capítulos anteriores, las proteínas que componen el mucus podrían interactuar con las NCLs y disminuir su movilidad, reduciendo la capacidad de dichos sistemas de atravesar la membrana celular.

Para estudiar la interacción entre las proteínas del mucus y las NCLs se emplearon sistemas en los que se reemplazó el fármaco por el colorante fluorescente NileRed.

En todos los casos, las NCLs mostraron no interactuar de manera significativa con las mucinas, no presentando alteraciones en el tamaño partícula a causa de cambios en la movilidad. Esto podría deberse a que las mucinas en las condiciones de trabajo se encuentran cargadas negativamente, al igual que las NCLs, no favoreciéndose así posibles interacciones electrostáticas.

5.4.2.5. Activación del complemento

En este ensayo, se estudió la activación del mecanismo clásico del complemento del SHN al contacto con eritrocitos de oveja sensibilizados, lo que conduce a la lisis de éstos y la liberación de hemoglobina. Cuando el suero está en presencia de nanosistemas activadores, se encuentran menos proteínas del complemento para lisar los eritrocitos de oveja, lo que provoca una reducción de las unidades del sistema del complemento. El consumo del complemento fue expresado como función de la superficie de las NPs (cm^2) que representa un aumento en la concentración de NCLs y los resultados se muestran en la Figura 5.6.

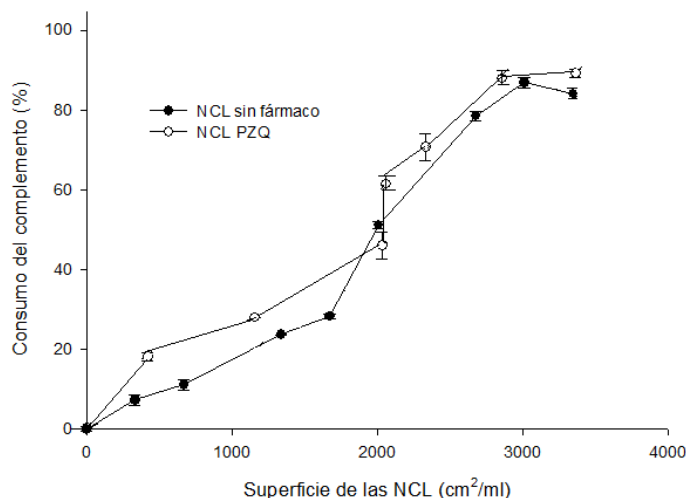


Figura 5.6. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm²/ml) de PZQ.

El consumo del sistema de complemento para las NCLs de PZQ (S7) fue comparado con los resultados obtenidos para las NCLs sin fármaco (S2). Los perfiles mostraron ser similares, por lo que no se estaría generando una influencia significativa en la activación del sistema del complemento al emplear las NCLs cargadas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos con las NCLs de BNZ (ver Capítulo 4, punto 4.4.2.1.6).

5.4.2.6. Ensayos de citotoxicidad de nanocápsulas lipídicas en cultivos de células Caco-2

Con el objetivo de determinar el efecto de las NCLs sobre las células se ensayó la supervivencia de un cultivo de células Caco-2 en presencia de distintas concentraciones de las NCLs sin fármacos y las cápsulas de PZQ. A continuación se muestran resultados obtenidos a 24 y 48 horas posteriores a la exposición.

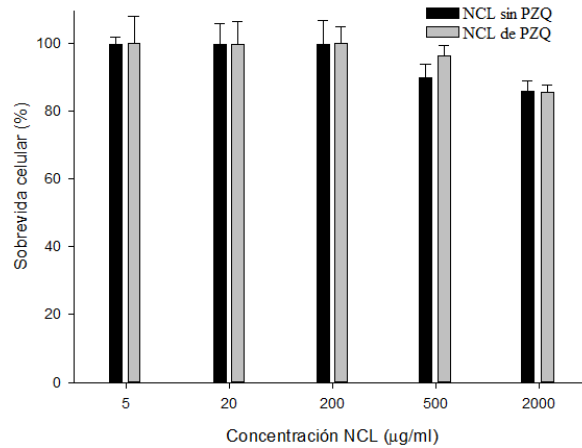


Figura 5.7. Supervivencia celular luego de 24 h de exposición a las NCLs.

En la Figura 5.7 se observan los perfiles de supervivencia celular en función de concentración de las NCLs sin PZQ y las NCLs de PZQ. Puede observarse que luego de 24 horas de exposición a concentraciones de hasta 2000 µg/ml de NCLs la viabilidad de células Caco-2 es alta y similar para las NCLs sin fármaco y NCLs de PZQ. A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron luego de tratar durante 48 horas los cultivos celulares con las NCLs. Esto indicaría que en las concentraciones analizadas, las NCLs cargadas presentan una baja citotoxicidad y podrían ser empleadas para llevar a cabo ensayos *in-vitro* o *in-vivo* en animales infectados.

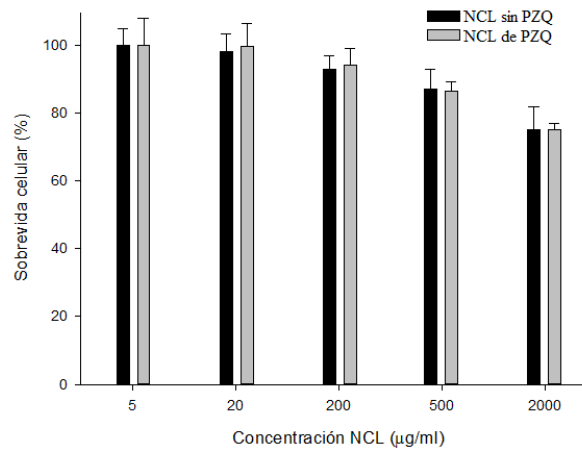


Figura 5.8. Supervivencia celular luego de 48 h de exposición a las NCLs.

En la Figura 5.8 se observa la supervivencia celular en función de las concentraciones de NCLs sin fármaco y NCLs de PZQ luego de 48 horas de exposición a las mismas. Puede observarse que la supervivencia celular es similar para las NCLs sin fármaco y las cargadas con PZQ para todas las concentraciones en las que se trabajó.

5.4.2.7. Evaluación de la eficacia antiparasitaria *in-vitro* de las nanocápsulas lipídicas de praziquantel

Se llevaron a cabo ensayos *in-vitro* sobre gusanos *S. mansoni*. Los resultados obtenidos respecto a la reducción de la movilidad relativa de los gusanos se muestran en la Figura 5.9, luego de 1 hora (Figura 5.9 A), 5 horas (Figura 5.9 B) y 24 horas (Figura 5.9 C) de incubación en presencia de PZQ y las NCLs.

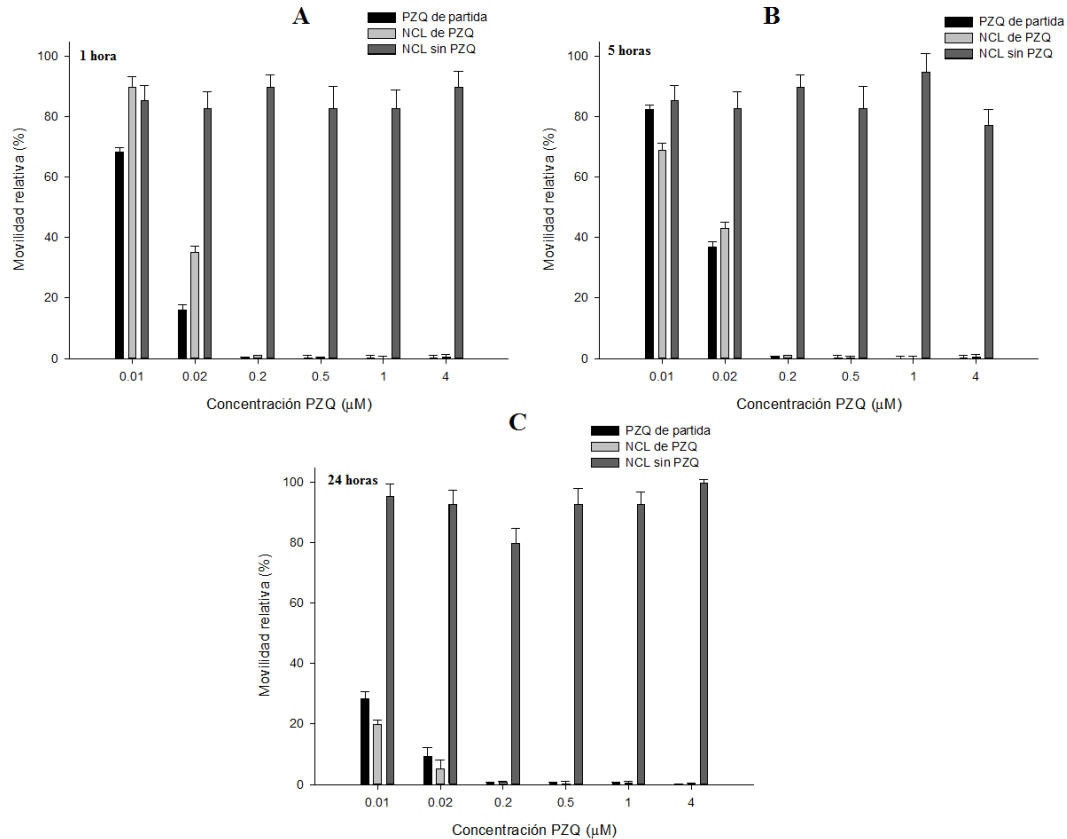


Figura 5.9. Movilidad relativa de gusanos *S. mansoni* en presencia de PZQ de partida y las NCLs de PZQ y NCLs blanco, luego de (A) 1 hora, (B) 5 horas y (C) 24 horas.

Se llevaron a cabo controles empleando las NCLs sin fármacos, no observándose efectos significativos sobre los gusanos. Por otro lado se comprobó la capacidad de inmovilizar e influenciar la disminución de movilidad de los gusanos por parte de las NCLs de PZQ, a partir de 1 hora de tratamiento (aunque el efecto es más pronunciado si el ensayo se lleva a cabo durante 24 horas, como se muestra en la Figura 5.9 C) viéndose este fenómeno fuertemente influenciado por la concentración de PZQ final empleada. En este sentido podríamos afirmar que las NCLs de PZQ son activas frente a gusanos *S. mansoni*.

5.5. Conclusiones

Las NPs de PZQ preparadas con distintas proporciones de P-188, P-407 y PVA, lograron un incremento en la S_{PZQ} de hasta 19 veces con respecto a la solubilidad del fármaco de partida. Las velocidades de disolución de PZQ también fueron superiores a la del PZQ sin tratar. En este caso, las mayores velocidades se obtuvieron para aquellas NPs que fueron formuladas con PVA. Esto podría deberse a que, como fue demostrado por ensayos de CDB y DRX, las NPs formuladas con PVA reducen la cristalinidad del fármaco en una proporción mayor que los poloxámeros.

Estas nanoformulaciones de PZQ aumentaron el efecto sobre el metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps*. Las formulaciones que provocaron mayores efectos sobre el metabolismo de los cisticercos fueron las formuladas a partir de los poloxámeros P-188 y P-407.

Se formularon NCLs cargadas con PZQ mediante el método de inversión de fase. Los resultados muestran que las NCLs sin fármaco y NCLs de PZQ exhiben un tamaño similar y cercano a 50 nm. El IPd en ambos casos fue menor o igual a 0,06, lo que indica una distribución de tamaño homogénea. Las nanocápsulas fueron observadas por MET, mostrando ser circulares. La eficacia de encapsulación del fármaco fue del 93 %.

Las NCLs demostraron no interactuar con mucinas, además se observó una activación del sistema del complemento para las NCLs de PZQ similar a la de las NCLs sin fármacos, lo que podría indicar la presencia del fármaco en el interior de las cápsulas.

La sobrevivencia de las células en presencia de las NCLs (con y sin PZQ) fue elevada tanto para el tratamiento de 24 como el de 48 horas.

Se demostró actividad contra gusanos *S. mansoni* para las NCLs de PZQ mediante ensayos *in-vitro*. En este sentido, las NCLs cargadas con PZQ representan una importante alternativa para una distribución eficiente de dicho agente antiparasitario.

5.6. Bibliografía

- (1) Cioli, D.; Pica-Mattoccia, L. “Praziquantel.” *Parasitol. Res.* **2003**, *90* (1), 3–9.
- (2) Dömling, A.; Khoury, K. “Praziquantel and Schistosomiasis.” *ChemMedChem* **2010**, *5* (9), 1420–1434.
- (3) Jenkins-Holick DS; Kaul TL. Society of Urologic Nurses and Associates <https://library.suna.org/suna/articles/538/view>.
- (4) Meyer, T.; Sekljic, H.; Fuchs, S.; Bothe, H.; Schollmeyer, D.; Miculka, C. “Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3* (1), 357.
- (5) Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. “A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability.” *Pharm. Res.* **1995**, *12* (3), 413–420.
- (6) Rodrigues, S. G.; Chaves, I. D. S.; Melo, N. F. S.; Jesus, M. B.; Fraceto, L. F.; Fernandes, S. A.; Paula, E.; Freitas, M. P. De; Pinto, L. D. M. A. “Computational Analysis and Physico-Chemical Characterization of an Inclusion Compound between Praziquantel and Methyl- β -Cyclodextrin for Use as an Alternative in the Treatment of Schistosomiasis.” *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *70* (1–2), 19–28.
- (7) El-Arini, S. K.; Giron, D.; Leuenberger, H. “Solubility Properties of Racemic Praziquantel and Its Enantiomers.” *Pharm. Dev. Technol.* **1998**, *3* (4), 557–564.
- (8) De la Torre, P.; Torrado, S.; Torrado, S. “Preparation, Dissolution and Characterization of Praziquantel Solid Dispersions.” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1999**, *47* (11), 1629–1633.
- (9) Acharya, D. S. R. “Optimization of Size Controlled Poly (Lactide-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Using Quality by Design Concept.” *Asian J. Pharm.* **2015**, *9* (3), 152–161.

- (10) Seremeta, K. P.; Höcht, C.; Taira, C.; Cortez Tornello, P. R.; Abraham, G. A.; Sosnik, A. “Didanosine-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Microparticles by a Coaxial Electrohydrodynamic Atomization (CEHDA) Technique.” *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (1), 102–111.
- (11) Gulsun, T.; Gursoy, R. N.; Oner, L. “Design and Characterization of Nanocrystal Formulations Containing Ezetimibe.” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2011**, *59* (1), 41–45.
- (12) Fraga, C. M.; Costa, T. L.; Bezerra, J. C. B.; De Souza Lino, R.; Vinaud, M. C. “*Taenia Crassiceps*: Host Treatment Alters Glycolysis and Tricarboxylic Acid Cycle in *Cysticerci*.” *Exp. Parasitol.* **2012**, *130* (2), 146–151.
- (13) Tielens, A. G. M.; Hellemond, J. J. van. Unusual Aspects of Metabolism in Flatworm Parasites. In *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*; CABI: Wallingford, 2006; pp 387–407.
- (14) Vinaud, M. C.; Ferreira, C. S.; Lino Junior, R. de S.; Bezerra, J. C. B. “*Taenia Crassiceps*: Fatty Acids Oxidation and Alternative Energy Source in in Vitro *Cysticerci* Exposed to Anthelmintic Drugs.” *Exp. Parasitol.* **2009**, *122* (3), 208–211.
- (15) Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J.-P. “Lipid Nanocarriers Improve Paclitaxel Transport throughout Human Intestinal Epithelial Cells by Using Vesicle-Mediated Transcytosis.” *J. Control. Release* **2009**, *140* (2), 174–181.
- (16) Gamboa, G. V. U.; Palma, S. D.; Lifschitz, A.; Ballent, M.; Lanusse, C.; Passirani, C.; Benoit, J. P.; Allemandi, D. A. “Ivermectin-Loaded Lipid Nanocapsules: Toward the Development of a New Antiparasitic Delivery System for Veterinary Applications.” *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (5), 1945–1953.

Capítulo 6.

FENBENDAZOL

6.1. Índice

6.1.	Índice.....	183
6.2.	Introducción	184
6.3.	Formulaciones	185
6.4.	Resultados	186
6.4.1.	Diseño y optimización de micropartículas de fenbendazol	186
6.4.1.1.	Fase de <i>screening</i>	186
6.4.1.2.	Fase de optimización	188
6.4.1.3.	Verificación de la optimización	195
6.4.1.4.	Caracterización de las micropartículas de fenbendazol.....	196
6.4.2.	Nanocápsulas lipídicas de fenbendazol	201
6.4.2.1.	Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad	201
6.4.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión.....	202
6.4.2.3.	Eficiencia de encapsulación.....	203
6.4.2.4.	Interacción de nanocápsulas con proteínas del mucus	203
6.4.2.5.	Activación del complemento	204
6.4.2.6.	Evaluación de la eficacia antiparasitaria de las nanocápsulas lipídicas de fenbendazol	205
6.5.	Conclusiones	209
6.6.	Referencias.....	210

6.2. Introducción

El FNZ es un fármaco perteneciente a la familia de derivados de los benzimidazoles, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la captación de glucógeno en el intestino del parásito a través de la destrucción de la estructura microtubular del epitelio intestinal¹. Este fármaco presenta un amplio espectro de actividad contra los helmintos del tracto intestinal y de los pulmones cuando se emplea una dosis oral de 5 a 7,5 mg/kg. Los datos de la literatura sugieren que el FNZ tiene un tránsito intestinal y un tiempo de excreción muy rápidos en algunas especies animales. También se ha postulado que su eficacia es proporcional a su persistencia en el ambiente del parásito, y debido a ello sería conveniente administrar dosis divididas en el tiempo para lograr una mayor eficacia².

En particular, se ha demostrado además que el FNZ es eficiente en la inhibición de la formación de vesículas de *E. multilocularis* así como en la reducción de la carga de gusanos y en el número de protoescoles en ratones infectados con *E. multilocularis*³. Este parásito presenta un ciclo de vida de tipo “salvaje”, el gusano adulto vive en los intestinos de diferentes zorros (hospedador definitivo). Los zorros infectados liberan huevos con sus heces, y luego se genera la absorción por vía oral por parte de los roedores (huésped intermedio) o los humanos (huésped accidental). Se forman metacestodos (vesículas) principalmente en el hígado de roedores, luego se produce la infección de zorros y perros por ingestión de roedores que contienen metacestodos con protoescólices. Los protoescólices maduran a tenias adultas en el intestino delgado. *E. multilocularis* produce la *Echinococcosis alveolar* (*E. alveolar*), una enfermedad que está principalmente limitada al hemisferio norte donde aparecen cerca de 18000 casos nuevos cada año. En relación a esto, hay datos que indican que FNZ es muy eficaz en el tratamiento de *E. alveolar* en modelos murinos infectados⁴.

6.3. Formulaciones

Se llevó a cabo un diseño de experimentos y su optimización para formular MPs de FNZ y PVA empleando el secado por aspersión, según fue descrito en el Capítulo 2, punto 2.2.2.1.4 (Página 31). Las MPs obtenidas fueron luego caracterizadas para comprobar la eficacia del diseño.

También se formularon NCLs de FNZ empleando el protocolo detallado en el Capítulo 2 punto 2.2.2.1.5.1 (Página 32). Estas formulaciones fueron caracterizadas fisicoquímicamente, y además fue evaluada su eficacia antiparasitaria *in-vitro* sobre *E. multilocularis*, llevando a cabo los ensayos de la PGI y Alamar Blue.

6.4. Resultados

6.4.1. Diseño y optimización de micropartículas de fenbendazol

6.4.1.1. Fase de *screening*

Como se mencionó, con anterioridad el diseño de experimentos es una técnica estadística que permite optimizar, entre otras cosas el proceso de formulación de MPs⁵. Para estimar los factores principales que repercuten significativamente en las propiedades las partículas se llevó a cabo un diseño de *screening* de tipo Plackett-Burman empleando el programa “Design Expert”.

En este inciso, se formularon MPs de FNZ empleando PVA y Sipernat® 50 a partir de una solución conteniendo etanol y acetona en medio ácido. La selección de PVA se debió a que posee propiedades emulsificantes y tensioactivas que favorecen la solubilidad de moléculas lipofílicas como FNZ. Los grupos OH del PVA pueden interactuar con la fase acuosa mientras que la cadena carbonada (grupo vinilo) va a interactuar, preferentemente, con los solventes orgánicos. Debido a ello, la presencia de PVA puede influir significativamente en el tamaño de las MPs⁶. El Sipernat®, formulado a base de dióxido de silicio posee una gran capacidad de absorción que aumenta la fluidez y prolonga la vida útil de las sustancias en polvo que sean susceptibles de apelmazamiento durante el proceso de secado⁷.

Para la elaboración de las MPs de FNZ se empleó un equipo de secado por aspersion, y tomando en consideración la metodología empleada y los componentes de la formulación, tanto la concentración del estabilizante seleccionado (PVA), y del soporte sólido (Sipernat®) así como las condiciones en las que se lleva a cabo la etapa de secado (potencia de la *Bomba* y $T_{entrada}$ para el secado) podrían ser factores determinantes de las propiedades finales de las MPs. Debido a ello, cada uno de los factores fue evaluado a dos niveles (el máximo y el mínimo propuestos para la elaboración de MPs). La evaluación consistió en el análisis de los distintos factores sobre las respuestas, los experimentos llevados a cabo se detallan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Diseño de Plackett Burman de MP de FNZ construido para seleccionar factores

Ensayos	Factores				Respuestas			
	PVA (g)	$V_{Sipernat}$ (ml)	Bomba (%)	$T_{entrada}$ (°C)	R (%)	FNZ_c (µg/mg sólido)	S_{FNZ} (µg/ml)	D_{FNZ} (µg)
1	0,5	50	10	140	69,56	27,99	21,74	0,45
2	0,5	50	10	100	69,02	27,36	17,52	0,65
3	3,0	200	17	100	44,07	110,74	41,30	0,84
4	3,0	200	10	140	62,74	163,77	48,20	1,34
5	0,5	200	17	100	40,19	62,47	9,47	1,33
6	3,0	200	10	140	55,43	74,45	39,38	0,60
7	3,0	50	17	140	60,16	33,36	58,55	0,53
8	3,0	50	17	100	44,19	49,41	60,47	0,20
9	0,5	50	17	140	62,74	30,77	21,74	0,56
10	0,5	200	10	100	60,51	121,69	19,82	1,29
11	0,5	200	17	140	57,22	123,17	11,39	0,04
12	3,0	50	10	100	47,42	40,95	55,87	0,71

Se llevó a cabo una prueba ANOVA sobre los datos experimentales mostrados en la Tabla 6.1, los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Valores de p obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.

	R (%)	FNZ_c (µg/mg sólido)	S_{FNZ} (µg/ml)	D_{FNZ} (µg)
Modelo	0,0189	0,0337	<0,0001	0,3557
PVA (g)	0,0612	0,4692	<0,0001	0,9410
$V_{Sipernat}$ (ml)	0,1490	0,0035	0,0669	0,1373
Bomba (%)	0,0280	0,6683	0,9832	0,3034
$T_{entrada}$ (°C)	0,0180	0,7047	0,8499	0,3181

En la Tabla 6.2 se puede observar que, con un nivel de significación del 5%, la respuesta R mostró ser dependiente de la potencia de la Bomba ($p=0,028$) y de la $T_{entrada}$ ($p=0,018$), ambos factores que participan de la etapa de secado. Este fue un resultado lógico ya que una mayor potencia de la Bomba implica un mayor flujo (ml/min) que a su vez incide directamente en el R . Por otro lado, la cantidad de PVA no puede descartarse completamente como un factor significativo sobre el R ya que el valor de la p es cercano a 0,05 ($p=0,06$). Un resultado similar fue reportado por Kumar y colaboradores⁸, quienes describieron que los parámetros del secado influyeron directamente sobre el R de nanocristales de indometacina.

La segunda respuesta, FNZ_c , mostró ser dependiente de forma significativa del $V_{Sipernat}$ empleado, lo cual podía preverse ya que un mayor volumen de dicha solución involucra también una mayor masa total y la consiguiente disminución del FNZ en la formulación final. Por otro lado, un incremento del soporte sólido podría favorecer la deposición de las partículas a medida que se van evaporando los solventes en la cámara de secado.

En la Tabla 6.2 se muestra que el modelo fue significativo para la S_{FNZ} ($p < 0,0001$), siendo el factor determinante más importante la cantidad de PVA ($p < 0,0001$), mientras que según los resultados obtenidos, no podemos descartar la influencia del $V_{Sipernat}$ sobre dicha respuesta. Este resultado era esperable debido a la capacidad solubilizante del PVA⁹.

La última respuesta ensayada fue la D_{FNZ} , según los resultados del ensayo ANOVA llevado a cabo, no se logró un modelo significativo en base a los factores estudiados ($p = 0,3557$).

No se evidenciaron *outliers* en ninguno de los ensayos llevados a cabo, y en todos los casos la falta de ajuste fue considerada no significativa ($p = 0,5804$).

El objetivo de esta fase fue seleccionar los factores que tuvieran influencia sobre al menos uno de las respuestas ensayadas, así como determinar aquellas respuestas que pudieran ser modeladas por dichos factores. En base a estos resultados se continuó con la optimización de las respuestas: R , FNZ_c y S_{FNZ} , a partir de todos los factores estudiados: concentración de PVA, $V_{Sipernat}$, potencia de la *Bomba* y $T_{entrada}$.

6.4.1.2. Fase de optimización

Para la optimización se llevó a cabo un diseño de superficie de respuesta de tipo central compuesto, con la información obtenida previamente de la primera etapa del diseño.

Tabla 6.3. Diseño central compuesto construido para optimizar las respuestas.

Ensayos	Factores				Respuestas		
	PVA_c (g)	$V_{Sipernat}$ (ml)	$Bomba$ (%)	$T_{entrada}$ (°C)	R (%)	FNZ_c (µg/mg sólido)	S_{FNZ} (µg/ml)
1	1,75	255	13	120	52,06	98,69	47,05
2	0,5	50	17	100	52,86	145,71	40,53
3	1,75	125	13	150	64,63	71,21	21,74
4	1,75	125	19	120	47,85	79,75	23,66
5	0	125	13	120	62,91	143,14	84,24
6	0,5	50	10	100	62,96	175,17	45,90
7	3	200	10	100	50,29	54,96	119,90
8	1,75	125	13	120	55,30	81,53	102,65
9	1,75	125	13	120	56,78	76,69	113,39
10	1,75	5	13	120	62,78	116,73	243,38
11	1,75	125	13	120	56,87	913,96	119,14
12	0,5	200	10	140	67,88	119,02	44,37
13	1,75	125	13	120	54,12	87,86	87,31
14	1,75	125	13	120	56,91	115,48	110,70
15	3,85	125	13	120	50,34	59,73	279,42
16	3	200	17	100	41,92	71,88	40,53
17	0,5	200	17	140	58,07	100,88	16,37
18	3	50	10	140	65,64	60,77	87,69
19	3	50	17	140	55,82	66,43	82,33
20	1,75	125	8	120	64,58	87,73	22,89
21	1,75	125	13	86	41,94	76,16	62,39

Se optimizaron el R , la FNZ_c y la S_{FNZ} ; en función de los factores: concentración de PVA, $V_{Sipernat}$, potencia de la $Bomba$ y $T_{entrada}$. Los experimentos realizados así como los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.3.

Durante el proceso de optimización el objetivo fue formular un sistema microparticulado de FNZ y PVA con un alto R , una elevada FNZ_c obtenido y que, además, las MPs poliméricas permitieran aumentar la S_{FNZ} .

Para tal fin, se aplicó un diseño central compuesto, que constó de 21 experimentos (Tabla 6.3), los que incluían 5 réplicas del punto central. Para los experimentos se generaron combinaciones de los factores seleccionados: concentración de PVA (desde 0 a 3,85 g), $V_{Sipernat}$ (de 5 a 255 ml), la potencia de la $Bomba$ (de 8 a 19) y la $T_{entrada}$ (de 86 a 150 °C). En la Tabla 6.3 se incluyen además los resultados obtenidos.

Luego de eliminar los *outliers*, las respuestas fueron ajustadas a patrones polinomiales, para encontrar los mejores modelos. Los resultados de los ensayos ANOVA para la optimización de las respuestas arrojan buenos indicadores estadísticos, la falta de ajuste fue no significativa, el modelo fue significativo y el r^2 ajustado mostró ser similar al r^2 predicho, como puede observarse en la Tabla 6.4.

Además los resultados del análisis arrojaron que el modelo lineal es apropiado para explicar el comportamiento del R y la FNZ_c al modificar los factores estudiados. Un modelo lineal en este caso estaría indicando la ausencia de interacciones entre los factores. Mientras que la S_{FNZ} fue bien ajustado a un modelo de tipo cuadrático, lo que sucede en la mayoría de casos previamente reportados¹⁰.

Tabla 6.4. Valores de falta de ajuste, de los parámetros r^2 y probabilidad asociada obtenidos para cada uno de los factores sobre las respuestas.

	R (%)	FNZ_c ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sólido)	S_{FNZ} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Modelo	<0,0001 Lineal	<0,0001 Lineal	0,0039 Cuadrático
PVA_c (g)	<0,0001	<0,0001	0,0025
$V_{Sipernat}$ (ml)	<0,0001	0,0303	0,0009
$Bomba$ (%)	<0,0001	0,4762	0,1216
$T_{entrada}$ ($^{\circ}\text{C}$)	<0,0001	0,0103	0,1916
Falta de ajuste	No significativo	No significativo	No significativo
r^2 ajustado	0,9701	0,8030	0,9455
r^2 predicho	0,9628	0,7215	0,9345

El R fue dependiente de la potencia de la $Bomba$ y la $T_{entrada}$ en el sistema de secado, además, en el modelo desarrollado durante la etapa de optimización el R mostró ser dependiente de la cantidad de PVA y del $V_{Sipernat}$ usado.

La FNZ_c fue dependiente de la cantidad de PVA empleada, el $V_{Sipernat}$ agregado y la $T_{entrada}$ del aspersor.

Por último, se demostró que la concentración de PVA y el $V_{Sipernat}$ influyen de manera significativa la S_{FNZ} .

Aunque existen muchos antecedentes de la preparación de MPs con PVA conteniendo distintos fármacos¹¹, la formulación y posterior optimización de MPs de FNZ aún no había sido estudiada, o al menos descripta en la literatura.

A continuación, en la Tabla 6.5, se muestran las condiciones en las que se llevó a cabo la optimización. Para todos los factores se permitió que estuvieran en el rango de trabajo y se optimizan con una importancia relativa de 3.

Tabla 6.5. Restricciones de la optimización para la formulación de MPs de FNZ.

	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
PVA_c (g)	En el rango	0,5	3	3
$V_{Sipernat}$ (ml)	En el rango	50	200	3
$Bomba$ (%)	En el rango	10	17	3
$T_{entrada}$ (°C)	En el rango	100	140	3
R (%)	Máxima	41,91	67,88	5
FNZ_c (µg/mg sólido)	Máxima	0,55	1,75	2
S_{FNZ} (µg/ml)	Máxima	16,37	279,42	3

Las 3 respuestas se optimizaron para maximizar su valor, seleccionando en este caso el R con la mayor importancia relativa (5), esto fue así porque los valores de R empleando la técnica de secado por aspersion suelen ser muy bajos comparados con los resultados al emplear otra técnica de secado^{12,13}. Por otro lado la S_{FNZ} se optimizó con una importancia relativa intermedia (3) y la FNZ_c con la menor importancia relativa (2).

Una vez realizado el procedimiento de optimización, se construyó una función de deseabilidad global en función de los factores que influyen en las respuestas. Se seleccionaron las mejores condiciones de elaboración de las MPs correspondientes a lo obtenido del diseño. La D en este punto alcanza un valor máximo de 0,814, que fue considerado adecuado para los propósitos de este trabajo. Es necesario mencionar que la aplicación de este tipo de diseños cuando se emplea el secado por aspersion se ha utilizado también para comprender los efectos de las variables de proceso durante la formulación de complejos de inclusión de fármacos lipofílicos con ciclodextrina. En dicho trabajo, la optimización del proceso resultó en una mejora considerable del rendimiento del producto atomizado, reduciendo al mínimo las impurezas y el contenido de humedad. Las respuestas observadas se correspondieron con los valores predichos de la formulación optimizada, demostrando así la viabilidad del procedimiento de optimización en la formulación de complejos con coclodextrinas¹⁰.

En las Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5 se muestran las variaciones de las respuestas en función de los factores que fueron significativos sobre cada una de ellas.

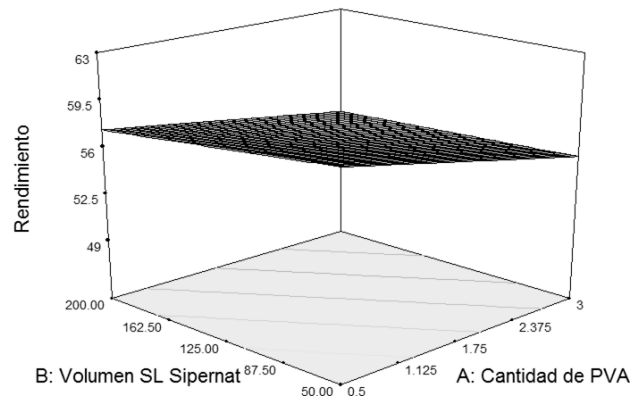


Figura 6.1. Variación del R en función de la concentración de la cantidad de PVA y el $V_{Sipernat}$.

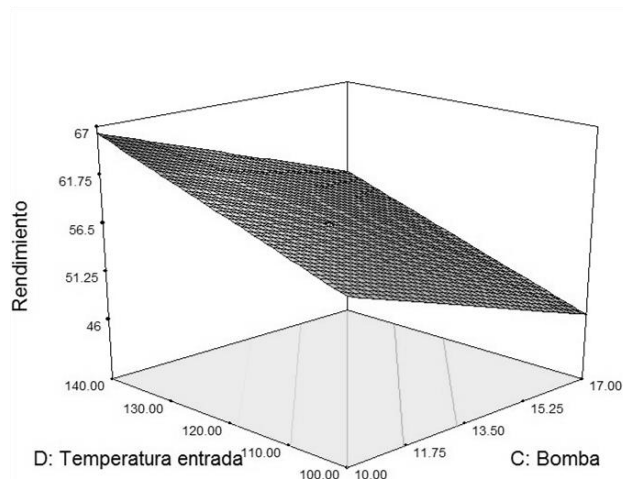


Figura 6.2. Variación del R en función de la potencia de la *Bomba* y la $T_{entrada}$ del rociador.

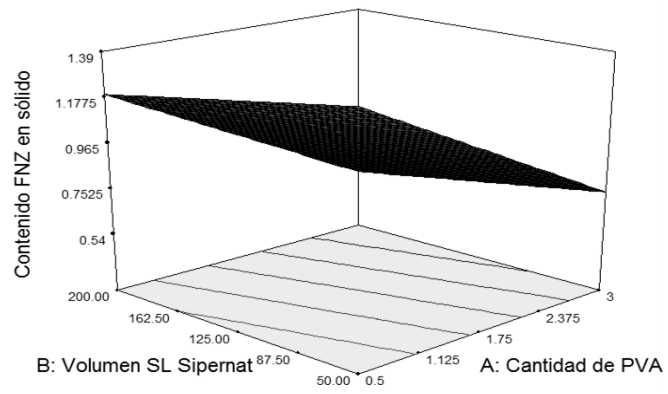


Figura 6.3. Variación del FNZ_c en función de la cantidad de PVA y del $V_{Sipernat}$.

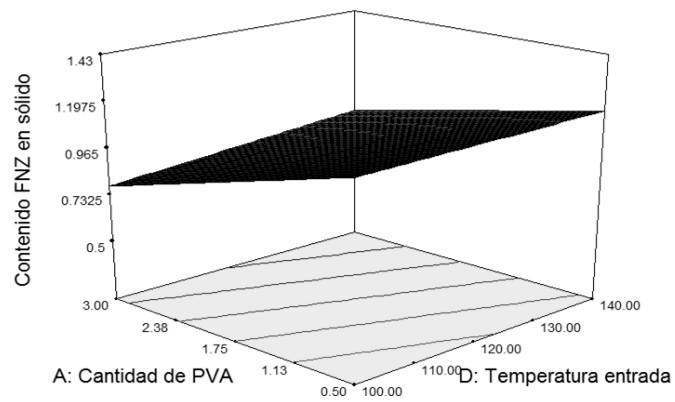


Figura 6.4. Variación del FNZ_c en función de la cantidad de PVA y de la $T_{entrada}$.

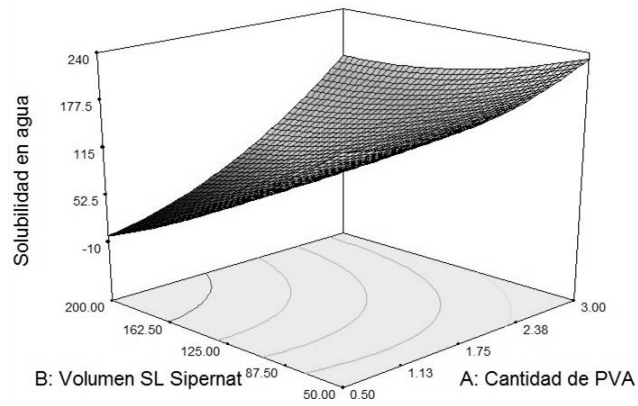


Figura 6.5. Variación de la S_{FNZ} en función de la cantidad de PVA y el $V_{Sipernat}$.

En las Figuras 6.6 y 6.7 se muestra la variación de la deseabilidad en función de los 4 factores estudiados.

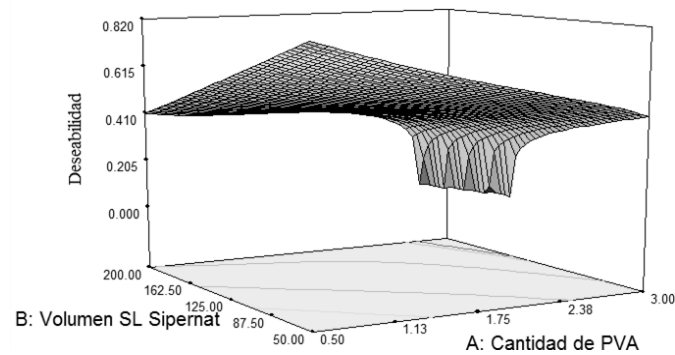


Figura 6.6. Representación de la deseabilidad en función de la cantidad de PVA y del $V_{Sipernat}$.

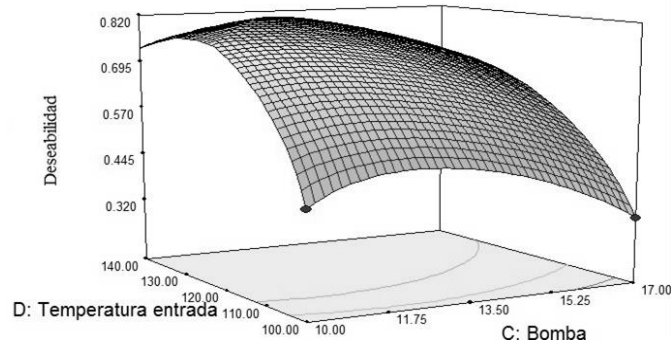


Figura 6.7. Gráfico de deseabilidad en función de la potencia de la *Bomba* y la $T_{entrada}$ del aspersor.

6.4.1.3. Verificación de la optimización

En la Tabla 6.6 se muestran los protocolos del ensayo optimizado (se seleccionó la solución cuya deseabilidad fue la mayor, de 0,8139), y del que contiene las condiciones reales en las que se trabajó. Además, dichos protocolos se comparan con los resultados de un experimento de características similares (experimento 3) realizado durante la etapa de diseño de la superficie de respuesta.

Tabla 6.6. Protocolos y resultados del experimento de optimización (valores teóricos y experimentales).

Muestra	PVA_c (g)	$V_{Sipernat}$ (ml)	<i>Bomba</i> (%)	$T_{entrada}$ (°C)	<i>R</i> (%)	FNZ_c ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sólido)	S_{FNZ} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Teórica	0,50	50,00	11,93	131,47	67,88	131,47	193,96
Experimental	0,50	50,00	12,00	131,00	77,75	188,71	143,68

En el caso del *R*, el resultado obtenido en el ensayo fue significativamente superior al predicho por el modelo y a todas las otras pruebas realizadas (tanto durante la optimización como en el *screening* previo). Esta diferencia puede deberse a que valores de *R* superiores a los ingresados en el programa son difíciles de predecir por el modelo.

Con respecto a la FNZ_c también se obtuvieron mejores resultados, 188 μg de FNZ por mg total comparado con la cantidad predicha por el modelo de 131 μg por mg de sólido.

Por último, la S_{FNZ} en el sistema optimizado (144 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mostró ser levemente inferior a la predicha en el modelo (193 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Tal como se puede observar en la Tabla 6.6, las MPs de FNZ optimizadas fueron obtenidas con un R mayor al 75 %, la carga del fármaco fue elevada y se consiguió elevar la S_{FNZ} de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 144 $\mu\text{g/ml}$.

6.4.1.4. Caracterización de las micropartículas de fenbendazol

6.4.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido

La tecnología de secado por aspersión permite la obtención de partículas esféricas principalmente, y en muchos casos, la morfología depende de los componentes de la formulación y las condiciones operativas seleccionadas. Con el objetivo de estudiar el impacto de los parámetros obtenidos para la optimización de las MPs de FNZ sobre la morfología final de las mismas, se realizaron estudios de microscopía electrónica.

En la Figura 6.8 se observan las imágenes obtenidas por MEB para el FNZ sin tratamiento y las MPs de FNZ optimizadas.

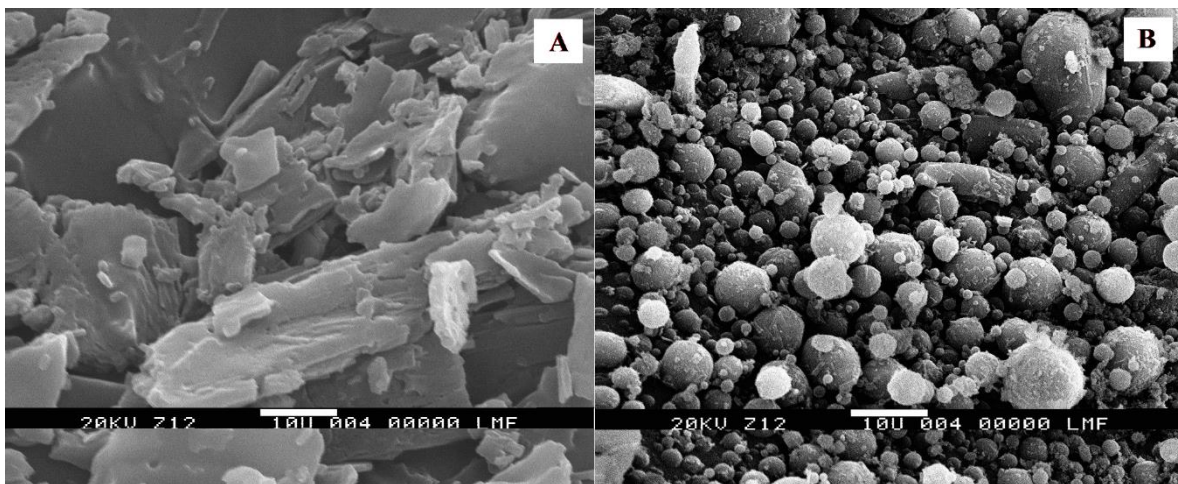


Figura 6.8. Micrografías de FNZ de partida (A) y de las MPs de FNZ optimizadas (B). La barra representa 10 μm .

Se puede observar que el FNZ de partida se presenta como una mezcla irregular de cristales de gran tamaño (mayores a 10 μm). Por otro lado, las MPs de FNZ presentan forma esférica, superficie lisa y tamaño relativamente uniforme en un rango de 2 a 10 μm , principalmente. La forma esférica de las mismas indica que el proceso de secado y los parámetros seleccionados fueron adecuados. Similares resultados fueron reportados por Fouad y colaboradores¹⁴, quienes formularon micropartículas de celecoxib, fármaco antiinflamatorio de amplio espectro que inhibe la enzima ciclooxigenasa, mediante el secado por aspersión

con diversos polímeros, incluyendo PVA con el agregado de dióxido de silicio (Sipernat®). Las micropartículas exhibieron un tamaño aproximado de 5 a 20 μm y fueron esféricas.

6.4.1.4.2. Calorimetría diferencial de barrido

La CDB es un método analítico reconocido para estudiar la relación entre los componentes de los sistemas farmacéuticos. En el termograma del FNZ (Figura 6.9) se observa un pico endotérmico agudo a 235,84 °C, característico de dicho fármaco según lo descrito por la bibliografía¹⁵. En análisis térmico de las MPs optimizadas demostró la existencia de un pico endotérmico de baja intensidad a 227,49 °C.

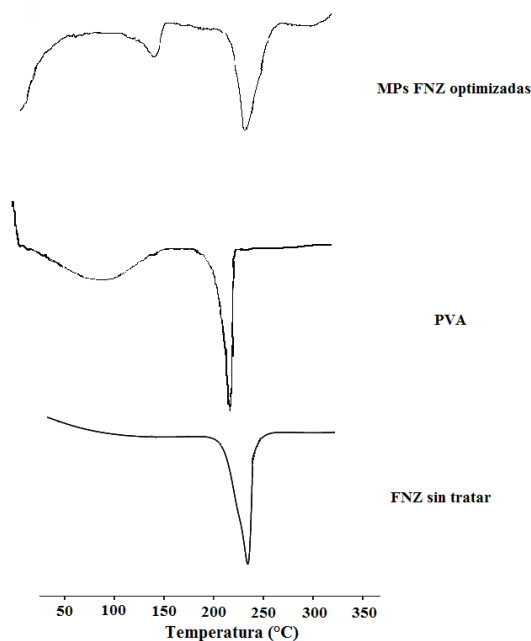


Figura 6.9. Termograma de FNZ sin tratar, PVA y las MPs de FNZ optimizadas.

En el proceso de preparación de las MPs, cuando el solvente se evapora luego del proceso de aspersión, el FNZ puede cristalizar o permanecen en un estado disuelto en el polímero. Si el fármaco permanece disuelto en el polímero, la señal correspondiente a la fusión del FNZ estaría ausente, o al menos, presente con menor intensidad. De acuerdo al termograma de las MPs optimizadas, se podría postular que el fármaco está encapsulado en el seno de las MPs y se encontraría parcialmente disuelto.

Se deben mencionar, además, que estos resultados serían coincidentes con los datos de la literatura en los cuales se describe la formulación de dispersiones sólidas de FNZ empleando

poloxámeros como polímeros transportadores, cuyo estudio térmico dio como resultado la desaparición de la señal endotérmica a 235,84 °C⁸, debido a formación de soluciones sólidas en la matriz polimérica.

6.4.1.4.3. Difracción de rayos X

La DRX permite estudiar las características cristalinas presentes en los fármacos de partida, y los cambios generados durante el proceso de formulación. En la Figura 6.10 se muestran los patrones de DRX para el FNZ y las MPs formuladas para estudiar las características al estado sólido de los mismos.

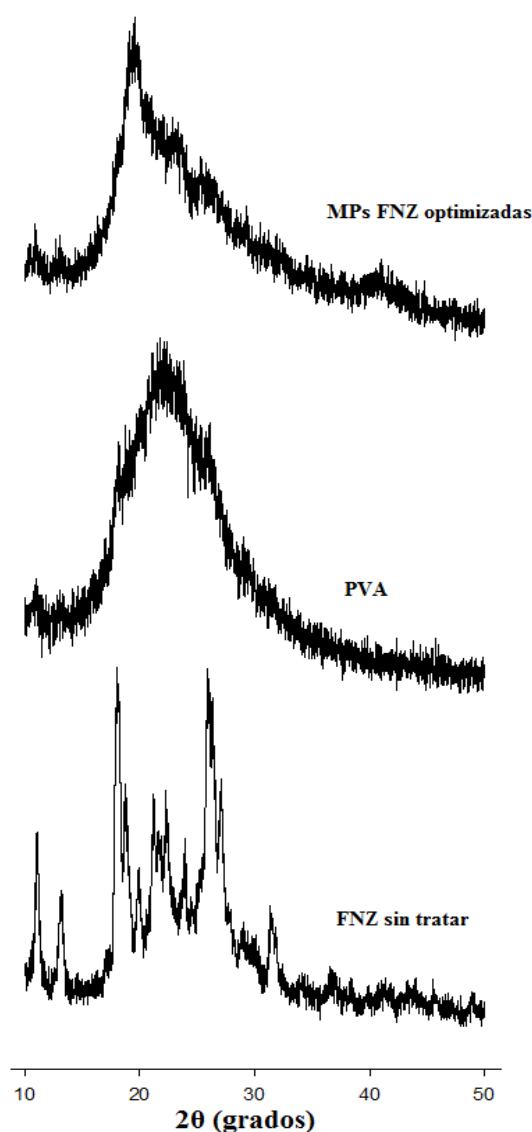


Figura 6.10. Difractogramas del FNZ, PVA y las MPs de FNZ optimizadas.

El difractograma de FNZ demostró que el fármaco de partida se encontró en forma cristalina, se observaron dos picos intensos cercanos a 20 y a $30 2\theta$, tal como se describe en la literatura⁸. El análisis del estado sólido de PVA demostró que se encuentra en un estado parcialmente cristalino donde se puede detectar una señal ancha a $20 2\theta$ ¹⁶.

Tal como se puede observar en la Figura 6.10, el difractograma de las MPs de FNZ fue similar al difractograma de PVA, mostrándose en un estado casi totalmente amorfo y se puede observar un pico cercano al del FNZ sin tratamiento, a $20 2\theta$. Posiblemente, la metodología relacionada con la formación de MPs (aspersión y posterior secado por calor) modificaría la red cristalina del FNZ y un pasaje, al menos parcial, al estado amorfo. Este fenómeno ha sido descrito para otros fármacos relacionados estructuralmente, como es el caso del albendazol, otro antihelmíntico de amplio espectro en medicina humana y veterinaria. Los difractogramas de MPs de albendazol con PVA usando el secado por aspersión mostraron que la intensidad de los picos cristalinos del fármaco disminuyeron gradualmente al aumentar la proporción de PVA hasta la obtención de MPs de albendazol amorfas, como se sugiere en la publicación de Alanazi y colaboradores¹⁷.

Los resultados del análisis de difracción de las MPs de FNZ están en concordancia con los obtenidos en el estudio térmico y confirman una transformación parcial del estado cristalino de FNZ a un estado amorfo.

6.4.1.4.4. Ensayo de disolución de fenbendazol

Una vez caracterizadas las MPs de FNZ optimizadas se llevó a cabo el estudio de la disolución del fármaco desde las MPs poliméricas, y se compararon los resultados con la disolución del FNZ de partida.

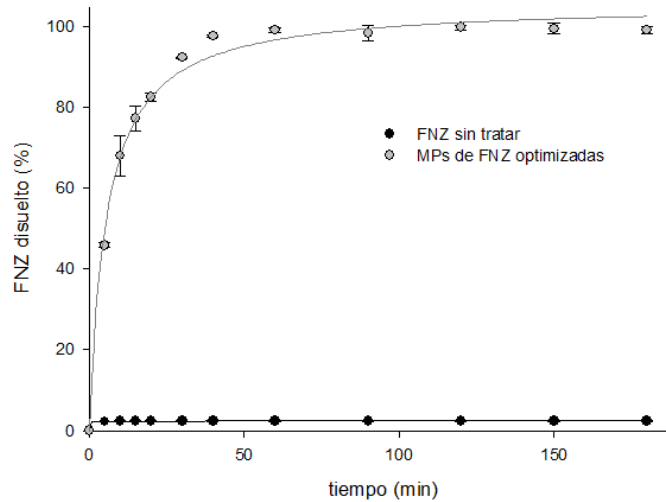


Figura 6.11. Perfiles de disolución de FNZ de partida y de FNZ desde las MPs optimizadas.

En la Figura 6.11 se muestran los perfiles de disolución de FNZ obtenidos para el fármaco sin tratar y las MPs optimizadas. De acuerdo a este ensayo, se observa un significativo incremento en la velocidad de disolución de FNZ en las MPs respecto al perfil de disolución para el fármaco sin encapsular. La disolución de FNZ desde las MPs fue de un 45%, 78% y 90% a los 5, 20 y 30 min, respectivamente, mientras que el fármaco sin tratar se disolvió en un porcentaje menor al 5% en los mismos lapsos de tiempo. La marcada diferencia en los perfiles de disolución de FNZ podría atribuirse a los cambios cristalinos del mismo, así como a la formación de partículas esféricas de menor tamaño como consecuencia de la formulación con PVA y su posterior secado, de acuerdo con los estudios de DRX y MEB descritos previamente.

Ambos perfiles de disolución mostrados en la Figura 6.11 fueron ajustados matemáticamente al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. Como se mencionó previamente, el modelo de Kosmeyer y Peppas se utiliza para analizar la disolución de fármacos desde formas farmacéuticas matriciales¹⁸, que son usualmente el tipo de estructura obtenida por medio del secado por aspersion¹⁹. Los valores de n obtenidos del ajuste fueron menores a 0,45, por lo que el mecanismo de difusión que se propone para la disolución de FNZ, desde las MPs optimizadas, es de tipo Fickiano, lo que implica que la velocidad de difusión a través de una membrana depende de forma directa del gradiente de concentración

del FNZ a ambos lados de la misma, mientras que es inversamente proporcional al espesor de la membrana, constituida este caso por la matriz de PVA.

Similares resultados en relación a la cinética de liberación fueron obtenidos cuando se estudió la disolución de albendazol desde MPs con PVA con posterior secado por aspersión¹⁷, y en el caso de la disolución de acetaminofeno (paracetamol), un analgésico empleado en algunos tipos de artritis para aliviar las cefaleas, disminuir procesos febriles y dolores corporales leves, desde MPs de quitosano²⁰.

6.4.2. Nanocápsulas lipídicas de fenbendazol

En base a la metodología que detallada previamente en el Capítulo 2, punto 2.2.2.1.5.1 (Pág. 32) se obtuvieron NCLs de FNZ. Las mismas fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro* y posteriormente se estudió su eficacia *in-vitro* frente a *E. multilocularis*.

6.4.2.1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad

Mediante el empleo de dispersión de luz dinámica, se determinó el $T_{particula}$, el IPd , PZ y conductividad de las nanocápsulas desarrolladas. En la Tabla 6.7 se observan los resultados obtenidos para las NCLs de FNZ (S8) y se las compara con las NCLs sin fármaco.

Tabla 6.7. Resultados de las NCLs sin fármaco y NCLs conteniendo FNZ.

Resultados	S2 (sin fármaco)	S8 (FNZ)
$T_{particula}$ (nm)	58,14±0,03	48,62±0,05
IPd (nm)	0,040±0,004	0,096±0,009
PZ (mV)	-5,44±0,08	-6,04±0,05
Conductividad (mS/cm)	0,598±0,005	0,596±0,009

El valor promedio obtenido para el tamaño de las NCLs de FNZ fue de 48,62 nm, similar al obtenido para las NCLs de igual proporción sin el fármaco, demostrando que la incorporación de FNZ no estaría alterando el tamaño de la cápsula.

Para evaluar la homogeneidad de las NCLs fue determinado el IPd . En la Tabla 6.7 se muestra que las NCLs presentan una distribución de tamaño considerada homogénea, con un IPd de 0,096 nm.

Para determinar la carga superficial de las NCLs S8 se empleó la medida del PZ , siendo en este caso de -6,04 mV, valor cercano al obtenido para las NCLs sin fármaco de igual tipo.

Este valor es importante, ya que, como se mencionó con anterioridad, el *PZ* es una medida de la magnitud de la carga superficial de las partículas, y esto tiene influencia en la repulsión o atracción electrostática entre las mismas, y por lo tanto es uno de los parámetros que afecta la estabilidad de los sistemas. Estos resultados coinciden también con los obtenidos para las NCLs de BNZ de igual proporción de componentes (S5), caracterizadas en el Capítulo 4. Se debe mencionar que, además, similares propiedades de tamaño y *PZ* fueron informados en la preparación de NCLs de paclitaxel, un fármaco de elección para el tratamiento sistémico del cáncer de ovario y de mamas, entre otros. Los autores describieron que tanto los sistemas vacíos y como aquellos cargados con paclitaxel mostraron un tamaño en un rango de 49 a 54 nm y cuyo *PZ* se encontró entre -4 y -6 mV, lo que confirma que la ausencia de variación de dichas propiedades después de la incorporación del fármaco²¹.

Finalmente, en la Tabla 6.7 se muestra el valor de conductividad obtenida para las NCLs de FNZ. Se observa que la conductividad no presenta diferencias significativas cuando se encapsula el FNZ, siendo para las NCLs sin fármaco y las NCLs de FNZ cercana a 0,6 mS/cm. Este valor era esperado considerando la cantidad de NaCl empleado en la formulación.

6.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las NCLs de FNZ fueron estudiadas empleando MET y las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 6.12 en la cual se puede observar que el diámetro de las NCLs S8 mostró ser similar al obtenido por dispersión de luz dinámica (ver Tabla 6.7). La estructura de las NCLs muestra una base compacta de lípidos donde está encapsulado el FNZ y la morfología de las mismas es esférica y con tamaños en el rango de 30-60 nm. También se exhiben algunas pocas partículas de un tamaño superior a 100 nm. Estos resultados fueron consistentes a los obtenidos previamente para los otros tipos de NCLs formuladas, y pueden ser a causa de procesos de fusión de una o más nanocápsulas durante la manipulación de la muestra para prepararla para este ensayo.

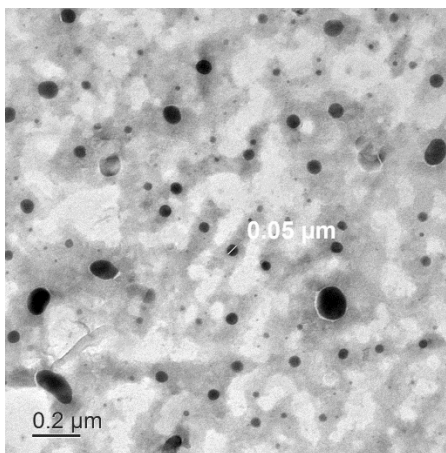


Figura 6.12. Micrografía electrónica de transmisión de las NCLs de FNZ (S8). La barra representa 200 nm.

6.4.2.3. Eficiencia de encapsulación

La E_fE de FNZ para las NCLs fue calculada como se describió en el Capítulo 2 (ver Ecuación 2.2 de la Página 36), y los resultados indicaron que se logró incorporar (cargar) el fármaco con una eficacia del 89,12 %. En base a estos resultados podemos afirmar que la nanoencapsulación de FNZ mediante el método de inversión de fase mostró ser un procedimiento adecuado, ya que permitió que una gran cantidad de fármaco (casi el 90 % del FNZ de partida) sea encapsulado en el interior de dichos sistemas. Resultados similares fueron observados cuando se encapsuló ivermectina, un antiparasitario empleado en medicina veterinaria, en este tipo de NCLs²². Este dato fue importante ya que ivermectina y FNZ no están estructuralmente relacionados y su solubilidad en agua es distinta, por lo tanto, la obtención de valores similares de carga en las NCLs sugiere que la selección de excipientes y la metodología de encapsulación fueron las correctas.

6.4.2.4. Interacción de nanocápsulas con proteínas del mucus

Como se mencionó en capítulos anteriores, las proteínas que componen el mucus podrían interactuar con las NCLs y disminuir su movilidad, reduciendo la capacidad de dichos sistemas de atravesar la membrana celular.

Para estudiar la interacción entre las proteínas del mucus y las NCLs se emplearon sistemas en los que se reemplazó el fármaco por el colorante fluorescente NileRed (ver en Capítulo 2, punto 2.2.2.4.4.).

En todos los casos las NCLs mostraron no interactuar de manera significativa con las mucinas, no presentando alteraciones en el tamaño partícula a causa de cambios en la movilidad. Esto podría deberse a que las mucinas en las condiciones de trabajo se encuentran cargadas negativamente, al igual que las NCLs (ver Tabla 6.7), no favoreciéndose así posibles interacciones electrostáticas. En este punto es importante destacar que no se han realizado, o al menos no registrado en la bibliografía evidencia del uso de este tipo de ensayos para determinar la interacción entre NCLs y las proteínas del mucus.

6.4.2.5. Activación del complemento

En este ensayo, se estudió la activación del mecanismo clásico del complemento del SHN al contacto con eritrocitos de oveja sensibilizados, lo que conduce a la lisis de éstos y la liberación de hemoglobina. Cuando el suero está en presencia de nanosistemas activadores, se encuentran menos proteínas del complemento para lisar los eritrocitos de oveja, lo que provoca una reducción de las unidades del sistema del complemento. El consumo del complemento fue expresado como función de la superficie de las NCLs (cm^2) que representa un aumento en la concentración de las mismas y los resultados se muestran en la Figura 6.13.

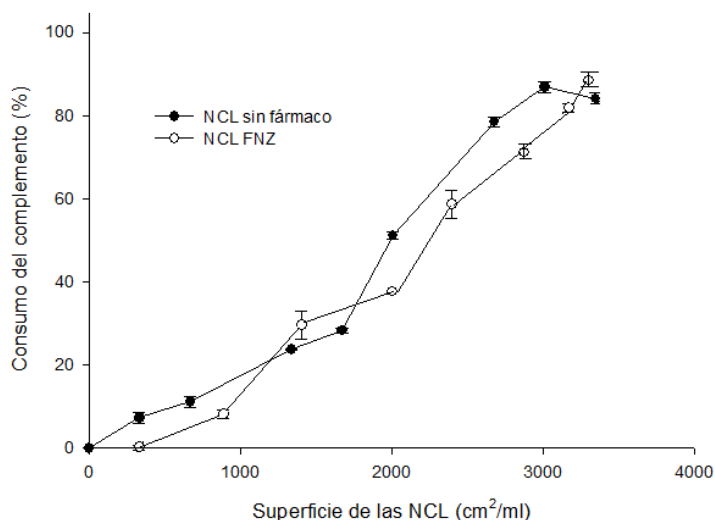


Figura 6.13. Consumo del sistema del complemento (%) en función de la superficie de las NCLs (cm^2/ml) de FNZ.

Tal como se puede ver en la Figura 6.13, el consumo del sistema de complemento para las NCLs de FNZ fue comparado con los resultados obtenidos para las NCLs sin fármaco (S2). Los perfiles mostraron ser similares, por lo que no se estaría generando una influencia significativa en la activación del sistema del complemento al emplear las nanoformulaciones

cargadas. Esto podría indicar ausencia del fármaco en la superficie de las NCLs, es decir, el FNZ podría encontrarse mayoritariamente en el interior de las NCLs.

6.4.2.6. Evaluación de la eficacia antiparasitaria de las nanocápsulas lipídicas de fenbendazol

El tratamiento quimioterapéutico actual de *E. alveolar* en los seres humanos se basa en albendazol o mebendazol. Sin embargo, los costos de tratamiento, la necesidad de una quimioterapia crónica y una alta recurrencia después de la interrupción del tratamiento requiere otras opciones de tratamiento más eficientes. Tomando en consideración que el FNZ ha demostrado ser eficaz contra *E. multilocularis*, parásito causante de la *E. alveolar* en este trabajo se evaluó la eficacia terapéutica *in-vitro* de las NCLs de FNZ⁴.

En este sentido, se evaluó la eficacia contra *E. multilocularis* por el ensayo PGI, Alamar Blue y ensayos de movilidad.

6.4.2.6.1. Ensayo enzimático de la fosfoglucoasa isomerasa

Los metacéstodos (larvas) de *E. multilocularis* poseen una capa laminada externa, una capa germinal interna, y vesículas que contienen metabolitos. Uno de ellos es la enzima glicolítica PGI, una proteína que estimula la proliferación tanto de las células de la capa germinal del parásito, así como mamíferas células endoteliales. Debido a que PGI es un componente del líquido vesicular, se han desarrollado ensayos para detectar la liberación esta enzima en presencia de distintos fármacos²³. En consecuencia, en este trabajo se realizó el ensayo sobre el comportamiento de la enzima al estar en contacto el parásito con las NCLs de FNZ. El daño de las vesículas fue calculado de forma indirecta mediante la medición de la cantidad de PGI liberada. En la Figura 6.14 se muestran los resultados obtenidos cuando se emplearon las NCLs de FNZ. Estos se comparan con los resultados obtenidos para el FNZ de partida y se emplea como control el dimetilsulfóxido.

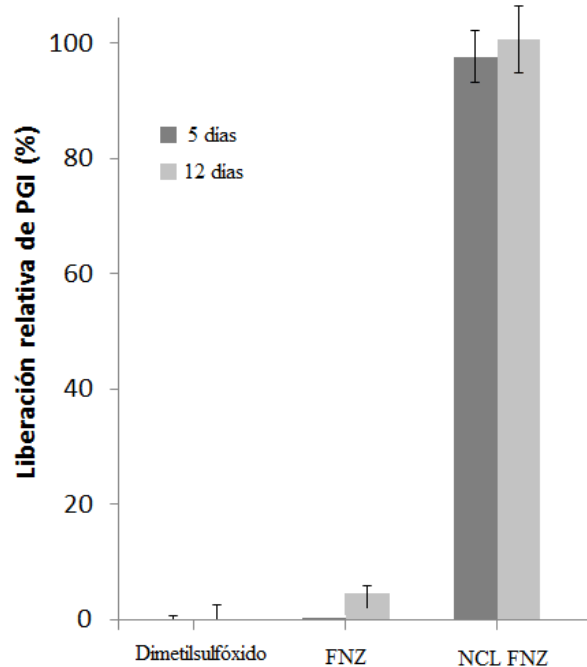


Figura 6.14. Porcentajes de liberación relativa de PGI en presencia de FNZ sin tratar y las NCLs de FNZ.

Se demostró que el FNZ sin tratar no fue activo contra los metacestodos de *E. multilocularis* dentro de los primeros 12 días de incubación *in-vitro*. Por el contrario las NCLs de FNZ mostraron una elevada liberación de la enzima PGI, lo que indica que podrían ser más activas que el fármaco de partida. Dicha actividad se relacionaría con una potencial interacción de las nanoformulaciones con el tegumento del parásito y posterior liberación del FNZ. Este resultado sugiere que la incorporación del fármaco en las NCLs es una alternativa viable si se desea incrementar la solubilidad y posterior interacción con los parásitos²³.

6.4.2.6.2. Ensayo Alamar Blue

Este es un ensayo colorimétrico en el que se utiliza el indicador de oxidación- reducción Alamar Blue que ya se ha empleado para determinar la eficacia de distintos fármacos contra otras parasitosis²⁴.

En este caso, el mismo ensayo se aplicó para medir la citotoxicidad de las NCLs de FNZ sobre los metacéstodos de *E. multilocularis* que se comparó con el fármaco sin encapsular. Los resultados se muestran en la Figura 6.15.

Se demostró que las NCLs de FNZ reducen marcadamente la viabilidad celular de metacéstodos de *E. multilocularis*, en comparación con la incubación con FNZ sin

tratamiento. Esto se debería, posiblemente, al incremento de la permeabilidad del fármaco cuando se incorpora en las nanoformulaciones, que favorece una mayor interacción con los parásitos. Cabe destacar que los resultados mostrados son valores relativos de viabilidad, en todos los casos los resultados se compararon con la viabilidad en presencia de dimetilsulfóxido.

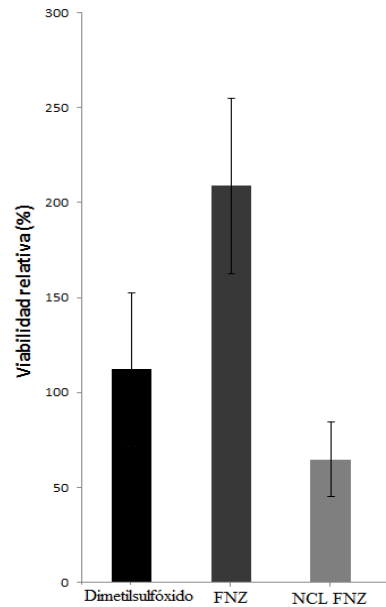


Figura 6.15. Viabilidad relativa de metacestodos de *E. multilocularis* en presencia de las NCLs de FNZ y el FNZ sin tratamiento.

6.4.2.6.3. Ensayo de movilidad

Se estudió el efecto sobre la movilidad de los parásitos en presencia de las NCLs de FNZ y del FNZ de partida. Los resultados se muestran en la Figura 6.16.

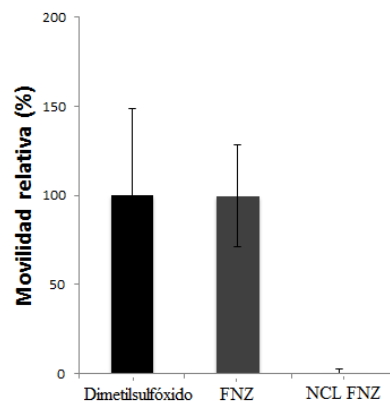


Figura 6.16. Movilidad relativa en presencia de FNZ sin tratamiento y las NCLs de FNZ.

Tal como se observa en la Figura 6.16, las NCLs de FNZ reducen marcadamente la movilidad de metacéstodos de *E. multilocularis*, en comparación con el FNZ sin encapsular. Estos resultados coinciden con los ensayos previos de la enzima PGI y Alamar Blue y confirman que la viabilidad y movilidad de las larvas se ve disminuida de manera importante cuando se las incuba con el FNZ encapsulado. En base a lo descrito se puede confirmar que la nanoformulación de FNZ en matrices lipídicas es una alternativa interesante para el incremento de la solubilidad, velocidad de disolución y permeabilidad de FNZ y posee un impacto directo sobre los metacéstodos de *E. multilocularis*.

6.5. Conclusiones

En este capítulo se demostró que las condiciones en las que se lleva a cabo la preparación de MPs, empleando secado por aspersión influyen significativamente en las características finales de las mismas.

Los sistemas microparticulados de FNZ presentaron buenos rendimientos, alta carga del fármaco en los sistemas y un incremento en la S_{FNZ} . Las MPs de FNZ optimizadas se obtuvieron a partir de 0,5 g de PVA, 50 ml de solución de Sipernat® (0,75 % p/v) y los parámetros de secado con la *Bomba* del aspersor en 12 % y la $T_{entrada}$ al sistema de secado en 131 °C. El sistema con mayor deseabilidad ($D=0,814$) permitió obtener un rendimiento del 78 %, la FNZ_c fue de 189 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de sólido y la S_{FNZ} en dicha formulación de 143,68 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El análisis por medio de MEB, CDB y DRX confirmó la obtención de MPs esféricas regulares, en las cuales el FNZ presenta transiciones del estado cristalino al amorfo. Además, se demostró que el empleo de estas MPs de FNZ optimizadas permite el aumento significativo de la velocidad de disolución del FNZ.

La incorporación de FNZ en NCLs fue llevada a cabo a partir del método de inversión de fase y las cápsulas obtenidas presentaron un tamaño relativamente homogéneo de 48 nm.

Las NCLs fueron estudiadas por MET, observándose sistemas de estructura lisa y homogénea dónde se pudo confirmar la homogeneidad del tamaño de partícula. La eficiencia de encapsulación fue mayor al 89 %. Las NCLs mostraron no interaccionar con las proteínas del mucus, así como una baja influencia sobre la activación del sistema del complemento.

Finalmente se observa una mejora significativa en la actividad *in-vitro* contra el parásito de *E. multilocularis* cuando NCLs cargadas con FNZ fueron empleadas.

6.6. Referencias

- (1) Barker, S. A.; Hsieh, L. C.; Short, C. R. “Methodology for the Analysis of Fenbendazole and Its Metabolites in Plasma, Urine, Feces, and Tissue Homogenates.” *Anal. Biochem.* **1986**, *155* (1), 112–118.
- (2) McKellar, Q. A.; Gokbulut, C.; Muzandu, K.; Benchaoui, H. “Fenbendazole Pharmacokinetics, Metabolism, and Potentiation in Horses.” *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30* (11), 1230–1239.
- (3) Hinz, E. “Fenbendazole Therapy of Experimental Larval Echinococcosis. I. The Effect of Fenbendazole on Worm Burden and Protoscolex Development of *Echinococcus Multilocularis* (Author’s Transl).” *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* **1978**, *240* (4), 542–548.
- (4) Küster, T.; Stadelmann, B.; Aeschbacher, D.; Hemphill, A. “Activities of Fenbendazole in Comparison with Albendazole against *Echinococcus Multilocularis* Metacestodes in Vitro and in a Murine Infection Model.” *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *43* (4), 335–342.
- (5) Dorati, R.; DeTrizio, A.; Genta, I.; Grisoli, P.; Merelli, A.; Tomasi, C.; Conti, B. “An Experimental Design Approach to the Preparation of Pegylated Polylactide-Co-Glicolide Gentamicin Loaded Microparticles for Local Antibiotic Delivery.” *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 909–917.
- (6) Kemala, T.; Budianto, E.; Soegiyono, B. “Preparation and Characterization of Microspheres Based on Blend of Poly(Lactic Acid) and Poly(ϵ -Caprolactone) with Poly(Vinyl Alcohol) as Emulsifier.” *Arab. J. Chem.* **2012**, *5* (1), 103–108.
- (7) Chauhan, B.; Shimpi, S.; Paradkar, A. “Preparation and Evaluation of Glibenclamide-Polyglycolized Glycerides Solid Dispersions with Silicon Dioxide by Spray Drying Technique.” *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *26* (2), 219–230.

- (8) Kumar, S.; Gokhale, R.; Burgess, D. J. “Quality by Design Approach to Spray Drying Processing of Crystalline Nanosuspensions.” *Int. J. Pharm.* **2014**, *464* (1–2), 234–242.
- (9) Brough, C.; Miller, D. A.; Keen, J. M.; Kucera, S. A.; Lubda, D.; Williams, R. O. “Use of Polyvinyl Alcohol as a Solubility-Enhancing Polymer for Poorly Water Soluble Drug Delivery (Part 1).” *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17* (1), 167–179.
- (10) Nekkanti, V.; Muniyappan, T.; Karatgi, P.; Hari, M. S.; Marella, S.; Pillai, R. “Spray-Drying Process Optimization for Manufacture of Drug-Cyclodextrin Complex Powder Using Design of Experiments.” *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35* (10), 1219–1229.
- (11) Bachtisi, A. R.; Boutris, C. J.; Kiparissides, C. “Production of Oil-Containing Crosslinked Poly(Vinyl Alcohol) Microcapsules by Phase Separation: Effect of Process Parameters on the Capsule Size Distribution.” *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *60* (1), 9–20.
- (12) Maury, M.; Murphy, K.; Kumar, S.; Shi, L.; Lee, G. “Effects of Process Variables on the Powder Yield of Spray-Dried Trehalose on a Laboratory Spray-Dryer.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *59* (3), 565–573.
- (13) Bruschi, M.; Cardoso, M. L.; Lucchesi, M.; Gremião, M. P. “Gelatin Microparticles Containing Propolis Obtained by Spray-Drying Technique: Preparation and Characterization.” *Int. J. Pharm.* **2003**, *264* (1–2), 45–55.
- (14) Fouad, E. A.; EL-Badry, M.; Mahrous, G. M.; Alanazi, F. K.; Neau, S. H.; Alsarra, I. A. “The Use of Spray-Drying to Enhance Celecoxib Solubility.” *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *37* (12), 1463–1472.
- (15) Melian, M. E.; Munguía, A. B.; Faccio, R.; Palma, S.; Domínguez, L. “The Impact of Solid Dispersion on Formulation, Using Confocal Micro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of Components.” *J. Pharm. Innov.* **2018**, *13* (1), 58–68.

- (16) Chan, S.-Y.; Chung, Y.-Y.; Cheah, X.-Z.; Tan, E. Y.-L.; Quah, J. “The Characterization and Dissolution Performances of Spray Dried Solid Dispersion of Ketoprofen in Hydrophilic Carriers.” *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10* (5), 372–385.
- (17) Alanazi, F.; El-Badry, M.; Ahmed, M. O.; Alsarra, I. A.; Alanazi, F. K.; El-Badry, M.; Ahmed, M. O.; Alsarra, I. A. “Improvement of Albendazole Dissolution by Preparing Microparticles Using Spray-Drying Technique.” *Sci. Pharm.* **2007**, *75* (2), 63–79.
- (18) Lao, L. L.; Peppas, N. A.; Boey, F. Y. C.; Venkatraman, S. S. Modeling of Drug Release from Bulk-Degrading Polymers. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1) 28–41.
- (19) Salazar, J.; Müller, R. H.; Möschwitzer, J. P.; Müller, R. H.; Möschwitzer, J. P. “Application of the Combinative Particle Size Reduction Technology H 42 to Produce Fast Dissolving Glibenclamide Tablets.” *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49* (4), 565–577.
- (20) Liu, C.; Desai, K. G. H.; Tang, X.; Chen, X. “Drug Release Kinetics of Spray-Dried Chitosan Microspheres.” *Dry. Technol.* **2006**, *24* (6), 769–776.
- (21) Hureaux, J.; Lagarce, F.; Gagnadoux, F.; Vecellio, L.; Clavreul, A.; Roger, E.; Kempf, M.; Racineux, J. L.; Diot, P.; Benoit, J. P.; Urban, T. “Lipid Nanocapsules: Ready-to-Use Nanovectors for the Aerosol Delivery of Paclitaxel.” *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *73* (2), 239–246.
- (22) Gamboa, G. V. U.; Palma, S. D.; Lifschitz, A.; Ballent, M.; Lanusse, C.; Passirani, C.; Benoit, J. P.; Allemandi, D. A. “Ivermectin-Loaded Lipid Nanocapsules: Toward the Development of a New Antiparasitic Delivery System for Veterinary Applications.” *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (5), 1945–1953.
- (23) Stadelmann, B.; Spiliotis, M.; Müller, J.; Scholl, S.; Müller, N.; Gottstein, B.; Hemphill, A. “Echinococcus Multilocularis Phosphoglucose Isomerase (EmPGI): A Glycolytic Enzyme Involved in Metacestode Growth and Parasite-Host Cell Interactions.” *Int. J. Parasitol.* **2010**, *40* (13), 1563–1574.

- (24) Ráz, B.; Iten, M.; Grether-Bühler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R. “The Alamar Blue Assay to Determine Drug Sensitivity of African Trypanosomes (T.b. Rhodesiense and T.b. Gambiense) in Vitro.” *Acta Trop.* **1997**, 68 (2), 139–147.

Capítulo 7.

CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones

En el Capítulo 3 se formularon MPs y NPs de GB, empleando poloxameros, EuRLPO y PEGs de diferente PM. También se llevó a cabo un DOE para optimizar la formulación de NPs de GB. Las partículas permitieron mejorar la solubilidad y velocidad de disolución del fármaco. Además, las NPs demostraron ser más permeables a células Caco-2 que el fármaco sin tratamiento.

En el Capítulo 4 se desarrollaron NPs de BNZ empleando DOE, para reducir el tamaño de partícula mejorando la solubilidad del fármaco. Este sistema se caracterizó *in-vitro* e *in-vivo*, evaluando su efecto sobre ratones infectados con *T. cruzi*. Se llegó a la conclusión de que el tratamiento con estas NPs podría permitir tratar con éxito la enfermedad de Chagas frente a una infección aguda por *T. cruzi*.

También se formularon NCLs de BNZ de diferentes tamaños empleando los mismos componentes en diferentes concentraciones, y se llevó a cabo un DOE para obtener la relación de componentes óptima. Las NCLs fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, demostrando aumentar la permeabilidad aparente de BNZ hasta 10 veces. Durante este proceso fue controlada la integridad de la monocapa y la captación de las NCLs por parte de células Caco-2. Las NCLs de BNZ representan una alternativa atractiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ya que estas formulaciones pueden ser estables en forma de una suspensión en medios acuosos, lo que podría facilitar la administración de BNZ en neonatos y niños.

En el Capítulo 5 se formularon NPs de PZQ con distintas proporciones de poloxameros y PVA, alcanzando un incremento en la solubilidad acuosa del fármaco de hasta 19 veces. Las velocidades de disolución de PZQ también fueron superiores a la del PZQ sin tratar. Estos sistemas aumentaron el efecto sobre el metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps*.

De manera adicional se formularon NCLs de PZQ que fueron evaluadas *in-vitro*. Los estudios sobre gusanos *S. mansoni* sugirieron que estas nanoformulaciones podrían poseer una promisorio actividad antiparasitaria en modelos animales infectados.

Finalmente, en el Capítulo 6, se formularon MPs de FNZ empleando secado por aspersión, que fueron desarrolladas y optimizadas por DOE. Los sistemas demostraron ser una alternativa muy adecuada para lograr buenos rendimientos, alta carga del fármaco en los sistemas y elevar significativamente la solubilidad del fármaco. Se demostró, además, que el empleo de estas MPs de FNZ optimizadas permitió un aumento significativo de la velocidad de disolución del fármaco.

Se formularon también NCLs de FNZ que fueron caracterizadas *in-vitro*. Los estudios sobre larvas demostraron un incremento de la actividad *in-vitro* contra el parásito de *E. multilocularis* por parte de las NCLs cargadas con FNZ en comparación con el FNZ sin encapsular.

Capítulo 8.

RESUMEN

8.1. Resumen

El presente trabajo aborda la formulación y caracterización de diferentes sistemas micro- y nanoparticulados de glibenclamida, benznidazol, praziquantel y fenbendazol. Todos estos son fármacos empleados como antiparasitarios, pero al ser muy poco solubles en agua presentan una baja absorción y errática biodisponibilidad.

Con el objetivo de mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de glibenclamida, se formularon diferentes sistemas nanoparticulados. Se evaluó el uso de diversos biomateriales en la formulación de nanopartículas. Para esto fueron evaluados: Eudragit RLPO, P-188, P-407 y polietilenglicol 6000, empleando diferentes metodologías de agitación y secado posterior. También se formularon nanopartículas de glibenclamida conteniendo Eudragit RLPO, P-188, P-407 y polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares. Finalmente, se llevó a cabo un diseño de experimentos para la preparación de dichas nanopartículas, seleccionando las mejores condiciones de formulación. Todos los sistemas formulados fueron luego caracterizados fisicoquímicamente e *in-vitro*.

Estos sistemas nanoparticulados permitieron un aumento en la solubilidad acuosa de dicho fármaco de más de 6 veces. Los resultados demostraron que la velocidad de disolución de glibenclamida en todas las muestras fue superior a la del fármaco sin tratar. Tanto las metodologías de agitación como el tipo de secado aplicados en este estudio dieron como resultado la obtención de nanopartículas con diferentes características fisicoquímicas. A partir de todas las muestras que fueron secadas por liofilizado se obtuvieron partículas submicrómicas, con tamaños desde 49 a 394 nm, mientras que cuando el secado fue llevado a cabo en estufa las partículas exhibieron un tamaño micrométrico.

En relación a la influencia del peso molecular del polietilenglicol, se demostró que el incremento del mismo dió como resultado la formación de nanopartículas de menor tamaño, y que a su vez aumentaba la solubilidad acuosa del fármaco. Además, el incremento del peso molecular del polietilenglicol se correlacionó de manera directamente proporcional con la velocidad de disolución de las correspondientes nanopartículas. Se observó que estos sistemas no interaccionaban significativamente con las proteínas del mucus y los ensayos de viabilidad celular indicaron que los mismos no presentaron citotoxicidad sobre células Caco-2.

Finalmente se llevó a cabo un diseño de experimentos para optimizar la formulación de nanopartículas. En base a los resultados obtenidos previamente se implementaron dos

etapas (*screening* y la fase de optimización). Las nanopartículas optimizadas de glibenclamida fueron preparadas empleando 400 mg de P-188, 8 mg de P-407, 200 mg de Eudragit RLPO e igual cantidad de polietilenglicol 6000, y agitación magnética. Este sistema, que brindó la mayor deseabilidad (0,83), alcanzó un rendimiento del 84 %, la eficacia de encapsulación fue del 94 %, el tamaño de partícula de 155 nm y una solubilidad acuosa del fármaco de 151,32 µg/ml.

Por otro lado, se prepararon nanopartículas de benznidazol y poloxámero P-188, formuladas mediante un método de diseño con posterior optimización de experimentos. Estos sistemas fueron caracterizados *in-vitro* y se comprobó la eficacia antiparasitaria *in-vivo* en ratones. Además fueron formuladas nanocápsulas lipídicas de benznidazol mediante el método de inversión de fase, variando las cantidades de los mismos componentes con el objetivo de obtener sistemas con características diferentes. Finalmente se optimizó la cantidad y el tipo de aceite empleado para el desarrollo de los sistemas. Todas las nanocápsulas fueron caracterizadas *in-vitro*.

En este trabajo se demostró que las condiciones para llevar a cabo la preparación de los nanosistemas de benznidazol y poloxámero P-188 fueron significativamente críticas en las características finales obtenidas. El tamaño de partícula se redujo, mientras que la cantidad de benznidazol nanocristalizado y la solubilidad acuosa del fármaco se incrementaron mediante el procedimiento de optimización.

Las condiciones óptimas para la preparación de nanopartículas incluyeron el uso de una solución de benznidazol de 26 mg/ml, de 15 mg/ml de P-188 y el 30% de fase orgánica. Tanto la temperatura de cristalización como la velocidad de agitación no pudieron ser modeladas como factores significativos sobre las respuestas estudiadas.

En las condiciones de deseabilidad (0,99), el 98 % de benznidazol fue nanocristalizado, el tamaño de partícula fue de 48 nm y la solubilidad acuosa de benznidazol de 3,75 mg/ml. Finalmente, este sistema optimizado se caracterizó *in-vitro*, demostrando un aumento significativo de la permeabilidad aparente de benznidazol.

También se demostró que las nanopartículas de benznidazol formuladas a través de este proceso de optimización exhiben un notable efecto en la inhibición del crecimiento amastigotes de *Trypanosoma cruzi* en miocitos cardiacos primarios. Los ensayos *in-vivo* indicaron que todos los ratones sobrevivieron a la infección aguda con 15 dosis de 25 o 50 mg/kg/día de nanopartículas de benznidazol durante el ensayo. Estos hallazgos llevaron a la conclusión de que el tratamiento con nanopartículas de benznidazol es un enfoque muy conveniente, en diferentes dosis, para tratar con éxito la enfermedad de

Chagas en un modelo experimental de infección aguda por *Trypanosoma cruzi*. Adicionalmente, estos sistemas se podrían dosificar en suspensiones acuosas para ser administrados a neonatos y niños, quienes hasta la actualidad no poseen medicación adecuada a su edad.

También se formularon nanocápsulas lipídicas de benznidazol de diferentes tamaño, las que fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, demostrando no interaccionar con las proteínas del mucus y no generar cambios significativos en la activación del sistema del complemento. Además mantuvieron una alta sobrevivencia celular luego de 24 y 48 horas de tratamiento. Estos sistemas permitieron aumentar la permeabilidad aparente de fármaco hasta 10 veces, siendo controladas durante este proceso la integridad de la monocapa y la captación de las nanocápsulas lipídicas. En este sentido, se concluye que este tipo de nanocápsulas de BNZ representan una alternativa atractiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Por otro lado, ya que pueden obtenerse como una suspensión estable en medios acuosos, las nanocápsulas lipídicas podrían facilitar la administración de benznidazol en neonatos y niños.

Por medio del procedimiento de nanocrystalización controlada se formularon nanopartículas de praziquantel empleando P-188 y P-407 y alcohol poli(vinílico) como polímeros transportadores. El método de cristalización controlada se llevó a cabo empleando dos tipos de agitación: magnética (300 rpm) y homogeneizador (7000 rpm). Estos sistemas fueron evaluados *in-vivo* sobre el metabolismo de cisticercos de *Taenia crassiceps* en modelo animal. Por otro lado, se desarrollaron nanocápsulas lipídicas de praziquantel en base al método de inversión. Las mismas fueron caracterizadas fisicoquímicamente e *in-vitro*, y se evaluó su efecto frente a gusanos *Schistosoma mansoni*.

Las nanopartículas de praziquantel preparadas con distintas proporciones de P-188, P-407 y alcohol poli(vinílico), lograron un incremento en la solubilidad de praziquantel de hasta 19 veces con respecto a la solubilidad del fármaco de partida. La velocidad de disolución del fármaco se incrementó notablemente al estar nanoformulado. Esto podría deberse a que, como fue demostrado por ensayos de calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X, las nanopartículas formuladas con alcohol poli(vinílico) reducen la cristalinidad del fármaco en una proporción mayor que los poloxámeros. Estas nanoformulaciones de praziquantel modificaron de manera considerable el metabolismo de cisticercos de *Taenia crassiceps* en modelo animal.

También se formularon nanocápsulas lipídicas cargadas con praziquantel mediante el

método de inversión de fase. Los resultados indicaron que las nanocápsulas sin fármaco y las de praziquantel exhiben un tamaño similar y cercano a 50 nm. El índice de polidispersidad en ambos casos fue menor o igual a 0,06, lo que sugiere una distribución de tamaño homogénea. Se observó una activación del sistema del complemento para las nanocápsulas lipídicas de praziquantel similar a la de las nanocápsulas sin fármacos, lo que podría indicar la presencia del fármaco en el interior de las cápsulas. La sobrevida de las células en presencia de las cápsulas (con y sin praziquantel) fue elevada tanto para el tratamiento de 24 como el de 48 horas. Se demostró actividad contra gusanos *Schistosoma mansoni* para las nanocápsulas de praziquantel mediante ensayos *in-vitro*. En este sentido, las nanocápsulas lipídicas cargadas con praziquantel representan una importante alternativa para una distribución eficiente de dicho agente antiparasitario.

Por último, se formularon sistemas de fenbendazol. Se llevó a cabo un diseño de experimentos y su optimización para formular micropartículas de fenbendazol y alcohol poli(vinílico) empleando el secado por aspersión. Las partículas obtenidas fueron luego caracterizadas para comprobar la eficacia del diseño. Además se desarrollaron y caracterizaron nanocápsulas lipídicas y se evaluó su actividad antiparasitaria *in-vitro* frente a *Echinococcus multilocularis*.

Se demostró que las condiciones en las que se lleva a cabo la preparación de micropartículas, empleando secado por aspersión influyen significativamente en las características finales de las mismas. Los sistemas microparticulados de fenbendazol presentaron buenos rendimientos, alta carga del fármaco en los sistemas y un incremento en la solubilidad acuosa del fenbendazol. La formulación de las micropartículas optimizadas se realizó a partir de 0,5 g de alcohol poli(vinílico), 50 ml de solución de Sipernat® (0,75 % p/v) y los parámetros de secado utilizados fueron con la bomba del aspersor en 12 % y la temperatura de entrada al sistema de secado en 131 °C. El sistema con mayor deseabilidad (0,814) permitió obtener un rendimiento del 78 %, el porcentaje de fenbendazol en el sólido fue de 189 µg/mg de sólido y la solubilidad de fenbendazol en dicha formulación de 143,68 µg/ml. El análisis por medio de microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X confirmó la obtención de micropartículas esféricas regulares, en las cuales el fenbendazol presenta transiciones del estado cristalino al amorfo. Además, se demostró que el empleo de estas micropartículas de fenbendazol optimizadas permite el aumento significativo de la velocidad de disolución del fármaco.

La incorporación de fenbendazol en nanocápsulas lipídicas fue llevada a cabo a partir

del método de inversión de fase y las cápsulas obtenidas presentaron un tamaño relativamente homogéneo de 48 nm. Las nanocápsulas fueron estudiadas por microscopía electrónica de transmisión, observándose sistemas de estructura lisa y homogénea donde se pudo confirmar la homogeneidad del tamaño de partícula. La eficiencia de encapsulación fue mayor al 89 %. Las nanocápsulas lipídicas mostraron no interactuar con las proteínas del mucus, así como una baja influencia sobre la activación del sistema del complemento. Además fue evaluada su eficacia antiparasitaria *in-vitro* sobre *Echinococcus multilocularis*, llevando a cabo los ensayos de la enzima fosfoglucoasa isomerasa y Alamar Blue. Se observa una mejora significativa en la actividad *in-vitro* contra el parásito de *Echinococcus multilocularis* cuando nanocápsulas lipídicas cargadas con fenbendazol fueron empleadas.