



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA Y EFICACIA CLÍNICA DE
NUEVAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN MODIFICADA
EN BASE A RICOBENDAZOLE EN CANINOS**

Alicia Raquel Dib Brusales

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

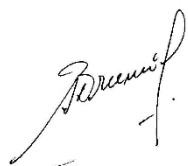
2017

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

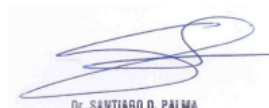
Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA Y EFICACIA CLÍNICA DE
NUEVAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN MODIFICADA
EN BASE A RICOBENDAZOLE EN CANINOS**

Alicia Raquel Dib Brusales



Sergio Sánchez Bruni
Director de Tesis



Dr. SANTIAGO D. PALMA

Santiago Palma
Co-director

2017

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

José Manuel Verdes, DMTV, MSc, PhD.

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República, Uruguay

María Eugenia Olivera, QF, PhD.

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina

Nicolás Litterio, MV, PhD

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Católica de Córdoba, República Argentina

2017



**FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados**

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**“EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA Y EFICACIA CLÍNICA DE
NUEVAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN MODIFICADA EN
BASE A RICOBENDAZOLE EN CANINOS”**

Por: Mag. Alicia Raquel DIB BRUSALES

**Director de Tesis: Dr. Sergio Sánchez Bruni
Codirector de Tesis: Dr. Santiago Palma**

Tribunal

Presidente: Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro: Dra. María Eugenia Olivera

Tercer Miembro: Dr. Nicolás Litterio

Fallo del Tribunal:

APROBADA con MENCIÓN.

Anfiteatro del Hospital Veterinario, 22 de febrero de 2017



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Postgrados Académicos y Especializaciones

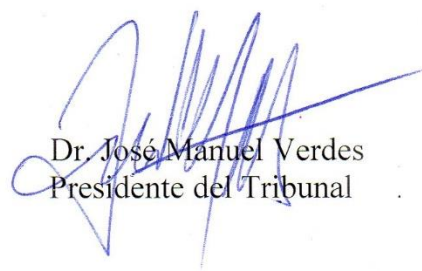
El Tribunal considera que la Doctoranda Mag. Alicia Raquel Dib Brusales ha realizado un trabajo de Tesis adecuado para la obtención del Título, con una buena redacción escrita, adecuada revisión bibliográfica para sustentar la hipótesis y objetivos planteados.

Los resultados obtenidos se presentan de forma clara, demostrando una excelente capacidad oratoria, siendo un aporte al conocimiento de la farmacología veterinaria, específicamente en el área de los antiparasitarios en perros.

Los resultados de esta Tesis tienen un alto impacto en Medicina Veterinaria, fundamentalmente en temas vinculados a la Salud Animal y cuyos resultados tienen una potencial transferencia al sector productivo. Como en toda buena Tesis Doctoral, se abren nuevos caminos de investigación en esta disciplina.

La Defensa oral fue clara, concisa y amena, respaldada por un adecuado material audiovisual, demostrando profundo conocimiento y responsabilidad en el desarrollo del trabajo de Tesis. Destacamos la solvencia en el razonamiento llevado a cabo en las respuestas a las preguntas y sugerencias planteadas por el Tribunal, que denotan el grado de compromiso durante el proceso de formación.

Por lo anteriormente expresado, el Tribunal, por unanimidad, califica el trabajo de Tesis de Doctorado en Salud Animal de la Mag. Alicia Raquel Dib Brusales “EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA Y EFICACIA CLÍNICA DE NUEVAS FORMULACIONES DE LIBERACIÓN MODIFICADA EN BASE A RICOBENDAZOLE EN CANINOS”, como Aprobado con Mención.



Dr. José Manuel Verdes
Presidente del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis Directores, Dres. Sergio Sánchez Bruni y Santiago Palma, por todo lo que me apoyaron y enseñaron. A través de los años de estudio, fueron mis profesores y amigos.

Por supuesto también a mis amigos argentinos, Alejandro Paredes, Cristina Farías y Silvina Castro, por su paciencia y enseñanzas en mis incursiones en el laboratorio.

A las Facultades de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Provincia de Buenos Aires y de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, por permitirme aprender y trabajar con mis experimentos en sus laboratorios.

A mi muy querida Facultad de Veterinaria, por la confianza y apoyo que depositó en mi persona como profesional docente e investigador.

A mis compañeros del Área Farmacología, por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi familia, por estar siempre a mi lado.

A mis amigos, por quererme tal y como soy, por su apoyo y confianza.

Disfruta de cada momento y de cada día, carpe diem!

ÍNDICE

Introducción	1
Características generales de los BZD	3
Clasificación	5
Propiedades físico-químicas	5
Farmacocinética	6
Mecanismo de acción de los Benzimidazoles	10
Espectro de acción	11
Efectos adversos y tóxicos	12
Estrategias farmacológicas y nuevos desafíos	13
Sistemas de liberación modificada	15
Clasificación	17
Clasificación de los sistemas matriciales	20
Excipientes reguladores de la liberación	22
Sistemas SLM gastro-retentivos flotantes	25
Formulación del Comprimido	27
Métodos de obtención de comprimidos	28
Caracterización farmacotécnica	30
Pruebas reológicas o estudio de la fuides de los polvos	31
Ensayos de velocidad de disolución <i>in vitro</i>	36
Hipótesis	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
Estrategia de la investigación	37
Estudio Experimental I	40
Estudio Experimental II	48
Experimento 1	50
Experimento 2	58
Experimento 3	61
Experimento 4	67
Experimento 5	74
Estudio Experimental III	83
Estudio Experimental IV	100

Discusión general	114
Principales aportes de la Tesis Doctoral	127
Referencias bibliográficas	128
Publicaciones	146

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral, está basada en cuatro Estudios Experimentales (I, II, III y IV), donde se analizaron las características biofarmacéuticas y eficacia clínica antiparasitaria de comprimidos en base a Ricobendazole (RBZ), diseñados y formulados como nuevos sistemas de liberación modificada (SLM). El objetivo general fue obtener y caracterizar nuevos SLM en base a RBZ, para ser administrados en caninos como especie primaria. Los Estudios Experimentales I y II fueron realizados *in vitro*, para desarrollar nuevas formulaciones en base a RBZ. Los Estudios Experimentales III y IV, fueron realizados *in vivo* en perros para evaluar perfiles farmacocinéticos (PK) y eficacia clínica antiparasitaria respectivamente. En el Estudio Experimental I, se diseñó y caracterizó exitosamente una formulación de liberación inmediata (LI) en base a RBZ, para utilizarla como formulación control. El Estudio Experimental II, constó de 5 experimentos en los cuales se diseñaron y caracterizaron exitosamente SLM conformados por distintos excipientes, dos de carácter hidrofílico (Hidroxipropilmetil-celulosa y Ácido Algínico) y dos de carácter lipídico (Gelucire 50/02® y Alcohol Cetílico). En el Estudio Experimental III, se valoraron los perfiles PK *in vivo* de las formulaciones obtenidas en los Estudios Experimentales I y II. Se trabajó con 6 grupos de perros (n=2 cada uno) cruza, machos y hembras no preñadas, libres de parásitos gastrointestinales. Se hizo un diseño en bloque incompleto (2 fases separadas por 21 días entre sí), con un n=4 final por grupo. Se administraron las formulaciones SLM, una formulación en base a RBZ LI y una formulación en base a Albendazole (ABZ) LI. Se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos pre y post-administración (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 y 48 h). Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis por cromatografía líquida de Alta Performance (HPLC). Los resultados obtenidos en el estudio PK, indicaron que la comparación estadística de la concentración máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (AUC), entre las formulaciones en base a RBZ estudiadas, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$), sin embargo, se pudieron observar diferencias ($p < 0,05$), en el tiempo (T_{max}) ($p < 0,05$) ($6,50 \pm 3,00$), de la C_{max} de la formulación SLM con Alcohol Cetílico (AC). Por lo cual la formulación SLM con AC, fue seleccionada para la valoración de la eficacia

clínica antiparasitaria en la especie destino. El Estudio Experimental IV, se basó en dos objetivos: el primero fue comparar las eficacias clínicas antiparasitarias entre las formulaciones: RBZ SLM con AC, RBZ LI y ABZ LI. El segundo objetivo, fue comparar las eficacias clínicas entre dos diferentes dosis únicas (20 mg/kg y 10 mg/kg), de la formulación RBZ SLM con AC, un dosis única (20 mg/kg) de RBZ LI y 3 dosis *sid* (25 mg/kg) de ABZ LI. Se trabajó con 5 grupos de perros (n=6 cada uno). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la efectividad antiparasitaria ($p > 0,05$), entre las 2 dosis de la formulación RBZ SLM con AC estudiadas. Este resultado, se consideró importante a la hora de pensar en la terapéutica con esta molécula.

Palabras clave: nuevos sistemas de liberación modificada, regímenes de dosificación, Ricobendazole, antihelmínticos, perros, vía oral.

SUMMARY

The present PhD Thesis is based in four Experimental Studies (I, II, III and IV) in which the biopharmaceutical characteristics and clinical antiparasitic efficacy of new Ricobendazole (RBZ)-based controlled release systems (CRS) in the form of tablets for oral administration in canines were studied. The main aim of this Thesis was to obtain and to evaluate new CRZ RBZ-based formulations to be administered in dogs. Experimental Studies I and II were performed *in vitro* in order to develop new RBZ-based formulations. Experimental Studies III and IV were performed *in vivo* in dogs to evaluate the pharmacokinetic profiles (PK) and antiparasitic clinical efficacy respectively. In Experimental Study I, an immediate release (IR) RBZ-based formulation was designed as control formulation. Experimental Study II was based in five experiments in which two hydrophilic polymer matrices based in Hydroxypropyl MethylCellulose (HPMC) and Alginic Acid (AA) and two lipid polymer matrices based in Gelucire 50/02® (GE) and Cetyl Alcohol (CA) were successfully designed. In Experimental Study III, PK parameters of the formulations obtained in Experimental Studies I and II were evaluated. Twelve crossbreed dogs, males and non-pregnant females, gastrointestinal (GI) parasites-free, were involved in this trial. Experimental dogs were randomly allocated into six groups (n=2 each), and received six different treatments using an incomplete block design (2 phases separated by 21 days washout period) for obtaining a final experimental n=4 per group. Treatments of a Albendazole (ABZ)-based IR formulation and RBZ-based (IR and CRS formulations from Experimental Studies I and II) were administered in a single oral dose to experimental animals. Blood samples were taken prior to and following treatments (0; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 and 48 h) after the oral treatments. Samples were stored frozen (- 20 °C) until PK analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). No statistical differences ($p>0,05$) were observed on plasma maximum concentration (C_{max}) and on area under curve (AUC) between RBZ formulations. However, a significance ($p<0.05$) time (T_{max}) (6.50 ± 3.00) for C_{max} in CRS RBZ-based formulation with CA was observed, so this formulation was selected for the antiparasitic clinical efficacy evaluation in dogs.

Two aims were considered for Experimental Study IV. First, to compare the antiparasitic clinical efficacy between the RBZ-based CR formulation with CA, the RBZ-based IR formulation and a ABZ-based IR formulation. The second aim was to compare the antiparasitic clinical efficacy of two different single doses (20 mg/kg and 10 mg/kg) of the RBZ-based CR formulation with CA, a single dose (20 mg/kg) of a RBZ IR formulation and a ABZ IR (25 mg/kg) (3 doses sid). Thirty crossbreed dogs, males and non-pregnant females, naturally parasitised with GI nematodes were involved in this trial. Animals were allocated into 5 groups (n=6 each). No statistical differences in antiparasitic clinical efficacy were observed ($p>0.05$) between the two doses of RBZ CR formulations. This result was considered very important for an anthelmintic treatment with this RBZ-based CR with AC formulation in this species.

Key words: new controlled delivery systems, dosage parameters, Ricobendazole, anthelmintics, dogs, oral administration

Abreviaciones

AA	Ácido Algínico
ABZSO	Albendazole sulfóxido
ABZSO ₂	Albendazole sulfona
AC	Alcohol Cetílico
AUC	Área bajo la curva
BZD	Benzimidazoles
Cmax	Concentración máxima
DS	Dispersiones sólidas
FBZ	Fenbendazole
GE	Gelucire
GI	Gastrointestinal
HLB	Balance hidrofílico/lipofílico
HPG	huevos por gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HPMC	Hidroxipropil-metilcelulosa
LI	Liberación inmediata
LM	Liberación modificada
OBZ	Oxibendazole
PK	Farmacocinética/o
TRCH	Test de reducción de conteo de huevos
RBZ	Ricobendazole
sid	Una dosis cada 24 h
SLM	Sistemas de liberación modificada
Tmax	Tiempo máximo

Introducción

El tratamiento y el control de los parásitos internos en pequeños animales, es muy importante dado que afectan su normal desarrollo y crecimiento, pueden producir diarreas severas y disturbios metabólicos. *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. son las especies parásitas más importantes de nematodos gastrointestinales (GI) del perro adulto en nuestro país. A su vez, algunos parásitos internos, como *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum*, son los causantes en el hombre de los síndromes de *larva migrans* visceral y cutánea respectivamente (Soulsby, 1982; Díez et al., 1999).

Para la práctica clínica, se requiere de un conocimiento epidemiológico del parásito involucrado y un entendimiento de las características de los fármacos antihelmínticos, disponibles en el mercado veterinario. Muchas son las herramientas farmacológicas que están a disposición en el mercado veterinario actual, muchas veces con las mismas moléculas pero con diferente formulación (Sánchez Bruni, 2006).

Cualquier principio activo, que se pretenda comercializar para su utilización clínica, debe pasar por una serie de etapas encaminadas a la obtención de un medicamento seguro, confiable y eficaz. El diseño de un nuevo medicamento es un trabajo multidisciplinario de varias etapas, que concluye en la obtención de la forma farmacéutica más adecuada, para ese principio activo. El diseño de una forma farmacéutica, plataforma compuesta por el/los principio/s activo/s y excipientes, finaliza en ensayos de biodisponibilidad en un número importante de casos. Por tanto, cualquier cambio en el proceso de diseño y formulación, puede influenciar en la absorción y por ende la biodisponibilidad del fármaco en cuestión en la especie destino. Por ello, los estudios de formulación de una presentación farmacéutica, pueden durar varios años, antes de llegar a su comercialización e incluso después de haberse comercializado, se pueden requerir estudios de reformulación para mejorarlo, adaptarlo a nuevos requerimientos del mercado y evitar inconvenientes que puedan manifestarse con su uso (Vila Jato, 2001). Todo esto, puede englobarse en el concepto de Biofarmacia, desde donde se estudia como las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus formas farmacéuticas y sus vías de administración, pueden afectar su absorción y por ende su

biodisponibilidad. La interrelación entre los factores antes descritos, rigen que cantidad y a qué velocidad ese principio activo accede a la circulación sistémica. Para que un fármaco sea efectivo, necesita alcanzar un receptor en el sitio de acción y permanecer unido a él el tiempo suficiente para ejercer su efecto farmacológico. Esto va a depender de la vía de administración, de la forma farmacéutica y de su tasa de liberación (Ashford, 2002).

Entonces, la biodisponibilidad de una molécula en el organismo, va a estar regida por su Farmacocinética. La sigla LADME, pone de manifiesto las diferentes etapas que ocurren en dichos procesos: la liberación del principio activo una vez administrado en el organismo, el estudio de como se absorbe hacia la circulación sistémica y por ende su biodisponibilidad, la distribución en los tejidos, el metabolismo o biotransformación y la eliminación de los fármacos (Figura 1).

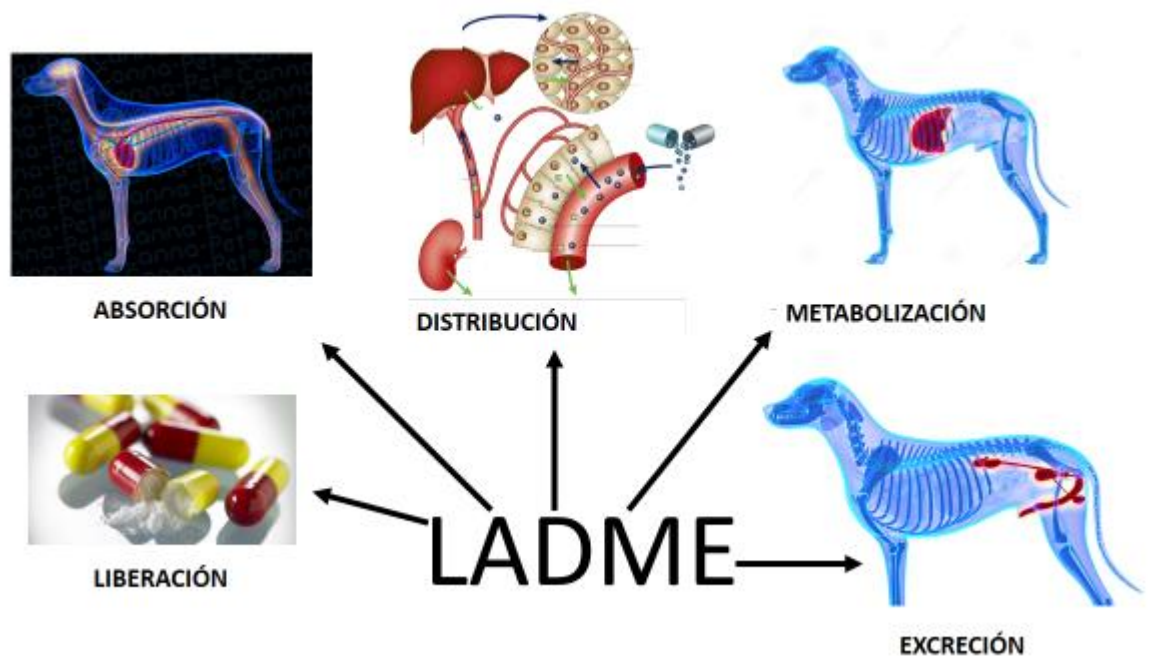


Figura 1. Procesos farmacocinéticos LADME: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco.

Estas etapas, suponen el paso del principio activo, a través de las membranas biológicas. Es indispensable conocer los mecanismos por medio de los cuales los fármacos las atraviesan, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y las membranas que modifican esta transferencia, para comprender la disposición de los fármacos en el organismo, como se

distribuyen y llegan a su sitio de acción, como se metabolizan y como son finalmente excretados y eliminados (Baggot & McKellar, 1994; Buxton & Bennet, 2011).

La presente Tesis Doctoral, se enmarca en el estudio de las propiedades biofarmacéuticas de nuevas formulaciones del metabolito activo Ricobendazole (RBZ), un Benzimidazole (BZD) metilcarbamato, muy utilizado en rumiantes y caninos como antihelmíntico de amplio espectro, y como nuevas formulaciones orales en base a esta molécula, podrían ser capaces de influenciar en sus propiedades biofarmacéuticas y en la eficacia clínica antiparasitaria en los perros.

Características generales de los BZD

Desde la década de 1960, los BZD han sido utilizados ampliamente en medicina humana y medicina veterinaria, como antihelmínticos y antiprotozoos (Lanusse y Prichard 1993). Hoy en día, el desarrollo de gran cantidad de presentaciones farmacéuticas en base a BZD en el mercado veterinario, incluye asociaciones medicamentosas con otros principios activos, con el objetivo de aumentar su espectro de acción, reducir la presentación de reacciones adversas y hacer frente a fenómenos de resistencia, principalmente en especies de producción (Sánchez Bruni et al., 2006).

Los antihelmínticos BZD y sus metabolitos derivados, debido a su amplio espectro y bajo costo, comprenden una familia de fármacos antihelmínticos ampliamente utilizada en la terapia antiparasitaria en medicina veterinaria y medicina humana (Sánchez Bruni et al., 2006; Scarpelli et al., 1999). El interés básico para estudiar el núcleo químico BZD como desarrollo potencial de nuevos agentes quimioterápicos, surgió en 1950 cuando se determinó que 5,6 dimetil-1-benzimidazol, conformaba una parte integral de la estructura molecular de la vitamina B₁₂. Estos resultados, fueron de gran interés y dieron origen a estudios que aportaron beneficios al tratamiento farmacológico de las enfermedades parasitarias. El primer fármaco BZD sintetizado fue el Tiabendazole en la década de 1960, luego por diversas sustituciones

químicas se obtuvieron los BZD metilcarbamatos, caracterizados por poseer un grupo metilcarbamato en el anillo tiazol.

El núcleo químico BZD comprende un sistema de 2 anillos (bicíclicos) (Wagner y Millet, 1943), en los cuales un grupo benceno se fusiona en las posiciones 4 y 5 del anillo imidazol (heterocíclico) (Figura 2).

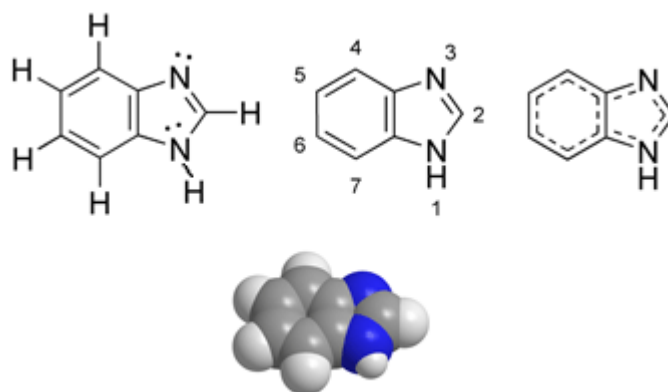


Figura 2. Estructura química del núcleo Benzimidazole. Adaptado de Townsend, 1990.

Se produce un rápido intercambio de protones en el grupo amino (NH_2) y el átomo de nitrógeno (N) del anillo imidazol, dando origen a los tautómeros I y II, que son químicamente equivalentes. Esta equivalencia química refleja la trascendental importancia que tienen los átomos de N ubicados en posición 1 y 3 del anillo imidazol, debido a que son los que confieren las características ácidas y básicas a la molécula (Lanusse et al., 1993; Rew y Mckenzie, 2002). Si estos átomos, se sustituyen por otros grupos químicos, se originan dos isómeros no equivalentes con diferentes características químicas. Por esta razón, sólo las posiciones 2 y 5, respectivamente (imidazólico y bencénico), fueron el objetivo para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica, por tanto las sustituciones en dichas posiciones 2 y 5, han generado los compuestos más potentes del grupo. Los derivados que contienen un átomo de azufre en tales posiciones, poseen alta eficacia contra nematodos gastrointestinales (GI), broncopulmonares adultos y estadios

inmaduros, incluyendo también larvas inhibidas de la mayoría de los nematodos GI (Mc Kellar & Scott, 1990).

Clasificación

Los compuestos BZD más importantes se clasifican en: **BZD Tiazólicos** (Tiabendazole), **Pro-BZD** (Febantel y Netobimin), **BZD Metilcarbamatos** (Mebendazole, Oxibendazole, Albendazole, Albendazole Sulfóxido ó Ricobendazole, Fenbendazole, Oxfendazole) y **BZD Tioles Halogenados** (Triclabendazole) (Lanusse & Prichard, 1993), (Figura 3).

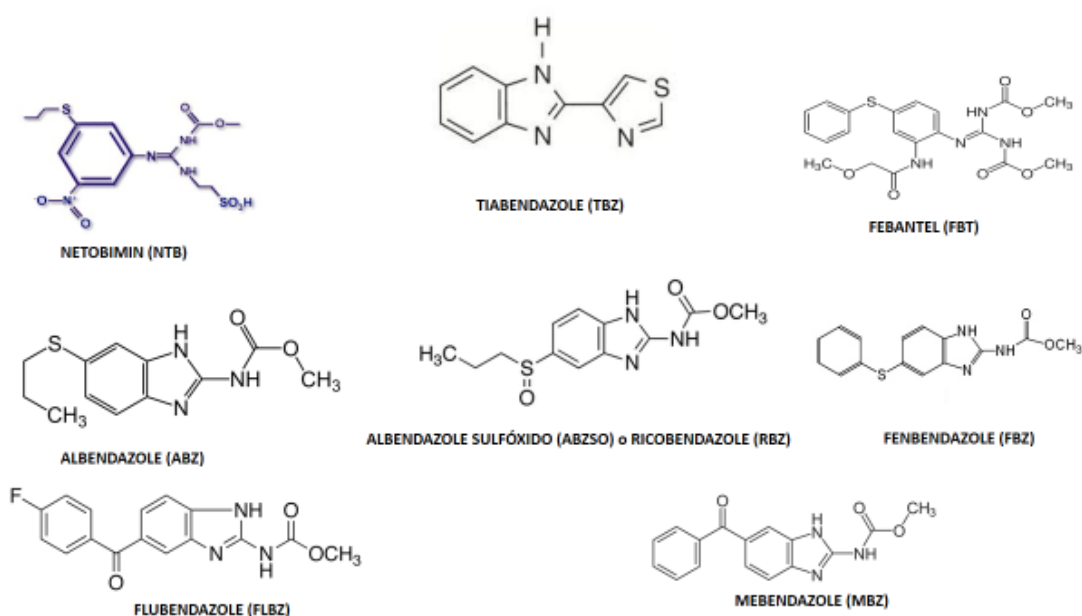


Figura 3. Estructura química de los BZD más importantes usados en medicina veterinaria. Adaptado de: Lanusse et al., 2009.

Propiedades físico-químicas

Los BZD, son sustancias cristalinas estables y con alto punto de fusión (223-304°C); además son relativamente insolubles en agua, benceno y éter, pero muy solubles en alcohol y disolventes no polares (Townsend & Wise, 1990). Son bases débiles (pK 6,8 y 7,8), por lo que se encuentran principalmente en

su forma no ionizada a pH plasmático, lo cual favorece su distribución desde el plasma hacia diferentes tejidos, hecho especialmente importante para el intercambio reversible entre plasma y fluidos digestivos (Lanusse et al., 1993). El pasaje o distribución del fármaco / metabolito desde el plasma al tracto digestivo, está impulsado por el gradiente de pH entre el plasma y los diferentes segmentos del tracto GI. Ha sido demostrado que este mecanismo tiende a concentrar los metabolitos de Albendazole (ABZ) (sulfóxido y sulfonas) en el tracto GI, lo cual es particularmente importante en el caso del estómago, donde el pH más ácido que a nivel intestinal, favorece el atrapamiento iónico del fármaco (Lanusse et al., 1993; Sánchez Bruni et al., 2002).

Farmacocinética

Liberación y Absorción

Existe una estrecha relación entre la formulación farmacéutica, la vía de administración, la biodisponibilidad sistémica y el efecto antiparasitario, de modo que a mayor biodisponibilidad del fármaco activo, mayor eficacia antihelmíntica (Lanusse et al., 1993). La disolución de las partículas en suspensión de una formulación farmacéutica en base a BZD en los fluidos GI, es necesaria para facilitar la absorción de los fármacos a través de la mucosa GI y lograr una adecuada biodisponibilidad plasmática. Por tanto la solubilidad de los fármacos es un parámetro limitante para que se cumpla dicha disolución. La solubilidad de ABZ es de 0,01 mg / ml en agua (Galia, 1999) y 0,376 mg/ml en una solución buffer 1,2 pH (Torrado et al., 1996). La solubilidad acuosa del metabolito ABZSO ó RBZ es mayor: 0,062 mg / ml en agua y 0,9 mg/ml en 0,1M de HCl (Wu et al., 2005).

Cuando los antihelmínticos BZD, son formulados para ser administrados por vía oral, la solubilidad de la molécula administrada, impacta directamente en su absorción y consecuentemente en su eficacia antiparasitaria. La baja solubilidad en agua de esta familia farmacológica, es una importante limitante para la formulación de los más potentes antihelmínticos BZD metilcarbamatos,

para administración por vía oral o intrarruminal (Lanusse et al., 1998; Sánchez Bruni et al., 2002).

En los rumiantes, cuando una suspensión antihelmíntica es depositada en el rumen, las partículas del fármaco se mezclan y se distribuyen en el contenido ruminal, probablemente debida a la estratificación de ese órgano. El gran volumen del rumen y la extensa permanencia del material alimenticio en el mismo, aumentan el tiempo de permanencia de diversas sustancias, especialmente de los fármacos (García Sacristán et al., 1995). Por lo tanto, se puede decir que el rumen actúa como reservorio y prolonga la duración del período de absorción de los compuestos BZD en esas especies domésticas. Una vez que los BZD pasan al abomaso, sufren un atrapamiento iónico, que los deja en contacto con los parásitos allí presentes mucho más tiempo (Baggot y McKellar 1994; Lanusse et al., 1993). Cuando se estudia la cinética de los BZD en la especie canina, el fenómeno es diferente. Se ha demostrado que el tiempo de tránsito GI, es más corto en los perros (Diez et al., 1999), comparado con el de los seres humanos (Ganong, 1995) y el de las especies rumiantes y equinos.

Es sabido que una vez que el antihelmíntico se absorbe en el tracto GI, se distribuye rápidamente por el sistema circulatorio, comenzando simultáneamente el proceso de biotransformación necesario para facilitar la eliminación de estos compuestos y sus metabolitos. Por tanto y debido a la corta longitud de trayecto del GI en los perros, no es posible que se produzca una absorción lenta y sostenida, con el necesario y prolongado reciclado entre el plasma y el tracto GI, como sucede en las otras especies domésticas mencionadas. Entonces, estos factores tan relevantes para optimizar la eficacia antihelmíntica de los BZD, se ven limitados en los caninos. No se produce el efecto reservorio de los fármacos, por lo que los BZD llegan al estómago donde sufren el atrapamiento iónico, para pasar luego al intestino donde se produce una absorción rápida en la primera porción duodenal (Sánchez Bruni et al., 2006). Este es el motivo por el cual, algunos compuestos BZD, como el ABZ, deben administrarse en los perros en dosis consecutivas de varios días (3 a 5 días) (Campbell, 1990), para lograr su máxima eficacia antihelmíntica contra algunas especies de parásitos, como

por ejemplo contra especies de *Trichuris* sp. o contra el protozooario *Giardia duodenalis*.

Estudios *in vivo*, han demostrado que la absorción oral de los BZD depende de su disolución a pH bajo, lo cual está estrechamente relacionado a la tasa de vaciado gástrico y tránsito intestinal (Lanusse et al., 1993; Sánchez Bruni et al., 1996). Una dieta rica en grasas mejora la absorción del ABZ en humanos (Edwards et al., 1988), aunque esto no ha sido observado en caninos. La absorción sistémica es fundamental, dado que la llegada del fármaco a los parásitos debe hacerse por vía sanguínea, ya que los mismos son en su gran mayoría hematófagos (Díez et al, 1999).

El RBZ es la única molécula desarrollada de la familia de los BZD, cuya formulación permite, en forma de solución, la administración parenteral subcutánea en rumiantes (Sánchez Bruni et al., 1996).

Biotransformación y excreción

Las reacciones de biotransformación más importantes en los BZD metilcarbamatos, son la sulfoxidación y la hidroxilación. El ABZ, por ejemplo, es catalizado extensamente en primera fase hepática, por un sistema de oxidasas microsomales (flavin-monooxigenasa) (Álvarez et al., 1999). Dicho proceso, transforma el fármaco madre ABZ en su metabolito sulfóxido (ABZSO), también conocido como RBZ, en un proceso reversible, en el cual mediante reducción, dicho metabolito activo, es reducido hacia el principio activo madre ABZ, prolongando de esta manera, el reciclaje de la molécula, que mantiene en este proceso su eficacia farmacológica.

Luego, en una segunda fase hepática mediada por el citocromo P450, el ABZSO se conjuga en forma irreversible en un metabolito sulfona (ABZSO₂), básicamente inactivo (Figura 4).

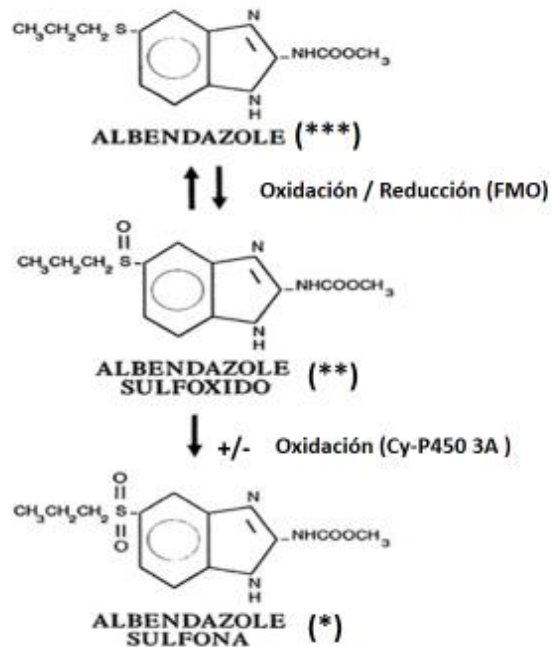


Figura 4. Secuencia metabólica propuesta para ABZ y sus metabolitos. Los procesos de oxidación son mediados por la enzima flavin-monooxigenasa (FMO) y citocromo- P450 (CY-P450 3A). Paso enantiomérico de ABZSO: los enantiómeros (-) y (+) en caninos fueron demostrados por Delatour et al., 1990. La potencia antihelmíntica de la droga madre y metabolitos están representados como: (*) muy pobre o sin actividad, (**) buena actividad y (***) muy buena actividad. Adaptado de Sánchez Bruni et al., 2006.

El metabolismo de los BZD, depende fundamentalmente de las sustituciones presentes en la posición 5 del anillo BZD. Dicha posición, es la diana de las reacciones metabólicas de primera fase. El grupo químico a sustituir en la posición 5 del anillo BZD, es particularmente importante, porque determina la velocidad de la biotransformación y extiende la permanencia del fármaco activo, lo que mejora la eficacia antihelmíntica (Sánchez Bruni et al., 2006; Lanusse et al., 2007).

Los metabolitos que sufrieron los procesos de oxidación e hidroxilación en la primera fase hepática son conjugados, mediante procesos de glucuronoconjugación y/o sulfatación en segunda fase hepática, para aumentar su polaridad y ser fácilmente excretados por vía renal y en menor grado por vía biliar (Campbell, 1990).

Mecanismo de acción de los BZD

El mecanismo de acción intrínseco de estos fármacos, se basa en la disrupción progresiva de las funciones celulares básicas y en el bloqueo de la polimerización de la tubulina de las células intestinales y tegumentales, interrumpiendo las divisiones celulares del parásito (Martin, 1997; Lacey, 1990). Esto ocurre debido a la presencia de un grupo carbamato en la posición 2 del núcleo BZD, lo cual es esencial para la actividad antimicrotubular (Lacey et al., 1987). En todos los organismos eucariotas, la unidad estructural de los microtúbulos, es un dímero formado por subunidades de tubulina α y β . Los microtúbulos, además de formar parte de la estructura del citoesqueleto, participan en diversas funciones celulares, particularmente en la división celular, el transporte de nutrientes y la excreción de desechos metabólicos (García Sacristán et al., 1995). Diferentes estudios de interacción entre moléculas de BZD y tubulina, indican que estos compuestos se unen al monómero de la subunidad β , impidiendo incorporar el mismo al polímero de tubulina. De esta manera, las moléculas de BZD provocan una disrupción en el equilibrio microtúbulo / tubulina, desencadenando su despolimerización (Figura 5).

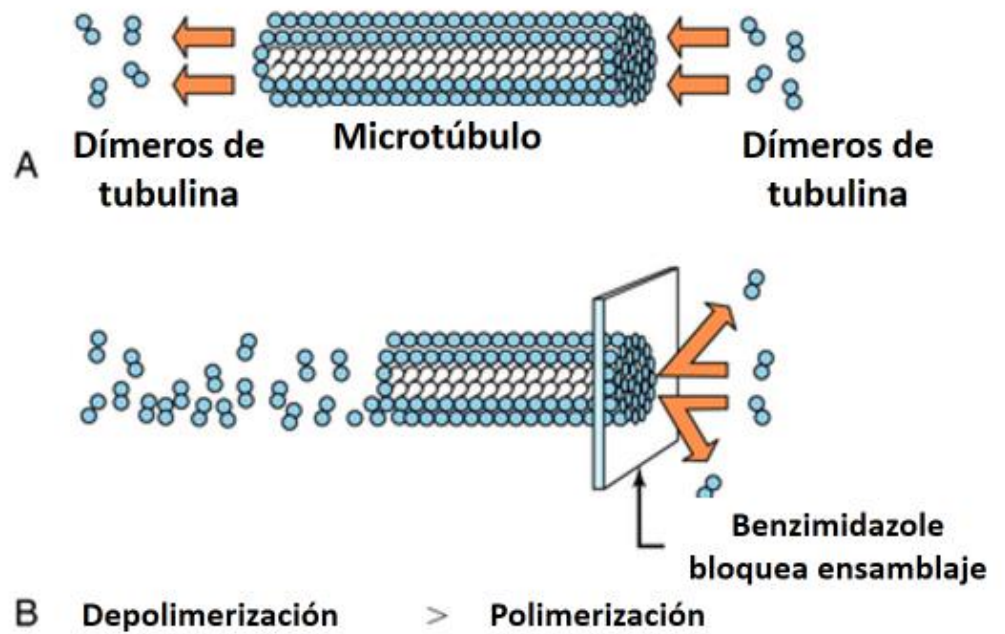


Figura 5. Mecanismo de acción de Benzimidazoles. Unión del BZD a la tubulina β con la consiguiente inhibición de la polimerización del microtúbulo. Adaptado de Lacey, 1990.

Espectro de acción

El amplio espectro de acción de los compuestos BZD, queda determinado por la presencia durante el tiempo suficiente de concentraciones tóxicas del fármaco, en el sitio de localización de los parásitos (Álvarez et al., 2000).

El ABZ es efectivo contra nematodos gastrointestinales y pulmonares, cestodes y trematodes (Campbell, 1990; McKellar & Scott, 1990; Sánchez Bruni et al., 2000). En rumiantes, el ABZ se utiliza para el control de formas maduras y larvianas de diferentes especies de nematodos GI de los géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, *Neoascaris*, *Chabertia*, *Strongyloides* y *Trichuris*. Además, nematodos pulmonares del género *Dictyocaulus* y cestodes como *Moniezia*. En caninos, es indicado para especies del género *Toxocara*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Strongyloides* y *Trichuris* y cestodes como *Dipylidium* y *Taenia* sp. (Campbell, 1990). Se ha demostrado la eficacia de ABZ y su metabolito activo sulfóxido (ABZSO), contra el protozoo *Giardia*

duodenalis en humanos (Oxberry y col., 2000), así como su actividad ovicida contra *Ascaris summ* en la especie suina (Belo et al., 1999). El RBZ, comparte el espectro de acción de su fármaco madre y conserva además, la actividad ovicida a partir de las 10-12 hs de su aplicación (Steffan et al., 2000).

Efectos adversos y tóxicos

ABZ es bien tolerado y se caracteriza por no presentar efectos adversos en dosis terapéuticas, excepto en hembras preñadas, ya que ha sido demostrado que es embriotóxico o teratogénico, dependiendo de la posología, la especie animal tratada y la etapa del desarrollo embrionario en la que se encuentre. Piscopo y Smoak, (1997), estudiaron el efecto teratogénico en ovejas luego de una administración oral durante la segunda y tercera semana de gestación. En seres humanos, el ABZ está clasificado como de categoría C, es decir que puede ser potencialmente riesgoso para el feto.

Por otra parte, Stokol et al., (1997), indicaron que en perros, dosis de 30 a 40 mg/kg de ABZ durante 4 a 90 días, causaron anemia reversible, leucopenia y pérdida de peso. También, demostraron que un perro desarrolló toxicidad de médula ósea, luego de la administración de ABZ (25 mg/kg, c/24 hs) durante 5 días, seguido por la administración de 50 mg/kg *per os* cada 12 hs durante 5 días.

Se ha observado toxicidad aguda y mortalidad significativa en ratones luego de la administración de ABZ en dosis superiores a 5.000 mg/kg por vía oral. En ratas, la dosis letal 50 por vía oral, oscila entre 1.300 y 2.400 mg/kg (Dayan, 2003). Los síntomas de intoxicación, incluyen diarrea, vómitos, taquicardia y distrés respiratorio. Hasta la fecha, no se han encontrado estudios de toxicidad aguda de RBZ, en ninguna especie doméstica.

Estrategias farmacológicas y nuevos desafíos

Se han estudiado diversas estrategias farmacológicas para incrementar la eficacia antiparasitaria de los antihelmínticos BZD, por ejemplo, el metabolito activo del ABZ, el ABZSO o RBZ, está comercialmente disponible en algunos países de Latinoamérica, (excepto Uruguay), como solución dentro de una cápsula blanda para administración oral en caninos (Saumell et al., 2006).

Se sabe que la administración oral, es la vía más simple y fácil para una terapéutica farmacológica. Debido a su gran estabilidad, pequeño tamaño, dosis precisa y producción sencilla, las formas sólidas de administración oral, presentan importantes ventajas sobre otras formas farmacéuticas destinadas a la misma vía, lo cual produce que las nuevas entidades químicas desarrolladas y en desarrollo, sean diseñadas para la vía oral con la premisa de originar una concentración plasmática *in vivo*, efectiva y reproducible (Ikegami, 2006; Charman y Charman, 2003). Estas moléculas, presentan la desventaja de tener baja solubilidad en agua y pobre absorción duodenal luego de su administración oral (Charman y Charman, 2003; Van Drooge, 2006), lo cual puede ir en detrimento de la eficacia terapéutica (Vippagunta, 2006; Bogdanova, 2005). Por tanto, uno de los mayores desafíos en la industria farmacéutica, está ligado al desarrollo de estrategias para mejorar la solubilidad en agua y consecuentemente la velocidad de disolución de los fármacos (Vippagunta, 2006; Tanaka, 2006; Ohara et al., 2005).

En base a lo anteriormente descrito, si se optimiza el perfil de liberación, es posible obtener una mejor biodisponibilidad de los fármacos (Streubel et al., 2006; Tanaka et al., 2006; Leuner & Dressman, 2000; Prabhu, 2005). Una de las estrategias más eficaces para mejorar la velocidad de disolución de fármacos que presentan pobre solubilidad acuosa, ha sido la utilización de dispersiones sólidas (DS).

Estos sistemas han sido definidos como la dispersión de uno o más principios activos en estado sólido en una matriz inerte (soporte) preparada por fusión, disolución con un solvente orgánico o una combinación fusión-disolución. Están generalmente constituidos por polímeros hidrofílicos, donde la

liberación del fármaco es gobernada por las propiedades físico-químicas del portador (Chiou & Riegelman, 1971).

Si bien existe gran cantidad de datos publicados sobre DS, los mecanismos por los cuales estos sistemas aumentan la velocidad de disolución, continúan siendo objeto de estudio y no son del todo claros o determinantes. La razón para esto, parece estar ligada a la complejidad de los procesos de liberación desde las dispersiones y la variedad de factores que pueden afectar este último fenómeno, incluyendo las propiedades físico-químicas del fármaco (solubilidad, estado físico, tamaño de partícula) y las propiedades del portador utilizado para las dispersiones (solubilidad, hidrofiliidad, peso molecular y potenciales interacciones droga – portador) (Georgarakis et al., 2007).

Diferentes materiales han sido evaluados como transportadores o *carriers*. La primera generación de DS involucraban el uso de carriers cristalinos (Sekiguchi & Obi, 1964; Levy, 1963) y azúcares (Kanig, 1964), mientras que la segunda generación incluye diferentes tipos de polímeros hidrofílicos como polietilenglicoles (Janssens et al., 2008; Wang et al., 2004) y polivinilpirrolidona (Konno et al., 2008; Marín et al., 2002), entre otros.

En los últimos años, se ha comenzado a explorar el uso de agentes surfactantes. Este tipo de dispersiones pueden ser binarias: fármaco – tensioactivo (como portador) o ternarias, donde a la dispersión tradicional fármaco – polímero hidrosoluble, se le agrega un agente surfactante. En este caso, el incremento de la velocidad de disolución, estaría relacionado con un aumento de la humectación de las partículas, favoreciendo el contacto entre éstas y el medio, y también con un posible efecto de solubilización micelar. Estas dispersiones se pueden clasificar como de tercera generación (Vasconcelos et al., 2007).

En los trabajos publicados correspondientes a la Tesis de Maestría de Dib et al., (2011) y Castro et al., (2013), se utilizó Poloxamer 188, como portador para la preparación y evaluación de DS en base a ABZ. Los poloxameros, son un grupo de copolímeros de polioxietileno-polipropileno con propiedades

surfactantes, ampliamente utilizados como excipientes con diferentes funciones que van desde la humectación hasta la obtención de geles termosensibles. El segmento de polioxietileno es hidrofílico, mientras que el segmento polioxipropileno es hidrofóbico. Todos los poloxameros son químicamente similares en su composición, difiriendo solamente en la cantidad relativa de óxidos de propileno y etileno que son adicionados durante su preparación. No son metabolizados en el organismo (Collet & Popli, 2000), y se utilizan en formulaciones farmacéuticas de administración oral y parenteral; generalmente se admite que carecen de toxicidad y que no son irritantes. Este agente transportador presenta un bajo punto de fusión (52 – 57 °C), propiedades surfactantes y una amplia seguridad para ser utilizado por vía oral (Collet & Popli, 2000; Vilhelmsen et al., 2005).

Sistemas de liberación modificada

A través del desarrollo galénico, se han llevado a cabo trabajos dirigidos a la búsqueda de formas novedosas de administración, las que también supongan un claro beneficio para el paciente. De esta manera, surge el concepto de Sistemas de Liberación Modificada (SLM), las cuales pueden aportar ventajas en cuanto a la actividad terapéutica, como por ejemplo:

- Prolongar la acción medicamentosa, mediante la liberación sostenida del fármaco.
- Liberar el fármaco en un sitio específico, para protegerlo o mejorar su absorción.
- Mejorar la pauta posológica, buscando una vía de administración más cómoda y la reducción del número de tomas/día, en el intento de conseguir una dosis única.
- Disminuir el riesgo de efectos adversos de los medicamentos.

Se ha demostrado desde comienzos de la década de 1980 hasta el presente, un interés constante (Andretta, 2003) en el tema, tal como se aprecia en el gran número de trabajos publicados en diferentes revistas científicas, las numerosas patentes concedidas y el impacto de estos sistemas en el mercado farmacéutico. Su marco teórico, está relacionado a la comprensión de los

fenómenos de liberación, como por ejemplo el transporte de masa a través de una matriz polimérica.

Los SLM, se pueden presentar como formas farmacéuticas de unidades simples (comprimidos), donde toda la dosis se incorpora en una formulación monolítica o bien en sistemas de unidades múltiples o multiparticulados. Éstos, permiten desarrollar formulaciones confiables que tienen todas las ventajas de las formulaciones simples, evitando sin embargo, el peligro de alteraciones en el perfil de liberación del fármaco o el comportamiento de la formulación debido a la variabilidad de una unidad a otra por cambios en el pH en el GI y la población enzimática (Asghar & Chandran, 2006).

En la mayoría de los SLM, el fármaco se introduce en el interior de lo que se denomina portador o *carrier*. La velocidad de liberación del principio activo deseada, está prácticamente controlada por las propiedades del material utilizado como portador, aunque por otra parte, existen otros factores de menor influencia, tales como el pH del medio en que se va a realizar la liberación. Teniendo en cuenta estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos períodos de tiempo (Sáez et al., 2004).

Cuando se utiliza una forma farmacéutica de liberación convencional, el nivel de principio activo en el organismo alcanza una concentración máxima que luego va declinando hacia un mínimo (concentración sub-terapéutica), siendo necesaria la administración de una nueva dosis. Por tanto, si el máximo o el mínimo de concentración del fármaco en el medio, se sitúan por encima del nivel de toxicidad o por debajo del nivel mínimo efectivo, se pueden producir de forma alternante períodos de toxicidad y de ineficacia. Esta situación es particularmente problemática, si ambos niveles (toxicidad y efectividad), están muy próximos, como sucede en los casos de fármacos con una ventana terapéutica estrecha. Los SLM, tienen la capacidad de proveer de una concentración uniforme de principio activo en el sitio de liberación/absorción y de esta manera, mantener las concentraciones plasmáticas del fármaco dentro de un rango terapéutico, lo cual puede minimizar la aparición de

posibles efectos adversos y reducir la frecuencia de administración (Gupta et al., 2002).

Clasificación

Los SLM se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios:

1. Según el tipo de acción que producen (Figura 6).

De acción sostenida: son preparados que entregan inicialmente el fármaco en cantidad necesaria para alcanzar la respuesta farmacológica deseada en forma rápida, y luego en cantidad adecuada, para que la velocidad de absorción sea igual a la de eliminación, durante un período prolongado, que puede llegar a ser de 10 a 12 hs.

De acción prolongada: son aquellas formulaciones en que el fármaco se libera inicialmente en la cantidad suficiente para la acción o en un exceso no perjudicial para el organismo. El principio activo se libera luego, en forma lenta a una velocidad no siempre ligada a su eliminación.

De acción retardada: el fármaco, no se libera inmediatamente después de la administración, sino que tiene un tiempo de latencia hasta que el mismo sea liberado.

De acción repetida: estas formulaciones, proporcionan inicialmente una dosis simple de fármaco y a un tiempo posterior, otra dosis similar.

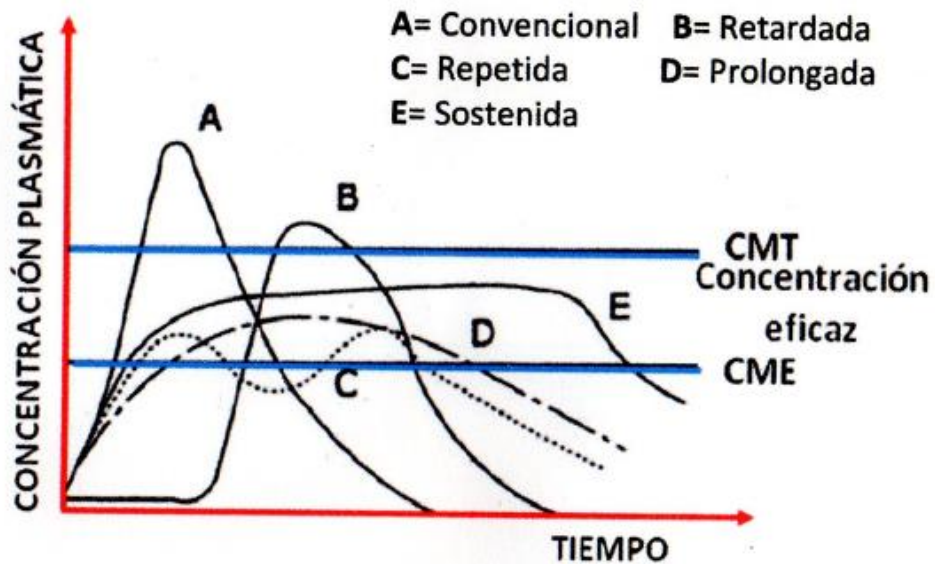


Figura 6. Perfiles de concentración plasmática/tiempo. CMT: concentración máxima tolerada. CME: concentración mínima eficaz. Adaptado de: Puebla, 2012.

Los SLM que dependen del tipo de acción que producen y que pueden ser diseñados para ser administrados por distintas vías de administración, requieren para su desarrollo, de un conocimiento detallado de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del producto que se formula. Su diseño, utiliza además, el conocimiento detallado de los eventos biofarmacéuticos, farmacocinéticos y farmacodinámicos que pueden desencadenarse luego de su administración en el paciente.

2. Según el mecanismo mediante el cual se modula la liberación del fármaco Banker & Rhodes, (1996), (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de sistemas de liberación de acuerdo al mecanismo de modulación de la liberación de los fármacos.

SLM	Mecanismo	Características
<i>Controlados por disolución</i>	Liberación limitada por la velocidad de disolución del fármaco	Cinética de liberación de orden cero. El sistema se disuelve completamente en el sitio de aplicación.
<i>Sistemas de reservorio</i>	Difusión controlada a través de una membrana inerte	Una membrana de polímero (depende del tipo de polímero), controla la velocidad de liberación del fármaco. Cinética de liberación de orden cero. Potencialmente tóxico si falla el sistema. Fármacos de alto peso molecular pueden ver dificultada su liberación.
<i>Sistemas matriciales</i>	Difusión de fármacos a través de la matriz	Dispersión homogénea del fármaco en una mezcla de polímeros de forma sólida. No se obtiene cinética de liberación de orden cero. Acepta fármacos de alto peso molecular.
<i>Bioerosionables</i>	Liberación modulada por erosión de la matriz	Dispersión homogénea de fármacos. Dificulta el control cinético, debido a la multiplicidad de los procesos involucrados. Potencial tóxico del polímero degradado
<i>Intercambio iónico</i>	Liberación de fármacos modulada por el intercambio con iones del medio.	Interacción electrostática entre el fármaco y un polielectrolito entrecruzado insoluble en agua (resina). Dependiente de la presencia de iones en el medio de liberación. Cinética de orden cero.

3. Según el tipo de matriz utilizada.

Los SLM, se pueden clasificar como sistemas matriciales o monolíticos, sistemas reservorio y sistemas osmóticos. Un principio básico fundamental que gobierna a estos sistemas, es que en una solución, la difusión del fármaco ocurrirá desde una zona de alta concentración hacia otra de baja concentración (Saez et al., 2004). Esta diferencia de concentración, es la que regulará la difusión del principio activo, hacia afuera del sistema, mientras que el agua difundirá hacia adentro del mismo. Dado que el agua, se encuentra en exceso fuera del sistema que lo rodea, el sistema debería permitir su entrada.

En la presente Tesis se diseñaron diferentes sistemas matriciales.

Clasificación de los sistemas matriciales

Los sistemas matriciales en líneas generales, se pueden clasificar en dos grandes grupos, según el tipo de matriz utilizada:

a) Matrices hidrofílicas coloidales: en las cuales las partículas del fármaco se encuentran dispersadas en un matriz soluble, desde el cual el fármaco estará disponible, una vez que la matriz se disuelva en el medio que la rodea.

Y aquellas que forman geles verdaderos, donde los sistemas interactúan en presencia de agua para formar una estructura polimérica entrecruzada con una fase continua que se encuentra atrapada en los intersticios de la cadena del gel. Los entrecruzamientos limitan la movilidad de las cadenas poliméricas y le otorgan estructura al gel, como sucede con Ácido Algínico (Figura 7 y Figura 8).

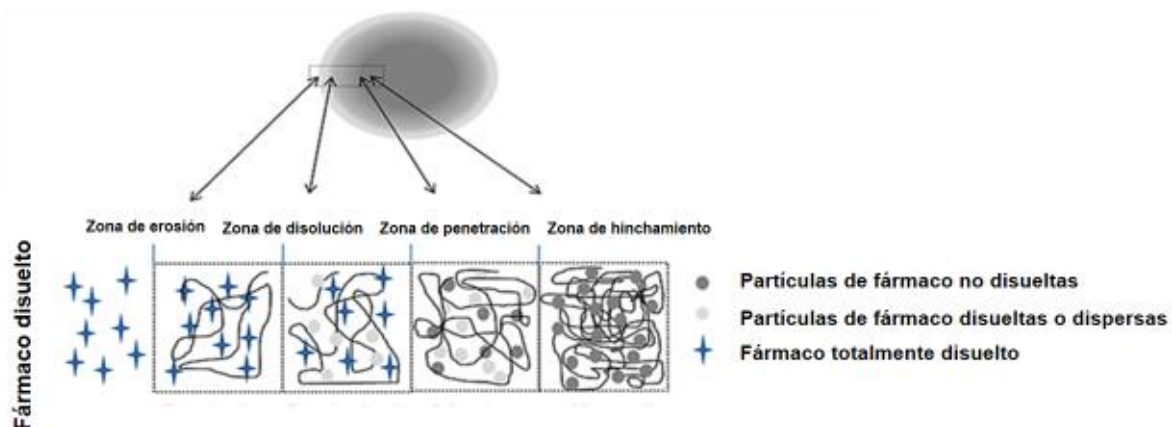


Figura 7. Esquema ilustrativo del mecanismo de liberación de un principio activo desde un comprimido formulado con una matriz hidrofílica. Adaptado de: Ghori y Conway, 2015.

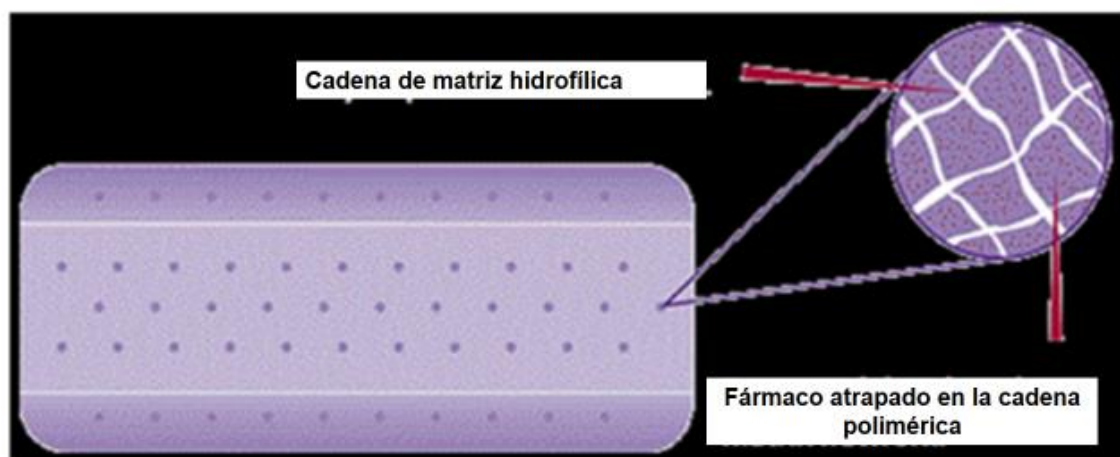


Figura 8. Sección de un comprimido de administración oral en una matriz hidrofílica. Adaptado de: Muhammad & Conway, 2015.

b) Matrices lipídicas y matrices poliméricas insolubles: también llamadas erosionables, son aquellas en las cuales las partículas del fármaco, se dispersan en una matriz insoluble, desde la cual el fármaco estará disponible, cuando el solvente penetre hacia adentro de la matriz y disuelva las partículas del fármaco (Figura 9).

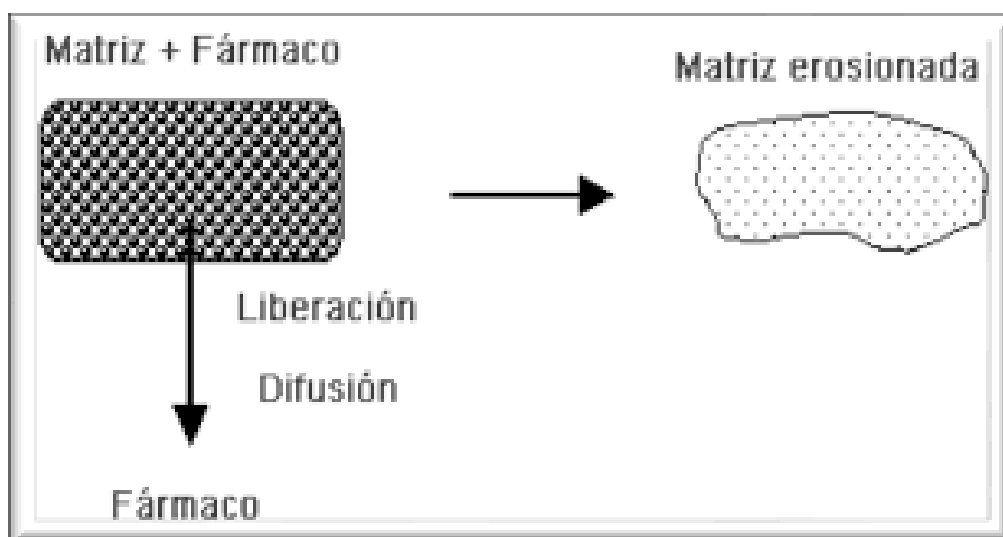


Figura 9. Representación esquemática del proceso de erosión desde matriz lipídica. Adaptado de: Costa et al., 2004.

Excipientes reguladores de la liberación

Las matrices hidrofílicas utilizadas en esta Tesis Doctoral fueron: hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) y Ácido Algínico (AA) y las matrices lipídicas fueron: Gelucire 50/02® (GE) y Alcohol Cetílico (AC).

Características principales de formadores de matriz hidrofílica

HPMC, es el excipiente hidrofílico formador de matriz, más utilizado para la preparación de SLM de administración oral (Sánchez et al., 2010). Una de sus características más importantes, es su alta mojabilidad, la cual tiene un efecto significativo en la cinética de liberación de la droga incorporada al sistema farmacéutico. Cuando se encuentra en contacto ya sea con agua o con un

fluido biológico, éstos difunden hacia adentro de la matriz, resultando en una relajación de la cadena polimérica y en una expansión de volumen (Rowe et al., 2007). Luego, el fármaco asociado al excipiente difunde hacia afuera del sistema polimérico (Siepmann & Peppas, 2001).

HPMC es un éter de propilenglicol derivado de la metilcelulosa. La sustitución R representa un grupo $-\text{CH}_3$, un grupo $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ o un átomo de hidrógeno (Figura 10). Existen diversos tipos de HPMC, según el grado de viscosidad y sustitución. Dichos grados, indican la viscosidad, en mPas (milipascales), de un sistema al 2% p/p en solución acuosa a 20°C . HPMC de alto/medio grado de viscosidad, se utiliza como agente formador de matriz en SLM y las de bajo grado de viscosidad, en soluciones acuosas como agentes formadores de films de recubrimiento.

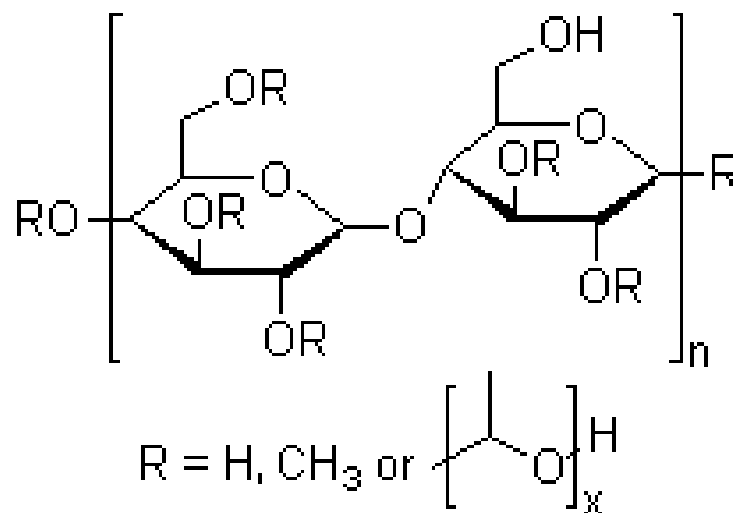


Figura 10. Estructura química de Hidroxipropil Metil Celulosa (HPMC).
Extraído de Rowe et al., 2009.

El AA es un polisacárido natural extraído de algas marinas. Se compone de ácido manurónico (M) y ácido glucurónico (G). Es una especie de polvo blanco o amarillo, inodoro, insípido e insoluble en agua. Su peso molecular es de 20.000 a 240.000 daltons. Es el principal excipiente de una variedad de formulaciones farmacéuticas, de uso oral y tópico. Tanto en formulaciones en forma de comprimidos o cápsulas, el AA es usado tanto como agente ligante

o como agente desintegrador en concentraciones de 1-5% w/w. Además es ampliamente utilizado como agente engrosante y formador de suspensiones en pastas, cremas y geles, además de agente estabilizante para emulsiones de agua en aceite (Rowe et al., 2009; Phillips et al., 1984). Su estructura química se ilustra en la Figura 11.

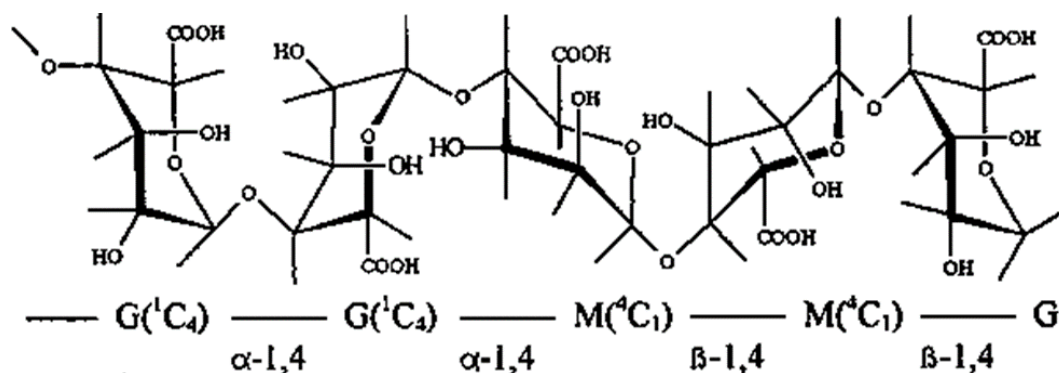


Figura 11. Estructura química del Ácido Algínico. Extraído de Rowe et al., 2009.

Características principales de formadores de matriz lipídica

El AC, es una mezcla sólida de alcoholes alifáticos, que comprende principalmente 1-hexadecanol ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}$). Es ampliamente utilizado en formulaciones cosméticas y farmacéuticas como supositorios, formas sólidas de liberación modificada, emulsiones, lociones, cremas y ungüentos (Figura 12) (Rowe et al., 2007).

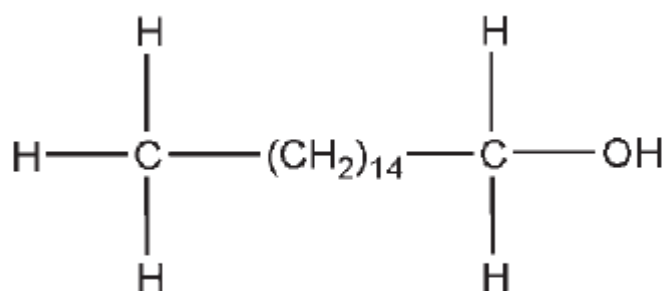


Figura 12. Estructura química de Alcohol Cetílico. Extraído de Rowe et al., 2009.

Los GE, son un grupo de excipientes conformados por ceras semisólidas anfipáticas inertes, las cuales son naturalmente activas en superficie y se dispersan o solubilizan en medio acuoso, formando micelas, glóbulos microscópicos o vesículas. Han sido estudiados tanto como formadores de matrices de SLM, así como para la mejora de las propiedades físico-químicas de los fármacos (Sharma et al., 2012; Aïñaoui et al., 1997).

La gran variedad de GE, están caracterizados por un amplio rango de puntos de fusión, desde 33°C hasta 64°C y más comúnmente desde 35°C hasta 55°C. Presentan variedad de valores de balance hidrofílico/lipofílico (HLB) de 01 a 14. Cuando se les designa un nombre (por ejemplo: GE 50/02®), el número 50 indica su punto de fusión y el número 02 indica su valor HLB. Cuanto más bajo sea el HLB de un GE, se facilita su uso para reducir la tasa de disolución del ingrediente farmacológicamente activo. Al contrario, cuanto más alto sea su HLB, el GE se podrá usar para acelerar la liberación del principio activo. GE 50/02®, es usado como excipiente y tiene una naturaleza química de glicéridos poliglicolizados saturados. Los GE, aumentan la solubilidad de los principios activos insolubles o pobremente solubles, y producen dispersiones estables en las paredes del GI, optimizando su absorción (Esquisabel et al., 1996; Aungust et al., 1994).

Sistemas SLM gastro-retentivos o flotantes

Dentro de las nuevas estrategias propuestas para aumentar el tiempo de permanencia de algunas formas farmacéuticas en base a fármacos muy insolubles en el estómago, se encuentran los sistemas SLM flotantes. En la presente Tesis Doctoral, se trabajó con SLM gastro-retentivos flotantes, para mantener los compactos en base a RBZ en el estómago de los perros, liberando el principio activo en forma sostenida en el tiempo.

Los SLM se han desarrollado principalmente para medicina humana y se pueden clasificar como:

- Sistemas bioadhesivos, los cuales se adhieren a la mucosa superficial (Vallejo & Perilla, 2008).
- Sistemas expandibles, que en contacto con los fluidos gástricos incrementan rápidamente su tamaño y retarda el pasaje a través de píloro (Klausner et al., 2003).
- Sistemas controlados por la densidad, los cuales pueden ser flotantes (baja densidad) o de alta densidad (permanecen en el fondo del saco estomacal) (Singh & Kim, 2000).

Los sistemas de baja densidad (< 1 g/mL), se caracterizan por sus propiedades flotantes. Generalmente la baja densidad se produce por atrapamiento de aire (cámaras huecas, producción de efervescencia) o por incorporación de materiales de baja densidad (sustancias grasas, aceites, polvos que producen espuma (Jiménez et al., 2006).

El control de liberación, es ejercido por las propiedades de los polímeros matriciales que lo componen, como por ejemplo HPMC, y en estudios *in vitro*, se observó que el sistema flota durante todo el tiempo de estudio (más de 12 h) (Losi et al., 2006).

Principales ventajas de los SLM

1. El efecto terapéutico, puede mantenerse durante más tiempo.
2. La posología en cuanto a la dosificación, implica una menor frecuencia de dosis, mayor aceptación y mejor cumplimiento de los tratamientos.
3. Los niveles plasmáticos de los principios activos contenidos en los SLM, son controlados, predecibles y constantes.
4. Puede existir una disminución de trastornos asociados a intolerancia gástrica.

A su vez, cuando se habla de las ventajas de los SLM flotantes, se debe agregar que estos sistemas, permiten minimizar las fluctuaciones de las

concentraciones de fármaco en plasma y los efectos adversos concentración-dependiente asociados. Con estos sistemas flotantes, se espera que la liberación del fármaco sea completa en el estómago, ya que el principio activo disuelto estará disponible para su absorción en el intestino delgado, luego del vaciado gástrico.

Por otro lado, en casos de disturbios intestinales, como aumento de peristaltismo intestinal o diarrea, el principio activo permanece en el estómago, evitando de esta manera ser eliminado con las heces antes de su disolución y liberación.

Aquellos fármacos con una pobre solubilidad y por ende escasa biodisponibilidad, pueden incrementar ambos parámetros, desde la forma SLM flotante.

Desventajas de los SLM

1. El peligro de sobredosificación con efectos tóxicos, por una posible falla del sistema, donde se puede liberar una dosis masiva del principio activo en forma inmediata.
2. Dificultad de interrumpir el tratamiento si aparecen efectos adversos graves.
3. Variaciones y susceptibilidades individuales, que no puedan ser contempladas de antemano.

Formulación del Comprimido

Un comprimido es una forma farmacéutica sólida, que contiene uno o más principios activos, generalmente acompañados por excipientes apropiados, los cuales pueden administrarse por diferentes vías. Se preparan mediante la aplicación de altas presiones sobre polvos o granulados, empleando equipos mecánicos provistos de matrices o punzones apropiados (Farmacopea Argentina, 2003).

Métodos de obtención de comprimidos.

Clasificación

Por compresión directa. Es el método más sencillo y ofrece muchas ventajas. Requiere de menos equipamiento, espacio, tiempo y consumo de energía, además de ser menos costoso.

Es muy importante obtener un buen flujo de la mezcla, para una correcta compresión. Si no existe un flujo aceptable por parte del sólido a comprimir, puede haber alta variación en el peso y contenido de los comprimidos, por falta de llenado homogéneo de la matriz (Cork, 1985). Los parámetros que evalúan las propiedades de flujo de los sólidos se determinan por las propiedades reológicas de los mismos (densidad, ángulo de reposo e índices relacionados: como son los índices de Carr y Hausner).

Por granulación. Es una estrategia para mejorar el flujo de sólidos y aumentar la cohesión de la mezcla a comprimir, aglomerando pequeñas partículas primarias del sólido, las cuales son forzadas a adherirse para formar entidades multiparticulares de mayor tamaño, denominadas gránulos. De esta manera, se previene la segregación de los componentes de una mezcla que puede impedir un buen mezclado (Summers & Aulton, 2002) (Figura 13).

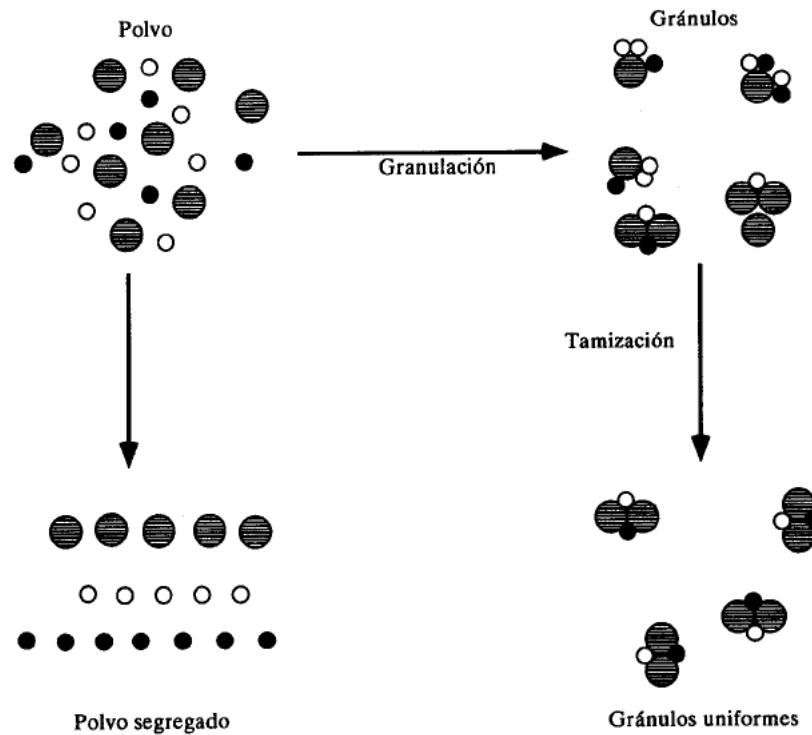


Figura 13. Esquema ilustrativo del proceso de la granulación. Extraído de Vila Jato et al., 2001.

Las técnicas de granulación, a su vez se clasifican en:

Granulación húmeda: esta técnica se basa en la humectación de los polvos con una solución aglutinante, tamizado de la masa humectada, secado y posterior tamizado de los gránulos secos para luego homogeneizar el tamaño de las partículas. Se agregan excipientes adicionales a la mezcla, como antiadherentes y lubricantes entre otros, antes de la compresión (Summers & Aulton, 2004).

Granulación seca: también conocida como “pre-compresión”, los gránulos se obtienen por la aplicación de una presión externa que provoca la interacción entre partículas para formar los gránulos. La cohesión entre partículas es posible gracias a interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals.

Granulación por fusión (*melt granulation*): La granulación por fusión, es un proceso en el cual la granulación, se produce por la adición de un agente aglutinante que es sólido a temperatura ambiente pero funde a temperaturas

relativamente bajas. El agente aglutinante, actúa como líquido de unión de las partículas de polvo de forma similar al líquido adicionado en los procesos de vía húmeda (Kristensen & Schaefer, 1997). Dependiendo de la cantidad de aglutinante añadido, de los componentes que constituyen la mezcla y de la elección de las condiciones del proceso, es posible obtener gránulos o incluso pellets (Heng & Wong, 2003).

Caracterización farmacotécnica

Una vez que se obtienen las formas sólidas o compactos (comprimidos), éstos se someten a su caracterización farmacotécnica para evaluar su calidad. Según las diferentes farmacopeas, se codifican estándares, para determinar si una formulación cumple con los parámetros predeterminados de calidad. Estos estándares son:

- *Apariencia general*: tiene que ver con la elegancia de la formulación, para su aceptación por parte del paciente (medicina humana) y del propietario o tenedor de un animal (medicina veterinaria). Otros aspectos ligados a tener en cuenta, son el tamaño y forma, color y textura de la superficie del comprimido.
- *Uniformidad de peso*: los requerimientos de las farmacopeas, se especifican como el porcentaje de desviación del peso medio teórico de una muestra de comprimidos. Los límites de tolerancia están asociados con unos márgenes preestablecidos de pesos. Según la Farmacopea Europea, se pesan un total de 20 comprimidos y se establecen valores límites de aceptación, que pueden variar entre el 10% y el 20%.
- *Uniformidad de contenido*: este parámetro se utiliza principalmente para comprimidos de bajo peso (< 5 mg). En las diferentes farmacopeas, se acepta una desviación de hasta el 5%.

- *Friabilidad:* durante la manufactura, el embalaje y almacenamiento, el comprimido sufre un alto estrés mecánico, lo que puede causar rotura. Por esto, el ensayo de friabilidad, está diseñado para medir la resistencia de la formulación a dicho estrés externo. Para que una formulación sea aceptable, la friabilidad debe ser menor al 1%. Para la valoración de este parámetro, se utiliza un equipo denominado friabilómetro, el cual tiene las especificaciones codificadas en la Farmacopea Nacional Argentina, VII Edición.
- *Dureza:* este parámetro se mide en términos de la fuerza necesaria para romper el comprimido. El ensayo de dureza, se utiliza durante el proceso de la compresión y sirve para comprobar si la presión ejercida por la comprimidora es la adecuada. Un comprimido aceptable, puede tener una dureza de entre 4 a 10 kg (Vila Jato et al., 2001). Para la valoración de este parámetro, se utiliza un equipo denominado durómetro, el cual tiene las especificaciones codificadas en la Farmacopea Nacional Argentina, VII Edición.

Pruebas reológicas o estudios de fluidez de los polvos

Estos estudios, son necesarios para asegurar que el flujo de los polvos sea el óptimo. Es un parámetro de gran importancia en el manejo de sólidos farmacéuticos (Martin et al., 1994).

Hay varios factores que influyen en el grado de fluidez de un polvo, como por ejemplo: la cohesión entre moléculas, la composición química del material, el tamaño de partícula, la carga estática y la humedad, ya que en la práctica, los polvos húmedos no fluyen tan fácilmente como lo hacen los secos.

Por tanto, las diferentes pruebas reológicas se clasifican de la siguiente manera:

- *Microscopía y tamaño de partícula:*

El tamaño de partícula de los principios activos y excipientes farmacéuticos es un factor decisivo en su comportamiento. En volúmenes grandes de polvos, se pueden separar las partículas de acuerdo a su tamaño por la técnica de tamizado. Las partículas esféricas fluyen más rápidamente que las partículas de forma irregular.

- *Humedad*

El contenido de agua en una muestra, influye notoriamente en el flujo de los polvos. El agua, tiende a formar aglomerados no fluentes y si es excesiva, se tiende a pegar en las paredes. La cantidad óptima de humedad de un granulado se considera entre el 3 y 5%.

- *Densidad*

Permite conocer el volumen ocupado por una masa conocida, incluyendo los espacios entre las partículas y la porosidad de la mezcla. Se divide en densidad aparente o *bulk* y densidad empaquetada.

- *Índice de Hausner*

Permite calcular la fluidez de un polvo, toma en cuenta la densidad aparente y la densidad empaquetada. La fluidez se categoriza según diferentes valores (Tabla 2), y se calcula como:

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\text{densidad empaquetada}}{\text{densidad aparente (bulk)}}$$

Cuanto menor sea el índice de Hausner, mayor será la fluidez de un polvo.

Tabla 2. Interpretación de la fluidez de los polvos mediante el índice de Hausner.

INDICE DE HAUSNER	FLUIDEZ
1.09-1.10	Excelente
1.10-1.14	Muy Buena
1.14-1.19	Buena
1.19-1.25	Regular
>1.25	Pobre

- *Compresibilidad o Índice de Carr*

La compresibilidad, se refiere a la capacidad de los polvos para compactarse y se relaciona con los conceptos de densidad empaquetada y densidad aparente o densidad *bulk*. Al igual que la fluidez, la compresibilidad se categoriza según diferentes valores (Tabla 3), y se calcula por medio del Índice de Carr, mediante la fórmula:

$$\text{Índice de Carr} = \frac{\text{densidad empaquetada} - \text{densidad aparente}}{\text{densidad empaquetada}}$$

A menor índice de Carr (compresibilidad), mejor será el tipo de flujo del polvo.

Tabla 3. Interpretación de la compresibilidad de los polvos mediante el índice de Carr

Índice de Carr (%) (compresibilidad)	TIPO DE FLUJO
5-15	Excelente
16-18	Bueno
18-25	Regular
25-33	Pobre
33-38	Muy Pobre
>40	Pésimo

- *Velocidad de Flujo*

Es el tiempo necesario para que fluya una cantidad específica de polvo, a través de un cilindro hueco colocado a una determinada altura. La velocidad de flujo de un polvo es un índice directo de las fricciones entre las partículas que lo componen.

Para determinarla, se debe tomar el tiempo, que tarda en caer todo el granulado a una placa de vidrio. Se calcula como:

$$\text{Velocidad de flujo} = \text{masa (g)} / \text{tiempo (seg)}$$

- *Ángulo de Reposo*

Es el ángulo formado entre la horizontal y la pendiente de una pila de polvo. Es decir, cuando un polvo se deja caer libremente, las partículas de sólidos se agrupan formando un cono. Su determinación, es el método más usado para determinar el comportamiento del flujo de los polvos. El ángulo formado por la horizontal y la inclinación del cono se denomina "ángulo de reposo" (45°) y su valor numérico, es indicativo de la capacidad de fluidez del polvo, (Figura 14).

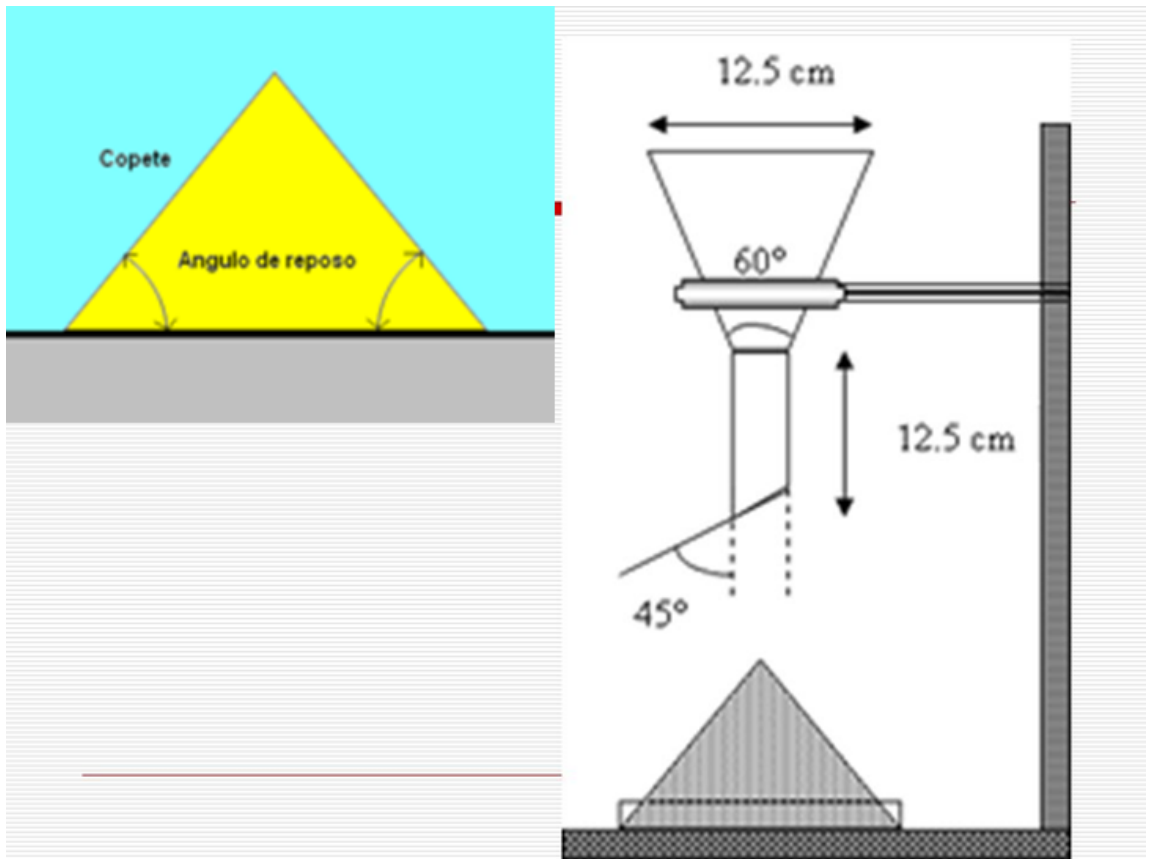


Figura 14. Interpretación del cálculo del ángulo de reposo de sólidos.
Adaptado de: Martin et al., 1994.

Ensayos de velocidad de disolución in vitro

Estos ensayos, valoran la velocidad en la cual un principio activo se disuelve en un medio líquido y que cantidad total es disuelta. La importancia de estos ensayos, radica en correlacionar proceso de disolución estudiado *in vitro* con el fenómeno similar que ocurre en la especie destino.

Para realizar los estudios de disolución, se utilizan dispositivos, conocidos como equipos disolutores, con características USP. Estos contienen vasos de vidrio o de policarbonato, de forma cilíndrica con el fondo redondo. Cada vaso, tiene una capacidad de hasta 1 litro de medio de disolución. Para mantener el medio homogéneo dentro del vaso, se usa un accesorio en forma de paleta o canastillo, donde se introducirá el principio activo a estudiar. Estos accesorios, girarán a una velocidad fijada de antemano, lo cual simula los movimientos peristálticos. Las velocidades oscilan entre 25 y 150 rpm.

Las condiciones de estudio de disolución, deben estar estandarizadas, para que sirvan como método predictivo de la disolución y absorción *in vivo*.

Los estudios de solubilidad, se hacen normalmente en medio acuoso, ya que éste es el medio fisiológico en el cual se produce la disolución del fármaco. Los medios más utilizados son con HCl 0,1M, HCl 0,01M y NaOH 0,1M a temperatura ambiente, así como en solución amortiguadora, que varían entre rangos de pH de 1 a 7,4 a 37°C.

Estos ensayos no predicen la acción biológica de una sustancia, pero proporcionan información relevante para los estudios *in vivo* posteriores a la etapa de desarrollo, antes de evaluar el fármaco en las especies destino (Vila Jato, 2001).

En la presente Tesis Doctoral, se trabajó con formas farmacéuticas en forma de comprimidos contenidas en sistemas matriciales, hidrofílicos y lipídicos, para formular SLM en base a RBZ. A su vez se diseñó un sistema SLM gastro-retentivo flotante, utilizando un excipiente formador de matriz de tipo hidrofílico.

Hipótesis

Los SLM en base a RBZ, contribuyen a optimizar las características biofarmacéuticas de dicha molécula, pudiendo de esta manera influenciar en su biodisponibilidad, eficacia clínica antiparasitaria e inocuidad en la especie canina.

Objetivo general

Obtener y caracterizar nuevos SLM en base a RBZ en forma de comprimidos, para ser administrados por vía oral en caninos como especie primaria.

Objetivos específicos

- 1) Correlacionar la valoración farmacotécnica *in vitro* de las distintas formulaciones SLM en base a RBZ obtenidas, con ensayos de farmacocinética *in vivo* en perros.
- 2) Valorar la influencia de los SLM en base a RBZ, en la eficacia clínica antiparasitaria *in vivo* en perros.

Estrategia de la investigación

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, implicaron el trabajo coordinado entre el Área Farmacología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay, el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (CIVETAN-UNCPBA), Tandil, República Argentina y el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Facultad Nacional de Córdoba, República Argentina.

La presente Tesis Doctoral se dividió en cuatro (4) Estudios Experimentales.

ESTUDIO EXPERIMENTAL I

Diseño, formulación y caracterización farmacotécnica de una formulación de liberación inmediata (LI) o convencional en base a RBZ (200 mg) en forma de comprimidos, para ser utilizada como formulación control. Este Estudio Experimental, se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

ESTUDIO EXPERIMENTAL II

Diseño, formulación y caracterización farmacotécnica de nuevas formulaciones en base a RBZ SLM, en forma de comprimidos para administración oral en perros, utilizando diferentes sistemas matriciales reguladores de liberación. Este Estudio Experimental, se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

ESTUDIO EXPERIMENTAL III

Valoración PK comparativa de las diferentes formulaciones obtenidas en los Estudios Experimentales I y II. Este Estudio Experimental, fue realizado en conjunto, en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, Tandil, República Argentina y el Área Farmacología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

ESTUDIO EXPERIMENTAL IV.

Valoración de la eficacia clínica comparativa entre diferentes formulaciones LI en base ABZ y RBZ y una formulación SLM en base a RBZ, en perros naturalmente parasitados con parásitos GI. Este Estudio Experimental, se realizó en el Área Farmacología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

ESTUDIO EXPERIMENTAL I

Objetivos

- 1) Diseñar, formular y caracterizar una formulación experimental en base a RBZ LI (200 mg) en forma de comprimidos, para ser utilizada como formulación control.
- 2) Realizar los ensayos de disolución de una formulación comercial en base a RBZ LI (Laboratorios AFFORD, Argentina), para compararla con los valores del ensayo de disolución de la formulación experimental obtenida en el objetivo 1.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron formulaciones compactadas en forma de comprimidos (n=40), con una masa total de 500 mg en base a RBZ LI (200 mg) (Parafarm®, Argentina). Los mismos, fueron formulados mediante la técnica de granulación húmeda. La formulación experimental obtenida, se identificó como RBZ LI.

Componentes de la formulación

La composición porcentual y la masa en mg de los componentes utilizados en la formulación RBZ LI, se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición porcentual y masa en mg de cada componente a partir de la masa calculada en mg de cada comprimido de la formulación en base a RBZ LI.

Componentes	mg	RBZ LI (%)
RBZ	200	40
Lactosa Spray Dried (Montpellier®)	222,5	44,5
Almidón glicolato de sodio (Explotab®)	50	10
Talco	5	1
Estearato de Magnesio	7,5	1,5
PVP-etanol 10%	15	3

RBZ: Ricobendazole, LI: liberación inmediata, PVP: Polivinilpirrolidona

La Lactosa se utilizó como material de relleno-ligante. El almidón glicolato de sodio (Explotab®, Parafarm, Argentina), se usó como agente desintegrante, y el talco y el estearato de magnesio como antiadherente y lubricante respectivamente. Una solución de polivinilpirrolidina (PVP) con etanol al 10%, se utilizó como agente granulante.

Se pesaron los diferentes componentes en una balanza de precisión (Adventurer OHAUS, USA).

En un mortero, se humedeció la mezcla con la solución granulante, la cual luego se forzó a pasar por un tamiz (*mesh* 30), el granulado resultante se secó durante 2 horas en estufa a 40°C. Previo a la compresión de la mezcla en la comprimidora, se agregaron el agente antiadherente (talco) y el agente lubricante (estearato de magnesio), se mezcló durante 3 minutos en una mezcladora de polvos (INSTRELEC, Argentina).

Se comprimió el producto resultante en una comprimidora de tipo excéntrico (DEL FABRO, Argentina), a dos diferentes fuerzas de compresión (1000 y 2000 kg). Se utilizó una matriz y punzones ranurados de 13 mm.

Ensayos de disolución

Se realizaron dos ensayos de disolución por sextuplicado.

En primer lugar, se evaluó la formulación experimental en base a RBZ LI y en segundo lugar se hizo el ensayo de disolución comparativo entre la formulación comercial (Laboratorio AFFORD, Argentina y la formulación RBZ LI).

En ambos ensayos, se utilizó como medio de disolución, ácido clorhídrico (HCl) con Lauril sulfato de Sodio (LSS) y NaCl, (Castro et al., 2013), ajustando el pH a 1,5. Se usó el método de paleta, a una velocidad de 50 rpm y con un volumen de 900mL por vaso. Se utilizó un equipo disolutor calidad USPXXIV (SOTAX AT 7 Smart, USA).

Se extrajeron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos con reemplazo del medio fresco, filtrado. Las concentraciones del fármaco RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV en las dos formulaciones ensayadas.

Para ello, se puso a punto una técnica de cuantificación por espectrofotometría Uv-visible, (Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution-300, USA). Se obtuvo una curva de calibrado por triplicado en HCL 0,1M (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de curva de calibración para RBZ en HCl 0,1M

λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	r ²
289	16260	0,995

Cacterización farmacotécnica de los comprimidos obtenidos

Se estudió la uniformidad de peso, friabilidad, uniformidad de contenido y dureza de todos los comprimidos obtenidos.

Uniformidad de peso. Se midió el peso de diez (10) comprimidos, con una balanza analítica. Se informó el promedio de las medidas y su desviación estándar.

Friabilidad. Se colocaron diez (10) comprimidos en un friabilómetro (AVIC Argentina), por 5 minutos y se midió la pérdida de peso respecto de la masa inicial.

Uniformidad de contenido. Se molieron 3 comprimidos y se obtuvieron 3 soluciones madres en etanol. Se realizaron diluciones con HCl 0,1M, previo filtrado de las muestras y se cuantificaron al UV-visible, (Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution-300, USA).

Dureza. Se midió la dureza de 10 comprimidos en un durómetro digital (AVIC Argentina) y se informó un promedio de las mismas y su desviación estándar.

Resultados

El perfil de disolución de la formulación experimental en base a RBZ LI sometida a diferentes fuerzas de compresión (1000 y 2000 kg), se muestran en la Figura 15. Los perfiles de disolución comparativos entre la formulación experimental y la formulación comercial, se ilustran en la Figura 16.

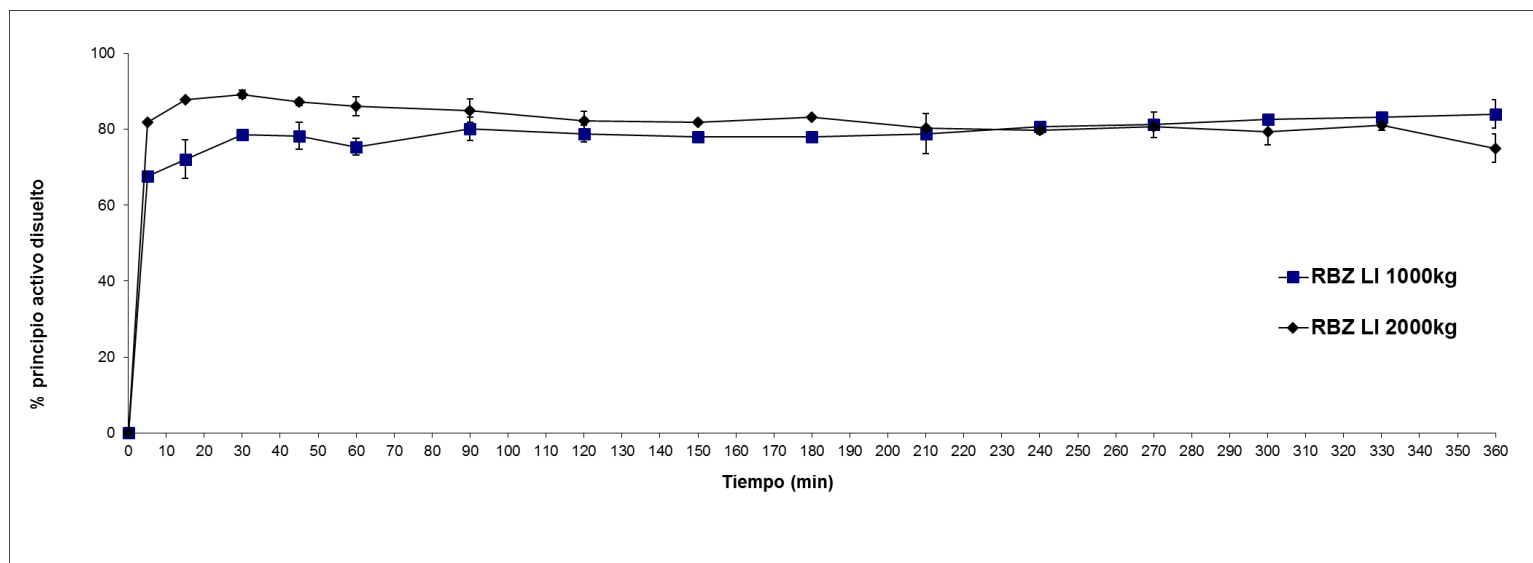


Figura 15. Ensayo de disolución de formulaciones experimentales en base a RBZ LI a diferentes fuerzas de compresión (1000 y 2000 kg) con método de paleta, 50rpm, 900mL de HCl con Lauril sulfato de Sodio y NaCl, 37°C.

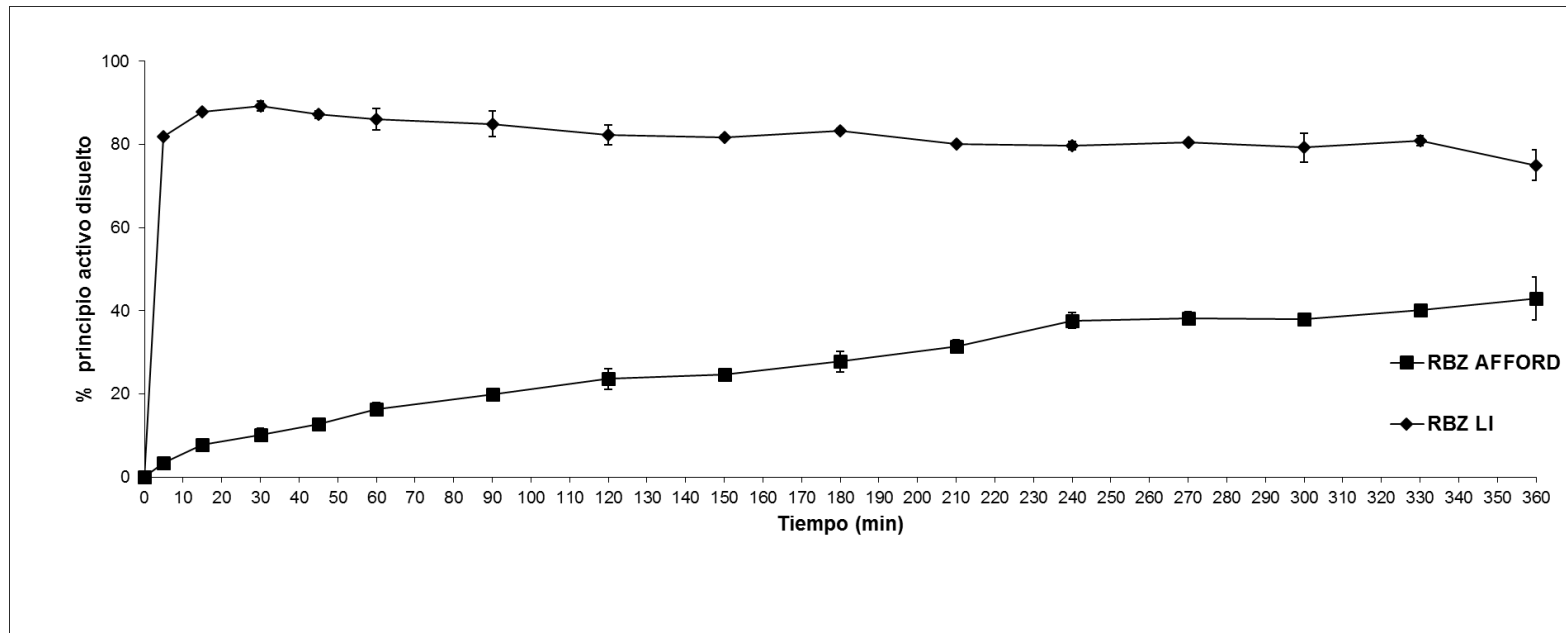


Figura 16. Ensayo de disolución comparativo entre la formulación en base a RBZ LI experimental (fuerza de compresión de 2000 kg) y la formulación comercial control en base a RBZ (Laboratorios AFFORD, Argentina), con método de paleta, 50rpm, 900mL de HCL con Lauril sulfato de Sodio y NaCl, 37°C.

La Tabla 6, muestra los valores promedio del porcentaje de disolución del principio activo, de las formulaciones en base a RBZ LI experimental y la formulación comercial (Laboratorio AFFORD, Argentina). La Tabla 7, muestra los valores correspondientes a la caracterización farmacotécnica de los compactos de la formulación experimental en base a RBZ LI.

Tabla 6. Porcentajes de disolución promedio de RBZ de la formulación comercial (Laboratorio AFFORD, Argentina) y la formulación experimental RBZ LI.

RBZ AFFORD			RBZ LI experimental		
Tiempo (min)	% disolución promedio	DS	Tiempo (min)	% disolución promedio	DS
0	0,00	0,00	0	0,00	0,00
5	3,75	0,55	5	46,34	1,77
15	6,07	0,16	15	80,23	1,64
30	8,47	1,46	30	81,62	2,57
45	11,36	1,37	45	82,50	2,89
60	13,36	1,54	60	82,89	2,81
90	16,13	1,43	90	80,85	0,73
120	19,31	2,50	120	79,61	0,56
180	24,40	2,45	180	79,00	0,57

RBZ LI: Ricobendazole de liberación inmediata, DS: desvío estándar

Tabla 7. Caracterización farmacotécnica de la formulación RBZ LI.

	Uniformidad de peso (g)	Friabilidad (%)	Dureza (kg)	Uniformidad de contenido (mg)
RBZ LI	0,5076 ± 0,0093	0,33	5,97 ± 0,91	187,81 ± 2,20

Conclusiones parciales

La formulación experimental en base a RBZ LI, superó exitosamente la pruebas farmacotécnicas. La mezcla de polvos antes de ser sometida a compresión (2000 kg), presentó buen flujo y excelente comportamiento en la comprimidora, con un llenado uniforme de la matriz, sin adhesión a los punzones. La formulación liberó el contenido de fármaco en los primeros minutos, lo cual se atribuyó a la adición del almidón glicolato de sodio (Explotab®), un agente con potente acción desintegrante, a la formulación (Muñoz et al., 1998). Sin embargo, los valores de los estudios PK de ambas formulaciones, comercial (Dib et al., 2011) y experimental (Dib et al., 2015), fueron similares y no presentaron diferencias significativas.

La necesidad de diseñar y formular una nueva formulación en base a RBZ LI para ser utilizada como control en los sucesivos estudios experimentales y estudios *in vivo*, fue crucial para unificar el uso de las mismas técnicas y equipamiento del laboratorio, así como validar el método de detección por UV para las sucesivas formulaciones en base a RBZ.

ESTUDIO EXPERIMENTAL II

Objetivo

Diseñar, formular y caracterizar diferentes formulaciones SLM en base a RBZ en forma de comprimidos, utilizando diferentes sistemas matriciales reguladores de la liberación.

Estrategia metodológica

Se realizaron cinco (5) experimentos *in vitro* en los cuales se diseñaron, formularon y caracterizaron, diferentes formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg) en forma de comprimidos de 500 mg, para administración oral. Dichos experimentos, se realizaron en el Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.

Experimento 1: formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg), utilizando HPMC como formador de matriz polimérica hidrofílica, reguladora de la liberación.

Experimento 2: formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg), utilizando AA, como formador de matriz polimérica hidrofílica, reguladora de la liberación.

Experimento 3: formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg), utilizando AC como formador de matriz lipofílica, reguladora de la liberación.

Experimento 4: formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg), utilizando GE 50/02® como formador de matriz lipofílica, reguladora de la liberación.

Experimento 5: formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg), con capacidad gastro-retentiva o flotante.

Para el diseño, formulación y obtención de los comprimidos en todos los experimentos y formulaciones ensayadas, se siguieron las siguientes etapas.

1. Diseño, formulación y elaboración de comprimidos.
2. Ensayos de disolución.
3. Caracterización farmacotécnica de los comprimidos obtenidos, con el análisis de uniformidad de peso (g), friabilidad (%), dureza (Kg) y uniformidad de contenido (mg).

Se utilizó el mismo equipamiento descrito en el Estudio Experimental I para los ensayos de disolución y caracterización farmacotécnica.

Experimento 1

Materiales y métodos

Se diseñaron y caracterizaron siete (7) formulaciones SLM (500 mg) en base a RBZ (200 mg) (Parafarm® Argentina), utilizando como excipiente formador de matriz, el HPMC de viscosidad media (MV), adicionado en diferentes porcentajes. Se utilizó la técnica de granulación húmeda. Las formulaciones se identificaron como: "P" (P1, P2, P3, P4, P5, P6 P7).

Las formulaciones P1, P2 y P3, se sometieron a dos fuerzas de compresión (1000 y 2000 kg), para evaluar el efecto de este factor en su comportamiento *in vitro*.

Componentes de las formulaciones

La composición porcentual y la masa en mg de las formulaciones P, se ilustran en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulaciones P1 a P7. Composición porcentual y masa en mg de cada componente por cada comprimido.

Componentes	P1%	P1 mg	P2%	P2 mg	P3%	P3 mg	P4%	P4 mg	P5%	P5 mg	P6%	P6 mg	P7%	P7 mg
RBZ	40	200	40	200	40	200	40	200	40	200	40	200	40	200
Lactosa Spray Dried (Montpellier®)	39,5	197,5	24,5	122,5	9,5	47,5	39,5	197,5	34,5	172,5	44,5	223	42	210
HPMC (MV)	15	75	30	150	45	225	10	50	15	75	5	25	5	25
NaCl	-	-	-	-	-	-	5	25	2,5	12,5	5	25	7,5	38
Celulosa microcristalina (Avicel®)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	12,5	-	-	-	-
Talco	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
Estearato de magnesio	1,5	7,5	1,5	7,5	1,5	7,5	1,5	7,5	1,5	7,5	1,5	7	1,5	7
PVP	3	15	3	15	3	15	3	15	3	15	3	15	3	15

RBZ: Ricobendazole, HPMC: Hidroxipropil-metilcelulosa, MV: viscosidad media, NaCl: Cloruro de sodio, PVP: Polivinilpirrolidona

En las formulaciones P4, P5, P6 y P7, se agregó el cloruro de sodio (NaCl) como agente acanalante para evitar su flotación, ya que permite aumentar la penetración del medio de disolución en el interior del comprimido.

En la formulación P5, se agregó una celulosa microcristalina (Avicel[®], FMC Biopolymer, USA), como relleno ligante y mejorador de flujo.

Se prepararon y caracterizaron las formulaciones de la misma forma descrita en el Estudio Experimental I. La formulación resultante, se comprimió con una fuerza de 2000 kg.

Ensayos de Disolución

Para este estudio, se realizaron los ensayos por triplicado, mediante el método del canastillo para evitar que los comprimidos flotaran. La velocidad fue de 50rpm, medio HCl 0,1M, a 37°C y 900mL.

En todos los ensayos, se extrajeron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos con reemplazo del medio fresco y filtrado.

Las concentraciones del principio activo RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV, obteniéndose una curva de calibrado por triplicado en HCL 0,1M según lo descrito en la Tabla 5.

Resultados

Las Figura 17, ilustra el ensayo de disolución de las formulaciones P1, P2 y P3 sometidas a diferentes fuerzas de compresión (1000 y 2000 kg). Las Figuras 18 y 19, ilustran el ensayo de disolución de las formulaciones P4 - P5 y P6 - P7 respectivamente, comparados con la formulación control RBZ LI.

La Tabla 9, muestra los valores correspondientes a los perfiles de disolución de las formulaciones P6 y P7. La Tabla 10, muestra la caracterización farmacotécnica de la formulación P6.

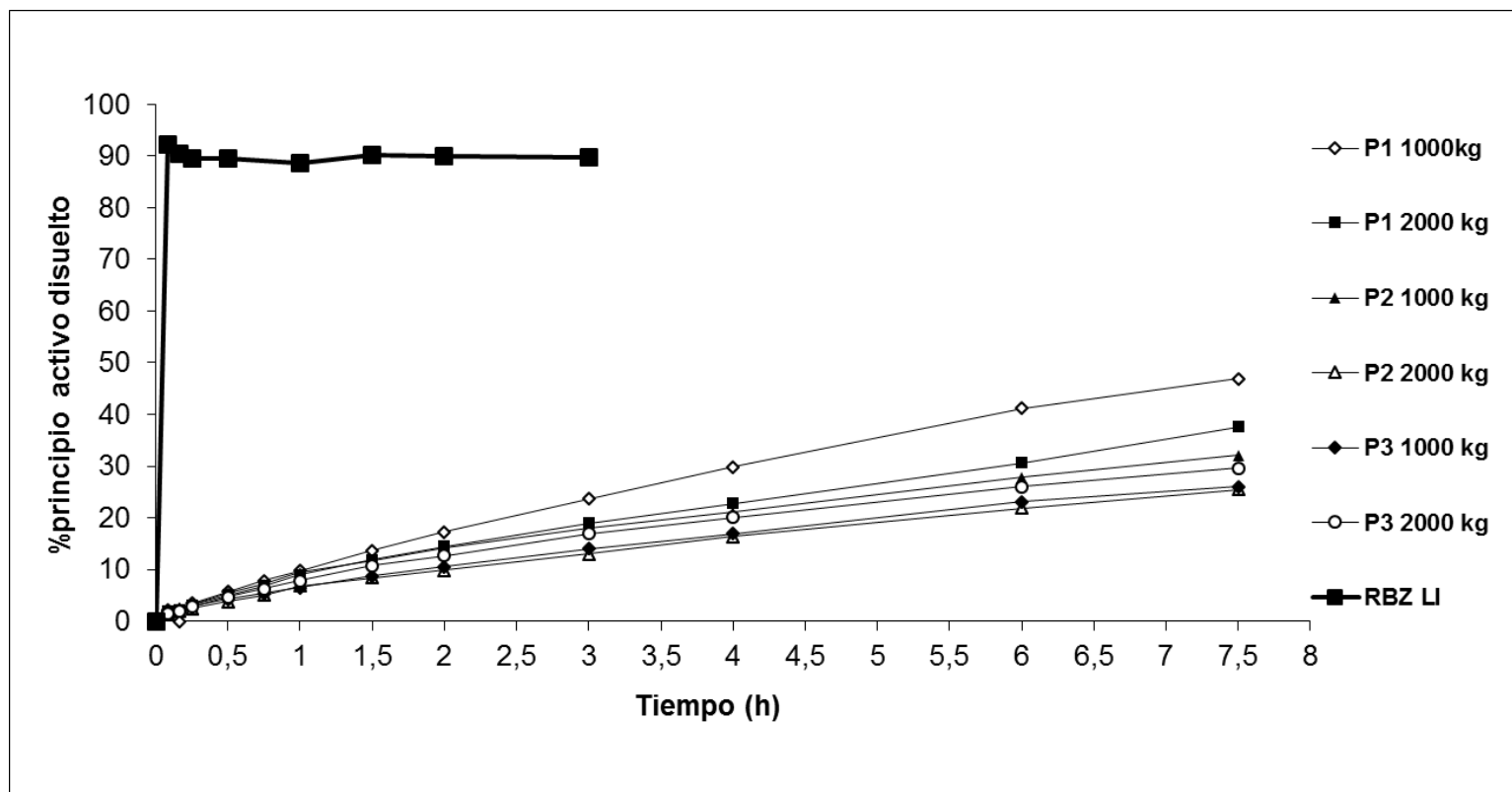


Figura 17. Ensayo de disolución comparativo de las formulaciones P1, P2 y P3, en base a RBZ sometidas a fuerzas de compresión de 1000 y 2000 kg, comparado con la formulación control (RBZ LI).

Método de paleta, 50 rpm, 900 mL, HCL 0,1M a 37°C.

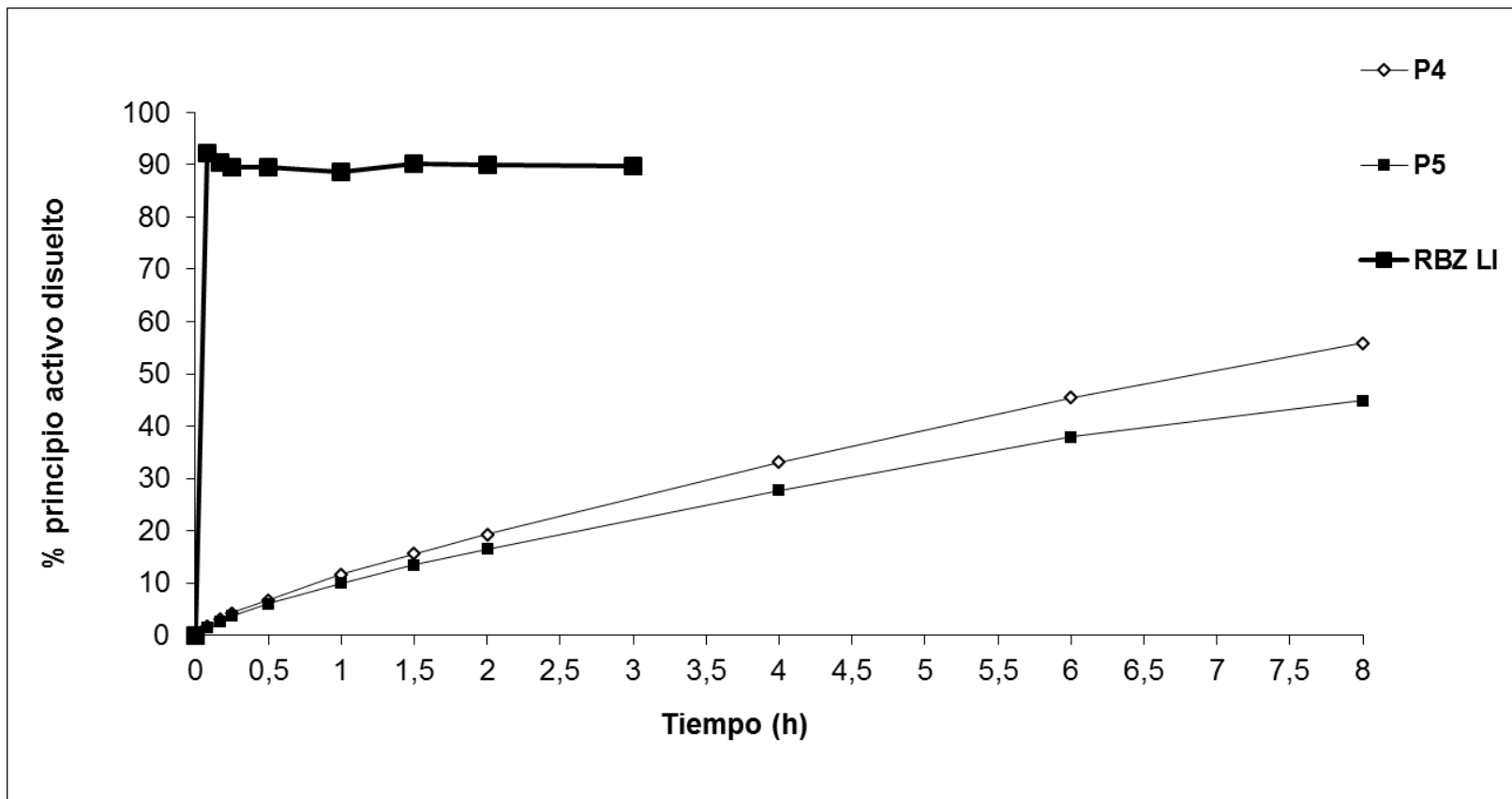


Figura 18. Ensayo de disolución de formulaciones P4 y P5 en base a RBZ (2000 kg), comparado con la formulación control RBZ LI. Método de canastillo, 50 rpm, 900 mL, HCL 0,1M a 37°C.

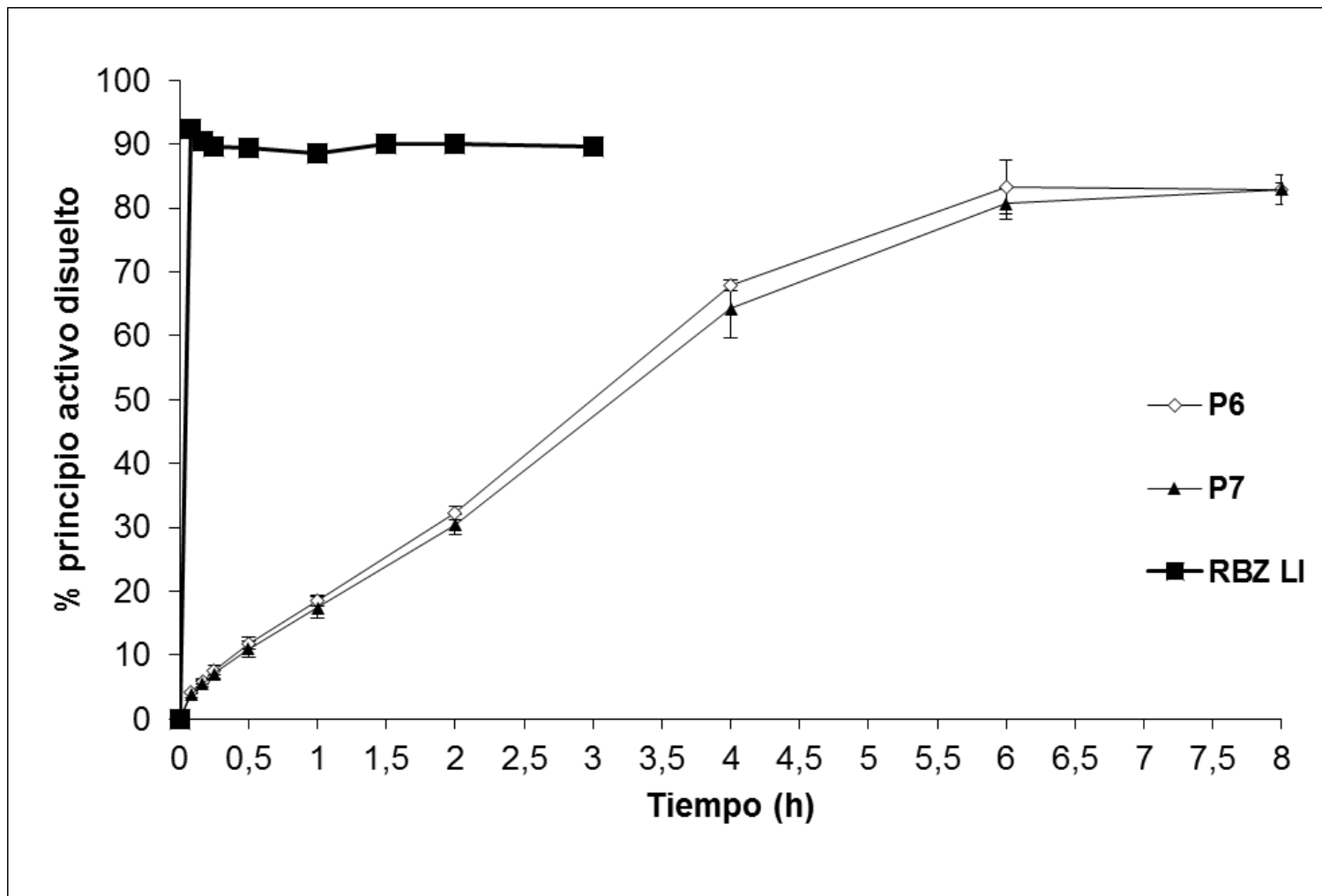


Figura 19. Ensayo de disolución de formulaciones P6 y P7 (2000 kg), en base a RBZ, comparado con la formulación control RBZ LI, método de canastillo, 50 rpm, 900 mL, HCL 0,1M a 37°C.

Tabla 9. Porcentajes de disolución promedio y desvío estándar entre las formulaciones P6 y P7.

Tiempo (h)	Formulación P6		Formulación P7		x	DS
	% disolución promedio	% disolución promedio	x	DS		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	4,09	3,81	3,95	0,19		
0,17	5,81	5,52	5,67	0,21		
0,25	7,64	7,04	7,34	0,43		
0,50	11,88	10,95	11,41	0,66		
1,00	18,49	17,46	17,97	0,73		
2,00	32,20	30,45	31,32	1,24		
4,00	67,85	64,26	66,05	2,54		
6,00	83,31	80,68	82,00	1,86		
8,00	82,92	82,92	82,92	0,00		

x: promedio, DS: desvío estándar

Tabla 10. Caracterización farmacotécnica de formulación P6

Uniformidad de peso (g)	Friabilidad (%)	Dureza (kg)	Uniformidad de contenido (mg)
0,5056 ± 0,0327	0,23	7,52 ± 1,33	183,81 ± 2,20

Conclusiones parciales

Se probaron diferentes proporciones del principal componente formador de matriz HPLC. Las cantidades ascendentes de HPMC y la fuerza de compresión, no fueron factores determinantes en el estudio *in vitro* de las formulaciones P1, P2 y P3. Sin embargo, los compactos obtenidos a menor fuerza de compresión (1000kg), flotaron durante todo el ensayo de disolución, por tanto se descartaron nuevos diseños de formulaciones sometidas a dicha fuerza.

Para el desarrollo de las formulaciones P4, P5, P6 y P7, se eligió como punto de partida la formulación P1, se utilizó el método de canastillo para evitar su flotación y se sometieron a una fuerza de compresión de 2000 kg.

Dados los resultados obtenidos, se seleccionó la formulación P6, para continuar con su escalado y valoración farmacocinética (PK) *in vivo*.

Experimento 2

Materiales y métodos

Se diseñaron y caracterizaron 2 formulaciones SLM en base a RBZ (200 mg) (Parafarm®, Argentina), en forma de comprimidos (500 mg), utilizando como excipiente formador de matriz, el AA (Sigma®, Argentina) en diferentes proporciones. Dichas formulaciones, se identificaron como: "A" (A1 y A2). Se utilizó la técnica de granulación húmeda.

Se adicionó Lactosa como relleno y NaCl como agente acanalante a las mezclas de ambas formulaciones. Se varió la proporción de Lactosa, acorde a la variación de la proporción del agente formador de la matriz.

Componentes de las formulaciones

La composición porcentual y la masa en mg de los diferentes componentes de las formulaciones A, se ilustran en la Tabla 11.

Tabla 11. Formulaciones A1 y A2. Composición porcentual y masa en mg de cada componente de cada comprimido.

Componentes	A1 (%)	mg	A2 (%)	mg
RBZ	40	200	40	200
Ácido Algínico (Sigma®)	2,5	12,5	5	25
Lactosa Spray Dried (Montpellier®)	47	235	44.5	222,5
NaCl	5	25	5	25
PVP	3	15	3	15
Talco	1	5	1	1
Estearato de magnesio	1.5	7,5	1.5	7,5

RBZ: Ricobendazole, PVP: Polivinilpirrolidona, NaCl: cloruro de sodio, PVP: polivinilpirrolidona

Ensayos de disolución

Se realizaron por triplicado, mediante el método del canastillo, a 50rpm, HCl 0,1M a 37°C y 900mL. En todos los ensayos, se extrajeron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos con reemplazo del medio fresco, filtrado. Las concentraciones del fármaco RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV. Se obtuvo una curva de calibrado por triplicado en HCL 0,1M según explicado en la Tabla 5.

Resultados

La Figura 20 y la Tabla 12, muestran el comportamiento de disolución de las formulaciones ensayadas. La Tabla 13, muestra la valoración farmacotécnica de los compactos obtenidos de las formulaciones A1 y A2.

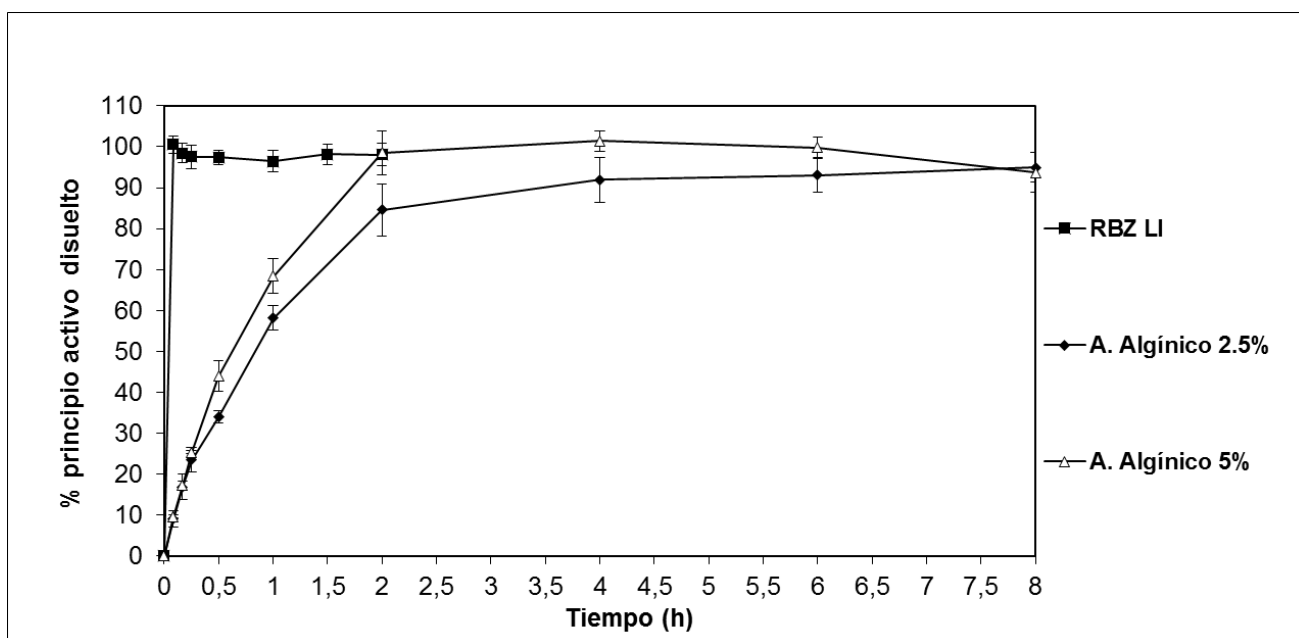


Figura 20. Ensayo de disolución de formulaciones A1 y A2 en base a RBZ, comparado con RBZ LI, método de canastillo, 50 rpm, 900 mL, HCL 0,1M a 37°C.

Tabla 12. Porcentajes de disolución promedio y desvío estándar entre las formulaciones A1 y A2.

Tiempo (h)	Formulación A1	Formulación A2		x		DS
	% disolución promedio	% disolución promedio				
0,00	0,00	0,00	✓	0,00	✓	0,00
0,08	19,00	21,00	✓	20,00	✓	1,41
0,17	29,00	37,00	✓	33,00	✓	5,66
0,25	44,00	54,00	✓	49,00	✓	7,07
0,50	56,00	67,00	✓	61,50	✓	7,78
1,00	62,00	73,00	✓	67,50	✓	7,78
2,00	69,00	74,00	✓	71,50	✓	3,54
4,00	79,00	88,00	✓	83,50	✓	6,36
6,00	85,00	90,00	✓	87,50	✓	3,54
8,00	87,00	92,00	✓	89,50	✓	3,54

A1 y A2: Ácido Algínico, % porcentaje, x: promedio, DS: desvío estándar

Tabla 13. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones A1 y A2.

	Uniformidad de peso (g)	Friabilidad (%)	Dureza (kg)	Uniformidad de contenido (mg)
A1	0,5054 ± 0,025	0,34	4,74 ± 0,86	184,79 ± 2,56
A2	0,5051 ± 0,034	0,19	6,50 ± 1,07	184,65 ± 2,48

Conclusiones parciales

Los perfiles de disolución de las formulaciones en base a RBZ con AA, no se consideraron acordes a un comportamiento SLM, debido a que presentó un perfil de disolución más acorde al inmediato. Se observó que los perfiles de disolución de las formulaciones experimentales en base a AA, tuvieron un comportamiento similar a los demostrados por las formulaciones P6 y P7 (HPMC), a las 8 hs de ensayo.

La variación de las proporciones de AA en A1 y A2, no demostró diferencias en los perfiles de disolución de ambas formulaciones experimentales. Por tanto, se seleccionó en forma aleatoria a la formulación A2, para su valoración PK *in vivo* en perros y se procedió a su escalado.

Experimento 3

Materiales y Métodos

Se diseñaron y caracterizaron cuatro (4) formulaciones SLM en base a RBZ (Parafarm[®], Argentina), utilizando AC como excipiente formador de matriz. Dichas formulaciones, se identificaron como “L” (L1, L2, L3 y L4). Los comprimidos obtenidos fueron de 500 mg, excepto la formulación L1, que fue de 600 mg.

La formulación L1, se formuló por mezcla directa de los polvos, las formulaciones L2 y L3, se formularon por *melt granulation* y la formulación L4 por granulación húmeda convencional.

La técnica de *melt granulation*, consistió en la mezcla de los diferentes componentes de cada formulación en un mortero, para luego fundir la mezcla resultante a Baño María a 80°C.

La mezcla con la consistencia adecuada, se forzó a pasar por un tamiz (*mesh* 30). Se dejó enfriar, se mezcló y antes de la compresión, se agregó el talco. Se comprimió con matriz y punzones ranurados de 13 mm (Talleres Sánchez SC1[®], Argentina). El NaCl, se utilizó como agente acanalante en las 4 formulaciones. El fosfato dibásico de calcio dihidratado (Emcompress[®], Parafarm, Argentina), fue utilizado como relleno mejorador de flujo en L2.

La composición de todas las formulaciones con AC se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición porcentual de los componentes de las diferentes formulaciones “L”.

Componentes	L1 %	L2 %	L3 %	L4 %
RBZ	200 mg (33,33%)	200 mg (33,33%)	200 mg (40%)	200 mg (40%)
Alcohol Cetílico	33,33	40	40	36
Lactosa Spray Dried (Montpellier®)	28,33	10	14	15
Fosfato de calcio dibásico (Emcompress®)	-	10,67	-	-
NaCl	4,17	5	5	5
Talco	0,83	1	1	1
PVP-etanol 10%	-	-	-	3

RBZ: Ricobendazole, NaCl: cloruro de sodio, PVP: polivinil-pirrolidona

Ensayos de disolución

Los ensayos de disolución de las formulaciones L3 y L4, se realizaron por triplicado mediante el método del canastillo, a 50rpm, HCl 0,1 M a 37°C y 900mL (Figura 29).

En todos los ensayos, se extrajeron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos con reemplazo del medio fresco y filtrado.

Las concentraciones del fármaco RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV. Se obtuvo una curva de calibrado por triplicado en HCL 0,1M según explicado en la Tabla 5.

Resultados

La figura 21, ilustra el gráfico correspondiente a los ensayos de disolución de las formulaciones L3 (*melt granulation*) y L4 (granulación húmeda). La Tabla 15, muestra los perfiles de disolución de ambas formulaciones.

La Tabla 16, muestra la caracterización farmacotécnica correspondiente a la formulación L3.

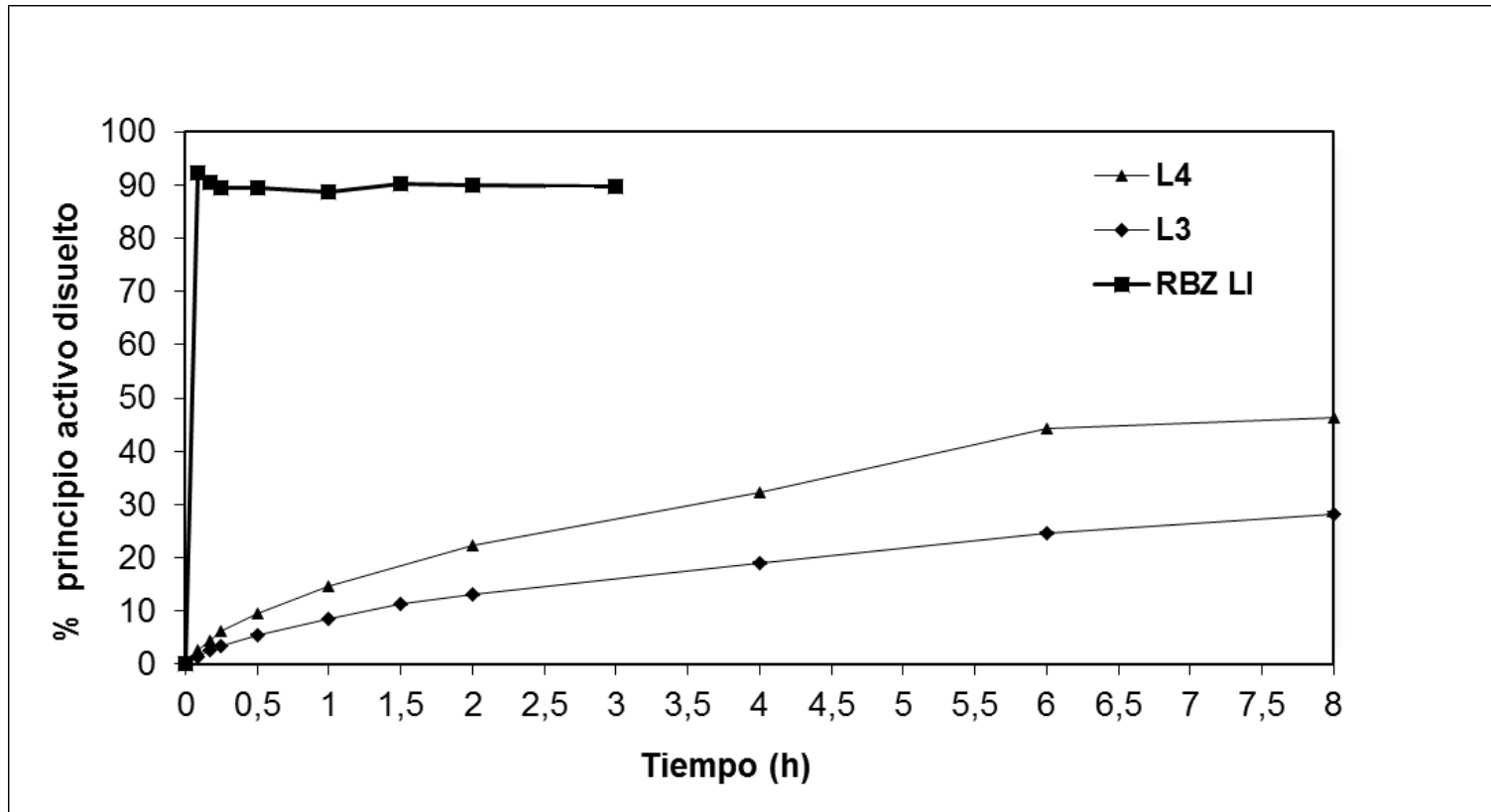


Figura 21. Ensayo de disolución de las formulaciones L3 y L4, comparada con RBZ LI, mediante la técnica de canastillo, 37°C, HCl 0,1M, 50rpm, 900mL.

Tabla 15. Porcentajes de disolución promedio y desvío estándar entre las formulaciones L3 y L4.

Tiempo (h)	Formulación L3		Formulación L4		x	DS
	% disolución promedio	% disolución promedio	% disolución promedio	% disolución promedio		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00
0,08	1,50	2,34	1,50	2,34	1,92	0,59
0,17	2,62	3,38	2,62	3,38	3,00	0,54
0,25	3,46	4,52	3,46	4,52	3,99	0,75
0,50	5,60	9,16	5,60	9,16	7,38	2,52
1,00	8,53	13,96	8,53	13,96	11,25	3,84
2,00	11,24	19,59	11,24	19,59	15,41	5,91
4,00	13,03	30,62	13,03	30,62	21,82	12,44
6,00	19,05	37,30	19,05	37,30	28,18	12,90
8,00	24,61	44,49	24,61	44,49	34,55	14,05

L3 y L4: Alcohol Cetílico, x promedio, DS desvío estándar.

Tabla 16. Caracterización farmacotécnica de la formulación L3.

Uniformidad de peso (g)	Friabilidad (%)	Dureza (kg)	Uniformidad de contenido (mg)
0,4989 ± 0,0102	0,31	8,31 ± 1,22	202,49 ± 6,45

Conclusiones parciales

La mezcla de polvos correspondiente a la formulación L1, presentó malas propiedades de flujo y formación de grumos. Se intentó diluirla con 1g de Lactosa, pero dado que no se consiguió mejorarla, por lo tanto fue descartada.

La formulación L2, presentó mal flujo al igual que la formulación L1, se intentó granular con el lípido fundido (*melt granulation*). Se utilizó un fosfato de calcio dibásico dihidratado (Emcompress®, Parafarm, Argentina), que tiene buenas propiedades como relleno y mejorador de flujo, pero dado que igualmente se formaron grumos, la formulación también fue descartada.

La granulación de la formulación L3, preparada mediante la técnica de *melt granulation*, presentó dificultades debido al estrecho rango de temperaturas. Dado que si el lípido formador de matriz está muy fundido, no se forman los

gránulos y si está demasiado solidificado, es muy difícil lograr que atraviese la malla del tamiz. Sin embargo, se pudo obtener un material granulado.

Para el diseño de la formulación L4, se disminuyó el porcentaje de AC con el objetivo de lograr una granulación húmeda con PVP-etanol y así evitar el proceso de *melt granulation*. El agregado de talco, mejoró la mezcla en la comprimidora. Sin embargo, se observó que la formulación L3, presentó un perfil de disolución más lento que L4, por tanto L3 fue seleccionada para su escalado y valoración PK *in vivo* en perros.

Experimento 4

Materiales y Métodos

Se diseñaron y caracterizaron cinco (5) formulaciones SLM (500 mg), en base a RBZ (Parafarm® Argentina), utilizando GE 50/02®, como excipiente formador de matriz, en diferentes proporciones. Dichas formulaciones se identificaron como “G” (G1, G2, G3, G4 y G5).

Los compactos de las formulaciones G1 y G2, fueron obtenidos mediante la técnica de mezcla directa de los polvos, el RBZ fue humedecido con etanol y agua.

Las formulaciones G3, G4 y G5, se obtuvieron mediante la técnica de granulación húmeda.

Se pesaron e integraron los polvos y se humedeció la mezcla en un mortero, con solución granulante de Polivinilpirrolidina (PVP) 10% en etanol.

Luego se forzó la mezcla para pasar por un tamiz *mesh* 30, el granulado se secó durante 2 hs a temperatura ambiente.

Finalmente, se agregó lauril sulfato de sodio (LSS), como agente humectante. Se mezcló por 3 minutos adicionales por volteo.

Se comprimió con matriz y punzones número 13 ranurado en una comprimidora monopunzón Talleres Sánchez SC1®, Argentina.

La composición porcentual de las formulaciones G1 a G5, se muestra en las Tabla 17.

Tabla 17. Composición porcentual de los componentes de las formulaciones G1 a G5.

Componentes	G1	G2	G3	G4	G5
RBZ	40	40	40	40	40
Gelucire 50/02®	58	58,5	30	15	7,5
Lauril sulfato de sodio (LSS)	1	0,5	1,5	1	1
Lactosa Spray Dried (Montpellier®)	-	-	24,5	39,5	47
Talco	1	1	1	1,5	1,5
PVP	-	-	3	3	3

RBZ: Ricobendazole, G: Gelucire 50/02®, PVP: polivinilpirrolidona.

Ensayos de disolución

Los ensayos de las formulaciones G4 y G5, se realizaron por triplicado mediante el método del canastillo, a 50 rpm, HCL 0,1 M a 37 °C y 900 mL.

En todos los ensayos, se extrajeron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos con reemplazo del medio fresco y filtrado. Las concentraciones del fármaco RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV. Se obtuvo una curva de calibrado por triplicado en HCL 0,1M según explicado en la Tabla 5.

Resultados y discusión

La Figura 22, ilustra el gráfico correspondiente a los ensayos de disolución de las formulaciones G4 y G5, comparado con la formulación control RBZ LI. Las Tablas 18 y 19, muestran los valores correspondientes a los perfiles de disolución de las formulaciones G4 y G5 y su caracterización farmacotécnica respectivamente.

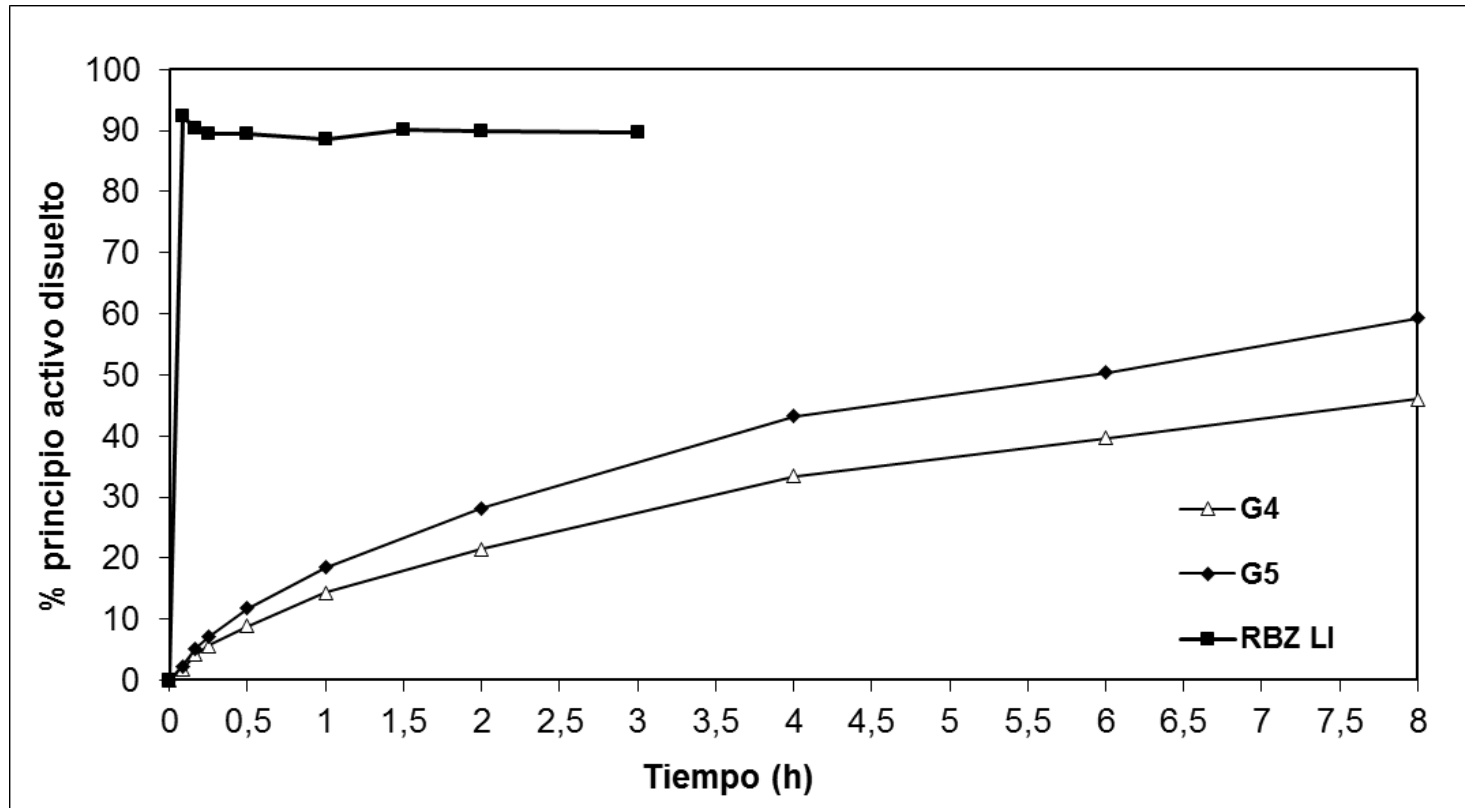


Figura 22. Ensayo de disolución de las formulaciones G4 y G5 mediante la técnica de canastillo, 37°C, HCl 0,1M, 50rpm 900mL.

Tabla 18. Porcentajes de disolución promedio y desvío estándar entre las formulaciones G4 y G5.

<i>Tiempo (hs)</i>	<i>Formulación G4</i>	<i>Formulación G5</i>	<i>x</i>	<i>DS</i>
	<i>% disolución promedio</i>	<i>% disolución promedio</i>		
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	2,31	1,81	2,06	0,35
0,17	5,22	4,23	4,72	0,70
0,25	7,12	5,68	6,40	1,02
0,50	11,74	8,89	10,32	2,02
1,00	18,46	14,31	16,38	2,93
2,00	28,11	21,48	24,79	4,69
4,00	43,24	33,39	38,31	6,97
6,00	50,42	39,61	45,01	7,64
8,00	59,31	45,99	52,65	9,42

X: promedio, DS: desvío estándar

Tabla 19. Caracterización farmacotécnica de las formulaciones G4 y G5

	<i>Uniformidad de peso (g)</i>	<i>Friabilidad (%)</i>	<i>Dureza (kg)</i>	<i>Uniformidad de contenido (mg)</i>
G4	0,4962 ± 0,0004	0,16	5,29 ± 0,67	199,23 ± 1,45
G5	0,5051 ± 0,0340	0,19	6,50 ± 1,07	200,02 ± 0,35

Conclusiones parciales

Las formulaciones G1, G2 y G3, fueron descartadas antes de realizar sus correspondientes ensayos de disolución, debido a que las mezclas no fueron adecuadas para su compresión. Tanto G1 como G2, se pegaron demasiado a los punzones de la comprimidora. Por tanto, se decidió adicionar Lactosa en diferentes proporciones a las formulaciones G3, G4 y G5, como agente de relleno y mejorador del flujo.

En la formulación G3, las proporciones elegidas de Lactosa y GE 50/02[®], no fueron las acertadas, por lo que la formulación se pegó igualmente a los punzones de la comprimidora, por lo que también fue descartada.

La mayor proporción de Lactosa y menor proporción de Gelucire 50/02[®], de las formulaciones G4 y G5, facilitó su flujo en la comprimidora por lo cual se las eligió para su escalado y caracterización.

Resumen de las formulaciones SLM ensayadas

La Figura 23 ilustra los ensayos de disolución de las formulaciones en base a RBZ seleccionadas para su evaluación PK *in vivo* en los perros. En esa Figura, se destaca el comportamiento SLM de la formulación L3, exhibiendo un lento perfil de disolución del principio activo RBZ *in vitro*.

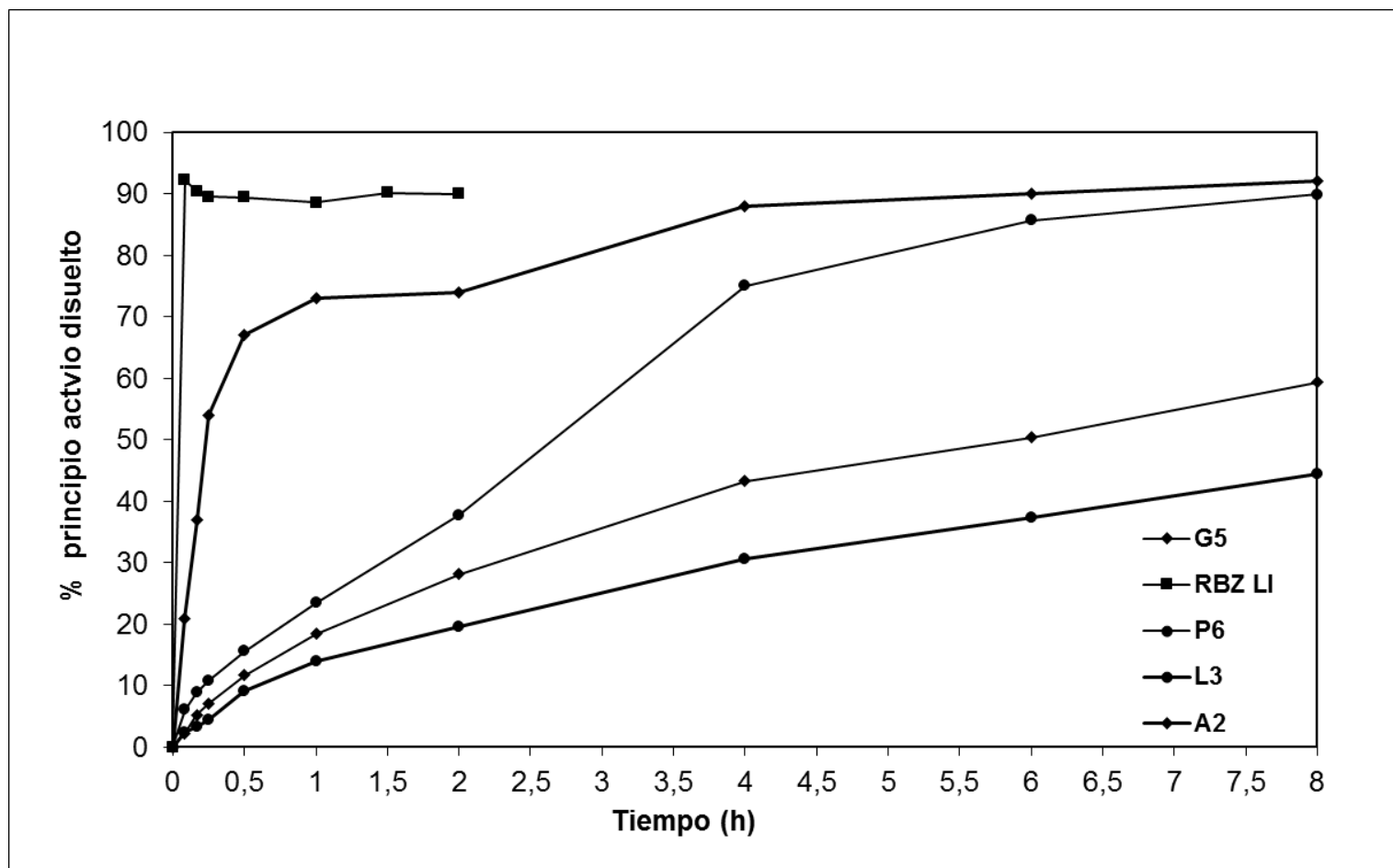


Figura 23. Ensayo de disolución de las formulaciones experimentales en base a RBZ que fueron seleccionadas para su ensayo *in vivo* en perros. RBZ: Ricobendazole, LI: liberación inmediata, HPMC: Hidroxipropil-metil celulosa, L: Alcohol Cetílico, A: Ácido Algínico, G: Gelucire.

Experimento 5

Materiales y Métodos

Se diseñaron tres diferentes formulaciones gastro-restaurantes o flotantes (650 mg), en base a RBZ (200 mg) mediante la técnica de granulación húmeda.

Se utilizó una combinación de HPMC de alta (HPMC HV -K15) y baja/media viscosidad (HPMC LV- K100), en cada formulación. Las formulaciones fueron identificadas como "A", "B" y "C".

Primeramente, el RBZ fue humedecido con una solución granulante de PVP-etanol 10%, para luego dejar secar en estufa a 40°C.

Una vez secado, se mezcló con una Celulosa Microcristalina (Avicel 200®, Parafarm, Argentina) como agente desintegrante y HPMC. Seguidamente, se sometió a mezclado por volteo durante 12 minutos.

Finalmente se agregaron el talco y el estearato de magnesio a la mezcla. Se volvió a mezclar durante otros tres minutos.

La composición en mg de los componentes de cada formulación, se ilustra en la Tabla 20.

Tabla 20. Componentes (mg) de las diferentes formulaciones diseñadas

COMPONENTES (mg)	A	B	C
RBZ	200	200	200
PVP	12	12	12
HPMC K100	130	260	-
HPMC K15	130	-	260
Avicel 200®	156	156	156
Talco	11	11	11
Estearato de magnesio	11	11	11

RBZ: Ricobendazole, PVP: polivinilpirrolidona, HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa.

Se realizaron comprimidos de 650 mg en una comprimidora monopunzón excéntrica (Talleres Sánchez SC3®, Argentina), a diferentes fuerzas de compresión (200, 300 y 400 kg).

Los comprimidos resultantes de las diferentes formulaciones (A, B y C), fueron identificados según la fuerza de compresión aplicada. Con fuerza de compresión de 200 kg: las formulaciones fueron: A1, B1 y C1; con fuerza de compresión de 300 kg: formulaciones A2, B2 y C2 y con fuerza de compresión de 400 kg: formulaciones A3, B3 y C3. Se utilizaron punzones bicóncavos de 11 mm.

Se realizó la correspondiente valoración farmacotécnica que incluyó dureza, friabilidad, uniformidad de peso, uniformidad de contenido de los compactos, así como también se evaluó la reología de los polvos, de las 3 diferentes formulaciones.

Ensayos de disolución

Se realizaron por triplicado los ensayos de disolución mediante el método de paleta, a 50rpm, HCl 0,1 M a 37°C y 900mL, de las formulaciones A2 y B2 que habían sido sometidos a fuerzas de compresión de 300 kg, (Figura 24).

Se extrajeron muestras a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas con reemplazo del medio fresco, filtrado y debidamente disuelto. Las concentraciones del fármaco RBZ, se determinaron por espectrofotometría UV. Se obtuvo una curva de calibrado por triplicado en HCl 0,1M según explicado en Tabla 5.

Resultados y discusión

La Tabla 21, ilustra los valores correspondientes a las pruebas reológicas de las 3 formulaciones de compactos gastroretentivos flotantes ensayados.

Tabla 20. Pruebas reológicas de las formulaciones A, B y C.

Fórmula	Ángulo de reposo	Densidad bulk (g.mL⁻¹)	Densidad empaquetada (g.mL⁻¹)	Índice de Carr	Índice de Hausner
A	25 ± 2	0,39	0,48	18,75	1,23
B	25 ± 2	0,41	0,49	16,32	1,20
C	14 ± 2	0,42	0,47	10,63	1,12

Las Tablas 22 y 23 muestran la caracterización farmacotécnica y los valores de los perfiles de disolución de las formulaciones A, B y C respectivamente. La Figura 24, ilustra los perfiles de disolución de dichas formulaciones.

Tabla 22. Valoración farmacotécnica de las formulaciones A, B y C.

<i>Fórmula</i>	<i>Dureza (kg)</i>	<i>Friabilidad (%)</i>	<i>Uniformidad de Peso (g)</i>	<i>Flotación</i>		<i>Test de flotación</i>
				<i>Inicio</i>	<i>Permanencia (h)</i>	
A₁	3,26 ± 0,37	1,25	0,65 ± 0,002	Instantáneo	>24	-
A₂	5,14 ± 0,70	0,61	0,65 ± 0,004	Instantáneo	>24	10 hs hasta desintegración completa
A₃	8,96 ± 0,74	0,15	0,65 ± 0,001	No flota	-	-
B₁	2,46 ± 0,24	1,45	0,65 ± 0,005	Instantáneo	>24	-
B₂	5,68 ± 0,49	0,63	0,66 ± 0,003	Instantáneo	>24	12 hs hasta desintegración completa
B₃	7,38 ± 0,29	0,63	0,65 ± 0,006	No flota	-	-
C₁	2.34±0.22	1,39	0,65 ± 0,011	Instantáneo	>24	-
C₂	4,04 ± 0,55	0,16	0,65 ± 0,002	Instantáneo	>24	18 hs flotando
C₃	7,16 ± 0,61	0,31	0,65 ± 0,004	No flota	-	-

Tabla 23. Porcentajes de disolución promedio y desvío estándar entre las formulaciones A2 y B2.

Tiempo (hs)	A2	DS	B2	DS
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	3,80	0,25	4,68	0,83
1	5,93	0,31	7,75	1,08
2	9,49	0,77	13,76	1,33
4	17,13	1,33	25,25	2,74
6	21,62	1,76	34,17	2,59
8	27,17	1,27	44,02	2,41
10	30,61	2,10	54,49	2,99
12	35,02	2,27	59,60	2,62
24,00	62,01	4,34	88,08	5,62

DS: desvío estándar

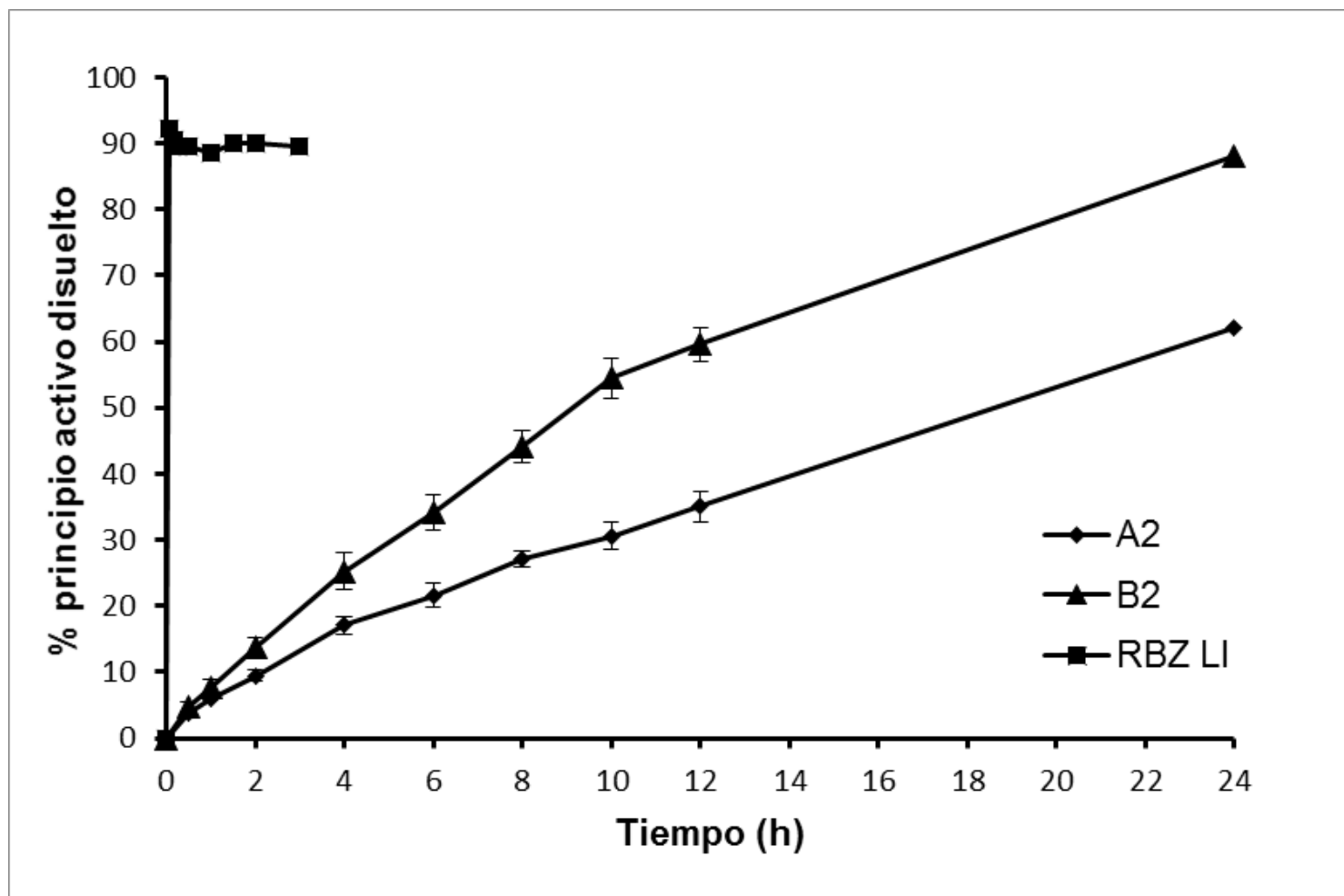


Figura 24. Perfiles de disolución de las formulaciones A2 y B2, comparado con la formulación control RBZ LI.

Conclusiones parciales

La fuerza de compresión fue determinante a la hora de superar los test de friabilidad y flotación a la que fueron sometidas las formulaciones experimentales de este experimento. Las formulaciones sometidas a fuerzas de compresión de 200 kg (A1, B1 y C1), no superaron el test de friabilidad. Las formulaciones sometidas a fuerzas de compresión de 400 kg (A3, B3 y C3), fueron descartadas, debido a que no superaron el test de flotación.

Solamente las formulaciones sometidas a fuerzas de compresión de 300 kg (A2, B2 y C2), superaron todos los controles de calidad farmacotécnicos, además de flotar por períodos superiores a las 10 horas (Figuras 25, 26 y 27). Es de destacar que la formulación C2, mantuvo una flotabilidad durante 18 hs.



Figura 25. Formulaciones “A” sometidas a diferentes fuerzas de compresión. Se observa la flotación de A1 (200 kg) y A2 (300 kg). El vaso A3, contiene la formulación sometida a 400 kg.



Figura 26. Formulaciones “B” sometidas a diferentes fuerzas de compresión. Se observa la flotación de B1 (200 kg) y B2 (300 kg). El vaso B3, contiene la formulación sometida a 400 kg.



Figura 27. Formulaciones “C” sometidas a diferentes fuerzas de compresión. Se observa la flotación de C1 (200 kg) y C2 (300 kg). El vaso C3, contiene la formulación sometida a 400 kg.

ESTUDIO EXPERIMENTAL III

Objetivo general

Evaluar el comportamiento PK de diferentes formulaciones SLM en base a RBZ, utilizando una formulación LI en base a ABZ y una formulación LI en base a RBZ como controles.

Materiales y métodos

Principios activos

Se utilizaron las formulaciones SLM diseñadas y elegidas para su escalado en el Estudio Experimental II, la formulación en base a RBZ LI experimental formulada y caracterizada en el Estudio Experimental I y una formulación comercial de ABZ (Prazibek[®], Vetcross), de liberación convencional.

Las formulaciones SLM seleccionadas para el presente estudio, fueron identificadas según el excipiente modulador de la liberación utilizado, de la siguiente manera:

Matriz hidrofílica con HPMC -	formulación RBZ- HPMC.
Matriz hidrofílica con AA -	formulación RBZ- AA.
Matriz lipofílica con GE 50/02[®] -	formulación RBZ- GE.
Matriz lipofílica con AC -	formulación RBZ- AC.

Diseño experimental in vivo

El manejo de los animales siguió las normas y protocolos de Ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. (www.fvet.edu.uy/chea.edu.uy).

Animales

Se utilizaron animales procedentes de un refugio canino de Montevideo. Los mismos eran perros cruza (n=12) con edades comprendidas entre los 2 y 8 años, 5 machos y 7 hembras no preñadas ($30 \pm 2,5$ kg). Todos los animales, estaban libres de parásitos GI, lo cual se demostró mediante dos test consecutivos de recuento de huevos por gramo (hpg) de materia fecal.

Los perros de experimentación, tenían libre acceso a agua de bebida, eran alimentados con alimento balanceado de buena calidad y tenían buena salud, lo cual se determinó por examen físico antes de la administración de las formulaciones.

Los animales, fueron agrupados en forma aleatoria en 6 grupos (n=2 cada uno). Los grupos fueron identificados como: Grupo 1: (A) ABZ LI; Grupo 2: (B) RBZ LI; Grupo 3: (C) RBZ-HPMC; Grupo 4: (D) RBZ- AC; Grupo 5: (E) RBZ-GE y Grupo 6: (F) RBZ-AA.

El ensayo se realizó en 2 fases, utilizando un diseño en bloque incompleto. Ambas fases estuvieron separadas por un período de 21 días, por tanto se obtuvo, para cada formulación, un n=4 de animales.

Todos los tratamientos en base a RBZ LI, ABZ LI y RBZ SLM, se administraron en única dosis (sugeridas para la especie canina), como se ilustra en la Tabla 24.

Tabla 24. Diseño *in vivo* en bloque incompleto con n=4 final por grupo.

Grupos de animales	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Tratamientos fase I	(A) ABZ-LI	(B) RBZ-LI	(C) RBZ-HPMC	(D) RBZ-AC	(E) RBZ-GE	(F) RBZ-AA
Dosis única mg/kg PV	25	20	20	20	20	20
Tratamientos fase II	(D) RBZ-AC	(C) RBZ-HPMC	(A) ABZ-LI	(B) RBZ-LI	(F) RBZ-AA	(E) RBZ-GE
Dosis única mg/kg	20	20	25	20	20	20

G: grupo, ABZ: Albendazole, RBZ: Ricobendazole, LI: liberación inmediata, HPMC: Hidroxipropil Metil Celulosa, AC: Alcohol Cetílico. GE: Gelucire 50/02®, AA: Ácido Algínico. mg/kg PV: miligramos por kilo de peso vivo.

Muestras sanguíneas

Se extrajo sangre de los animales antes y después de la administración de las formulaciones. Las extracciones se realizaron de la vena cefálica antebraquial de los perros utilizando un catéter 18G a las 0 (previo), 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 y 48 hs post administración.

La sangre obtenida fue inmediatamente transferida a tubos heparinizados. El plasma se separó mediante centrifugación a 3000 g durante 15 minutos y almacenada en tubos plásticos debidamente rotulados a -20° C hasta su análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

Procedimientos analíticos

Las muestras de plasma blanco procedentes de perros libres de fármacos de tipo BZD fueron analizadas para comprobar la inexistencia de sustancias extrañas, para esto se realizaron extracciones con acetonitrilo, metanol HPLC y agua HPLC libre de impurezas (Mallinckrodt Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda).

A partir de diluciones de estándares de ABZ, ABZSO y ABZSO₂: 1/1000 – 1/100 – 1/10, se obtuvieron soluciones madre de (10 µg/mL). Dichas soluciones fueron mezcladas tomando 1 mL de la dilución de 100 µg/mL de cada una utilizando pipetas automáticas. Luego se adicionó 7 mL de Metanol.

Análisis de los metabolitos de ABZ

Proceso de extracción sólida.

Los metabolitos ABZSO y ABZSO₂ así como el OBZ utilizado como estándar interno, fueron extraídos de los plasmas (Sánchez Bruni *et al.*, 2002; Lanusse *et al.*, 1991), utilizando columnas C18 (carbono 18), (Strata Phenomenex, USA) descartables.

En este proceso se utilizó un sistema generador de vacío (Ashcroft, USA) con capacidad para 16 columnas de C18. Dichas columnas fueron acondicionadas siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se agregó 1 mL de metanol HPLC (Mallinckrodt Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda), aplicación de presión de vacío hasta cinco minutos.
- b. Se adicionó 1 mL de H₂O HPLC, aplicación de presión de vacío.
- c. Se agregó 0,5 mL de la muestra mediante pipeta Pasteur, aplicación de presión de vacío hasta su vaciado.
- d. Se aplicó una extensión de tiempo de vacío de cinco (5) minutos para lograr un buen secado y la retención de la muestra en el C18 de cada columna.

e. Se hizo elusión con 1,5 mL de metanol HPLC y recolección de la muestra en tubos de vidrio, debidamente rotulados colocados debajo de cada una de las columnas.

Las muestras fueron sometidas a evaporación con N₂ durante veinte (20) minutos a una temperatura de 45°C, para posterior reconstitución con 200 µL de fase móvil.

Análisis por HPLC:

Preparación de la fase móvil para Cromatógrafo

Composición de la fase móvil: acetato de amonio (buffer) y acetonitrilo (solvente).
Equipos necesarios: balanza de precisión, pHmetro, cuba con electrodo y agitador electrónico.

En la balanza de precisión se pesaron 1,93 g de acetato de amonio y 0,1 g de azida sódica (antifúngico); se agregó un litro de agua desionizada y se sometió a un agitador electrónico durante unos segundos. Luego se ajustó el pH de la solución utilizando HCl al 37% o NaOH al 5%, hasta lograr un valor adecuado de 6,6.

Se filtró la solución final mediante filtro de nylon para partículas de 0,45 µm. El buffer así obtenido se almacenó en frasco color caramelo para su protección contra la luz.

Procedimiento de Resuspensión y Recuperación

Los tubos de vidrio conteniendo la muestra sometida a evaporación con N₂, se resuspendieron con el agregado de 200 µL de acetonitrilo, mediante pipeta automática graduada en µL.

Las muestras experimentales (plasmas blancos y plasmas con BDZ), fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con detector

ultravioleta. Para ello se inyectaron cincuenta (50) μL de cada muestra previamente extraída y los analitos eluidos (flujo 1,2 mL/min) de la columna analítica (5 μm , 250 mm x 4,6 mm, columna C18), usando un método lineal de gradiente (Sánchez Bruni, 1996). La precisión del método (intra e interensayo) mostró un coeficiente de variación (CV) de 1,76 a 9%.

Los compuestos (ABZ, ABZSO, ABZSO₂ y OBZ) fueron identificados mediante los tiempos de retención según los estándares puros de referencia (ABZSO: 4¹⁵ min, ABZSO₂: 6¹³ min, OBZ 9⁴⁹ min y ABZ: 12²⁰ min). Las muestras de plasma blanco, indicaron el pico de retención correspondiente con el agregado de estándar OBZ (Figuras 28 y 29).

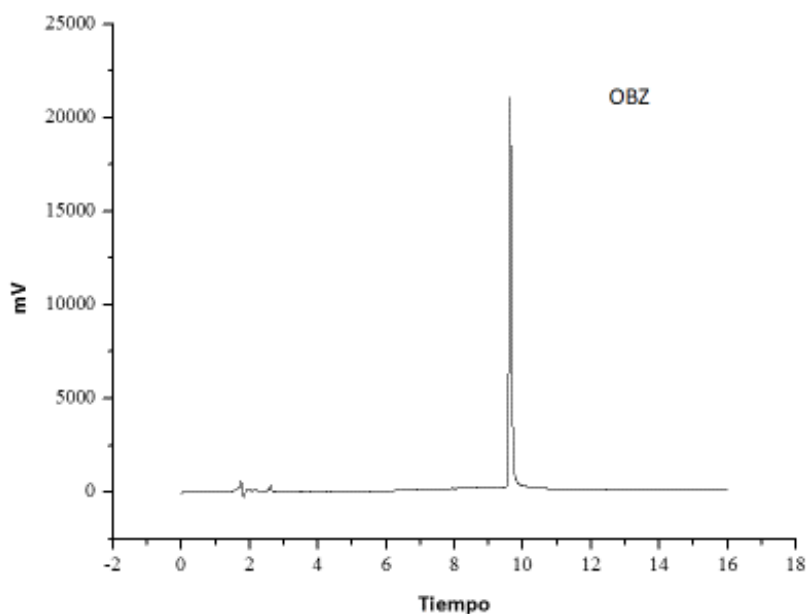


Figura 28. Pico de detección de OBZ en plasma blanco en el cromatograma

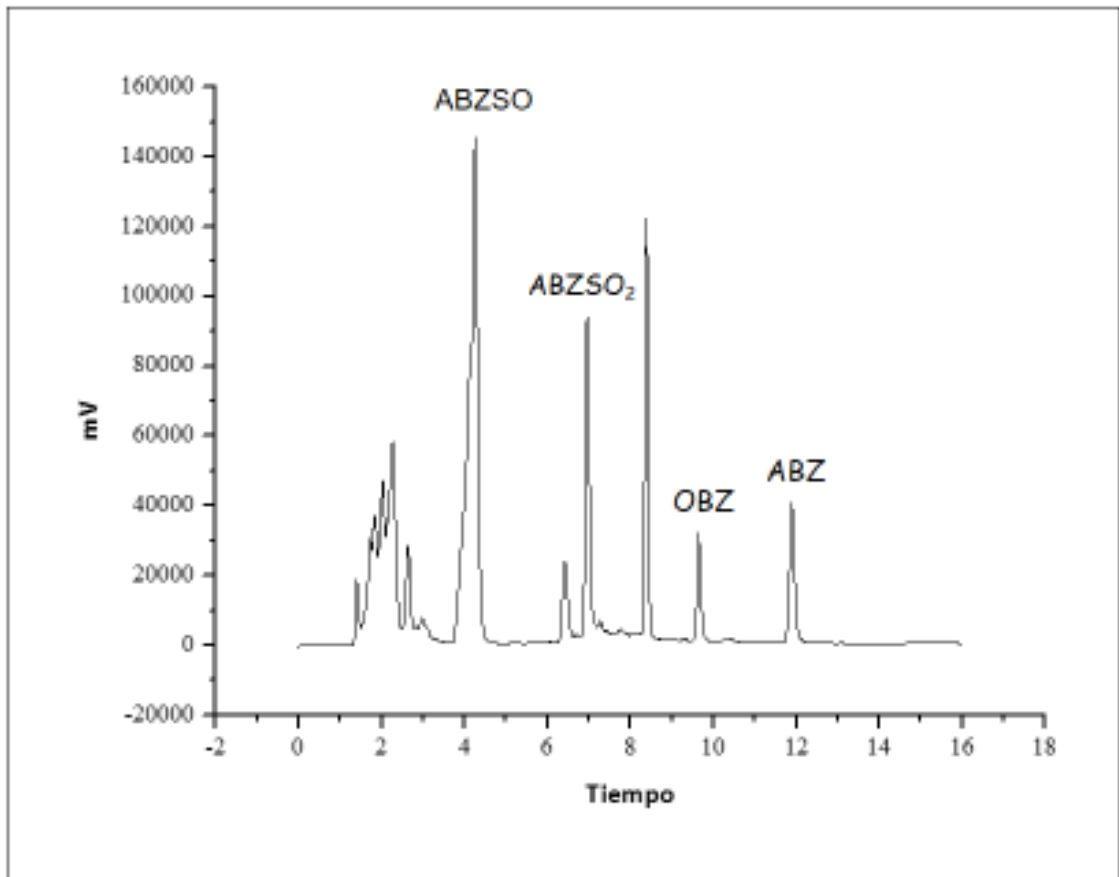


Figura 29. Curva calibración de plasma blanco fortificado 3 $\mu\text{g/ml}$ (ABZ, ABZSO, ABZSO₂ + estándar interno OBZ)

Las muestras experimentales detectaron picos de ABZ y sus analitos en los tiempos de retención estudiados en la validación del método experimental.

Las curvas de calibración para cada analito fueron construidas mediante análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados, lo cual estimó un coeficiente de correlación (r) entre 0.9987 y 0.9995.

Los límites de cuantificación (QL), fueron 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (ABZ y ABZSO) y 0.03 $\mu\text{g/mL}$ (ABZSO₂). Los porcentajes de recuperación o *recovery* fueron de 81%, 91% y 92% para ABZ, ABZSO y ABZSO₂ respectivamente.

Análisis Farmacocinético

Las curvas de concentración vs tiempo para los metabolitos ABZSO y ABZSO₂ en los plasmas de cada animal, fueron calculadas utilizando un software PK Solution 2.0 (Summit Research Services, OH, USA). La descripción de las curvas bioexponenciales de la concentración vs tiempo para los analitos ABZSO y ABZSO₂ luego del tratamiento vía oral, fueron calculadas mediante la siguiente ecuación (Notari, 1987).

$$C_p = B e^{-\lambda_2 t} - B e^{-\lambda_1 t}$$

Donde: C_p es la concentración en plasma en el tiempo t luego de la administración ($\mu\text{g/mL}$); B es la concentración en tiempo cero extrapolada desde la fase de eliminación ($\mu\text{g/mL}$); e es la base del logaritmo natural; λ_2 es el gradiente terminal (h^{-1}) y λ_1 es el gradiente obtenido por el ajuste el cual representa ya sea la constante de absorción de primer orden (λ_1) o la tasa constante de primer orden de formación del metabolito (λ_{for}) (h^{-1}). La vida media de eliminación ($t_{1/2\lambda_2}$) y absorción ($t_{1/2\lambda_1}$) o las vidas medias de formación de los metabolitos ($t_{1/2\lambda_{for}}$) fueron calculados como $\ln 2/\lambda_2$ y $\ln 2/\lambda_1$, respectivamente.

El pico de concentración C_{max} y T_{max} fue demostrado mediante el ploteo de las curvas de concentración vs tiempo para cada analito. El área bajo la curva (AUC) y el área bajo la curva primer momento (AUMC), fueron calculadas mediante la regla linear trapezoidal (Gibaldi & Perrier, 1982).

$$AUMC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i t_i + C_{i+1} t_{i+1}) + \frac{C_{last} \cdot t_{last}}{\lambda_z} + \frac{C_{last}}{\lambda_z^2}$$

El tiempo medio de residencia (TMR) fue determinado como $AUMC/AUC$.

Análisis estadístico

Las diferentes variables farmacocinéticas obtenidos de área bajo la curva (AUC), T_{max} y C_{max} para los analitos ABZSO y ABZSO₂, fueron comparados mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Análisis de los datos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de ABZSO y su metabolito inactivo ABZSO₂ luego de la administración oral de las seis diferentes formulaciones se ilustran en las tablas 25 y 26 respectivamente.

El fármaco madre ABZ de la formulación (A) no se detectó en plasma luego del tratamiento ensayado. La exposición plasmática de ABZSO, fue mayor cuando se la comparó estadísticamente con la obtenida por (A) ($p < 0,05$), tratamiento B: [AUC] +500% y C_{max} +487%; tratamiento C: [AUC] +600%, C_{max} 500%; tratamiento D: [AUC] + 330% y C_{max} 300%; tratamiento E: [AUC] +700% y C_{max} +350% y tratamiento F: [AUC] +350% y C_{max} + 250%. Los valores de AUC observados (0-LOQ) para los tratamientos B, C, D, E y F fueron del 99% y para el tratamiento A fue del 87% de los valores de AUC estimados luego de la extrapolación al infinito (0-∞). El estudio comparativo de AUC entre RBZ LI y las diferentes SLM (tratamientos C, D, E y F) no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$).

El tiempo de aparición del pico plasmático (T_{max}) para la formulación de RBZ-AC, mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) cuando se la comparó con los otros SLM.

Tabla 25. Parámetros farmacocinéticos (PK) comparativos para ABZSO luego de la administración oral de 6 formulaciones en perros

Parámetros PK	ABZSO Tratamiento A (ABZ LI)	ABZSO Tratamiento B (RBZ LI)	ABZSO Tratamiento C (RBZ-HPMC)	ABZSO Tratamiento D (RBZ-AC)	ABZSO Tratamiento E (RBZ-GE)	ABZSO Tratamiento F (RBZ-AA)
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	2.42 \pm 1.26 ^b	11.1 \pm 2.40 ^a	14.0 \pm 5.16 ^a	7.93 \pm 1.40 ^a	13.41 \pm 2.80 ^a	9.05 \pm 2.30 ^a
T_{max} (h)	5.34 \pm 2.54 ^b	4.00 \pm 0.00 ^a	3.50 \pm 1.00 ^a	6.50 \pm 3.00 ^b	4.50 \pm 2.50 ^a	2.55 \pm 1.00 ^a
$T_{1/2\lambda_1}$ (h)	2.15 \pm 1.32 ^b	5.25 \pm 0.88 ^a	6.15 \pm 0.91 ^a	5.39 \pm 0.77 ^a	5.50 \pm 0.25 ^a	7.12 \pm 0.75 ^a
$AUC_{(0-\infty)}$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	20.70 \pm 7.68 ^b	127 \pm 60.8 ^a	133 \pm 45.3 ^a	77.4 \pm 16.2 ^a	167 \pm 31.2 ^a	79.9 \pm 16.1 ^a
$T_{1/2\lambda_2}$ (h)	2.14 \pm 1.38 ^b	1.05 \pm 0.77 ^a	0.56 \pm 1.50 ^a	2.44 \pm 0.46 ^a	1.10 \pm 0.30 ^a	0.20 \pm 0.15 ^a
MRT (h)	8.24 \pm 3.46 ^a	9.23 \pm 0.35 ^a	7.65 \pm 1.68 ^a	9.33 \pm 0.92 ^a	9.10 \pm 0.86 ^a	8.74 \pm 1.32 ^a
PDP (h)	0.25 - 18	0.25 - 48	0.25 - 36	0.25 - 24	0.25 - 48	0.25 - 48

LI: liberación inmediata, HPMC: Hidroxipropil-metil-celulosa, AC: Alcohol Cetílico, GE: Gelucire®, AA: Ácido Algínico. Diferentes letras superinscriptas indican diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$). $T_{1/2\lambda_1}$, vida media de formación de metabolito; C_{max} , pico de concentración plasmática; T_{max} , tiempo en C_{max} ; $AUC_{(0-\infty)}$, área bajo la curva vs. el tiempo de la curva extrapolada al infinito; $AUC_{(0-t)}$ (LOQ), área bajo la curva observada desde 0 hasta el límite de cuantificación (LOQ); $T_{1/2\lambda_2}$: vida media de eliminación; MRT: tiempo media de residencia; PDP: período de detección plasmático.

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos (PK) comparativos para ABZSO₂ luego de la administración oral de 6 formulaciones en perros.

Parámetros PK	ABZSO₂ Tratamiento A (ABZ LI)	ABZSO₂ Tratamiento B (RBZ LI)	ABZSO₂ Tratamiento C (RBZ-HPMC)	ABZSO₂ Tratamiento D (RBZ-CA)	ABZSO₂ Tratamiento E (RBZ-GE)	ABZSO₂ Tratamiento F (RBZ-AA)
C_{max} (µg/mL)	0.42 ± 0.32 ^b	1.00 ± 0.41 ^a	0.93 ± 0.22 ^a	0.55 ± 0.41 ^a	1.00 ± 3.00 ^a	0.50 ± 0.20 ^a
T_{max} (h)	10.3 ± 3.47 ^a	14.0 ± 4.90 ^a	9.00 ± 3.83 ^a	12.0 ± 0.0 ^a	11.0 ± 1.70 ^a	1.00 ± 0.70 ^b
T ½ λ₁ (h)	2.74 ± 1.98 ^b	4.00 ± 1.75 ^b	8.46 ± 6.76 ^a	5.46 ± 1.23 ^a	12.6 ± 3.50 ^a	17.4 ± 4.90 ^a
AUC_(0-∞) µg.h/mL	4.10 ± 1.22 ^b	15.63 ± 9.67 ^a	16.10 ± 4.40 ^a	7.30 ± 3.93 ^a	15.48 ± 3.54 ^a	8.65 ± 2.98 ^a
T ½ λ₂ (h)	2.83 ± 2.05 ^a	3.00 ± 0.69 ^a	2.23 ± 0.59 ^a	10.5 ± 7.56 ^a	2.20 ± 0.80 ^a	0.40 ± 0.10 ^b
MRT (h)	11.7 ± 7.23 ^a	13.0 ± 2.94 ^a	16.1 ± 8.40 ^a	12.2 ± 0.88 ^a	18.0 ± 3.40 ^a	26.1 ± 7.70 ^a
PDP (h)	1.0 - 18	0.25 - 48	0.25 - 36	0.25 - 24	0.25 - 48	0.25 - 48

LI: liberación inmediata, HPMC: Hidroxipropil-metil-celulosa, AC: Alcohol Cetílico, GE: Gelucire®, AA: Ácido Algínico. Diferentes letras superinscriptas indican diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$). T_½ λ₁, vida media de formación de metabolito; C_{max}, pico de concentración plasmática; T_{max}, tiempo en C_{max}; AUC_(0-∞), área bajo la curva vs. el tiempo de la curva extrapolada al infinito; AUC_(0-t) (LOQ), área bajo la curva observada desde 0 hasta el límite de cuantificación (LOQ); T ½ λ₂: vida media de eliminación; MRT: tiempo media de residencia; PDP: período de detección plasmático.

La comparación de las curvas PK luego de la administración oral de las formulaciones de ABZ y RBZ de liberación inmediata, con tres diferentes excipientes formadores de matriz formulados con formulaciones de RBZ SLM se ilustran en las Figura 30 (RBZ-AA), Figura 31 (RBZ-HPMC), Figura 32 (RBZ- AC) y Figura 33 (RBZ-GE 50/02®).

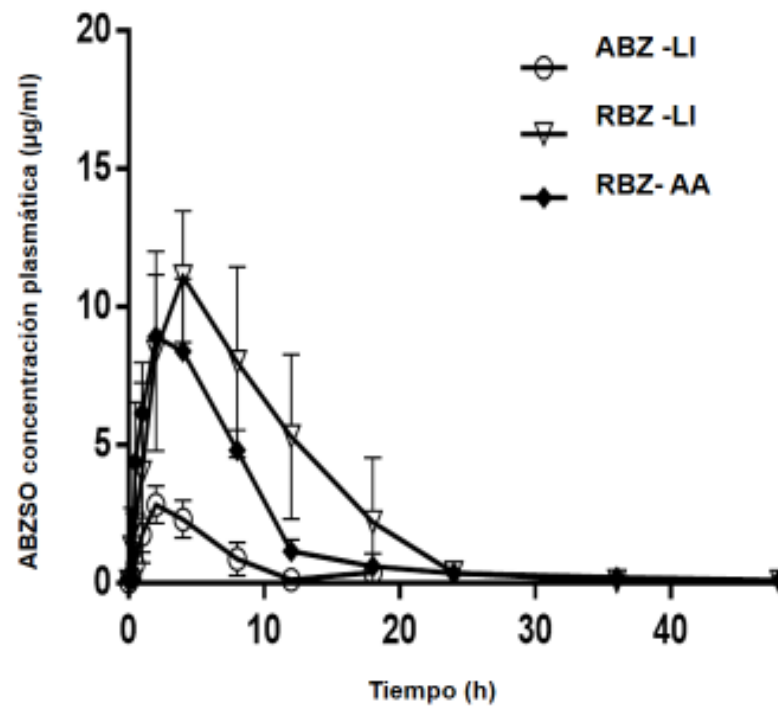


Figura 30. Perfiles comparativos plasmáticos (media \pm DS) para ABZSO (RBZ) luego de las administraciones por vía oral de una formulación en base a ABZ LI (25 mg/kg), una formulación en base a RBZ LI (20 mg/kg) y una formulación en base a RBZ SLM con AA (20mg/kg).

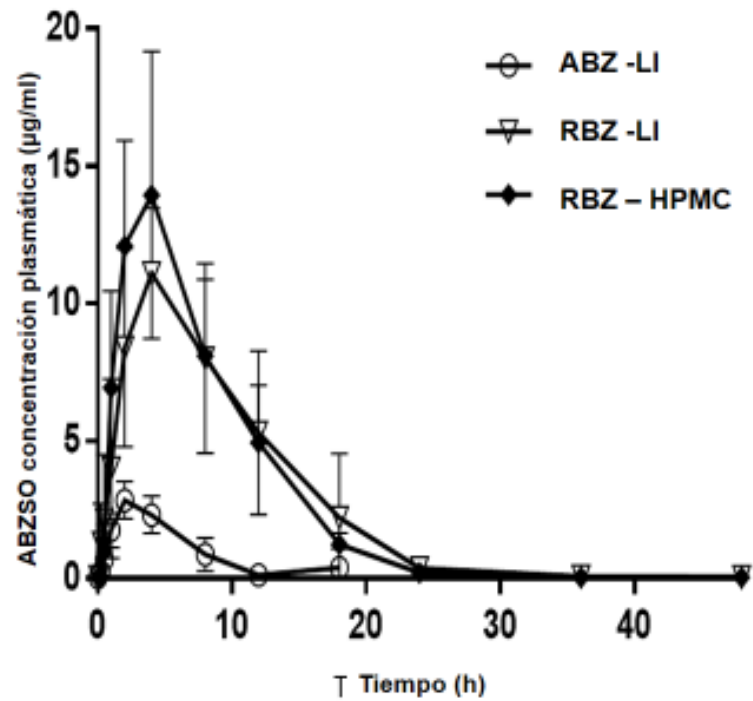


Figura 31. Perfiles comparativos plasmáticos (media \pm DS) para ABZSO (RBZ) luego de las administraciones por vía oral de una formulación en base a ABZ LI (25 mg/kg), una formulación en base a RBZ LI (20 mg/kg) y una formulación en base a RBZ SLM con HPMC (20mg/kg).

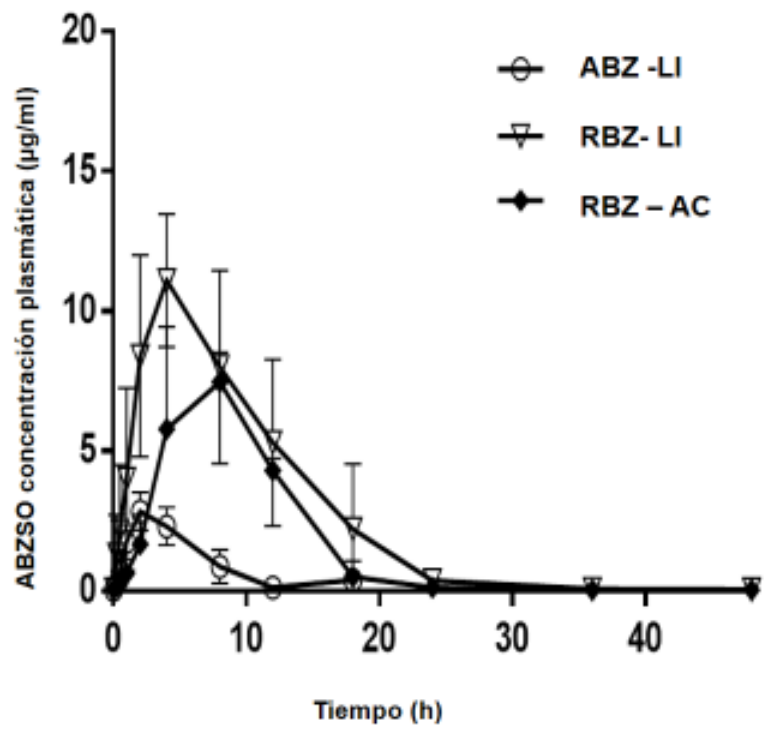


Figura 32. Perfiles comparativos plasmáticos (media \pm DS) para ABZSO (RBZ) luego de las administraciones por vía oral de una formulación en base a ABZ LI (25 mg/kg), una formulación en base a RBZ LI (20 mg/kg) y una formulación en base a RBZ SLM con AC (20mg/kg).

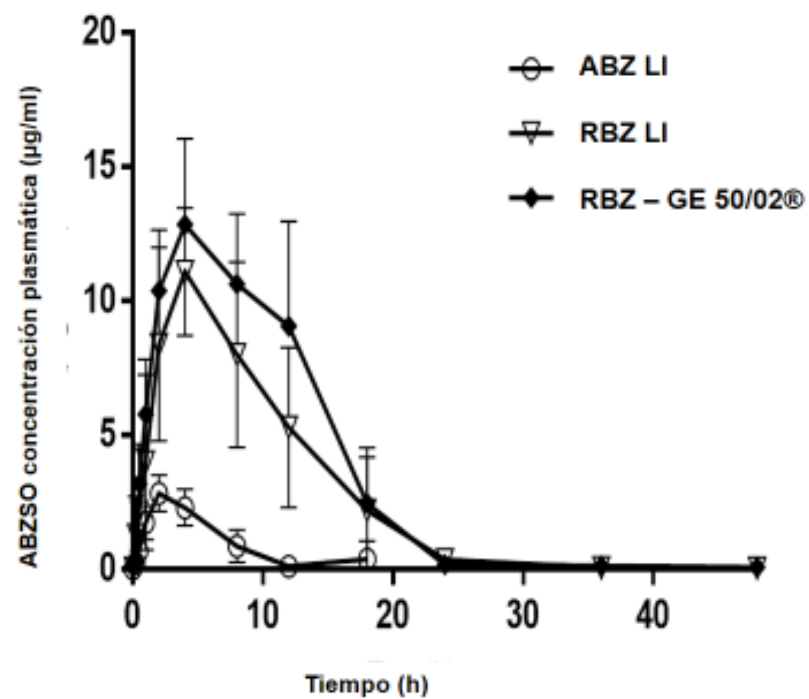


Figura 33. Perfiles comparativos plasmáticos (media \pm DS) para ABZSO (RBZ) luego de las administraciones por vía oral de una formulación en base a ABZ LI (25 mg/kg), una formulación en base a RBZ LI (20 mg/kg) y una formulación en base a RBZ SLM con GE 50/02[®] (20mg/kg).

Conclusiones parciales

El primer objetivo específico de la presente Tesis Doctoral, se cumplió con el desarrollo del Estudio Experimental III. Se hizo una evaluación PK *in vivo* en perros sanos, libres de parásitos GI, de todas las formulaciones experimentales, que fueron diseñadas, caracterizadas y seleccionadas para sus escalado *in vitro* en los Estudios Experimentales I y II.

La molécula RBZ pudo ser formulada con diferentes sistemas matriciales reguladores de la liberación, con las cuales se presumió que podrían liberar el principio activo en forma controlada durante un tiempo determinado, en los animales participantes del ensayo.

Sin embargo, solo la formulación con AC, fue capaz de demostrar un comportamiento SLM *in vivo*, liberando el fármaco RBZ en un tiempo más prolongado que las otras formulaciones SLM experimentales. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la C_{max} y el AUC entre las demás formulaciones SLM y la formulación en base a RBZ control. Los tiempos de detección plasmática (PDP) de RBZ AC, fueron inferiores (24 h), que las demás formulaciones en base a RBZ (36 y 48 h).

ESTUDIO EXPERIMENTAL IV

Objetivo I

Comparar la eficacia clínica antiparasitaria entre una formulación SLM en base a RBZ con AC (única dosis), una formulación LI en base a RBZ (única dosis) y una formulación LI en base a ABZ (3 dosis *sid*), administradas por vía oral en perros naturalmente parasitados con nematodos GI.

Objetivo II

Comparar la eficacia clínica antiparasitaria entre 2 diferentes dosis (10 mg/kg y 20 mg/kg), de la formulación SLM en base a RBZ con AC, administradas por vía oral en perros naturalmente parasitados con nematodos GI.

Materiales y métodos

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a la normativa de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) (Jacobs et al., 1994) y siguió las normas y protocolos de Ética de la Comisión Honoraria e Experimentación Animal (CHEA) de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Animales

Se trabajó con perros (n=30) naturalmente parasitados con *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. procedentes de un refugio canino del Departamento de Canelones, Uruguay.

Los animales, estaban alojados en caniles individuales con piso de cemento y techo de lata, cada canil tenía además una superficie a cielo abierto. Todos los animales estaban quirúrgicamente esterilizados.

Los perros (18 machos y 12 hembras), eran de raza cruzada y sus edades estaban comprendidas entre 2 y 10 años y sus pesos promedios fueron de $25 \pm 5,5$ kg.

Todos los animales tenían acceso libre al agua y eran alimentados con comida de tipo balanceada.

Se recogió materia fecal de cada perro, desde el piso de su canil, el mismo día de la emisión y se analizó con un método tradicional de flotación (Willis,

1921) y se verificó la morfología de los huevos (Boch y Supperer, 1992; Thienpont et al., 1979).

Grupo experimentales

Los animales fueron distribuidos en forma aleatoria en 5 grupos (n = 6 cada uno). Los grupos fueron identificados de la siguiente manera: Grupo 1: control sin tratamiento, Grupo 2: ABZ LI, Grupo 3: RBZ LI, Grupo 4: RBZ LM¹, Grupo 5: RBZ LM². El valor de huevos por gramo (hpg) de materia fecal al día 0 (pre-tratamiento) en todos los perros, fue de un promedio de 537 hpg para *Ancylostoma caninum* (rango entre 2400 y 80 hpg) y de un promedio de 246 hpg para *Trichuris* sp. (rango entre 640 y 40 hpg).

La Tabla 27, muestra el diseño experimental y los valores de hpg al día 0 de todos los animales incluidos en el ensayo.

Formulaciones farmacológicas administradas

Las formulaciones en forma de comprimidos ranurados administradas por vía oral a los animales fueron: una formulación experimental en base a RBZ SLM con una matriz lipídica de AC, una formulación experimental en base a RBZ LI y una formulación comercial en base a ABZ LI (Prazibek[®], Vetcross – Registro en Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca N° A-840).

El diseño, formulación y evaluación farmacotécnica de todas las formulaciones experimentales en base a RBZ usadas en este trabajo (Estudios Experimentales I y II), se hizo en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, UNITEFA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Dib et al., 2015).

Administración de las formulaciones y toma de muestras fecales post-administración

Los perros positivos incluidos en este trabajo, fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previo a la administración de los tratamientos farmacológicos.

Se tomó materia fecal de cada perro, el mismo día de su emisión desde el piso de su canil a los días 1, 2, 3, 7, 14 y 30, post-administración de la última dosis de cada formulación.

La toma de muestras se hizo en forma manual, con la protección de guantes descartables, se utilizó un guante diferente para cada animal. Cada muestra fecal, se guardó en heladera (4°C), en frascos debidamente rotulados hasta su análisis parasitológico.

Se utilizó la técnica de flotación de Willis (Willis, 1921) y la técnica McMaster (Thienpont, 1979).

El análisis de todas las muestras fecales, se realizó en el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Bioquímica sanguínea y hematológica

Se evaluó actividad enzimática (alanino amino transferasa ALT, aspartato aminotransferasa, AST y fosfatasa alcalina, ALP), a las 24 horas previas y a las 48 horas posteriores a la administración de la última dosis de cada formulación farmacológica. Para ello, se recolectaron muestras sanguíneas (5 ml), de la vena cefálica antebraquial de cada perro utilizando mariposa y jeringa 18G. La sangre extraída, se introdujo inmediatamente en tubos estériles BD Vacutainer® identificados para tal fin y se almacenó en heladera (4°C), hasta su posterior análisis.

El mismo, se realizó dentro de las 24 h posteriores a la extracción, en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se utilizó un equipo CB 350i (*Wiener Lab group*, Italia), mediante el método de acuerdo a la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

Eficacia clínica parasitológica

El test de reducción de conteo de huevos (TRCH), de cada especie de parásito en cada perro, fue determinado por la siguiente fórmula:

$$\text{TRCH} = \frac{\text{hpg (día 0 antes de tratamiento)} - \text{hpg (día i luego de tratamiento)}}{\text{hpg (día 0 antes de tratamiento)}} \times 100$$

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

Análisis estadístico

Se utilizó el test t ($p < 0,05$), para muestras pareadas para evaluar la eficacia clínica de RBZ LM en dos dosis diferentes (10 mg/kg y 20 mg/kg), dado que se midieron los valores de hpg y TRCH de cada grupo de perros a diferentes tiempos, comparándolos con los respectivos valores de hpg al día 0.

Se usó el test de Kruskal-Wallis – Test posthoc: Mann-Whitney ($p < 0,05$), para comparar las eficacias clínicas entre las diferentes formulaciones utilizadas, ya que los diferentes grupos de perros, que fueron seleccionados aleatoriamente, presentaron contajes muy dispares mostrando alta heterogeneidad.

Se utilizó el test t ($p < 0,05$) para muestras pareadas para evaluar la significancia estadística entre los valores de la bioquímica sanguínea previo y post administración de las formulaciones para cada animal.

Todos los datos estadísticos, se examinaron utilizando el software gratuito Past 3.07 (Hammer et al., 2001).

Tabla 27. Diseño experimental. Identificación de los grupos de perros (n=6) y recuento de hpg para *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. al día cero de cada animal.

Especies parásitas	Grupo 1: control s/t	hpg día 0	Grupo 2: ABZ LI 25 mg/kg (3 dosis sid)	hpg día 0	Grupo 3: RBZ LI única dosis (20 mg/kg)	hpg día 0	Grupo 4: RBZ LM¹ única dosis (10 mg/kg)	hpg día 0	Grupo 5: RBZ LM² única dosis (20 mg/kg)	hpg día 0
<i>Ancylostoma caninum</i>	1	760	7	80	13	720	19	80	25	2400
<i>Ancylostoma caninum</i>	2	320	8	1200	14	200	20	1200	26	880
<i>Ancylostoma caninum</i>	3	840	9	160	15	520	21	160	27	400
<i>Ancylostoma caninum</i>	4	80	10	320	16	320	22	320	28	2000
<i>Ancylostoma caninum</i>	5	160	11	120	17	360	23	120	29	800
<i>Ancylostoma caninum</i>	6	120	12	320	18	720	24	320	30	120
<i>Trichuris sp</i>	1	40	7	240	13	400	19	240	25	200
<i>Trichuris sp</i>	2	520	8	80	14	240	20	80	26	240
<i>Trichuris sp</i>	3	120	9	240	15	640	21	240	27	200
<i>Trichuris sp</i>	4	240	10	280	16	560	22	280	28	560
<i>Trichuris sp</i>	5	200	11	80	17	280	23	80	29	320
<i>Trichuris sp</i>	6	80	12	120	18	200	24	160	30	240

ABZ LI: Albendazole liberación inmediata, RBZ LI: Ricobendazole liberación inmediata, RBZ LM: Ricobendazole liberación modificada, (las diferentes letras superinscriptas, indican las dosis de RBZ LM), sid: una administración cada 24 hs, hpg: huevos por gramo, s/t: sin tratamiento.

Resultados

Las Tablas 28, 29 y 30, muestran los recuentos de hpg (media y rango) y TRCH para *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. al día cero previo a la administración y a los días 1, 2, 3, 7 y 30 post-administración de las diferentes formulaciones, a los distintos grupos de perros de la población de estudio, así como su significancia estadística (límites de confianza del 95%), mediante el test t ($p < 0,05$).

Los recuentos de hpg, fueron negativos al día 2 post tratamiento para las formulaciones en base a RBZ LM (10 mg/kg y 20 mg/kg). Sin embargo, se observó una TRCH de 90% y 97% para *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. respectivamente al día 30 post administración de la formulación en base a RBZ LM administrada a 10 mg/kg (Tabla 28).

En referencia a la formulación comercial de ABZ, se observó una eficacia antiparasitaria del 100% para *Ancylostoma caninum* desde el día 1 hasta el día 7 post-administración, sin embargo a los días 14 y 30 la eficacia antiparasitaria, disminuyó a 87% y 75% respectivamente. El TRCH para *Trichuris* sp, no superó el 56% durante todo el ensayo experimental (Tabla 29).

La formulación RBZ LI (20 mg/kg), demostró una efectividad del 100% al día 1 post-administración, la cual se mantuvo durante todo el ensayo (Tabla 30). Las Tablas 31 y 32, comparan los TRCH de las diferentes formulaciones administradas a los perros participantes en el ensayo, contra *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. respectivamente, así como su significancia estadística ($p < 0,05$).

La Tabla 33, muestra la comparación estadística mediante el test t ($p < 0,05$), entre la media de los valores de enzimas hepáticas (FAS, ALT y AST), medidos en todos los perros de la población, a las 24 horas pre-administración y a las 48 horas post administración de todas las formulaciones farmacéuticas. No se observaron diferencias estadísticas en los tiempos estudiados.

Los animales no presentaron reacciones adversas o signos de toxicidad a las dosis utilizadas, la constitución de los comprimidos demostró ser fácilmente fraccionable para administrar dichas dosis. Ningún animal presentó dificultades para ingerir los comprimidos ni tampoco se produjo regurgitación.

Tabla 28. Recuento de huevos por gramo (hpg) (media y rango) y test de reducción (TRCH) para *Ancylostoma caninum* y *Trichuris sp*, al día 0 previo a la administración oral y a los días 1, 2, 3, 7, 14 y 30 post-administración de una formulación experimental en base a Ricobendazole (200 mg totales) de liberación modificada (LM) a la dosis única de 10 mg/kg y 20 mg/kg en dos grupos de perros (n =6 cada uno).

Parásito	Dosis	Día 0	Día 1	Día 2		Día 3		Día 7		Día 14		Día 30		
		\bar{x} hpg (Li-Ls)	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH
<i>Ancylostoma caninum</i>	10 mg/kg	366 (1200 - 80)	66* (0 - 200)	79	0	100	0	100	0	100	0	100	20* (0 - 40)	90
		<i>Trichuris sp</i>	180 (280-80)	40* (0-80)	87	0	100	0	100	0	100	0	100	6* (0 - 40)
20 mg/kg														
<i>Ancylostoma caninum</i>		1100 (2400 - 120)	160* (40 - 400)	72	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
<i>Trichuris sp</i>		293 (560-200)	93* (240 - 40)	86	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100

\bar{x} media; rango: (Li: límite inferior, Ls: límite superior). TRCH: test de reducción de conteo de huevos = \bar{x} día 0 - \bar{x} día i / \bar{x} día 0 x 100. Test t ($p < 0,05$), asterisco (*) indica presencia de huevos.

Tabla 29. Recuento de huevos por gramo (hpg) (media y rango) y test de reducción (TRCH) para (*Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp), al día 0 previo a la administración oral y a los días 1, 2, 3, 7, 14 y 30 post-administración de una formulación comercial en base a Albendazole de liberación inmediata (LI) (Prazibek®, Vetcross) (300 mg totales) a la dosis 25 mg/kg en 3 dosis consecutivas (sid) a un grupo de perros (n =6).

Parásito	Dosis 25 mg/kg	Día 0	Día 1	Día 2		Día 3		Día 7		Día 14		Día 30		
		\bar{x} hpg (Li-Ls)	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH
<i>Ancylostoma caninum</i>		193 (120-320)	0	100	0	100	0	100	0	100	20* (0-40)	87	40* (40-40)	75
<i>Trichuris</i> sp.		180 (80-280)	73* (40-80)	51	60* (40-80)	56	66* (40-80)	54	66* (40-80)	55	66* (40-80)	55	66* (40-80)	55

\bar{x} media; rango: (Li: límite inferior, Ls: límite superior). TRCH: test de reducción de conteo de huevos = \bar{x} día 0 - \bar{x} día i / \bar{x} día 0 x 100.

Test t (p< 0,05), asterisco (*) indica presencia de huevos.

Tabla 30. Recuento de huevos por gramo (hpg) (media y rango) y test de reducción (TRCH) para (*Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp), al día 0 previo a la administración oral y a los días 1, 2, 3, 7, 14 y 30 post-administración de una formulación experimental en base a Ricobendazole de liberación inmediata (LI) (200 mg totales) a la dosis 20 mg/kg en dosis única a un grupo de perros (n =6).

Parásito	Dosis	Día 0		Día 1			Día 2		Día 3		Día 7		Día 14		Día 30	
		20 mg/kg	\bar{x} hpg (Li-Ls)	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	\bar{x} hpg (Li-Ls)	TRCH	
<i>Ancylostoma caninum</i>		473 (720-200)	13* (0-80)	98	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		
<i>Trichuris</i> sp.		386 (640-200)	13* (40-80)	97	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100		

\bar{x} : media; rango: (Li: límite inferior, Ls: límite superior). TRCH: test de reducción de conteo de huevos = \bar{x} día 0 - \bar{x} día i / \bar{x} día 0 x 100.

Test t (p< 0,05), asterisco (*) indica presencia de huevos.

Tabla 31. Comparación estadística (media y desvío estándar), de los valores del Test de Reducción de Conteo de Huevos (TRCH) de *Ancylostoma caninum*, entre las formulaciones en base a Albendazole y Ricobendazole administradas en forma oral a los perros de la población de estudio, mediante el test de Kruskal-Wallis - Test posthoc: Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Toma muestras fecales (días)	Grupo 2: ABZ LI (25 mg/kg)	Grupo 3: RBZ LI (20mg/kg)	Grupo 4: RBZ LM¹ (10 mg/kg)	Group 5: RBZ LM² (20 mg/kg)	P
1	100 ± 0,00	98 ± 0,02	79 ± 0,36*	72 ± 0,18*	0,0026
2	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,2350
3	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,2350
7	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,2350
14	87 ± 0,16*	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,0202
30	75 ± 0,10*	100 ± 0,00	90 ± 0,08	100 ± 0,00	0,0009

ABZ: Albendazole, RBZ: Ricobendazole, LI: liberación inmediata, LM: liberación modificada. * indican diferencias significativas entre grupos. Los números superinscriptos ^(1, 2) indican las diferentes dosis de RBZ LM.

Tabla 32. Comparación estadística (media y desvío estándar), de los valores del Test de Reducción de Conteo de Huevos (TRCH) de *Trichuris* sp. entre las formulaciones administradas en forma oral a los perros de la población de estudio, mediante el test de Kruskal-Wallis - Test posthoc: Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Toma muestras fecales (días)	Grupo 2: ABZ LI (25 mg/kg)	Grupo 3: RBZ LI (20mg/kg)	Grupo 4: RBZ LM¹ (10 mg/kg)	Group 5: RBZ LM² (20 mg/kg)	P
1	52 ± 0,45*	97 ± 0,06	87 ± 0,33	87 ± 0,18	0,0317
2	56 ± 0,26*	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,0492
3	54 ± 0,25*	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,0360
7	54 ± 0,25*	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,0359
14	54 ± 0,13*	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,0358
30	54 ± 0,13*	100 ± 0,00	97 ± 0,28	100 ± 0,00	0,0330

ABZ: Albendazole, RBZ: Ricobendazole, LI: liberación inmediata, LM: liberación modificada, * indican diferencias significativas entre grupos. Los números superinscriptos ^(1, 2) indican las diferentes dosis de RBZ LM.

Tabla 33. Evaluación estadística de los valores de enzimas hepáticas (media y desvío estándar), previa y post-administración de las formulaciones en base a Ricobendazole y Albendazole a todos los perros de la población de estudio, mediante el test t ($p < 0,05$).

<i>Enzimas hepáticas</i>	\bar{x} valores previo administración (24h)	\bar{x} valores post-administración (48 h)	<i>p</i>
<i>FAS</i>	135,9 ± 52,5	121,3 ± 42	0,3281
<i>ALT</i>	44,6 ± 22,8	39,1 ± 11,1	0,3137
<i>AST</i>	32,8 ± 12,9	33,5 ± 9,3	0,8481

FAS: fosfatasa alcalina sérica, ALT: alanino aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, \bar{x} : media.

Conclusiones parciales

La formulación experimental en base a RBZ LM con AC utilizada en este Estudio Experimental, fue la que exhibió el mejor perfil PK como SLM *in vivo*, cuando fue comparada con las otras formulaciones en base a RBZ SLM testadas por Dib et al., (2015). En ese trabajo, se demostró que el tiempo de aparición del pico plasmático (T_{max}) de dicha formulación, fue mayor que el de otras formulaciones experimentales testadas en base a RBZ LM y RBZ LI.

En el presente estudio, se evidenció que ambas dosis (10 mg/kg y 20 mg/kg) de la formulación RBZ LM con AC, alcanzaron un TRCH del 100% contra *Ancylostoma caninum* y del 96% contra *Trichuris* sp. al día 2 post-administración, mientras que la formulación en base a RBZ LI, obtuvo un TRCH cercano al 100% contra ambos parásitos GI al día 1 post-administración (Dib et al., 2016).

Este resultado, sugirió que la matriz lipídica con AC de la formulación experimental en base a RBZ LM, pudo demorar en 24 h la aparición de la máxima eficacia clínica antiparasitaria observada, tanto luego de la administración de la dosis completa convencional (20 mg/kg), como luego de la administración de la mitad (10 mg/kg) de dicha dosis, lo cual no se consideró una desventaja desde el punto de vista clínico.

Los valores de TRCH observados contra *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. luego de la administración de la mitad de la dosis convencional (10 m/kg) de RBZ LM, podrían suponer que esa dosis redundaría en una mejora del margen de seguridad de la molécula RBZ. Sin embargo, harían falta evaluaciones PK de la molécula *in vivo* en perros tratados con esa dosis.

Además serían necesarios realizar ensayos donde se evalúen los niveles de toxicidad aguda de RBZ en animales de experimentación, administrado por vía oral u otras vías de administración.

DISCUSIÓN GENERAL

La línea de investigación que incluye la presente Tesis Doctoral, está vinculada al estudio de los procesos biofarmacéuticos y PK de diferentes formulaciones de BZD, en particular de formulaciones SLM en base al metabolito activo de ABZ para administración oral en perros. Los antecedentes, se incluyen en mi Tesis de Maestría, donde se estudiaron los perfiles PK plasmáticos comparativos de tres diferentes formulaciones de ABZ en caninos (Dib et al., 2011).

Para continuar con esta línea de investigación, fue necesario integrar un equipo multidisciplinario que englobase el conocimiento de la tecnología farmacéutica, Biofarmacia, la Farmacología y la Parasitología veterinaria, por tanto fue crucial el trabajo conjunto con otros investigadores. En esta Tesis Doctoral, se planteó estudiar la influencia de diferentes excipientes reguladores de la liberación, en nuevas formulaciones SLM en base a RBZ en forma de comprimidos, para administración oral en caninos y valorar además esa influencia en la eficacia clínica antiparasitaria en dicha especie. Para esto, se diseñaron, formularon y caracterizaron nuevas formulaciones en base a dicha molécula.

La base del estudio radica en que los efectos farmacológicos de un fármaco, se pueden observar generalmente en un corto plazo luego de su administración. Sin embargo, entre la administración del fármaco y la aparición del efecto farmacológico esperado, el mismo debe atravesar en forma lenta o rápida, según el caso, diversas barreras biológicas, dependiendo de las propiedades físico-químicas de la molécula y de la naturaleza de las mencionadas barreras (Lanusse & Prichard, 1993).

Es imprescindible que un fármaco contenido en un medicamento, luego de administrado a un organismo, se libere de sus excipientes para lograr una buena absorción y por ende una adecuada biodisponibilidad plasmática. En el caso de los BZD, es muy importante que éstos sufran un proceso de disolución en el estómago, para que se pueda producir su liberación y absorción en la

primera porción duodenal. Es evidente que estos fármacos, necesitan de un tiempo de permanencia suficiente en contacto con los fluidos GI, para lograr dicha disolución. En definitiva, la tasa de disolución de los antihelmínticos BZD en el estómago de cualquier especie animal, es extremadamente importante para alcanzar una adecuada absorción, una consecuente biodisponibilidad y finalmente una elevada eficacia clínica (Lanusse & Prichard, 1993). Sin embargo, la baja solubilidad acuosa de los BZD, puede limitar su absorción durante su tránsito GI (McKellar et al., 1990; McKellar et al., 1993), lo cual se dificulta aún más en la especie canina, dado su corto tracto GI comparado con el de otras especies domésticas (McKellar et al., 1993).

En medicina veterinaria, los BZD están formulados como sistemas de liberación convencional o LI. En líneas generales, se sabe que en estos sistemas, los niveles de concentración plasmática de un principio activo, alcanzan un máximo y luego progresivamente decrecen hasta concentraciones sub-terapéuticas hasta que una nueva dosis sea administrada. Además, si las concentraciones máximas y mínimas del fármaco, se localizan por encima del nivel de toxicidad o por debajo del nivel mínimo efectivo, se pueden suceder alternativamente períodos de toxicidad e ineffectividad, por tanto, la concentración del fármaco en plasma (o sitio de acción), fluctúa entre dosis y dosis, por lo que se hace imposible mantener una concentración terapéutica constante (Ashford, 2002).

Los SLM están pensados para modular los períodos de liberación de un fármaco en forma pre-definida (Balamurali et al., 2011) y han sido utilizados en diversas formulaciones farmacéuticas, principalmente en medicina humana. En muchas formulaciones SLM, el fármaco es introducido en un transportador que puede ser un polímero. Estos sistemas poliméricos, tienen la ventaja de mantener la concentración del principio activo entre los niveles de toxicidad e ineffectividad a partir de una dosis única y luego liberarla de manera continua durante un período determinado de tiempo. Entonces, la tasa de liberación de dicho principio activo, está controlada por las propiedades del polímero (Juárez & Villafuerte, 2011; Tonnesen & Karlsen, 2002).

En medicina veterinaria la administración de un fármaco a dosis única o SLM (antimicrobianos y antiparasitarios), ha sido un objetivo comercial muy importante para las empresas farmacéuticas en los últimos años, principalmente en el sector de producción animal, ya que minimizan el número de manipulaciones que impone la duración del tratamiento (Alonso, 2010). Sin embargo, en pequeños animales, la investigación sobre nuevas formulaciones SLM de productos zoterápicos, es relativamente nueva. Ruiz et al., (2015), estudiaron el comportamiento PK de una formulación de Doxiciclina en perros, demostrando que no hubo diferencias significativas en su perfil comparado con una formulación LI.

La investigación sobre formulaciones SLM en base a BZD, en particular ABZ, para mejorar su comportamiento *in vitro-in vivo*, es muy interesante. Castro et al., (2013), demostraron como la biodisponibilidad de ABZ formulado como dispersión sólida con Poloxamer-188, optimiza su biodisponibilidad plasmática en perros, cuando se le compara con una formulación LI. Mansuri et al., (2016), estudiaron una nueva formulación matricial liofilizada mucoadhesiva en base a ABZ en forma de comprimidos, para administración en medicina humana. En ese trabajo, se demuestra como la incorporación de nuevos excipientes, impacta positivamente en la vida media de ABZ. Paredes (2016), como una estrategia para optimizar la biodisponibilidad de la molécula, diseña y caracteriza nuevas formulaciones en base a ABZ en forma de nanocristales.

En el Estudio Experimental I de la presente Tesis Doctoral, fue necesario diseñar y formular una formulación en base a RBZ LI, para utilizarla como formulación control en los estudios *in vivo* en la especie destino. El objetivo de lograr esta formulación, fue que la formulación comercial LI (APTOMAX[®], Laboratorios AFFORD, Argentina), que existe en el mercado veterinario de la República Argentina al momento de la realización del Estudio, no cumplía con el comportamiento farmacocinético esperado para la molécula y reportado por Dib et al., (2011). Por tanto, no era posible utilizar esa preparación comercial como formulación control. Entonces, se decidió y se logró con éxito, diseñar y formular una preparación en base a RBZ LI, que fue utilizada con

dichos fines en todos los Estudios Experimentales realizados en la presente Tesis Doctoral.

El Estudio Experimental II, constó de 5 experimentos que tuvieron como objetivo diseñar, formular y caracterizar formulaciones en base a RBZ con un comportamiento de liberación SLM. Se utilizaron diferentes excipientes formadores de matriz, tanto hidrofílicos como lipídicos. Las matrices hidrofílicas, estuvieron conformadas por HPMC y AA y las matrices lipídicas, por GE 50/02[®] y AC.

Todas las formulaciones SLM diseñadas fueron exitosas y de cada matriz utilizada, se seleccionaron aquellas formulaciones que demostraron características farmacotécnicas y biofarmacéuticas *in vitro* acorde a SLM, para su escalado y posterior valoración PK *in vivo* en los perros. Cabe destacar, que es complejo unificar la formulación de matrices cuando los materiales formadores de matriz utilizados, presentan propiedades muy diferentes. Por un lado, los polímeros (hidrofílicos), se comportan de un modo notoriamente diferente a los lípidos y entre estos últimos dependiendo de algunos factores, las diferencias son relativamente importantes. Teniendo en cuenta además que el objetivo central de este trabajo, era correlacionar patrones *in vitro* con hallazgos *in vivo* en caninos, las diferentes formulaciones fueron ajustadas farmacotécnicamente para poder disponer de al menos un sistema evaluable sin homogeneizar variables entre los experimentos, tales como métodos de compresión, uso de acanalantes, surfactantes o rellenos.

En las formulaciones donde se incluyó la formulación con HPMC, en todos los casos se correlacionó con un efecto de regulación de la liberación del principio activo, sin llegar a un comportamiento SLM propiamente dicho, dado que se produjo una desintegración completa de la matriz en todas las formulaciones ensayadas. Por otra parte, se observó que la diferencia en la fuerza de compresión, influyó negativamente en los perfiles de disolución de las 3 primeras formulaciones, dada la flotabilidad observada de los comprimidos en el medio, durante los ensayos de disolución.

A menor fuerza de compresión (1000 kg), se produjo flotación de los compactos, por tanto esas formulaciones no se pudieron seleccionar para su escalado. La compresión de las matrices a una fuerza superior (2000 kg), fue seleccionada para aplicarse a las siguientes formulaciones (P4, P5, P6 y P7) de este Experimento. También se pudo observar que las variaciones de la proporción porcentual de HPMC en las mezclas de las formulaciones, influyó positivamente en los porcentajes de fármaco liberado; a concentraciones menores del polímero, fueron mayores los porcentajes de disolución en función del tiempo. Aunque no se observaron diferencias entre las formulaciones P6 y P7, la formulación P6, fue finalmente seleccionada para su escalado y su valoración PK *in vivo* en perros.

Como ya se ha comentado, la solubilidad de los fármacos, es un factor muy importante dado que su alta o baja solubilidad puede afectar las características del gel formado en una matriz con HPMC y por ende la liberación del principio activo. Ford et al., (1985), estudiaron la liberación de principios activos altamente solubles (prometazina, aminofilina y propanolol) y un fármaco pobremente soluble (indometacina), formulados en matrices con HPMC. Para la indometacina, tanto el grado de viscosidad de HPMC y el tamaño de la partícula del fármaco, contribuyeron a controlar la liberación del fármaco. Esto fue debido al mecanismo de erosión de la capa de gel que fue el factor dominante. Ghori et al., (2014), reportó similares observaciones.

Por otro lado, se estudió la influencia de un excipiente formador de matriz de tipo hidrofílico con AA, el cual está categorizado como un agente modificador de la liberación, estabilizante, desintegrante y que aumenta la viscosidad (Rowe et al., 2009). Las formulaciones SLM diseñadas con dicho excipiente, liberaron el principio activo de manera acorde a un perfil de liberación de tipo LI. Por tanto, se observó un comportamiento similar al demostrado por las matrices poliméricas con HPMC del Experimento 1.

Cuando se compararon los valores de disolución referidos a las formulaciones con matriz hidrofílica (HPMC y AA), se observó la casi completa disolución del principio activo a las 8 horas en todas las formulaciones ensayadas. Sin embargo otros autores, (Ramírez-Rigo et al., 2006), estudiando y

caracterizando las propiedades de liberación de diferentes fármacos (atenolol, metoclopramida y propranolol), en matrices con AA observaron una liberación de orden cero muy marcada, tanto en agua como en solución buffer de pH 6,8. Este perfil de liberación observado bajo diferentes condiciones, fue consecuencia de un equilibrio entre la expansión y la erosión de la capa de hidrogel formada por los excipientes y que resultó en un área constante de la matriz con el medio de disolución que la rodeaba.

Zahoor et al., (2005) y Möbus et al., (2012), validan al AA como un material altamente atractivo para aumentar el tiempo de residencia de una formulación en el sitio de absorción, influenciando la liberación del/los principio/s activo/s. Ceschan et al., (2014), desarrollando una nueva formulación utilizando AA para administración de Atenolol (agente antihipertensivo), en forma inhalatoria en seres humanos, concluyen que el fármaco incrementa su tiempo de residencia, debido a las propiedades mucoadhesivas de las cadenas poliméricas de AA utilizadas como polielectrolito aniónico.

Aunque los perfiles obtenidos en esta Tesis Doctoral, mostraron en contraste con esos trabajos, ausencia de modulación de la liberación del principio activo, se seleccionó la formulación (A2), para su escalado y valoración PK *in vivo* en perros.

En el Experimento 3 del Estudio Experimental II, se utilizó el AC como excipiente formador de matriz lipídica. Se presentaron algunas dificultades a la hora de someter las mezclas de los polvos a los procesos de granulación debido a la naturaleza de este tipo de excipiente, el cual conspira en general contra los procesos de mezclado, flujo y compresión. Las formulaciones L1 y L2, fueron las representantes de ese problema, dado que presentaron malas propiedades de flujo y pegado a los punzones de la comprimidora, lo cual no se consiguió mejorar con el agregado de otros excipientes. La variación de las proporciones de los excipientes principales (Lactosa y AC), dio como resultado una granulación adecuada, pudiendo finalmente seleccionar a las formulaciones L3 y L4, para realizar los ensayos de disolución, escalado y caracterización farmacotécnica de los compactos resultantes.

Fue interesante observar como la formulación L3, demostró un perfil de disolución más lento cuando se la comparó con L4 y por tanto fue la formulación seleccionada para el posterior estudio PK *in vivo*. Y en definitiva, fue esa formulación L3, que efectivamente tuvo un comportamiento como SLM en los estudios PK *in vivo* y en la valoración de la eficacia clínica antiparasitaria en perros naturalmente parasitados con nematodos GI como se detallará más adelante en esta Discusión.

En concordancia con este resultado, se puede citar a otros autores que también estudiaron la influencia de AC en la formulación de sistemas matriciales. Por ejemplo, Maheshwari et al., (2003), estudiaron formulaciones SLM con AC en base a Ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo de vida media corta y baja capacidad de compresibilidad y fluidez, observándose que la cantidad de AC en la formulación, afecta la liberación del fármaco en la formulación, registrándose un retardo significativo (9 h), en la liberación del principio activo. Castellanos et al., (2007), estudiaron como tres formas orales de liberación sostenida en base a propranolol, contenidos en matrices de AC en combinación con HPMC y otros excipientes, mantuvieron perfiles de disolución similares y estables durante 2 años de estudio.

Las formulaciones SLM en base a RBZ utilizando GE 50/02[®] como formador de matriz lipídica, dieron como resultado cinco formulaciones. Las 3 primeras, fueron descartadas antes de realizar sus correspondientes ensayos de disolución, debido a que las mezclas no fueron adecuadas para su compresión. Las proporciones de Gelucire 50/02[®] en las formulaciones G1 y G2, hicieron que la mezcla se pegara demasiado a los punzones de la comprimidora. Por tanto y para solucionar este inconveniente, se decidió adicionar Lactosa como material de relleno en diferentes proporciones a las restantes formulaciones (G3, G4 y G5), variando de esta manera y en forma concomitante las proporciones de Gelucire 50/02[®]. Sin embargo, en la formulación G3, las proporciones elegidas de GE y Lactosa, no fueron las adecuadas, resultando que la mezcla volviera a pegarse a los punzones de la comprimidora, por lo que hubo de ser descartada. Las formulaciones G4 y G5,

fueron preparadas con mayor proporción de Lactosa y menor proporción de Gelucire 50/02®, obteniendo finalmente formulaciones con buen flujo.

Dado los resultados obtenidos, se eligieron a las formulaciones G4 y G5 para su escalado y la formulación G5 fue seleccionada para su valoración PK *in vivo* en la especie destino.

Varios autores han estudiado el uso de GE como excipiente en formulaciones SLM. Dennis et al., (1990), en dos formulaciones matriciales semi-sólidas *in vitro-in vivo* en base a Ketoprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, para administración oral en la especie humana, utilizan una matriz con GE 50/13 en la primera formulación y en la segunda formulación, combinan GE 50/13 (75%) y GE 50/02 (25%). Esta última formulación logra una liberación prolongada de 22 h en los tests *in vitro-in vivo*. Este resultado podría sugerir que la combinación entre dos GE diferentes según su HLB, podría optimizar una liberación más lenta del principio activo, pero sin embargo las propiedades químicas del fármaco (hidrosolubilidad / liposolubilidad), podrían influir o no permitir la combinación de GE en la formulación. Sánchez Bruni et al., (2000), comparando la biodisponibilidad plasmática en perros de dos formulaciones farmacéuticas de dosificación oral (ABZ LI formulado en forma de comprimidos para uso en humanos y ABZ formulado en forma de cápsulas con GE 44/14), no encuentran un aumento en la biodisponibilidad de la formulación con GE 44/14 como era de esperarse, dado sus características de HLB.

Siepmann et al., (2006), estudiaron los mecanismos de liberación de formulaciones en forma de pellets en base a Teofilina en matrices lipídicas con GE 50/02®. En ese trabajo, se observó que las diferentes técnicas de elaboración de los pellets (extrusión- esferonización y solidificación-fusión), fueron determinantes en la forma de liberación del pa, siendo que la difusión desde la matriz predominó en las formas de pellets preparadas en forma de solidificación-fusión.

En una segunda etapa del desarrollo de formulaciones SLM, se pensó en trabajar con el concepto de comprimidos flotantes gastro-retentivos (Experimento 5). Aunque estas formulaciones, no se destinaron a estudios *in*

vivo en la presente Tesis Doctoral, se pudieron establecer conceptos importantes en relación a la molécula RBZ, cuando fue formulada como sistema gastro-retentivo flotante.

Este tipo de formulaciones, adquieren gran importancia debido a dos factores claves, el pequeño segmento de tracto GI disponible para la absorción que dispone el perro y la disolución del principio activo que debe ocurrir en estómago (McKellar et al., 1993). Por tanto, la gastro-retención de formulaciones con BDZ, podría ser un argumento tecnológico de alto impacto en esta especie.

La decisión de formular y caracterizar compactos gastro-retentivos flotantes en base a RBZ, se basó en diversas publicaciones científicas sobre formulaciones de diferentes fármacos, que se han preparado como sistemas gastro-retentivos flotantes en medicina humana (Hwang et al., 1998; Akbari et al., 2009; Shah et al., 2009; Bandari et al., 2010; Goindi et al., 2011; Sarangapani y Rajappan, 2012; Udayakumar & Vasudevan, 2012; Meka et al., 2013; Srikanth et al., 2013). De hecho, esos trabajos demuestran la flotabilidad de los compactos obtenidos mediante el uso de sulfato de bario ($BaSO_4$) como agente de contraste, radiografías en seres humanos (Özdemir et al., 2000; Kulkarni & Bhatia, 2010) y en especies animales, incluyendo el perro (Baumgartner et al., 2000). En un reciente trabajo, Patel et al., (2016), estudió con éxito la preparación y caracterización in vitro de Cefpodoxime (antimicrobiano), formulado como comprimido flotante gastro-retentivo no efervescente, utilizando Poloxamer 188 y celulosa microcristalina como excipientes principales. Obtuvo una flotación de mas de 12 h.

En este tipo de SLM, se debe arribar a una situación de compromiso entre una fuerza de compresión que garantice la formación de un compacto estable (baja friabilidad), pero con alta porosidad que aseguren el acceso del agua (u otro medio similar), para lograr la flotabilidad. Por consiguiente, para avanzar en este estudio, se diseñaron tres formulaciones (A, B y C), utilizando HPMC de media/baja viscosidad (HPMC k100) y alta viscosidad (HPMC k15). Este experimento, tuvo como objetivo lograr formulaciones que se mantuvieran flotando en el estómago del perro por tiempos superiores a las 12 hs, para así

optimizar la liberación prolongada de RBZ. Se pudo observar que la influencia de las fuerzas de compresión, fue crucial a la hora de que las formulaciones superaran los tests de flotación y de friabilidad. Las formulaciones diseñadas, se comprimieron a fuerzas de 200, 300 y 400 kg. Con referencia a la flotación, sólo las formulaciones sometidas a fuerzas de 200 y 300 kg, flotaron durante más de 12h en el medio de disolución. Las formulaciones sometidas a fuerzas de 400 kg, no superaron dicho test. Este hecho, se atribuyó a la disminución drástica de la porosidad de comprimido producida por la fuerza de compresión más alta.

La fuerza de compresión de 200 kg, no permitió la superación del test de friabilidad, dado que los compactos no mantuvieron su integridad durante el test, demostrando una desviación mayor al 1%. Solamente los compactos sometidos a la fuerza de compresión intermedia de 300 kg, superaron todos los controles farmacotécnicos, además de flotar por períodos superiores a las 12 h.

Es de destacar la flotabilidad de la formulación C2 durante 18 hs. Los ensayos de disolución demostraron que la formulación B2, presentó un perfil de liberación prolongado (~80% de fármaco disuelto a las 24 hs), sin embargo el quiebre que se observa a las 10 horas (Figura 24), podría relacionarse con una cierta desintegración de la matriz. Por otra parte, la formulación A2 presentó un perfil de disolución más lento y lineal que la formulación B2 (~60% en 24hs).

La formulación C2, no fue ensayada debido a que se previó una velocidad de disolución demasiado lenta debido a la alta viscosidad de HMPC K15 (tomando como referencia el caso de la formulación B2 con HPMC de baja viscosidad).

El objetivo del Estudio Experimental III, fue observar si los excipientes reguladores de la liberación, que habían mostrado diferentes perfiles SLM *in vitro*, podrían influir en el comportamiento PK plasmático *in vivo* de las formulaciones, una vez administradas a los animales por vía oral. En dicho Estudio, no se observaron diferencias significativas en el área bajo la curva

(AUC), entre las formulaciones SLM en base a RBZ y la formulación en base a RBZ LI. La biodisponibilidad del metabolito activo en las formulaciones SLM fue similar RBZ LI, a pesar de la presencia de los sistemas matriciales. Sin embargo, se pudo destacar que el tiempo (T_{max}) donde el pico plasmático (C_{max}), alcanzó su máxima concentración para la formulación en base a RBZ con AC, mostró un retraso significativo al compararlo con las otras formulaciones en base a RBZ SLM y RBZ LI, lo cual sugirió un comportamiento SLM *in vivo*, tal como se observó en su perfil *in vitro*. A su vez, destacó el tiempo menor de detección plasmático de 24 h de la formulación con AC, en contraste con los tiempos de detección de 36 y 48 hs, exhibidos por las demás formulaciones en base a RBZ. Dado los resultados observados en el comportamiento PK de la formulación con AC, la misma fue elegida para la evaluación de eficacia clínica antiparasitaria en los perros naturalmente parasitados con nematodos GI, para determinar si dicho comportamiento PK *in vivo* observado, tendría alguna influencia en dicha eficacia.

Se ha evaluado la eficacia antiparasitaria de los BZD en diferentes especies animales, (Hollenwegger et al., 1987; Campbell, 1990; Álvarez et al., 1999; Steffan et al., 2000; Saumell et al., 2004). La dosis terapéutica convencional del fármaco madre ABZ, por vía oral (25 mg kg cada 24hs) durante 3 a 5 días (Campbell, 1990), ha sido indicada en perros para alcanzar concentraciones plasmáticas estables de la droga, debido a su baja solubilidad y al corto tránsito GI de esta especie, a diferencia de los rumiantes, tal como ya ha sido mencionado. En los rumiantes, los BZD se administran en única dosis por vía oral, sufren un efecto reservorio a nivel ruminal, un atrapamiento iónico en el abomaso y un pasaje lento del principio activo al intestino, donde se producirá su absorción (Lanusse & Pritchard, 1993), lo cual impacta positivamente en la eficacia clínica contra especies parásitas del GI (Alvarez et al., 1999). En perros naturalmente parasitados con nematodos GI, se ha evaluado la eficacia antiparasitaria de ABZ en diferentes dosis. Hollenwegger et al., (1987), evaluaron la eficacia antiparasitaria de ABZ contra *Trichuris vulpis* y *Toxocara canis* a las dosis de 10, 20 y 30 mg/kg, obteniendo una eficacia del 100% contra ambas especies de parásitos a la dosis de 30 mg/kg.

En el Estudio Experimental IV de la presente Tesis Doctoral, la eficacia clínica antiparasitaria de la formulación comercial en base a ABZ LI fue del 100% al día 1 contra *Ancylostoma caninum*, la cual se mantuvo hasta el día 7, sin embargo se observó un recuento del 87%, al día 14 post administración de la última dosis, lo cual sugirió una reinfestación con esta especie de nematode en los perros que recibieron este tratamiento. Se observó una actividad moderada (TRCH: 56%) contra *Trichuris* sp. durante todo el ensayo, tal como lo reportado previamente por Campbell, (1990).

Dada la condición de mayor solubilidad acuosa que tiene el RBZ (0,062 mg/ml) y 0,9 mg/ml en solución buffer 0,1M HCl (Wu y col., 2005), comparado con ABZ, es de esperar que su administración en perros, sea en dosis inferiores que la del fármaco madre. Esta molécula se encuentra formulada en productos comerciales LI para perros, en forma de comprimidos de administración oral en única dosis (20 mg/kg), que contienen 200 mg totales de RBZ por cada comprimido. La indicación terapéutica del laboratorio de referencia (Laboratorio AFFORD, Argentina), es la de administrar un comprimido cada 10 kg PV, como se indica en su producto APTOMAX®, Argentina, el cual está registrado en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) de la República Argentina, con el número 04-133 (senasa.gov.ar). Saumell et al., (2006), evaluando la eficacia clínica parasitológica de dicho producto comercial en perros, lo administran a la dosis indicada de 20 mg/kg, registrando un recuento negativo de huevos de *Ancylostoma caninun* y *Trichuris* sp. al día 4 post-dosificación. Este resultado, puede estar vinculado al perfil de disolución de ese producto, tal como fue demostrado en Estudio Experimental 1 de esta Tesis.

En el estudio de la eficacia clínica antiparasitaria (Estudio Experimental IV), de la presente Tesis Doctoral, la formulación en base a RBZ SLM, formulada en una matriz lipídica con AC, sugirió un paralelismo entre el tiempo de aparición de la máxima eficacia clínica (100%), de esta formulación con el parámetro PK (T_{max}) observado *in vivo* en el Estudio Experimental III (Dib et al., 2016). Se evidenció que la matriz lipídica de la formulación SLM en base

a RBZ AC, moduló la liberación del principio activo RBZ, tanto luego de la administración de la dosis completa convencional (20 mg/kg), como luego de la administración de la mitad de dicha dosis (10 mg/kg), demorando la aparición del efecto antiparasitario esperado.

Se consideró interesante observar, que la elevada eficacia clínica antiparasitaria obtenida luego de la administración de la dosis de 10 mg/kg de la formulación con AC, podría estar relacionada con la potencia del principio activo, dado que aunque la cantidad de fármaco que llegó a los parásitos fue menor, igualmente se obtuvo una eficacia antiparasitaria comparable con la de la dosis sugerida convencional (20 mg/kg). Esto supuso que la molécula RBZ, podría tener una dosis efectiva mínima más baja que la dosis convencional. Sin embargo, esto deberá ser confirmado mediante la evaluación PK correspondiente con dicha dosis.

Es preciso destacar que Dib et al., (2011), reportan que una única dosis oral (20 mg/kg), de una formulación comercial (Afford, Argentina) en base a RBZ LI, alcanza una mayor (500%) biodisponibilidad plasmática, que una dosis convencional (25 mg/kg), de una formulación experimental en base a ABZ LI administrada también en única dosis. Por tanto, cabe considerar que la administración de la mitad de la dosis convencional de RBZ, podría mejorar el margen de seguridad para esta molécula, basado en su comportamiento PK.

Se ha estudiado que los medicamentos, pueden presentar reacciones adversas o tóxicas inesperadas, por lo que la farmacovigilancia continuada es necesaria una vez que los productos se registran para su comercialización (Batalha, 1997). Los perros utilizados en este Estudio Experimental, no presentaron signos de reacciones adversas o toxicidad en respuesta a las formulaciones en base a RBZ o a la formulación comercial en base a ABZ, a las dosis administradas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de enzimas hepáticas de los perros de la población de estudio, luego del análisis de los resultados bioquímicos, previo y post-administración de las formulaciones. El interés de realizar este estudio bioquímico, fue dado

por la extensa metabolización en segundo pasaje hepático, que sufre la molécula RBZ hacia su metabolito inactivo sulfona.

No se encontraron a la fecha de la finalización de los trabajos de la presente Tesis Doctoral, trabajos científicos que hubieran estudiado la toxicidad aguda de RBZ en animales de experimentación o reportes de notificaciones adversas o tóxicas de perros tratados con esta molécula.

PRINCIPALES APORTES DE ESTA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral, generó conocimientos básicos y aplicados que contribuyen a comprender la influencia de las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos y sus efectos clínicos. Se fomentó la discusión exhaustiva de los aspectos bajo estudio, entre especialistas de las áreas de Farmacología, Química farmacéutica y Parasitología del equipo multidisciplinario.

Se buscó profundizar en el estudio del diseño, formulación y caracterización farmacotécnica de nuevas formulaciones SLM en base a RBZ en forma de comprimidos. Se demostró que la molécula RBZ, es posible de ser formulada como SLM, y que los diferentes excipientes formadores de matrices, efectivamente influyen en el proceso de liberación del principio activo

Se comprendió como el comportamiento *in vitro* de las formulaciones SLM podían influenciar en el comportamiento PK de la molécula y en su eficacia clínica antiparasitaria en perros. Este resultado, fue destacado en la observación de la aparición del máximo efecto antiparasitario (100%), 48 h posteriores a la administración de la formulación SLM de RBZ AC en contraste con RBZ LI.

Por otra parte, el hecho de que la administración de una dosis inferior (10 mg/kg) de la molécula RBZ, pueda ser igualmente efectiva que la dosis convencional (20 mg/kg) contra parásitos GI en perros, resulta muy interesante a la hora de dosificar a los animales.

Cabe destacar que en Uruguay, no existe registro ante la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), de medicamentos que contengan RBZ para uso en perros. Esta molécula, se encuentra registrada para uso en rumiantes por vía inyectable sub-cutánea. Por tanto, los resultados de esta Tesis Doctoral son interesantes, a la hora de pensar en el registro de medicamentos en base a esta molécula para su administración en caninos, con una indicación posológica a dosis menores a la registrada (20 mg/kg), en otros países de Latinoamérica.

Los años de estudio de esta Tesis Doctoral, me permitieron adquirir conocimientos sobre Biofarmacia e incorporarlos a mi línea de investigación del Área de Farmacología y Parasitología Veterinaria. Estos conocimientos, son de gran relevancia para la continuación de esta línea de investigación, que comenzó con mi Tesis de Maestría.

Las conclusiones finales de esta Tesis suponen una importante transferencia tecnológica a la industria farmacéutica veterinaria.

Referencias bibliográficas

Aiñaoui A, Ouriemchi E, Bidah D, El Amrani M, Vergnaud J (1997). Process of drug release with oral dosage forms with a Gelucire lipid matrix. *Journal of Polymer Engineering* 17: 245-255.

Akbari B, Dholakiya R, Shiyani B, Lodhiya D, Shastri S. (2009). Development, In-vitro Evaluation & Study of Effect of Hardness on Buoyancy Time of Gastro retentive Floating Tablets of Famotidine. *Journal of Pharmacy Research* 2:1579-1583.

Alonso J. (2010). ¿Por qué un medicamento veterinario de acción prolongada? *Albéitar: publicación veterinaria independiente* 132: 8-10.

Álvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C, Sallovitz J. (2000). Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *J Vet Pharmacol Therap* 23:193-201.

Álvarez L, Sanchez Bruni S, Lanusse C. (1999). In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J Vet Pharmacol Therap* 22: 77-86.

Andreetta H. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación Usos de Distintos Modelos. *Lat Am J Pharm* 22 (4): 355-64.

Asghar L, Chandran S. (2006). Multiparticulate formulation approach to colon specific drug delivery: current perspectives. *J Pharm Sci* 9 (3): 327–338.

Ashford M. (2002). Introduction to biopharmaceutics. En: *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. Aulton ME, 2nd Edition, Churchill Livingstone, UK, 213-216.

Aungst B, Nguyen N, Rogers N, Rowe S, Hussain M. (1994). Improved oral bioavailability of HIV protease inhibitor using Gelucire 44/04 and labrasol vehicles. *Bulletin Technique Gattefosse* 87: 49-54.

Baggot J, McKellar Q. (1994). The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *J Vet PharmacolTherap* 17: 409-419.

Balamurali V, Pramodkumar T, Srujana N, Venkatesh M, Gupta N. (2011) pH sensitive drug delivery systems: A review. *American Journal of Drug Discovery and Development* 1: 24-48.

Bandari S, Eaga C, Thadishetty A, Yamsani M. (2010). Formulation and evaluation of multiple tablets as a biphasic gastroretentive floating drug delivery system for fenoverine. *Acta pharmaceutica* 60: 89-97.

Banker G, Rhodes. *Modern Pharmaceutics*. (2002) 3rd Ed. Marcel Dekker, New York p 825.

Barker HA, Smyth RD, Weissbach H, Toohey JI, Ladd JN and Volcani BE. (1960). Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing Benzimidazole or 5,6- Dimethylbenzimidazole. *Journal of Biological Chemistry*. 235: 480- 488.

Baumgartner S, Kristl J, Vrečer F, Vodopivec P, Zorko B. (2000). Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *International journal of pharmaceutics*, 195: 125-135.

Belo M, Castagnolli K, Gomes R, Costa A, Nascimento A, Morais, D. (1999). Assay on the efficacy of an albendazole sulphoxide, praziquantel and pyrantel pamoate association for helminth parasite control in cats. *ARS Vet Sup*. 45-49.

Boch J, Supperer R. (1982). Parasitología en Medicina Veterinaria. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. p 627.

Bogdanova, S. (2005). Interactions of polyvinylpyrrolidone with ibuprofen and naproxen: experimental and modeling studies. *Pharm Res.* 22: 806–815.

Buxton I, Benet L. (2011). Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. En: Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12ª edición, Mc GrawHill, México, 17-41.

Campbell W. (1990). Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol Today.* 6: 130-133.

Castellanos E, Iraizoz A, Lizardo J, Bataille B. (2007). Subcoating with Kollidon VA 64 as water barrier in a new combined native dextran/HPMC–cetyl alcohol controlled release tablet. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69: 303–311

Castro S, Dib A, Suárez G, Allemandi D, Lanusse C, Sánchez Bruni S, Palma S. (2013). Comparative Plasma Exposure of Albendazole after Administration of Rapidly Disintegrating Tablets in Dogs. *Bio Med Res Int.* (Article ID 920305).

Ceschan N, Bucalá V, Ramírez-Rigo M. (2014). New alginic acid–atenolol microparticles for inhalatory drug targeting. *Materials Science and Engineering* 41: 255–266.

Charman S, Charman W. (2003). Oral modified-release delivery systems. En: *Modified-Release Drug Delivery Technology.* Rathbone M.J. Ed, Marcel Dekker. p 1–10.

Chiou W, Riegelman S. (1971). Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J. Pharm Sci.* 60: 1281-1302.

Collett J, Popli H. (2000). Poloxamer. En: Kibbe A. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Ed. Pharmaceutical Press, London. p 385–388.

Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Facultad de Veterinaria, UdelaR. Disponible en: www.fvet.edu.uy/chea.edu.uy.

Costa E, Arancibia A, Aiache. (2004). J Acta Farm Bonaerense 23: 259 -65.

Dayan AD. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta tropica 86: 141-159.

Delatour P, E Benoit, F. Garnier, S. Besse. (1990). Chirality of the sulphoxide of fenbendazole and albendazole in sheep. J Vet Pharmacol Therap 13: 361–366.

Dennis A, Farr S, Kellaway I, Taylor G, Davidson R. (1990). International Journal of Pharmaceutics 65: 85-100.

Desai J. (2006). Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release. Int J Pharm 308: 115–123.

Dib A, Suárez G, Farías G, Cabrera P, Castro S, Allemandi D, Moreno L, Lanusse C, Sanchez Bruni S. (2011). Albendazole sulphoxide kinetic disposition after treatment with different formulations in dogs. J Vet Pharmacol Therap 34: 136-141.

Dib A, Paredes A, Eliópulos N, Farías C, Suárez G, Allemandi D, Lanusse C, Sánchez Bruni, S. (2015). Pharmacokinetic Assessment of Novel Controlled Release Formulations of Ricobendazole Intended for Oral Administration in Dogs. Clinical & Experimental Pharmacology. (Doi: 10/4172/2161-1459.1000198).

Dib A, Paredes A, Aldrovandi A, Allemandi D, Palma S, Sánchez Bruni, S. (2016). Evaluación Biofarmacéutica y Eficacia Clínica de nuevas

formulaciones de Liberación Modificada en base a Ricobendazole en caninos. Veterinaria Montevideo vol 52, nro 204.

Díez P, Díez N, Morrondo M. (1999). Nematodosis: Toxocariosis, Toxascariosis, Ancilostomatidosis, Tricuriosis, Estrongiloidosis, Espirocercosis y Ollulanosis. En: Cordero del Campillo M, Rojo F. Parasitología Veterinaria. Ed. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid. p 615-651.

Edwards G, Breckenridge A. (1988). Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. Clin Pharmacokinet 15: 67-93.

Esquisabel A, San Vicente A, Igartua M, Hernández M, Gascón A, et al. (1996). Influence of melting point and hydrophilic/lipophilic balance of salbutamol sulfate from lipid matrices. SPT Pharma Sciences 6: 365-369.

Farmacopea Nacional Argentina. Séptima Ed., primer volumen, 2003.

Ford J, Rubinstein M, Hogan J. (1985b). Formulation of sustained release promethazine hydrochloride tablets using hydroxypropyl-methylcellulose matrices. International Journal of Pharmaceutics, 24, 327-338.

Galia E, Horton J, Dressman J. (1999). Albendazole Generics – a comparative in vitro study. Pharm Res 16: 1871-1875.

Ganong W. (1995). Digestión y Absorción. Fisiología Médica. 20ª ed. Mexico. p 535-568.

García Sacristán A, Castejón F, de la Cruz L, González J, Murillo M, Salido G. (1995). Fisiología Digestiva de los rumiantes. En: García Sacristán A. Fisiología Veterinaria. Ed. Mc Graw Hill, Madrid p 599–648.

Gardner D. (1997). The intelisite capsule: a new easy to use approach for assessing regional drug absorption from gastrointestinal tract. *Pharm Tech Eur* 9: 46–53.

Georgarakis E, Sigalas M, Avgoustakis K, Bikiaris D, Karava E. (2007). Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug–polymer interactions. *Eur J Pharm Biopharm* 66: 334–347.

Ghori MU, Ginting G, Smith A, Conway BR. (2014). Simultaneous quantification of drug release and erosion from hypromellose hydrophilic matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, 465: 406-412.

Ghori MU y Conway BR. (2015). Hydrophilic Matrices for Oral Control Drug Delivery. *American Journal of Pharmacological Sciences* 3: 103-109.

Gibaldi, M, Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics*. Ed. Marcel Dekker Inc. 2^a ed. New York.

Goindi S, Mann K, Aggarwal N. (2011). Gastro-retentive floating beads of curcumin β -cyclodextrin complex to treat stomach tumors. *Alternative Medicine Studies* 1: 12.

Gupta P, Vermani K, Garg S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Delivery Today* 7: 569-579.

Hammer O, Harper D, Ryan P. (2001). Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electrónica* 4: 9.

Heng P, Wong T.W. (2003). Melt processes for oral solid dosage forms. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 1-6.

Holenwegger J, Waserman A, Pérez R, Mato B. (1987). Estudio de la eficacia nematocida de Albendazol en los caninos. *Veterinaria Argentina* 4: 165-167.

Hwang SJ, Park H, Park K. (1998). Gastric retentive drug-delivery systems. *Crit Rev Ther Drug* 15: 243– 284.

Ikegami K. (2006). Bioavailability and in vivo release behavior of controlled-release multiple-unit theophylline dosage forms in beagle dogs, cynomolgus monkeys, and göttingen minipigs. *J Pharm Sci* 95: 1888-1895.

Jacobs D, Arakawab A, Courtney C, Gemmeld M, McCalle J, Myers G, Vanoarujsg O. (1994). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics for dogs and cats'. *Vet Parasitol* 52: 179-202.

Janssens S, Novoa de Armas H, Roberts C, Van den Mooter G, (2008). Characterization of ternary solid dispersions of Itraconazole in polyethylene glycol 6000/polyvidone-vinylacetate 64 blends. *Eur J Pharm Biopharm* 69: 1114-1120.

Jiménez A, Palma S, Allemandi D. (2006). *Nuestra Farmacia* 48.

Juárez D, VillaFuerte L. (2011). Gelucire 39/01 as excipient for gastroretentive metronidazole sustained delivery. *Int J Pharm Pharm Sci* 3: 86-91.

Kanig L. (1964). Properties of Fused Mannitol in Compressed Tablets. *J Pharm Sci* 53: 188–192.

Klausner E, Lavy E, Friedman M, Hoffman A. (2003). Expandable gastroretentive dosage forms. *J of Controlled Rel* 90:143-162.

Konno H, Handa T, Alonzo D, Taylor L. (2008). Effect of polymer type on the dissolution profile of amorphous solid dispersions containing felodipine. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 493-499.

Kristensen GH, Schaefer T. (1997). Granulations. Encyclopedia of pharmaceutical technology. Ed. Marcel Dekker, New York Vol. 7 p 121-160

Kulkarni A, Bhatia M. (2010). Development and evaluation of regioselective bilayer floating tablets of Atenolol and Lovastatin for biphasic release profile. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 15-25.

Lacey E, Brady R, Prichard R, Watson T. (1987). Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. Vet Parasitol 23: 105-119.

Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. Parasitology Today. 6: 112-115.

Lanusse C, Alvarez L, Sallovitz J, Mottier L, Sanchez Bruni, S (2007). Antinematodal Drugs, En: Riviere P, Papich M. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ed. Wiley Blackwell, St. Press Univ. 9^a ed. p 1053-1094.

Lanusse C, Gascon L, Prichard R. (1993). Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. J Vet Pharmacol Therap 16: 38-47.

Lanusse C, Prichard R. (1993). Cinical Pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. Drug Metabol Rev 25: 235-279.

Lanusse C, Trudeau C, Ranjan S, Prichard R. (1991). Pharmacokinetic profile of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. J Vet Pharmacol Therap 14: 101-108.

Lanusse C, Virkel G, Sánchez Bruni S, Alvarez L, Lifschitz F, Imperiale F. (1998). Ricobendazole kinetics and availability following subcutaneous administration of a novel injectable formulation in calves. Res Vet Sci 65: 5-10.

Lanusse C, Alvarez C, Sallovitz A, Mottier L, Sánchez Bruni S. (2009). Antinematodal drugs. En: Riviere JE y Papich MG. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons 9th ed. Wiley-Blackwell. U.S.A. p1053-1094.

Leuner C, Dressman J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 47–60.

Levy G. (1963). Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. *Am J Pharm Sci Support Public Health* 135: 78–92.

Losi E, Bettini R, Santi P, Sonvico F, Colombo G, Lofthus K, Colombo P, Peppas NA. (2006). Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems. *J Control Rel.* 111: 212-218.

Lumsden JH, Mullen K, McSherry BJ. (1979). Canine hematology and biochemistry reference values. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43: 125–131.

Maheshwari M, Ketkar A, Chauhan B, Patil B, Paradkar A. (2003). Preparation and characterization of ibuprofen–cetyl alcohol beads by melt solidification technique: effect of variables. *International Journal of Pharmaceutics* 261: 57–67.

Mansuri S, Kesharwani P, Tekade R, Jain N. (2016). Lyophilized mucoadhesive-dendrimer enclosed matrix tablet for extended oral delivery of albendazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 102: 202-213.

Marín M, Margarit M, Salcedo, G. (2002). Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone II. *J Pharmacol* 57: 723-727.

Martin R. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs: a review. *Vet J* 154: 11-34.

Martin A, Bustamante P, Chun A. (1994). Powder Rheology. BI Waverly Pvt. Ltd., New Delhi, 465-466.

McKellar Q, Harrison P, Galbraith E, Inglis I. (1990). Pharmacokinetics of fenbendazole in dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 13: 386-392.

McKellar Q, Scott E. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents: a review. *J Vet Pharmacol Therap* 13: 223-247.

McKellar Q, Galbraith E, Baxter P. (1993). Oral absorption and bioavailability of fenbendazole in the dog and the effects of concurrent ingestion on food. *J Vet Pharmacol Therap* 13: 223-227.

Meka V S, Gorajana A, Dharmanlingam SR, Kolapalli VR. (2013). Design and evaluation of a gastroretentive drug delivery system for metformin HCl using synthetic and semi-synthetic polymers. *Investigación clínica* 54: 347-359.

Möbus K, Siepmann J, Bodmeier R. (2012). Zinc–alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81: 121–130.

Morales G, Pino L. (1977). Manual de diagnóstico helmintológico en rumiantes. Caracas. Venezuela, p 99.

Muñoz N, Ferrero C, Muñoz-Ruiz A, Velazco M, Jiménez-Castellanos M. (1998). Effect of Explotab® on the Tabletability of a Poorly Soluble Drug. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24: 785-791.

Notari R. (1987). Pharmacokinetics. En: Notari R. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. Ed. Marcel Dekker Inc. New York, 4^a ed. p 45-128.

Ohara T. (2005). Dissolution mechanism of poorly water-soluble drug from extended release solid dispersion system with ethylcellulose and hydroxypropyl-methylcellulose. *Int J Pharm* 302: 95–102.

Özdemir N, Ordu S, Özkan Y. (2000). Studies of floating dosage forms of furosemide: in vitro and in vivo evaluations of bilayer tablet formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, 26: 857-866.

Oxberry M, Reynoldson J, Thompson R. (2000). The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J Vet Pharmacol Therap* 23: 113-120.

Paredes A. (2016). Nanocristales de Albendazole obtenidos por homogeneización de alta presión y secado por aspersion: diseño, optimización y caracterización in vitro-in vivo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Republica Argentina.

Patel H, Patel R, Patel L, Patel Y, Raval A. (2016). Preparation and in vitro characterization of non effervescent floating delivery system of cefpodoxime proxetil. *Pharmacophore* 7:132-140.

Phillips G, Wedlock D, Williams P. (1984). Gums and Stabilizers for the Food Industry 5 IRL Press, Oxford, U.K. p 243–246.

Piscopo S, Smoak I. (1997). Comparison of effects of albendazole sulphoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos. *AJVR* 58: 1038-1042.

Prabhu S. (2005). Novel lipid-based formulations enhancing the in vitro dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, piroxicam. *Int J Pharm* 301: 209–216.

Puebla M. (2012). Estudio de la influencia de los parámetros tecnológicos y de formulación sobre la liberación de Teofilina en comprimidos matriciales lipídicos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.

Ramírez-Rigo M, Allemandi D, Manzo R. (2006). Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid characterization and delivery properties. *Int J Pharm* 322: 36-43.

Rew R, McKenzie E. (2002). Quimioterapia antihelmíntica. En: Prescott J, Baggott J, Walker R. *Terapéutica Antimicrobiana*. Ed. Inter-Médica 3ª ed. Buenos Aires. Cap. 20, pp. 431–447.

Rowe R, Sheskey P, Quinn M (2009) Alginic Acid. En: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6th ed), Pharmaceutical Press. London UK p 20.

Rowe, R., Sheskey, P., Quinn, M. (2009). Hydroxypropyl Cellulose, Low-substituted. En: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6th ed). Pharmaceutical Press. London UK p 317-321.

Ruiz S, Olvera L, Chacón S, Estrada D. (2015). Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs. *American journal of veterinary research* 76: 367-372.

Sáez V, Hernández E, Sanz L, Katime I. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5: 87– 101.

Sánchez Bruni S, Alvarez L, Virkel G, Lifschitz A, Monfrinotti A, Lanusse C. (1996). Perfil farmacocinético de ricobendazole administrado por vía parenteral en bovinos. *Rev Med Vet* 77: 145-150.

Sánchez Bruni S, Sallovitz J, Alvarez L, Lanusse C. (2002). Antiparasitarios internos - Fármacos antihelmínticos: benzimidazoles y otros nematodocidas.

En: Botana, Landoni, Martín-Jiménez. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España p 517-544.

Sánchez Bruni S, Sallovitz J, Savio E, McKellar Q, Lanusse C. (2000). Comparative Availability of two oral dosage forms of albendazole in dogs. *Vet J.* 160: 153-156.

Sánchez Bruni, S, Jones D, McKellar Q. (2006). Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals. *J Vet Pharmacol Therap* 29: 443-457.

Sánchez R, Damas R, Domínguez P, Cerezo P, Salcedo I, Aguzzi C, Viseras C. (2010). Uso de la HidroxiPropilMetilCelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmaespaña Ind* p 48-51.

Sarangapani S, Rajappan M. (2012). Optimisation studies on gastroretentive floating system of pantoprazole tablets using response surface methodology. *Journal of Pharmacy Research* 5: 32-53.

Saumell C, Fuse L, Monfrinotti A, Iglesias L, Steffan P, Fiel C. (2006). Evaluación de Ricobendazole vía oral en caninos. *Rev Med Vet* 87: 160-165.

Scarpelli L, Belo M, Souza L, Sabatini G, Costa A, Moraes F. (1999). Hematology and biochemical parameters of bovine treated with different doses of ivermectin, abamectin and albendazole sulphoxide. *ARS Vet Sup* 57-62.

Sekiguchi K, Obi N. (1964). Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. *Chem Pharm Bull* 12: 134–144.

Shah SH, Patel JK, Patel NV. (2009). Stomach specific floating drug delivery system: A review. *Int J PharmTech Res*, 1: 623-633.

Sharma D, Singh G, Singh M, Kumar D, Rathore MS. (2012). A review on innovative approaches to enhance solubility and dissolution rate of hydrophobic drugs. *Novel Science International Journal* 7: 486-492.

Siepmann J, Peppas N. (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 48: 139–157.

Singh BN, Kim KH. (2000). Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. *J of Controlled Rel.* 63: 235-259.

Soulsby E. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, Ed. Nueva Editorial Interamericana 7^a ed. México p 823.

Srikanth P, Narayana R, Wasim Raja S, Brito Raj S. (2013). A review on oral controlled drug delivery. *Advanced Pharmaceutics* 3: 51-58.

Srikanth M, Gorajana A, Dharmanlingam S, Murthy R. (2013). Diseño y evaluación de un sistema gastro-retentivo de administración de metformina HCL, utilizando polímeros sintéticos y semisintéticos. *Investigación Clínica* 54 (4), 347-359.

Steffan P, Fiel C, Ferreyra D. (2000). Eficacia del Ricobendazole en tratamientos repetidos contra nematodes gastrointestinales del bovino. *Rev Med Vet* 81: 95-99.

Stokol T, Randolph J, Nachbar S, Rodi C, Barr SC. (1997). Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat. *J Am Vet Med Assoc* 210:1753-1756.

Streubel A. (2006). Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Curr Opin Pharmacol* 6: 501–508.

Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. (2006). Gastroretentive drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 3: 217-233.

Summers M, Aulton M. (2002). Granulation. En: Aulton M. *Pharmaceutics, the science of dosage dosing*. (2nd ed). Capítulo 25. C. Livingstone. España. pp 365-377.

Tanaka N. (2006). Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): In vivo evaluation. *J Contr Release* 112: 51–56.

Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. (1979). Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica p 187.

Tonnesen HH, Karlsen J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28: 621–630.

Torrado S, Torrado S, Cadorniga R, Torrado J. (1996). Formulation parameters of albendazole solution. *International Journal of Pharmaceutics* 140: 45-50.

Townsend L, Wise D. (1990). The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today* 6: 107-112.

Udayakumar T, Vasudevan M. (2012). Novel Sustained Release Swellable Bioadhesive Floating Gastroretentive Drug Delivery System of Bilayer Tablets Containing Rifampicin and Isoniazid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters* 1: 21-24.

Vallejo Díaz B, Perilla E. (2008). Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 37: 33-61.

Van Drooge D. (2006). Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. *Int J Pharm* 310: 220–229.

Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water-soluble drugs. *Drug Discov Today* 12: 1068-1075.

Vila Jato JL, (2001). Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Ed. Síntesis Santiago de Compostela, España p 580.

Vilhelmsen T, Eliassen H, Schaefer T. (2005). Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. *Int J Pharm Sci* 303: 132-142.

Vippagunta S. (2006). Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *J Pharm Sci* 96: 294–304.

Wagner E. C. y Millett W. H. (1943). Benzimidazole. *Org. Synth. Coll* 2: 65

Wang X, Michael A, Van den Mooter G. (2004). Study of the phase behaviour of polyethylene glycol 6000–itraconazole solid dispersions using DSC. *Int J Pharm Sci* 272: 181-187.

Willis HH. (1921). A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med J Aust* 2: 375-376.

Wu Z, Razzak M, Tucker I, Medicott N. (2005). Physicochemical Characterization of Ricobendazole: Solubility, Lipophilicity, and ionization characteristics. *Int J Pharm Sci* 94: 983-993.

York P. (1983). Solid-state properties of powders in the formulation and processing of solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* 14: 1-28.

Zahoor A, Sharma S, Khuller G. (2005). Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 298–303.

Publicaciones I a III

La presente Tesis Doctoral, está basada en las siguientes publicaciones:

Publicación I. Castro S, **Dib A**, Suárez G, Allemandi D, Lanusse C, Sánchez Bruni S, Palma S. (2013). Comparative Plasma Exposure of Albendazole after Administration of Rapidly Disintegrating Tablets in Dogs. *Bio Med Res Int.* (Article ID 920305).

Publicación II. **Dib A**, Paredes A, Eliópulos N, Farías C, Suárez G, Allemandi D, Lanusse C, Sánchez Bruni, S. (2015). Pharmacokinetic Assessment of Novel Controlled Release Formulations of Ricobendazole Intended for Oral Administration in Dogs. *Clinical & Experimental Pharmacology.* (Doi: 10/4172/2161-1459.1000198).

Publicación III. **Dib A**, Paredes A, Aldrovandi A, Allemandi A, Lanusse C, Palma S. Sánchez Bruni S. (2016). Eficacia clínica antiparasitaria contra *Ancylostoma caninum* y *Trichuris* sp. de una formulación de liberación modificada en base a Ricobendazole para administración oral en perros. *Revista Veterinaria Montevideo (Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay)*, vol 52, nro 204.