



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Ingeniería Química

**TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE LOS MATERIALES**

**Desarrollo de materiales particulados de
administración inhalatoria basados en sistemas
polielectrolito-fármaco**

Nazareth Eliana Ceschan

Bahía Blanca

Argentina

2017

PREFACIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Materiales, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Planta Piloto de Ingeniería Química, dependiente del Departamento de Ingeniería Química y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 1 de febrero de 2017, bajo la dirección de las Dras. Verónica Bucalá y María Verónica Ramírez Rigo.

Nazareth Eliana Ceschan



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de(.....)

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

*Dos caminos se abrieron ante mí,
pero tomé el menos transitado
y eso marcó la diferencia.*

Robert Frost.

A mi familia, mi inspiración. A mi abuelo, mi vida.

*Memoria selectiva para recordar lo bueno,
prudencia lógica para no arruinar el presente,
y optimismo desafiante para encarar el futuro.*

Isabel Allende

Más allá de los resultados académicos, esta Tesis implica un enorme crecimiento personal. Me llevo la generosidad, el conocimiento y la predisposición de todos aquellos que marcaron esta etapa, por lo que quiero expresar mi gratitud hacia ellos.

Voy a comenzar agradeciendo a mis directoras, sin quienes esta Tesis no hubiese sido posible. Gracias Vero R por darme la posibilidad de iniciar este camino, que hoy llega a su fin. Gracias por tu calidez y dulzura; tu acompañamiento diario y tu apoyo resultaron el pilar de este trabajo. Gracias Vero B por permitirme entrar al grupo. Tu paciencia y generosidad fueron inquebrantables. También quiero agradecer al Dr. Rubén Manzo, por su co-dirección en la beca CONICET.

Gracias a la Universidad Nacional del Sur, a CONICET y a PLAPIQUI, por brindarme la beca, el financiamiento y el espacio para desarrollar este trabajo. También a las empresas que generosamente donaron materias primas: Plastiape y Puraq America.

Una mención especial merecen los administrativos de PLAPIQUI. Gracias a todos por su trabajo diario. Y en especial gracias a Nora y a Any por sus eficientes respuestas a todas mis dudas burocráticas.

También quiero agradecer a todo el grupo de Reactores y Tecnología de Partículas, en especial a la Dra. Juliana Piña. Es muy importante saber que cuento con su apoyo. Gracias también al grupo de Catálisis, que por “cercanía geográfica” fueron parte importante de mi vida plapiquense. Palabras aparte se llevan Fernanda y Agustina. Gracias por su diaria y desinteresada ayuda; por la generosidad de formarme en mis primeros pasos en el laboratorio. Agus, tu inmensa amabilidad me dio las primeras herramientas en PLAPIQUI. No hay palabras

de agradecimiento adecuadas. Fer, tu acompañamiento frente a cada desafío es digno de destacar.

Debo reconocer que los pececitos tropicales de la pecera dejan una marca indeleble en mí. Los que estuvieron antes, los que están ahora. Gracias Dani, Yani, Marti, Paula, Mely, Mariana, Mary, Andrés y Edu. Escribir no hubiese sido lo mismo sin ustedes. No hay nada en el mundo que pague las charlas, los mates y los viernes de torta.

A mis amigos, que estuvieron en cada paso que di, con una palabra de aliento adecuada para cada momento. Romi, Ana, Pablo, Mari, Pame, Ana, Mechi, Noel, Noe, Javi, gracias por entenderme, no es tarea fácil. Gracias en especial a Ana, que compartió conmigo cada detalle de los dos últimos años, alegrándose de cada logro y dando ánimos frente al fracaso.

A todo el grupo de farmacia, un gracias enorme por estar siempre, por ser parte de cada viaje. A los Dres. Diego Genovese, Marcelo Villar y Loreana Gallo, por su colaboración en la puesta a punto e interpretación de diversas técnicas. Al servicio de microscopía electrónica de la UAT, por el importante trabajo realizado en la toma de las fotos bajo la técnica de presión variable.

Gracias a los grupos de investigación que me recibieron tan amablemente y que compartieron sin reparos sus conocimientos: al laboratorio PHR 4.214 del College of Pharmacy (University of Texas at Austin), especialmente a su director, el Dr. Hugh Smyth, por recibirme tan generosamente, y al LIDeB (UNLP), por su cordialidad y predisposición durante mi estadía, en especial a los Dres. Alan Talevi, María Laura Sbaraglini y Esperanza Ruiz. También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Melina Mateos y a su grupo de trabajo, por su colaboración en los ensayos con líneas celulares.

Texas no hubiese sido lo que fue sin los Austinites. May, Fran, Delfi, Chino, Lu, Mauro y Mario: gracias y mil gracias por hacer mi estadía maravillosa, hicieron de Austin *a home from home* y me llevo su amistad por siempre. Un agradecimiento especial a Mayra y también a Carine y Stasa, por recibirme en su casa.

Y finalmente, un gracias enorme y eterno a mi familia, mi sostén e inspiración. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

A todos... infinitamente gracias.

RESUMEN

La administración pulmonar de fármacos es la vía no invasiva alternativa a la oral de mayor proyección terapéutica. Entre los diferentes dispositivos disponibles para esta aplicación, los inhaladores de polvo seco se han convertido en los sistemas elegidos por prescriptores y pacientes. Para tratamientos locales, las partículas que los conforman deben exhibir diámetros aerodinámicos entre 0,5 y 5 μm , mientras que para la farmacoterapia sistémica, deben ser menores a 3 μm .

El desempeño de las partículas inhalatorias puede optimizarse utilizando técnicas de co-procesamiento de fármacos y excipientes. En particular, el uso de polielectrolitos permite obtener nuevas entidades químicas cuando se los procesa con fármacos de carga opuesta.

En esta Tesis doctoral se estudió la obtención y caracterización de micropartículas poliméricas portadoras de fármacos de administración por vía inhalable. Los fármacos seleccionados fueron atenolol (AT) e indometacina (IN), los cuales se co-procesaron mediante secado por atomización con ácido algínico (AA) y polilisina (PL), respectivamente.

El co-procesamiento de polielectrolitos y fármacos permitió el diseño flexible de productos inhalatorios. Se produjeron cambios en las propiedades de los materiales a nivel molecular, particulado y a granel. Si bien AT e IN puros son cristalinos, los sistemas particulados polielectrolito-fármaco resultaron estructuras amorfas. Se encontraron evidencias de interacción ácido-base entre los componentes y las características finales de las partículas resultaron ser función de la composición cuali-cuantitativa de la alimentación líquida. Por otra parte, la combinación del uso de un alto caudal del aire de atomización y de un ciclón de alta performance habilitó la obtención de partículas de pequeño tamaño, con un muy buen rendimiento del proceso de secado.

La distribución de diámetros aerodinámicos es una propiedad fundamental para evaluar sistemas inhalatorios. Las pruebas de aerosolización demostraron que los sistemas particulados portando ambos fármacos tuvieron buenas propiedades aerodinámicas. En efecto, la fracción respirable obtenida para los sistemas fue del orden o mayor a la que presentan la mayoría de los productos disponibles en terapéutica.

En medios fisiológicos simulados, las velocidades iniciales de disolución de los complejos fueron mayores que las de los fármacos puros y se demostró que la interacción polielectrolito-fármaco es reversible. Por lo tanto, luego de la deposición, los materiales tendrían la capacidad del disolverse en el fluido pulmonar y liberar los fármacos para que ejerzan acción local o se

absorban. Por otra parte, las formulaciones no modificaron la viabilidad de líneas celulares modelo de epitelio alveolar.

Complementariamente, se realizaron estudios específicos en cada material. Para el sistema con AT, el agregado de AA permitió aumentar la mucoadherencia de las partículas, propiedad relevante para incrementar el tiempo de residencia en pulmón. Las formulaciones con IN mostraron el mismo efecto antiinflamatorio que el fármaco puro, en un modelo celular de macrófagos murinos.

En síntesis, se desarrollaron formulaciones innovadoras de antihipertensivos/antiarrítmicos y antiinflamatorios para ser administrados por vía inhalatoria. Estos materiales demostraron tener muy buenas propiedades biofarmacéuticas. Por lo tanto, son alternativas terapéuticas promisorias para tratamientos locales y sistémicos de enfermedades crónicas. En efecto, podrían mejorar la biodisponibilidad y disminuir los efectos adversos y el tiempo de inicio de acción.

ABSTRACT

The pulmonary administration of drugs is the non-invasive alternative to oral route of greater therapeutic projection. Among the different devices available for this application, dry powder inhalers have become the preferred systems by prescribers and patients. For local treatments, particles should exhibit aerodynamic diameters between 0.5 and 5 μm , while, for systemic pharmacotherapy, aerodynamic diameters should be smaller than 3 μm .

The performance of the inhalatory particles can be optimized by co-processing drugs and excipients. In particular, the use of polyelectrolytes allows obtaining new chemical entities when they are processed with oppositely charged drugs.

In this PhD Thesis the production and characterization of polymeric microparticles carrying drugs was studied. Particles were intended for inhalatory administration. The drugs selected were atenolol (AT) and indomethacin (IN), which were co-processed by spray drying with alginic acid (AA) and polylysine (PL), respectively.

Co-processing polyelectrolytes and drugs allowed the design of inhalatory products in a flexible way. Material properties changed at molecular, particle and bulk level. Although raw AT and IN are crystalline drugs, the polyelectrolyte-drug ionic complexes were amorphous structures. Evidence of acid-base interaction between the components was found. The final characteristics of the particles turned out to be a function of the quali-quantitative composition of the liquid feed. Besides, the combination of a high atomization air flow rate and a high performance cyclone allowed the production of small particles, adequate for inhalatory administration, with a high process yield.

The aerodynamic diameters distribution is the main property for evaluating inhalatory systems. *In vitro* aerosolization tests demonstrated that the particulate systems carrying both drugs had good aerodynamic properties. In fact, the respirable fraction obtained for the developed systems was similar or even higher than this fraction of most commercial products.

In simulated physiological media, the complexes initial dissolution rates were greater than those of the pure drugs and the polyelectrolyte-drug interaction was shown to be reversible. Therefore, after deposition, the materials would have the ability to dissolve in the lung fluid and release the drugs to exert the local pharmacological effect or be absorbed. On the other hand, the formulations did not modify the viability of model alveolar epithelial cell lines.

In addition, specific studies were carried out on each material. For the AT system, the addition of AA allowed increasing the particles mucoadherence, a relevant property to enlarge the residence time in the lung. The IN formulations showed the same anti-inflammatory effect as the pure drug in a murine macrophages cell model.

In summary, innovative antihypertensive/antiarrhythmic and anti-inflammatory formulations were developed for inhalatory administration. These materials proved to have good biopharmaceutical properties. Therefore, they are promising therapeutic alternatives for local and systemic treatments of chronic diseases. In effect, they could improve bioavailability and decrease adverse side effects and time onset of action.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción

1.1	Vías de administración de fármacos	2
1.2	Características de la vía inhalatoria.....	3
1.3	Dispositivos de administración inhalatoria	5
1.4	Deposición de las partículas en el árbol respiratorio.....	8
1.4.1.	Mecanismos de deposición de las partículas	9
1.5	Mecanismos de remoción de partículas	10
1.6	Técnicas de obtención de sistemas particulados para administración inhalatoria.....	11
1.7	Diseño de micropartículas para IPS.....	13
1.7.1.	Polímeros para el diseño de sistemas particulados inhalables.....	14
1.7.2.	Poliectrolitos de administración inhalatoria	14
1.7.3.	Sistemas polielectrolito-fármaco	15
1.7.4.	Sistemas polielectrolito-fármaco para IPS	15
1.8	Fármacos seleccionados para formular sistemas de administración inhalatoria	16
1.8.1.	Atenolol.....	16
1.8.2.	Indometacina	18
1.9	Relevancia de los medicamentos de vía inhalatoria en el mercado farmacéutico	20
1.10	Objetivos de la Tesis.....	21
1.11	Bibliografía	23

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1.	Materiales	31
2.2.	Métodos	32
2.2.1.	Determinación del número de equivalentes por gramo de polielectrolito	32
2.2.2.	Determinación del contenido de sodio en ácido algínico	33
2.2.3.	Preparación y caracterización de las alimentaciones líquidas a atomizar	33
2.2.4.	Proceso de secado por atomización (SA)	35
2.2.4.1.	SA de las dispersiones ácido algínico/atenolol	35
2.2.4.2.	SA de las soluciones polilisina/indometacina.....	37

2.2.5.	Caracterización del sistema particulado	38
2.2.5.1.	Contenido de humedad.....	38
2.2.5.2.	Cargado del fármaco	38
2.2.5.3.	Espectroscopía infrarroja asociada a Transformación de Fourier (FT-IR) ...	38
2.2.5.4.	Análisis térmico	38
2.2.5.5.	Difracción de rayos X de polvo	39
2.2.5.6.	Distribución de tamaño de partícula.....	39
2.2.5.7.	Morfología de las micropartículas.....	40
2.2.5.8.	Determinación de la densidad del polvo por picnometría de nitrógeno	40
2.2.5.9.	Propiedades de flujo de los materiales secados por atomización	41
2.2.5.10.	Tendencia a la captación de humedad.....	42
2.2.6.	Estimación de diámetro aerodinámico	43
2.2.7.	Mezcla de las micropartículas con <i>carrier</i>	44
2.2.8.	Aerosolización de las micropartículas <i>in vitro</i>	44
2.2.9.	Acondicionamiento de muestras a diferentes humedades relativas.....	47
2.2.10.	Ensayos de liberación de los fármacos.....	48
2.2.11.	Ensayo de citotoxicidad.....	50
2.2.11.1.	Citotoxicidad de las micropartículas portando AT	51
2.2.11.2.	Citotoxicidad de las micropartículas portando IN.....	51
2.2.12.	Ensayo de Mucoadhesión <i>in vitro</i> : resistencia a la tracción	51
2.2.13.	Efecto antiinflamatorio de partículas con IN en un modelo <i>in vitro</i>	52
2.2.13.1.	Cultivo y tratamiento de la línea celular RAW 264.7	52
2.2.13.2.	Inmunoblot (<i>Western Blot</i> , WB).....	52
2.2.14.	Análisis estadístico	53
2.3.	Bibliografía	54

Capítulo 3. Obtención y caracterización fisicoquímica del sistema ácido algínico-atenolol

3.1.	Introducción	60
3.2.	Formulaciones	64
3.3.	Resultados	66
3.3.1.	Caracterización de las alimentaciones a procesar en el secadero por atomización.....	66

3.3.2.	Proceso de secado por atomización.....	69
3.3.3.	Caracterización del producto	71
3.3.3.1.	Contenido de humedad.....	71
3.3.3.2.	Composición de las micropartículas.....	72
3.3.3.3.	Caracterización por FT-IR	73
3.3.3.4.	Análisis térmico	76
3.3.3.5.	Caracterización cristalográfica	78
3.3.4.	Morfología y tamaño de las micropartículas	80
3.3.5.	Densidades de los polvos y propiedades de flujo	85
3.3.6.	Tendencia a la captación de humedad.....	87
3.3.7.	Estimación del diámetro aerodinámico (D_{aer}^e)	88
3.4.	Conclusiones.....	90
3.5.	Bibliografía	91

Capítulo 4. Obtención y caracterización fisicoquímica del sistema polilisina-indometacina

4.1.	Introducción	98
4.2.	Formulaciones	102
4.3.	Resultados	104
4.3.1.	Caracterización de la alimentación líquida	104
4.3.2.	Proceso de secado por atomización.....	106
4.3.3.	Caracterización del producto	107
4.3.3.1.	Contenido de humedad y cargado del fármaco.....	107
4.3.3.2.	Caracterización mediante FT-IR	108
4.3.3.3.	Caracterización cristalográfica	110
4.3.3.4.	Análisis térmico	112
4.3.3.5.	Morfología.....	115
4.3.3.6.	Distribución de tamaño de partícula.....	117
4.3.3.7.	Propiedades de flujo	118
4.3.3.8.	Densidad del polvo.....	119
4.3.4.	Estimación del diámetro aerodinámico	119
4.4.	Conclusiones.....	121
4.5.	Bibliografía	123

Capítulo 5. Caracterización biofarmacéutica de los materiales portadores de atenolol

5.1.	Introducción	129
5.2.	Resultados	132
5.2.1.	Propiedades de aerosolización.....	132
5.2.1.1	Test de aerosolización <i>in vitro</i>	132
5.2.1.2	Efecto de la humedad de almacenamiento sobre las propiedades de aerosolización.....	136
5.2.1.3	Comparación de los diámetros aerodinámicos estimados con las MMDAs .	141
5.2.2.	Liberación del fármaco a partir del complejo iónico.....	142
5.2.3.	Ensayo de citotoxicidad.....	145
5.2.4.	Ensayo de mucoadhesión.....	147
5.3.	Conclusiones.....	148
5.4.	Bibliografía	149

Capítulo 6. Caracterización biofarmacéutica de los materiales portadores de indometacina

6.1.	Introducción	154
6.2.	Resultados	157
6.2.1.	Ensayo de aerosolización <i>in vitro</i>	157
6.2.2.	Comparación de los diámetros aerodinámicos estimados con las MMDAs	162
6.2.3.	Ensayo de liberación de IN	163
6.2.4.	Ensayo de viabilidad celular	166
6.2.5.	Efecto antiinflamatorio de IN contenida en las micropartículas.....	168
6.3.	Conclusiones.....	169
6.4.	Bibliografía	171

Capítulo 7. Conclusiones y trabajo futuro

7.1.	Conclusiones y trabajo futuro	176
------	-------------------------------------	-----

Abreviaturas.....	180
Figuras	182
Tablas	187
Producción científica	190

*La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos
y el horizonte se corre diez pasos más allá.
¿Entonces para qué sirve la utopía?
Para eso, sirve para caminar.*

Eduardo Galeano

Capítulo 1.

Introducción

1.1 Vías de administración de fármacos

La vía de administración de medicamentos más utilizada es sin dudas la vía oral. Sin embargo, no todos los principios activos admiten esta ruta. Esto se debe principalmente a problemas de estabilidad en el tracto gastrointestinal, al efecto de extracción presistémica que sufren algunas moléculas al pasar por el hígado o porque la terapia requiere rápido inicio de acción o administración local [1]–[3]. Estos inconvenientes sumados a que se reportan efectos adversos gastrointestinales de relevancia en algunos grupos de fármacos, motivan la investigación y desarrollo de productos farmacéuticos destinados a otras vías de administración [4]. Dentro de las alternativas de carácter no invasivo se encuentran las vías tópica, rectal, vaginal, bucal e inhalatoria. Entre ellas, la opción de mayor proyección es la inhalatoria. Esto se debe a que las áreas superficiales del epitelio nasal y pulmonar son relativamente extensas y están ampliamente vascularizadas. Por otra parte hay escasa presencia de transportadores de eflujo, características que favorecen la absorción de los fármacos. Además, el uso de la vía inhalatoria se destaca porque el inicio de acción es relativamente rápido y se pueden absorber fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas [5]. Dentro de la vía inhalatoria se engloban las vías nasal y pulmonar, las cuales permiten tratamientos tanto locales como sistémicos.

Para el caso de la administración nasal, la absorción del fármaco depende del sitio en la mucosa nasal donde se deposita la formulación y de las características fisicoquímicas propias del principio activo. Diferentes regiones de la mucosa tienen diferente permeabilidad y concentración de microvellosidades y cilias [6][7]. En términos generales, la mucosa nasal presenta baja permeabilidad para compuestos polares mientras que los fármacos lipofílicos pueden absorberse por difusión pasiva transcelular [6]. Por otra parte, las cilias que recubren el epitelio barren relativamente rápido las partículas que se depositan en la mucosa, siendo el tiempo promedio de eliminación entre 15 y 20 minutos [7]. Así, los principios activos que son poco solubles en el mucus nasal se eliminan con relativa rapidez, condicionando su biodisponibilidad. Es por ello que para esta vía es común la incorporación a la formulación de promotores de la permeación y sustancias mucoadhesivas. Estos compuestos, en cierta extensión, facilitan el pasaje del principio activo a través del epitelio nasal o prolongan el tiempo de residencia de la formulación en la mucosa, respectivamente [8].

La vía de administración pulmonar presenta ventajas competitivas respecto a la nasal en la mayoría de los casos debido a que: a) la superficie alveolar y la vascularización son significativamente mayores; b) el espesor de la membrana alveolar es menor; y c) la permeabilidad de la membrana es mayor. Así, la absorción de principios activos de naturaleza variada, incluyendo macromoléculas, es posible, incluso sin el agregado de promotores de la permeación [8].

No obstante a que la vía inhalatoria incluye la ruta de administración nasal, es usual utilizar el término de vía inhalatoria como sinónimo de la vía pulmonar [9]; en esta Tesis ambos términos se utilizan como sinónimos.

Más allá del gran potencial que presentan los sistemas de administración inhalatoria, el diseño de los mismos aun presenta grandes desafíos para lograr una farmacoterapia adecuada. Para ello, se requiere que el fármaco llegue correctamente a sitios de acción y permanezca en ellos el tiempo necesario. Un primer paso en el diseño de formulaciones inhalatorias es reconocer los desafíos que imponen la anatomía y fisiología del árbol respiratorio.

1.2 Características de la vía inhalatoria

Anatómica y fisiológicamente, el tracto respiratorio puede dividirse en dos grandes porciones: la vía conductiva y la vía respiratoria propiamente dicha [9], tal como se ilustra en la Figura 1.1.

La vía conductiva está compuesta por la nariz, boca, tráquea, bronquios, bronquiolos y bronquiolos terminales. El principal objetivo de este tramo es humidificar, calentar y conducir el aire hasta la zona respiratoria.

Los bronquios, bronquiolos y bronquiolos terminales se bifurcan varias veces (Figura 1.1), lo que aumenta el área superficial y disminuye la velocidad del aire circulante y las dimensiones de los conductos [9]. Esta parte del tracto respiratorio está recubierto por células ciliadas y glándulas secretoras de mucus.

A medida que los bronquiolos se bifurcan en los bronquiolos terminales (conductos más pequeños de la vía conductiva) comienzan a formarse los pasajes de aire, constituyendo la transición de la vía conductiva a la respiratoria [10]. Estos bronquiolos son blanco terapéutico de algunos fármacos utilizados para tratamientos locales [9][10].

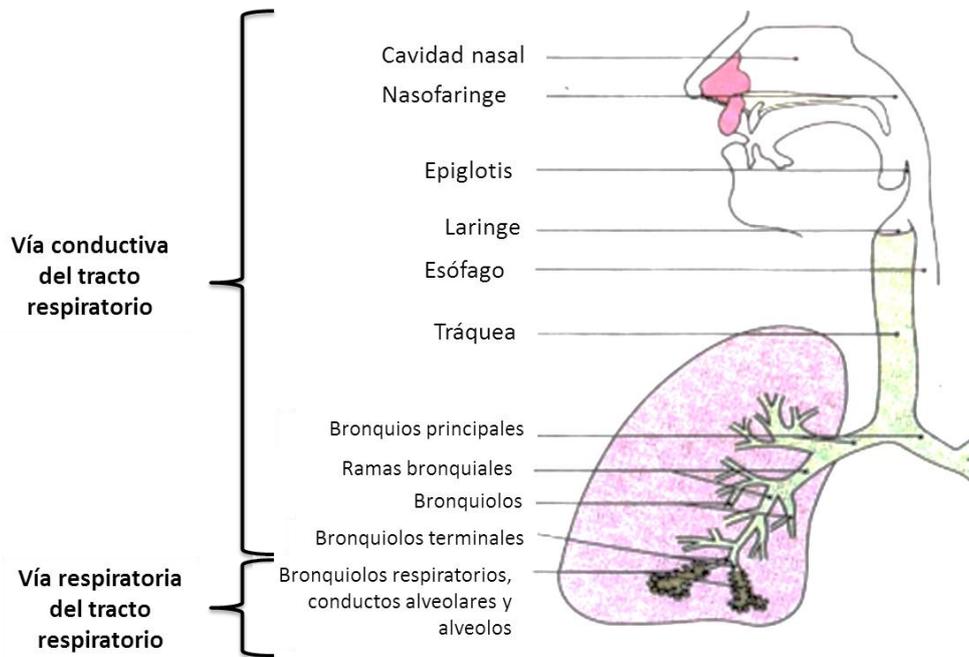


Figura 1.1. Esquema del tracto respiratorio, dividido en la vía conductiva y la vía respiratoria. Adaptado de referencias [11] y [12]

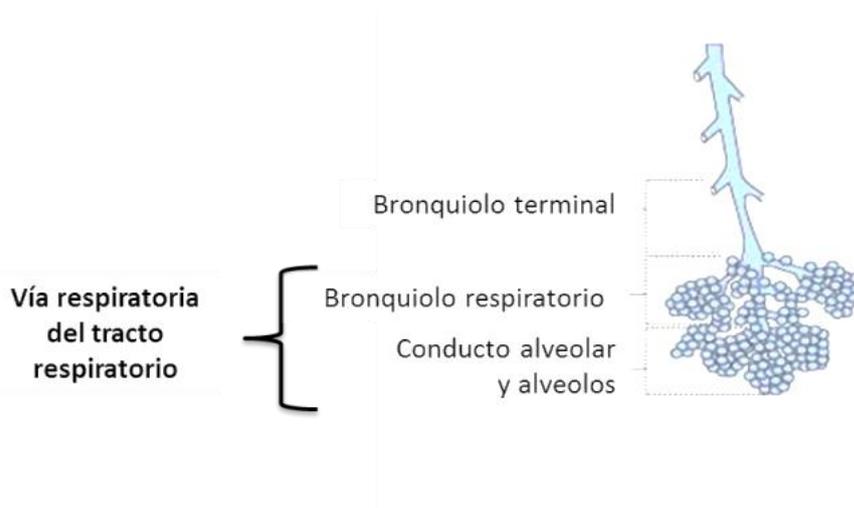


Figura 1.2. Esquema de la vía respiratoria del tracto respiratorio. Adaptado de referencia [13]

Por su parte, la vía respiratoria está compuesta por los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares y los alveolos, como puede verse en la Figura 1.1 y en detalle en la Figura 1.2. Este segmento constituye la parte final del tracto respiratorio, cuya principal función es el intercambio hematogaseoso, el cual es posible debido a: a) el gradiente de presión de oxígeno desde la vía conductiva hacia los alveolos y b) el gran área superficial que presentan los alveolos y a la delgada capa de células que componen esta sección, ambas situaciones favorecen la difusión de los gases [9]. En cuanto a la administración de fármacos,

los alveolos son la zona de máxima superficie y permeabilidad, por lo que esta sección del sistema respiratorio es atractiva como sitio de absorción para formulaciones de administración sistémica.

Debido a la complejidad estructural del tracto respiratorio, para acceder a bronquios, bronquiolos y/o alveolos de modo no invasivo, los fármacos se administran en forma de aerosol (gotas o partículas suspendidas en un medio gaseoso) usando dispositivos especialmente diseñados para esta aplicación y que se describen en la siguiente sección [8].

1.3 Dispositivos de administración inhalatoria

Los dispositivos frecuentemente utilizados para administrar fármacos por vía inhalatoria son:

- Nebulizadores
- Inhaladores presurizados de dosis medida (IDM)
- Inhaladores de polvo seco (IPS).

Los sistemas de nebulización son de fácil utilización, ya que no requieren destreza para la administración de la formulación, y son útiles para todas las poblaciones de pacientes quienes requerirán diferentes tipos de máscaras. Existen dos variantes de estos dispositivos: nebulizadores a pistón y ultrasónicos. En los nebulizadores a pistón, una corriente de aire presurizado se fuerza a pasar a través de un fino orificio hacia una ampolla que contiene el fármaco en un medio líquido. A medida que entra la corriente de aire, se forman finas gotas, las cuales abandonan el nebulizador en forma de niebla. Los nebulizadores ultrasónicos basan su funcionamiento en la vibración de un cristal piezoeléctrico, cuya oscilación a alta frecuencia genera ondas en el líquido que contiene el principio activo. La generación de las gotas ocurre por formación de ondas capilares y cavitación [14].

Dentro de las desventajas de los sistemas de nebulización, se pueden mencionar: el tamaño del dispositivo (no son sistemas portátiles, lo que dificulta el cumplimiento de la farmacoterapia en tratamientos crónicos); el ruido ocasionado por los equipos; el relativo alto tiempo requerido para la administración de la dosis del fármaco (20-30 minutos); y el desperdicio del principio activo debido al volumen muerto de la ampolla y a la adherencia a las paredes del reservorio. Finalmente, diferentes propiedades físicas del líquido (viscosidad y volumen del reservorio) y condiciones externas (temperatura y humedad) afectan el desempeño de los sistemas de nebulizaciones [14][15].

Los inhaladores presurizados de dosis medida representan el segmento de medicamentos inhalatorios con mayores unidades vendidas a nivel mundial [16]. La amplia adopción de este sistema se sostiene en que puede utilizarse por diferentes poblaciones de pacientes, incluyendo niños menores a cuatro años, pacientes con capacidad inspiratoria reducida y ancianos [15].

Los IDMs contienen un propelente licuado, donde el principio activo está disuelto o disperso, el cual se encuentra en equilibrio con su fase gaseosa. Tradicionalmente, los gases propelentes fueron compuestos clorofluorocarbonados (CFCs). A partir del protocolo de Montreal en 1987 y como consecuencia de su impacto en el medio ambiente, los CFCs comenzaron a reemplazarse por hidrofluoroalcanos (HFAs). De este conjunto de nuevos propelentes, los más utilizados en compuestos farmacéuticos son el HFA 134a y el 227. Si bien estos propelentes son menos nocivos para el ambiente que sus antecesores, no son completamente inocuos, ya que, aunque no contribuyen a la depleción de la capa de ozono sí lo hacen al efecto invernadero.

Otra desventaja de estos compuestos es que la mayoría de los fármacos poseen una baja solubilidad en ellos, lo que hace que sea necesario formular los IDM como suspensiones del fármaco en el propelente. Por lo tanto, la formulación tiene que diseñarse para resolver los problemas de estabilidad de partículas de fármaco en el propelente [17]. Los IDMs, en general, logran baja deposición pulmonar debido a la necesidad de coordinar la maniobra de administración y de inhalación de manera simultánea y a la alta velocidad que la pluma aerosolizada alcanza cuando se evapora el propelente; ambas situaciones favorecen el impacto orofaríngeo de la formulación [8][18].

Por su parte, los inhaladores de polvo seco son dispositivos que permiten administrar el fármaco en forma de polvo, tras una inspiración activa del paciente. Existen dos tipos de sistemas: unidosis y multidosis; cada uno de los cuales presenta diferentes variantes de cuerpos de IPSs. En el sistema unidosis, el principio activo se encuentra contenido en cápsulas, mientras que el multidosis contiene en el reservorio entre 60 y 120 dosis, las cuales se cargan en el canal de administración por modificaciones mecánicas aplicadas al inhalador [19].

En los sistemas unidosis, las cápsulas se colocan dentro del dispositivo cada vez que es necesaria la administración del fármaco. La Figura 1.3 muestra el cargado de la cápsula.

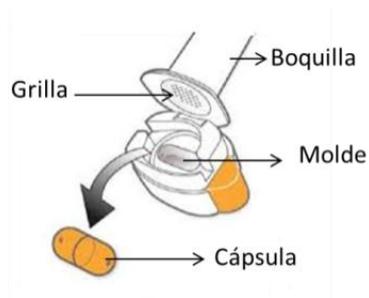


Figura 1.3. Cargado de la cápsula de gelatina en un dispositivo de IPS. Adaptado de referencia [20]

En el esquema de la Figura 1.3, la cápsula, una vez cargada en el molde, se rompe por medio de un sistema de agujas, activadas por el paciente oprimiendo los botones indicados en amarillo que se localizan a los costados del molde. Otros dispositivos de IPS (que poseen diferente cuerpo) rompen la cápsula haciendo girar la boquilla. Una vez que la cápsula se rompe (por el mecanismo que sea) el fármaco queda retenido dentro de la misma o en la cámara en la cual se encuentra, tal como se esquematiza en la Figura 1.4.

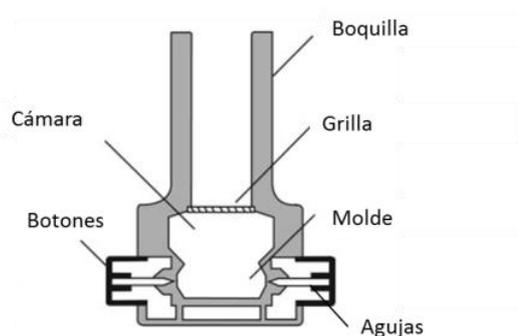


Figura 1.4. Esquema del interior de un inhalador de polvo seco. Adaptado de referencia [21]

Finalmente, el fármaco se administra mediante la inspiración del paciente, como se muestra en la Figura 1.5.

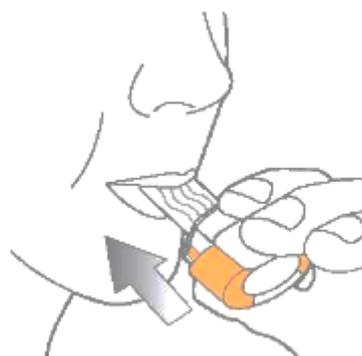


Figura 1.5. Esquema de la administración del fármaco mediante la inhalación del paciente. Adaptado de referencia [20]

Las grillas que se ilustran en las Figuras 1.3 y 1.4 ayudan a romper los aglomerados de fármacos que puedan generarse

Los IPSs surgen como una interesante alternativa que permite administrar grandes dosis de medicamentos (lo cual no es posible con los IDMs), resuelven los problemas de estabilidad respecto de las formulaciones líquidas y la necesidad de usar propelentes dañinos para la capa de ozono o que contribuyen al efecto invernadero de los sistemas IDMs, permitiendo la administración de dosis de forma exacta y reproducible. Al ser sistemas activados por la inspiración no es necesaria la coordinación entre el disparo y la inhalación, como sí ocurre en los IDMs. Si bien la técnica de inhalación es sencilla, el principal inconveniente es que se requiere un flujo respiratorio alto, razón por la cual no están recomendados para niños pequeños (menores a cuatro años) y en pacientes con limitada capacidad pulmonar (como pacientes enfermos de asma o EPOC) [22]–[24]. No obstante, cualquier solución o suspensión que pueda transformarse en forma sólida se prefiere por sobre un producto en estado líquido. En efecto, las formas sólidas, presentan una mayor estabilidad química y menor susceptibilidad a la contaminación por microorganismos. Además, son menos sensibles a variaciones de temperatura y condiciones de almacenamiento respecto a las formas líquidas [25].

Debido a estas ventajas en términos de dosificación, estabilidad y eficacia, en esta Tesis se seleccionaron los IPSs como dispositivos para la administración inhalatoria de micropartículas conteniendo fármacos.

1.4 Deposición de las partículas en el árbol respiratorio

Como previamente se mencionó, los alvéolos contribuyen de manera significativa al gran área superficial que presenta la porción respiratoria del pulmón y por lo tanto son los sitios objetivo para la mayoría de los tratamientos administrados por vía pulmonar [9]. Para llegar allí, las partículas que forman parte del IPS deben exhibir ciertos atributos específicos, principalmente en términos de tamaño [26].

El diámetro aerodinámico es una propiedad clave para establecer la deposición de las partículas en el pulmón. Se trata de un diámetro equivalente al de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad terminal que la partícula de interés [27].

Para acceder al pulmón, el diámetro aerodinámico de las partículas debe ubicarse entre 0,5 y 5 μm . Una fracción de las mismas se depositará en la región bronquial, principalmente en los bronquiolos terminales y respiratorios (diámetros aerodinámicos entre 3-5 μm [9][10]), lo que permite el tratamiento de afecciones locales, como asma y bronquitis crónica. Para llegar a la membrana alveolar, o lo que es lo mismo, para que el fármaco se deposite en una región donde pueda ser absorbido por la circulación sistémica, las partículas deben exhibir diámetros aerodinámicos menores a 3 μm . Partículas con diámetros mayores a 6-10 μm se depositan en la región orofaríngea, mientras que las menores a 0,5 μm son mayoritariamente exhaladas del sistema respiratorio [9][10][28].

1.4.1. Mecanismos de deposición de las partículas

La deposición de las partículas en el árbol respiratorio está gobernada por tres mecanismos principales:

- Impacto por inercia. Este mecanismo es particularmente relevante para partículas con diámetros aerodinámicos mayores a 5 μm . En las primeras porciones de la vía conductiva, la velocidad del aire respirado es alta y el flujo turbulento. Las partículas grandes a alta velocidad no siguen la trayectoria de la corriente de aire, las mismas impactan las vías aéreas y se depositan sobre ellas. Al depositarse en la región superior del tracto respiratorio, son barridas por las cilias que recubren la tráquea y finalmente deglutidas [10].
- Sedimentación. Las partículas en el rango de 0,5-5 μm ven favorecida su deposición por efecto gravitatorio cuando la velocidad del aire es relativamente baja, condición que se alcanza en la región profunda del pulmón. Cuanto más pequeñas son las partículas tienen mayor probabilidad de mantenerse en suspensión y, por lo tanto, de llegar a los sacos alveolares [10].
- Difusión por movimiento browniano. Se trata del desplazamiento errático de las partículas con diámetros aerodinámicos menores a 0,5 μm cuando llegan a la región alveolar. Por ser tan pequeñas, y aun en condiciones de baja velocidad de aire, estas partículas en general no llegan a depositarse y se eliminan con el aire exhalado [10].

1.5 Mecanismos de remoción de partículas

Luego de que las partículas del fármaco se depositan en el tracto respiratorio, las mismas pueden disolverse para actuar localmente, sufrir metabolización y/o pasar a circulación sistémica o ser eliminadas de las vías respiratorias.

- **Absorción.** Uno de los mecanismos de eliminación de las partículas depositadas en el pulmón es a través de su disolución en el fluido del pulmón y su posterior absorción sistémica. El epitelio pulmonar está cubierto por capas finas de mucus y surfactante, los cuales constituyen barreras a la absorción de fármacos. Sin embargo, si los principios activos son lipofílicos, ellos pueden atravesar estas barreras y posteriormente el epitelio con relativa facilidad (mecanismo de difusión pasiva). Por el contrario, si los activos son hidrofílicos, la absorción será a través de difusión paracelular, utilizando poros intercelulares [9][28]. Cabe destacar que, si se pretende lograr un tratamiento sistémico a través de la vía inhalatoria, este mecanismo de eliminación se convierte en un paso fundamental para lograr la acción terapéutica.
- **Metabolismo pulmonar.** Las enzimas pulmonares presentes en el árbol respiratorio pueden metabolizar los principios activos que ingresen allí luego de su disolución en los fluidos pulmonares. Sin embargo, debe considerarse que la capacidad metabólica de los pulmones es considerablemente menor que la del hígado y la mayoría de los compuestos (desde moléculas pequeñas hasta proteínas) muestran biodisponibilidad casi completa cuando se las administra por vía inhalatoria [9][29].
- **Barrido o *clearance* mucociliar y tos.** Las porciones superiores del tracto respiratorio (tráquea y bronquios) están recubiertas por cilias, las cuales con el número y la frecuencia de batido afectan el movimiento del mucus del epitelio pulmonar y, por lo tanto, el movimiento de las partículas atrapadas en él. Las células ciliadas son las responsables de remover las secreciones y las partículas extrañas que se depositan en el sistema respiratorio. Este sistema de "limpieza" se conoce como barrido mucociliar (*clearance mucociliar*) [9]. Por su parte, la tos también facilita la expulsión de partículas depositadas en las vías aéreas superiores. Este mecanismo es menos importante que el barrido mucociliar en personas sanas, pero cobra importancia en situaciones patológicas como asma y enfermedades obstructivas (patologías en las cuales se reduce la actividad ciliar) [29]. Para sortear estos mecanismos de eliminación de partículas y prolongar el tiempo de residencia de las formulaciones en el pulmón, se han propuesto los sistemas inhalatorios mucoadhesivos [30].

- Fagocitosis. Los macrófagos alveolares son células del sistema inmunitario y tienden a fagocitar las partículas depositadas en los alveolos. La fagocitosis es particularmente relevante para partículas entre 1,5 y 3 μm poco solubles en el fluido pulmonar. Este mecanismo de eliminación mediante fagocitosis ha limitado, en parte, la eficiencia de los sistemas de liberación modificada en el pulmón [9][10].

1.6 Técnicas de obtención de sistemas particulados para administración inhalatoria

Teniendo en cuenta las ventajas de los IPSs en términos de estabilidad y eficacia, se han estudiado diferentes tecnologías de producción de polvos aptos para la administración pulmonar haciendo uso de este tipo de dispositivos. Especial énfasis se ha puesto en métodos de manufactura económicos, simples y que produzcan el sistema particulado con las propiedades aerodinámicas adecuadas para su inhalación, su absorción en los sitios de acción seleccionados, que evite su aglomeración durante el almacenamiento y que sea de fácil dispersión al momento de su aplicación [26].

La mayoría de los IPSs actualmente disponibles en terapéutica contienen partículas muy pequeñas (tal como se indicó, del orden de pocos micrones), mayoritariamente obtenidas por micronización del material sólido que contiene el principio activo. La materia prima es en general producida por cristalización (proceso seguido de una etapa de filtración, secado y molienda) o bien por granulación (tecnología que puede requerir también una etapa de secado del producto y su molienda). La reducción de tamaño de las partículas se puede lograr mediante presión, atrición, impacto, etc. [26].

Entre las técnicas más empleadas para la producción de sistemas inhalables puede mencionarse la molienda por chorro (*jet milling*). En este proceso, las partículas originales colisionan entre sí forzadas por chorros de aire a presión. Si bien la mayoría de los productos comerciales que contienen partículas de administración inhalatoria se obtienen empleando esta tecnología, como desventajas pueden mencionarse que la micronización requiere relativamente largos tiempos de procesamiento hasta lograr el tamaño de partícula adecuado para la administración inhalatoria. Además puede inducir cargas electrostáticas en el polvo tornándolo cohesivo y adhesivo. En casos extremos, el conjunto del material puede tornarse amorfo y sufrir procesos de recristalización que conducen al crecimiento de cristales en la superficie de las partículas molidas, formación de puentes sólidos interparticulares y consecuentemente a la aglomeración del polvo original. La técnica de molienda por chorro no

es adecuada para manipular material frágil, poroso o de superficie modificada, como lo son los materiales revestidos o encapsulados [26].

Otra técnica empleada es el método basado en emulsiones. La misma implica la preparación de emulsiones dobles (fases acuosa y oleosa) o triples (fases acuosa/oleosa/acuosa) seguida de la posterior eliminación de la fase oleosa que contiene el principio activo (en general un solvente orgánico volátil) mediante evaporación, extracción utilizando un antisolvente o intercambio de solventes. Los inconvenientes de las técnicas de precipitación a base de emulsiones se encuentran relacionados con la complejidad del proceso de manufactura. El mismo implica varias etapas, trae aparejado la generación de una alta cantidad de residuos y requiere extrema precaución para eliminar todos los solventes orgánicos residuales [26].

Las técnicas de obtención de partículas mediante el empleo de fluidos supercríticos (FSC) han surgido como una alternativa a los procesos convencionales de precipitación. Los FSCs son fluidos que se encuentran en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico y poseen propiedades intermedias entre líquido y gas, otorgándole ventajas considerables como alta difusividad y densidad, baja viscosidad y casi nula tensión superficial. Las distintas metodologías varían de acuerdo al papel que desempeña el fluido supercrítico en el sistema, ya sea como solvente (*rapid expansion of supercritical solutions*-RESS), antisolvente (*supercritical antisolvent*-SAS, *gas antisolvent system*-GAS, *solution enhanced dispersion by supercritical fluids*-SEDS) o soluto (*particles from gas saturated solutions*-PGSS). El FSC más empleado en la industria farmacéutica es el CO₂ supercrítico, debido a su bajo costo, seguridad, disponibilidad y a sus parámetros críticos accesibles. Esta tecnología permite obtener partículas de pequeño tamaño y distribución estrecha, con menor densidad libre y morfología controlada. Sin embargo, presenta como desventaja principal la necesidad de trabajar a alta presión, con equipos especializados, y el uso de solventes orgánicos para disolver los fármacos [31].

El secado por atomización (*spray drying*) es una técnica muy usada para la producción de sistemas particulados. Esta popularidad se debe a su simplicidad, facilidad de operación y capacidad de producir polvos co-procesados (i.e., conteniendo varios compuestos) en un solo paso. Sin embargo, la producción de partículas para ser administradas por vía inhalatoria constituye un campo relativamente nuevo. La razón principal se debe a que las partículas requeridas para este tipo de formulación son muy pequeñas, tamaños que se encuentran en el límite inferior de la capacidad de producción de esta tecnología. Un proceso típico de secado por atomización consta de diferentes etapas principales: (1) la atomización de una

solución/dispersión/emulsión la cual se realiza con ayuda de aire a presión; (2) el secado de las finas gotas atomizadas haciendo uso de aire caliente y (3) la separación del polvo seco del aire mediante el uso de ciclones. Para cada una de estas etapas de trabajo, existen diversas variables de diseño y operativas que se pueden regular para obtener partículas con los atributos deseados. Respecto a las condiciones operativas, es posible ajustar el caudal de la solución/dispersión/emulsión a atomizar, la temperatura y caudal del aire de secado y el caudal o presión del aire de atomización [26][32][33]. La formulación del líquido a atomizar (i.e., concentración de sólidos, contenido de solventes, tipos de solutos) en conjunción con las condiciones operativas afectan la morfología de las partículas resultantes [34] y consecuentemente las propiedades aerodinámicas de las mismas. Adicionalmente, existen diferentes tipos de ciclones para coleccionar las partículas producidas. Se ha reportado que el uso de ciclones de alta performance logran maximizar la recolección de partículas en el rango inhalable [35]. Respecto de la estabilidad de los materiales procesados, una desventaja potencial del método es la factibilidad de la degradación térmica de los productos debido al uso de aire caliente para favorecer el secado. Sin embargo, la alta temperatura de entrada del aire de secado (que puede seleccionarse y controlarse con precisión) disminuye drásticamente a medida que se evapora el solvente (por ejemplo agua) que acompaña a la alimentación líquida que se atomiza en el equipo y contiene el principio activo entre otros excipientes. Por otro lado, el corto tiempo de residencia de las gotas finamente atomizadas en la cámara de secado minimizan la factibilidad de degradación térmica. De esta manera, las aplicaciones de esta tecnología se expanden día a día como consecuencia de que es posible manipular las condiciones operativas del proceso para la producción de polvos con los atributos deseados [23][26][32]. Diversos autores reportaron la obtención de sistemas particulados de administración inhalatoria mediante esta técnica [36]–[41].

1.7 Diseño de micropartículas para IPS

El desarrollo de partículas porosas o huecas es un campo de interés para la producción de sistemas de administración inhalatoria. El diámetro aerodinámico puede mantenerse en un valor adecuado aun cuando se trabaje con partículas de mayor tamaño geométrico a expensas de la disminución en la densidad. Consecuentemente, se obtienen sistemas con mayor dispersabilidad [26][42]. Tal es el caso de las partículas de alta porosidad *PulmoSphere*[®], producto comercial para el tratamiento de fibrosis quística [26][42]

Por otra parte y aunque los IPSs están constituidos principalmente por fármacos puros micronizados, se reconoce que las micropartículas multicomponente permite optimizar el desempeño de los materiales. En la literatura científica se reportó el co-procesamiento de dos o más principios activos [43] y mezclas de principio activo-excipientes [44] que condujeron principalmente a cambios en las propiedades de los sólidos a nivel particulado y a granel [43]-[46].

1.7.1. Polímeros para el diseño de sistemas particulados inhalables

Se ha reportado que la obtención de partículas co-procesadas conteniendo fármacos y polímeros biodegradables constituye una opción muy atractiva en la terapia inhalable. La incorporación de polímeros adecuadamente seleccionados permiten: prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el pulmón (polímeros mucoadhesivos) lo cual habilita a reducir la dosis diaria en los tratamientos crónicos y consecuentemente minimizar los efectos adversos; remover mucus en enfermedades donde la producción es excesiva (polímeros mucolíticos); aumentar la estabilidad durante el almacenamiento de la formulación; superar las barreras fisiológicas que el sistema respiratorio impone a la administración local y sistémica de principios activos (e.g., evitando el reconocimiento por los macrófagos alveolares), entre otros efectos benéficos [47][48].

1.7.2. Polielectrolitos de administración inhalatoria

Entre los polímeros que se han empleado para desarrollar formulaciones de administración inhalatoria, los polielectrolitos han sido foco de numerosos estudios [49]–[51]. Estas macromoléculas están constituidas por unidades repetitivas que presentan grupos funcionales ionizables, positivos y/o negativos. Estos grupos se disocian en soluciones acuosas, dejando iones libres asociados con la cadena polimérica [52]. Se los puede clasificar según el origen de los mismos (naturales, sintéticos o semisintéticos) o el tipo de carga que exhiban (catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos).

Para la formulación de principios activos, los polielectrolitos deben poseer importantes propiedades como lo son la biodegradabilidad y biocompatibilidad. La biocompatibilidad indica que, al entrar en contacto con tejidos humanos, el material no genera daños ni tiene efectos tóxicos. Desde el punto de vista de la aplicación farmacéutica, la biodegradabilidad se refiere a

que la ruptura de la cadena original da lugar a pequeñas cadenas o monómeros que puedan metabolizarse o eliminarse [49].

1.7.3. Sistemas polielectrolito-fármaco

Los polielectrolitos tienen la capacidad de interactuar con contraiones orgánicos o inorgánicos. La interacción entre principios activos con cargas en su estructura y polímeros ionizables permite la formación de nuevas entidades, con propiedades químicas, fisicoquímicas y/o biofarmacéuticas diferenciadas de los fármacos puros [52][53]. Esta estrategia se ha empleado para la administración de fármacos por diferentes vías, incluyendo la inhalatoria.

1.7.4. Sistemas polielectrolito-fármaco para IPSs

Con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad, estabilidad o el desempeño terapéutico de formulaciones, distintos fármacos con problemas de administración por vía oral se asociaron mediante interacciones iónicas con polielectrolitos de carga opuesta para su administración por vía inhalatoria. Los factores reportados como más influyentes en la formación de complejos iónicos son el pH, la fuerza iónica, la relación fármaco/polielectrolito y el medio en el cual se produce la interacción [54]–[56].

En particular, la obtención de sistemas polielectrolito-fármaco para administrar como formulaciones de IPSs se ha centrado en la formulación de antibióticos para tratamientos locales. Debido a las ventajas de administrar estos activos directamente en el pulmón para el tratamiento de la tuberculosis o infecciones concomitantes a otras enfermedades respiratorias (producto de las alteraciones provocadas por la fibrosis quística), Cheow y Hadinoto [55] y Kho y Hadinoto [56] propusieron la formación de complejos entre antibióticos fluoroquinolónicos y dextrano, donde el polielectrolito estabiliza al fármaco que se encuentra en estado amorfo. Nanoagregados de nanopartículas conteniendo vancomicina se obtuvieron mediante interacción iónica con ácido poliacrílico, el cual otorgó estabilidad a los nanoagregados evitando su aglomeración [57].

Además de la interacción polielectrolito-fármaco, también resulta interesante el estudio de sistemas compuestos por dos polielectrolitos de carga opuesta. Mediante la técnica de capa-por-capla (*layer-by-layer*) y posterior secado por atomización, Manca y col. obtuvieron partículas formadas por la interacción iónica entre carragenato y quitosano, cargando

rifampicina. La presencia de los polielectrolitos aumentó la permanencia de las partículas en el pulmón, lo que permitió distanciar el intervalo de dosificación [58].

Si bien estos antecedentes son interesantes, hasta el momento no se ha estudiado el desempeño de formulaciones de IPSs conteniendo polímeros y fármacos ionizables para administración sistémica, ni se han explorado las relaciones entre la calidad de los sistemas particulados y las variables de formulación y/o de proceso de producción. De esta manera, en esta Tesis se plantea realizar aportes en las temáticas no exploradas estudiando materiales polielectrolito-fármaco obtenidos mediante secado por atomización.

1.8 Fármacos seleccionados para formular sistemas de administración inhalatoria

Teniendo en cuenta el interés creciente en formular fármacos como IPS destinados a tratamientos sistémicos, se identificó que existen una gran variedad de familias de principios activos cuya administración presenta desafíos en cuanto a su desempeño o sus efectos colaterales. Dichas familias poseen propiedades y efectos farmacológicos muy distintos. Entre ellos se encuentran: hormonas sexuales, fármacos cardíacos, antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos opioides, antivirales, antihistamínicos, proteínas, péptidos, antígenos y ADN plasmídico [3][59]. Algunos de estos principios activos también se proponen para tratamientos locales.

Para esta Tesis se seleccionaron dos fármacos, uno exhibiendo grupos básicos en su estructura y otro exhibiendo grupos ácidos. Los principios activos seleccionados son atenolol e indometacina, los cuales son utilizados para el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia en la población. Sin embargo, la administración oral de ambos principios activos plantea dificultades, las cuales podrían salvarse utilizando vías alternativas, como la inhalable.

1.8.1. Atenolol

Atenolol es un fármaco básico de extenso uso para el tratamiento de la hipertensión arterial. Esta patología se define como la elevación crónica de la presión arterial, cuya progresión lleva a daños cardíacos, renales, cerebrales y vasculares, los cuales determinan una morbi-mortalidad temprana. La prevalencia mundial de esta afección es de alrededor de mil millones de afectados, lo que ocasiona aproximadamente 7 millones de muertes anuales [60]. En la Argentina, el 15 % de los pacientes que padecen enfermedades crónicas son hipertensos [61].

Los fármacos β -1-bloqueantes son de segunda elección para el tratamiento de la hipertensión arterial, por detrás de los diuréticos. Para pacientes que sufren de enfermedades cardíacas, los principios activos de la familia de los β -1-bloqueantes constituyen la primera línea del tratamiento farmacológico de la hipertensión [60]. Por otra parte, la prevalencia de la arritmia cardíaca se duplicó en los últimos diez años. Esto se debe, en parte, al aumento de la esperanza de vida de la población mayor. La fibrilación atrial es la arritmia crónica más común, siendo su prevalencia mundial del 2 % en la población general. Si bien esta enfermedad no pone en peligro la vida de los pacientes, sí disminuye la calidad de vida y aumenta marcadamente la morbi-mortalidad de personas que sufren, en simultáneo con la arritmia, otras enfermedades cardíacas como infarto de miocardio y falla cardíaca [62][63]. Para el tratamiento agudo del ritmo cardíaco irregular como para tratamientos antiarrítmicos crónicos se utilizan fármacos β -1-bloqueantes, entre otras familias de fármacos [64].

Atenolol es un principio activo muy interesante para su administración por vía pulmonar ya que presenta baja biodisponibilidad oral [65], efectos adversos gastrointestinales [66] y en el sistema nervioso central, siendo estos últimos dependientes de la dosis [67]. Además, para tratamientos antiarrítmicos [68], se requiere un rápido comienzo de acción y la concentración del activo en la circulación cardíaca, situaciones ambas que pueden conseguirse mediante la administración pulmonar [68].

El uso de antiarrítmicos por vía inhalatoria se propone como la ruta más rápida para acceder al corazón, solo comparable con la administración intracardíaca, la cual requiere de manera excluyente una maniobra por profesionales capacitados y un ambiente hospitalario. La ventaja dada por la sencillez de la administración por vía oral de estos activos se contrapone con la necesidad para el tratamiento de arritmias de proveer dosis elevadas y rápida acción (el tiempo de acción por vía oral es de alrededor de 60 minutos). Por su parte, la administración intravenosa causa la dilución del fármaco en el volumen sanguíneo, el cual se distribuye ampliamente por diferentes tejidos antes de alcanzar la circulación cardíaca causando efectos adversos sistémicos. Además, este tipo de administración requiere de un ambiente hospitalario, poco cómodo para el paciente [68].

Hasta el momento, no existen formulaciones inhalables de atenolol comercialmente disponibles. Aunque hay antecedentes patentados que se enfocan en el método de administración pulmonar de fármacos antiarrítmicos (entre los que se encuentra este fármaco) [68] y en una nueva tecnología adecuada para la administración de fármacos por vía inhalatoria basada en un sistema de vaporización-condensación que fue aplicado

satisfactoriamente a atenolol [69]. Los desarrollos de sistemas de vaporización-condensación se encuentran en estudio y permiten generar partículas de muy pequeño tamaño (~100 nm). Sin embargo, estos sistemas no son de sencillo diseño; se basan en esparcir una pequeña cantidad de una solución conteniendo el principio activo sobre una superficie metálica y dejar evaporar el solvente de la solución. En general, se requieren solventes orgánicos para lograr una fina capa del fármaco, los cuales deben evaporarse completamente. Las partículas del aerosol se generan calentando la superficie metálica para generar un vapor y luego haciendo pasar una corriente de aire que lo enfríe, provocando la condensación en partículas [69][70]. En esta tecnología la sustancia a evaporar debe ser térmicamente estable [71]. Para el caso particular de atenolol, la pureza de las partículas producidas es alta pero los rendimientos son significativamente más bajos que los alcanzados con otras sustancias evaluadas. Aun así, el sistema prevé el ajuste de la dosis emitida en cierta extensión permitiendo ampliar el área del film a partir del cual se genera el aerosol [69].

En esta Tesis, atenolol se co-procesó mediante secado por atomización con ácido algínico (polielectrolito ácido). Las características de este compuesto y sus usos en la industria farmacéutica se presentan en el Capítulo 3. Las micropartículas obtenidas constituyen una formulación innovadora para la administración inhalatoria de atenolol, con ventajas competitivas relacionadas con la simplicidad de administración respecto de los sistemas patentados de vaporización/condensación. Por otra parte, en la literatura científica no se reportan sistemas de administración inhalatoria conteniendo atenolol.

1.8.2. Indometacina

Como fármaco ácido se seleccionó indometacina, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que se utiliza como analgésico y antiinflamatorio. El dolor crónico es una de las principales causas de discapacidad a nivel mundial con una prevalencia de 12-30 % [72]. La mitad de los pacientes que reporta sufrir dolor indica que el mismo es constante. Para el abordaje de esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso en el año 1986 el concepto de la escalera analgésica, donde el primer escalón de la terapia del dolor está constituido por los AINEs [73].

Se estima que 30 millones de personas en el mundo utilizan AINEs diariamente. En Argentina esta familia de fármacos constituyó el segundo grupo de medicamentos más vendidos en el período 2005-2010 [74]. En un estudio observacional se determinó que casi el 60 % de los

pacientes que concurría a consultas por patologías reumatológicas consumía AINEs para el tratamiento sintomático del dolor asociado a estas enfermedades [75]. En síntesis, se trata de principios activos de intensivo uso en terapéutica.

Indometacina presenta importantes efectos adversos gastrointestinales, lo que ha limitado, en parte, su utilización en tratamientos crónicos como la artritis reumatoide y la osteoartritis [76]. Además, demostró eficacia en el tratamiento de la respuesta inflamatoria bronquial específica e inespecífica del asma, como así también otras afecciones inflamatorias pulmonares [77]. Sin embargo, la administración oral de la dosis de indometacina necesaria para lograr concentraciones terapéuticas en el pulmón se ve limitada debido a la aparición de efectos adversos gastrointestinales [77].

La vía inhalatoria aparece como una interesante alternativa para la administración de este fármaco. En efecto, existe una patente donde se propone suministrar indometacina para tratamientos locales en pulmón mediante nebulizadores. La formulación y la técnica de administración permitieron exitosamente la terapéutica de los estímulos bronquiales no específicos en pacientes asmáticos, sin presentar efectos adversos [77].

En la literatura científica se reportó que la obtención de nanopartículas de indometacina utilizando la técnica de evaporación/condensación, administradas por vía inhalatoria, demostraron ser efectivas para el tratamiento de inflamaciones articulares, requiriendo menores dosis respecto de la vía oral para lograr el efecto antiinflamatorio. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, esta tecnología no es portable, todavía está en estudio y resulta difícil conocer la dosis que efectivamente llega al pulmón [71]. Además, cabe resaltar que partículas con diámetros menores a $0,5 \mu\text{m}$ difícilmente se depositen de manera efectiva en el pulmón.

De acuerdo a los antecedentes relevados, el desarrollo de micropartículas de indometacina para tratamientos locales o sistémicos mediante el uso de IPSs con alta deposición pulmonar constituye un desafío por un lado para resolver los problemas de estabilidad asociados a las formulaciones que involucran preparaciones líquidas y por otro para garantizar la deposición de las partículas en la región profunda del pulmón. En esta Tesis, este fármaco se formula como micropartículas poliméricas co-procesadas obtenidas mediante secado por atomización. El polielectrolito seleccionado para obtener el complejo iónico fue polilisina y las partículas se diseñaron para la administración pulmonar del activo en formulaciones de IPS. Las propiedades farmacológicas de indometacina y las propiedades de polilisina se presentan en el Capítulo 4.

1.9 Relevancia de los medicamentos de vía inhalatoria en el mercado farmacéutico

Se ha presentado previamente el estado del arte en relación a la temática de la Tesis. Aun así resulta interesante introducir algunos datos del mercado farmacéutico que ilustren la relevancia de estos productos para el sector industrial. Aunque se mencionó inicialmente que los medicamentos de administración oral son de elección en numerosas enfermedades, de acuerdo a un reporte sectorial, el medicamento líder en facturación a nivel mundial en 2012 fue un producto de administración inhalatoria. Se trata de una asociación de fluticasona propionato y salmeterol xinafoato efectiva para el tratamiento del asma y EPOC, que se encuentra bajo la forma de IPS o IDM. Por otra parte, se espera que el mercado de medicamentos inhalables aumente en un 50 % entre 2015 y 2025 [78]. Esta tendencia se puede asociar a una combinación de factores [78]: a) aumento de la prevalencia de enfermedades alérgicas y obstructivas [79][80]; b) aumento de la esperanza de vida [78]; c) falta de políticas públicas destinadas al tratamiento precoz de algunas enfermedades pulmonares crónicas [81], d) desarrollo tecnológico y diversificación de productos inhalatorios para tratar otras patologías [3][82][83].

Para el caso particular de los IPSs, tecnología más reciente, se espera un incremento de la oportunidad de mercado del 43 % entre 2015 y 2025 [78]. Estos sistemas de administración inhalatoria representan los mayores ingresos del mercado de medicamentos inhalables por unidad dispensada, aunque los IDMs los superan ampliamente en el número de unidades vendidas en todo el mundo, excepto en el mercado Japonés [16].

La mayoría de los IPSs disponibles en terapéutica, se encuentran enfocados al tratamiento de enfermedades pulmonares: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis quística. Para tratar estas afecciones, los fármacos formulados son: β -agonistas (salbutamol, salmeterol, indacaterol, tiotropio, entre otros), esteroides (beclometasona, budesonida, mometasona), anticolinérgicos (tiotropio, aclidinio) y antiinfecciosos (tobramicina) [3]. Es un área en la que existen múltiples dispositivos de administración para un número limitado de fármacos. Sin embargo, esta característica está cambiando y han ingresado al mercado internacional IPSs para tratamientos sistémicos. Recientemente, la FDA aprobó la administración de insulina por vía inhalatoria [82] y fuera del mercado de Estados Unidos se comercializa un IPS conteniendo loxapina para el tratamiento de la esquizofrenia [83]. Además, nuevas formulaciones de IPSs de administración sistémica se encuentran en fases de pruebas preclínicas y clínicas. Tal es el caso de la levodopa para el tratamiento del Parkinson [83].

La creciente inclusión de nuevos grupos terapéuticos a formulaciones de IPS se encuentra en línea con el enfoque de esta Tesis en los que se han seleccionado fármacos para el tratamiento de hipertensión, arritmias, dolor e inflamación (según sea el caso).

Todos estos datos y tendencias sugieren que los medicamentos inhalatorios son atractivos para las industrias enfocadas en la innovación o en la producción de medicamentos genéricos. Por esto en el mundo, son numerosas las empresas dedicadas al desarrollo y manufactura de medicamentos de administración pulmonar, entre ellas: AstraZeneca, Beximco Pharmaceuticals, Boehringer Ingelheim GmbH, Cipla, GlaxoSmithKline, Merck & Co, OMRON Healthcare Europe, PARI Medical Holding y Teva Pharmaceutical Industries [78].

1.10 Objetivos de la Tesis

Considerando la utilidad terapéutica de los fármacos seleccionados, las ventajas que la administración por vía pulmonar plantea, la posibilidad de generar nuevos materiales mediante asociaciones polielectrolito-fármaco y los atributos positivos de los IPSs respecto a la dosificación y estabilidad e interés industrial, en esta Tesis se diseñaron, produjeron y evaluaron partículas inhalables de indometacina y atenolol.

Estas formulaciones, basadas en co-procesados con polielectrolitos de carga opuesta mediante secado por atomización, constituyen opciones terapéuticas para tratamientos locales y sistémicos. Las mismas podrían contribuir a mejorar la terapéutica de enfermedades crónicas disminuyendo los efectos adversos, y logrando un rápido comienzo de acción en casos donde se requiere una inmediata intervención farmacológica.

En este contexto, el objetivo global de esta Tesis es el desarrollo de formulaciones innovadoras efectivas de antihipertensivos/antiarrítmicos y antiinflamatorios para ser administrados por vía inhalatoria.

Por su parte, los objetivos específicos perseguidos son:

- Formular complejos polielectrolito-fármaco en solución acuosa con atributos adecuados para su procesamiento por secado por atomización, seleccionado polímeros y composiciones relativas.

- Establecer las condiciones operativas más adecuadas del secado por atomización para obtener partículas con propiedades apropiadas para su aplicación farmacéutica en inhaladores de polvo seco.
- Desarrollar capacidades para la medición confiable de propiedades físico-químicas, farmacéuticas y biofarmacéuticas *in vitro* de los materiales obtenidos. Evaluar especialmente las propiedades de tamaño, morfología, aerosolización, liberación y permeación a través de membranas de los materiales co-procesados.
- Valorar de manera preliminar la performance de los productos desarrollados en cultivos celulares modelo.

1.11 Bibliografía

- [1] S. W. Stein and C. G. Thiel, "The History of Therapeutic Aerosols: A Chronological Review," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 29, no. 0, pp. 1–22, 2016.
- [2] D. A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. BenJebria, M. Lou Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, A. Ben-jebria, M. Lou Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, and R. Langer, "Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery," *J Appl Physiol*, vol. 85, pp. 379–385, 1998.
- [3] D. C. Cipolla and I. Gonda, "Formulation technology to repurpose drugs for inhalation delivery," *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, vol. 8, pp. 123–130, 2011.
- [4] A. K. Yazdi and H. D. C. Smyth, "Hollow crystalline straws of diclofenac for high-dose and carrier-free dry powder inhaler formulations," *Int. J. Pharm.*, vol. 502, pp. 170–180, 2016.
- [5] K. Moebus, J. Siepmann, and R. Bodmeier, "Novel preparation techniques for alginate – poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 45, no. 3, pp. 358–366, 2012.
- [6] L. Illum, "Nasal drug delivery: New developments and strategies," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 23, pp. 1184–1189, 2002.
- [7] L. Illum, "Nasal drug delivery: Possibilities, problems and solutions," *J. Control. Release*, vol. 87, pp. 187–198, 2003.
- [8] D. Traini and P. M. Young, "Inhalation and Nasal Products," in *Inhalation Drug Delivery: Techniques and Products*, 1st Edition, P. Colombo, D. Traini, and F. Buttini, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 15–30.
- [9] D. Traini, "Inhalation Drug Delivery," in *Inhalation Drug Delivery: Techniques and Products*, 1st Editio., P. Colombo, D. Traini, and F. Buttini, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 1–14.
- [10] R. Verma, M. Ibrahim, and L. Garcia-Contreras, "Lung Anatomy and Physiology and Their Implications for Pulmonary Drug Delivery," in *Pulmonary Drug Delivery: Advances and Challenges*, 1st Edition, A. Nokhodchi and G. Martin, Eds. John Wiley & Sons, 2015, pp. 1–18.
- [11] A. Silva, "Sistema respiratorio: Anatomía y Fisiología," <http://pt.slideshare.net/lannasilva14/respiratrio-31219809>, 2014. .
- [12] C. M. Cernadas, "Generalidades del sistema respiratorio," in *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*, 2003, pp. 105–111.
- [13] "Aparato respiratorio: introducción," <http://smpatologia.blogspot.com.ar/2013/08/aparato-respiratorio-introduccion.html>, 2013.
- [14] A. Gibbons and H. D. C. Smyth, "Science and Technology of Nebulizers and Liquid-Based Aerosol Generators," in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 1st Edition, H. D. C. Smyth

and A. J. Hickey, Eds. Springer, 2011, pp. 223–236.

- [15] A. Ari and J. B. Fink, “Guidelines for aerosol devices in infants, children and adults: which to choose, why and how to achieve effective aerosol therapy.,” *Expert Rev. Respir. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 561–572, 2011.
- [16] J. N. Pritchard, “Industry guidance for the selection of a delivery system for the development of novel respiratory products,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 11, pp. 1755–1765, 2015.
- [17] P. B. Myrdal, P. Sheth, and S. W. Stein, “Advances in metered dose inhaler technology: formulation development.,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 2, pp. 434–455, 2014.
- [18] N. Washington, C. Washington, and C. Wilson, Eds., “Pulmonary drug delivery,” in *Physiological Pharmaceutics. Barriers to Drug Absorption*, 2nd Edition, Taylor and Francis, 2001, pp. 221–247.
- [19] M. Rosas-Vargas, J. del Rio-Chivardi, E. Castro-Hidalgo, B. E. del Rio-Navarro, and J. J. L. Sienra-Monge, “Types and characteristics of devices for the treatment of asthma,” *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, vol. 62, no. 4, pp. 273–286, 2005.
- [20] Imed.es, “Seebri Breezhaler 44 Microgramos Polvo Para Inhalacion: Ficha técnica,” <https://imedi.es/seebri-breezhaler-44-microgramos-polvo-para-inhalacion>.
- [21] “Fibrosis Quística en México,” [Http://clinicafaq-ceprep.blogspot.com.ar/2010/08/dispositivos-para-inhalacion-de_11.html](http://clinicafaq-ceprep.blogspot.com.ar/2010/08/dispositivos-para-inhalacion-de_11.html), 2010.
- [22] D. I. Daniher and J. Zhu, “Dry powder platform for pulmonary drug delivery,” *Particuology*, vol. 6, no. 4, pp. 225–238, 2008.
- [23] H. M. Mansour, Y. S. Rhee, and X. Wu, “Nanomedicine in pulmonary delivery.,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 4, pp. 299–319, 2009.
- [24] F. Buttini, P. Colombo, A. Rossi, F. Sonvico, and G. Colombo, “Particles and powders: Tools of innovation for non-invasive drug administration.,” *J. Control. Release*, vol. 161, pp. 693–702, 2012.
- [25] A. Zahoor, S. Sharma, and G. K. Khuller, “Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis.,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 4, pp. 298–303, 2005.
- [26] A. Chow, H. Tong, P. Chattopadhyay, and B. Shekunov, “Particle engineering for pulmonary drug delivery,” *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 3, pp. 411–437, 2007.
- [27] A. H. de Boer, D. Gjaltema, P. Hagedoorn, and H. W. Frijlink, “Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique,” *Int. J. Pharm.*, vol. 249, pp. 219–231, 2002.
- [28] K. P. O’Donnell and H. D. C. Smyth, “Macro- and Microstructure of the Airways for Drug Delivery,” in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 1st Edition, H. D. C. Smyth and A. J. Hickey, Eds. Springer, 2011, pp. 1–19.
- [29] B. Olsson, E. Bondesson, L. Borgström, S. Edsbäcker, S. Eirefelt, K. Ekelund, L. Gustavsson, and T. Hegelund-Myrbäck, “Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption,” in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 1st Edition, H. D. C. Smyth and A. J.

Hickey, Eds. Springer, 2011, pp. 21–50.

- [30] I. M. El-Sherbiny, D. G. Villanueva, D. Herrera, and H. D. C. Smyth, "Overcoming Lung Clearance Mechanisms for Controlled Release Drug Delivery," in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 1st Edition, H. D. C. Smyth and A. J. Hickey, Eds. Springer, 2011, pp. 101–116.
- [31] S. Do Yeo and E. Kiran, "Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 34, no. 3, pp. 287–308, 2005.
- [32] L. Gallo, J. M. Llabot, D. Allemandi, V. Bucalá, and J. Piña, "Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties," *Powder Technol.*, vol. 208, no. 1, pp. 205–214, 2011.
- [33] A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, C. Rossi, and M. Ricci, "Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation," *Chem. Eng. J.*, vol. 160, no. 1, pp. 363–369, 2010.
- [34] R. P. Raffin, D. S. Jornada, I. Ré, A. Pohlmann, and S. S. Guterres, "Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation," *Int. J. Pharm.*, vol. 324, pp. 10–18, 2006.
- [35] K. B. Prinn, H. R. Costantino, and M. Tracy, "Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [36] N. E. Ceschan, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "New alginic acid-atenolol microparticles for inhalatory drug targeting.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 41, pp. 255–266, 2014.
- [37] P. Opanasopit, T. Rojanarata, A. Apirakaramwong, T. Ngawhirunpat, and U. Ruktanonchai, "Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes.," *Int. J. Pharm.*, vol. 382, pp. 291–295, 2009.
- [38] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Self-assembled amorphous drug – polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 367, no. 1, pp. 518–526, 2012.
- [39] L. Cruz, E. Fattal, L. Tasso, G. C. Freitas, A. B. Carregaro, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, and N. Tsapis, "Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery.," *J. Control. Release*, vol. 152, no. 3, pp. 370–375, 2011.
- [40] I. M. El-Sherbiny and H. D. C. Smyth, "Controlled release pulmonary administration of curcumin using swellable biocompatible microparticles.," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 2, pp. 269–280, 2012.
- [41] N. E. Ceschan, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "Polymeric microparticles containing indomethacin for inhalatory administration," *Powder Technol.*, vol. 285, pp. 51–61, 2015.
- [42] R. Vehring, "Pharmaceutical particle engineering via spray drying.," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 999–1022, 2008.
- [43] P. Ispas-Szabo, M. M. Friciu, P. Nguyen, Y. Dumoulin, and M. A. Mateescu, "Novel self-assembled mesalamine–sucralfate complexes: preparation, characterization, and

- formulation aspects," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 42, no. 7, pp. 1183–1193, 2016.
- [44] I. Soulairol, N. Tarlier, B. Bataille, T. Cacciaguerra, and T. Sharkawi, "Spray-dried solid dispersions of nifedipine and vinylcaprolactam/vinylacetate/PEG6000 for compacted oral formulations," *Int. J. Pharm.*, vol. 481, pp. 140–147, 2015.
- [45] K. Nidhi, S. Indrajeet, M. Khushboo, K. Gauri, and D. J. Sen, "Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review," *Int. J. Drug Dev. Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 26–33, 2011.
- [46] P. D. Chaudhari, A. A. Phatak, U. Desai, and D. O. F. Excipients, "A Review: Coprocessed Excipients-An Alternative to Novel Chemical Entities," *Int. J. Pharm. Chem. Sci.*, vol. 1, no. 4, pp. 1824–1842, 2012.
- [47] L. Gallo, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "Formulation and characterization of polysaccharide microparticles for pulmonary delivery of sodium cromoglycate," *AAPS PharmSciTech*, vol. En prensa, 2016.
- [48] F. Ungaro, I. D'Angelo, A. Miro, M. I. La Rotonda, and F. Quaglia, "Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: Challenges and promises," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 64, no. 9, pp. 1217–1235, 2012.
- [49] H. M. Mansour, M. Sohn, A. Al-Ghananeem, and P. P. Deluca, "Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceutics and controlled release drug delivery aspects," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 9, pp. 3298–3322, 2010.
- [50] E. Rytting, J. Nguyen, X. Y. Wang, and T. Kissel, "Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 5, no. 6, pp. 629–639, 2008.
- [51] F. Harris and L. Pierpoint, "PhotodynamicTherapy Based on 5-Aminolevulinic Acid and Its Use as an Antimicrobial Agent," *Med. Res. Rev.*, vol. 29, no. 6, pp. 1292–1327, 2012.
- [52] R. H. Manzo, A. F. Jimenez-Kairuz, M. E. Olivera, F. Alovero, and M. V Ramirez Rigo, "Thermodynamic and Rheological Properties of Polyelectrolyte Systems," in *Polyelectrolytes, Thermodynamics and Rheology*, Springer International Publishing Switzerland, 2014, pp. 215–244.
- [53] D. Quinteros, M. V. Ramirez Rigo, A. Jimenez Kairuz, M. E. Olivera, R. H. Manzo, and D. Allemandi, "Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 72–79, 2008.
- [54] K. Jasmeet, S. L. Harikumar, and K. Amanpreet, "Interpolyelectrolyte complexes as prospective carriers for controlled drug delivery," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 3, no. 4, pp. 58–62, 2012.
- [55] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Green preparation of antibiotic nanoparticle complex as potential anti-biofilm therapeutics via self-assembly amphiphile-polyelectrolyte complexation with dextran sulfate.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 92, pp. 55–63, 2012.
- [56] K. Kho and K. Hadinoto, "Dry powder inhaler delivery of amorphous drug nanoparticles: Effects of the lactose carrier particle shape and size," *Powder Technol.*, vol. 233, pp. 303–311, 2013.
- [57] D. R. Sikwal, R. S. Kalhapure, S. Rambharose, S. Vepuri, M. Soliman, C. Mocktar, and T.

- Govender, "Polyelectrolyte complex of vancomycin as a nanoantibiotic: Preparation, in vitro and in silico studies," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 63, pp. 489–498, 2016.
- [58] M. L. Manca, D. Valenti, O. D. Sales, A. Nacher, A. M. Fadda, and M. Manconi, "Fabrication of polyelectrolyte multilayered vesicles as inhalable dry powder for lung administration of rifampicin," *Int. J. Pharm.*, vol. 472, pp. 102–109, 2014.
- [59] R. Krishnamoorthy and A. K. Mitra, "Prodrugs for nasal drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, pp. 135–146, 1998.
- [60] A. Ahad, F. I. Al-Jenoobi, A. M. Al-Mohizea, N. Akhtar, M. Raish, and M. Aqil, "Systemic delivery of β -blockers via transdermal route for hypertension," *Saudi Pharm. J.*, vol. 23, no. 6, pp. 587–602, 2015.
- [61] Utilización y gasto en servicios de salud en Argentina 2010. Jorge Raúl Jorrat. 1er edición. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. 2011, pp. 1–73.
- [62] S. S. Chugh, R. Havmoeller, K. Narayanan, D. Singh, M. Rienstra, E. J. Benjamin, R. F. Gillum, Y. H. Kim, J. H. McAnulty, Z. J. Zheng, M. H. Forouzanfar, M. Naghavi, G. A. Mensah, M. Ezzati, and C. J. L. Murray, "Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: A global burden of disease 2010 study," *Circulation*, vol. 129, no. 8, pp. 837–847, 2014.
- [63] M. Zoni-Berisso, F. Lercari, T. Carazza, and S. Domenicucci, "Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective," *Clin. Epidemiol.*, vol. 6, pp. 213, 2014.
- [64] A. J. Camm, P. Kirchhof, G. Y. H. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, et al., "Guidelines for the management of atrial fibrillation," *Eur. Heart J.*, vol. 31, no. 19, pp. 2369–2429, 2010.
- [65] A. Ahad, F. I. Al-Jenoobi, A. M. Al-Mohizea, N. Akhtar, M. Raish, and M. Aqil, "Systemic delivery of β -blockers via transdermal route for hypertension," *Saudi Pharm. J.*, vol. 23, pp. 587–602, 2014.
- [66] B. N. C. Prichard, R. Simmons, M. J. Rooks, D. A. Haworth, D. Laws, and S. Wonnacott, "A double-blind comparison of monoxidine and atenolol in the management of patients with mild to moderate hypertension," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 20, no. 4, pp. 45–49, 1992.
- [67] N. K. Gostick, S. R. Mayhew, R. Million, D. Sagar, S. R. Suxena, D. F. Ingram, and N. P. Barmer, "A dose-response study of atenolol in mild to moderate hypertension in general practice," *Curr. Med. Res. Opin.*, vol. 5, no. 2, pp. 179–184, 1977.
- [68] C. A. Schuler and R. Narasimhan, "US20150313. Unit doses, aerosols, kits and methods for treating heart conditions by pulmonary administration," 2015.
- [69] R. L. Hale, C. C. Hodges, P. M. Lloyd, A. T. Lu, D. J. Myers, J. D. Rabinowitz, M. J. Wensley, J. A. McKinney, and A. C. Zaffaroni, "US 9211382 B2. Drug condensation aerosols and kits," 2015.
- [70] J. D. Rabinowitz, M. Wensley, P. Lloyd, D. Myers, W. Shen, A. Lu, C. Hodges, R. Hale, D. Mufson, and A. Zaffaroni, "Fast onset medications through thermally generated aerosols," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 309, no. 2, pp. 769–775, 2004.
- [71] A. A. Onischuk, T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, N. A. Zhukova, A. M. Baklanov, V. V.

- Karasev, G. G. Dultseva, V. V. Boldyrev, and V. M. Fomin, "Anti-inflammatory effect from indomethacin nanoparticles inhaled by male mice.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–243, 2008.
- [72] G. Fanelli, P. Cherubino, and C. Compagnone, "Opioid use for Chronic Pain Management in Italy: Results from the Orthopedic Instant Pain Survey Project.," *Orthop. Rev. (Pavia)*, vol. 6, no. 5309, pp. 51–55, 2014.
- [73] M. J. Rodríguez, "Valoración de la actitud terapéutica ante el paciente con dolor crónico en las Unidades de Dolor en España. Estudio STEP," *Rev. Soc. Esp. Dolor*, vol. 8, pp. 525–532, 2006.
- [74] P. Luna, "Enfermedad ulceropéptica: Grupos de riesgo y estrategias terapéuticas," *Acta Gastroenterol. Latinoam.*, vol. 42, no. 1, pp. 15–17, 2012.
- [75] M. J. Santa-Cruz, M. A. Medina, S. B. Papisidero, R. Chaparro-del Moral, M. Guinsburg, J. A. Caracciolo, and O. L. Rillo, "Consumo de antiinflamatorios no esteroideos en pacientes que concurren por primera vez a un Servicio de Reumatología," *Rev Arg Reum.*, vol. 25, no. 4, pp. 14–20, 2014.
- [76] M. El-Badry, G. Fetih, and M. Fathy, "Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000.," *Saudi Pharm. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 217–225, 2009.
- [77] S. Bianco, "US6051566. Anti-reactive anti-asthmatic activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs by inhalation," 2000.
- [78] Future Market Insights, "Respiratory Inhaler Devices Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2015," 2015.
- [79] B. de la Hoz, T. Dordal, E. Enrique, J. Quiralte, and C. Vidal, "Alergias respiratorias 2020," 2012.
- [80] Organización Mundial de la Salud, "Enfermedades respiratorias crónicas: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)," 2004.
- [81] Organización Mundial de la Salud, "Informe sobre la situación de las enfermedades no transmisibles 2010," vol. 11, 2010.
- [82] M. M. Al-Tabakha, "Future prospect of insulin inhalation for diabetic patients: The case of Afrezza versus Exubera," *J. Control. Release*, vol. 215, pp. 25–38, 2015.
- [83] Y. B. Wang, A. B. Watts, J. I. Peters, and R. O. Williams, "The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines - A review," *Int. J. Pharm.*, vol. 461, pp. 112–128, 2014.

*Dadme una tarea en la que pueda poner algo de mí mismo
y ya no será una tarea; será gozo;
es arte.*

Bliss Carman

Capítulo 2.

Materiales y Métodos

2.1. Materiales

A continuación se indican todos los materiales usados en la presente Tesis:

- Ácido algínico (AA): obtenido a partir de algas pardas, grado analítico (Sigma, San Luis, Estados Unidos)
- Atenolol (AT): grado farmacéutico (Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina)
- Indometacina (IN): grado farmacéutico (Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina)
- ϵ -polilisina (PL): grado alimenticio (Purac America, Lincolnshire, Estados Unidos). Este reactivo se utilizó como se recibió del proveedor, es decir, como una mezcla polilisina:dextrina (PL:DX) en proporción 1:1. La dextrina es un polisacárido (polímero lineal de α -1,4-poliglucosa, con ramificación menor al 5 %). Al igual que otros azúcares como lactosa y manitol, la dextrina mejora las propiedades de flujo y la estabilidad de sistemas particulados durante el almacenamiento. La asociación de dextrina con polilisina, permite mejorar la estabilidad de la estructura conformacional del polímero [1][2].
- Materiales utilizados en la caracterización fisicoquímica de las micropartículas: bromuro de potasio (grado espectroscópico, Merck, Darmstadt, Alemania), lactosa monohidrato tamizada entre mallas ASTM N° 140-70 (grado farmacéutico, Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina), fosfato potásico monobásico (grado analítico, Anedra, Buenos Aires, Argentina), hidróxido de sodio (grado analítico, Anedra, Buenos Aires, Argentina), ácido clorhídrico 1N (grado analítico, Anedra, Buenos Aires, Argentina), hidróxido de potasio (grado analítico, Cicarelli, Santa Fé, Argentina), cloruro de sodio (grado analítico, Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Materiales utilizados en los ensayos de caracterización biofarmacéutica: glicerina (grado farmacéutico, Anedra, Buenos Aires, Argentina), cápsulas de gelatina rígida número 3 (grado farmacéutico, Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina), lactosa monohidrato tamizada entre mallas ASTM N° 140-70 (grado farmacéutico, Parafarm, Saporiti, Buenos Aires, Argentina), mucina de estómago porcino (grado analítico, Sigma, San Luis, Estados Unidos).
- Materiales utilizados en los ensayos con cultivos celulares: solución salina fosfato tamponada de Dubelcco (Lonza, Walkersville, MD, Estados Unidos), reactivo MTT (Life

Technologies, Oregon, Estados Unidos), medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, Life Technologies, Oregon, Estados Unidos), suero fetal bobino (FBS, Natocor, Córdoba, Argentina), antibiótico-antimicótico (Anti-Anti 100X, Gibco, Life Technologies, Oregon, Estados Unidos), lipopolisacáridos de *Klebsiella pneumoniae* (LPS, Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, San Luis, Estados Unidos), solución tamponada de lisis RIPA (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 15 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 5 mM NaF, 1 mM Na₂VO₄ y la mezcla inhibidora de proteasas), membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos), solución tamponada TTBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl y polisorbato 20 0,1 % p/v), sustrato de quimioluminiscencia (Pierce®ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific, Oregon, Estados Unidos), película de autoradiografía (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos), estándares de peso molecular (26634, ThermoScientific, Oregon, Estados Unidos), anticuerpo anti- α tubulina monoclonal de ratón (DM1-A, CP06) (EMD/Biosciences-Calbiochem, California, Estados Unidos), anticuerpo policlonal de conejo anti-ciclooxigenasa-2 (COX-2) (CaymanChemical, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos), anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, Estados Unidos) y anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, Estados Unidos). Todos estos materiales utilizados para los ensayos en cultivos celulares fueron grado analítico.

- Agua destilada.

2.2. Métodos

A continuación se describe la metodología utilizada en esta Tesis para evaluar diferentes propiedades y comprobar las hipótesis planteadas en las investigaciones.

2.2.1. Determinación del número de equivalentes por gramo de polielectrolito

El número de equivalentes ácidos de AA o básicos de PL por gramo de material, disponibles para neutralizar por los fármacos de carga opuesta seleccionados, se determinó mediante

titulación potenciométrica directa [3] utilizando un pHmetro (Orion 410a, Cole Parmer, Vermon Hills, Estados Unidos).

El número de equivalentes ácidos por gramo de AA fue de $4,55 \times 10^{-3}$, valor que fue obtenido utilizando una solución valorada de NaOH 0,009930 N. Por su parte, el número de equivalentes básicos de la PL comercial es de $3,39 \times 10^{-3}$, valor obtenido utilizando una solución valorada de HCl 0,009810 N.

2.2.2. Determinación del contenido de sodio en ácido algínico

El contenido de sodio en ácido algínico fue de 2,26 mg de sodio por kilogramo de ácido algínico, valor que se determinó mediante la técnica de emisión atómica en llama (AAAnalyst 700, Espectrómetro de absorción atómica, Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos). La curva de calibrado se preparó disolviendo cloruro de sodio en agua tridestilada, igual medio que el utilizado para diluir el polielectrolito.

2.2.3. Preparación y caracterización de las alimentaciones líquidas a atomizar

Al equipo de secado (ver más detalles en Sección 2.2.4) ingresa una alimentación líquida que es atomizada. Para ambos sistemas estudiados (AA-AT y PL-IN), cada polielectrolito se dispersó o disolvió en agua bajo agitación magnética constante y se adicionó el fármaco correspondiente en forma de polvo en la cantidad adecuada para neutralizar el 25, 50 o 75 % de los grupos ácidos de AA o básicos de PL. Las muestras se denominaron de acuerdo al porcentaje de neutralización, identificado con el subíndice x y al porcentaje de sólidos totales en la alimentación, identificado como Y%. De esta manera, las muestras se denominaron (AA-AT)_x Y% y (PL-IN)_x:DX Y%. Además, a algunas de las alimentaciones preparadas se les ajustó el pH hasta valores cercanos a 7, con el objetivo de obtener valores de pH más cercanos al fisiológico. A las dispersiones conteniendo AT se les agregó KOH, mientras que a las soluciones conteniendo IN se les agregó HCl. En todos los casos, la solución/dispersión preparada se llevó a un volumen final de 200 mL.

A las alimentaciones preparadas se les realizaron las siguientes caracterizaciones:

- pH: Se utilizó un pHmetro Orion 410a, Cole Parmer, Vermon Hills, Estados Unidos.

- Viscosidad cinemática: Se empleó un viscosímetro capilar Cannon-Fenske (tamaño de tubo 100, State College, Estados Unidos) y se fijó la temperatura en 25 °C.
- Concentración final de fármaco: el contenido de AT e IN en las dispersiones/soluciones preparadas se determinó mediante espectrofotometría UV-visible (T60, PG instruments, Lutterworth, Reino Unido) a 274,6 nm para las alimentaciones conteniendo atenolol y a 319,5 nm para las de indometacina. Adicionalmente, se obtuvieron los espectros de AA y PL:DX para demostrar que la presencia del polielectrolito no interfiere en la determinación del AT o IN, respectivamente.

Para todas las alimentaciones preparadas, se supuso que la concentración de polielectrolito es igual a la cantidad teórica (es decir, la cantidad usada para la formulación). Cuando se llevó a volumen la muestra (PL-IN)₇₅:DX 1,6% se observaron dos fases. Para este caso en particular, mezcla de naturaleza bifásica, se midieron las concentraciones de PL e IN del sobrenadante que se reportan en la Tabla 3.2. La concentración de PL del sobrenadante se determinó por titulación potenciométrica. El 97,17 ± 0,49 % de la PL:DX utilizada para preparar la alimentación denominada (PL-IN)₇₅:DX 1,6% se cuantificó en el sobrenadante.

Adicionalmente, las siguientes determinaciones fueron realizadas en algunas muestras seleccionadas.

- Densidad: Se utilizó un picnómetro de vidrio tipo Gay-Lussac a 25 °C. Esta determinación se realizó solo para la muestra (AA-AT)₅₀ 8% dado que fue la dispersión más viscosa de todas las series preparadas. Con esta determinación se calculó la viscosidad dinámica según la siguiente ecuación:

$$\mu_d = \mu_c D_f \quad (2.1)$$

donde μ_d , μ_c y D_f representan las viscosidades dinámica y cinemática, y la densidad del fluido, respectivamente.

- Potencial electrocinético: Para establecer esta propiedad se utilizó un equipo Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). Este potencial se determinó para los sistemas AA-AT con x=25, 50 y 75 %. Debido a requerimientos operativos del equipo, las muestras se diluyeron a una concentración final de 0,1 % p/v. Para potenciales electrocinéticos menor a 50 mV en valor absoluto, esta dilución no afecta la información obtenida relativa a la estabilidad física de las dispersiones, ya

que a estos valores la repulsión electrostática de las partículas cargadas es independiente de la concentración [4].

Todos los experimentos detallados en esta sección se realizaron por triplicado.

2.2.4. Proceso de secado por atomización (SA)

Todas las dispersiones y soluciones preparadas según lo descrito en la Sección 2.2.3 se alimentaron en un equipo de secado por atomización (Mini Spray Dryer B-290, BÜCHI, Flawil, Suiza) de presión negativa escala laboratorio, el cual se muestra en la Figura 2.1. Por su parte, la Figura 2.2 muestra esquemáticamente la obtención de las micropartículas utilizando la tecnología de SA.

Del conjunto de variables operativas del equipo, la temperatura de entrada del aire de secado, el caudal de la alimentación líquida y el caudal del aire de secado se mantuvieron fijos para el procesamiento de todas las muestras, mientras que el caudal del aire de atomización se estudió a dos niveles. Por otra parte, se utilizaron dos diseños de ciclones para separar las partículas obtenidas del aire [5]. La temperatura de salida del aire de secado se registró para cada alimentación procesada. Luego del secado, el polvo colectado en el vaso de colección se pesó, colocó en frascos color caramelo y almacenó para su posterior caracterización.

El rendimiento del proceso se calculó como la relación entre la masa del producto obtenido luego del secado respecto de la cantidad inicial de sólidos utilizada para preparar las alimentaciones líquidas.

2.2.4.1. SA de las dispersiones ácido algínico/atenolol

Para las distintas formulaciones, se agrega el superíndice z a la nomenclatura para indicar el conjunto de condiciones operativas y de diseño utilizadas en los experimentos de secado por atomización. Por ejemplo $(AA-AT)_x Y\%^z$ indica que se neutralizaron $x\%$ de los grupos ácidos del polielectrolito, $Y\%$ representa el contenido de sólidos totales de la dispersión y z señala el set de condiciones operativas y de diseño seleccionadas.

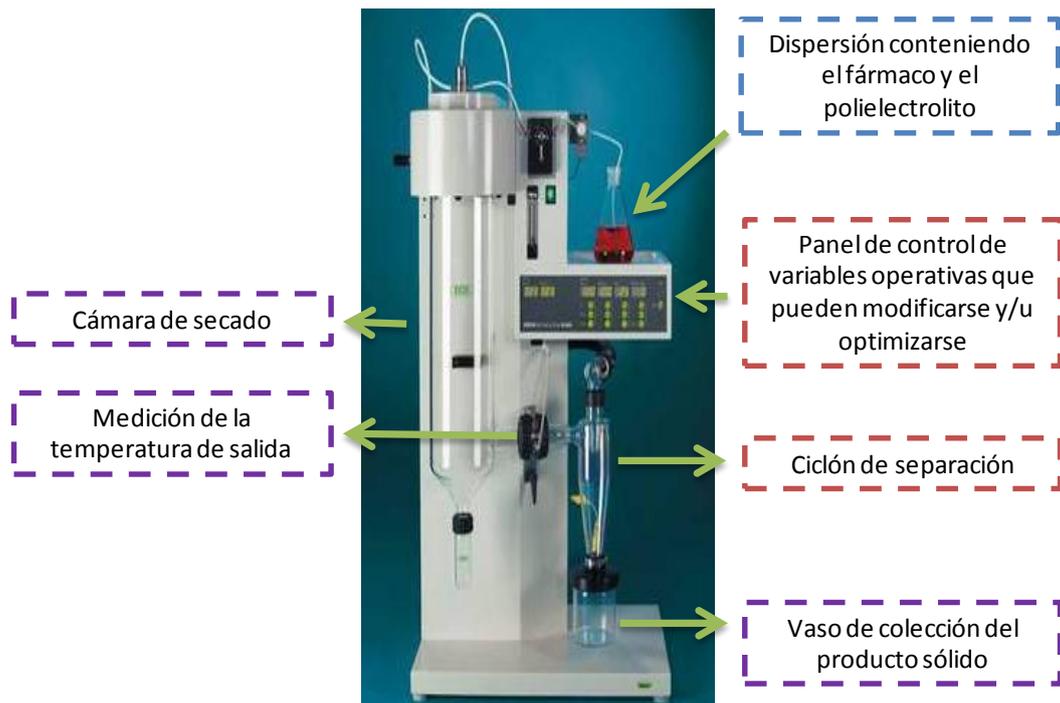


Figura 2.1. Esquema del equipo de secado por atomización. Adaptado de referencia [6]

Para $z=a$, las variables seleccionadas fueron: temperatura del aire de entrada (co-corriente): 140 °C, caudal del aire de atomización: 601 L/h, caudal de la alimentación líquida: 20 % (6 mL/min), caudal del aire de secado 35 m³/h. El ciclón utilizado para coleccionar las partículas obtenidas fue un ciclón convencional. Las variables operativas se seleccionaron a partir de datos reportados en la literatura científica para el secado de alginato de sodio puro [7]–[12].

Para $z=b$ y con el objetivo de analizar el efecto de la gota atomizada en la calidad del producto, respecto a la condición a solo se aumentó el caudal del aire de atomización al valor de 742 L/h [13].

Para $z=c$ respecto a la condición a se modifican dos variables en simultáneo: alto caudal de aire de atomización (742 L/h) y un ciclón de alta performance para recuperar partículas más finas.

Adicionalmente se ensayó un cambio en la composición de las micropartículas, ajustando el pH de las formulaciones a valores cercanos a 7 mediante el agregado de KOH. Estas muestras se denominaron (AA-AT)_x:K Y%^z.

2.2.4.2. SA de las soluciones polilisina/indometacina

Análogamente a la nomenclatura de las formulaciones de AT, la descripción $(PL-IN)_x:DX Y\%^z$ indica que se neutralizaron x % de los grupos básicos del polielectrolito, $Y\%$ representa el contenido de sólidos totales de la dispersión y z señala el set de condiciones operativas y de diseño seleccionadas.

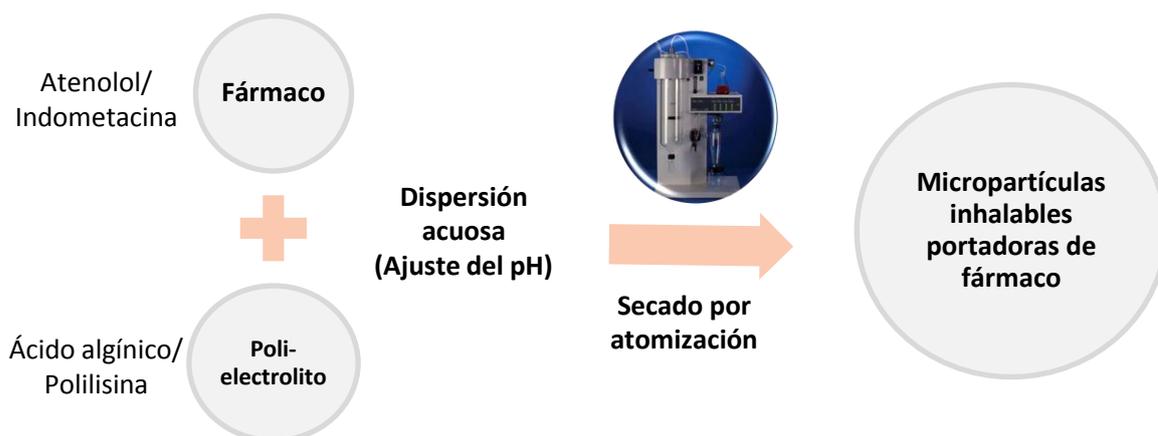


Figura 2.2. Esquema de la obtención de las micropartículas para administración inhalatoria

Las condiciones de secado para las soluciones PL/IN fueron las mismas que para las dispersiones AA/AT: temperatura del aire de entrada (co-corriente): 140 °C, caudal del aire de atomización: 601 L/h, caudal de la alimentación líquida: 20 %, caudal del aire de secado 35m³/h. El ciclón utilizado para coleccionar las partículas obtenidas fue un ciclón convencional y los sistemas obtenidos recibieron el nombre $(PL-IN)_x:DX Y\%^a$, representando el superíndice a el conjunto de variables operativas y de diseño seleccionadas.

Al igual que para el sistema AA/AT, el caudal del aire de atomización se elevó, para algunas muestras, a 742 L/h y se utilizó un ciclón de alta performance para coleccionar las partículas. Las formulaciones obtenidas bajo estas condiciones se denominan $(PL-IN)_x:DX Y\%^c$. Adicionalmente se ensayó un cambio en la composición de las micropartículas, ajustando el pH de las formulaciones a valores cercanos a 7. Estas muestras se denominaron $(PL-IN)_{50}:DXCl 1,6\%^c$.

2.2.5. Caracterización del sistema particulado

2.2.5.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad de todos los productos obtenidos se determinó inmediatamente después del proceso de secado en un analizador de humedad halógeno (MB45, Ohaus, Pine Brook, Estados Unidos). Aproximadamente 500 mg de polvo se calentaron hasta 105 °C.

El ensayo se concluyó cuando la variación de peso del polvo fue menor a 1 mg en 60 segundos.

2.2.5.2. Cargado del fármaco

La concentración de AT en los productos (AA-AT)_x Y%^z y de IN en los productos (PL-IN)_x:DX Y%^z se determinó mediante espectrofotometría UV-visible. Los polvos se dispersaron en agua destilada y la concentración de fármaco en la dispersión se evaluó (utilizando curvas de calibrado) a 274,6 nm para AT y a 319,5 nm para IN.

La composición de las micropartículas se expresó como gramo de fármaco en un gramo de muestra.

2.2.5.3. Espectroscopía infrarroja asociada a Transformación de Fourier (FT-IR)

Algunas muestras seleccionadas conteniendo AT e IN se estudiaron en compactos de bromuro de potasio con 1 % p/p de material a ensayar, usando un espectrómetro FT-IR (Nexus FT, Termonicolet, Maryland, Estados Unidos). Los espectros resultantes fueron un promedio de 32 escaneos con una resolución del 4 %. Las muestras y el bromuro de potasio se secaron hasta peso constante a 105 °C previo a su análisis.

2.2.5.4. Análisis térmico

Se realizó en un calorímetro diferencial de barrido Pyris 1 (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos). Se obtuvieron termogramas de algunos de los sistemas portando AT e IN. Aproximadamente 5 mg de las muestras a analizar se colocaron en cápsulas de aluminio cerradas. El estudio se realizó bajo corriente de nitrógeno (40 mL/min). Se elevó la

temperatura de los materiales desde 30 hasta 180 °C, luego se las enfrió desde 180 hasta 30 °C y finalmente se volvió a elevar la temperatura desde 30 hasta 180 °C, utilizando en todos los casos una velocidad de ± 10 °C/min.

Se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de los productos obtenidos por secado, materiales comerciales y de la mezcla física utilizando el método del ΔC_p [14]. También se determinó la temperatura y entalpía de fusión (T_{onset} y ΔH_f) del fármaco comercial y el secado por atomización. Estas mismas propiedades también se obtuvieron para las mezclas físicas.

2.2.5.5. Difracción de rayos X de polvo

Los difractogramas se colectaron entre los ángulos (2θ) 5 y 65 (Rigaku, Geigerfleck, Tokio, Japón), utilizando un tubo anódico de cobre con monocromador, operado a 35 kV y 15 mA. El paso de medición fue de 0,04° y el tiempo por paso de 8 segundos. Se estudiaron los mismos materiales ensayados por FT-IR.

En particular, la pérdida de cristalinidad del atenolol secado por atomización se determinó mediante la ecuación de Scherrer [15]. Esta ecuación relaciona el tamaño del cristal en un sólido con el ancho del pico en un diagrama de difracción de rayos X, indicando el tamaño del paquete cristalino responsable de la señal del pico:

$$\tau = k \lambda / \beta \cos \theta \quad (2.2)$$

donde τ es el tamaño medio del paquete cristalino, k es el factor de forma, λ la longitud de onda de la radiación, β el ancho del pico a la mitad de la altura y θ el ángulo de Bragg.

Para los materiales conteniendo IN, el ensayo también se repitió luego de 9 y 36 meses de almacenar las muestras a temperatura ambiente.

2.2.5.6. Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partículas se determinó mediante difracción laser utilizando el método de polvo seco (LA 950 V2, Horiba, Kyoto, Japan). Los materiales secados por atomización se dispersaron en lactosa en una proporción lactosa:muestra 4:1 con el propósito

de mejorar el flujo del material desde la tolva de alimentación hasta la celda de medición. El diámetro volumétrico medio de la lactosa difiere significativamente del tamaño medio de los materiales secados. De esta manera se obtienen distribuciones bimodales con dos modas perfectamente diferenciables. Adicionalmente se determinó el tamaño volumétrico medio de los fármacos, los polielectrolitos y la lactosa comerciales.

El tamaño medio se reporta como el diámetro volumétrico medio (D_{43}) o mediana (D_{50}). El ancho de la distribución se informa como *span*, variable que se calcula haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$span = (D_{90} - D_{10})/D_{50} \quad (2.3)$$

donde D_{90} , D_{50} y D_{10} son los diámetros para los cuales el 90, 50 y 10 % de la población se encuentran por debajo de cada valor, respectivamente. La distribución puede considerarse angosta si el factor de *span* es menor a 2 [16]. Para todos los casos también se determinó la distribución de tamaño de partículas (*Particle Size Distribution*, PSD) completa, expresada como histograma y como función acumulativa pasante.

Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

2.2.5.7. Morfología de las micropartículas

La morfología de las micropartículas portando AT e IN, de los materiales puros secados por atomización y de las materias primas sin procesamiento se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electronic Microscopy*, SEM) utilizando un microscopio EVO 40-XVP (LEO, Oberchoken, Alemania). Previo a su observación, las micropartículas se metalizaron con oro (espesor del metalizado: 300 nm) utilizando un equipo Pelco 91000 (Ted Pella, California, Estados Unidos).

2.2.5.8. Determinación de la densidad del polvo por picnometría de nitrógeno

La densidad de la muestra de los productos secados por atomización se determinó mediante intrusión de nitrógeno (Nova 1200e, Quantachrome Instruments, Florida, Estados Unidos). Aproximadamente 1 g de material se colocó en una celda precalibrada y el volumen de vacíos

intra e interparticulares se determinó por intrusión de nitrógeno. La densidad de la muestra se calculó como la relación entre la masa pesada del sólido y el volumen de sólido. El volumen de sólido se calcula por diferencia entre el volumen de la celda vacía y el volumen de vacíos (i.e., volumen de nitrógeno ingresado). Para partículas muy porosas y con poros bien conectados el valor de densidad de la muestra puede considerarse próximo al valor de densidad del sólido, mientras que para partículas no porosas, la densidad de la muestra representa la densidad de la partícula.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.5.9. Propiedades de flujo de los materiales secados por atomización

Para determinar la densidad libre o de lecho de las micropartículas obtenidas por secado por atomización, las muestras se colocaron en probetas graduadas de 10 cm³. La densidad libre (D_{libre}) se calculó como la relación entre el peso de la muestra (en gramos) colocada en la probeta y el volumen (en cm³) que la misma ocupa. La densidad empaquetada ($D_{empaquetada}$) se estimó sometiendo la probeta a suaves golpes hasta que no se evidenciaron cambios en el volumen del material.

Las determinaciones de densidad libre y empaquetada se utilizaron para calcular propiedades de flujo como es el Índice de Carr (IC), el cual se estima mediante la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{D_{empaquetada} - D_{libre}}{D_{empaquetada}} \times 100 \quad (2.4)$$

De acuerdo a la USP, el valor de IC permite clasificar el flujo de los polvos tal como se resume en la Tabla 2.1 [17].

Tabla 2.1. Clasificación de la propiedad de flujo de polvos según el Índice de Carr (IC) (USP, [17])

Propiedad de flujo	IC
Excelente	< 10
Bueno	11-15
Razonable	16-20
Aceptable	21-25
Pobre	26-31
Muy pobre	32-37
Muy muy pobre	>38

También se evaluó el ángulo de reposo de los polvos. Esta propiedad se determinó utilizando un método alternativo al codificado en USP ya que los materiales obtenidos por secado no fluyen por el embudo. En este trabajo se utilizó un cilindro que se colocó sobre una superficie lisa y se llenó con 2,5 gramos de muestra. Luego, el cilindro se levantó dejando caer la muestra que forma finalmente un cono. Se determinó el radio y la altura de dicho cono utilizando un calibre. Finalmente la relación entre la altura y el radio del cono proporciona la tangente del ángulo de reposo [18].

De acuerdo a la USP, el ángulo de reposo clasifica las propiedades de flujo de los materiales como se muestra en la Tabla 2.2 [17].

Los resultados de las determinaciones de las densidades y del ángulo de reposo que se presentan en la Tesis son un promedio de 10 repeticiones.

Tabla 2.2. Clasificación de la propiedad de flujo de polvos según el ángulo de reposo (USP, [17]).

Propiedad de flujo	Ángulo de reposo (°)
Excelente	25-30
Bueno	31-35
Adecuado (no necesita ayuda)	36-40
Aceptable (puede obstruirse)	41-45
Pobre (requiere agitación o vibración)	46-55
Muy pobre	56-65
Muy muy pobre	>66

2.2.5.10. Tendencia a la captación de humedad

La captación de humedad de los productos AA-AT y de AA comercial se evaluó a 25 °C y 75 % de humedad relativa (HR). La HR seleccionada se proporcionó a la cámara de acondicionamiento mediante el uso una mezcla glicerina-agua siguiendo la norma ASTM D5032-97 [19]. Estas mezclas, dependiendo del contenido de glicerina, proveen diferentes HRs (ver Tabla 2.3) (e.g. 58 % de glicerina para HR=75 %). Aproximadamente 100 mg de muestra se colocaron en un recipiente hermético y se registró el peso de la misma regularmente. El ensayo se realizó hasta que el peso de las muestras en dos pesadas consecutivas fue constante. El aumento de peso se relacionó con la captación de humedad de los materiales.

En particular este ensayo resultó de interés para los materiales conteniendo AA porque este polielectrolito es muy higroscópico [20]. Por su parte, los ensayos no se extendieron a los

materiales PL-IN debido a que se ha reportado que PL no posee tendencia en captar humedad del ambiente [21] y en consecuencia no sería una propiedad crítica a evaluar.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 2.3. Contenido de glicerina en soluciones acuosas y humedad relativa provista [19]

Contenido de glicerina (p/p %)	HR, %
58	75
72	60
86	40

2.2.6. Estimación de diámetro aerodinámico

Si se conoce la mediana de un sistema particulado, es posible establecer un valor aproximado del diámetro aerodinámico medio haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$D_{aer}^e = D_{50} \sqrt{D_p} \quad (2.5)$$

donde D_{50} representa la mediana de la distribución (debido a que se utiliza la técnica de difracción láser, la mediana se encuentra expresada en masa o volumen), D_p la densidad de la partícula y D_{aer}^e el diámetro aerodinámico estimado. El-Sherbiny y col. sugieren que para estimar de manera sencilla el D_{aer} la densidad de la partícula puede ser reemplazada por la densidad empaquetada ($D_{empaquetada}$) [22]:

$$D_{aer}^{e, min} = D_{50} \sqrt{D_{empaquetada}} \quad (2.6)$$

Sin embargo, se estima que densidad empaquetada subestima la densidad de partícula en un 21 % [23][24]. Por esta razón el uso de esta densidad predice diámetros aerodinámicos medios inferiores a los reales.

En esta Tesis, para establecer un rango de D_{aer} estimados donde pueda localizarse el D_{aer} real, se midió la densidad de las muestras ($D_{muestra}$), lo cual permitiría estimar el diámetro aerodinámico de la siguiente manera:

$$D_{aer}^{e, max} = D_{50} \sqrt{D_{muestra}} \quad (2.7)$$

Como la densidad de la muestra será siempre mayor a la de la partícula, el uso de la misma predice diámetros aerodinámicos seguramente mayores a los reales. El uso de las Ecuaciones 2.6 y 2.7 permite establecer el rango de valores dentro del cual se ubicaría el diámetro aerodinámico medio real.

2.2.7. Mezcla de las micropartículas con carrier

Algunos de los polvos obtenidos mediante secado por atomización se mezclaron con lactosa, excipiente utilizado como *carrier*, en una proporción micropartículas:lactosa 1:3, mediante dilución geométrica en un mezclador orbital (Turbula®, Glen Mills, Maywood, Estados Unidos) durante 20 minutos a 46 rpm.

La uniformidad de contenido se evaluó por espectrofotometría UV-visible sobre 5 muestras tomadas al azar. La masa de cada muestra y la longitud de onda seleccionada fueron: 25 mg y 274,6 nm para AT; 15 mg y 319,5 nm para IN.

2.2.8. Aerosolización de las micropartículas in vitro

El desempeño de las micropartículas en el ensayo de aerosolización *in vitro* se evaluó en un equipo de Impacto en Cascada (*Next Generation Impactor*, NGI, Copley Scientific, Nottingham, Reino Unido). La Figura 2.3 muestra un esquema de este equipo, el cual cuenta con un preseparador (PS) y un puerto de inducción (PI). El inhalador se conecta al PI mediante un adaptador (A). El NGI está constituido por siete etapas de impacto inercial y un colector final con microorificios [25]. Más detalle de las particularidades de este equipo se presenta en el Capítulo 5.

Para analizar la deposición *in vitro* de las micropartículas se utilizaron cápsulas de gelatina rígida #3, las cuales se llenaron con una apropiada cantidad de micropartículas o de las mezclas micropartículas:lactosa obtenidas según lo descrito en la Sección 2.2.7. Para determinar las propiedades de aerosolización de las micropartículas portando AT, se colocaron en las cápsulas 25 mg de las micropartículas obtenidas por SA o la cantidad adecuada de la mezcla micropartículas:lactosa que contiene 25 mg de micropartículas. Para determinar la deposición *in vitro* de las partículas portando IN, se colocaron en la cápsula 15 mg de las muestras obtenidas por SA o la cantidad de mezcla micropartículas:lactosa que aporte 15 mg de

micropartículas. El llenado de las cápsulas para este sistema fue menor debido a la menor densidad del mismo respecto de los materiales conteniendo AT.

Los polvos se dispersaron en el NGI utilizando un inhalador de alta resistencia RS01 (Plastiapae, Milán, Italia). Se ensayaron dos caídas de presión (ΔP) en todo el sistema: 2 y 4 KPa; bajo estas condiciones el caudal de aire (provisto por una bomba de vacío) fue de 42,5 y 58,8 L/min, respectivamente. La caída de presión de 4 KPa es la recomendada por la USP para realizar el ensayo, ya que emula caudales típicos inspirados por pacientes con capacidades pulmonares normales [17]. Sin embargo, si los sistemas particulados presentan tendencia a la aglomeración, la adhesión o cohesión de las partículas de fármaco puede llevar a patrones de deposición pulmonar dependientes del caudal de aire. Por esta razón, resulta interesante estudiar el comportamiento aerodinámico a menores caídas de presión (i.e., menores caudales de aire) para evaluar si pacientes con menor capacidad inspiratoria pueden alcanzar dosis inhalables terapéuticas [26][27]. Para cada caudal seleccionado, el equipo se operó el tiempo necesario para que circulen 4 L de aire (capacidad pulmonar estándar). Para cada caudal, los diámetros de corte de cada etapa del NGI se calcularon siguiendo los lineamientos expuestos por Marple y col., la USP y la Farmacopea Europea [17][28][29] y se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Diámetros aerodinámicos de corte de las etapas del NGI al utilizar diferentes caudales de aire

Etapa	Caudal (L/min)	
	42,5 (2KPa)	58,8 (4KPa)
Diámetros de corte (μm)		
1	9,71	8,15
2	5,34	4,51
3	3,35	2,85
4	1,95	1,68
5	1,12	0,95
6	0,67	0,56
7	0,42	0,34
MOC	0,22	0,14

Para evitar que las partículas por rebote reingresen a la corriente de aire, cada taza colectora del NGI se recubrió con una fina capa de glicerina. Luego de la simulación de la inspiración mediante la circulación de 4 L de aire, se recolectaron las muestras en cada una de las etapas del impactador. Por su parte, el PS se llenó con 15 mL de agua para recuperar el material particulado allí depositado. El fármaco depositado en el resto de los componentes del equipo se recuperó lavando cada parte con agua (5-10 mL) y se cuantificó mediante espectroscopía

UV-Visible a 274,6 nm para el ensayo realizado con las micropartículas conteniendo AT y a 319,5 nm para las micropartículas conteniendo IN.

En la Figura 2.3 se muestra el exterior y el interior del equipo de impacto en cascada utilizado en esta Tesis. En la misma figura se incluyen llaves que agrupan conjuntos de etapas y se las referencia con números. Los diámetros de corte para cada etapa que se muestra en la figura se calcularon para un caudal de aire que proveyó una caída de presión de (4 KPa), tal como se describe en la USP [17]. La codificación de números se introduce para ejemplificar de manera aproximada el cálculo de diferentes fracciones (ver leyenda de la figura) de interés para la evaluación de las formulaciones, las cuales se definen a continuación [30]:

- Fracción Emitida (FE): representa el porcentaje de fármaco cargado en la cápsula que efectivamente sale de la cápsula y el inhalador.
- Fracción de Partículas Finas (FPF): es el porcentaje acumulado de masa de fármaco menor a un dado diámetro aerodinámico (usualmente 3 o 5 μm) respecto del total de masa que sale de la cápsula y el inhalador (i.e. la masa de fármaco recuperada del PI, PS, las etapas 1 a 7 del NGI y el MOC).
- Fracción respirable (FR): representa el porcentaje acumulado de masa de fármaco menor a un dado diámetro aerodinámico (usualmente 3 o 5 μm) respecto del total de masa de fármaco recuperada del inhalador, cápsula, PI, PS, las etapas 1 a 7 del NGI y el MOC.
- Mediana en masa del diámetro aerodinámico (MMDA): diámetro aerodinámico donde el 50 % de la población tiene un tamaño inferior a ese valor. Se calcula de la distribución acumulada de masa de fármaco (construida considerando la masa de fármaco recolectada en las etapas 1 a 7 del NGI y el MOC). Para que las partículas lleguen a regiones profundas del pulmón, las partículas deben exhibir diámetros aerodinámicos entre 0,5 y 5 μm , mientras que para la administración sistémica se requiere valores de MMDA entre 0,5 y 3 μm [31].
- Desviación estándar geométrica (GSD): representa el ancho de la distribución de diámetros aerodinámicos. Se calcula como $(D_{84}/D_{16})^{1/2}$, donde D_{84} y D_{16} representan los diámetros en los cuales se recupera el 84 % y 16 % de la masa de fármaco de las etapas 1 a 7 y MOC del NGI, respectivamente. La distribución del tamaño aerodinámico de las partículas puede considerarse angosta si el GSD es menor a 3 [32].

Cuando los parámetros requieren el dato de una fracción acumulada menor que un dado diámetro, la misma se calcula de manera estricta utilizando un método de interpolación lineal.

Para ello se utilizan los datos experimentales de la distribución acumulativa de tamaños aerodinámicos, la cual se construye considerando los diámetros de corte presentados en la Tabla 2.4 y la masa del fármaco cuantificada en cada una de las etapas del impactador.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

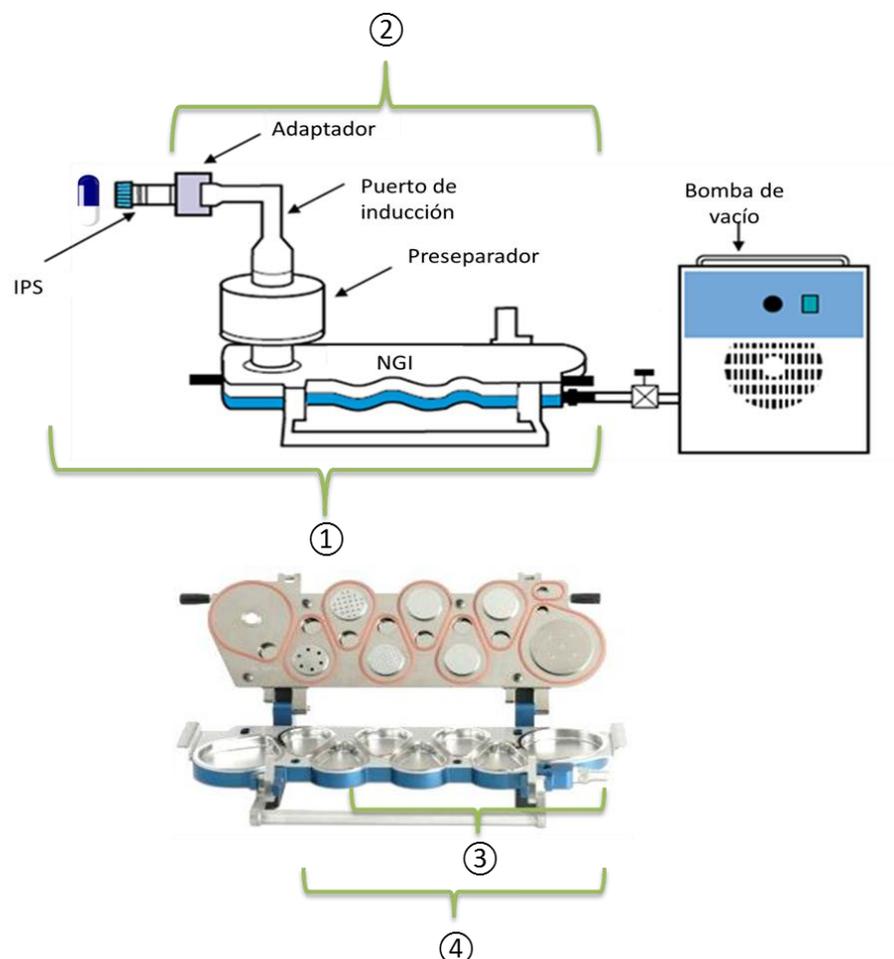


Figura 2.3. Esquema del equipo de impacto en cascada. Para $\Delta P = 4\text{KPs}$, $FE = \textcircled{2}/\textcircled{1}$; $FFP < 5\ \mu\text{m} = \textcircled{4}/\textcircled{2}$; $FFP < 3\ \mu\text{m} = \textcircled{3}/\textcircled{2}$; $FR < 5\ \mu\text{m} = \textcircled{4}/\textcircled{1}$; $FR < 3\ \mu\text{m} = \textcircled{3}/\textcircled{1}$ (Adaptado de Copley Scientific [25])

2.2.9. Acondicionamiento de muestras a diferentes humedades relativas

Como se mencionó, el contenido de humedad de los materiales basados en ácido algínico es una propiedad crítica que, entre otras implicancias, podría modificar la aerosolización. Por ello, materiales seleccionados de las formulaciones $(AA-AT)_xY\%^z$ se almacenaron durante 24 horas a temperatura ambiente y 40, 60 y 75 % de humedad relativa (HR) (el contenido de glicerina en soluciones acuosas para proveer la correspondiente HR se encuentra en la Tabla 2.3). Aproximadamente 100 mg de las muestras se colocaron en recipientes herméticos. Adicionalmente, la mezcla en proporción 1:3 de micropartículas:lactosa se almacenó en las

mismas condiciones que las micropartículas solas. Finalizado el acondicionamiento, las muestras se pesaron nuevamente y el aumento de peso se asoció a la adsorción de agua. Inmediatamente después del pesado, las partículas se ensayaron en el NGI con el objetivo de evaluar la influencia del almacenamiento a diferentes humedades relativas en la performance de la aerosolización *in vitro*. Para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos se utilizó el test estadístico de ANOVA simple.

Además, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido LEO (Oberchoken, Alemania) bajo presión variable (10kV, presión de la cámara 70Pa, corriente del haz 40pA) [33]. Esta técnica de presión variable ofrece la posibilidad de caracterizar la morfología de muestras con cierto contenido de humedad, sin preparación o pretratamiento [34].

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.10. Ensayos de liberación de los fármacos

Los experimentos se realizaron en celdas verticales de Franz a 37 °C. La Figura 2.4 muestra un esquema de una celda. El compartimiento receptor se separó del donador por una membrana de diálisis de celulosa (Sigma, peso molecular de corte: 14000 Da). El compartimiento receptor se completó con 60 mL de medio degasificado (solución fosfato tamponada pH 7,4 o agua destilada) y se mantuvo bajo agitación magnética constante.

En el compartimiento donador se colocó una solución de las micropartículas o las micropartículas en estado sólido. Para realizar estudios comparativos, se colocaron los fármacos como materia prima en el compartimiento donador.

Para el sistema portando AT se colocó en el compartimiento donador una solución de concentración 5 mg/mL de fármaco puro o una solución de las micropartículas que provea una cantidad equivalente del principio activo. Para los productos conteniendo IN, se partió de soluciones del ingrediente farmacéutico activo puro en solución fosfato tamponada o de soluciones de las micropartículas en agua y en solución fosfato tamponada. En todos los casos, la concentración de IN en el compartimiento donador fue de 2,5 mg/mL. La concentración de IN comercial en el compartimiento donador se vio limitada por su solubilidad en solución fosfato tamponada pH 7,4 (2,75 mg/mL a 37 °C) [35].

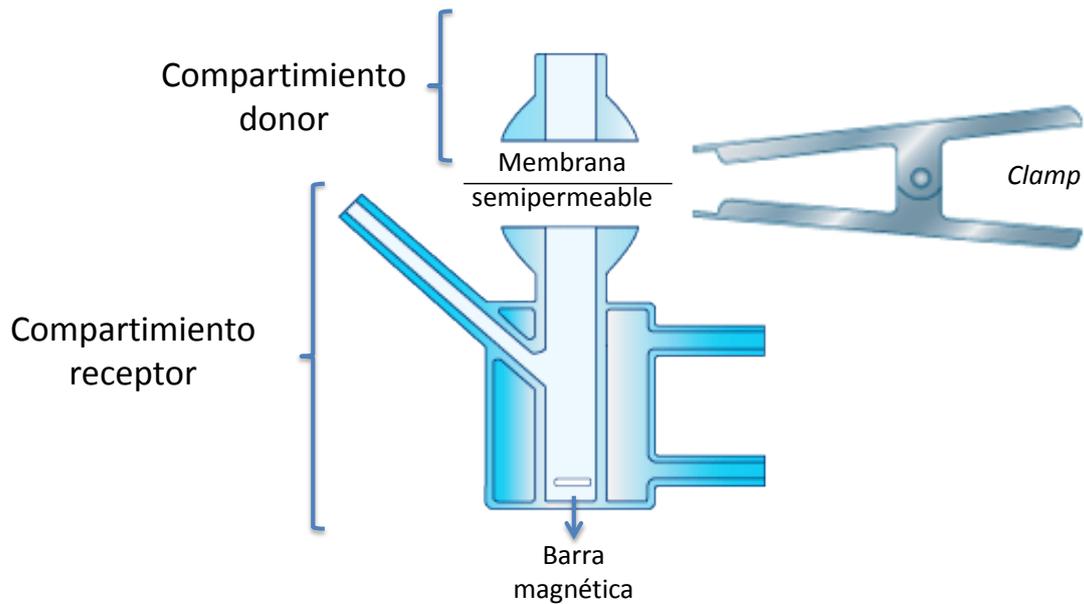


Figura 2.4. Esquema de una celda de Franz. Adaptado de referencia [37]

Por otra parte, se estudió la liberación de los fármacos cuando se colocaron las micropartículas en forma de polvo en el compartimiento donador. En este caso, el objetivo del ensayo fue estudiar la liberación desde el complejo iónico, adicionando el paso de la disolución de las micropartículas en el medio receptor. Para las partículas conteniendo AT se colocaron 25 mg del principio activo puro o una cantidad adecuada de las micropartículas obtenidas por SA que proveyó 25 mg de AT. Para el caso de IN, 12,5 mg del fármaco puro o la cantidad adecuada de las micropartículas de los sistemas secados que contuvieran esa cantidad de fármaco se colocaron en el compartimiento donador.

A intervalos de tiempo predeterminados (cada 15 minutos durante la primera hora, cada 30 minutos la segunda hora y cada 60 minutos hasta completar 6 horas de ensayo) se tomaron 2 mL del compartimiento receptor y se reemplazaron por el mismo volumen de medio fresco. El contenido de principio activo en los volúmenes muestreados se determinó mediante espectrofotometría UV-visible.

Los perfiles de liberación de los fármacos se compararon utilizando el factor de similitud f_2 , que se define como [36]:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \right\} 100 \quad (2.8)$$

donde n constituye el número de puntos experimentales y R_t y T_t representan el porcentaje de fármaco liberado al tiempo t de la referencia (fármaco puro) y el polvo obtenido por secado portando el fármaco, respectivamente. Las formulaciones se consideran similares si f_2 es mayor a 50 [36].

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.11. Ensayo de citotoxicidad

Para analizar la seguridad de los materiales obtenidos mediante secado por atomización se realizó el ensayo colorimétrico de MTT, bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico, en las líneas celulares A-549 (ATCC® CCL-185®). El ensayo MTT provee una medida cuantitativa de la viabilidad celular. La reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico a formazán ocurre solo en las mitocondrias de células viables. En este ensayo, las células A-549 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a 37 °C en un ambiente de 5 % de CO₂. Luego de 24 horas de incubación, los fármacos puros, los polielectrolitos puros y los complejos iónicos disueltos en medio de cultivo DMEM se agregaron a los cultivos celulares, los cuales se incubaron durante 24 horas. Además, se incubaron células sin tratamiento (solo con medio de cultivo) considerado como ensayo de control. Luego de las 24 horas, se aspiró el sobrenadante de los pocillos, se adicionó la solución de MTT (5 mg/mL) y se incubó durante 2 horas. El formazán formado se cuantificó en DMSO midiendo la absorbancia (Abs) a 540 nm. La viabilidad celular (VC) se expresó según la Ecuación 2.9.

$$VC = \frac{Abs_{tratamiento}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (2.9)$$

Los resultados reportados son el promedio de seis réplicas.

2.2.11.1. Citotóxicidad de las micropartículas portando AT

La dosis por vía oral de AT varía entre 25-100 mg diarios, con una biodisponibilidad de aproximadamente el 40 % [38]. Sin embargo, la dosis recomendada de AT para la vía inhalatoria se encuentra en el rango de 0,1 mg a 20 mg [39]. Por otra parte, el volumen de fluido pulmonar es de alrededor de 100 mL [40]. En este contexto, se prepararon dispersiones de algunas formulaciones AA-AT en medio de cultivo para obtener concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/mL. Considerando que la composición de las micropartículas fue de $\sim 0,5 \text{ g}_{\text{AT}}/\text{g}_{\text{sólido}}$, se testearon dosis equivalentes de AT entre 12,5 y 100 mg, llegando a estudiar condiciones extremas de alta concentración para evaluar el potencial citotóxico. Con fines comparativos, AA y AT puros se ensayaron en concentraciones de 0,12; 0,25; 0,5 y 1,0 mg/mL.

2.2.11.2. Citotóxicidad de las micropartículas portando IN

Por vía oral son necesarios entre 25 y 200 mg diarios de IN para tratamientos de enfermedades articulares. Por su parte, Onischuck y col. determinaron que la dosis antiinflamatoria efectiva de IN por vía inhalatoria era seis órdenes de magnitud menores que para la vía oral [41]. Para las partículas conteniendo IN se ensayaron algunas formulaciones PL-IN obtenidas por secado a la concentración de 0,44 mg/mL de micropartículas en medio de cultivo. Esto provee una cantidad de IN en el pulmón de 7,5 mg, valor considerablemente mayor que el requerido para el tratamiento de las afecciones articulares sistémicas. Adicionalmente, se probaron concentraciones del polielectrolito equivalentes a las contenidas en la concentración de micropartículas probadas.

2.2.12. Ensayo de Mucoadhesión in vitro: resistencia a la tracción

Se utilizó un analizador de textura TA Plus (Lloyd Instruments, West Sussex, Inglaterra), provisto de una celda de carga de 5 kg_f, según lo descrito por Gallo y col. [42]. El equipo consiste de una superficie estacionaria sobre la cual se adhirió un papel de filtro de 25 mm de diámetro. Sobre este papel se colocó 0,1 mL de una solución de mucina de concentración 3 % p/v en solución fosfato tamponada pH 7,4 a 37 °C. Esta concentración se seleccionó ya que la concentración de este material en el tracto respiratorio es de 2-4 % [32]. Las micropartículas se adhirieron utilizando una cinta doble faz a una sonda móvil, ubicada por sobre la superficie estacionaria. Esta sonda se bajó poniéndola en contacto (sin aplicar presión) con las partículas

hasta que las mismas se embebieron en la solución de mucina durante 3 minutos, luego de los cuales la sonda se volvió a elevar a una velocidad de 0,1 mm/s. Se registró la fuerza máxima (N) y el trabajo (J) de despegue utilizando el software Nexygen Plus. El análisis se realizó para el fármaco puro y las micropartículas AA-AT. Adicionalmente, se determinó la fuerza máxima y el trabajo de despegue para la solución de mucina, utilizando la sonda libre de polvo.

Los resultados reportados son un promedio de ocho repeticiones.

2.2.13. Efecto antiinflamatorio de partículas con IN en un modelo de inflamación *in vitro*

2.2.13.1. Cultivo y tratamiento de la línea celular RAW 264.7

La línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 (ATCC® TIB-71®) se cultivó en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10 % de suero fetal bobino y antibióticos-antimicóticos a 37°C en un ambiente (incubador humidificado) de 5 % de CO₂. Las células crecieron en cápsulas de cultivo de 35 mm de diámetro y se privaron de suero durante 2 horas previo al experimento. La línea RAW 264.7 se pre-incubó durante una hora a 37°C con soluciones en medio de cultivo conteniendo alternativamente: una concentración de 10 µM de IN pura, cantidad suficiente de micropartículas conteniendo PL-IN para lograr una concentración de 10 µM de IN y una masa de PL:DX equivalente a la presente en la solución de las micropartículas. Posteriormente las células se trataron con lipopolisacáridos (LPS) de *Klebsiella pneumoniae* (10 µg/ml en DMEM libre de suero o en el mismo volumen de agua estéril ultra pura, en las condiciones controles con y sin LPS) durante 24 horas. La solución patrón de LPS (4 mg/mL) se preparó en agua estéril ultra pura y la solución madre de IN pura (70 mM) en dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO se agregó a todos los cultivos en cantidades suficientes para alcanzar una concentración final de 0,015 %.

2.2.13.2. Inmunoblot (Western Blot, WB)

Luego del tratamiento experimental, se removió el medio de cultivo, las células se lavaron tres veces con solución fosfato salina tamponada y se lisaron con 80 µL de solución tamponada de lisis RIPA en un baño a 0 °C. El contenido total de proteínas en el lisado celular se determinó

mediante el método de Bradford [43] y las muestras se desnaturalizaron con solución tamponada Laemmli a 100 °C durante 5 minutos [44]. 30 µg de proteínas se separaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (*SDS-PAGE*) utilizando geles de poliacrilamida 10 % y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno. Las membranas fueron bloqueadas con 10 % de albúmina de suero bobino en solución tamponada TTBS a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se las incubó con anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y las bandas inmuno-reactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia usando films de autorradiografía UltraCruz®. Los valores de densitometría de las bandas inmuno-reactivas se determinaron usando el software ImageJ 1.38. El peso molecular de las bandas se determinó usando estándares de peso molecular.

2.2.14. Análisis estadístico

Para encontrar diferencias estadísticamente significativas en los resultados de rendimiento del proceso de secado y tamaño de partícula y en los ensayos de aerosolización *in vitro*, citotoxicidad, mucoadhesión e inmunoblot se utilizó el test de ANOVA simple, seguido por el método de comparación múltiple de la diferencia mínima significativa (DMS), excepto para el inmunoblot en el cual se utilizó el test de Bonferroni para comparar las medias. La significancia estadística se determinó a través del valor p (valores p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos). Previo al análisis, las asunciones de ANOVA de homosedasticidad y normalidad se probaron utilizando el Test de *Levene* y los valores de *Kurtosis* estándar, respectivamente [45][46].

2.3. Bibliografía

- [1] L. Huybrechts, "WO2006117029A1. Use of polylysine in combination with either green tea or olive extracts or both for use against halitosis," 2006.
- [2] E. J. Lee, S. W. Lee, H. G. Choi, and C. K. Kim, "Bioavailability of cyclosporin A dispersed in sodium lauryl sulfate-dextrin based solid microspheres.," *Int. J. Pharm.*, vol. 218, pp. 125–131, 2001.
- [3] N. Uyanik and C. Erbil, "Monomer reactivity ratios of itaconic acid and acrylamide copolymers determined by using potentiometric titration method," *Eur. Polym. J.*, vol. 36, pp. 2651–2654, 2000.
- [4] V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, and J. Lyklema, "Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 309, no. 2, pp. 194–224, 2007.
- [5] M. Maury, K. Murphy, S. Kumar, L. Shi, and G. Lee, "Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 59, no. 3, pp. 565–573, 2005.
- [6] "Laboratory Scale Spray Drying Of Inhalable Drugs: A Review," <http://www.buchi.com/en/file/bestbuchi59laboratoryspraydryingofinhalabledrugs.pdf>, 2010.
- [7] A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, C. Rossi, and M. Ricci, "Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation," *Chem. Eng. J.*, vol. 160, no. 1, pp. 363–369, 2010.
- [8] K. Möbus, J. Siepmann, and R. Bodmeier, "Zinc – alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 81, pp. 121–130, 2012.
- [9] K. Mladenovska, O. Cruaud, P. Richomme, E. Belamie, R. S. Raicki, M. Venier-julienne, E. Popovski, J. P. Benoit, and K. Goracinova, "5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization," *Int. J. Pharm.*, vol. 345, pp. 59–69, 2007.
- [10] S. A. Shoyele, N. Sivadas, and S. A. Cryan, "The effects of excipients and particle engineering on the biophysical stability and aerosol performance of parathyroid hormone (1-34) prepared as a dry powder for inhalation.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, no. 1, pp. 304–311, Mar. 2011.
- [11] N. Sivadas, D. O. Rourke, A. Tobin, V. Buckley, Z. Ramtoola, J. G. Kelly, A. J. Hickey, and S. Cryan, "A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins," *Int. J. Pharm.*, vol. 358, pp. 159–167, 2008.
- [12] C. Muzzarelli, V. Stanic, L. Gobbi, G. Tosi, and R. Muzzarelli, "Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres," *Carbohydr. Polym.*, vol. 57, no. 1, pp. 73–82, 2004.
- [13] J. D. Ormes, D. Zhang, A. M. Chen, S. Hou, D. Krueger, T. Nelson, and A. Templeton,

- “Design of experiments utilization to map the processing capabilities of a micro-spray dryer: particle design and throughput optimization in support of drug discovery,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 121–129, 2013.
- [14] S. Clas, C. Dalton, and B. Hancock, “Differential scanning calorimetry: applications in drug development,” *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 2, no. 8, pp. 311–320, Aug. 1999.
- [15] A. W. Burton, K. Ong, T. Rea, and I. Y. Chan, “On the estimation of average crystallite size of zeolites from the Scherrer equation: A critical evaluation of its application to zeolites with one-dimensional pore systems,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 117, pp. 75–90, 2009.
- [16] F. Palazzo, S. Giovagnoli, A. Schoubben, P. Blasi, C. Rossi, and M. Ricci, “Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin-palladium complex,” *Int. J. Pharm.*, vol. 440, no. 2, pp. 273–82, 2013.
- [17] “United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30–NF 25,” *United States Pharmacopeial Conv.*, Rockville, MD, 2007.
- [18] W. Kaiyaly, A. Alhalaweh, S. P. Velaga, and A. Nokhodchi, “Effect of carrier particle shape on dry powder inhaler performance,” *Int. J. Pharm.*, vol. 421, no. 1, pp. 12–23, 2011.
- [19] ASTM-Norm-D5032, “Standard Practice for maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Glycerin Solutions.” 1997.
- [20] R. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, “Alginic Acid,” in *Handbook of pharmaceutical excipients 6th Ed*, vol. 40, no. 3, 2009, pp. 20–22.
- [21] S. Shukla, A. Singh, A. Kumar, and A. Mishra, “Review on production and medical applications of -polylysine,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 65, pp. 70–81, 2012.
- [22] I. M. El-Sherbiny, S. McGill, and H. D. C. Smyth, “Swellable Microparticles as Carriers for Sustained Pulmonary Drug Delivery,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 5, pp. 2343–2356, 2010.
- [23] C. Bosquillon, C. Lombry, V. Pr eat, and R. Vanbever, “Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance,” *J. Control. Release*, vol. 70, no. 3, pp. 329–339, 2001.
- [24] D. D. Pham, E. Fattal, N. Ghermani, N. Guiblin, and N. Tsapis, “Formulation of pyrazinamide-loaded large porous particles for the pulmonary route: Avoiding crystal growth using excipients,” *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no. 2, pp. 668–677, 2013.
- [25] Copley-Scientific, “Quality Solutions for Who are Copley.” Edition Brochure, 2012.
- [26] S. P. Duddu, S. A. Sisk, Y. H. Walter, T. E. Tarara, K. R. Trimble, A. R. Clark, M. A. Eldon, R. C. Elton, M. Pickford, P. H. Hirst, S. P. Newman, and J. G. Weers, “Improved Lung Delivery from a Passive Dry Powder Inhaler Using an Engineered PulmoSphere[®] Powder,” *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 689–695, 2002.
- [27] K. T. Ung, N. Rao, J. G. Weers, A. R. Clark, and H. K. Chan, “In Vitro Assessment of Dose Delivery Performance of Dry Powders for Inhalation,” *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 48, no. 10, pp. 1099–1110, 2014.
- [28] Council of Europe, *European Pharmacopoeia 7.0*. 2010.
- [29] V. A. Marple, B. A. Olson, K. Santhanakrishnan, J. P. Mitchell, S. C. Murray, and B. L.

- Hudson-Curtis, "Next Generation Pharmaceutical Impactor Part II: Archival Calibration," *J. Aerosol Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 301–324, 2003.
- [30] M. J. Donovan and H. D. C. Smyth, "Influence of size and surface roughness of large lactose carrier particles in dry powder inhaler formulations.," *Int. J. Pharm.*, vol. 402, no. 1–2, pp. 1–9, 2010.
- [31] Y. B. Wang, A. B. Watts, J. I. Peters, S. Liu, A. Batra, and R. O. Williams, "In Vitro and In Vivo performance of dry powder inhalation formulations: comparison of particles prepared by thin film freezing and micronization," *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 4, pp. 981–993, 2014.
- [32] S. S. Razavi Rohani, K. Abnous, and M. Tafaghodi, "Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of insulin with regard to the selection of excipients.," *Int. J. Pharm.*, vol. 465, no. 1–2, pp. 464–478, 2014.
- [33] A. J. Ávila, C. Gutiérrez Ayesta, N. Ceschan, M. J. Yañez, and M. V. Ramírez-Rigo, "Morfología y aerosolización de micropartículas inhalables portadoras de fármacos acondicionadas a diferentes humedades relativas," *Acta Microsc.*, vol. 25, 4to Congreso de la Sociedad Argentina de Microscopía, pp. 163–164, 2016.
- [34] P. Ansell, "Developments in electron microscopy," *Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 40–48, 2000.
- [35] J. X. Zhang, X. J. Li, L. Y. Qiu, X. H. Li, M. Q. Yan, Yi Jin, and K. J. Zhu, "Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly (N-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups: Preparation, in vitro and in vivo evaluation.," *J. Control. Release*, vol. 116, no. 3, pp. 322–329, 2006.
- [36] H. X. Ong, D. Traini, M. Bebawy, and P. M. Young, "Epithelial profiling of antibiotic controlled release respiratory formulations," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 9, pp. 2327–2338, 2011.
- [37] I. PermeGear, "Parts of a Franz Cell," <http://permegear.com/parts-of-a-franz-cell/>.
- [38] R. Krishnamoorthy and A. K. Mitra, "Prodrugs for nasal drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, pp. 135–146, 1998.
- [39] J. D. Rabinowitz and A. C. Zaffaroni, "7,048,909 B2. Delivery of Beta-blockers through an inhalation route," 2006.
- [40] H. C. Yeh and G. M. Schum, "Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition," *Bull. Math. Biol.*, vol. 42, pp. 461–480, 1980.
- [41] A. A. Onischuk, T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, N. A. Zhukova, A. M. Baklanov, V. V. Karasev, G. G. Dultseva, V. V. Boldyrev, and V. M. Fomin, "Anti-inflammatory effect from indomethacin nanoparticles inhaled by male mice.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–43, 2008.
- [42] L. Gallo, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "Formulation and characterization of polysaccharide microparticles for pulmonary delivery of sodium cromoglycate," *AAPS PharmSciTech*, vol. En prensa, 2016.
- [43] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol.

72, pp. 248–254, 1976.

- [44] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
- [45] N. D. M. Villanueva, A. J. Petenate, and M. A. A. P. Da Silva, “Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model,” *Food Qual. Prefer.*, vol. 11, no. 5, pp. 363–370, 2000.
- [46] K. F. Nimon, “Statistical assumptions of substantive analyses across the general linear model: A mini-review,” *Front. Psychol.*, vol. 3, pp. 1–5, 2012.

*No podemos resolver problemas pensando de la misma
manera que cuando los creamos.*

Albert Einstein

Capítulo 3.

Obtención y caracterización fisicoquímica del sistema ácido algínico-atenolol

3.1. Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 1, los fármacos que presentan problemas de biodisponibilidad por vía oral, efectos adversos en su sitio de administración o que requieren menores dosis para tratamientos pulmonares locales respecto de su administración por la ruta oral son principios activos candidatos para formulaciones de administración inhalatoria.

En particular, los β -bloqueantes poseen pobre biodisponibilidad cuando se los administra oralmente y, si bien no existen aún productos en el mercado, la vía inhalatoria se reportó como una alternativa que permitiría mejorar su desempeño terapéutico [1]. Además, la administración pulmonar de varios principios activos pertenecientes a este grupo farmacológico permitiría un rápido comienzo de acción cuando se los utiliza como antiarrítmicos [2].

Atenolol (AT) se seleccionó como principio activo modelo dentro de este grupo terapéutico. Este es un fármaco selectivo β -1-bloqueante cardíaco con efecto inotrópico y cronotrópico negativo. Además de su aplicación para el tratamiento de la hipertensión arterial por vía oral, se administra por vía intravenosa cuando se requiere una rápida intervención, como es el caso del infarto agudo de miocardio [3] y, recientemente, fue propuesto para el tratamiento de la hipertensión pulmonar [4].

La biodisponibilidad de atenolol cuando se administra por vía oral ronda el 40-50 %. Esto se debe a su pobre permeación intestinal y a que experimenta un intenso efecto de primer paso hepático. Presenta alta solubilidad en medio acuoso pero baja permeabilidad por vía oral, razón por la cual pertenece al grupo III del sistema de clasificación biofarmacéutica [5]. Dependiendo de la dosis, el atenolol administrado oralmente puede causar efectos adversos en el sistema nervioso central, como letargia y cansancio, los cuales limitan la adherencia de los pacientes. Gostick y col. indicaron que el cansancio es significativo cuando la dosis es mayor a 100 mg por día [6]. También se reportaron efectos gastrointestinales, como náuseas, colitis isquémica y diarrea, entre otros, con una incidencia del 8,8 % [7].

Con el objetivo de superar los efectos adversos y aumentar la biodisponibilidad sistémica de atenolol, se propusieron sistemas de administración transdérmica [5]. Sin embargo, ya que la permeación pasiva de AT por esta vía es limitada, para lograr adecuados niveles de absorción

fue necesario el agregado de promotores de la permeación en las formulaciones [5], la utilización de sistemas de microagujas [8] o iontoforesis [9].

La administración inhalatoria de AT reviste particular interés debido a que la capacidad metabólica del pulmón es considerablemente menor que la hepática por lo que se necesitarían menores dosis comparadas con la vía oral [10]. Además se ha reportado que el atenolol permea adecuadamente en membranas respiratorias [11].

Es importante destacar que AT es aproximadamente 20 veces más potente para bloquear receptores β -1-adrenérgicos (receptores cardíacos) que para bloquear receptores β -2-adrenérgicos (receptores presentes en la musculatura lisa bronquial). Aunque se recomendó usar con precaución este fármaco en pacientes que padecen asma [12], dos meta-análisis publicados por Selpeter y col. indicaron que dosis de atenolol entre 50 y 200 mg en pacientes que sufren de enfermedades pulmonares obstructivas no manifestaron efectos adversos respiratorios [13][14]. Además, De Plaen y col. demostraron que a dosis intravenosas tan elevadas como 600 mg, este fármaco no exhibió bloqueo β -2 [15]. Las dosis inhalatorias de AT propuestas por Rabinowitz y Zaffaroni se encuentran entre 0,1 y 20 mg [16]. Por lo tanto, la formulación inhalatoria presenta una dosis marcadamente por debajo de aquellas que no demostraron efectos adversos respiratorios, lo cual permitiría suponer que el bloqueo β -2 no es un impedimento para el desarrollo de formulaciones inhalatorias de atenolol.

Por otra parte, en el Capítulo 1 también se mencionó que formular complejos iónicos, compuestos por polielectrolitos y fármacos de carga opuesta, permite el diseño de nuevas entidades químicas con características diferentes a las de los fármacos puros.

En esta Tesis, el polielectrolito seleccionado para formar el complejo iónico con AT fue ácido algínico (AA). AA es un polímero natural producido por las algas pardas, las cuales constituyen su principal fuente de materia prima. El alga parda gigante *Macrocystis pyrifera* (orden *Laminaria*) crece abundantemente en las costas de las provincias de Chubut y Santa Cruz. Además, el AA es un producto extracelular de microorganismos como *Pseudomonas auruginosa* y *Azotobacter vinelandii*. El AA está compuesto por unidades repetitivas de ácidos urónicos: ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico, siendo la composición relativa entre uno y otro dependiente de las condiciones de extracción, el lugar de recolección y las variaciones estacionales [17].

El AA es biocompatible, no tóxico, biodegradable y posee propiedades espesantes, impermeabilizantes, estabilizantes, gelificantes, texturizantes, formadoras de películas y

bioadhesivas que resultan atractivas para aumentar el tiempo de residencia de principios activos en su sitio de absorción/acción, mejorando tanto la efectividad como la biodisponibilidad de los fármacos [18]–[20].

Este polielectrolito se ha propuesto como material portador de proteínas [21] y de antibióticos antituberculosos [22] en formulaciones de administración inhalatoria. La interacción iónica entre AA y los principios activos otorgó estabilidad a las formulaciones. Para el caso puntual de los antimicrobianos, la combinación prolongó el tiempo de residencia del principio activo en el pulmón, reduciendo el número de administraciones necesarias para cumplir con la farmacoterapia. Esto es particularmente relevante para tratamientos con antituberculosos, los cuales pueden extenderse durante varios meses [22].

Además, recientemente se demostró que oligosacáridos de ácido algínico tienen la capacidad de modificar las propiedades viscoelásticas del mucus que recubre el sistema respiratorio, rompiendo las redes de hidrogel de mucina y facilitando la penetración de principios activos [23]. Estos oligosacáridos demostraron ser seguros para su administración inhalatoria en ensayos de toxicidad *in vivo* [23]. De esta manera, AA posee propiedades atractivas para el desarrollo de sistemas de administración inhalatoria aplicables al tratamiento de enfermedades que cursan con producción aumentada de mucus, como la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica [23].

Las Figuras 3.1 y 3.2 muestran la estructura química de AT y de AA, respectivamente. El pKa de AT es de 9,6 y en la Figura 3.1 se remarca el grupo amino secundario. En la Figura 3.2 se destacan los grupos ácidos de las subunidades de ácido manurónico y gulurónico. El AA presenta un pKa de 3,5.

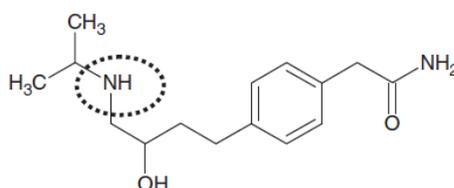


Figura 3.1. Estructura química de atenolol en la cual se resalta el grupo amino

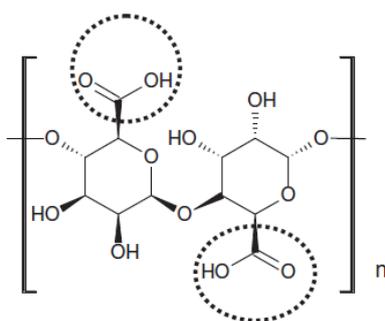
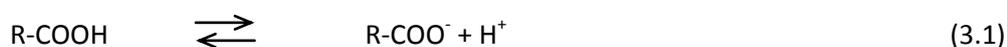


Figura 3.2. Estructura química de ácido algínico en la cual se resaltan los grupos ácidos

Cuando un polielectrolito ácido se combina con un fármaco básico en un medio acuoso se generan los pares iónicos según se indica a continuación:



donde R-COOH y R-COO⁻ representan el polielectrolito con su grupo carboxilo o carboxilato, respectivamente; F y FH⁺ representan la estructura del fármaco desprotonado o protonado y [R-COO⁻FH⁺] representa el par iónico. La Ecuación 3.4 se conoce como condensación de contraiones en soluciones de polielectrolitos [24][25]. Cuando se incorpora un contraión inorgánico, identificado como M⁺, se obtiene la estructura [M⁺R-COO⁻FH⁺].

Las propiedades de equilibrio de las dispersiones polielectrolito-fármaco se describieron para diferentes polímeros aniónicos, entre ellos, para el carbomer [26], el ácido hialurónico [27], la forma ácida de la carboximetilcelulosa [28] y el ácido algínico [29]. Particularmente, el sistema ácido algínico-atenolol fue estudiado por Ramírez Rigo y col. [29]. Estos investigadores prepararon mezclas de AA, AT y solventes (agua o etanol) en morteros, proceso seguido de una etapa de evaporación de solvente y molienda manual. Para el producto así obtenido, se estudió la liberación del principio activo tanto en agua como en solución salina de NaCl al 0,9 % a 37 °C. Cuando se utilizó agua se observó una alta proporción de pares iónicos en el medio. Por el contrario cuando se empleó un medio fisiológico, se disociaron los pares iónicos

permitiendo la liberación del fármaco [29]. Este precedente permitió postular que el secado por atomización de dispersiones acuosas AA-AT llevaría a la obtención de micropartículas de complejos iónicos. Además, y de acuerdo a lo expresado por los mismos investigadores, el producto sólido en contacto con un medio fisiológico tendría la capacidad de mojarse, hincharse y liberar el fármaco, el cual estaría disponible para ser absorbido.

3.2. Formulaciones

Considerando los antecedentes que indican que el complejo AA-AT puede disociarse proveyendo AT libre y que el AA permite lograr sistemas mucoadhesivos, que aumentan el tiempo de permanencia del fármaco en el pulmón y, por lo tanto, su pasaje a través de la membrana pulmonar, se prepararon las dispersiones ácido algínico-atenolol que se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición de las soluciones y dispersiones preparadas

Muestra	Formulación teórica					
	AA (g)	AT (g)	KOH (g)	Concentración AA (% p/v)	Composición ($\frac{g_{AT}}{g_{sólido}}$)	Sólidos totales (% p/v)
Formulaciones de composición binaria						
(AA-AT) ₂₅ 1,6%	2,47	0,75	-	1,2	0,23	1,6
(AA-AT) ₅₀ 1,6%	2,00	1,21	-	1,0	0,38	1,6
(AA-AT) ₇₅ 1,6%	1,68	1,52	-	0,8	0,48	1,6
(AA-AT) ₅₀ 4%	5,00	3,03	-	2,5	0,38	4,0
(AA-AT) ₅₀ 8%	10,00	6,06	-	5,0	0,38	8,0
(AA-AT) ₂₅ 1,3%	2,00	0,61	-	1,0	0,23	1,3
(AA-AT) ₇₅ 1,9%	2,00	1,82	-	1,0	0,48	1,9
(AA-AT) ₇₅ :K 1,7%	1,68	1,52	0,11	0,8	0,46	1,7
(AA-AT) ₇₅ :K 2%	2,00	1,82	0,13	1,0	0,46	2,0
Formulaciones de las materias primas puras						
AA 1%	2,00	-	-	1,0	-	1,0
AA 1,6%	3,21	-	-	1,6	-	1,6
AT 0,6%	-	1,21	-	-	-	0,6
AT 1,6%	-	3,21	-	-	-	1,6

Las formulaciones poseen distintos grados de neutralización de los grupos ácidos libres de AA y concentración de sólidos totales en la dispersión. Tal como se adelantó en el Capítulo 2, la nomenclatura usada para denominar las formulaciones es (AA-AT)_x Y%, donde el subíndice x representa el grado de neutralización de los grupos ácidos libres de AA (expresado como porcentaje) mientras que Y% representa el contenido de sólidos totales en la dispersión. Con propósitos comparativos también se formularon dispersiones/soluciones con los materiales

puros (AT o AA) y distinto porcentaje de contenido de sólido totales. Todas las formulaciones listadas en la Tabla 3.1 fueron procesadas mediante secado por atomización para la obtención de micropartículas.

Las alimentaciones líquidas para la obtención de micropartículas por secado por atomización se formularon con los siguientes propósitos:

- Para determinar la influencia de la relación AA:AT en el polvo obtenido por secado, los grupos ácidos de AA se neutralizaron en un 25, 50 y 75 % utilizando cantidades crecientes de AT. Para estas muestras, el contenido de sólidos totales se fijó en 1,6% de manera de poder evaluar de manera independiente la influencia del grado de neutralización en la calidad del producto y el desempeño del proceso de secado.
- Por otra parte, para analizar el efecto del contenido de sólidos totales sobre la calidad del polvo obtenido, se compararon dispersiones con un 50 % de neutralización de los grupos ácidos de AA y contenido de sólidos de 1,6, 4 y 8% (muestras (AA-AT)₅₀ 1,6%, (AA-AT)₅₀ 4% y (AA-AT)₅₀ 8%, respectivamente).
- Dado que AA posee propiedades viscosantes, se estudió el cambio en la viscosidad y en las propiedades del material obtenido cuando se varió el contenido de AT, mientras que la cantidad de polielectrolito se mantuvo constante (1 % p/v). Así se obtuvieron las dispersiones (AA-AT)_x Y% para x=25, 50 y 75 e Y=1,3, 1,6 y 1,9%, respectivamente.
- Para estudiar el efecto del pH en las dispersiones, a algunas de las muestras con x=75 se le adicionó una solución de KOH 0,09567 N en cantidades necesarias para ajustar el pH a valores cercanos a 7 y se las denominó (AA-AT)_x:K Y%. Si bien en general AA se presenta como sal sódica, debido a que una de las potenciales aplicaciones de las micropartículas es como antihipertensivo, no se utilizó NaOH por la implicancia del catión Na en el aumento de la presión arterial.
- A los fines comparativos, se prepararon soluciones o dispersiones de AT y AA como materiales puros dándoles la denominación AA Y% y AT Y%. En particular se prepararon las formulaciones AA 1% y AT 0,6% porque representan el contenido de cada material presente en el producto (AA-AT)₅₀ 1,6%, usado como referencia. Por otra parte, también se prepararon la dispersión de AA y solución de AT puros con una concentración de sólidos totales de 1,6%. Estas formulaciones se procesaron para poder comparar el rendimiento de estos materiales precursores con los productos co-procesados a igual contenido de sólidos.

Las alimentaciones líquidas, como se señaló en el Capítulo 2, se procesaron por secado por atomización seleccionando condiciones operativas y de diseño particulares. A modo de resumen en la Tabla 3.2 se detallan dichas variables.

Por otra parte se reitera que los polvos obtenidos se denominan (AA-AT)_x Y%^z, donde la letra z representa las condiciones de secado descritas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Condiciones operativas y de diseño

Condiciones (z)	Temperatura de entrada del aire (°C)	Caudal del aire de secado (m ³ /h)	Caudal de la alimentación líquida (mL/min)	Caudal del aire de atomización (L/h)	Tipo de ciclón
a	140	35	6	601	Convencional
b	140	35	6	742	Convencional
c	140	35	6	742	alta performance

Los sólidos obtenidos se caracterizaron a nivel molecular, particulado y a granel. La interacción iónica entre AA y AT se estudió mediante espectroscopía infrarroja asociada a transformación de Fourier. El estado cristalino de los materiales y su comportamiento térmico se determinó mediante difracción de rayos X de polvos y calorimetría diferencial de barrido, respectivamente. El tamaño de las partículas se determinó por difracción láser y la forma de las mismas por microscopía electrónica de barrido. Adicionalmente se determinaron las propiedades de flujo de los polvos obtenidos y su capacidad de captar humedad del medio. Finalmente se estimó el diámetro aerodinámico de las formulaciones para seleccionar aquellos sistemas con la mejor capacidad de llegar a regiones respirables del pulmón. También se determinaron propiedades biofarmacéuticas de algunos productos seleccionados, sin embargo éstos últimos resultados se presentan y discuten en el Capítulo 5.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterización de las alimentaciones a procesar en el secadero por atomización

La Tabla 3.3 muestra el pH, la viscosidad y la composición experimental de las soluciones y dispersiones preparadas según la metodología descrita en la Sección 2.2.3 y que se listan en la Tabla 3.1.

Como era de esperar, el pH de las dispersiones aumentó con el porcentaje de neutralización de los grupos ácidos de AA (ver Ec. 3.4). A igual contenido de sólidos totales, el pH se incrementó de 2,54 para AA 1,6% (0 % de grupos ácidos neutralizados) hasta 4,26 para la muestra (AA-AT)₇₅ 1,6%. El valor máximo de pH se logró cuando se adicionó KOH a la dispersión, ya que el agregado del contraión inorgánico de potasio permite la neutralización de grupos ácidos adicionales (ver Ec. 3.5).

Tabla 3.3. Composición, pH y viscosidad de la alimentación líquida para secar por atomización

Muestra	Propiedades experimentales		
	Composición (g _{AT} /g _{sólido})	Viscosidad cinemática (mm ² /seg)	pH
Formulaciones de composición binaria			
(AA-AT) ₂₅ 1,6%	0,22±0,01	7,02±0,07	2,98±0,02
(AA-AT) ₅₀ 1,6%	0,36±0,01	7,00±0,05	3,04±0,01
(AA-AT) ₇₅ 1,6%	0,46±0,02	4,18±0,08	4,26±0,02
(AA-AT) ₅₀ 4%	0,36±0,02	23,90±0,34	3,01±0,01
(AA-AT) ₅₀ 8%	0,37±0,02	54,14±0,42	3,00±0,03
(AA-AT) ₂₅ 1,3%	0,21±0,01	7,24±0,04	2,92±0,03
(AA-AT) ₇₅ 1,9%	0,46±0,03	4,60±0,04	4,11±0,02
(AA-AT) ₇₅ :K 1,7%	0,46±0,02	3,59±0,09	6,63±0,04
(AA-AT) ₇₅ :K 2%	0,45±0,02	3,65±0,08	6,55±0,03
Formulaciones conteniendo compuestos puros			
AA 1%	-	-	2,77±0,02
AA 1,6%	-	-	2,54±0,05
AT 0,6%	-	-	10,00±0,04
AT 1,6%	-	-	11,20±0,04

También se estudió el efecto de la viscosidad de la alimentación sobre la calidad de las micropartículas. Se trata de una propiedad que afecta de manera importante el tamaño de gota generada y el tamaño y morfología de las partículas obtenidas. Cuando la viscosidad disminuye, las gotas formadas son de menor tamaño y por lo tanto, debido al incremento de área superficial por unidad de volumen, aumenta la eficiencia del proceso de secado. Los valores de viscosidad cinemática obtenidos se ubican entre 3,65 y 54,14 mm²/s. Esto evidencia que tanto el porcentaje de neutralización como el contenido de sólidos en la dispersión afecta esta propiedad. Por otra parte, cuando se mantuvo fija la cantidad de AA, el valor de viscosidad disminuyó cuando aumentó el porcentaje de neutralización de los grupos ácidos del polielectrolito (desde 7,24 mm²/s para (AA-AT)₂₅ 1,3% hasta 4,60 mm²/s para (AA-AT)₇₅ 1,9%). Este resultado es razonable, ya que se conoce que en la medida que los grupos ácidos del polielectrolito son neutralizados, la viscosidad del medio disminuye [30]. La misma tendencia se evidenció al estudiar la dispersión (AA-AT)₇₅ 1,6%, donde el valor de viscosidad fue un 20 %

mayor que para (AA-AT)₇₅:K 1,7%. Cuando el porcentaje de neutralización se mantuvo fijo y aumentó la concentración de sólidos en la dispersión, la viscosidad aumentó considerablemente. Por ejemplo, para x=50, un incremento en el contenido de sólidos de 1,6 a 8% (aumento de 5 veces) provocó una viscosidad casi 8 veces mayor (de 7 a 54,14 mm²/s). Dado que el equipo de secado por atomización tiene un valor máximo recomendado de 250 Pa.s de viscosidad dinámica para su adecuado funcionamiento [31][32], para la dispersión (AA-AT)₅₀ 8% (la dispersión de mayor viscosidad cinemática) se determinó la viscosidad dinámica utilizando la densidad de este fluido (1,02 kg/m³). El valor obtenido resultó de 55,63 Pa.s. A partir de este resultado, se demostró que todas las formulaciones preparadas fueron aptas para alimentarse en el equipo de secado por atomización. El efecto de la viscosidad sobre la performance de secado y calidad del producto se abordará en secciones posteriores.

Como se requiere homogeneidad de la alimentación durante el tiempo que dura la atomización de la misma, se estudió el potencial electrocinético de las dispersiones con distinto porcentaje de neutralización: 25, 50 y 75 % para Y%= 1,3, 1,6 y 1,9%. Por inspección visual la dispersión de AA puro mostró tendencia a precipitar el sólido desde el seno del líquido [33]. Por el contrario, las dispersiones conteniendo AA y AT a evaluar no evidenciaron separación de fases. Como se indicó en la sección de métodos, los sistemas binarios se diluyeron hasta una concentración adecuada debido a requerimientos operativos del equipo. Todas las dispersiones demostraron un alto potencial electrocinético negativo (-37,23±0,52 mV para (AA-AT)₂₅ 1,3%, -42,73±0,29 mV para (AA-AT)₅₀ 1,6% y -45,12±0,26 mV para (AA-AT)₇₅ 1,9%). En efecto valores mayores a 30 mV en valor absoluto son indicadores de buena estabilidad [30]. Esta condición puede atribuirse a que las cadenas poliméricas de AA parcialmente neutralizadas por AT tienden a repelerse entre ellas lo suficiente como para impedir la agregación. El aumento del potencial electrocinético con la proporción de AT en la composición de la dispersión puede asociarse con el aumento del grado de ionización de los grupos carboxílicos libres de AA debido al aumento de pH cerca de su pKa.

La Tabla 3.1 presenta el diseño de las formulaciones líquidas, sin embargo en los procedimientos de pesada de los componentes para la preparación de las mismas existen desviaciones respecto a los valores deseados. Por esta razón, se determinó el contenido de AT en las formulaciones líquidas por UV (ver Sección 2.2.3) y se refirió el contenido de AT medido respecto a la cantidad de masa de sólidos pesada para cada muestra. La Tabla 3.3 presenta la composición medida experimentalmente, la cual está en muy buen acuerdo con la composición teórica de las formulaciones (ver Tabla 3.1).

3.3.2. Proceso de secado por atomización

La Tabla 3.4 muestra la temperatura del aire de salida (T_s) y el rendimiento luego del proceso de secado. Aun cuando se utilice una temperatura de aire de entrada de 140 °C (Tabla 3.2), los materiales son protegidos por el descenso térmico que se experimenta al evaporar el solvente (agua). El punto de mayor estrés térmico para las muestras ocurre cuando ya se obtiene el polvo y la temperatura del aire alcanza el valor T_s . Como la degradación térmica de AT comienza alrededor de 200 °C [34] y la de AA *ca.* 240 °C [35], aún a la máxima T_s (85 °C) las muestras no deberían experimentar procesos que afecten la estabilidad de los materiales. Es importante señalar que cuando se opera con las condiciones *c*, que involucran el uso de un ciclón de alta performance, las temperaturas de salida fueron aun menores que las observadas para las condiciones de secado *a* y *b*.

Tabla 3.4. Temperatura de salida del aire de secado y rendimiento

Muestra	T_s (°C)	Rendimiento (%)
Productos co-procesados		
(AA-AT) ₂₅ 1,6% ^a	79,5±0,7	59,76±2,45
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	82,7±0,6	65,90±2,38
(AA-AT) ₇₅ 1,6% ^a	79,0±1,4	58,69±3,30
(AA-AT) ₅₀ 4% ^a	78,0±1,2	72,70±2,88
(AA-AT) ₅₀ 8% ^a	80,0±1,8	52,31±3,51
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	85,0±0,0	58,72±1,53
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	83,7±0,6	67,40±2,23
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	80,2±1,8	45,84±2,64
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	78,5±2,5	85,18±0,52
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b	85,0±1,4	53,48±1,11
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	77,8±2,3	87,80±1,34
(AA-AT) ₇₅ :K 1,7% ^c	63,3±0,58	85,25±1,68
Materiales puros		
AA 1% ^a	83,3±0,5	18,14±3,01
AA 1,6% ^a	81,1±2,8	29,26±5,10
AA 1,6% ^c	62,6±1,16	33,73±1,72
AT 0,6% ^a	84,0±1,7	26,79±4,20
AT 1,6% ^a	82,5±2,5	26,04±4,20
AT 1,6% ^c	64,3±1,53	73,29±3,38

Para un contenido de sólidos totales 1,6% y condiciones de secado *a*, el porcentaje de neutralización no mostró una tendencia clara en el efecto que ocasiona en el rendimiento del proceso. En efecto, para las muestras (AA-AT)_x 1,6%^a con x= 25, 50 y 75 %, el rendimiento fue de 59,76, 65,90 y 58,69 %, respectivamente. Las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre las muestras (AA-AT)_x 1,6%^a con x= 25 y 75 % (valor $p > 0,05$), pero sí entre los materiales (AA-AT)₂₅1,6%^a y (AA-AT)₅₀ 1,6%^a y entre (AA-AT)₇₅ 1,6%^a y (AA-AT)₅₀ 1,6%^a (valor $p < 0,05$). Todos los valores de rendimiento obtenidos se consideran aceptables para un equipo

de secado escala laboratorio [36]. Sin embargo, cuando los materiales puros se secaron en las mismas condiciones (*a*), se observó una reducción sustancial en los valores de rendimiento (29,26 % para AA 1,6%^a y 26,04 % para AT 1,6%^a). El bajo rendimiento de los compuestos puros está de acuerdo con la observación de material acumulado en las paredes de la cámara de secado y/o en el ciclón. Esto indica que, bajo las condiciones de procesamiento *a*, las formulaciones binarias son más plausibles de ser procesadas por SA que los materiales puros.

Manteniendo el grado de neutralización constante ($x=50$ %) el aumento de sólidos totales de 1,6 a 4% causó un aumento de rendimiento de 10 %. Sin embargo, la muestra (AA-AT)₅₀ 8%^a constituyó una excepción a esta tendencia, obteniéndose un rendimiento más bajo (52,31 %). Esta disminución puede atribuirse a la alta viscosidad de esta formulación (la más alta de toda la serie), propiedad que puede haber causado la formación de gotas de mayor tamaño, menor eficiencia en el proceso de secado y, por lo tanto, mayor adhesión a la cámara del equipo [37][38].

Respecto de las variables operativas del equipo de SA, se ha reportado que el aumento del caudal del aire de secado permite obtener partículas más pequeñas [31], hecho favorable para los sistemas de administración inhalatoria para los cuales el tamaño de partículas es un atributo crítico de calidad. Con esta motivación, se procesó la formulación con el 75 % de grado de neutralización y un contenido de sólidos totales de 1,9% bajo las condiciones denominadas *b* (ver Tabla 3.2). La muestra (AA-AT)₇₅ 1,9%^b se obtuvo con un rendimiento 32 % menor respecto de (AA-AT)₇₅ 1,9%^a. A iguales restantes condiciones operativas y de diseño, el aumento de solo el caudal de aire de atomización de 601 a 742 L/h, causa la producción de gotas más pequeñas y consecuentemente un diámetro medio de micropartículas menor. La disminución de rendimiento observada se atribuyó a la falta de eficiencia de recolección de finos con el ciclón convencional. Por esta razón, se procesó la misma muestra bajo las condiciones *c* (ver Tabla 3.2), utilizando el ciclón de alta performance que ofrece la compañía Büchi. La Tabla 3.4 también muestra los resultados para el rendimiento cuando se obtuvo el producto (AA-AT)₇₅ 1,9%^c. Para las condiciones *c* el rendimiento fue de 85,18 %, el cual resultó ser 26,37 % mayor al obtenido bajo las condiciones *a*. Este resultado está directamente relacionado con la capacidad del ciclón de alta performance para coleccionar partículas finas [39].

Considerando la mejora en rendimiento observada mediante el uso del ciclón de alta performance, los componentes puros con un contenido de sólidos de 1,6% (que habían demostrado bajo rendimiento en las condiciones de secado *a*), se procesaron utilizando el set de variables definidas como *c*. El rendimiento observado para estos nuevos ensayos también

se muestra en la Tabla 3.4 y, como puede verse, la modificación del caudal del aire de secado y del ciclón usado para coleccionar las partículas influyó marcadamente en el desempeño del secado del fármaco. Así, el rendimiento para el producto AT 1,6%^c mejoró un 181,45 % respecto de AT 1,6%^a. Sin embargo, las mejoras en el rendimiento por el uso de las condiciones c no fueron tan marcadas para el polímero puro. El rendimiento del proceso de obtención de la muestra AA 1,6%^c fue solo 15,28 % superior al obtenido para el caso AA 1,6%^a. Para AA y para ambas condiciones, se observó un importante pegado de masa en la cámara de secado. El efecto de este pegado en la composición de las micropartículas se discutirá en secciones posteriores.

Por otra parte, cuando se mantuvieron las condiciones de procesamiento por secado y se adicionó hidróxido de potasio a la alimentación para ajustar su pH hasta un valor cercano a 7, el rendimiento fue similar comparado con las muestras sin el agregado del contraión K. Por ejemplo para las condiciones c, el rendimiento para las muestras (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K2%^c fue de 85,18 y 87,80 %, respectivamente. En consecuencia, la pequeña modificación en el contenido de sólidos totales (de 1,9 a 2%) y la viscosidad de la alimentación (de 4,6 a 3,65 mm²/seg) no afectaron el desempeño del proceso de secado ni la recuperación del producto obtenido.

Como se demostró, el contenido de sólidos en la dispersión, el caudal del aire de atomización y el tipo de ciclón empleado tienen un alto impacto en el rendimiento del proceso de secado. El aumento de la cantidad de producto recuperado utilizando un ciclón de alta performance responde al nuevo diseño del equipo provisto por el tecnólogo para coleccionar partículas finas. Este diseño fue previamente propuesto por otros investigadores para obtener materiales aptos para la administración inhalatoria ya que los ciclones convencionales llevan a la obtención de bajos rendimientos para sistemas particulados en el rango adecuado para depositarse en regiones profundas del pulmón [40]–[42].

3.3.3. Caracterización del producto

3.3.3.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad residual de los productos está indicado en la Tabla 3.5. Todos los valores para las partículas portando AT son bajos, menores al 5,4 %, indicando que el proceso de secado a las condiciones seleccionadas es adecuado [36]. Los mayores valores de humedad

residual se observaron para las muestras de AA puro, probablemente debido a la naturaleza higroscópica de este material [33]. Por el contrario, las muestras de atenolol puro presentaron bajos valores de contenido de agua residual, resultado que se encuentra en buen acuerdo con la naturaleza no higroscópica del fármaco [43]. Cabe destacar que la humedad residual fue ligeramente mayor para los productos cuando se los recolectó empleando un ciclón de alta performance, resultado probablemente relacionado con la menor temperatura del aire de salida observada para estas muestras (Tabla 3.4).

3.3.3.2. Composición de las micropartículas

En la Tabla 3.5 también se presenta la composición de AT medida por UV (Sección 2.2.5.2) en los polvos obtenidos.

Tabla 3.5. Humedad residual y cargado de AT en los productos

Muestra	Humedad residual (%)	Composición (g _{AT} /g _{sólido})
Productos co-procesados		
(AA-AT) ₂₅ 1,6% ^a	4,36±0,41	0,30±0,01
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	5,32±0,98	0,48±0,01
(AA-AT) ₇₅ 1,6% ^a	4,35±0,05	0,59±0,02
(AA-AT) ₅₀ 4% ^a	4,14±0,08	0,50±0,01
(AA-AT) ₅₀ 8% ^a	3,43±0,46	0,58±0,02
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	5,14±0,86	0,36±0,01
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	3,55±0,01	0,63±0,02
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	3,95±0,14	0,62±0,01
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	4,69±0,78	0,53±0,01
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b	2,97±1,10	0,49±0,01
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	3,99±0,76	0,48±0,01
(AA-AT) ₇₅ :K 1,7% ^c	4,90±0,42	0,46±0,02
Materiales puros		
AA 1% ^a	7,24 [#]	-
AA 1,6% ^a	5,76±0,31	-
AA 1,6% ^c	6,37±0,42	-
AT 0,6% ^a	0,95 [#]	-
AT 1,6% ^a	0,58±0,01	-
AT 1,6% ^c	0,63±0,08	-

[#] Determinaciones únicas debido a la pobre cantidad de material obtenido

El contenido de AT se ubicó entre 0,47 y 0,63 g_{AT}/g_{sólido}. Es de remarcar que en la composición de las micropartículas, la cantidad de AT por gramo de sólido es mayor que en las alimentaciones líquidas, presentando diferentes grados de desviación. Como se mencionó en la Sección 3.3.2 y se muestra en la Tabla 3.4, el secado del polímero puro condujo a un bajo rendimiento. Este resultado está en acuerdo con la visualización de material pegado en la

cámara de secado. Por otra parte, debe considerarse que las micropartículas portadoras de AT presentan diferentes proporciones de AA que no interacciona ni con el fármaco ni con el contraión K (si este último estuviera presente). La discrepancia entre la composición de la alimentación y la del material particulado disminuyó cuando el porcentaje de neutralización resultó casi total (muestras conteniendo potasio). Este resultado está en buen acuerdo con el hecho de que es el AA no neutralizado el que presenta mayor tendencia al pegado en las paredes de la cámara.

3.3.3.3. Caracterización por FT-IR

Para caracterizar a nivel molecular los materiales particulados, se obtuvieron los espectros FT-IR de los productos (AA-AT)₂₅ 1,3%^a, (AA-AT)₅₀ 1,6%^a y (AA-AT)₇₅ 1,9%^a, los cuales se compararon con los materiales puros tal cual se recibieron del proveedor, los materiales puros obtenidos por secado por atomización (AA 1%^a y AT 0,6%^a) y una mezcla física compuesta por la misma proporción de AT/AA que el producto (AA-AT)₅₀ 1,6%. El objetivo fue analizar si el secado por atomización permite la obtención de complejos iónicos en estado sólido entre AA y AT.

Las Figuras 3.3-3.5 muestran los espectros FT-IR de las muestras anteriormente mencionadas, resaltando las siguientes bandas relevantes:

- grupos funcionales básicos o ácidos no ionizados
- grupos amino o carbonilo ionizados

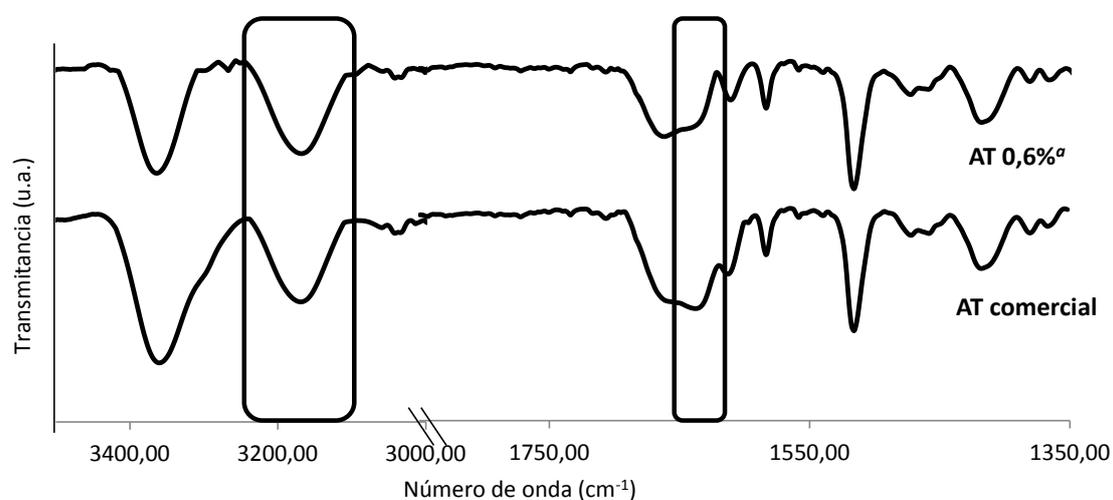


Figura 3.3. Espectros FT-IR de AT comercial y AT 0,6%^a. (u.a.: unidades arbitrarias)

Las Figuras 3.3 y 3.4 muestran los espectros de los materiales puros sin procesar y secados por atomización donde pueden verse las bandas características de absorción de AT y AA, respectivamente.

Para AT, la banda de flexión en el plano del grupo N-H aparece aproximadamente en 1635 cm^{-1} , mientras que la correspondiente a la tensión del mismo grupo aparece en 3160 cm^{-1} . Esto se encuentra de acuerdo con datos previamente publicados de la posición de las bandas correspondientes a estos grupos en el espectro de FT-IR de AT [35].

Como se muestra en la Figura 3.4, para el AA, la banda de tensión del grupo ácido carboxílico no disociado aparece a 1755 cm^{-1} .

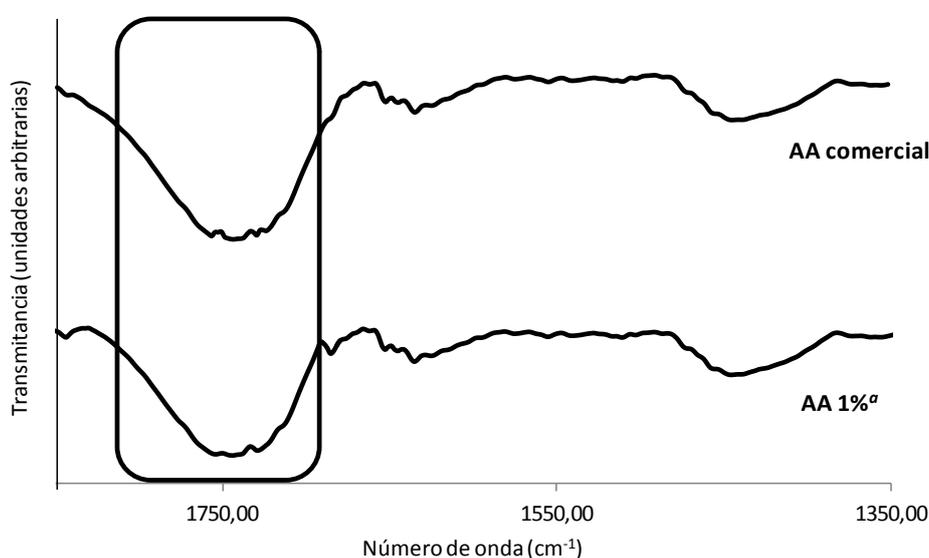


Figura 3.4. Espectros FT-IR de AA comercial y AA 1%ª. (u.a.: unidades arbitrarias)

La Figura 3.5 muestra la mezcla física de AA/AT. En la misma se pueden observar las bandas correspondientes al grupo amino de AT en 1638 y 3164 cm^{-1} . Por otra parte, también se distingue la banda correspondiente al grupo ácido carboxílico de AA que aparece en 1744 cm^{-1} .

La Figura 3.5 también exhibe los espectros FT-IR de los materiales co-procesados de composición binaria. En ellos se observan cambios significativos respecto a los materiales puros. Las bandas del grupo amino de AT desaparecen completamente, y aparece una nueva banda atribuida al movimiento de tijeras del grupo NH_2^+ alrededor de 1600 cm^{-1} (la posición exacta varía con el material analizado: 1594 cm^{-1} para $(\text{AA-AT})_{25}$ 1,3%ª, 1600 cm^{-1} para $(\text{AA-AT})_{50}$ 1,6%ª y 1609 cm^{-1} para $(\text{AA-AT})_{75}$ 1,9%ª). Estos cambios sugieren que los grupos amino de AT reaccionan completamente para formar el complejo iónico.

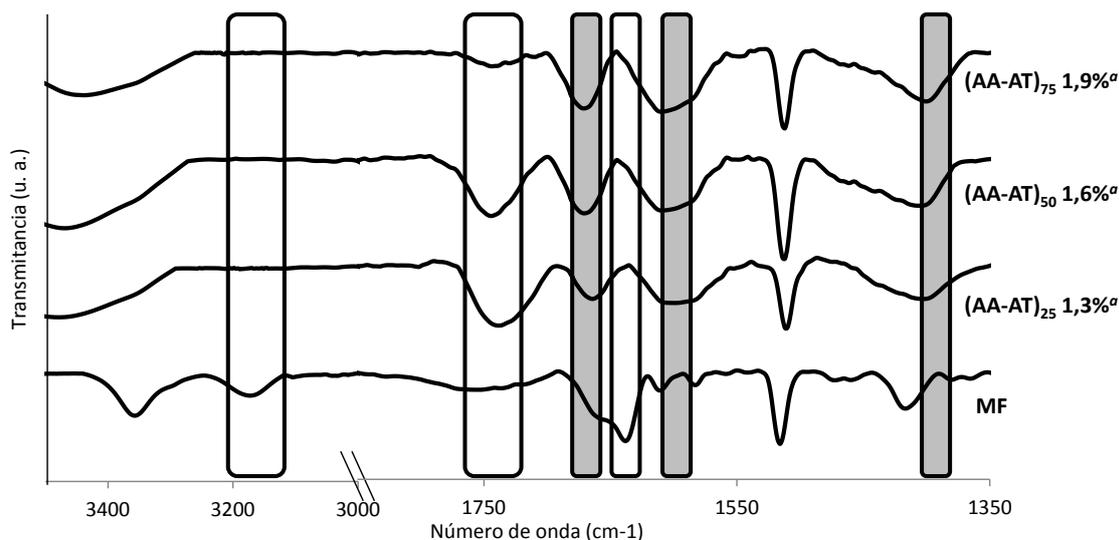


Figura 3.5. FTIR de la mezcla física y de los materiales co-procesados $(AA-AT)_x$ 1,3-1,9%. Los recuadros sin relleno muestran las bandas asociadas a los grupos básicos o ácidos no disociados. Los recuadros rellenos resaltan las bandas atribuidas a los grupos básicos o ácidos disociados. (u.a.: unidades arbitrarias)

Además de los cambios asociados con el grupo amino de AT, una intensa banda atribuida a la tensión asimétrica de los grupos carboxilatos de AA se encontró en 1660 cm^{-1} para $(AA-AT)_{25}$ 1,3%, 1669 cm^{-1} para $(AA-AT)_{50}$ 1,6% y 1675 cm^{-1} para $(AA-AT)_{75}$ 1,9%. Además de la aparición de la banda asociada a la tensión asimétrica del carboxilato, la banda que corresponde a la tensión simétrica del mismo grupo se ubicó con forma de hombro en 1400 cm^{-1} para $(AA-AT)_{25}$ 1,3%, 1413 cm^{-1} para $(AA-AT)_{50}$ 1,6% y 1402 cm^{-1} para $(AA-AT)_{75}$ 1,9%. Finalmente, la banda correspondiente a la tensión del grupo C=O de AA se puede observar en 1739 cm^{-1} para $(AA-AT)_{25}$ 1,3%, 1740 cm^{-1} para $(AA-AT)_{50}$ 1,6% y 1739 cm^{-1} para $(AA-AT)_{75}$ 1,9%. Sin embargo, la intensidad de la misma decrece cuando crece el porcentaje de neutralización de los grupos ácidos de AA.

Los importantes cambios observados en los materiales $(AA-AT)_x$ 1,3-1,9% respecto de los espectros FT-IR de los materiales puros demuestran la interacción iónica entre los grupos amino de AT y los grupos carboxilos de AA. Estos materiales co-procesados mediante secado por atomización constituyen una nueva entidad química en estado sólido denominada complejo polielectrolito-fármaco.

3.3.3.4. Análisis térmico

El comportamiento térmico de las mismas muestras analizadas por FT-IR se estudió mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB). La Tabla 3.6 muestra la temperatura de transición vítrea (T_g) para AA y algunos materiales co-procesados seleccionados. También se incluyen los valores de la temperatura y entalpía de fusión para el AT.

Los termogramas de AT (material puro y secado por atomización, Figura 3.6) mostraron un pico endotérmico en 153,48 °C, evento asociado a la fusión del fármaco [43]. Este pico también estuvo presente en la mezcla física (se ubicó en 153,83 °C, Figura 3.7) pero no en los materiales co-procesados (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a. Se ha descrito que las propiedades térmicas de una mezcla física son equivalentes a la suma de los comportamientos térmicos de los componentes individuales [44]. Cuando se observan desviaciones, las mismas indican algún tipo de interacción entre los constituyentes [45]. En los materiales co-procesados obtenidos, la ausencia de la endoterma de fusión es una evidencia indirecta de la ausencia de la estructura cristalina de AT. Este hecho, sumado a los cambios observados en los espectros de FT-IR de los materiales obtenidos por secado por atomización respecto de las materias primas confirma la interacción iónica entre AA y AT.

Tabla 3.6. Comportamiento térmico de los materiales puros, la mezcla física (MF) y los productos de secado (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a

Muestra	Temperatura de transición vítrea (T_g) (°C)	ΔC_p (J/g°C)	Temperatura de inicio de la fusión de AT (T_{onset}) (°C)	ΔH_f (J/g de AT)
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	111,01±2,39	0,21±0,02	-	-
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	125,67±3,02	0,21±0,01	-	-
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	133,32±3,53	0,43±0,04	-	-
AA	110,65±2,47	0,44±0,06	-	-
AA 1% ^a	110,97±3,18	0,21±0,04	-	-
AT	-	-	153,48±1,08	128,22±1,35
AT 0,6% ^a	-	-	152,62±1,56	103,30±1,68
MF	109,98±2,95	0,22±0,05	153,83±1,80	120,82±2,01

Los termogramas de AA tal cual se recibió del proveedor y el AA secado por atomización, como los materiales (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a mostraron cerca de 100 °C una endoterma ancha, asociada a la pérdida de agua de sorción, ya que la misma solo se encontró en el primer calentamiento (Figuras 3.6 y 3.7) [35].

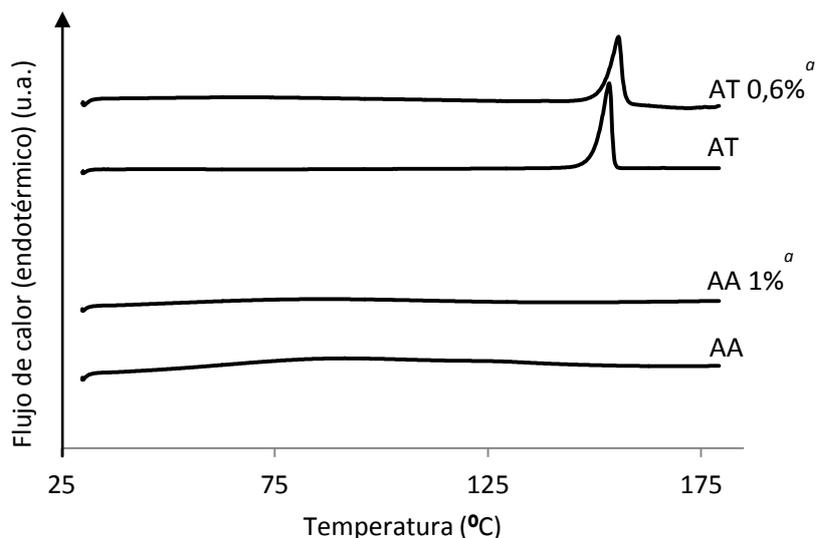


Figura 3.6. Comportamiento térmico de los materiales precursores tal como se recibieron de los proveedores (AA y AT) o procesados mediante secado por atomización (AA 1% y AT 0,6%), (u.a.: unidades arbitrarias)

En un segundo calentamiento, habiendo eliminado el agua residual, se determinó la T_g de AA y los complejos iónicos en polvo (Tabla 3.6). El valor de T_g aumentó cuando el grado de neutralización se incrementó. Este efecto puede deberse al efecto anti-plastificante que AT ejerce en la estructura de AA. Aquí se postula que el AT se ubica en el volumen libre entre las cadenas de AA, interaccionando con ellas mediante una reacción de neutralización [46]. Este efecto en la T_g fue previamente reportado para otros sistemas de polielectrolitos asociados con moléculas a través de interacciones fuertes, como lo son la interacción iónica [47].

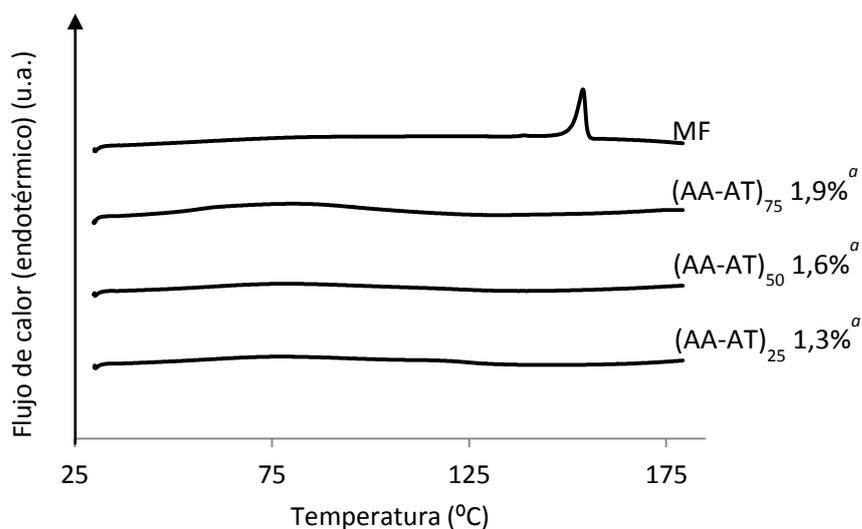


Figura 3.7. Comportamiento térmico de los materiales co-procesados binarios y la mezcla física (MF), (u.a.: unidades arbitrarias)

Los valores de T_g también pueden relacionarse a la tendencia de los materiales a pegarse durante el proceso de secado por atomización [48]–[50]. En concordancia con esto es que Bhandari y col. propusieron que la temperatura del aire de entrada no debiera estar más de 20 °C por encima de la T_g del material que se está secando, de manera de aumentar el rendimiento del proceso [49]. En el secado de los materiales co-procesados no se evidenciaron problemas de rendimiento, ya que la temperatura del aire de salida fue inferior a la T_g de estos compuestos. Sin embargo debe considerarse que: a) existen grupos libres de AA (i.e., sin combinarse con AT) en todas las alimentaciones formuladas; y b) en algún área de la cámara de secado, la temperatura puede ser próxima a la T_g de AA (110 °C) favoreciendo el pegado selectivo de AA en la cámara. De hecho, la composición de los materiales secos (Tabla 3.5) difiere de la composición de la alimentación preparada (Tabla 3.3).

3.3.3.5. Caracterización cristalográfica

Con el objetivo de evaluar cambios cristalinos asociados a la composición y procesamiento de las formulaciones, en esta sección se presenta el análisis cristalográfico de las mismas muestras examinadas por calorimetría diferencial de barrido.

La Figura 3.8 presenta el difractograma obtenido para AT. Como allí puede observarse, AT como materia prima posee estructura cristalina. La posición e intensidad de las reflexiones se encuentran acordes a datos previamente publicados [45]. El pico de intensidad relativa 100 se ubicó a la distancia interplanar de 12,4 Å, en concordancia con otros reportes de literatura científica [51]. Para el AT secado por atomización (AT 0,6%^a), este pico resultó menos intenso. Esta muestra mantuvo la estructura cristalina (i.e., las reflexiones se ubicaron en las mismas posiciones angulares que las correspondientes al AT sin procesar por secado por atomización), aunque el grado de cristalinidad, el hábito y los planos cristalinos serían diferentes, como consecuencia del procesamiento del material [18][52]. aunque el grado de cristalinidad, el hábito y los planos cristalinos serían diferentes, como consecuencia del procesamiento del material [18][52]. Esto se evidencia indirectamente en el menor ΔH_f que el material secado por atomización presentó respecto de la materia prima sin procesar (ver Tabla 3.6).

Para comparar el cambio de cristalinidad entre el AT procesado y sin procesar por secado por atomización se utilizó la ecuación de Scherrer [53]. Para el AT sin procesar, el tamaño del paquete cristalino responsable de originar el pico en 12,4 Å resultó de 149 nm. En cambio, para el AT secado por atomización el tamaño de dicho paquete fue de solo 42 nm. Esto

demuestra que el proceso de secado modifica el grado de cristalinidad. Además la pérdida de cristalinidad también puede observarse en la elevación de la línea de base entre 15 y 30°, comportamiento característico del material amorfo.

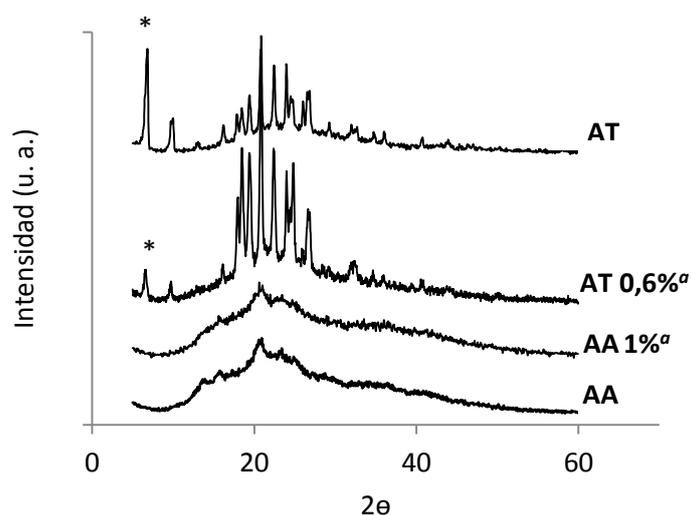


Figura 3.8. Difractograma de los materiales puros procesados por SA y sin procesar. (u.a.: unidades arbitrarias)

Respecto del polielectrolito, el AA sin procesar mostró una estructura compuesta por regiones cristalinas con picos en 15,1 y 20,0°, los cuales se encuentran en buen acuerdo con lo reportado por Ikeda y col. [18]. Este arreglo cristalino se encuentra inmerso en una matriz amorfa, como se puede deducir de la elevación de la línea de base entre 15 y 40° [18][54]. Cuando el AA se secó por atomización, la estructura resultante fue aún más desordenada que el material sin procesar.

La mezcla física (MF) de ambos componentes mostró las reflexiones características de AT y la elevación de la línea de base otorgada por AA (ver Figura 3.9). Por el contrario, los difractogramas de las muestras co-procesadas mostraron el patrón correspondiente a una estructura amorfa (Figura 3.9). Las reflexiones propias de la estructura cristalina de AT no se observan mientras que aquellas relacionadas con las porciones cristalinas de AA se modifican significativamente, en especial cuando el grado de neutralización se incrementa hasta 75 %. Estos resultados indican que el secado rápido de AT no es suficiente para explicar la estructura amorfa del fármaco en los productos AA-AT, ya que el fármaco puro secado por atomización mantiene la estructura cristalina. La interacción entre el polielectrolito y el fármaco sería la

responsable de evitar la cristalización del principio activo en el proceso de secado, probablemente asociado a cambios en la nucleación espontánea de ambos componentes.

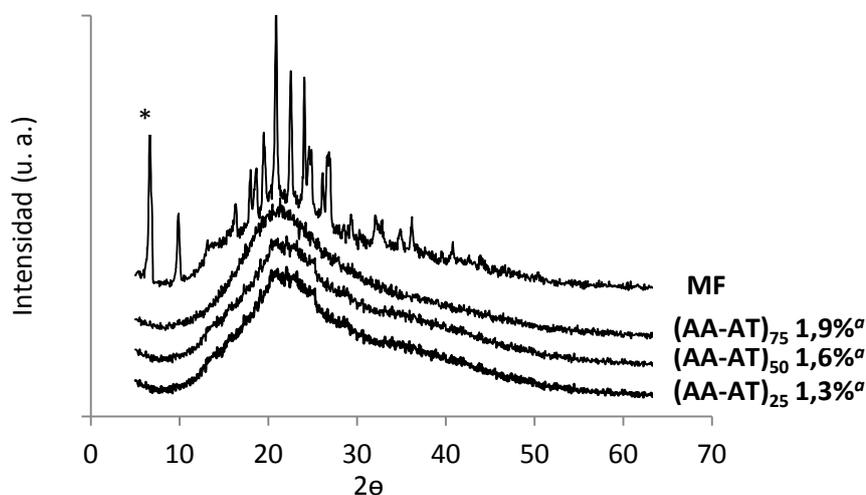


Figura 3.9. Difractograma de la mezcla física (MF) y los materiales co-procesados (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a. (u.a.: unidades arbitrarias)

3.3.4. Morfología y tamaño de las micropartículas

La tecnología de secado por atomización permite la obtención de partículas con diferente morfología, dependiendo de las propiedades de la formulación alimentada y de las condiciones operativas seleccionadas [55]. Con el objetivo de estudiar el impacto de estos parámetros en el sistema polielectrolito-fármaco bajo estudio, la morfología de las micropartículas se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Figuras 3.10-3.13).

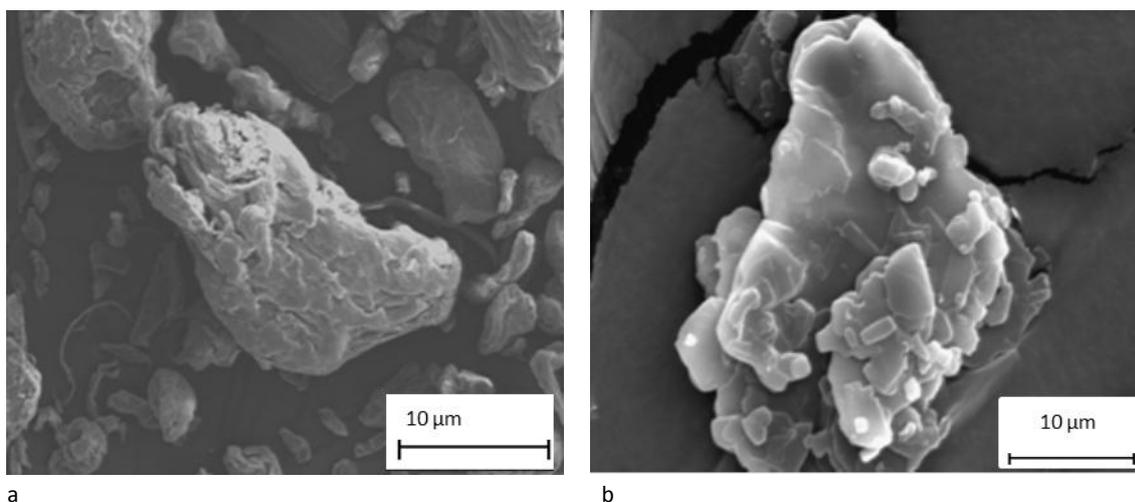


Figura 3.10. Micrografías MEB de las materias primas a 3000X: a) ácido algínico (AA) y b) atenolol (AT)

Como puede verse en la Figura 3.10.a, el AA sin procesar está compuesto por partículas irregulares, de superficie rugosa y escamosa.

Por su parte, el AT como materia prima (Figura 3.10.b) mostró estructura de láminas agrupadas, superpuestas de forma irregular y tamaño variable, en concordancia con la morfología descrita por Marini y col. [51].

La Figura 3.11 muestra micrografías del producto sólido obtenido secando AA y AT puros (AA 1%^o y AT 0,6%^o) a distintas magnificaciones. Las fotografías del AA procesado por SA muestran partículas en su mayoría de forma alveolar y algunas de las cuales son comparativamente más grandes que el resto. El atenolol secado por atomización (AT 0,6%^o) presenta partículas de forma poliédrica cuyas caras planas pueden asociarse a la estructura cristalina de este compuesto luego del procesamiento por SA. Ambos materiales secados por atomización mostraron superficies lisas.

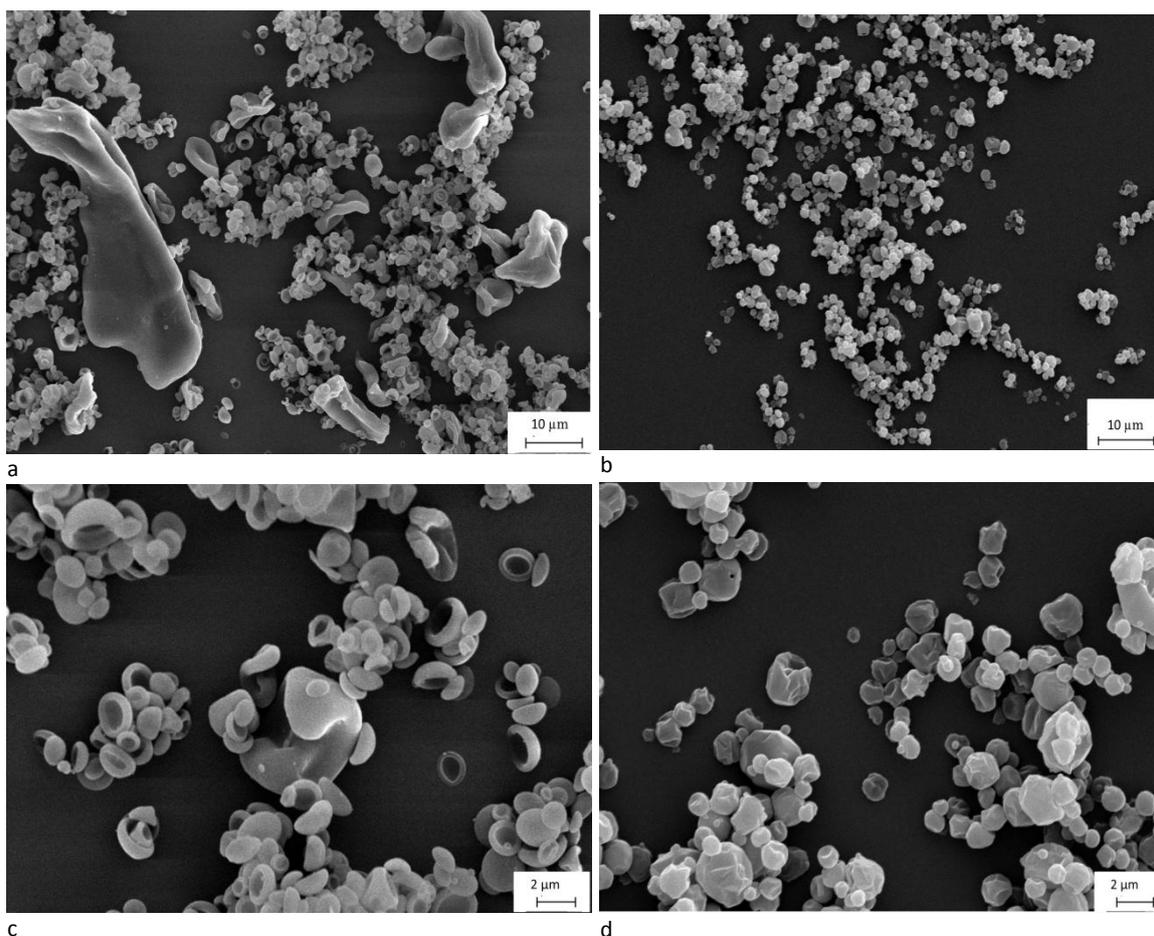


Figura 3.11. Micrografías a distintas magnificaciones de AA y AT secados por atomización. a) AA 1%^o (3000X); b) AT 0,6%^o (3000X); c) AA 1%^o (10000X); d) AT 0,6%^o (10000X)

La Figura 3.12 muestra las micropartículas AA-AT obtenidas secando alimentaciones con igual grado de neutralización de los grupos ácidos de AA ($x=50\%$) y con diferente contenido de sólidos totales para las condiciones de tratamiento α . Las micropartículas co-procesadas resultaron marcadamente diferentes a las materias primas, tanto secadas por atomización como sin procesar (Figuras 3.10 y 3.11). Como puede verse en la Figura 3.12, las partículas resultan más redondeadas y con menos zonas deprimidas a medida que aumenta el contenido de sólidos en la dispersión. En todos los casos se puede observar que los materiales co-procesados exhiben superficies arrugadas y son de forma colapsada, morfología esperada para partículas aditivadas con polímeros [56]. Por otra parte no se observan cristales, coincidiendo con el análisis de los difractogramas de DRX y los termogramas para las muestras cargando el fármaco, lo cual refuerza la hipótesis de que AT se asoció completamente con AA.

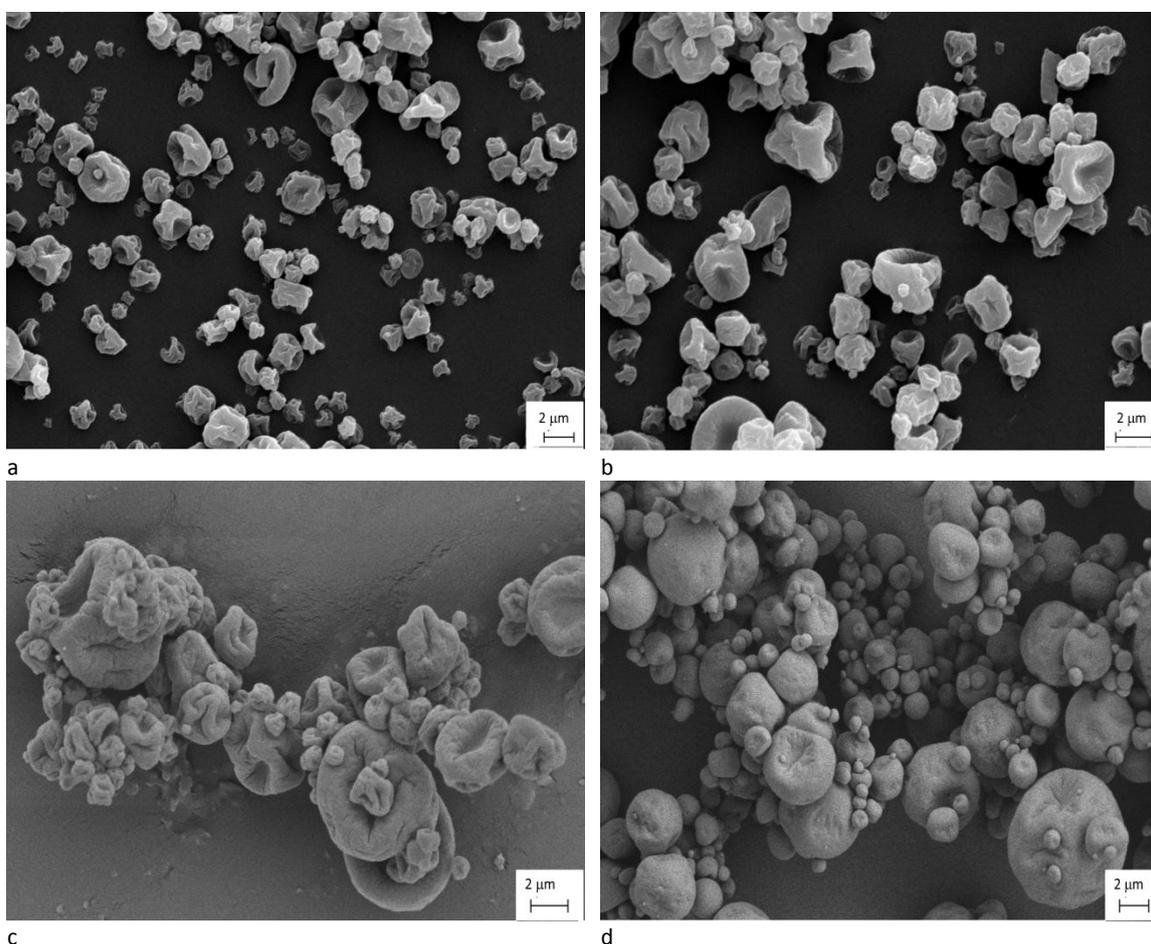


Figura 3.12. Micrografías de las micropartículas $(AA-AT)_{50}$ 1,6-8% ^{α} . a) $(AA-AT)_{50}$ 1,6% ^{α} (8000X); b) $(AA-AT)_{50}$ 1,6% ^{α} (10000X); c) $(AA-AT)_{50}$ 4% ^{α} (10000X); d) $(AA-AT)_{50}$ 8% ^{α} (8000X)

La morfología de micropartículas poliméricas puede explicarse mediante su comportamiento durante el proceso de secado. Para estos compuestos la distribución de los sólidos dentro de la gota durante el secado no es homogénea. La baja capacidad de las macromoléculas para la

difusión causa un enriquecimiento de material en la superficie de la gota, formándose una especie de coraza en etapas tempranas del secado. Dependiendo de las características de esa coraza, tales como espesor y propiedades mecánicas, la misma puede colapsar o arrugarse resultando en productos con formas colapsadas o elipsoidales [55]. Basado en esta teoría, la diferente forma observada para AA 1%^a y los materiales compuestos por AA y AT podría indicar que la interacción entre estos componentes cambia las propiedades de los materiales durante el proceso de secado.

La Figura 3.13 compara los polvos a iguales condiciones de tratamiento con y sin el agregado de potasio para dos niveles de concentración de sólidos. Las micrografías indican que la variación del grado de neutralización agregando KOH para ajustar el pH no afectó sensiblemente la morfología de las partículas.

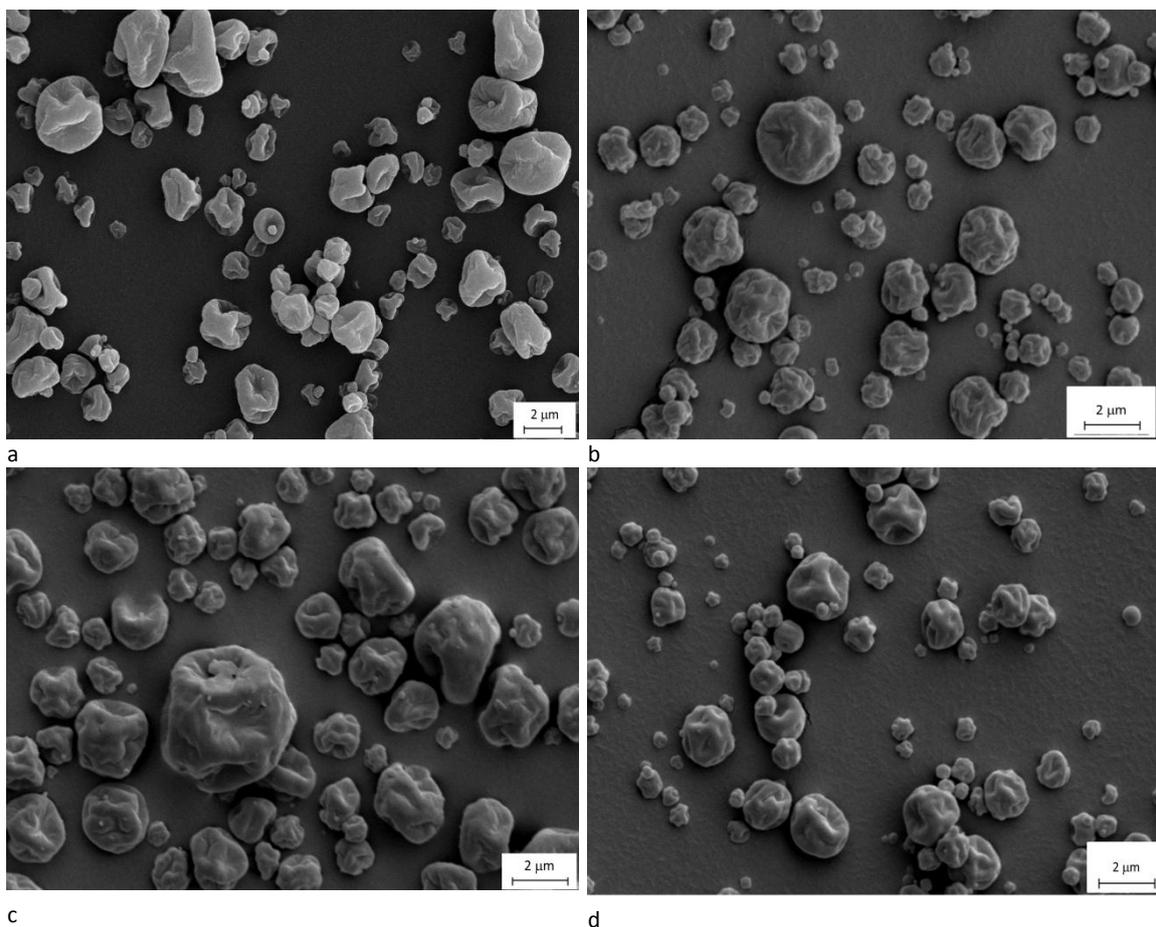


Figura 3.13. Imágenes MEB de las micropartículas: a) (AA-AT)₇₅ 1,9%^b (15000X); b) (AA-AT)₇₅ 1,9%^c (15000X); c) (AA-AT)₇₅:K 2%^b (15000X); d) (AA-AT)₇₅:K 2%^c (15000X)

En conclusión, como es de esperar, variaciones importantes en el contenido de sólidos totales afectan la morfología de las micropartículas resultantes del co-procesamiento de AT y AA.

La Tabla 3.7 muestra el diámetro volumétrico medio (D_{43}) y ancho de las distribuciones de tamaño de partículas (expresado como *span*) para distintas formulaciones y condiciones de procesamiento. Puede verse que el tamaño medio de las distribuciones se ubicó entre 3,40 y 6,97 μm . Para un mismo porcentaje de neutralización ($x=50$ y $x=75$) y variables de procesamiento fijas, el tamaño medio aumentó a medida que se incrementó el contenido de sólidos totales. Para $(\text{AA-AT})_{50}$ $Y\%^a$, el D_{43} aumentó alrededor de un 15 % cuando el contenido de sólidos se elevó de 1,6 a 4%, hecho probablemente asociado a una consolidación temprana de la coraza [55]. Posteriores aumentos en el contenido de sólidos ($Y=8\%$) no afectaron el diámetro volumétrico medio. Como puede verse en la Tabla 3.3, a igual grado de neutralización, la viscosidad aumenta con el contenido de sólidos totales. Esta propiedad condiciona el tamaño de la gota y por lo tanto los tamaños finales de las partículas (dispersiones más viscosas producen gotas más grandes durante la atomización). La viscosidad de la alimentación $(\text{AA-AT})_{75}$ 1,9% disminuyó cuando se ajustó el pH de la formulación (de 4,6 a 3,65 mm^2/seg) con KOH. Este efecto ocasionó que el aumento de neutralización por el agregado del contraión conduzca a menores diámetros volumétricos medios.

Tabla 3.7. Diámetro medio volumétrico y *span* para los materiales comerciales, puros secados por atomización y micropartículas co-procesadas

Muestra	D_{43} (μm)	<i>Span</i>
Materiales co-procesados		
$(\text{AA-AT})_{25}$ 1,6% ^a	6,37±0,32	0,93±0,11
$(\text{AA-AT})_{50}$ 1,6% ^a	5,50±0,30	1,26±0,10
$(\text{AA-AT})_{75}$ 1,6% ^a	6,97±0,08	0,97±0,09
$(\text{AA-AT})_{50}$ 4% ^a	6,33±0,36	1,02±0,06
$(\text{AA-AT})_{50}$ 8% ^a	6,31±0,24	1,04±0,08
$(\text{AA-AT})_{25}$ 1,3% ^a	5,59±0,08	1,02±0,12
$(\text{AA-AT})_{75}$ 1,9% ^a	5,64±0,05	1,08±0,07
$(\text{AA-AT})_{75}$ 1,9% ^b	5,15±0,11	1,11±0,04
$(\text{AA-AT})_{75}$:K 2% ^b	3,95±0,21	1,71±0,04
$(\text{AA-AT})_{75}$ 1,9% ^c	3,76±0,35	1,86±0,14
$(\text{AA-AT})_{75}$:K 2% ^c	3,40±0,10	1,69±0,07
Componentes puros		
AA	53,44±0,98	1,94±0,09
AA 1% ^a	8,95±0,26	1,43±0,15
AA 1,6% ^c	7,68±0,07	2,13±0,21
AT	61,25±0,71	1,98±0,12
AT 0,6% ^a	6,07±0,36	1,16±0,18
AT 1,6% ^c	5,85±0,53	2,15±0,25

Por otra parte, para $x=75\%$ el tamaño medio de partículas disminuyó cuando las condiciones de procesamiento cambiaron de a a b . Sin embargo y como se mencionó en la Sección 3.3.2, esta mejora en la calidad de producto llevó a una disminución del 32 % en el rendimiento del proceso por baja eficiencia de colección en el ciclón convencional. Para aumentar dicha eficiencia, se utilizó un ciclón de alta performance, con capacidad de colección de partículas de hasta $1\ \mu\text{m}$ (condición de secado c) [57]. Como puede observarse en la Tabla 3.7, el uso de este ciclón permitió disminuir el diámetro volumétrico medio del polvo obtenido.

Por otra parte, los valores de $span$ de los materiales secados fueron menor a 2 para todos los sistemas, excepto para AA y AT $1,6\%^c$. De esta manera, todas las micropartículas poliméricas portadoras de AT presentaron distribuciones de tamaño que pueden considerarse angostas [58].

En conclusión, el tamaño de las partículas obtenidas se vio afectado por la viscosidad de la alimentación (o el contenido de sólidos en la misma), el caudal del aire de atomización y el ciclón utilizado para coleccionar las partículas.

3.3.5. Densidades de los polvos y propiedades de flujo

La Tabla 3.8 muestra las densidades libre y empaquetada de los sistemas particulados, la densidad de la muestra, el índice de Carr y el ángulo de reposo.

La densidad de la muestra se ubicó entre $0,90$ y $1,38\ \text{g}/\text{cm}^3$. La tabla también muestra la misma propiedad para los materiales puros secados por atomización, los cuales resultaron de $1,10$ y $1,47\ \text{g}/\text{cm}^3$ para AT y AA, respectivamente. Considerando este resultado, se podría inferir que las partículas co-procesadas podrían tener huecos internos no conectados de mayor volumen que los existentes cuando se procesan los materiales precursores puros.

Para un grado de neutralización fijo, las densidades de la muestra fueron mayores para aquellas partículas obtenidas a partir de alimentaciones con mayor contenido de sólidos, situación previamente reportada [55]. Como el material $(AA-AT)_{75}\ 4\%^a$ tiene un diámetro volumétrico comparable con $(AA-AT)_{75}\ 8\%^a$, los valores de $D_{muestra}$ podrían indicar que el primer material está compuesto por partículas más huecas que el segundo.

Los valores de densidad de la muestra se utilizaron para estimar los diámetros aerodinámicos, los cuales se discutirán más adelante.

Tabla 3.8. Densidad de la muestra, libre y empaquetada, índice de Carr (*IC*) y ángulo de reposo de los materiales secados por atomización

Muestra	$D_{muestra}$ (g/cm ³)	D_{libre} (g/cm ³)	$D_{empaquetada}$ (g/cm ³)	<i>IC</i>	Ángulo de reposo (°)
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	1,38±0,02	0,27±0,01	0,44±0,01	36,98±4,30	31,84±2,71
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	1,01±0,04	0,28±0,03	0,43±0,02	36,02±3,48	31,87±3,80
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	0,90±0,06	0,26±0,01	0,44±0,01	40,64±0,62	31,78±3,41
(AA-AT) ₅₀ 4% ^a	1,08±0,05	0,27±0,01	0,47±0,02	41,66±3,06	31,47±5,92
(AA-AT) ₅₀ 8% ^a	1,26±0,03	0,25±0,01	0,43±0,03	43,26±4,87	31,47±5,86
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	0,93±0,06	0,22±0,01	0,33±0,01	34,79±2,02	32,06±2,54
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b	1,07±0,05	0,26±0,02	0,39±0,04	32,36±1,10	33,34±2,16
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	0,92±0,09	0,30±0,02	0,45±0,01	32,58±2,72	31,04±1,95
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	1,06±0,07	0,29±0,03	0,45±0,04	36,37±1,76	34,59±3,02
AA 1% ^a	1,47±0,03	-	-	-	-
AT 0,6% ^a	1,10±0,02	-	-	-	-

D_{libre} : densidad libre, $D_{empaquetada}$: densidad empaquetada, $D_{muestra}$: densidad de la muestra

La determinación del ángulo de reposo indicó que los materiales presentaron flujo bueno o libre (ver Tabla 2.2). Sin embargo, de acuerdo al índice de Carr, los materiales presentaron muy pobres o muy muy pobres propiedades de flujo (ver Tabla 2.1) [59]. Este resultado era el esperado considerando el pequeño D_{43} que todas las muestras presentaron. En general las partículas de administración inhalatoria son materiales cohesivos con tendencia a aglomerarse. Esto se debe a que las fuerzas atractivas de Van der Waals son las que dominan las interacciones entre las partículas para polvos finos de diámetros medios menores a 30 μm [60]. La aparente falta de concordancia de los resultados de flujo por las dos técnicas empleadas puede deberse a la presencia de aglomerados de naturaleza inestable en la formulación, que mejoran las propiedades de flujo de los materiales, lo cual se refleja en el ángulo de reposo. Sin embargo, estos aglomerados se desagregaron fácilmente en partículas individuales cuando se les aplicó una fuerza de compactación durante la medición de la densidad empaquetada, dato que se utilizó en el cálculo del Índice de Carr y que indica que los materiales presentan muy pobres propiedades de flujo.

Como se mencionó en la introducción, excipientes *carrier* permiten mejorar la fluidez de partículas de administración inhalatoria [61], y por lo tanto mejorar su performance durante el proceso de aerosolización [62][63]. Por esta razón, algunos materiales seleccionados se mezclaron con lactosa en una proporción 1:3 de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 2.2.7. Para calcular el *IC* de las mezclas micropartículas:lactosa se determinaron la D_{libre} y $D_{empaquetada}$ de las mismas. Los *IC* de las muestras con lactosa se muestran en la Tabla 3.9. Los resultados indican que, efectivamente, el agregado de lactosa tiene la capacidad de mejorar las propiedades de flujo de las micropartículas. Los nuevos valores calculados de *IC* indican

que el flujo mejoró de muy pobre a aceptable para las mezclas físicas de lactosa y (AA-AT)₇₅:K 2%^{b y c}:lactosa y de muy pobre a pobre para los sistemas (AA-AT)₇₅ 1,9%^{b y c}:lactosa (ver Tabla 2.1) [59]. Las mezclas con lactosa podrían considerarse como adecuadas para dosificarse en equipamientos convencionales de llenado de cápsulas, ya que la inclusión del excipiente logró un mejor manejo de los polvos. Por otro lado cabe resaltar que actualmente se persigue el uso de formulaciones libres de *carrier* [64]. Con este propósito hay trabajos realizados para el desarrollo de adaptaciones en máquinas de llenado de cápsulas que permitan trabajar con polvos cohesivos. Utilizando estos nuevos dispositivos, polvos de administración inhalatoria con naturaleza cohesiva y D_{libre} entre 0,10 y 0,45 g/mL, como las exhibidas por las micropartículas portando AT (Tabla 3.8) podrían dosificarse como sistemas libres de *carrier* [65][66].

Tabla 3.9. Índice de Carr (IC) de las micropartículas sin lactosa y con lactosa en proporción 1:3

Muestras	IC
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b :lactosa	29,87±1,23
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b :lactosa	24,72±2,09
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c :lactosa	26,83±1,89
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c :lactosa	24,07±1,75

3.3.6. Tendencia a la captación de humedad

La Tabla 3.10 muestra el contenido de humedad en el equilibrio a 25°C de los materiales co-procesados y del polímero AA comercial cuando se los almacenó a 75 % de humedad relativa (valor obtenido a partir de mezclas glicerina-agua, ver Tabla 2.3). Como se mencionó en la sección de secado por atomización, AA es un material muy higroscópico, lo cual queda reflejado al aumentar un orden de magnitud la humedad final (75 % p/p, Tabla 3.10) respecto de la inicial (7,24 % p/p, Tabla 3.5).

Tabla 3.10. Contenido de humedad en el equilibrio de los materiales obtenidos por SA a 25°C y 75 % HR

Muestra	Contenido de humedad en el equilibrio (% p/p)
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	16,50±0,57
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	19,16±0,86
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	21,53±0,64
(AA-AT) ₅₀ 4% ^a	20,07±0,47
(AA-AT) ₅₀ 8% ^a	24,18±0,64
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	15,81±0,98
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b	16,99±0,40
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	16,46±0,99
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	17,02±0,36
AA	75,29±0,41

Los materiales co-procesados presentaron una humedad en el equilibrio entre 15,81 y 24,18 % p/p. Este marcado descenso de la humedad final es una propiedad deseable ya que minimiza problemas de estabilidad durante el almacenamiento y facilita la manipulación de los materiales.

3.3.7. Estimación del diámetro aerodinámico (D_{aer}^e)

La Tabla 3.11 muestra la mediana de la distribución de tamaño de partículas expresada en volumen o masa (D_{50}) y los diámetros aerodinámicos estimados (D_{aer}^e) mínimo y máximo de los materiales, calculados según las Ecuaciones 2.6 y 2.7, respectivamente.

Tabla 3.11. Diámetro mediano (D_{50}) y diámetro aerodinámico medio estimado (D_{aer}^e)

Muestra	D_{50} (μm)	$D_{aer}^{e, \text{máx}}$ medio (μm)	$D_{aer}^{e, \text{min}}$ medio (μm)
(AA-AT) ₂₅ 1,3% ^a	5,28±0,09	6,20	3,50
(AA-AT) ₅₀ 1,6% ^a	5,20±0,32	5,23	3,40
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^a	5,31±0,08	5,03	3,52
(AA-AT) ₅₀ 4% ^a	5,94±0,45	6,17	4,07
(AA-AT) ₅₀ 8% ^a	5,91±0,35	6,63	3,88
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	4,63±0,15	4,47	2,65
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b	3,66±0,37	3,40	2,45
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	3,54±0,34	3,79	2,37
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	3,04±0,09	3,13	2,04

Como puede verse, el material (AA-AT)₇₅:K 2%^c presentó los diámetros aerodinámicos estimados más bajos, en concordancia con haber presentado el mínimo valor de D_{50} de la serie. Si se analiza la serie (AA-AT)₇₅ 1,9%^{a, b y c} puede verse cómo la modificación de las variables de proceso manteniendo constante la composición de la alimentación afectan los diámetros aerodinámicos estimados. Así, el aumento del caudal de atomización (condición *b*) causó una disminución del $D_{aer}^{e, \text{máx}}$ del 11 % respecto al valor del mismo parámetro cuando la muestra se procesó bajo la condición *a*. Por su parte, la combinación de un elevado caudal de aire de atomización con el ciclón de alta performance (condición *c*) logró disminuir en un 32 % el $D_{aer}^{e, \text{máx}}$ del polvo obtenido bajo las condiciones *a*. Como era de esperar, la misma tendencia se pudo observar para el $D_{aer}^{e, \text{min}}$ (Ecuación 2.6). En este caso se puede ver, también en la Tabla 3.11, que los diámetros aerodinámicos estimados resultaron más pequeños que cuando se utilizó la densidad de la muestra para calcularlos. Cabe mencionar que la densidad empaquetada subestima la densidad de la partícula en aproximadamente un 21 % debido al espacio vacío interparticular [67], mientras que la densidad de la muestra sobreestima la

densidad de la partícula en el caso de que las partículas sean porosas. En la primera situación, i.e., utilizando la densidad empaquetada, el $D_{aer}^{e,min}$ subestimaré el $D_{aer}^{e,max}$ real del material, mientras que en la segunda, i.e., haciendo uso de la densidad de la muestra, el $D_{aer}^{e,max}$ sobreestimaré el D_{aer} real. Estos D_{aer}^e medios se compararán con los diámetros aerodinámicos medios obtenidos en el impactador en cascada en el Capítulo 5.

Con el objetivo de conocer la distribución de diámetros aerodinámicos estimada, los datos completos de la distribución de tamaños geométricos obtenida por difracción láser se afectó por la raíz cuadrada de la densidad de la muestra. Este cálculo se realizó para los productos (AA-AT)₇₅ 1,9%^{a, b y c} y se muestra en la Figura 3.14.

Los materiales 1,9%^{a, b y c} se seleccionaron ya que los mismos presentaron un alto cargado del fármaco, buen rendimiento del proceso de secado y baja humedad residual. Cómo puede verse, la condición de secado c desplaza marcadamente la distribución hacia valores de D_{aer}^e más pequeños.

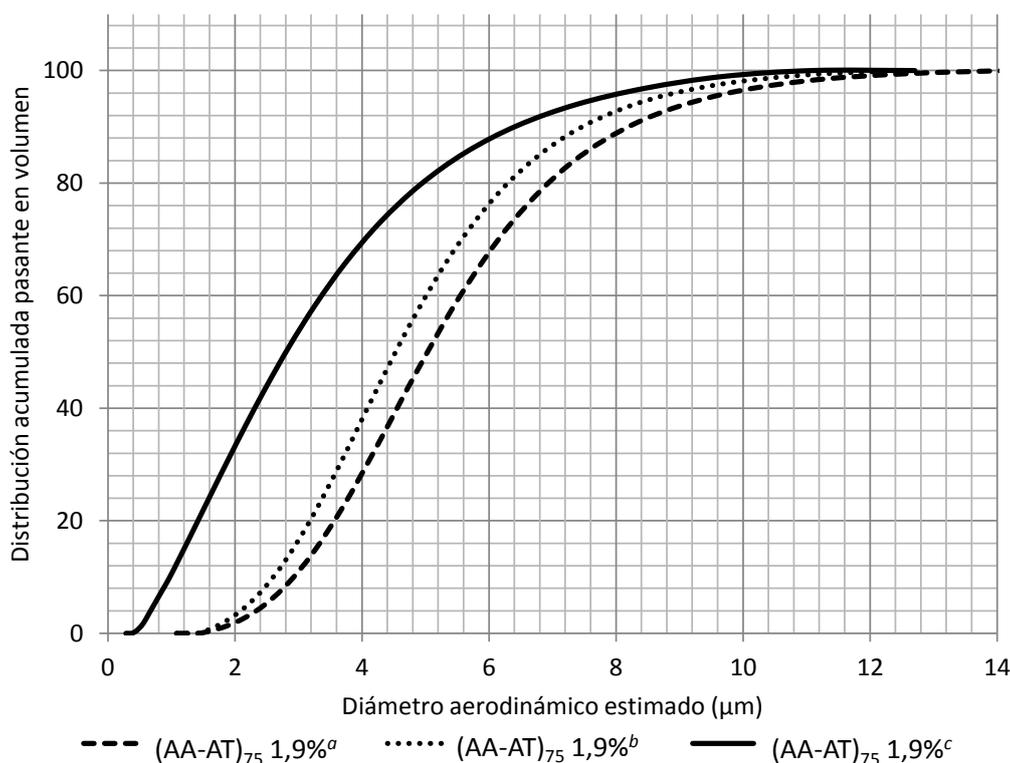


Figura 3.14. Distribución de diámetros aerodinámicos medios estimados (usando la densidad de la muestra) para los materiales (AA-AT)₇₅ 1,9%^{a, b y c}

En base a estos resultados de diámetro aerodinámico estimado, las muestras (AA-AT)₇₅ 1,9%^{b y c} fueron las elegidos para realizar los ensayos de caracterización biofarmacéutica (liberación del fármaco a partir del sólido, aerosolización *in vitro* y viabilidad celular). Debido a la necesidad de lograr sistemas que sean biocompatibles *in vivo*, los mismos estudios se realizaron para las micropartículas obtenidas a partir de alimentaciones con pH ajustado a valores cercanos a 7 (i.e., (AA-AT)₇₅:K 2%^{b y c}).

3.4. Conclusiones

Mediante el uso del polielectrolito ácido algínico se logró la obtención de sistemas particulados portadores de AT con buenos atributos para su administración por vía inhalatoria. Cambios en la composición de la alimentación líquida, en las variables operativas del proceso de secado y en la geometría del ciclón utilizado en la colección de las partículas permitieron modificar diferentes propiedades de los productos. Así, se pudo verificar que el contenido de sólidos y la viscosidad de la alimentación fueron las principales variables operativas que afectaron el proceso de secado cuando se utilizó un ciclón convencional para coleccionar las partículas. Sin embargo, fue el uso del ciclón de alta performance lo que permitió mejorar marcadamente el rendimiento del proceso de secado.

La interacción iónica entre AA y AT quedó demostrada, indicando que se obtuvo una nueva entidad química mediante la tecnología de secado por atomización en un proceso de base acuosa. Este nuevo material demostró flexibilidad en el cargado del fármaco a la vez que su procesamiento permitió modificar la calidad de los materiales obtenidos. Las formulaciones y condiciones de procesamiento con los mejores cualidades para la administración inhalatoria fueron (AA-AT)₇₅ 1,9%^{b y c} y (AA-AT)₇₅:K 2%^{b y c}, las cuales exhibieron alto rendimiento de secado, baja humedad residual, relativa baja tendencia a captar humedad el ambiente, alta cantidad de cargado de AT y pequeños diámetros aerodinámicos estimados. Las propiedades biofarmacéuticas de los materiales seleccionados serán presentadas en el Capítulo 5.

3.5. Bibliografia

- [1] R. Krishnamoorthy and A. K. Mitra, "Prodrugs for nasal drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, pp. 135–146, 1998.
- [2] R. L. Hale, C. C. Hodges, P. M. Lloyd, A. T. Lu, D. J. Myers, J. D. Rabinowitz, M. J. Wensley, J. A. McKinney, and A. C. Zaffaroni, "US 9211382 B2. Drug condensation aerosols and kits," 2015.
- [3] S. Yusuf, R. Peto, D. Bennett, D. Ramsdale, L. Furse, C. Bray, and P. Sleight, "Early intravenous atenolol treatment in suspected acute myocardial infarction: Preliminary Report of a Randomised Trial," *Lancet*, pp. 273–276, 1980.
- [4] P. P. So, R. A. Davies, G. Chandy, D. Stewart, R. S. Beanlands, H. Haddad, C. Pugliese, and L. M. Mielniczuk, "Usefulness of beta-blocker therapy and outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension," *Am. J. Cardiol.*, vol. 109, no. 10, pp. 1504–1509, 2012.
- [5] A. Ahad, F. I. Al-Jenoobi, A. M. Al-Mohizea, N. Akhtar, M. Raish, and M. Aqil, "Systemic delivery of β -blockers via transdermal route for hypertension," *Saudi Pharm. J.*, vol. 23, pp. 587–602, 2014.
- [6] N. K. Gostick, S. R. Mayhew, R. Million, D. Sagar, S. R. Suxena, D. F. Ingram, and N. P. Barmer, "A dose-response study of atenolol in mild to moderate hypertension in general practice," *Curr. Med. Res. Opin.*, vol. 5, no. 2, pp. 179–184, 1977.
- [7] B. N. C. Prichard, R. Simmons, M. J. Rooks, D. A. Haworth, D. Laws, and S. Wonnacott, "A double-blind comparison of monoxidine and atenolol in the management of patients with mild to moderate hypertension," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 20, no. 4, pp. 45–49, 1992.
- [8] K. Ita, N. Hatsakorzian, and V. Tolstikov, "Microneedle-Mediated Delivery of Atenolol and Bisoprolol Hemifumarate," *J. Nanopharmaceutics Drug Deliv.*, vol. 1, no. 1, pp. 38–44, 2013.
- [9] H. Keerthi, P. K. Panakanti, and M. R. Yamsani, "Design and Characterization of Atenolol Transdermal Therapeutic Systems: Enhancement of Permeability via Iontophoresis," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 66, no. 4, pp. 318–332, 2012.
- [10] B. Olsson, E. Bondesson, L. Borgström, S. Edsbäcker, S. Eirefelt, K. Ekelund, L. Gustavsson, and T. Hegelund-Myrbäck, "Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption," in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 1st Edition, H. D. C. Smyth and A. J. Hickey, Eds. Springer, 2011, pp. 21–50.
- [11] A. Tronde, B. Nordén, A. B. Jeppsson, P. Brunmark, E. Nilson, H. Lennerna, and U. Hultkvist Bengtsson, "Drug Absorption from the Isolated Perfused Rat Lung—Correlations with Drug Physicochemical Properties and Epithelial Permeability," *J. Drug Target.*, vol. 11, no. 1, pp. 61–74, 2003.
- [12] S. Krauss, E. Spitz, A. Krauss, B. Grizotzki, and S. Clement, "Treatment of hypertension in mild asthmatic patients with atenolol," *Angiology*, vol. 35, no. 12, pp. 773–778, 1984.

- [13] S. R. Salpeter, T. M. Ormiston, E. E. Salpeter, P. J. Poole, and C. J. Cates, "Cardioselective beta-blockers for chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis," *Respir. Med.*, vol. 97, no. 10, pp. 1094–1101, 2003.
- [14] S. R. Salpeter, T. M. Ormiston, and E. E. Salpeter, "Cardioselective beta-blockers in patients with reactive airway disease: a meta-analysis.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 137, no. 9, pp. 715–725, 2002.
- [15] J. F. De Plaen, A. Amery, and T. Reybrouck, "Comparative potency of atenolol and propranolol as beta-adrenergic blocking agents in man," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 10, no. 5, pp. 297–303, 1976.
- [16] J. D. Rabinowitz and A. C. Zaffaroni, "7,048,909 B2. Delivery of Beta-blockers through an inhalation route," 2006.
- [17] Ø. Holte, E. Onsøyen, R. Myrvold, and J. Karlsen, "Sustained release of water-soluble drug from directly compressed alginate tablets," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 20, pp. 403–407, 2003.
- [18] A. Ikeda, A. Takemura, and H. Ono, "Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis," *Carbohydr. Polym.*, vol. 42, no. 4, pp. 421–425, 2000.
- [19] J. Tu, S. Bolla, J. Barr, J. Miedema, X. Li, and B. Jasti, "Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization," *Int. J. Pharm.*, vol. 303, pp. 171–181, 2005.
- [20] G. Coppi, V. Iannuccelli, E. Leo, M. T. Bernabei, and R. Cameroni, "Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 27, no. 5, pp. 393–400, 2001.
- [21] K. Möbus, J. Siepmann, and R. Bodmeier, "Zinc – alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 81, pp. 121–130, 2012.
- [22] A. Zahoor, S. Sharma, and G. K. Khuller, "Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 4, pp. 298–303, 2005.
- [23] M. F. Pritchard, L. C. Powell, G. E. Menzies, P. D. Lewis, K. Hawkins, C. Wright, I. Doull, T. R. Walsh, E. Onsøyen, A. Dessen, R. Myrvold, P. D. Rye, A. H. Myrset, H. N. E. Stevens, L. A. Hodges, G. MacGregor, J. B. Neilly, K. E. Hill, and D. W. Thomas, "A New Class of Safe Oligosaccharide Polymer Therapy to Modify the Mucus Barrier of Chronic Respiratory Disease," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 3, pp. 863–872, 2016.
- [24] G. S. Manning, "Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties," *J. Chem. Phys.*, vol. 51, no. 3, pp. 924–933, 1969.
- [25] G. S. Manning, "Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions II. Self-Diffusion of the Small Ions," *J. Chem. Phys.*, vol. 51, no. 3, pp. 934–938, 1969.
- [26] A. F. Jimenez-Kairuz, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo, "Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels," *Int. J. Pharm.*, vol. 250, pp. 129–136, 2003.
- [27] F. D. Battistini, M. E. Olivera, and R. H. Manzo, "Equilibrium and release properties of

- hyaluronic acid-drug complexes.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 588–594, 2013.
- [28] M. V. Ramírez Rigo, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo, "A linear free energy relationship treatment of the affinity between Carboxymethylcellulose and basic drugs," *Mol. Pharm.*, vol. 1, no. 5, pp. 383–386, 2004.
- [29] M. V. Ramirez Rigo, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo, "Swellable drug–polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid Characterization and delivery properties," *Int. J. Pharm.*, vol. 322, pp. 36–44, 2006.
- [30] M. G. Carneiro-da-Cunha, M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, "Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production," *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 3, pp. 522–528, 2011.
- [31] A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, C. Rossi, and M. Ricci, "Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation," *Chem. Eng. J.*, vol. 160, no. 1, pp. 363–369, 2010.
- [32] R. P. Raffin, D. S. Jornada, I. Ré, A. Pohlmann, and S. S. Guterres, "Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation," *Int. J. Pharm.*, vol. 324, pp. 10–18, 2006.
- [33] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, M. Quinn, N. Armstrong, R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. Quinn, "Alginic Acid," in *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th Editio., R. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, Eds. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association, 2009, pp. 218–220.
- [34] M. Wesolowski and B. Rojek, "Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques," *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2013.
- [35] J. P. Soares, J. E. Santos, G. O. Chierice, and E. T. G. Cavalheiro, "Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt," *Eclética Química*, vol. 29, no. 2, pp. 57–64, 2004.
- [36] M. I. U. Islam and T. A. G. Langrish, "An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 46–56, 2010.
- [37] S. J. Lukasiewicz, "Spray-Drying Ceramic Powders," *J Am. Ceram. SOC*, vol. 72, no. 4, pp. 617–624, 1989.
- [38] N. R. Rabbani and P. C. Seville, "The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders.," *J. Control. Release*, vol. 110, no. 1, pp. 130–140, 2005.
- [39] K. B. Prinn, H. R. Costantino, and M. Tracy, "Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [40] M. J. Maltesen, S. Bjerregaard, L. Hovgaard, S. Havelund, and M. van de Weert, "Quality by design - Spray drying of insulin intended for inhalation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, no. 3, pp. 828–838, 2008.
- [41] K. Mosén, K. Bäckström, K. Thalberg, T. Schaefer, H. G. Kristensen, and A. Axelsson,

- “Particle formation and capture during spray drying of inhalable particles.,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 9, no. 4, pp. 409–417, 2004.
- [42] K. Stahl, M. Claesson, P. Lilliehorn, H. Lindén, and K. Bäckström, “The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 233, pp. 227–237, 2002.
- [43] V. Caplar, Z. Mikotid-Mihun, H. Hofman, J. Kuftinec, F. Kajfei, A. Nagl, and N. Blaievid, “Atenolol,” in *Analytical profiles of drugs substances*, Vol. 13., K. Florey, Ed. Academic Press, INC, 1984.
- [44] J. Wells, “Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances,” in *Pharmaceutics, the science of dosage form design*, 2nd ed. Aulton, M.E. Churchill Livingstone Elsevier Science Limited, 2002, pp. 113–138.
- [45] R. Ficarra, P. Ficarra, M. R. Di Bella, D. Raneri, S. Tommasini, M. L. Calabro, A. Villari, and S. Coppolino, “Study of the inclusion complex of atenolol with b-cyclodextrins,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 23, pp. 231–236, 2000.
- [46] R. J. Chokshi, H. K. Sandhu, R. M. Iyer, N. H. Shah, W. Malick, and H. Zia, “Characterization of physico-mechanical properties of indomethacin and polymers to assess their suitability for hot-melt extrusion processes as a means to manufacture solid dispersion/solution.,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, no. 11, pp. 2463–2474, Nov. 2005.
- [47] A. L. Sarode, H. Sandhu, N. Shah, W. Malick, and H. Zia, “Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: Predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation.,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 48, no. 3, pp. 371–384, 2012.
- [48] B. Bhandari and T. Howes, “Relating the Stickiness Property of Foods Undergoing Drying and Dried Products to their Surface Energetics,” *Dry. Technol.*, vol. 23, pp. 37–41, 2005.
- [49] B. R. Bhandari and T. Howes, “Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods,” *J. Food Eng.*, vol. 40, pp. 71–79, 1999.
- [50] T. G. Langrish, “Assessing the rate of solid-phase crystallization for lactose: The effect of the difference between material and glass-transition temperatures,” *Food Res. Int.*, vol. 41, no. 6, pp. 630–636, 2008.
- [51] A. Marini, V. Berbenni, M. Pegoretti, G. Bruni, and P. Cofrancesco, “Drug-excipient compatibility studies by physico-chemical techniques. The case of atenolol,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 73, pp. 547–561, 2003.
- [52] R. A. Esteves de Castro, R. M. Barbosa, and J. Sim, “Infrared spectroscopy of racemic and enantiomeric forms of atenolol,” *Spectrochim. Acta Part A*, vol. 67, pp. 1194–1200, 2007.
- [53] A. W. Burton, K. Ong, T. Rea, and I. Y. Chan, “On the estimation of average crystallite size of zeolites from the Scherrer equation: A critical evaluation of its application to zeolites with one-dimensional pore systems,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 117, pp. 75–90, 2009.
- [54] L. Chen, T. Okuda, X. Y. Lu, and H. K. Chan, “Amorphous powders for inhalation drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 100, pp. 102–115, 2016.

- [55] R. Vehring, "Pharmaceutical particle engineering via spray drying.," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 999–1022, 2008.
- [56] Y. Sugiyama, R. J. Larsen, J.-W. Kim, and D. a Weitz, "Buckling and crumpling of drying droplets of colloid-polymer suspensions.," *Langmuir*, vol. 22, no. 14, pp. 6024–6030, 2006.
- [57] "Laboratory Scale Spray Drying Of Inhalable Drugs: A Review," <http://www.buchi.com/en/file/bestbuchi59laboratoryscalespraydryingofinhalabledrugs.pdf>, 2010.
- [58] F. Palazzo, S. Giovagnoli, A. Schoubben, P. Blasi, C. Rossi, and M. Ricci, "Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin-palladium complex.," *Int. J. Pharm.*, vol. 440, no. 2, pp. 273–282, 2013.
- [59] "United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30–NF 25," *United States Pharmacopeial Conv.*, Rockville, MD, 2007.
- [60] M. Krantz, H. Zhang, and J. Zhu, "Characterization of powder flow: Static and dynamic testing," *Powder Technol.*, vol. 194, no. 3, pp. 239–245, 2009.
- [61] S. R. Carvalho, A. B. Watts, J. I. Peters, and R. O. Williams, "Dry Powder Inhalation for Pulmonary Delivery: Recent Advances and Continuing Challenges," in *Pulmonary Drug Delivery. Advances and Challenges*, 1st Edition, A. Nokhodchi and G. Martin, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 2015, pp. 35–62.
- [62] G. Pilcer, N. Wauthoz, and K. Amighi, "Lactose characteristics and the generation of the aerosol.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 233–256, 2012.
- [63] A. H. de Boer, P. Hagedoorn, M. Hoppentocht, F. Buttini, F. Grasmeyer, and H. W. Frijlink, "Dry powder inhalation: past, present and future," *Expert Opin. Drug Deliv.*, pp. 1–14, 2016.
- [64] G. Pilcer, V. De Bueger, K. Traina, H. Traore, T. Sebti, F. Vanderbist, and K. Amighi, "Carrier-free combination for dry powder inhalation of antibiotics in the treatment of lung infections in cystic fibrosis.," *Int. J. Pharm.*, vol. 451, pp. 112–120, 2013.
- [65] E. Faulhammer, M. Fink, M. Llusa, S. M. Lawrence, S. Biserni, V. Calzolari, and J. G. Khinast, "Low-dose capsule filling of inhalation products: critical material attributes and process parameters.," *Int. J. Pharm.*, vol. 473, pp. 617–626, 2014.
- [66] E. Faulhammer, M. Llusa, P. R. Wahl, A. Paudel, S. Lawrence, S. Biserni, V. Calzolari, and J. G. Khinast, "Development of a design space and predictive statistical model for capsule filling of low-fill-weight inhalation products," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 42, no. 2, pp. 221–230, 2016.
- [67] C. Bosquillon, C. Lombry, V. Pr at, and R. Vanbever, "Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance.," *J. Control. Release*, vol. 70, no. 3, pp. 329–339, 2001.

*La manera como se presentan las cosas no es la manera como son;
y si las cosas fueran como se presentan
la ciencia entera sobraría.*

Karl Marx

Capítulo 4.

Obtención y caracterización fisicoquímica del sistema polilisina-indometacina

4.1. Introducción

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo farmacológico con diversos inconvenientes en su administración oral y para los cuales se han explorado vías alternativas. En particular, se estudió la administración nasal y pulmonar de ketoprofeno, meloxicam e ibuprofeno [1]–[3]. Estas formulaciones se diseñaron con el objetivo de evitar los efectos adversos locales de la administración oral de los AINEs y para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio superior. Los resultados promisorios alcanzados han motivado extender el estudio de esta estrategia a otros fármacos del grupo.

Indometacina (IN) es un AINE derivado del ácido indol-acético. Como todos los fármacos de esta familia, IN posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. En particular, este fármaco se propone para reducir el dolor y la inflamación de enfermedades articulares como la artritis reumatoide, la tendinitis y la osteoartritis [4].

La indometacina es muy poco soluble en soluciones acuosas (5 µg/mL a 25 °C [5]), razón por la cual presenta baja biodisponibilidad cuando se lo administra por vía oral en formulaciones de liberación inmediata. La baja solubilidad pero alta permeabilidad por vía oral hace que este principio activo sea clase II en el sistema de clasificación biofarmacéutica [4].

Para aumentar la velocidad de disolución de IN se han abordado diferentes estrategias. Entre otras, obtención del fármaco en estado amorfo, reducción del tamaño de partícula y preparación de complejos de inclusión. Sin embargo, estas técnicas tienen como desventajas la inestabilidad del estado amorfo, el límite de tamaño de partícula conseguido y la limitación de la eficiencia de carga [6]–[8]. En este sentido, el secado por atomización emerge como una estrategia interesante para obtener sólidos en estado amorfo (cuya estabilidad podría manipularse mediante el co-procesado de sustancias) y partículas de pequeño tamaño, con buenas propiedades de dispersión.

Además de los inconvenientes de biodisponibilidad oral, el uso de indometacina se ve limitado por la alta incidencia de efectos adversos gastrointestinales. El mecanismo de acción de este fármaco inhibe la secreción de prostaglandinas protectoras de la mucosa gástrica. Por otra parte, el pH ácido estomacal favorece la forma no ionizada del fármaco, la cual tiene la capacidad de penetrar y acumularse en las células parietales del estómago. El medio

intracelular de las células mencionadas favorece la forma ionizada de indometacina, actuando como una trampa de iones y provocando alteraciones en el citoesqueleto celular [9]. Este último efecto puede evitarse administrando el fármaco por vías alternativas a la oral.

Los efectos adversos gastrointestinales de este principio activo son variados y de alta incidencia. Se destacan la dispepsia, hiperacidez, náuseas, vómitos, dolor epigástrico, úlceras y erosiones [4][9]. Por esta razón se exploraron vías de administración alternativas, sumado al objetivo de aumentar la biodisponibilidad de indometacina. Entre ellas se ha estudiado la administración percutánea de nanocápsulas conteniendo IN [10][11]. Sin embargo, el fármaco puro demostró baja tendencia a la permeación y absorción [11] y fue necesario el agregado de promotores de la permeación para lograr concentraciones elevadas de IN en el estrato córneo, desde donde puede absorberse a circulación sistémica [10][12]. De esta manera, la performance de las formulaciones tópicas de este principio activo demostró ser dependiente de cómo se las formule [10]. Respecto a la vía inhalatoria, en la literatura científica se reportan sistemas líquidos de administración nasal y nanopartículas de administración pulmonar de IN [13]–[15]. Al igual que para la vía tópica, la vía nasal requirió la incorporación de promotores de la permeación para la absorción del fármaco [14]. Las nanopartículas de administración pulmonar lograron una adecuada absorción sistémica del principio activo, sin el agregado de promotores de la permeación, utilizando la tecnología de vaporización/condensación [15]. Sin embargo, este método aún se encuentra en desarrollo y presenta, como se mencionó en el Capítulo 1, dificultades en cuanto a la deposición de las partículas generadas (debido al pequeño tamaño) y en la determinación de la dosis que efectivamente llega al pulmón.

La Figura 4.1 muestra la estructura química de indometacina y remarca el grupo ácido carboxílico (pKa 4,5).

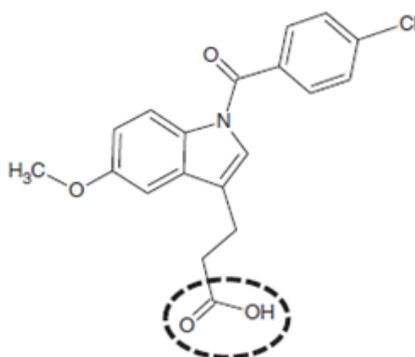


Figura 4.1. Estructura química de indometacina en la cual se resalta el grupo ácido carboxílico

Por su naturaleza ácida, IN se podrían formular en complejos iónicos con polielectrolitos catiónicos, entre ellos, polilisina.

La ϵ -polilisina (PL) es un homopolímero natural conformado por aproximadamente 30 residuos del aminoácido esencial L-lisina. Es producida mediante fermentación aeróbica por el organismo *Streptomyces albulus*. Debido a que PL es soluble en agua y no tóxica para consumo humano, tiene amplias aplicaciones industriales y biomédicas. Por otra parte, PL se comporta como antimicrobiano y por lo tanto se usa habitualmente en la industria alimenticia [16][17]. Este polielectrolito además es considerado categoría GRAS por la FDA como aditivo alimentario [18], resultando prácticamente no tóxico en ensayos de toxicidad oral aguda y carente de actividad mutagénica. Durante su metabolismo, las proteasas humanas degradan la polilisina en monómeros de lisina, los cuales tienen la capacidad de ser utilizados en la síntesis proteica [16].

Respecto al uso específico de polilisina para el diseño de sistemas de administración de fármacos, es importante destacar que constituye una importante alternativa a los vectores virales para administrar ADN en la terapia génica. Los grupos catiónicos de la polilisina interactúan con los grupos aniónicos del ADN, formando un complejo que enmascara los sulfatos de carga de negativa de los nucleótidos. Este complejo previene la degradación de ADN por parte de enzimas nucleasas. Por otra parte, los grupos básicos libres de polilisina, que no interactúan con los segmentos de ADN, tienen la capacidad de interactuar con componentes de las membranas biológicas, de manera de aumentar la eficacia de internalización y transfección del material genético [19]. Por otro lado, diversas estructuras de polilisina se estudiaron para la administración de fármacos quimioterápicos e inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa [20][21]. También, se demostró que la PL aumenta la permeabilidad de diclofenac (un anti-inflamatorio no esteroideo con propiedades farmacológicas similares a la indometacina) cuando se lo administra como emulsión tópica [22].

Para el caso puntual de la administración inhalatoria, PL se utilizó para funcionalizar nanopartículas de insulina de administración pulmonar. Estas nanopartículas funcionalizadas presentaron mejor distribución en el pulmón y mayor biodisponibilidad respecto de las partículas no funcionalizadas [23].

La capacidad de PL de interactuar con aniones y la falta de toxicidad por vía intranasal [24] e intratraqueal [25] constituyen las propiedades más interesantes para su selección como

polielectrolito para obtener micropartículas portando IN para su administración por vía pulmonar.

La Figura 4.2 muestra la fórmula química de PL y remarca el grupo amino libre, el cual tiene un pKa de aproximadamente 10,8.

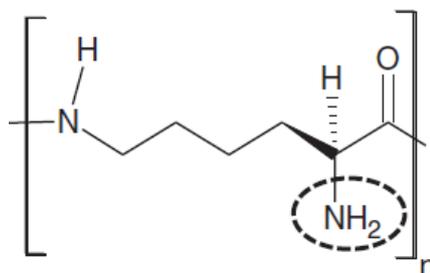


Figura 4.2. Estructura química de polilisina en la cual se resalta el grupo básico de su estructura

Los pares iónicos que se forman cuando un polielectrolito catiónico (R-NH₂, en este caso polilisina) se combina con un fármaco ácido (F-COOH, en este caso indometacina) en un medio acuoso se describen de acuerdo a las Ecuaciones 4.1-4.3.



donde F-COOH y F-COO⁻ representan el fármaco con grupos carboxílicos o carboxilatos, respectivamente. R-NH₂ y R-NH₃⁺ representan las especies desprotonadas y protonadas del polielectrolito y [F-COO⁻R-NH₃⁺] representa el par iónico. La Ecuación 4.3 se denomina condensación de contraiones en solución (tal como se mencionó en el Capítulo 3) [26]. Este mecanismo es el que se postula para representar la interacción entre PL e IN. Considerando que se utilizó como materia prima una mezcla polilisina:dextrina (PL:DX) en proporción 1:1, es importante señalar que se asume que DX no interfiere con la formación del complejo de la Ecuación 4.3. En efecto, las propiedades de equilibrio no se modifican por la presencia de compuestos no electrolíticos [27]. Cuando se incorpora un contraión inorgánico, identificado

aquí como M^- , se obtiene la estructura $[M^-F-COO^-R-NH_3^+]$ (Ecuación 4.5). Esta es la situación que se obtuvo cuando a medios líquidos conteniendo IN y PL:DX se agregó HCl a los efectos de regular el pH hasta valores cercanos a 7. El ácido clorhídrico neutraliza los grupos libres básicos de PL no saturados con IN.

En este capítulo se formulan mezclas líquidas conteniendo diferentes proporciones de IN y PL:DX para su procesamiento por secado por atomización (SA). El objetivo es obtener micropartículas co-procesadas conteniendo IN y PL para su administración por vía inhalatoria. IN es soluble en diferentes solventes orgánicos pero prácticamente insoluble en agua. El SA se reportó previamente en la literatura científica como técnica para la obtención de materiales particulados de administración oral portando IN pura. Sin embargo, para disolver el fármaco fue necesario alcalinizar el medio mediante el agregado de hidróxido de amonio. Una estrategia diferente es el uso de polielectrolitos que, mediante la interacción iónica con el fármaco, aumenten su solubilidad aparente. Esto se ha probado para diferentes fármacos poco solubles, como metoclopramida, eritromicina y diclofenac, entre otros [27]. En esta Tesis, la interacción iónica entre PL e IN permitiría mejorar la compatibilidad acuosa del fármaco [26][27].

4.2. Formulaciones

En la Tabla 4.1 se presentan las mezclas líquidas formuladas para su posterior procesamiento por secado por atomización (SA). Tal como se mencionó en el Capítulo 2, las muestras se denominaron con la nomenclatura $(PL-IN)_x:DX$ Y%, donde x se refiere al grado de neutralización de los grupos amino de PL e Y% al contenido de sólidos teóricos totales de las mezclas. Al preparar mezclas acuosas, se observó que aquellas formuladas con IN pura presentaron precipitados del fármaco como consecuencia de su baja solubilidad en agua. Por su parte, exceptuando la muestra $(PL-IN)_{75}:DX$ 1,6%, en las formulaciones acuosas con IN y PL listadas en la Tabla 4.1 no se observaron precipitados.

Las formulaciones de la Tabla 4.1 se diseñaron con los siguientes objetivos:

- Para determinar la influencia de la relación PL:DX/IN en el polvo obtenido por secado, los grupos amino de PL se neutralizaron en un 25, 50 y 75 %. Para estas muestras, el contenido de sólidos totales se fijó en 1,6% de manera de poder evaluar el efecto del grado de neutralización sobre la calidad del producto en polvo y el rendimiento del

proceso de secado. Este objetivo pudo alcanzarse para las alimentaciones líquidas (PL-IN)₂₅:DX 1,6% y (PL-IN)₅₀:DX 1,6%. Sin embargo, como se adelantó, en la formulación (PL-IN)₇₅:DX 1,6% se formaron dos fases y solo el sobrenadante de esta muestra se alimentó en el equipo de secado, previo análisis. El contenido de sólidos alcanzado en el sobrenadante fue de 1,4%.

- Para un porcentaje de neutralización (50 %) y una composición relativa de IN/PL (0,3 g_{IN}:g_{PL:DX}) fijos, se varió el contenido de sólidos (0,6; 1,3; 1,6 y 2,6%) con el objetivo de analizar el efecto de esta variable sobre las propiedades del polvo obtenido.
- Para estudiar la performance de las formulaciones a pHs más biocompatibles, a muestras seleccionadas se adicionó HCl 0,09567 N para ajustar el pH cercano a 7 y se las denominó (PL-IN)_x:DXCl Y%.
- A fines comparativos, también se sometió a secado por atomización una solución de la materia prima de polilisina (PL:DX 1,6%). Debido a la baja solubilidad de IN en agua y la marcada inestabilidad física de sus dispersiones acuosas, el fármaco puro no se procesó mediante secado por atomización.

Respecto a las condiciones operativas y de diseño del proceso de secado por atomización se utilizaron las condiciones *a* y *c* empleadas con éxito para la formulación AA/AT (ver Tabla 3.2).

Tabla 4.1. Composición teórica de las alimentaciones líquidas de PL/IN

Muestra	PL:DX (g)	Formulación teórica				
		IN (g)	HCl (g)	Concentración IN (% p/v)	Composición (g _{IN} /g _{sólido})	Sólidos totales (% p/v)
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6%	2,79	0,42	-	0,21	0,13	1,6
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6%	2,47	0,74	-	0,37	0,23	1,6
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6%	2,20	1,01	-	0,51	0,31	1,6 [#]
(PL-IN) ₅₀ :DX 0,6%	0,92	0,28	-	0,14	0,23	0,6
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3%	1,99	0,60	-	0,30	0,23	1,3
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6%	4,00	1,20	-	0,60	0,23	2,6
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7%	2,47	0,74	0,15	0,37	0,21	1,7
PL:DX 1,6%	3,21	-	-	-	-	1,6

(#) sólidos totales teóricos, debido a la aparición de un precipitado se procesó el sobrenadante con 1,4% de sólidos totales

En este capítulo, se estudia el impacto de las variaciones de composición y de procesamiento sobre el rendimiento del proceso de secado y la calidad de las micropartículas (humedad, tamaño, forma, densidad, comportamiento térmico, cristalinidad, propiedades de flujo y diámetros aerodinámicos estimados). Por otra parte, se analiza la interacción iónica entre el polielectrolito y el fármaco mediante espectroscopía infrarroja asociada a transformación de Fourier. Finalmente, se seleccionan materiales con buenos atributos para la administración

inhalatoria y para continuar con la evaluación de calidad de producto. Las propiedades biofarmacéuticas de materiales seleccionados se estudian en el Capítulo 6.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterización de la alimentación líquida

La Tabla 4.2 presenta la composición experimental, viscosidad y pH de las alimentaciones líquidas formuladas según la Tabla 4.1.

La solución de PL:DX 1,6% presentó un valor de pH de 9,7 aproximadamente, mientras que el valor de pH de los complejos varió entre 8,14 y 8,96. Como era de esperar, el agregado del fármaco a la solución del polielectrolito disminuyó el pH debido a la neutralización parcial de los grupos básicos de PL (Ecuación 4.3). Para un pH de alrededor de 10, la solubilidad de IN en agua a temperatura ambiente es menor a 1 mg/mL [28]. De esta manera, esta propiedad de IN para valores de pH entre 8,14 y 8,96 debería ser menor que 1 mg/mL. Para las muestras con porcentaje de neutralización del 50 % de los grupos básicos de PL, la concentración de IN varió de 1,3 a 7,3 mg/mL, valores experimentales marcadamente superiores a la solubilidad esperada de IN. Aun así, para todas estas muestras, las formulaciones fueron transparentes, de color amarillo claro, sin evidencias de saturación. Los nuevos compuestos (PL-IN)₅₀:DX Y% permitieron incorporar IN por encima de la concentración de saturación del fármaco puro en medios acuosos. Para 1,6% de contenido total de sólidos, tampoco se evidenció saturación de la solución cuando el porcentaje de neutralización fue de 25 %. Por el contrario, cuando se neutralizaron el 75 % de los grupos aminos de PL, el fluido obtenido no fue homogéneo, observándose una capa amarilla oscura en el fondo. Es importante destacar que para la alimentación (PL-IN)₇₅:DX 1,6% la concentración de IN en el sobrenadante (que contenía un contenido de sólidos totales reales de 1,4%) fue de 3,5 mg/mL, valor menor que el correspondiente a la muestra (PL-IN)₅₀:DX 2,6%. Los complejos (PL-IN)_x:DX permitieron incorporar cantidades de IN en solución acuosa marcadamente mayores que la estrategia convencional de alcalinizar el medio hasta pH 10 (1 mg/mL [28]). Además, la formulación propuesta aumenta la concentración del principio activo en agua sin el uso de co-solventes orgánicos como metanol para disolver el fármaco [29]. Estos resultados indican que se pueden alcanzar elevadas concentraciones de IN en medio acuoso si hay suficiente cantidad de PL:DX libre disponible. Considerando que estos resultados están en buen acuerdo con el gran incremento de la compatibilidad acuosa observada para fármacos insolubles en agua con otros

polielectrolitos [26][27] y que Limwikrant y col. [30] reportaron que DX no solubiliza IN en agua, el aumento de la solubilidad aparente observado para el principio activo se asocia principalmente a la interacción entre PL e IN.

Con el objetivo de obtener soluciones con pH más cercano al fisiológico, a la solución (PL-IN)₅₀:DX 1,6% se le modificó el pH adicionando HCl. Esta nueva alimentación se denominó (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7% y el pH experimental final fue de 7,65. Como es esperado y tal como lo indica la Ecuación 4.5, al neutralizarse parte de los grupos amino libre de PL que no interaccionaban con IN se produce una disminución de pH.

Se conoce que la viscosidad es una propiedad de la alimentación que afecta el proceso de SA. Como se mencionó en el capítulo previo, cuando la viscosidad de la alimentación aumenta, las gotas que se atomizan son más grandes y por consiguiente, a igual contenido de sólidos, se espera una disminución de la eficiencia del secado [31]. De acuerdo a las viscosidades reportadas en la Tabla 4.2, los valores son como máximo 30 % superiores a los valores del agua a 25 °C. Por lo tanto, todas las formulaciones líquidas resultaron adecuadas para su atomización. Para las soluciones conteniendo los complejos iónicos y para un dado grado de neutralización, la viscosidad aumentó conforme se incrementó el contenido de sólidos, situación previamente reportada por Frascareli y col. [31]. El agregado de HCl para neutralizar los grupos libres de PL no modificó de manera importante la viscosidad de la alimentación, probablemente debido a que la incorporación de HCl no afectó sensiblemente el contenido de sólidos (el incremento por agregado de HCl fue de 0,08% p/v).

Tabla 4.2. Composición experimental, viscosidad y pH de las soluciones preparadas para procesar por SA

Muestra	Propiedades de las soluciones			
	Composición (g _{IN} /g _{sólido})	Contenido total de sólidos (% p/v)	Viscosidad cinemática (mm ² /segundo)	pH
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6%	0,13±0,01	1,6	1,65±0,02	8,96±0,08
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6%	0,22±0,01	1,6	1,86±0,02	8,54±0,03
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% [#]	0,25±0,01	1,4	1,92±0,03	8,36±0,04
(PL-IN) ₅₀ :DX 0,6%	0,21±0,01	0,6	-	8,14±0,04
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3%	0,22±0,01	1,3	1,49±0,02	8,44±0,03
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6%	0,22±0,01	2,6	1,91±0,03	8,76±0,08
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7%	0,21±0,02	1,7	1,87±0,02	7,65±0,21
PL:DX 1,6%	-	1,6	1,69±0,02	9,68±0,08

[#]) Las propiedades experimentales corresponden al sobrenadante con un contenido de sólidos totales de 1,4% p/v

Para las alimentaciones compuestas por el complejo iónico, con grados de neutralización de 25 y 50 %, la composición experimental de IN se correspondió adecuadamente con el valor esperado (composición teórica). Sin embargo, para la solución (PL-IN)₇₅:DX 1,6%, la

concentración experimental de IN en el sobrenadante fue del 80 % respecto del valor esperado (0,25/0,31). La imposibilidad de obtener una formulación líquida homogénea debido a la aparición de un precipitado explica la diferencia observada entre la composición teórica y experimental.

4.3.2. Proceso de secado por atomización

En la Tabla 4.3 se presentan la temperatura de salida del aire de secado y el rendimiento para todos los experimentos realizados; asimismo se incluye el contenido de humedad de los polvos obtenidos.

Se conoce que la temperatura del aire de salida (T_s) del proceso de secado afecta la estabilidad de los compuestos termolábiles. Para todos los ensayos, como puede deducirse de la Tabla 4.3, la T_s se ubicó entre 64 y 86 °C. Teniendo en cuenta que IN es térmicamente estable hasta 248 °C [32] y que la etapa de mayor estrés térmico de las micropartículas ocurre cuando las mismas abandonan la cámara de secado a T_s , el principio activo fue procesado por debajo de su temperatura de degradación. Respecto de PL, Maurer y Lee secaron soluciones acuosas de este polímero (5 % p/v) a una temperatura de entrada de 150 °C, sin mostrar signos de degradación [33]. Dado que para la obtención de las micropartículas portando IN la temperatura de entrada del aire se fijó en 140 °C (ver Tabla 3.2) y el contenido de sólidos fue mucho menor al 5 %, no se espera que el polielectrolito sufra degradación térmica.

Tabla 4.3. Temperatura del aire de salida, rendimiento y humedad de las muestras obtenidas por SA

Muestra	T_s (°C)	Rendimiento (%)	Humedad (%)
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	69,0±0,0	54,38±2,35	4,68±0,25
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	74,0±4,5	50,10±1,63	4,83±0,36
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	70,5±0,7	46,23±3,83	4,84±0,34
(PL-IN) ₅₀ :DX 0,6% ^a	-	42,20 [#]	-
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	85,0 [#]	51,25 [#]	4,57 [#]
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	80,0 [#]	67,18 [#]	3,50 [#]
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	70,5±3,2	65,10±2,98	4,79±0,56
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	64,0±4,2	69,00±1,36	4,92±0,45
PL:DX 1,6% ^a	72,0±0,0	46,86±1,35	5,00±0,12

T_s : Temperatura de salida del aire de secado. [#]Determinaciones únicas

Para las condiciones de procesamiento *a*, (mostradas en la Tabla 4.3) el rendimiento del proceso de secado se ubicó entre 42 y 67 %, siendo valores aceptables para secaderos escala laboratorio [34]. Manteniendo el contenido de sólidos constantes y usando el ciclón convencional, el rendimiento disminuyó cuando el grado de neutralización aumentó, aunque

las diferencias encontradas no resultaron estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$). De esta manera, el porcentaje de neutralización de los grupos básicos de PL no afectó sensiblemente el rendimiento del proceso de secado.

Para estudiar el efecto del contenido de sólidos totales sobre el rendimiento (manteniendo constantes las variables operativas en el equipo de secado y el grado de neutralización de $x=50\%$), se estudiaron los siguientes niveles $Y\%$: 0,6, 1,3, 1,6 y 2,6%. Para el menor contenido de sólidos estudiado, el rendimiento resultó ser el menor de la serie (42 %). Por otra parte, cuando el contenido de sólidos fue 2,6% el rendimiento alcanzó el mayor valor (67,2%). Si bien para $Y=1,3$ y 1,6% los rendimientos se ubicaron entre los valores máximo y mínimo obtenidos (para $Y=0,6$ y 2,6%), el cambio de contenido de sólidos de 1,3 a 1,6 % no afectó sensiblemente al rendimiento (probablemente debido a la pequeña modificación en esta variable de formulación). Tal como se esperaba, cuando el contenido de sólidos aumentó, el desempeño del secado aumentó, situación previamente reportada en bibliografía para otro tipo de materiales [35][36].

Los resultados del rendimiento del proceso de SA también se muestran en la Tabla 4.3 para la muestra $(PL-IN)_{50}:DX$ 1,6%. El cambio de las condiciones de procesamiento de a a c , condujo a un incremento en el rendimiento de aproximadamente un 30 %. Tal como se reportó en el capítulo anterior para el sistema AA-AT, el ciclón de alta performance resultó ser más eficiente para colectar partículas finas. Bajo las condiciones c , el agregado de HCl a la formulación original de $x=50\%$ e $Y=1,6\%$, permitió obtener un rendimiento alto y cercano al exhibido por la muestra no neutralizada.

Para el sistema compuesto por PL:DX e IN, el aumento del contenido de sólidos y la combinación de un alto caudal del aire de atomización y el uso de un ciclón de alta performance (condición c) favorecieron la obtención de mayores rendimientos de secado.

4.3.3. Caracterización del producto

4.3.3.1. Contenido de humedad y cargado del fármaco

Como puede observarse en la Tabla 4.3, los valores de humedad residual varían entre 3,5 y 5 %, resultados adecuados para un equipo de secado escala laboratorio [34]. Las partículas obtenidas de la muestra $(PL-IN)_{50}:DX$ 2,6%^a presentaron la humedad residual más baja. Este

comportamiento se relaciona con que es la muestra con mayor concentración de sólidos en la alimentación, por lo tanto las gotas atomizadas tienen el valor más bajo de contenido de agua [37].

La Tabla 4.4 presenta composición de IN (determinada por espectroscopía UV) en todos los polvos obtenidos por SA. La composición de los sistemas particulados obtenidos está en buen acuerdo con la composición de las alimentaciones líquidas precursoras, las cuales se mostraron en la Tabla 4.2.

Tabla 4.4. Composición de las micropartículas conteniendo IN

Muestra	Composición ($g_{IN}/g_{sólido}$)
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	0,12±0,01
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	0,20±0,01
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	0,26±0,01
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	0,20±0,01
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	0,19±0,01
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	0,20±0,02
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	0,17±0,02

4.3.3.2. Caracterización mediante FT-IR

Para caracterizar a nivel molecular los polvos obtenidos por SA, se obtuvieron los espectros de FT-IR de los materiales puros sin procesar, PL:DX 1,6%^a y la serie (PL-IN)_x:DX 1,6%^a. El objetivo de este ensayo fue buscar evidencias de interacción iónica entre los grupos amino de PL y los grupos carboxílicos de IN. La Figura 4.3 muestra los espectros FT-IR, donde se destacan las bandas relevantes alrededor de los siguientes números de onda:

- 900 and 1720 cm^{-1} correspondiente a los grupos acídicos no disociados de IN [38][39], y
- 1590 cm^{-1} representativo de grupos aminos disociados de PL [40].

Los espectros de la PL:DX comercial y de PL:DX 1.6%^a exhibieron perfiles de FT-IR similares. Por esta razón en la Figura 4.3, solo se muestra el espectro para la muestra PL:DX 1.6%^a. La coincidencia de espectro para el material procesado y sin procesar, indica que el secado por atomización no degradó el polielectrolito.

De acuerdo a Maurer and Lee [33], la principal señal característica de PL (“banda amida I”) aparece en 1642 cm^{-1} . En buen acuerdo, la muestra PL:DX 1.6%^a exhibió una banda relativamente ancha a 1656 cm^{-1} . Para el material PL:DX, la señal asociada a la tensión

simétrica del grupo -NH_2 de PL no pudo identificarse ya que se encuentra solapada con la señal amida de esta misma sustancia y la señal de los grupos OH de DX.

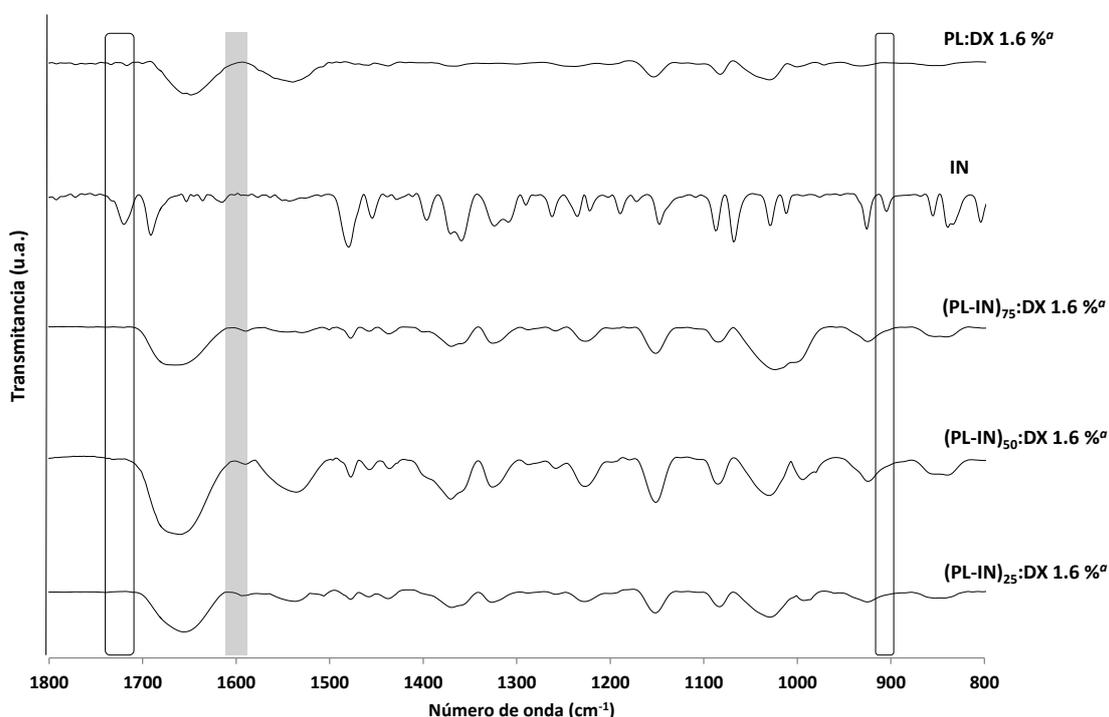


Figura 4.3. Espectros FT-IR de los complejos iónicos, el fármaco puro y PL:DX. (u.a.: unidades arbitrarias)

En concordancia con lo reportado en la literatura para IN, la señal de tensión del grupo COOH y la de flexión fuera del plano del grupo O-H del ácido carboxílico se encontraron en 1721 y 905 cm^{-1} , respectivamente [38][39]. Como IN es siempre el reactivo limitante en la preparación de todas las alimentaciones, estas dos señales completamente desaparecen para todos los sistemas $(\text{PL-IN})_x:\text{DX } 1,6\%^a$, indicando que IN reacciona íntegramente con PL. En simultáneo, una señal débil aparece a $1589,7$, $1591,9$ and $1590,1\text{ cm}^{-1}$ para $(\text{PL-IN})_x:\text{DX } 1,6\%^a$ con x variando entre 25 y 75 %. Esta banda se relaciona con la flexión asimétrica del grupo NH_3^+ [40], sugiriendo la interacción entre IN y PL.

Las bandas asociadas con la tensión simétrica ($\sim 1400\text{ cm}^{-1}$) y asimétrica ($1630\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) del grupo COO^- y la flexión simétrica de NH_3^+ ($1470\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$) no pudieron identificarse inequívocamente porque, las señales de tensión del grupo indol ($\sim 1480\text{ cm}^{-1}$) y de tensión del grupo clorobencilo ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) de IN [38] y la vibración de flexión (1408 cm^{-1}) de los grupos OH de DX se encuentran solapados [41].

4.3.3.3. Caracterización cristalográfica

Para evaluar los cambios de cristalinidad asociados con el proceso de secado y la composición de la alimentación, las mismas muestras estudiadas por FT-IR se analizaron mediante difracción de rayos X (DRX) de polvos obtenidos por SA. Además, se estudió una mezcla física (MF) de PL:DX e IN formulada con la misma proporción que la utilizada para preparar el complejo (PL-IN)₅₀:DX 1,6%.

Como se observa en la Figura 4.4, IN presentó estructura cristalina. La posición e intensidad de las reflexiones está en buen acuerdo con datos previamente reportados para este principio activo [7]. El pico de intensidad relativa 100 se ubicó en 19,76° (lo que indica una distancia interplanar de 4,49 Å), correspondiendo este patrón de difracción con el polimorfo γ o I, el cual es el más estable [7].

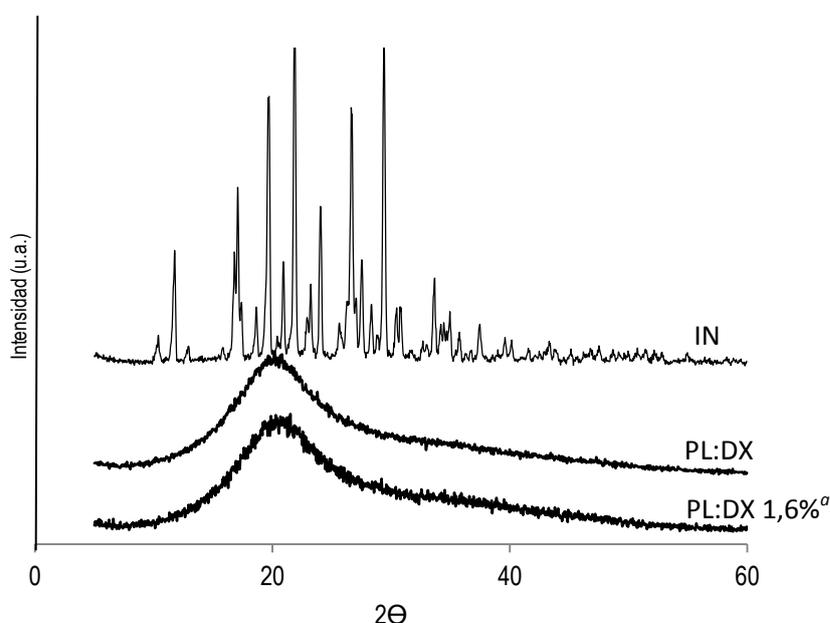


Figura 4.4. Diagrama de difracción de rayos X de los materiales puros comerciales y secados por atomización (u.a.: unidades arbitrarias)

Los difractogramas de la PL:DX tanto procesada por secado como comercial indican que ambos materiales son amorfos (Figura 4.4). De hecho, no se observaron picos pero sí la elevación de la línea de base, característico este tipo de estructuras [36].

El patrón de difracción de la MF (Figura 4.5) mostró tanto los picos característicos de la estructura cristalina de IN como la elevación de la línea de base del estado amorfo de PL:DX. Sin embargo, las muestras (PL-IN)_x:DX 1,6%ª resultaron amorfas según sus difractogramas (Figura 4.5). Este estado podría atribuirse tanto al proceso de SA, a la interacción iónica entre

PL e IN o a ambas condiciones. A diferencia de lo que ocurrió para el sistema AA-AT, no se pudo comprobar cuál/cuáles fueron los mecanismos que condujeron al estado amorfo de los polvos co-procesados PL-IN. Esto se debió a que no pudo secarse por atomización dispersiones acuosas de IN pura a concentraciones equivalente a las presentes en los polvos co-procesados (debido a la formación de precipitados).

Para un dado contenido de sólidos, el grado de neutralización no modificó cualitativamente el difractograma de rayos X (Figura 4.5), por lo que puede concluirse que las composiciones ensayadas no modificaron la estructura del material.

El estado amorfo de fármacos con pobre solubilidad acuosa, como IN, se prefiere por sobre el estado cristalino, ya que se asocia a la mejora de la biodisponibilidad [5][38]. Así, el nuevo sistema particulado basado en la interacción entre PL e IN, obtenido mediante una técnica simple de procesamiento, permitió producir materiales completamente amorfos.

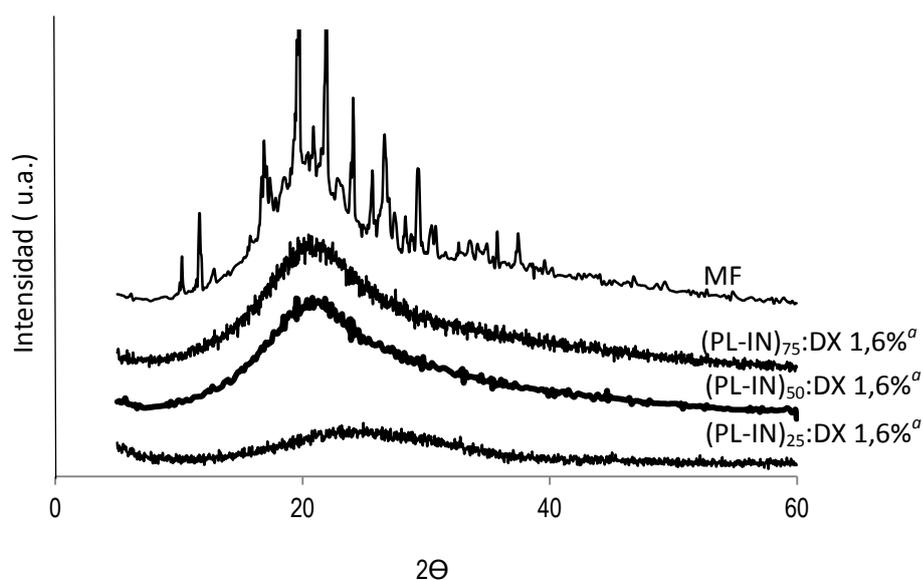


Figura 4.5. Diagrama de difracción de rayos X de los materiales secados por atomización y la mezcla física (u.a.: unidades arbitrarias)

Varios autores investigaron la producción de sistemas de IN en el estado amorfo. sin embargo, las formulaciones a las que arribaron fueron poco estables y el principio activo tendió a cristalizar con el tiempo [42]. Entre otros, Ewing y col. desarrollaron una dispersión sólida de IN-polietilenglicol utilizando el método de fusión en caliente seguido de un rápido enfriamiento. Inicialmente, la IN contenida en las muestras fue completamente amorfa, pero luego de cuatro días, el fármaco cristalizó a la estructura sólida γ [43]. Por esta razón, también

se analizó por rayos X la muestra de $(\text{PL-IN})_{50}:\text{DX } 1,6\%^a$ luego de un almacenamiento de 9 y 36 meses a temperatura ambiente. El difractograma obtenido se muestra en la Figuras 4.6. Como allí puede verse, la muestra envejecida se mantiene en el estado amorfo durante todo el período de almacenamiento ensayado.

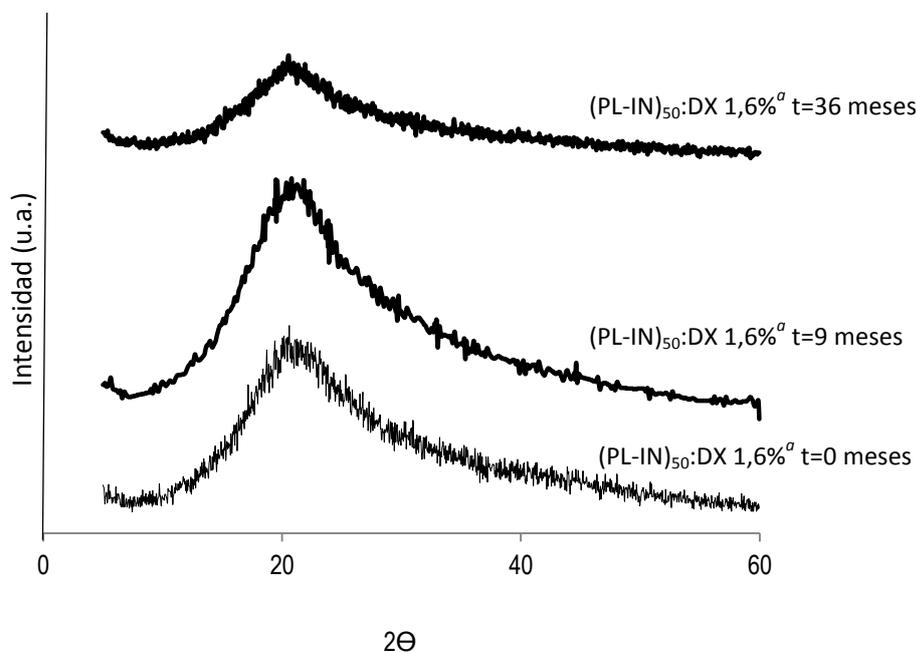


Figura 4.6. Diagrama de difracción de rayos X de la muestra $(\text{PL-IN})_{50}:\text{DX } 1,6\%^a$ a distintos tiempos de almacenamiento (u.a.: unidades arbitrarias)

Se ha reportado en la literatura científica que la cristalización de IN está dominada por la formación de puentes hidrógeno entre los grupos carboxílicos de dos moléculas de fármaco adyacentes. La nucleación comienza cuando se forman los dímeros de IN [44]. Según los espectros de FT-IR, la ausencia de los grupos carboxílicos no disociados del principio activo en $(\text{PL-IN})_x:\text{DX } 1,6\%^a$ indican que la formación del dímero no es posible y en consecuencia la cristalización de IN estaría limitada por la interacción PL-IN.

4.3.3.4. Análisis térmico

Los materiales estudiados por DRX también se analizaron térmicamente por calorimetría diferencial de barrido.

La Figura 4.7 muestra el termograma para IN pura. Allí puede verse un evento endotérmico a $163,24^\circ\text{C}$. Las temperaturas de fusión reportadas para las formas polimórficas α y γ de IN son

155 °C y 161 °C, respectivamente [7]. De acuerdo con los resultados obtenidos, la estructura de IN comercial se correspondería con la forma polimórfica γ , resultado que está en buen acuerdo con el patrón de difracción discutido en la sección anterior.

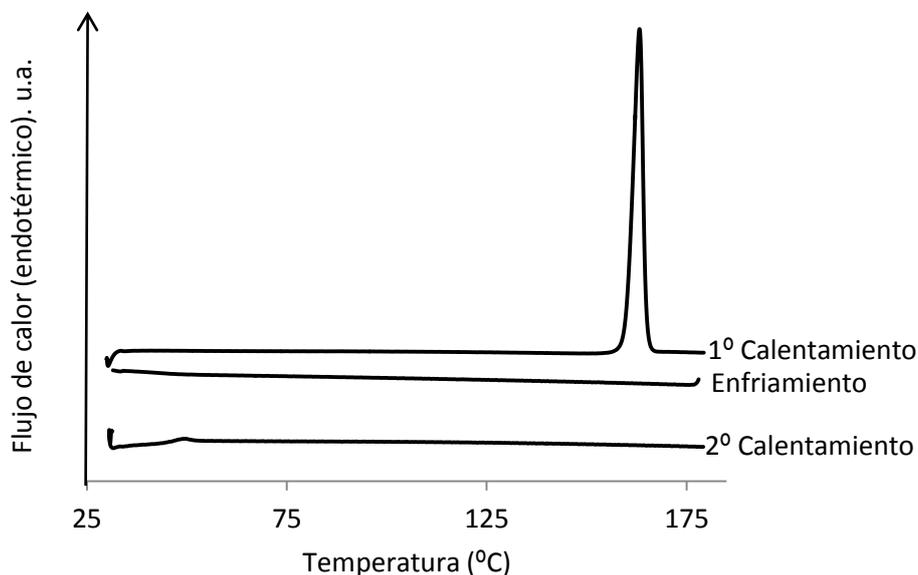


Figura 4.7. Termograma de IN (u.a.: unidades arbitrarias)

Para IN, el pico de fusión no se observó en el segundo calentamiento. Este comportamiento se relaciona con la ausencia del proceso de cristalización de IN durante el enfriamiento y la consecuente transformación de IN al estado amorfo. Este fenómeno fue previamente reportado por Shimada y col., quienes estudiaron IN pura a iguales velocidades de calentamiento y enfriamiento que las empleadas en esta Tesis [45]. La T_g de IN observada en el segundo calentamiento resultó ser 53,22 °C.

Durante el primer calentamiento, tanto PL:DX como PL:DX 1,6%^a mostraron un evento endotérmico cerca de 100 °C (Figura 4.8), el cual puede asociarse a la pérdida del agua adsorbida. Además no se observaron picos de fusión, resultado que está en buen acuerdo con el patrón de difracción amorfo observado en la Figura 4.5. Durante el segundo calentamiento se calculó la T_g , la cual resultó de 145 y 139 °C, para PL:DX y PL:DX 1,6%^a, respectivamente

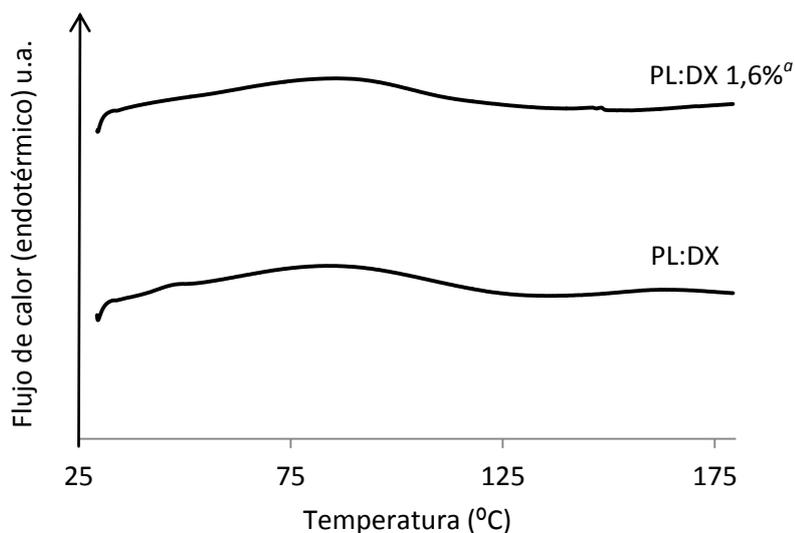


Figura 4.8. Termograma de la muestra PL:DX comercial y de la secada por atomización (u.a.: unidades arbitrarias)

La MF mostró dos picos endotérmicos durante el primer calentamiento (Figura 4.9): una endoterma ancha, a aproximadamente 100 °C, atribuida a la eliminación del agua adsorbida, y el pico de fusión del fármaco a 161,3 °C, valor que se reporta en la Tabla 4.5. La temperatura de fusión de IN en la MF fue levemente menor que la encontrada para IN pura, resultado esperado para materiales en estado impuro [46]. Además, el calor de fusión (expresado por gramo de IN) para la MF fue de alrededor del 60 % del valor correspondiente a el fármaco comercial, indicando que existe una interacción parcial entre los componentes de la MF [46].

Tabla 4.5. Comportamiento térmico de los materiales puros, los polvos obtenidos por SA y la MF

Muestra	T_g (°C)	T_f (°C)	T_{onset} (°C)	ΔH_f (J/g _{IN})
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6%ª	138,50±1,09	-	-	-
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6%ª	128,31±1,79	-	-	-
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6%ª	126,07±3,22	-	-	-
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6%ª	127,12±2,23	-	-	-
PL:DX	145,24±1,75	-	-	-
PL:DX 1,6%ª	139,64±2,87	-	-	-
MF	-	161,28	158,96	65,45
IN	53,22±2,00	163,24	159,99	108,94

La T_f , T_{onset} y ΔH_f se determinaron durante el primer calentamiento

Para los polvos (PL-IN)_x:DX 1,6%ª, solo se observa un evento endotérmico alrededor de 100 °C, consistente con la pérdida de agua adsorbida. Además, el pico de fusión de IN no se observó en ninguna de las muestras. Esto concuerda con la ausencia de estructura cristalina observada en los difractogramas de (PL-IN)_x:DX 1,6%ª (Figura 4.5). Por otra parte, las T_g para todos los

polvos (PL-N)_x:DX 1,6%^a, fueron mayores a 100 °C (Tabla 4.5), valores bien por encima de la T_g de IN pura.

Como se mencionó previamente, bajas T_g permiten movilidad molecular y posterior cristalización en condiciones ambiente. El sistema propuesto admite grandes cantidades de IN manteniendo el estado amorfo, con T_g relativamente altas, facilitando la manipulación y el almacenamiento de los materiales a temperatura ambiente.

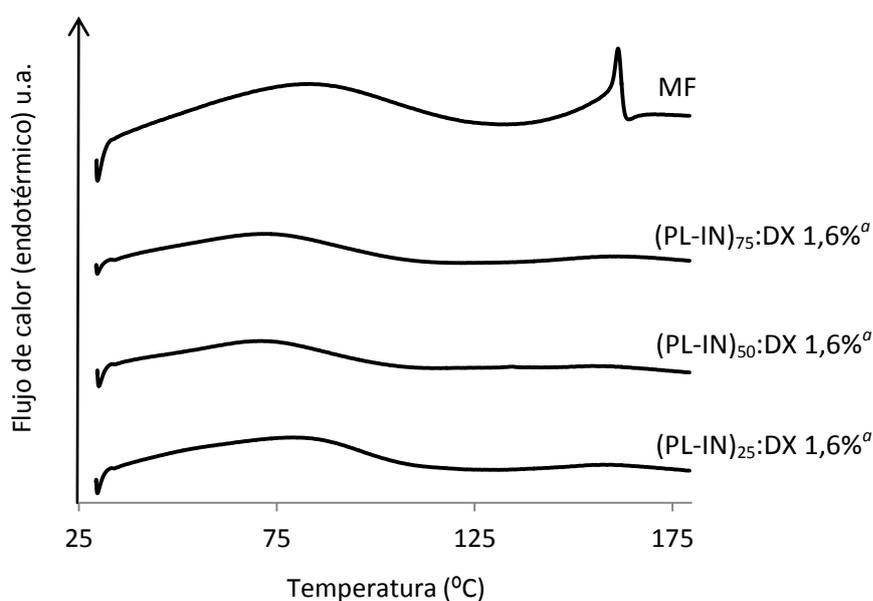


Figura 4.9. Termograma de los complejos iónicos en polvo y la mezcla física (u.a.: unidades arbitrarias)

4.3.3.5. Morfología

Para estudiar el efecto de las formulaciones en la morfología de las partículas, los polvos obtenidos se analizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB). Las Figuras 4.10-4.12 muestran las micrografías correspondientes a los materiales comerciales y los productos obtenidos mediante SA.

La Figura 4.10 indica que las partículas de IN sin procesar tienen forma de cristales planos, apariencia que concuerda con la morfología del fármaco descrita por Bandi y col. [47] y a la caracterización de este material arriba descrita.

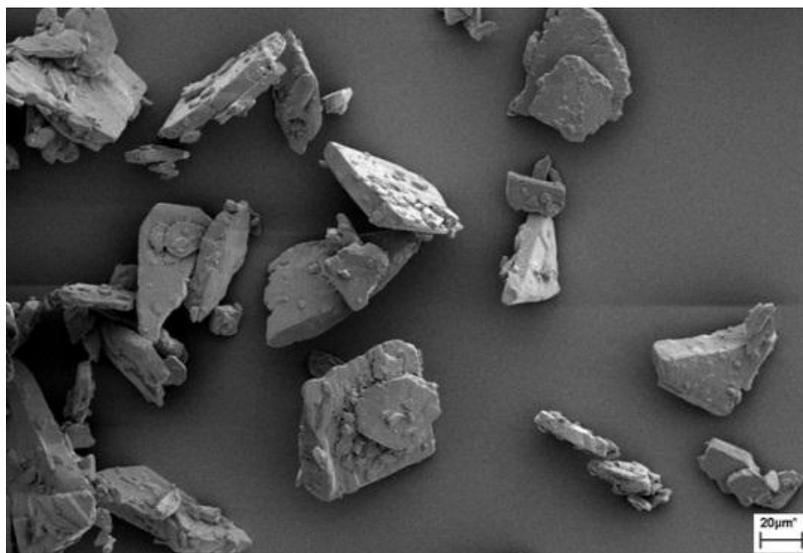
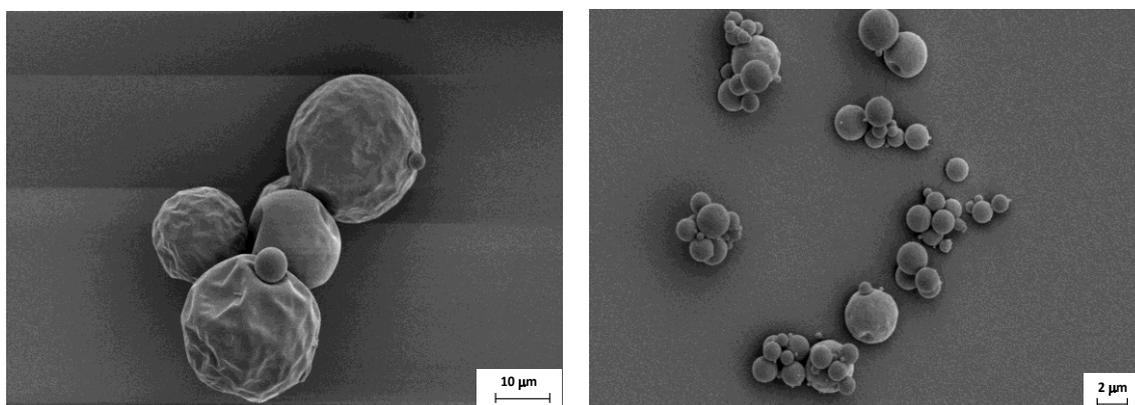


Figura 4.10. Micrografías de IN comercial (800X)

La materia prima PL:DX resultó estar conformada por partículas de forma redondeada y superficie dentada, como puede verse en la Figura 4.11.a. Por su parte, las partículas del material procesado PL:DX 1,6%^a mostraron apariencia redondeada, superficie más lisa, menor tamaño y formación de aglomerados.



a b
Figura 4.11. Micrografías PL:DX: a) PL:DX comercial (8000X); b) PL:DX 1,6%^a (8000X)

Las micropartículas (PL-IN)_x:DX 1,6%^a mostraron partículas principalmente redondeadas y lisas (Figura 4.12). No se observaron cristales, en concordancia con el patrón amorfo de los difractogramas de DRX. Además se pudieron observar algunos orificios, indicando una probable estructura hueca, lo cual resulta atractivo para aplicaciones inhalatorias debido a la consecuente disminución de los valores de los diámetros aerodinámicos.

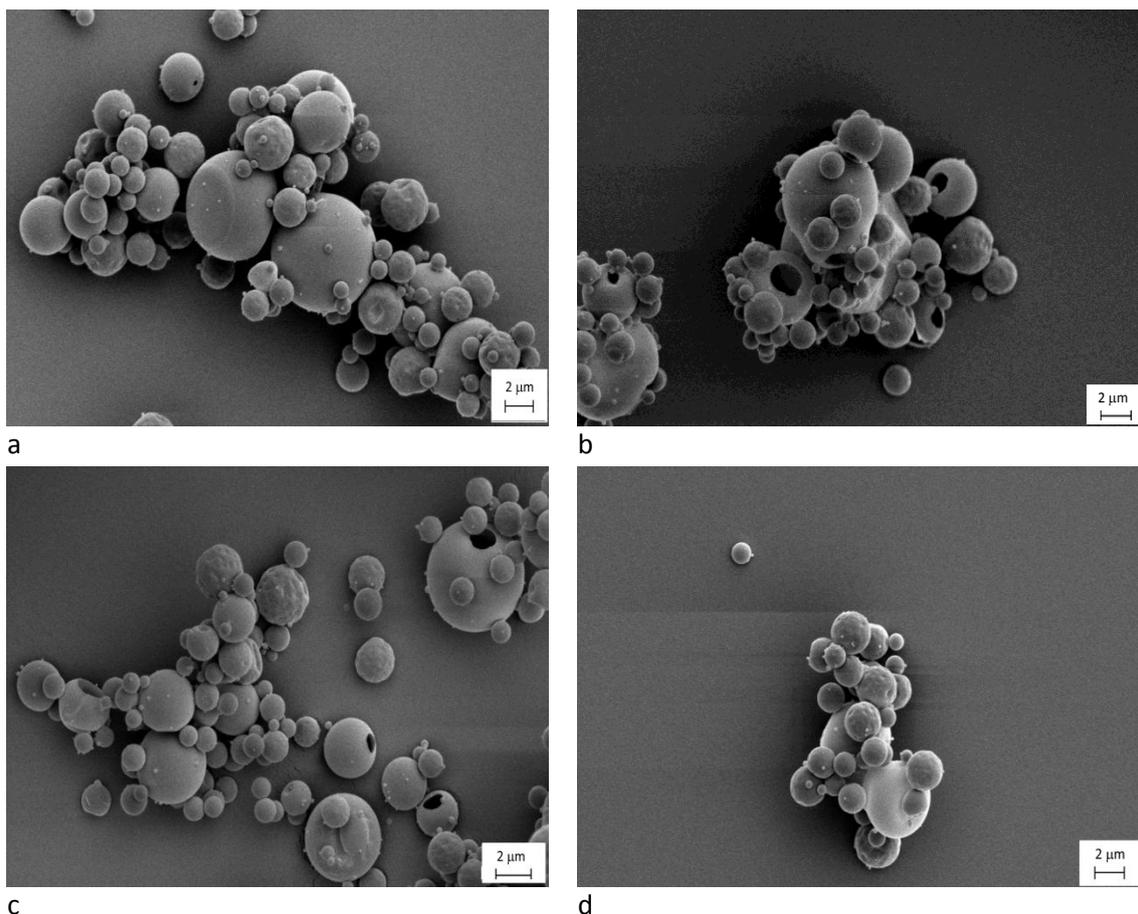


Figura 4.12. Micrografías de los complejos iónicos obtenidos mediante secado por atomización a 8000X: a) (PL-IN)₂₅:DX 1,6%^a; b) (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a; c) (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c; d) (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c

Por otra parte, la adición de HCl para ajustar el pH a valores cercanos a los fisiológicos no modificó la morfología de las partículas. En efecto, las partículas de (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c, que se muestran en la Figura 4.12.d, resultaron similares a las obtenidas con el mismo porcentaje de neutralización sin la adición de HCl ((PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a, Figura 4.12.c).

4.3.3.6. Distribución de tamaño de partícula

La granulometría de los polvos se determinó mediante difracción láser. La Tabla 4.6 reporta la distribución del tamaño volumétrico medio (D_{43}) así como el ancho de la distribución, expresado como valor de *span*.

El tamaño medio de partículas de PL:DX 1,6%^a fue el menor de todos los polvos, significativamente más pequeño y con un *span* menor que el material comercial PL:DX utilizado como materia prima.

Los materiales (PL-IN)_x:DX Y%^z presentaron diámetros volumétricos medios entre 5,57 y 6,97 μm. A iguales condiciones de procesamiento (condición *a*), el grado de neutralización y el contenido de sólidos en la alimentación no afectaron sensiblemente el tamaño medio de las distribuciones de tamaños de partículas. El aumento del caudal de aire de atomización y el uso simultáneo del ciclón de alta performance (condición *c* de procesamiento) tuvieron un impacto positivo en el tamaño de partículas. El polvo (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c presentó un tamaño medio 10 % menor al exhibido por la muestra (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a, siendo la diferencia estadísticamente significativa (valor *p* < 0,05)

Por otra parte, en todos los casos se obtuvieron distribuciones de tamaño de partículas estrechas; en efecto todos los valores de *span* fueron menores a 2.

Tabla 4.6. Diámetro volumétrico medio y *span* para materiales co-procesados y puros

Muestra	D_{43} (μm)	<i>Span</i>
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	6,84±0,16	1,13±0,15
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	6,38±0,24	1,05±0,08
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	6,93±0,56	1,02±0,14
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	6,45±0,45	1,04±0,12
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	6,25±0,10	1,06±0,09
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	5,68±0,16(*)	1,38±0,25
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	5,57±0,08	1,50±0,18
PL:DX	72,45±3,63	1,96±0,31
PL:DX 1,6% ^a	5,38±0,50	1,04±0,15
IN	83,75±5,27	3,26±0,36

(*): diferencia estadísticamente significativa respecto de la muestra (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a

4.3.3.7. Propiedades de flujo

La Tabla 4.7 muestra la densidad libre y empaquetada de los materiales (PL-IN)_x:DX Y%^z y el índice de Carr (*IC*) calculado a partir de dichas densidades. De acuerdo con la clasificación de la USP (ver Tabla 2.1), los polvos presentaron pobres o muy pobres propiedades de flujo [48]. Como se mencionó en el capítulo anterior, este flujo está relacionado con el pequeño tamaño medio de partículas que presentaron los sistemas obtenidos mediante SA. Es decir, la necesidad de partículas pequeñas para acceder a las regiones profundas del pulmón compete con la factibilidad de obtener polvos de buena fluidez. Sin embargo, como se mencionó anteriormente las propiedades de flujo pueden mejorarse agregando partículas *carrier* a los sistemas particulados (e.g., lactosa) [49]. A modo de ejemplo, la muestra (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a se mezcló con lactosa en una proporción micropartículas:lactosa 1:3. El *IC* para esta mezcla de

prueba resultó de 26,95 %, valor 28 % menor que el IC para la mezcla sin *carrier*. El agregado de lactosa permitió clasificar a la mezcla con flujo aceptable.

Tabla 4.7. Densidad libre y empaquetada e Índice de Carr de los materiales portando IN

Muestra	D_{libre} (g/cm ³)	$D_{empaquetada}$ (g/cm ³)	IC
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	0,19±0,03	0,27±0,02	37,81±0,48
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	0,21±0,01	0,30±0,03	37,38±0,55
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	0,19±0,02	0,30±0,02	37,67±0,93
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	0,20±0,03	0,33±0,02	36,64±0,51
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	0,25±0,04	0,35±0,01	37,84±0,46
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	0,23±0,01	0,34±0,02	32,35±1,29
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	0,28±0,01	0,39±0,03	28,21±1,18

D_{libre} : densidad libre, $D_{empaquetada}$: densidad empaquetada

4.3.3.8. Densidad del polvo

La densidad de la muestra, que se presenta en la Tabla 4.8 para los diferentes sistemas particulados obtenidos por SA, se ubicó entre 0,62 y 0,73 g/cm³, valores menores que los obtenidos para el fármaco y el polielectrolito puros (1,11 y 0,99 g/cm³, respectivamente). Considerando que los complejos PL-IN fueron menos densos que los materiales precursores, las partículas podrían tener una estructura hueca, tal como se sugiere en las micrografías de MEB.

Tabla 4.8. Densidad de la muestra de los materiales puros y secados por atomización

Muestra	$D_{muestra}$ (g/cm ³)
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	0,73±0,06
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	0,64±0,03
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	0,62±0,05
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	0,69±0,06
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	0,68±0,05
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	0,67±0,04
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	0,68±0,06
PL:DX	0,99±0,02
PL:DX 1,6 %	0,77±0,10
IN	1,11±0,05

4.3.4. Estimación del diámetro aerodinámico

Para conocer cuáles materiales tendrían la capacidad de llegar a regiones respirables del pulmón se estimó el diámetro aerodinámico de acuerdo a las Ecuaciones 2.6 y 2.7. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9.

Los valores estimados de diámetros medios aerodinámicos, aun considerando los valores máximos, que sobreestimarían los diámetros aerodinámicos reales si las partículas fueran porosas, indican que las muestras serían adecuadas para la administración inhalatoria de IN. Puede verse que el $D_{aer}^{e,máx}$ es aproximadamente un 12 % menor para la muestra (PL-IN)₅₀:DX 1,6% cuando se cambian las condiciones de secado *a* por las *c*.

Tabla 4.9. Mediana en volumen y diámetros aerodinámicos estimados medios

Muestra	D_{50} (μm)	$D_{aer}^{e,máx}$ medio (μm)	$D_{aer}^{e,min}$ medio (μm)
(PL-IN) ₂₅ :DX 1,6% ^a	6,59±0,23	5,63	3,42
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^a	5,99±0,27	4,79	3,28
(PL-IN) ₇₅ :DX 1,6% ^a	6,97±0,45	5,49	3,81
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,3% ^a	6,04±0,37	5,02	3,46
(PL-IN) ₅₀ :DX 2,6% ^a	5,95±0,18	4,91	3,52
(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	5,25±0,28	4,29	3,06
(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	5,18±0,08	4,27	3,23

$D_{aer}^{e,min}$ y $D_{aer}^{e,máx}$, calculados con Ecuaciones 2.6 y 2.7, respectivamente

Además del valor medio de diámetro aerodinámico estimado, es de interés conocer la distribución de diámetros aerodinámicos para evaluar la calidad de los polvos de administración inhalatoria. La Figura 4.13 muestra la distribución de $D_{aer}^{e,máx}$ para los materiales (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^{a y c}, obtenida a partir de la distribución de tamaños geométricos de partícula (obtenida por difracción láser) utilizando la Ecuación 2.6.

Como puede verse, el perfil de la distribución de tamaños aerodinámicos de partículas obtenido bajo las condiciones de secado *c* se desplaza hacia menores valores de D_{aer}^{e} . Como la densidad de la muestra es similar para ambos materiales, el desplazamiento hacia menores tamaños se debe a la obtención de partículas más finas bajo las condiciones de secado *c*.

De acuerdo a este análisis, el material (PL-IN)_x:DX 1,6%^c mostró los mejores atributos para la administración inhalatoria de micropartículas portando IN. Este material además, mostró un alto rendimiento en el proceso de secado, baja humedad residual y permitió cargar eficientemente una alta cantidad de IN sin mostrar signos de saturación ni separación de fases. Este producto se seleccionó para realizar la caracterización biofarmacéutica, junto con el polvo de igual composición relativa PL:DX/IN obtenido bajo los mismos parámetros de proceso, pero agregando HCl para ajustar el pH.

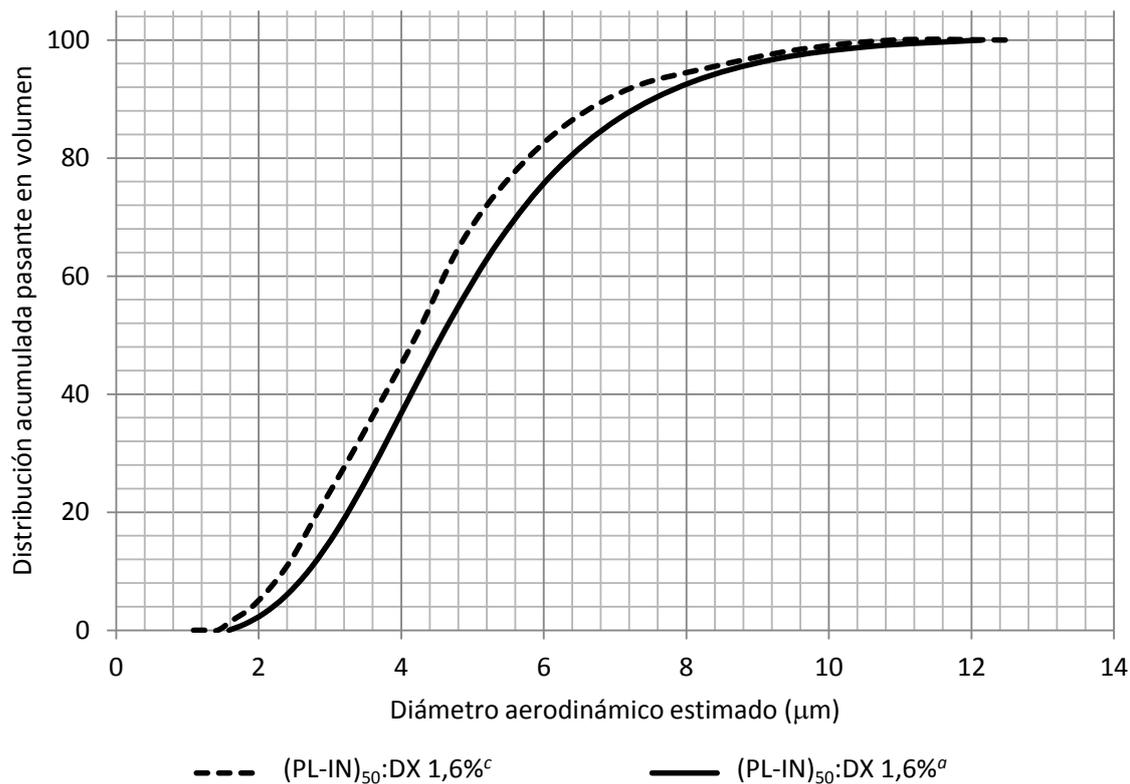


Figura 4.13. Distribución del diámetro aerodinámico estimado para las muestras (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^{a y c}

4.4. Conclusiones

En este capítulo se describió la obtención de un nuevo material para la administración inhalatoria de IN, utilizando una técnica simple de un solo paso. El uso del polielectrolito PL permitió incorporar una gran cantidad de IN en medio acuoso (mayor que la solubilidad del principio activo), sin utilizar solventes orgánicos, debido a la interacción iónica entre los grupos amino de PL y los ácidos de IN. El análisis de los espectros de FT-IR de los materiales portando el fármaco permitió postular la interacción iónica entre los componentes. Los materiales desarrollados resultaron amorfos y mantuvieron esa condición incluso luego de almacenarlos durante 36 meses.

Los materiales particulados (PL-IN)₅₀:DX Y% resultaron los más atractivos ya que permitieron una alta carga del fármaco sin evidenciar problemas de saturación durante la preparación de las alimentaciones líquidas. La corrección del pH de este material mediante el agregado de HCl, condujo a polvos con buenos atributos para la administración inhalatoria y a la vez fueron diseñados para aumentar la biocompatibilidad de los materiales desarrollados. Este ajuste en el pH no modificó el rendimiento del proceso de secado.

Como también había sucedido para el sistema AA-AT estudiado en el capítulo anterior, la combinación del uso de un alto caudal del aire de atomización y de un ciclón de alta performance permitió obtener y colectar, respectivamente, partículas de pequeño tamaño, con un muy buen rendimiento del proceso de secado respecto de la utilización del ciclón convencional y un menor caudal. Además, estos materiales exhibieron los menores diámetros aerodinámicos estimados, razón por la cual se los seleccionó para ensayar sus propiedades de aerosolización *in vitro*. Este ensayo y otras caracterizaciones biofarmacéuticas de los materiales seleccionados se presentan en el Capítulo 6.

4.5. Bibliografía

- [1] M. Stigliani, R. P. Aquino, P. Del Gaudio, T. Mencherini, F. Sansone, and P. Russo, "Non-steroidal anti-inflammatory drug for pulmonary administration: design and investigation of ketoprofen lysinate fine dry powders.," *Int. J. Pharm.*, vol. 448, no. 1, pp. 198–204, 2013.
- [2] A. Pomázi, R. Ambrus, P. Sipos, and P. Szabó-Révész, "Analysis of co-spray-dried meloxicam–mannitol systems containing crystalline microcomposites," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 56, pp. 183–190, 2011.
- [3] A. A. Onischuk, T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, N. A. Zhukova, A. M. Baklanov, V. V. Karasev, O. V. Borovkova, G. G. Dultseva, V. V. Boldyrev, and V. M. Fomin, "Analgesic effect from Ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 22, no. 3, pp. 245–253, 2009.
- [4] M. El-Badry, G. Fetih, and M. Fathy, "Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000.," *Saudi Pharm. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 217–225, 2009.
- [5] B. C. Hancock and M. Parks, "What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 397–404, 2000.
- [6] P. J. Salústio, G. Feio, J. L. Figueirinhas, J. F. Pinto, and H. M. Cabral Marques, "The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a beta-cyclodextrin cavity.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 2, pp. 377–386, 2009.
- [7] R. T. Y. Lim, W. K. Ng, and R. B. H. Tan, "Dissolution enhancement of indomethacin via amorphization using co-milling and supercritical co-precipitation processing," *Powder Technol.*, vol. 240, pp. 79–87, 2013.
- [8] P. J. Stewart and F.-Y. Zhao, "Understanding agglomeration of indomethacin during the dissolution of micronised indomethacin mixtures through dissolution and de-agglomeration modeling approaches.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 59, no. 2, pp. 315–323, 2005.
- [9] M. Feria, "Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos," in *Farmacología humana*, 6th Edition, J. Florez, Á. Mediavilla, and J. A. Armijo, Eds. Elsevier, 2014, pp. 355–387.
- [10] M. Ricci, C. Puglia, F. Bonina, C. Di Giovanni, S. Giovagnoli, and C. Rossi, "Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): In vitro and in vivo studies," *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, no. 5, pp. 1149–1159, 2005.
- [11] S. Miyazaki, A. Takahashi, W. Kubo, J. Bachynsky, and R. Löbenberg, "Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: In vitro release and in vivo skin penetration," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 240–245, 2003.
- [12] H. Y. Thong, H. Zhai, and H. I. Maibach, "Percutaneous penetration enhancers: An overview," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 20, no. 6, pp. 272–282, 2007.
- [13] Z. L. Huang, M. Kagoshima, E. Kagawa, and H. Shimada, "Absorption of indometacin from nasal cavity in rats," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 16, no. 2, pp. 117–120, 1995.

- [14] H. Y. Karasulu, Z. E. Sanal, S. Sözer, T. Güneri, and G. Ertan, "Permeation studies of indomethacin from different emulsions for nasal delivery and their possible anti-inflammatory effects.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 342–348, 2008.
- [15] A. A. Onischuk, T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, N. A. Zhukova, A. M. Baklanov, V. V. Karasev, G. G. Dultseva, V. V. Boldyrev, and V. M. Fomin, "Anti-inflammatory effect from indomethacin nanoparticles inhaled by male mice.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–243, 2008.
- [16] J. Hiraki, T. Ichikawa, S. I. Ninomiya, H. Seki, K. Uohama, H. Seki, S. Kimura, Y. Yanagimoto, and J. W. Barnett, "Use of ADME studies to confirm the safety of e-polylysine as a preservative in food," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 37, no. 2, pp. 328–340, 2003.
- [17] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, and K. K. Kunitomo, "Formation of carbamates and cross-linking of microbial poly(ϵ -lysine) studied by ^{13}C and ^{15}N solid-state NMR," *Polym. Bull.*, vol. 68, no. 3, pp. 745–754, 2012.
- [18] Y. Chang, L. McLandsborough, and D. J. McClements, "Antimicrobial delivery systems based on electrostatic complexes of cationic ϵ -polylysine and anionic gum arabic," *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 137–143, 2014.
- [19] R. K. Shukla and A. Tiwari, "Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon," *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, no. 2, pp. 399–416, 2012.
- [20] K. T. Al-Jamal, W. T. Al-Jamal, J. T.-W. Wang, N. Rubio, J. Buddle, D. Gathercole, M. Zloh, and K. Kostarelos, "Cationic poly-L-lysine dendrimer complexes doxorubicin and delays tumor growth in vitro and in vivo.," *ACS Nano*, vol. 7, no. 3, pp. 1905–1917, 2013.
- [21] T. H. Senanayake, S. Gorantla, E. Makarov, Y. Lu, G. Warren, and S. V. Vinogradov, "Nanogel-Conjugated Reverse Transcriptase Inhibitors and Their Combinations as Novel Antiviral Agents with Increased Efficacy against HIV-1 Infection," *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 12, pp. 4226–4236, 2015.
- [22] C. Yang, Y. Shen, J. Wang, A. Ouahab, T. Zhang, and J. Tu, "Cationic polymer-based micro-emulgel with self-preserving ability for transdermal delivery of diclofenac sodium.," *Drug Deliv.*, vol. 7544, pp. 1–9, 2014.
- [23] K. Shi, Y. Liu, L. Ke, Y. Fang, R. Yang, and F. Cui, "Epsilon-poly-L-lysine guided improving pulmonary delivery of supramolecular self-assembled insulin nanospheres," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 1441–1450, 2015.
- [24] A.-G. Ziady, C. R. Gedeon, O. Muhammad, V. Stillwell, S. M. Oette, T. L. Fink, W. Quan, T. H. Kowalczyk, S. L. Hyatt, J. Payne, A. Peischl, J. E. Seng, R. C. Moen, M. J. Cooper, and P. B. Davis, "Minimal toxicity of stabilized compacted DNA nanoparticles in the murine lung," *Mol. Ther.*, vol. 8, no. 6, pp. 948–956, 2003.
- [25] L. M. Kaminskas, V. M. McLeod, G. M. Ryan, B. D. Kelly, J. M. Haynes, M. Williamson, N. Thienthong, D. J. Owen, and C. J. H. Porter, "Pulmonary administration of a doxorubicin-conjugated dendrimer enhances drug exposure to lung metastases and improves cancer therapy," *J. Control. Release*, vol. 183, no. 1, pp. 18–26, 2014.
- [26] R. H. Manzo, A. F. Jimenez-Kairuz, M. E. Olivera, F. Alovero, and M. V. Ramirez Rigo, "Thermodynamic and Rheological Properties of Polyelectrolyte Systems," in *Polyelectrolytes, Thermodynamics and Rheology*, Springer International Publishing

Switzerland, 2014, pp. 215–244.

- [27] A. Jimenez-Kairuz, M. Ramirez Rigo, D. Quinteros, A. Vilches, M. Olivera, F. Alovero, and R. Manzo, "Recientes contribuciones sobre la utilización de polielectrolitos en sistemas portadores de fármacos. Parte I: Dispersiones Acuosas," *Rev. Farm.*, vol. 150, no. 1, pp. 11–25, 2008.
- [28] U. Gupta, H. B. Agashe, and N. K. Jain, "Polypropylene imine dendrimer mediated solubility enhancement: effect of pH and functional groups of hydrophobes," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 358–367, 2007.
- [29] N. H. Chun, I. C. Wang, M. M. Lee, Y. Y. Jung, S. Lee, W. S. Kim, and G. J. Choi, "Characteristics of indomethacin-saccharin (IMC-SAC) co-crystals prepared by an anti-solvent crystallization process.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, pp. 854–861, 2013.
- [30] W. Limwikanant, M. Osada, K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe, and K. Yamamoto, "Unique indomethacin nanoparticles formation by cogrinding with dextrin under defined moisture conditions," *Powder Technol.*, vol. 221, pp. 213–219, 2012.
- [31] E. C. Frascareli, V. M. Silva, R. V. Tonon, and M. D. Hubinger, "Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying," *Food Bioprod. Process.*, vol. 90, no. 3, pp. 413–424, 2012.
- [32] M. Rusu, M. Olea, and D. Rusu, "Kinetic study of the indomethacin synthesis and thermal decomposition reactions," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 24, pp. 19–24, 2000.
- [33] A. Mauerer and G. Lee, "Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from alpha-helix, beta-sheet or random coil conformations.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 62, no. 2, pp. 131–142, 2006.
- [34] M. I. U. Islam and T. A. G. Langrish, "An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 46–56, 2010.
- [35] L. Gallo, J. M. Llabot, D. Allemandi, V. Bucalá, and J. Piña, "Influence of spray-drying operating conditions on Rhamnus purshiana (Cáscara sagrada) extract powder physical properties," *Powder Technol.*, vol. 208, no. 1, pp. 205–214, 2011.
- [36] N. E. Ceschan, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "New alginic acid-atenolol microparticles for inhalatory drug targeting.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 41, pp. 255–266, 2014.
- [37] N. R. Rabbani and P. C. Seville, "The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders.," *J. Control. Release*, vol. 110, no. 1, pp. 130–140, 2005.
- [38] C. J. Strachan, T. Rades, and K. C. Gordon, "A theoretical and spectroscopic study of gamma-crystalline and amorphous indometacin.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 59, no. 2, pp. 261–269, 2007.
- [39] D. Quinteros, M. V. Ramirez Rigo, A. Jimenez Kairuz, M. E. Olivera, R. H. Manzo, and D. Allemandi, "Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 72–79, 2008.
- [40] R. T. Conley, *Infrared spectroscopy*, 2nd Editio. Alhambra, 1979.

- [41] H. Garcia, A. S. Barros, C. Gonçalves, F. M. Gama, and A. M. Gil, "Characterization of dextrin hydrogels by FTIR spectroscopy and solid state NMR spectroscopy," *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 7, pp. 2318–2329, 2008.
- [42] P. Karmwar, K. Graeser, K. C. Gordon, C. J. Strachan, and T. Rades, "Investigation of properties and recrystallisation behaviour of amorphous indomethacin samples prepared by different methods," *Int. J. Pharm.*, vol. 417, no. 1–2, pp. 94–100, 2011.
- [43] A. V. Ewing, G. S. Clarke, and S. G. Kazarian, "Stability of indomethacin with relevance to the release from amorphous solid dispersions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 60, pp. 64–71, 2014.
- [44] T. J. Kistenmacher and R. E. Marsh, "Crystal and Molecular Structure of an Antiinflammatory Agent, Indomethacin, 1-(p-Chlorobenzoyl) -5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 94, no. 4, pp. 1340–1345, 1972.
- [45] Y. Shimada, S. Goto, H. Uchiro, H. Hirabayashi, K. Yamaguchi, K. Hirota, and H. Terada, "Features of heat-induced amorphous complex between indomethacin and lidocaine.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 102, pp. 590–596, 2013.
- [46] K. Maiti, K. Mukherjee, A. Gantait, B. P. Saha, and P. K. Mukherjee, "Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats.," *Int. J. Pharm.*, vol. 330, pp. 155–163, 2007.
- [47] N. Bandi, W. Wei, C. B. Roberts, L. P. Kotra, and U. B. Kompella, "Preparation of budesonide- and indomethacin-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPBCD) complexes using a single-step, organic-solvent-free supercritical fluid process.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 159–168, 2004.
- [48] "United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30–NF 25," *United States Pharmacopeial Conv.*, Rockville, MD, 2007.
- [49] M. J. Donovan and H. D. C. Smyth, "Influence of size and surface roughness of large lactose carrier particles in dry powder inhaler formulations.," *Int. J. Pharm.*, vol. 402, pp. 1–9, 2010.

*El conocimiento no es una vasija que se llena,
sino un fuego que se enciende.*

Plutarco

Capítulo 5.

Caracterización biofarmacéutica de los
materiales portadores de atenolol

5.1. Introducción

Para que el organismo humano pueda beneficiarse de un principio activo que ha demostrado ser útil en el tratamiento de la patología para la cual está destinado, es necesario formularlo adecuadamente de modo que sea seguro y farmacológicamente eficaz. Los ensayos biofarmacéuticos son las herramientas que se utilizan para caracterizar la formulación propuesta, determinando la interacción entre el fármaco, la forma farmacéutica que lo contiene y el organismo [1]. Las pruebas *in vitro* están diseñadas con la finalidad de que sus resultados se correlacionen con los esperados *in vivo*, por lo que son herramientas de valor para diseñar nuevas formulaciones y/o demostrar equivalencia entre ellas. Algunas de las técnicas, además, son comunes al control de calidad de lotes de productos disponibles en el mercado [2].

El ensayo de aerosolización en impactadores en cascada es el estudio biofarmacéutico *in vitro* y de control de calidad que más se utiliza y mejor caracteriza una formulación de administración por vía pulmonar [3]. En farmacopeas se definen con precisión dos criterios principales: la distribución de tamaño aerodinámico de partículas (en inglés *Aerodynamic Particle Size Distribution, APSD*) y la uniformidad de la dosis administrada (en inglés, *Delivered Dose Uniformity, DDU*) [3]. Además de estas dos métricas, los ensayos de aerosolización en impactadores también permiten calcular las fracciones emitidas, finas de partículas y respirables, definidas en la Sección 2.2.8.

La prueba de uniformidad de dosis verifica que la cantidad de fármaco administrada es consistente lote a lote y, para sistemas de dosis múltiples, de dosis a dosis. Esta prueba es relativamente sencilla; por ejemplo, un IPS se dispara en un aparato de muestreo que permite capturar la dosis medida en un filtro. La cantidad de ingrediente activo suministrada se determina entonces mediante la técnica analítica adecuada [4].

La *APSD* se estudia tradicionalmente mediante impactadores en cascada de múltiples etapas. Como se mencionó en la Sección 1.4, el diámetro aerodinámico es el mejor indicador de la capacidad de los sistemas particulados de acceder a regiones profundas del pulmón. El ensayo de aerosolización *in vitro* permite establecer la relación másica de fármaco que se encuentra presente en partículas que pertenecen a un determinado rango de diámetros aerodinámicos.

Entre los equipos disponibles, uno de los más usados es el impactador en cascada de última generación (*Next Generation Impactor*, NGI) [5]. Tal como se mencionó en el Capítulo 2, este equipo está compuesto por siete etapas de separación (las cuales permiten modular de manera creciente la velocidad del aerosol circulante y coleccionar progresivamente partículas más pequeñas) y un colector final con microorificios (MOC). En el NGI, el dispositivo IPS (conteniendo la formulación de administración inhalatoria) se conecta a un puerto de inducción (PI) a través de un adaptador. El PI simula la retención de las partículas en el tracto respiratorio superior. Entre el IP y el NGI se coloca un preseparador (PS), el cual retiene las partículas relativamente grandes (partículas de *carrier*, partículas de fármaco de mayor tamaño o aglomerados de partículas) [6][7]. La separación de las partículas en las siete etapas del impactador se logra por el aumento sucesivo de la velocidad del aire a medida que pasa por una serie de orificios de diámetro cada vez más reducido. De acuerdo al caudal del aire seleccionado, el diámetro de corte de cada una de las etapas del NGI es diferente [7][8]. El resultado de este ensayo es una serie de muestras fraccionadas por tamaño aerodinámico, que se analizan para determinar una distribución de tamaño de partículas específicamente para las formulaciones de administración inhalatoria.

La simulación de un único ciclo de inhalación, equivalente a la inspiración de un paciente cuando usa un IPS, se logra con un caudal de aire constante que se genera mediante una bomba de vacío. Este caudal induce la “inspiración” del material particulado que se localiza en el IPS. Luego el aerosol atraviesa todas las etapas arriba descritas. El tiempo se selecciona de manera que pase una cantidad de aire equivalente a la capacidad pulmonar por inhalación [7][8].

Las características de las formulaciones, del IPS, del ambiente o del ensayo afectan la deposición *in vitro* de las partículas. Entre ellas se puede mencionar la caída de presión a través del inhalador, el agregado de materiales *carriers* y la humedad ambiente [9][10]. Por ejemplo, se ha reportado que a mayores caídas de presión, lo que implica un mayor caudal de aire circulante, aumenta la fracción de partículas respirables (ver definición en el Capítulo 2). También fue encontrado que la fracción respirable disminuye conforme aumenta la humedad ambiente, ya que cobran importancia las interacciones capilares entre las partículas o entre las partículas y el *carrier* [10].

Si bien el principal foco en la caracterización de sistemas inhalables está dado en la determinación de diámetro aerodinámico, es importante conocer además la liberación, disolución y permeación de los fármacos contenidos en formulaciones de IPS [3]. A diferencia

de lo que ocurre para la vía oral (entre otras), aún no existen técnicas codificadas para estudiar la disolución de sistemas particulados inhalatorios. En este contexto, en esta Tesis se adopta el uso de Celdas de Franz (descriptas en el Capítulo 2) para evaluar la liberación, difusión y permeación de fármacos contenidos en IPSs [11].

Una vez que las partículas se depositan en pulmón, el fármaco puede actuar localmente o absorberse y ejercer su efecto a nivel sistémico. Eventualmente, las partículas también pueden ser eliminadas por el barrido de las cilias que recubren el tracto respiratorio. Para aumentar el tiempo de permanencia de los sistemas particulados en el pulmón es de utilidad co-procesar los principios activos con excipientes que tengan propiedades mucoadherentes [12]. Así las partículas conteniendo el fármaco tendrían la capacidad de permanecer más tiempo en el sitio de acción o absorción [12]. Para conocer la capacidad de un sistema particulado de permanecer en el pulmón, en la literatura científica se propone el uso de analizadores de textura [13]. Utilizando estos equipos se puede evaluar la fuerza de despegue o el trabajo de despegue que debe realizar una probeta cargada con el producto inhalatorio para despegarse de un material que emule el mucus del pulmón (mucina) [14]. Diferentes autores propusieron tejidos mucosos animales para la realización de los ensayos. Sin embargo, los mismos se han reemplazado por mucina aislada de estómago porcino, la cual proporciona resultados más reproducibles [13].

Hasta que el sistema particulado se absorba, ejerza su efecto farmacológico a nivel local o se elimine, las partículas de administración inhalable estarán en contacto con las células pulmonares. Por esta razón, la formulación conteniendo el fármaco no debe dañar las células y tejidos del pulmón. Diferentes líneas celulares se propusieron para estudiar la seguridad de sistemas particulados de administración inhalable [15]. Para el caso particular de los IPSs conteniendo principios activos para tratamientos sistémicos es necesario estudiar la seguridad del material en líneas celulares representativas del epitelio alveolar, ya que las partículas deben llegar a la membrana del alveolo para poder absorberse y ejercer su efecto a nivel sistémico. De esta manera, para evaluar la citotoxicidad de las formulaciones, se propuso el uso de la línea celular A-549, ya que son células humanas de adenocarcinoma epitelial alveolar basal [16].

En este capítulo se estudian las propiedades biofarmacéuticas y la citotoxicidad de los sistemas (AA-AT)₇₅ 1,9%^{b y c} y (AA-AT)₇₅:K 2%^{b y c}, los cuales resultaron preliminarmente atractivos para la administración inhalatoria de atenolol. Como se mencionó en el Capítulo 3, de todos los materiales portando AT desarrollados, se seleccionaron aquellos sistemas con un alto cargado

de fármaco (i.e., 75 % de neutralización de los grupos ácidos de AA con AT), buen rendimiento del proceso de secado, baja humedad residual y pequeños tamaños de partículas. Por otra parte, se evalúa el efecto de la incorporación de lactosa como material *carrier* en el ensayo de aerosolización *in vitro*. Adicionalmente se discute la capacidad del complejo iónico de revertir y liberar el fármaco para ejercer su acción terapéutica. Finalmente, se examina la mucoadherencia de las micropartículas, con el objetivo de relacionarla con el tiempo de permanencia en el pulmón de los sistemas desarrollados. La Figura 5.1 resume el estudio realizado de las propiedades biofarmacéuticas relevantes para las formulaciones de AA-AT, respecto de la administración, liberación y absorción del principio activo. Además se evalúa la viabilidad celular luego de tratar una línea celular representativa de epitelio alveolar con las formulaciones conteniendo AT.

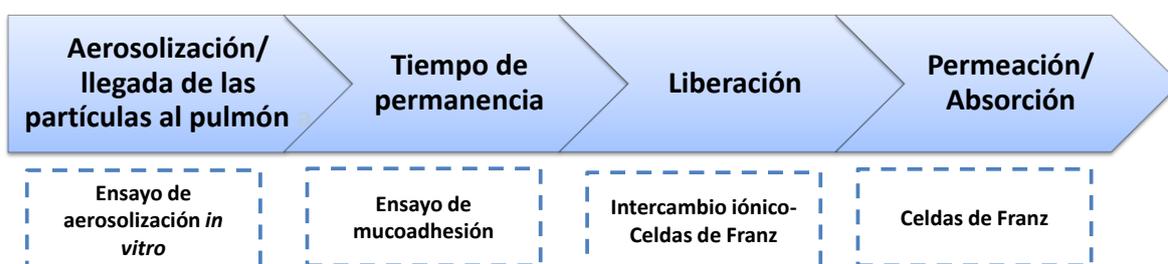


Figura 5.1. Resumen de la caracterización biofarmacéutica de los materiales AA-AT

5.2. Resultados

5.2.1. Propiedades de aerosolización

5.2.1.1 Test de aerosolización *in vitro*

En la Tabla 5.1 se listan las propiedades de aerosolización de las micropartículas seleccionadas en el Capítulo 3 como más atractivas para su administración inhalatoria. Las muestras una vez obtenidas por SA, se conservaron en desecador con sílica gel de manera que no capten humedad del ambiente. Las propiedades de aerosolización fueron determinadas a partir de la evaluación del contenido de AT en las distintas etapas del impactador en cascada utilizado (NGI, ver Sección 2.2.8). Los resultados que se reportan corresponden a ensayos realizados con una caída de presión de 4 KPa. La Figura 5.2, a modo de ejemplo, muestra algunas tazas colectoras de distintas etapas donde se observa el polvo depositado. Tal como se describió en

la Sección 2.2.8, el contenido de AT en cada etapa se determinó por lavado de las tazas colectoras y posterior análisis por UV.



Figura 5.2. Fotografía de las muestras de $(AA-AT)_{75}:K 2\%^c$ colectadas en las etapas de separación 3 y 4 del equipo NGI (que, para una caída de presión de 4 KPa, presentan diámetros de corte de 2,85 y 1,68 μm , respectivamente)

En la Tabla 5.1 se observa que todas las muestras exhibieron altas fracciones emitidas (FEs) ubicándose los valores entre 91 y 94 %. Los valores de FE fueron similares para todas las muestras, lo cual indica que el agregado del contraíón K y el uso de las diferentes condiciones de secado ensayadas no afectaron sensiblemente esta propiedad. La fracción fina de partículas (FPF) se ubicó entre 14,5 y 29,1 % y la fracción respirable (FR) entre 13,3 y 26,5 %. Considerando que estas fracciones para la mayoría de las formulaciones comerciales de IPSs se ubican entre 10-35 % [17], todos los polvos seleccionados resultaron adecuados para la administración inhalatoria de AT. Cabe destacar que el uso del ciclón de alta performance mejoró significativamente los valores de la FPF y la FR. En efecto, el uso de las condiciones de procesamiento *c* en lugar de las *b*, condujo a incrementos de estas fracciones cercanos al 90 y 50 % para las muestras $(AA-AT)_{75}$ 1,9% y $(AA-AT)_{75}:K 2\%$, respectivamente. Esta mejora fue estadísticamente significativa (valor $p < 0,05$) y se relacionó con la capacidad del ciclón de alta performance de coleccionar partículas más pequeñas (ver diámetros volumétricos medios de los polvos en la Tabla 3.7).

La mediana en masa del diámetro aerodinámico (MMDA) resultó adecuada para la administración sistémica de las formulaciones (alrededor de 3 μm). Como se esperaba, los valores fueron más pequeños para las condiciones de secado *c* respecto de las *b*, en consonancia con los mayores valores de FPF y FR % observados (i.e., una mayor cantidad de micropartículas ingresa a las etapas de separación del impactador). En todos los casos los valores de GSD fueron menores a 3, por lo que las distribuciones se consideraron angostas.

Tabla 5.1. Propiedades de aerosolización *in vitro* a 4KPa de caída de presión

Parámetros	(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^b	(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^b
FE (%)	92,73±1,24	91,64±3,72	90,96±1,03	94,27±2,69
FPF (%)	27,77±2,51	14,54±0,72 (*)	29,09±1,95	19,23±1,79(*)
FR (%)	25,76±2,45	13,34±1,19(*)	26,47±1,93	18,10±1,25(*)
MMDA (μm)	3,19±0,12	3,57±0,16	3,13±0,08	3,35±0,09
GSD	1,87±0,35	2,14±0,44	2,02±0,22	1,83±0,03

FE: fracción emitida; FPF: fracción de partículas finas; FE: fracción respirable. (*): diferencia estadísticamente significativa, respecto de las mismas fracciones calculadas para la condición de secado c

Considerando que las muestras (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c presentaron los mejores resultados de aerosolización *in vitro* en el equipo de impacto en cascada operando con 4 KPa, estas dos formulaciones se ensayaron a una menor caída de presión (2 KPa). Los resultados de este último caso, que simula la respiración de pacientes con capacidades inhalatorias disminuidas, se presentan en la Tabla 5.2. Como puede verse, ambas muestras presentan adecuada deposición de las partículas observándose un leve decrecimiento de la FE cuando la caída de presión disminuye a 2 KPa. La disminución de la caída de presión provoca un decrecimiento de la FPF y la FR que no resultó ser estadísticamente significativa para la muestra (AA-AT)₇₅ 1,9%^c pero sí lo fue para la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c respecto del ensayo realizado a 4 KPa de caída de presión. En paralelo, se observa un pequeño aumento de los valores de MMDA. Por su parte, los valores de GSD indican que las distribuciones también fueron angostas.

Tabla 5.2. Aerosolización *in vitro* de los sistemas ensayados a 2 KPa de caída de presión

Parámetros	(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c
FE (%)	91,05±1,68	89,58±3,17
FPF (%)	25,15±0,64	24,19±1,42(*)
FR (%)	22,89±0,22	21,69±1,94(*)
MMDA (μm)	3,24±0,22	3,25±0,07
GSD	1,79±0,24	1,77±0,08

(*): diferencia estadísticamente significativa, respecto del mismo material ensayado a 4KPa

Aunque la deposición *in vitro* de las partículas de (AA-AT)₇₅:K 2%^c es dependiente del caudal, lo que es particularmente relevante para pacientes con capacidad inhalatoria reducida [18], ambas formulaciones se consideran adecuadas para la administración inhalatoria de AT.

Para evaluar el efecto de la lactosa, la cual suele ser usada como *carrier* para mejorar las propiedades de aerosolización, las mezclas micropartículas:lactosa en proporción 1:3 de las muestras (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c se ensayaron en el NGI. Los resultados de estos

ensayos se presentan en la Tabla 5.3. Puede verse un leve incremento de la FE cuando se agrega lactosa como excipiente *carrier*. Aunque la literatura científica reporta que el agregado de lactosa aumenta la deaglomeración de las partículas y en consecuencia mejora la emisión de las mismas desde el inhalador [18], no pudieron detectarse diferencias estadísticamente significativas entre las mezclas con lactosa y las micropartículas sin este excipiente (valor $p > 0,05$).

Tabla 5.3. Aerosolización *in vitro* de las mezclas micropartículas:lactosa en proporción 1:3, ensayadas a 4KPa de caída de presión

Parámetros	(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c		(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	
	4KPa	2KPa	4KPa	2KPa
ΔP				
FE (%)	92,92±0,19	92,08±1,85	93,06±2,40	90,55±3,64
FPF (%)	29,12±1,81	26,09±1,01	32,26±0,58	26,78±2,85
FR (%)	27,05±1,70	24,01±1,32	30,11±1,24	25,10±1,95
MMDA (μm)	3,16±0,49	3,22±0,54	3,11±0,21	3,24±0,11
GSD	2,02±0,19	1,87±0,45	1,92±0,25	1,62±0,10

ΔP: caída de presión

El agregado del *carrier* llevó a una mejora de la FPF y de la FR de 4-11 % y 5-16 %, respectivamente. Si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$), el uso de lactosa proveyó al polvo de mejores propiedades de flujo (ver Sección 3.3.5).

Comparando las mezclas de micropartículas con lactosa (Tabla 5.3) con las micropartículas sin el agregado de *carrier* (Tabla 5.1) puede verse que los MMDAs no presentan diferencias significativas. El agregado de lactosa tampoco impacta significativamente en los valores de GSD; en todos los casos las distribuciones pueden considerarse angostas (i.e., valores bien por debajo de 3) [19].

Debido a que se utilizó lactosa tamizada, las partículas de este *carrier* deberían tener tamaños entre 105 y 210 μm y colectarse mayoritariamente en el preseparator. Los resultados obtenidos son una evidencia indirecta de que la lactosa no interacciona fuertemente con las micropartículas AA-AT en el proceso de aerosolización. De hecho, la cuantificación de AT en el PS fue similar tanto para los materiales con lactosa como libres de *carrier*, como se muestra en la Tabla 5.4.

Considerando que las formulaciones de polvo seco de administración inhalatoria dependen de la combinación del fármaco, el *carrier* y el inhalador [10], el estudio de la interacción de las

micropartículas con diferentes *carriers* constituye parte de los trabajos futuros que se desprenden de esta Tesis.

Tabla 5.4. Retención de AT en el preseparador (PS) para los materiales (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c, con y sin el agregado de lactosa

Muestra	Retención en el PS (%)
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c	9,60±1,93
(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c :lactosa	10,40±1,63
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	10,22±1,29
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c :lactosa	11,83±0,74

Los resultados discutidos en los párrafos previos indican que las formulaciones (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c poseen adecuadas propiedades de aerosolización *in vitro* a diferentes caídas de presión e incluso sin el agregado de materiales *carriers*, situación favorable para administrar mayores dosis del principio activo.

La dosis por vía oral de AT varía entre 25-100 mg diarios (tanto para el tratamiento de la hipertensión como de arritmias cardíacas) y la biodisponibilidad entre pacientes a dosis terapéuticamente efectivas exhibe importantes variaciones, ubicándose en alrededor del 40 % [20]–[23]. Por otra parte, para el tratamiento de la hipertensión por vía inhalatoria, se han indicado dosis terapéuticas entre 0,1 y 20 mg [24]. Considerando que los ensayos de aerosolización indican que aproximadamente un 25 % de la cantidad de AT cargada en la cápsula estaría disponible para la absorción sistémica, que una cápsula sin el uso de *carrier* podría cargarse con 50 mg de polvo y que la concentración de AT en las formulaciones es aproximadamente del 0,5 p/p, puede concluirse que alrededor de 6 mg sería la cantidad de AT que alcanzaría la circulación sistémica en cada disparo. Por lo tanto, la dosis de fármaco potencialmente requerida podría ser administrada en un número razonable de administraciones diarias. De todos modos, aún resta determinar la dosis terapéutica de AT por vía inhalatoria, resultado que permitiría establecer con mayor precisión el número de disparos diarios requeridos o la necesidad de reformulación de los productos.

5.2.1.2 Efecto de la humedad de almacenamiento sobre las propiedades de aerosolización

Se ha descrito que las condiciones de humedad a las cuales los polvos se exponen durante el proceso de manufactura, almacenamiento y uso, pueden afectar la aerosolización y el proceso de deposición *in vitro* de las partículas, impactando negativamente en la seguridad y eficacia

del tratamiento farmacoterápico [10]. Sin embargo, la literatura científica se ha enfocado principalmente en el efecto de la humedad ambiente sobre la aerosolización de fármacos puros, normalmente micronizados, con o sin el agregado de *carriers*. En esta sección se analiza la influencia de la humedad relativa de almacenamiento de las muestras sobre las propiedades de aerosolización *in vitro* para las micropartículas co-procesadas que contienen un polímero higroscópico. Con este objetivo, los sistemas (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c se almacenaron a humedades relativas (HR) de 40, 60 y 75 % durante 24 horas, con o sin el agregado de lactosa. Los valores de HR de 60 y 75 % se seleccionaron por ser las condiciones de almacenamiento codificadas por USP para los estudios de estabilidad de larga duración y acelerada de polvos, respectivamente [4]. Este tipo de estudios proveen información para seleccionar adecuadas condiciones de procesamiento y almacenamiento. Por otra parte, el valor de 40 % de HR se seleccionó por resultar ser la HR máxima recomendada para la manipulación de cápsulas de gelatina [25]. Luego del período de almacenamiento, se determinó el aumento de la humedad de los polvos y posteriormente se los evaluó en el impactador en cascada a 4 KPa de caída de presión.

La Figura 5.3 muestra el porcentaje de aumento de peso de las muestras (i.e., captación de humedad), atribuido a la humedad adsorbida para las micropartículas y para las mezclas micropartículas:lactosa. Allí se observa que la captación de humedad para todos los ensayos fue inferior al 15 %. Considerando este valor, el criterio de la Farmacopea Europea clasificaría a los polvos con y sin *carrier* como materiales higroscópicos [26].

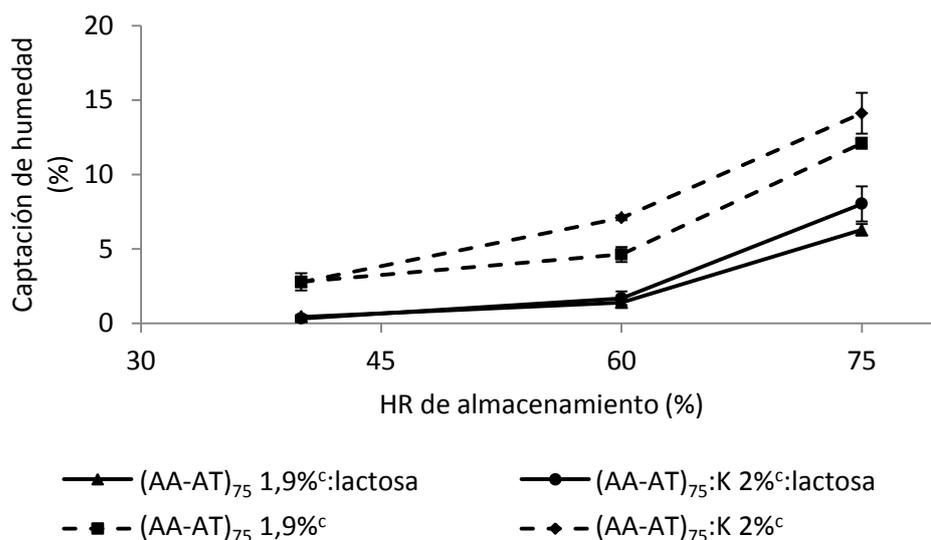


Figura 5.3. Captación de humedad de los sistemas secados por atomización y de las mezclas micropartículas:lactosa

Para una humedad relativa de 40 %, la higroscopicidad fue similar para las muestras sin lactosa (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c (alrededor de 3 %). Para las mezclas con lactosa el incremento de peso asociado a la adsorción de humedad fue sensiblemente menor (< 0,5 %) que para las muestras sin *carrier*, esto se debe a la baja higroscopicidad de este disacárido [27]. A HRs más elevadas (60 y 75 %), la captación de humedad comienza a diferenciarse. Particularmente a 75 %, la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c presentó, con o sin lactosa, mayor captación de humedad que la muestra (AA-AT)₇₅ 1,9%^c.

Las Tablas 5.5 y 5.6 muestran los parámetros relevantes del ensayo de aerosolización *in vitro* para los sistemas (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c con o sin lactosa, almacenados a diferentes humedades relativas y ensayados a una caída de presión de 4 KPa. Para las muestras con el agregado de lactosa, las diferencias en las FPF y FR % para las micropartículas solas y las mezclas de micropartículas:lactosa cuando se las almacenó a 60 y 75 % de HR no resultaron estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$). A 40 % de HR, el agregado del *carrier* no resultó en diferencias significativas para la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c, pero sí para el material (AA-AT)₇₅ 1,9%^c (valor $p < 0,05$). De esta manera, bajo las condiciones de humedad estudiadas, el excipiente seleccionado no afectó la aerosolización de los materiales.

Tabla 5.5. Parámetros relevantes para la deposición *in vitro* a diferentes humedades relativas (HR %)

HR (%)	(AA-AT) ₇₅ 1,9% ^c					
	40		60		75	
Relación micropartículas:lactosa	1:0	1:3	1:0	1:3	1:0	1:3
FE (%)	93,16±1,24	94,49±0,72	95,10±1,03	95,31±1,49	84,28±2,30	93,87±1,79
FPF (%)	24,91±1,66	20,83±1,38(*)	23,64±2,81	17,98±2,26	4,05±0,19	3,79±0,33
FR (%)	23,21±1,73	19,69±2,21(*)	22,50±2,90	17,16±2,37	3,59±0,22	3,56±0,29
MMDA (µm)	3,21±0,23	3,28±0,53	3,24±0,36	3,47±0,31	4,37±0,38	4,61±0,47
GSD	2,16±0,35	2,27±0,09	1,87±0,32	2,22±0,17	3,10±0,11	3,13±0,13

(*): diferencia estadísticamente significativa, respecto de las mismas fracciones calculadas para las micropartículas sin el agregado del *carrier*

Comparando los resultados de las muestras acondicionadas a 40 y 60 % de HR con aquellos obtenidos para los materiales conservados en el desecador sin el agregado de lactosa (Tabla 5.1), el análisis estadístico indicó que solo la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c almacenada a 60 % de HR mostró cambios en la FPF y la FR estadísticamente significativos (valor $p < 0,05$) respecto los valores obtenidos para la misma muestra almacenada en desecador. Para el resto de las muestras y condiciones, el acondicionamiento a diferentes humedades no impactó de manera significativa las propiedades de aerolización ($p > 0,05$), siendo los valores obtenidos para las distintas fracciones aún adecuados para la administración inhalatoria del fármaco,

considerando que se utilizarán componentes que lo protejan de la humedad (empaque primario y secundario).

Sin embargo, cuando las muestras se almacenaron a 75 % de HR, la FPF y la FR disminuyeron marcadamente. En efecto, estas propiedades resultaron ser muy inferiores a las observadas para las muestras almacenadas en el desecador, donde se detectaron disminuciones entre el 85-89 % (comparar valores reportados en Tablas 5.5 y 5.6 con los valores dados en la Tabla 5.1). Este importante cambio en las propiedades de aerosolización indica que las muestras expuestas a muy altas condiciones de humedad ambiente no son adecuadas para la administración inhalatoria. Sin embargo, cabe destacar que difícilmente los materiales se encuentren expuestos a condiciones ambientales tan drásticas.

Tabla 5.6. Parámetros relevantes para la deposición *in vitro* a diferentes humedades relativas (HR %)

HR (%)	(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c					
	40		60		75	
Relación micropartículas:lactosa	1:0	1:3	1:0	1:3	1:0	1:3
FE (%)	94,28±1,67	94,00±1,65	92,73±1,43	95,04±2,05	80,04±1,18	93,92±3,09
FPF (%)	26,20±1,07	27,37±2,96	22,16±1,62(*)	21,33±1,02	3,76±0,89	3,61±0,79
FR (%)	24,70±1,21	25,75±2,48	20,55±1,50(*)	20,29±1,39	3,01±0,71	3,38±0,73
MMDA (µm)	3,19±0,17	3,15±0,15	3,36±0,28	3,48±0,39	4,86±0,70	5,29±0,21
GSD	2,23±0,11	2,15±0,17	1,78±0,28	2,15±0,13	2,96±0,60	2,55±0,19

(*): diferencia estadísticamente significativa, respecto de las mismas fracciones calculadas para el material conservado en el desecador

Las Tablas 5.5 y 5.6 también muestran el valor de MMDA y GSD para todos los experimentos llevados a cabo bajo diferentes condiciones de HR. La MMDA aumentó cuando la HR aumentó, relacionado con la disminución de la FR. Los valores de GSD para las muestras almacenadas a 75 % de HR fueron mayores que para las otras condiciones de almacenamiento ensayadas; estas distribuciones ya no pueden considerarse angostas.

Aunque se ha reportado que la influencia de la humedad en las propiedades de aerosolización y deposición depende principalmente de la composición de las partículas, en términos generales, las fuerzas electrostáticas predominan a bajas HRs mientras que las fuerzas capilares se vuelven más importantes a HRs más elevadas, especialmente a valores superiores a 60 % [28]. Cuando las fuerzas de adhesión entre las partículas aumentan, el desempeño en el proceso de aerosolización disminuye debido a que es más difícil romper los aglomerados en partículas individuales. Sin embargo, el marcado decrecimiento de las propiedades de aerosolización a 75 % de HR puede, además, asociarse con los cambios físicos que experimentaron las micropartículas debido a poseer en su composición un polímero hidrofílico

hinchable [29]. De hecho, se observaron aglomerados de coloración marrón en la muestra almacenada a 75 % de HR. Si bien los aglomerados también fueron visualizados en la muestra almacenada a 60 % de HR, los mismos conservan el color original del material particulado y la capacidad de romperse con facilidad en las partículas individuales.

La Figura 5.4 muestra las micrografías de MEB, obtenidas mediante la técnica de presión variable para el material (AA-AT)₇₅:K 2%^c almacenado bajo diferentes condiciones. Las Figuras 5.4 a, b y c, las cuales corresponden al material (AA-AT)₇₅:K 2%^c mantenido en el desecador, bajo 40 % de HR y bajo 60 % de HR, respectivamente, indican que la morfología de las muestras es similar. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de impacto en cascada. Sin embargo, la Figuras 5.4 d, correspondiente a la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c almacenada a 75 % de HR, muestra una red gelificada, donde no se pueden reconocer las partículas individuales. Esta morfología puede asociarse a la formación de puentes capilares entre las partículas cuando la muestra capta humedad [10]. Las interacciones capilares evolucionan a la formación de una matriz viscosa [10]. Esta evidencia explica la dificultad de las muestras almacenadas a 75 % de HR para salir de la cápsula y es responsable de la disminución observada en los valores de FPF y la FR respecto a las muestras almacenadas en condiciones menos severas.

Del análisis previo puede concluirse que las propiedades aerodinámicas de las micropartículas son adecuadas para la administración inhalatoria de AT, incluso si se las expone a condiciones de almacenamiento de HR hasta 60 %. La muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c demostró poseer mejor comportamiento en el ensayo de deposición *in vitro* cuando se la almacenó a 40 y 60 % de HR respecto de la muestra (AA-AT)₇₅ 1,9%^c. Como ambos materiales tienen una tendencia similar a captar humedad cuando se las almacena a esos valores de HR, las mejores propiedades de aerosolización pueden relacionarse con el menor tamaño de partícula que la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c posee respecto de la muestra (AA-AT)₇₅ 1,9%^c. Cuando la humedad de almacenamiento aumentó hasta 75 % de HR, ninguna de las muestras analizadas fue adecuada para la administración inhalatoria. Por lo tanto, debería evitarse la manipulación de los polvos estudiados en este capítulo en ambientes de muy alta humedad relativa.

Por otra parte, las mezclas micropartículas:lactosa no modificaron significativamente la deposición *in vitro* de las muestras, excepto para el sistema (AA-AT)₇₅ 2%^c almacenado a 40 % de HR. Por último debe considerarse que la mayoría de los IPSs son dispositivos de dosis única, la cual está contenida en cápsulas o blisters que se insertan en el inhalador cada vez que se requiere administrar el fármaco. Un adecuado empaquetamiento provee protección contra

condiciones ambientales desfavorables, como la alta humedad relativa [18]. De esta manera, la exposición del material a HR de 75 % es poco probable.

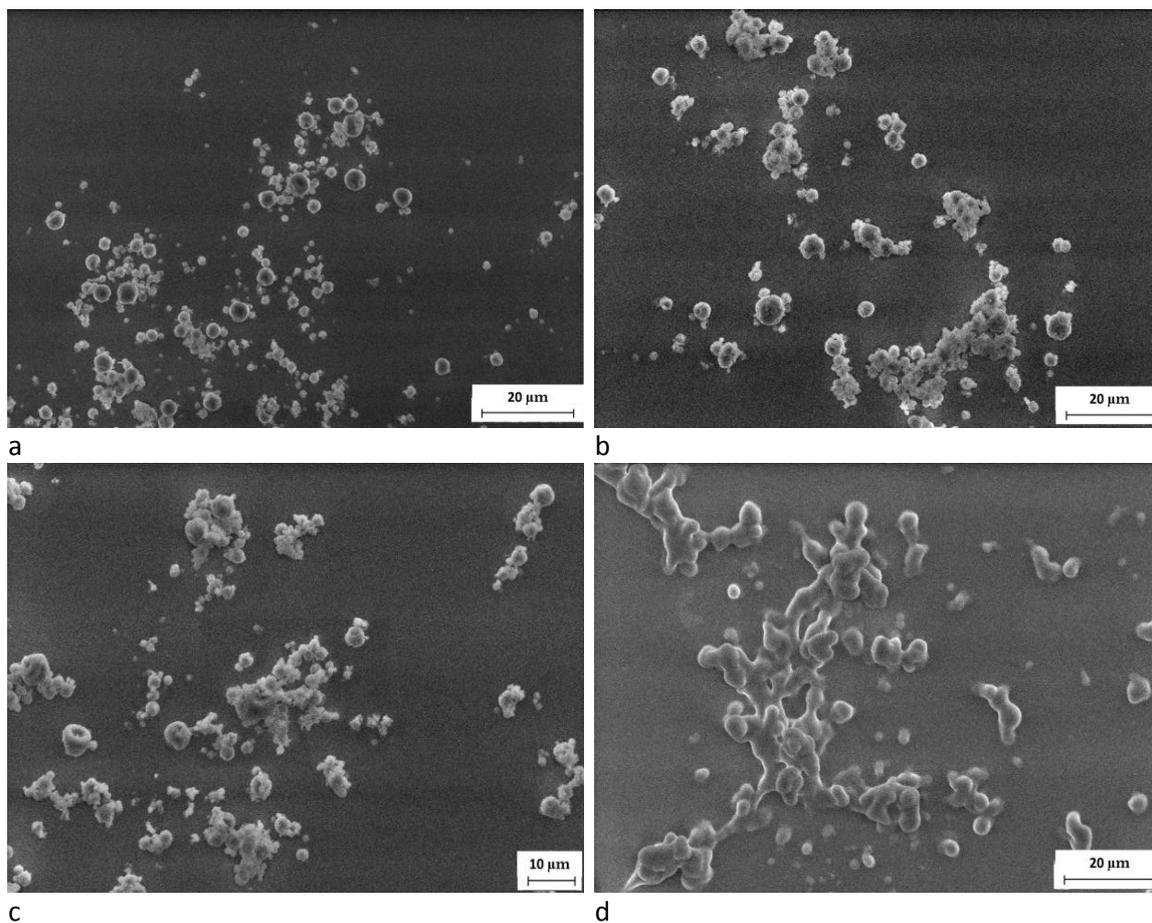


Figura 5.4. Micrografías de la muestra $(AA-AT)_{75}:K 2\%$ (2500X) obtenidas con la técnica de presión variable, almacenadas a diferentes humedades relativas: a) 0 %; b) 40 %; c) 60 %; d) 75 %

5.2.1.3 Comparación de los diámetros aerodinámicos estimados con las MMDAs

En el Capítulo 3 se estimaron los diámetros aerodinámicos según las Ecuaciones 2.6 y 2.7. Esto permitió seleccionar de manera rápida y preliminar aquellos materiales con propiedades atractivas para la administración inhalatoria. Aquí, los valores de D_{aer}^e (Tabla 3.11) se comparan con las MMDAs obtenidas en el ensayo de impacto en cascada (Tabla 5.1). La Figura 5.5 compara gráficamente los valores de los diámetros aerodinámicos estimados y los de MMDA.

Como se ve, los $D_{aer}^{e,min}$ (Ecuación 2.6), subestimaron las MMDAs en un 25-35 %. Por el contrario, los $D_{aer}^{e,max}$ (Ecuación 2.7), resultaron entre un 1,5 a 25 % mayores que los valores obtenidos *in vitro* por impacto en cascada. Es de resaltar que para las muestras $(AA-AT)_{75}:K 2\%$ los $D_{aer}^{e,max}$ coincidieron con los reales, siendo la diferencia no mayor al 1,5 %.

Para partículas individuales, la densidad de partículas es menor o igual que la densidad de la muestra, cumpliéndose la igualdad cuando la partícula no es porosa [30].

Si bien se propone que los materiales $(AA-AT)_{75} 1,9\%^{b \ y \ c}$ y $(AA-AT)_{75}:K 2\%^{b \ y \ c}$ podrían tener estructura hueca (ver Sección 3.3.5), las partículas de $(AA-AT)_{75}:K 2\%^{b \ y \ c}$ tendrían una estructura más densa que aquellas sin el agregado del contraión K y, por lo tanto, la densidad de la muestra más cercana a la densidad de la partícula.

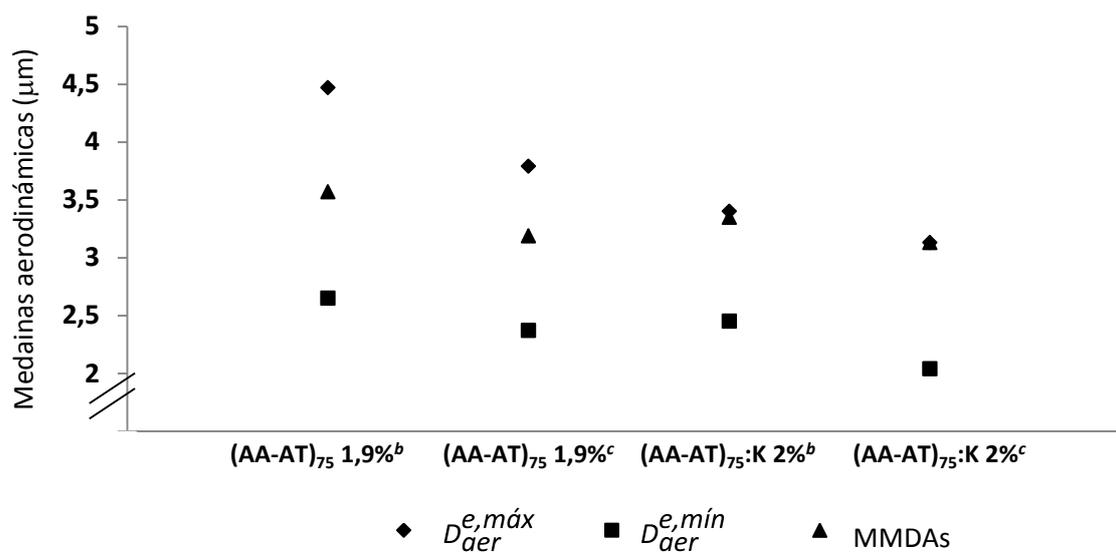


Figura 5.5. Valores de los $D_{aer}^{e,máx}$, $D_{aer}^{e,mín}$ y MMDAs obtenidas mediante el ensayo de impacto en cascada

Si bien ninguna de las ecuaciones propuestas permitió estimar el diámetro aerodinámico de todos los materiales de manera precisa, ambas ecuaciones son muy valiosas para la selección rápida de materiales capaces de llegar a regiones profundas del pulmón, ya que establecen el rango de tamaños donde se ubicarán las MMDAs. Por ejemplo, el material $(AA-AT)_{75}:K 2\%^c$ que presentó los menores diámetros aerodinámicos estimados, fue también el material que exhibió el valor más pequeño de MMDA. Por el contrario, la muestra $(AA-AT)_{75} 1,9\%^b$ que mostró el mayor valor estimado, resultó ser el material que presentó la mayor MMDA.

5.2.2. Liberación del fármaco a partir del complejo iónico

En este ensayo (ver Sección 2.2.10) se evaluó la capacidad de los iones del medio (solución fosfato tamponada pH 7,4) de intercambiarse con el fármaco en el complejo iónico y de esta manera liberar el principio activo para que pueda ejercer su acción farmacológica.

La Figura 5.6 muestra el perfil temporal de liberación del fármaco desde los polvos $(AA-AT)_{75}$ 1,9%^c y $(AA-AT)_{75}:K$ 2%^c cuantificados en el compartimiento receptor. Con fines comparativos también se evaluó el contenido de AT en el compartimiento receptor, colocando el polvo AT 1,6%^c en la membrana que separa los compartimientos de las celdas. Para este material puro y por inspección visual, se comprobó que se requirió un mayor tiempo de mojado respecto a los complejos iónicos. Esto podría estar relacionado, entre otras posibles causas, con que AT se encuentra en estado cristalino, estado de mayor estabilidad que, en general, requiere mayores tiempos para disolverse [31].

Sin embargo, luego de 6 horas de ensayo, alrededor del 80 % de AT colocado en el compartimiento donador (AT puro secado por atomización o contenido en los complejos iónicos $(AA-AT)_{75}$ 1,9%^c y $(AA-AT)_{75}:K$ 2%^c) se cuantificó en el compartimiento receptor. La liberación de AT a partir de los complejos se comparó con el perfil de AT 1,6%^c, utilizando el factor de similitud f_2 . Para los materiales portando el fármaco, el valor de f_2 fue mayor a 50 (66 y 51 para las muestras $(AA-AT)_{75}$ 1,9%^c y $(AA-AT)_{75}:K$ 2%^c, respectivamente), indicando que no hay diferencias entre la liberación de AT desde la formulación y su transporte a través de la membrana respecto del pasaje de AT 1,6%^c.

Los perfiles de liberación del fármaco desde las muestras $(AA-AT)_{75}$ 1,9%^c y $(AA-AT)_{75}:K$ 2%^c también resultaron similares ($f_2=58$).

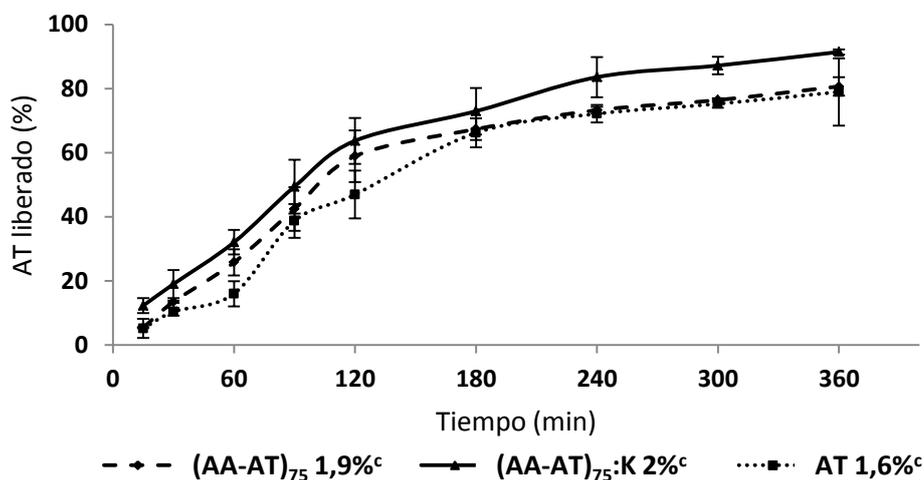


Figura 5.6. Perfil de liberación de AT a partir de los materiales particulados y del fármaco secado por atomización. Todos los perfiles resultaron similares, de acuerdo al factor f_2 .

En la Figura 5.7 y para la muestra $(AA-AT)_{75}:K$ 2%^c, se comparan los perfiles de liberación de AT colocando polvo o una solución acuosa del complejo iónico sobre la membrana de la celda. La

cantidad de AT en solución y en el sólido particulado fue la misma. Como puede verse, el transporte a través de la membrana de celulosa es más rápido desde la solución comparado con el complejo sólido. Este hecho se relaciona al proceso de mojado que debe experimentar el material particulado antes de transportarse a través de la membrana. Una vez que este paso se supera, los perfiles son semejantes.

Es importante resaltar que en el ensayo realizado, el medio del compartimiento receptor se enriqueció de AT en el tiempo, lo cual disminuye la velocidad del transporte de este fármaco. En el pulmón la velocidad del pasaje de AT a través de la membrana alveolar será mucho mayor debido a la dilución del fármaco en el torrente sanguíneo.

La liberación del fármaco a partir del complejo iónico y su transporte a través de la membrana de celulosa se debe a la disociación del complejo luego de que el medio receptor difunde hacia el compartimiento donador. El complejo tiene la capacidad de liberar el AT por intercambio iónico en un medio fisiológico [29] y, en consecuencia, el fármaco liberado pasa la membrana de manera comparable con el atenolol puro. En otras palabras, el agregado del polímero a la formulación de las partículas no afectaría adversamente la disponibilidad del fármaco en la membrana pulmonar.

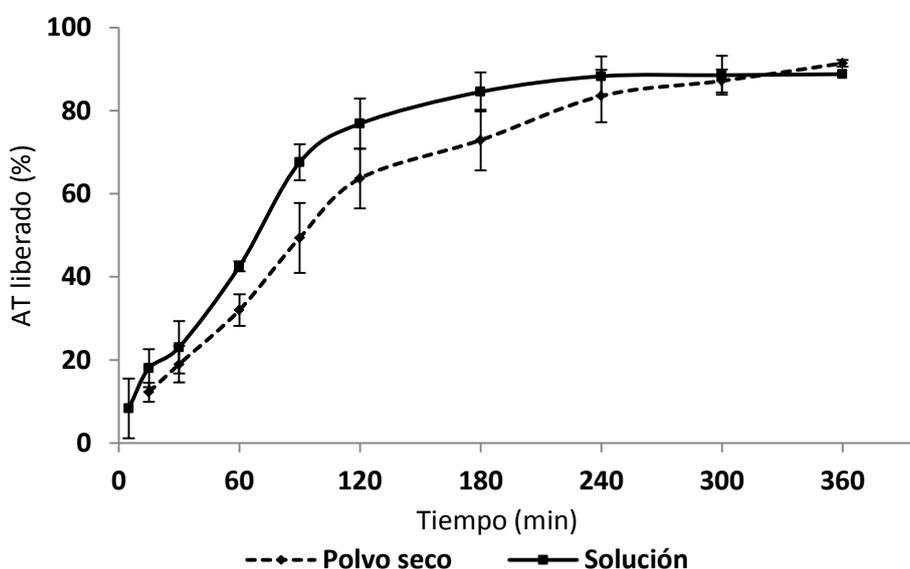


Figura 5.7. Perfil de liberación de (AA-AT)₇₅:K 2%^c partiendo de una solución o del polvo seco

5.2.3. Ensayo de citotoxicidad

La capacidad citotóxica de los materiales portando AT y sus precursores se determinó mediante el ensayo de MTT. La Figura 5.8 muestra una placa de cultivo, luego de aplicar los tratamientos y agregar el reactivo MTT. Cuanto más intensa es la coloración en los pocillos de cultivo, medida por espectrofotometría a 540 nm, mayor es la viabilidad celular.

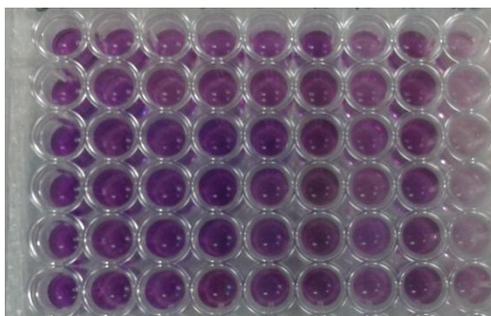


Figura 5.8. Fotografía a modo de ejemplo de una placa de cultivo luego de tratar las células con los materiales particulados y los productos puros, agregar el reactivo de MTT y disolver los cristales de formazán formados

Por su parte, las Figuras 5.9 y 5.10 muestran la viabilidad celular, expresada como % del control (células sin tratamiento, cultivadas solo con medio de cultivo, consideradas como 100 % de viabilidad o control negativo) para los sistemas (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c, AA y AT. Para las micropartículas, el eje X en la Figura 5.9 corresponde a la concentración de AA, mientras que en la Figura 5.10 corresponde a la concentración de AT.

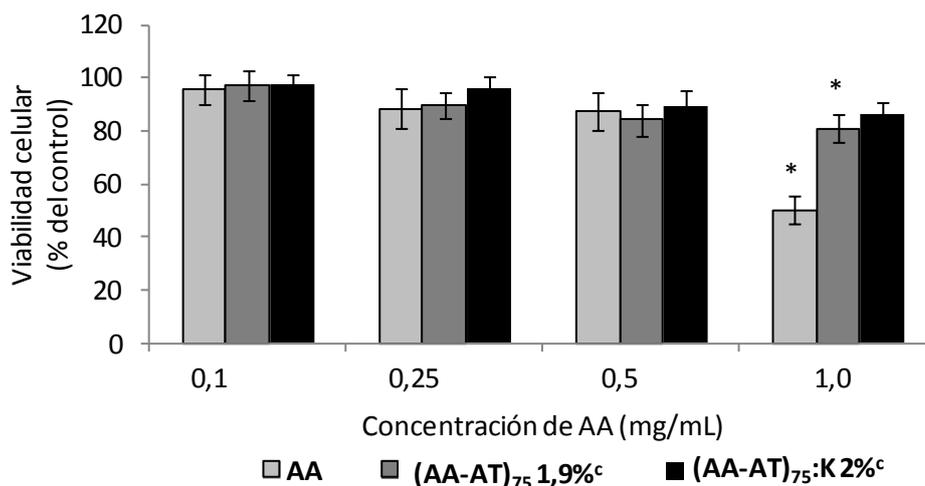


Figura 5.9. Viabilidad celular (expresada como % del control) de los materiales co-procesados y el polímero puro. (*): diferencia estadísticamente significativa

Como puede verse en la Figura 5.9, a las concentraciones de 0,1, 0,25 y 0,5 mg/mL de AA no se observó citotoxicidad celular para ninguno de los materiales ensayados. De hecho, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas para estas concentraciones (valor $p > 0,05$) respecto del control.

Sin embargo, a la concentración de 1 mg/mL, solo el tratamiento con (AA-AT)₇₅:K 2%^c no mostró diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control. Estas diferencias en la viabilidad celular pueden relacionarse, entre otros posibles factores, con los grupos ácidos libres del polielectrolito. Los compuestos ácidos inducen inflamación mediada por eosinófilos y neutrófilos y mecanismos de apoptosis [32][33]. De hecho, AA provocó un decrecimiento importante en la viabilidad celular a la concentración de 1 mg/mL. Cuando los grupos ácidos de AA se neutralizaron parcialmente con AT, la viabilidad celular aumentó considerablemente, mientras que cuando los grupos ácidos de AA se neutralizaron casi completamente, la diferencia con el control no fue estadísticamente significativa. Esta estrategia se probó para otros polielectrolitos, donde la interacción de los grupos ionizables con compuestos de carga opuesta modificó la citotoxicidad [34]. Por otra parte, la viscosidad y bioadhesión del AA puede haber causado pérdida de células durante las etapas de lavado [35].

En conclusión, las micropartículas obtenidas ajustando el pH de la formulación con hidróxido de potasio no resultaron citotóxicas en la línea celular A-549 y a las concentraciones de AA ensayadas.

La citotoxicidad de AT se ensayó a las mismas concentraciones que AA y se las comparó con los complejos iónicos. La Figura 5.10 muestra el perfil de viabilidad celular. El AT puro presenta una leve toxicidad a altas concentraciones, debido a que se trata de un compuesto básico orgánico, que no tiene la capacidad de elevar el pH a valores marcadamente alcalinos.

Es importante resaltar que la máxima concentración de AT ensayada (1 mg/mL), la cual provoca un leve descenso en la viabilidad celular, se corresponde con una dosis de AT equivalente en pulmón de 100 mg (considerando un volumen pulmonar de 100 mL). Esta dosis equivale a 5 veces el valor máximo recomendado para el tratamiento de la hipertensión por vía inhalatoria [24].

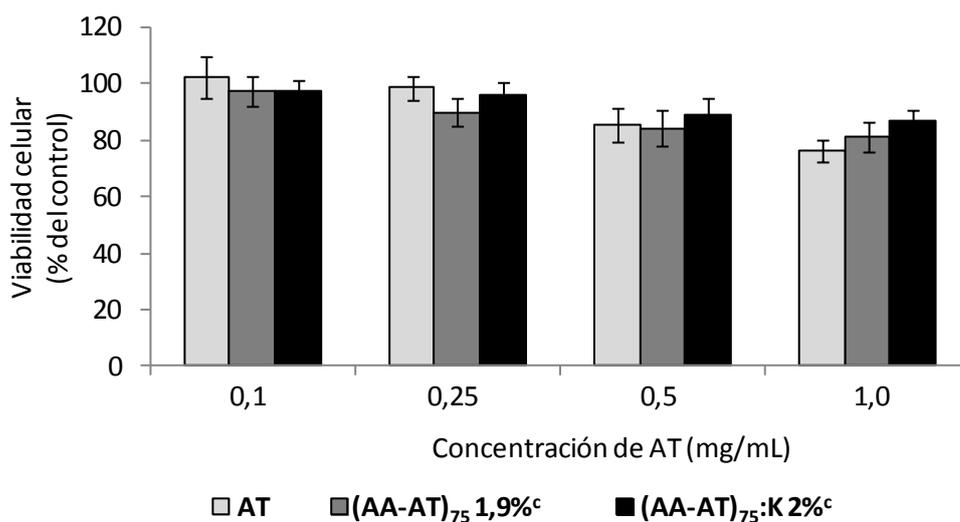


Figura 5.10. Viabilidad celular (expresada como % del control) de los materiales co-procesados y el fármaco puro

5.2.4. Ensayo de mucoadhesión

En función de los resultados presentados previamente, puede concluirse que el sistema (AA-AT)₇₅:K 2%^c demostró ser más seguro en el ensayo de citotoxicidad, presentó los mejores resultados en el test de deposición *in vitro* y fue eficaz para liberar el fármaco desde el complejo iónico, el cual se transfirió hacia el compartimiento receptor de manera similar que el AT puro. Es por estas razones que este complejo se considera el mejor de toda la serie de materiales portadores de AT preparados. Como último paso de la caracterización biofarmacéutica se estudió la mucoadhesión de este producto y se lo comparó con AT 1,6%^c. Este ensayo se realizó ya que los materiales mucoadherentes pueden prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el pulmón [36], aumentando la biodisponibilidad por disminuir el barrido de las micropartículas (*clearance* pulmonar).

La Tabla 5.7 muestra la fuerza máxima de adhesión y el trabajo necesario para despegar la probeta de las micropartículas. El ensayo realizado con mucina pura puede considerarse como una prueba control para establecer la fuerza mínima requerida para el despegue de la probeta. Las partículas co-procesadas requirieron una mayor fuerza, en consonancia con las propiedades mucoadhesivas que AA posee. La diferencia entre la fuerza de despegue de las micropartículas y AT resultó estadísticamente significativa, demostrando que el polielectrolito le confiere propiedades de mucoadherencia a la partícula del complejo, hecho positivo para aumentar el tiempo de permanencia del sistema en el pulmón. La misma tendencia mostró el trabajo de despegue, parámetro que generalmente sigue el mismo patrón de comportamiento que la fuerza y se verifica para este caso particular [37]. Por otro lado la fuerza de despegue

para AT puro es prácticamente coincidente con la observada para la prueba control, lo cual indica que AT no posee propiedades mucoadhesivas.

Tabla 5.7. Fuerza y trabajo máximo de despegue en el ensayo de mucoadhesión

Muestra	F máxima de despegue (N)	Trabajo máximo de despegue (J, x10 ⁻⁴)
AT	0,49±0,09	6,35±1,67
(AA-AT) ₇₅ :K 2% ^c	0,96±0,08 (*)	10,8±2,92(*)
Mucina	0,48±0,03	5,46±2,32

(*): diferencia estadísticamente significativa, respecto del ensayo con mucina

Por último, son necesarios estudios en animales de laboratorio para poder correlacionar estas propiedades *in vitro* con el comportamiento *in vivo* del sistema desarrollado. Este es otro aspecto a explorar en trabajos futuros.

5.3. Conclusiones

En este capítulo se estudiaron las propiedades biofarmacéuticas de los materiales portando AT seleccionados en el Capítulo 3 (aquellos que habían demostrado buenas propiedades fisicoquímicas para su administración inhalatoria, junto con buenos rendimientos en el proceso de secado).

Como pudo verse, los sistemas particulados tuvieron un adecuado comportamiento de aerosolización *in vitro*, siendo factible la administración inhalatoria de AT. Además, el complejo iónico demostró ser reversible, liberando el fármaco para que pueda ser absorbido y ejerza su acción a nivel sistémico. Las micropartículas obtenidas a partir de la alimentación con el pH ajustado a valores cercanos a la neutralidad demostraron mayor viabilidad celular. Por otra parte, la presencia del polielectrolito otorgó propiedades de mucoadherencia a las micropartículas, lo que sugiere que la formulación tendría la capacidad de aumentar su tiempo de permanencia en el pulmón.

5.4. Bibliografía

- [1] J. Doménech Berrozpe, J. Martínez Lanao, and J. M. Plá Delfina, *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II: Biofarmacia*, 1st Edition Síntesis.
- [2] B. Olsson, L. Borgström, H. Lundbäck, and M. Svensson, "Validation of a General In Vitro Approach for Prediction of Total Lung Deposition in Healthy Adults for Pharmaceutical Inhalation Products," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 26, no. 0, pp. 1–15, 2013.
- [3] C. K. Brown, H. D. Friedel, A. Barker, L. F. Buhse, S. Keitel, T. L. Cecil, J. Kraemer, J. M. Morris, C. Reppas, M. P. Stickelmeyer, C. Yomota, and V. P. Shah, "FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms," *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, no. 2, pp. 51–64, 2011.
- [4] "United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30–NF 25," *United States Pharmacopeial Conv.*, Rockville, MD, 2007.
- [5] J. P. Mitchell and M. W. Nagel, "Cascade Impactors for the Size Characterization of Aerosols from Medical Inhalers," *J. Aerosol Med.*, vol. 16, no. 4, pp. 341–377, 2003.
- [6] J. Mitchell, S. Newman, and H. Chan, "In Vitro and In Vivo Aspects of Cascade Impactor Tests and Inhaler Performance : A Review," *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, no. 4, pp. 237–248, 2007.
- [7] A. Kamiya, M. Sakagami, and P. R. Byron, "Cascade Impactor Practice for a High Dose Dry Powder Inhaler at 90 L/min: NGI Versus Modified 6-Stage and 8-Stage ACI," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 1028–1039, Jul. 2008.
- [8] V. A. Marple, B. A. Olson, K. Santhanakrishnan, J. P. Mitchell, S. C. Murray, and B. L. Hudson-Curtis, "Next Generation Pharmaceutical Impactor Part II: Archival Calibration," *J. Aerosol Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 301–324, 2003.
- [9] K. T. Ung, N. Rao, J. G. Weers, A. R. Clark, and H. K. Chan, "In Vitro Assessment of Dose Delivery Performance of Dry Powders for Inhalation," *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 48, no. 10, pp. 1099–1110, 2014.
- [10] G. Pilcer, N. Wauthoz, and K. Amighi, "Lactose characteristics and the generation of the aerosol," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 233–256, Mar. 2012.
- [11] M. Haggi, D. Traini, M. Bebawy, and P. M. Young, "Deposition, diffusion and transport mechanism of dry powder microparticulate salbutamol, at the respiratory epithelia," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 6, pp. 1717–1726, 2012.
- [12] M. Yang, H. Yamamoto, H. Kurashima, H. Takeuchi, T. Yokoyama, H. Tsujimoto, and Y. Kawashima, "Design and evaluation of inhalable chitosan-modified poly (dl-lactic-co-glycolic acid) nanocomposite particles," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 47, no. 1, pp. 235–243, 2012.
- [13] L. Gallo, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "Formulation and characterization of polysaccharide microparticles for pulmonary delivery of sodium cromoglycate," *AAPS PharmSciTech*, vol. En prensa, 2016.
- [14] C. Woertz, M. Preis, J. Breitzkreutz, and P. Kleinebudde, "Assessment of test methods

- evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, pp. 843–853, 2013.
- [15] S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix, and P. Hoet, "Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines.," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 6, no. 14, pp. 1–12, 2009.
- [16] B. Forbes and C. Ehrhardt, "Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, no. 2, pp. 193–205, 2005.
- [17] Y. B. Wang, A. B. Watts, J. I. Peters, S. Liu, A. Batra, and R. O. Williams, "In Vitro and In Vivo performance of dry powder inhalation formulations: comparison of particles prepared by thin film freezing and micronization," *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 4, pp. 981–993, 2014.
- [18] E. Cordts and H. Steckel, "Formulation considerations for dry powder inhalers," *Ther. Deliv.*, vol. 6, pp. 675–689, 2015.
- [19] S. S. Razavi Rohani, K. Abnous, and M. Tafaghodi, "Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of insulin with regard to the selection of excipients.," *Int. J. Pharm.*, vol. 465, pp. 464–478, Apr. 2014.
- [20] A. Melander, P. Stenberg, H. Liedholm, B. Scherstén, and E. Wahlin-Boll, "Food-induced reduction in bioavailability of atenolol," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 330, pp. 327–330, 1979.
- [21] J. J. Lilja, K. Raaska, and P. J. Neuvonen, "Effects of orange juice on the pharmacokinetics of atenolol.," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 61, pp. 337–340, 2005.
- [22] H. Jeon, I. J. Jang, S. Lee, K. Ohashi, T. Kotegawa, I. Ieiri, J. Y. Cho, S. H. Yoon, S. G. Shin, K. S. Yu, and K. S. Lim, "Apple juice greatly reduces systemic exposure to atenolol," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 75, no. 1, pp. 172–179, 2013.
- [23] I. Blomqvist, G. Westergren, A. Sandberg, U. E. Jonsson, and P. Lundborg, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of controlled-release metoprolol: a comparison with atenolol," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 33, pp. 19–24, 1988.
- [24] J. D. Rabinowitz and A. C. Zaffaroni, "7,048,909-B2. Delivery of Beta-blockers through an inhalation route," 2006.
- [25] M. J. Kontny and C. A. Mulski, "Gelatin capsule brittleness as a function at room temperature of relative humidity," *Int. J. Pharm.*, vol. 54, pp. 79–85, 1989.
- [26] A. Newman, S. M. Reutzel-Edens, and G. Zografi, "Characterization of the "Hygroscopic" Properties of Active Pharmaceutical Ingredients," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 3, pp. 1047–1059, 2008.
- [27] Y. Listiohadi, J. Hourigan, R. W. Sleight, and R. J. Steele, "Moisture sorption, compressibility and caking of lactose polymorphs," *Int. J. Pharm.*, vol. 359, pp. 123–134, 2008.
- [28] M. Lohrmann, M. Kappl, H.-J. Butt, N. A. Urbanetz, and B. C. Lippold, "Adhesion forces in interactive mixtures for dry powder inhalers-evaluation of a new measuring method.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 2, pp. 579–586, 2007.

- [29] M. V Ramirez Rigo, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo, "Swellable drug–polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid Characterization and delivery properties," *Int. J. Pharm.*, vol. 322, pp. 36–44, 2006.
- [30] P. F. DeCarlo, J. G. Slowik, D. R. Worsnop, P. Davidovits, and J. L. Jimenez, "Particle Morphology and Density Characterization by Combined Mobility and Aerodynamic Diameter Measurements. Part 1: Theory," *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 38, pp. 1185–1205, 2004.
- [31] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Self-assembled amorphous drug – polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 367, no. 1, pp. 518–526, 2012.
- [32] C. Clary-Meinesz, J. Mouroux, J. Cosson, P. Huitorel, and B. Blaive, "Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles," *Eur. Respir. J.*, vol. 11, no. 2, pp. 330–333, Feb. 1998.
- [33] F. Ricciardolo, B. Gaston, and J. Hunt, "Acid stress in the pathology of asthma," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 113, no. 4, pp. 610–619, 2004.
- [34] N. Nafee, M. Schneider, U. F. Schaefer, and C.-M. Lehr, "Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile.," *Int. J. Pharm.*, vol. 381, no. 2, pp. 130–139, Nov. 2009.
- [35] B. I. Florea, M. Thanou, H. E. Junginger, and G. Borchard, "Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation," *J. Control. Release*, vol. 110, no. 2, pp. 353–361, 2006.
- [36] F. Ungaro, I. D'Angelo, A. Miro, M. I. La Rotonda, and F. Quaglia, "Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: Challenges and promises," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 64, no. 9, pp. 1217–1235, 2012.
- [37] E. Hagesaether and S. A. Sande, "In vitro measurements of mucoadhesive properties of six types of pectin.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no. 4, pp. 417–425, 2007.

*Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que
no todos ignoramos las mismas cosas
Albert Einstein*

Capítulo 6.

Caracterización biofarmacéutica de los materiales portadores de indometacina

6.1. Introducción

Si bien la expansión de las tecnologías de administración inhalatoria fue rápida, los IPSs continúan teniendo un desempeño sub-óptimo en la aerosolización, pese a la dedicación que se puso en la mejora del diseño y manufactura de estos sistemas. La performance de un IPS está determinada por la combinación de las propiedades fisicoquímicas del sistema particulado, el diseño del inhalador y los mecanismos físicos que aerosolizan, deaglomeran, dispersan y depositan las partículas en el pulmón [1]. De esta manera, es necesaria la optimización completa de la formulación de polvo seco y de la geometría del dispositivo que se utiliza para su aplicación. La destreza del paciente para administrar el fármaco contenido en el IPS y su capacidad inhalatoria también condicionan el desempeño de los inhaladores [1].

La mayoría de los productos disponibles en terapéutica se basan en fármacos puros micronizados [2]. Como ya se mencionó, para mejorar formulaciones de sistemas de IPSs, en los últimos años se propuso utilizar materiales co-procesados. En particular, el uso de excipientes poliméricos en el co-procesamiento de fármacos resultó especialmente interesante para el desarrollo de formulaciones inhalables [3][4]. En efecto, ciertos polímeros permitieron obtener materiales con las siguientes propiedades específicas: a) sistemas mucoadhesivos, que aumentan el tiempo de permanencia de la formulación en el pulmón o, lo que es lo mismo, disminuyan el número de administraciones diarias [5]; b) direccionamiento de las formulaciones a sitios específicos del pulmón (por ejemplo, macrófagos o células cancerígenas) [6]; c) liberación modificada para el tratamiento de infecciones pulmonares [7]; d) aumento de la penetración de los fármacos en las células blanco (por ejemplo, aumento de la transfección e incorporación de ADN y oligonucleótidos en terapia génica) [8], entre otros. Por esta razón, el estudio de las propiedades de aerosolización (entre otras propiedades biofarmacéuticas relevantes) de nuevos sistemas es un área en creciente desarrollo para materiales co-procesados en los que existan o no interacciones entre los componentes. Si bien hay avances en el uso de polímeros para el desarrollo de productos inhalatorios con ventajas competitivas, son mucho menos explorados los sistemas donde el polímero con el fármaco forman un complejo iónico.

En particular, para un fármaco ácido y un polielectrolito básico, los únicos antecedentes reportados para la vía inhalatoria (nasal y pulmonar) son los productos portando heparina de bajo peso molecular. Como polielectrolitos se utilizaron quitosano, dendrímeros PAMAM y polietilenimina [9]–[12]. En estos estudios los materiales particulados se obtuvieron utilizando sistemas de emulsiones o doble emulsiones. Los productos se caracterizaron a nivel fisicoquímico y biofarmacéutico. Dentro de las caracterizaciones biofarmacéuticas se destacan la liberación del fármaco a partir del complejo iónico, la citotoxicidad de los materiales obtenidos, la absorción *in vivo* (a partir de soluciones conteniendo las formulaciones desarrolladas) y la actividad farmacológica. Sin embargo, en ninguno de estos reportes se estudió la aerosolización *in vitro*. Este ensayo es de fundamental importancia para conocer la factibilidad de uso de productos por vía inhalatoria. En este capítulo se evalúa la performance de la aerosolización *in vitro* de los sistemas PL-IN en un impactador de cascada, el cual constituye el primer estudio de estas características para formulaciones basadas en la interacción de un fármaco ácido y un polielectrolito básico.

Como ya se demostró para el sistema AA-AT, las propiedades a nivel molecular, particulado y a granel del sistema polielectrolito-fármaco son diferentes respecto al fármaco puro y tienen incidencia en las propiedades biofarmacéuticas de aerosolización, liberación, viabilidad celular, entre otros.

Para el sistema PL-IN, se estudian propiedades biofarmacéuticas de aquellos productos que exhibieron las mejores cualidades preliminares para la administración inhalatoria de indometacina. De todas las formulaciones, los estudios presentados en el Capítulo 4 permitieron seleccionar a las muestras (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c y (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c como los sistemas con los mejores atributos para la administración inhalatoria de indometacina. Para estos materiales es interesante conocer no solo la capacidad de los mismos de llegar a regiones profundas del pulmón para absorberse (y lograr terapias sistémicas: e.g. enfermedades inflamatorias articulares), sino también la capacidad de lograr tratamientos locales para la terapéutica de enfermedades inflamatorias del pulmón (e.g. afecciones respiratorias asociadas a la artritis reumatoide y tratamiento de la respuesta inflamatoria bronquial asmática).

Para lograr que un sistema particulado administrado por vía inhalatoria ejerza su efecto farmacológico para tratamientos locales, las partículas debieran exhibir diámetros aerodinámicos menores a 5 μm . Sin embargo para tratamientos a nivel sistémico, según el estudio desarrollado por Newman y col. [13] el cual compara la profundidad que alcanzan las

micropartículas *in vivo* (mediante gammagrafía) con los valores obtenidos en el impactador en cascada, las partículas deben tener un diámetro aerodinámico menor a 3 μm para depositarse en la membrana del alveolo (desde donde pueden absorberse a circulación sistémica). Por esta razón, se reportan parámetros relevantes del ensayo de aerosolización *in vitro* en el equipo NGI representativos para ambos tipos de administración (i.e., FPF y $\text{FR} < 3$ y $< 5 \mu\text{m}$). Además se estudia el efecto del agregado de lactosa para mejorar la dispersión y aerosolización de los sistemas.

Dado que la liberación del principio activo es relevante para la caracterización biofarmacéutica, también se ensaya la capacidad del complejo iónico de liberar el fármaco en un medio que simule condiciones fisiológicas. Esta propiedad es de especial importancia dado que indometacina es un principio activo de pobre solubilidad acuosa.

Por su parte, la viabilidad celular se ensayó en la línea A-549, como modelo representativo del epitelio alveolar. Esta línea resulta adecuada para estudiar el efecto citotóxico de materiales desarrollados para abordar tratamientos sistémicos por vía inhalatoria en los primeros estadios de formulación [14].

Por otra parte, enfermedades pulmonares como el asma se asocian con inflamación de las vías aéreas, por acción de diferentes estímulos [15]. En la respuesta inflamatoria están involucrados distintos mediadores celulares derivados de metabolitos de las enzimas ciclooxigenasas (COXs). Las COXs se activan respondiendo a la actividad de los macrófagos, células del sistema inmune implicados en los procesos inflamatorios [15][16]. La línea celular RAW 264.7 es una línea de macrófagos de origen murino utilizada en el estudio de los mecanismos bioquímicos implicados en los procesos inflamatorios pulmonares [17][18]. La activación de estas células mediante endotoxinas bacterianas (como los lipopolisacáricos y los peptidoglicanos) permite evaluar el efecto antiinflamatorio de fármacos [17][18]. De esta manera, la actividad antiinflamatoria de los productos seleccionados se ensayó en la línea celular RAW 264.7 y se la comparó con la del fármaco puro.

La Figura 6.1 resume el estudio de las propiedades biofarmacéuticas relevantes para las formulaciones de PL-IN.

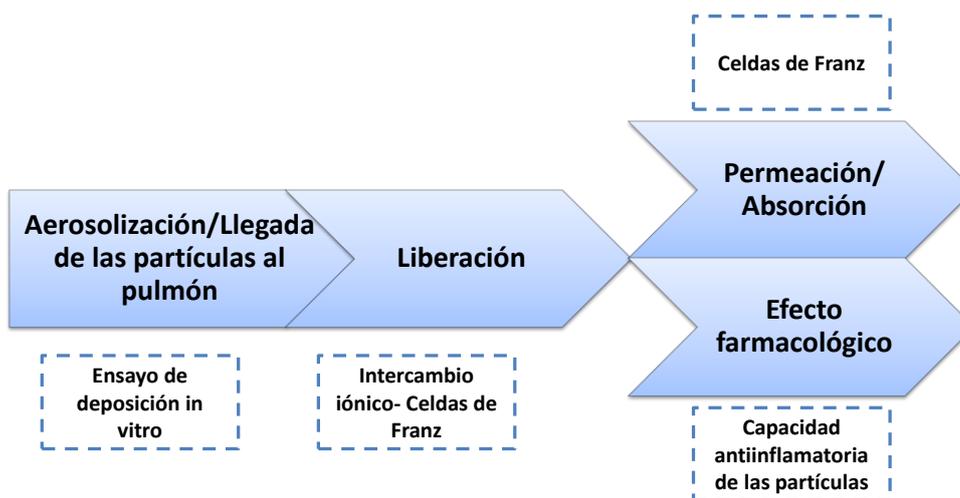


Figura 6.1. Resumen de la caracterización biofarmacéutica de los materiales PL-IN

6.2. Resultados

6.2.1. Ensayo de aerosolización *in vitro*

Los materiales (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c y (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c se evaluaron en el impactador en cascada con el objetivo de estudiar la aerosolización *in vitro*. Siguiendo las especificaciones codificadas en la USP, el ensayo se realizó a una caída de presión (ΔP) de 4 KPa [19]. La Tabla 6.1 presenta las propiedades de aerosolización calculadas a partir de la masa recolectada en cada etapa del impactador.

Tabla 6.1. Parámetros obtenidos del impactador en cascada para las micropartículas portando IN

Muestra	(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c		(PL-IN) ₅₀ :DXCl 1,7% ^c	
	ΔP , KPa			
FE (%)	4	85,76±2,15	4	84,72±2,95
FPF < 5 μm (%)	4	20,10±1,78(*)	4	22,62±3,23(*)
FR < 5 μm (%)	4	17,22±1,17(*)	4	19,18±2,90(*)
FPF < 3 μm (%)	4	11,87±2,13(*)	4	14,19±3,56(*)
FR < 3 μm (%)	4	10,19±1,92(*)	4	11,96±2,77(*)
MMDA (μm)	4	4,19±0,24	4	4,13±0,15
GSD	4	2,36±0,12	4	2,43±0,08

(*): diferencia estadísticamente significativa respecto del ensayo realizado a 4KPa de caída de presión

Como puede verse, los sistemas presentaron una alta fracción emitida, siendo en ambos casos el valor superior al 90 %. Esto indica que los sistemas particulados portadores de IN poseen baja tendencia a ser retenidos en la cápsula y el inhalador, etapas previas al ingreso de los

polvos en impactador. Estos valores están en buen acuerdo con valores de FE % reportados en la literatura científica como adecuados [20].

La fracción fina de partículas y fracción respirable menores a $3\ \mu\text{m}$ de ambos sistemas (Tabla 6.1) fue adecuada para la administración sistémica de IN por vía inhalatoria y se encuentra en buen acuerdo con los valores reportados para sistemas de polvo seco disponibles en terapéutica (variando estos últimos entre el 10 y el 35 %) [21]. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0.05$) en la FPF $< 3\ \mu\text{m}$ y la FR $< 3\ \mu\text{m}$ entre los dos sistemas estudiados, indicando que la variación del pH en la alimentación líquida no afectó los resultados del ensayo de aerosolización.

La Figura 6.2 muestra la deposición de las micropartículas en las etapas 3 y 4 del impactador NGI.



Figura 6.2. Micropartículas PL-IN depositadas en las etapas 3 y 4 del equipo NGI (que, para una caída de presión de 4 KPa, presentan diámetros de corte de $2,85$ y $1,68\ \mu\text{m}$, respectivamente)

La Tabla 6.1 también muestra los valores de FPF y FR menores a $5\ \mu\text{m}$. Como puede verse, las fracciones respirables y finas de partículas se ubican alrededor del 30 %, siendo valores adecuados para tratamientos locales. Aunque la vía inhalatoria se ha posicionado como una de las alternativas no invasivas de mayor interés y se ha dedicado un importante esfuerzo al diseño de IPSs, las formulaciones comerciales muestran, en general, bajas FPFs ubicándose entre el 12 y el 40 % de la dosis cargada en la cápsula. En una revisión realizada por Islam y Cleary, el 85 % de los IPSs comercialmente disponibles poseen valores de FPF $< 5\ \mu\text{m}$ inferiores a los observados para los materiales portando indometacina desarrollados en esta Tesis [1]. Cabe destacar la dificultad de comparar el desempeño en el ensayo de aerosolización de

diferentes IPSs, ya que cada uno cuenta con un diseño, resistencia y mecanismo de deaglomeración del fármaco que le es propio [1]. Todavía no se cuenta con herramientas que permitan comprender bajo qué condiciones es posible contrastar el desempeño de las formulaciones de IPSs que contienen diferentes principios activos y son administrados haciendo uso de distintos dispositivos de polvo seco [1].

Para 4KPa, los sistemas (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c y (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c presentaron valores de MMDA adecuados para la administración inhalatoria de las micropartículas (Tabla 6.1). Además las distribuciones obtenidas pueden considerarse estrechas, ya que los valores de GSD resultaron inferiores a 3 [22].

Si bien el ensayo codificado en la USP indica que el mismo debe realizarse a una caída de presión de 4 KPa, la prueba de aerosolización también se realizó a 2 KPa con el objetivo de estudiar la performance de las formulaciones para pacientes con capacidad inspiratoria disminuida. Como puede observarse en la Tabla 6.1, los valores de FE, FPF y FR % resultaron menores en todos los casos respecto del ensayo realizado a 4 KPa de caída de presión, siendo la diferencia encontrada estadísticamente significativa (valor $p < 0,05$). Los valores obtenidos bajo esta nueva condición de ensayo son aun adecuados para tratamientos locales en el pulmón y, en menor medida, sistémicos. La comparación de los materiales entre sí a esta caída de presión indicó que los mismos son similares, no detectándose diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$). Esto demuestra que las formulaciones tienen comportamientos equivalentes bajos las mismas condiciones, sin ser afectados por el agregado de HCl en la composición y que el desempeño farmacéutico estaría condicionado por la capacidad inspiratoria de los pacientes.

Al igual que con los sistemas portadores de atenolol (estudiados en el Capítulo 5), las micropartículas cargando IN se mezclaron con lactosa en proporción 1:3. Ya se discutió que el principal objetivo del agregado de los excipientes *carrier* radica en la reducción de las interacciones cohesivas fuertes entre las micropartículas, que llevan a la formación de agregados, y en el aumento de la fluidez de los polvos [1][23]. En la Tabla 6.2 se presentan las propiedades de aerosolización de las mezclas de micropartículas y lactosa para los ensayos realizados a 4 KPa. Como puede verse, la FE % no se vio afectada positivamente por el agregado de lactosa (comparando con los resultados sin lactosa, Tabla 6.1). Por otra parte, las FPF y FR (tanto menores a 5 como a 3 μm) disminuyeron aproximadamente en un 50 % respecto a los valores obtenidos sin uso del *carrier* (ver Tabla 6.1). Esto puede deberse al desarrollo de interacciones fuertes entre las micropartículas y la lactosa [24][25].

Tabla 6.2. Parámetros obtenidos del impactador en cascada para las mezclas micropartículas:lactosa (1:3) a 4KPa de caída de presión

Parámetros	Formulación	
	(PL-IN) ₅₀ :DX 1,6% ^c	(PL-IN) ₅₀ :DXCI 1,7% ^c
FE (%)	92,50±2,53	93,79±0,47
FPF < 5 μm (%)	15,47±1,08	13,40±1,32
FR < 5 μm (%)	14,30±1,29	12,55±1,22
FPF < 3 μm (%)	10,74±0,45	9,23±1,03
FR < 3 μm (%)	9,92±0,50	8,64±0,95
MMDA (μm)	4,65±1,60	5,16±0,47
GSD	2,96±0,25	2,93±0,22

La Figura 6.3 compara, para la muestra (PL-IN)₅₀:DXCI 1,7%^c, las fracciones de IN obtenidas en las distintas etapas del NGI. Se observa que cuando se ensaya el sistema micropartículas:lactosa se colecta un mayor porcentaje de fármaco en las etapas (PI+PS) respecto al valor medido para sistemas libres de *carrier*. Este fenómeno fue previamente reportado en la literatura científica para micropartículas obtenidas por micronización de principios activos utilizados en enfermedades pulmonares como asma y EPOC [24][25]. Thi y col. observaron la misma tendencia para partículas de terbutalina producidas mediante la técnica de secado por atomización o bien por micronizado [26].

Los resultados obtenidos indican, que al menos en la proporción usada, el uso del excipiente no mejora la aerosolización *in vitro*. Se requieren estudios complementarios para comprender las interacciones desarrolladas entre las micropartículas y el *carrier*.

Como se vio en este estudio, los sistemas particulados demostraron propiedades de aerosolización adecuadas para la administración inhalatoria de IN, tanto para tratamientos locales como sistémicos. Además, la performance de la aerosolización de las muestras se vio negativamente influenciada tanto por una menor caída de presión como por el agregado de lactosa como *carrier*. Para mejorar el desempeño de las formulaciones para pacientes con capacidad inspiratoria disminuida, podría utilizarse un dispositivo de polvo seco de baja resistencia (que logre una adecuada deaglomeración y aerosolización al máximo caudal de inspiración que el paciente puede alcanzar) en lugar del usado en la presente Tesis (de alta resistencia) [27][28].

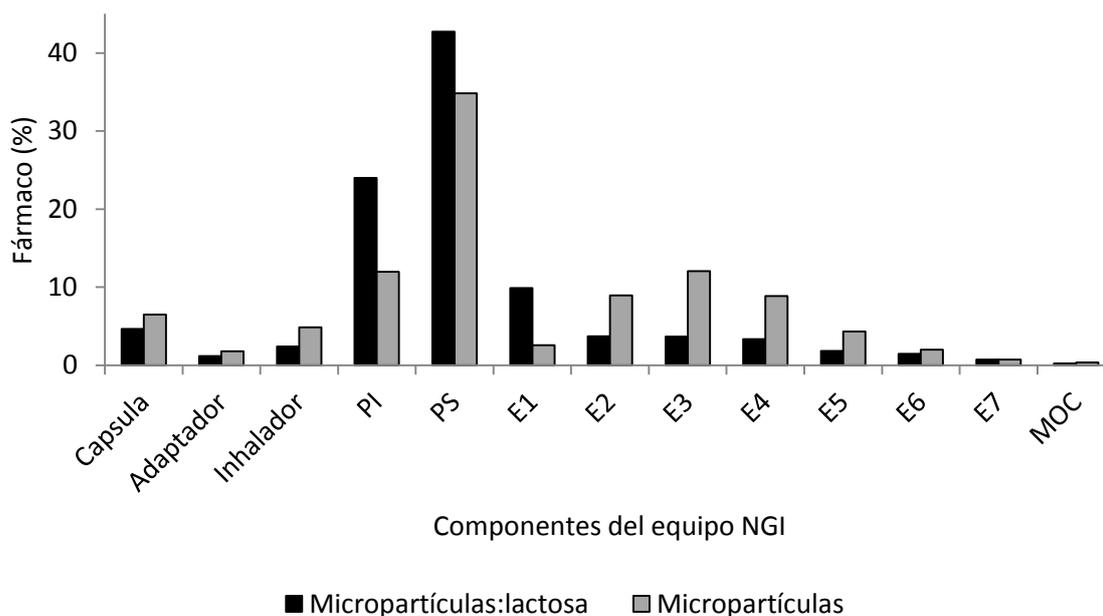


Figura 6.3. Retención de IN en las diferentes etapas del equipo de impacto en cascada NGI para la formulación (PL-IN)₅₀:DXCI 1,7%^c con y sin el agregado de lactosa

La dosis de IN por vía oral varía entre 25 y 200 mg diarios de IN para tratamientos de enfermedades articulares. Por su parte Onischuk y col. [29] demostraron, para la vía inhalatoria, que nanopartículas de IN obtenidas por la técnica de vaporización-condensación a dosis seis órdenes de magnitud menores que por vía oral permitían eficientemente el tratamiento del edema articular en ratones. Considerando que la fracción respirable menor a 3 μm (para las muestras sin lactosa) resultó de aproximadamente 17 %, que la composición de las micropartículas fue de alrededor de $0,2\text{g}_{\text{IN}}/\text{g}_{\text{polvo}}$, y que se colocaron 15 mg de micropartículas en cada cápsula, *ca.* 0,5 mg de IN llegarían a la membrana alveolar por inhalación. Considerando una dosis de 200 mg diarios y el criterio de Onischuk y col, 0,5 mg de IN serían al menos tres órdenes de magnitud mayor que la dosis terapéutica sugerida [29]. Aun cuando se utilizara lactosa para mejorar las propiedades de flujo del sistema particulado, las formulaciones desarrolladas podrían proveer en un solo disparo la dosis requerida para alcanzar una farmacoterapia sistémica adecuada.

La dosis para tratamientos pulmonares locales de diferentes fármacos puede considerarse de 10 a 20 veces menor cuando se administra por vía inhalable respecto de su administración por vía oral [30][31]. Esta regla del pulgar fue propuesta por Labiris y col. También se reportó que una dosis de IN de 25 mg nebulizada fue efectiva para tratar el estímulo bronquial inespecífico en pacientes asmáticos [32]. Considerando que aproximadamente el 10 % de la dosis de

fármaco de un sistema nebulizado tiene la capacidad de llegar a regiones profundas del pulmón [30], 2,5 mg de IN serían suficientes para lograr la terapéutica a nivel local. Realizando las mismas consideraciones que en el párrafo anterior respecto de la composición de las micropartículas y del llenado de la cápsula, pero teniendo en cuenta que fracción respirable (sin el agregado de lactosa) menor a 5 μm resultó de aproximadamente 28 %, en cada inhalación llegarían 0,75 mg de IN a regiones profundas del pulmón. Finalmente, se menciona que el sistema se propone como libre de *carrier*, por lo que una cantidad mayor a 15 mg de micropartículas pueden cargarse en cada cápsula. Así, respetando la dosis local de 2,5 mg se requerirían 2 administraciones diarias para alcanzarla. Si bien son necesarios ensayos *in vivo* para establecer las dosis adecuadas de los tratamientos locales por vía inhalatoria, las micropartículas desarrolladas presentan potencialidad para el tratamiento de inflamaciones pulmonares. Claramente como trabajo futuro se identifica el estudio de las formulaciones en modelos animales.

6.2.2. Comparación de los diámetros aerodinámicos estimados con las MMDAs

La Figura 6.4 muestra los diámetros aerodinámicos medios estimados (ver Sección 4.2.6) y los obtenidos mediante el ensayo de impacto en cascada para las muestras conteniendo IN (Tabla 6.1).

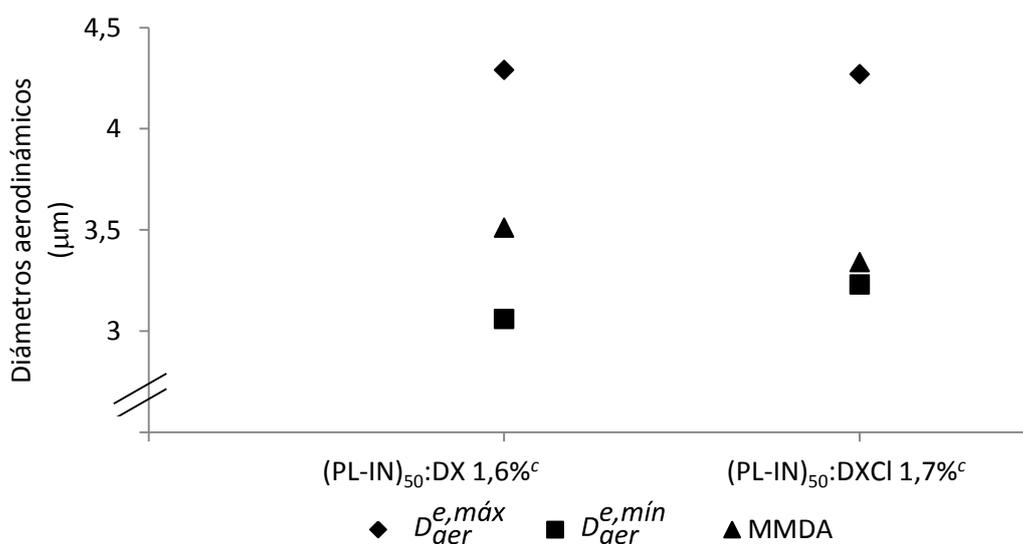


Figura 6.4. Comparación entre los $D_{aer}^{e,máx}$ y $D_{aer}^{e,mín}$ con los valores de MMDA

Como puede verse y al igual que para los sistemas conteniendo AT, los $D_{aer}^{e,max}$ sobreestiman a los valores de MMDA en un 22-28 % mientras que los $D_{aer}^{e,min}$ subestiman a las MMDAs en, como máximo, un 13 %. No obstante, son tamaños fáciles de calcular y permiten una rápida selección de materiales con tamaños adecuados para tratamientos inhalatorios. Se verifica, además, que el criterio de preselección de formulaciones basado en la estimación de $D_{aer}^{e,min}$ y $D_{aer}^{e,max}$ es de utilidad para sistemas conteniendo compuestos de diferentes propiedades fisicoquímicas.

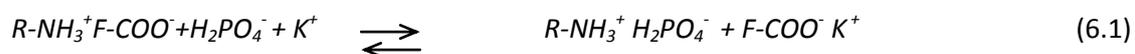
6.2.3. Ensayo de liberación de IN

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de disociación del complejo iónico conteniendo IN. Al igual que para AT, los perfiles de liberación se evaluaron partiendo de una solución (conteniendo el fármaco puro o las micropartículas portadoras del principio activo) o de sistemas particulados, los cuales se colocaron en el compartimiento donador de celdas de Franz (ver Sección 2.2.10).

Para el ensayo partiendo de soluciones, se seleccionaron como medios: solución fosfato tamponada pH 7,4 (para simular las condiciones fisiológicas en el pulmón) y agua, a fines comparativos, ya que es el medio en el cual se preparó la alimentación líquida para el proceso de secado. La Figura 6.5 muestra el perfil de liberación desde el sistema (PL-IN)₅₀:DX 1,6% en solución fosfato tamponada pH 7,4 y agua, comparados con el pasaje de IN pura en solución fosfato tamponada hacia el compartimiento donador.

El complejo iónico puede reaccionar de diferentes maneras, de acuerdo a la naturaleza del medio de liberación. Usando un medio acuoso, la cantidad de IN, liberada a partir del complejo iónico, que pasa desde el compartimiento donador al receptor es baja. De hecho, luego de seis horas solo el 24 % de la IN contenida inicialmente en las micropartículas pasó a través de la membrana de celulosa. El bajo porcentaje liberado sugiere una constante de equilibrio de disociación del par iónico baja (ver Ecuación 4.3). Por lo tanto, en una alta proporción, el fármaco se encuentra como complejo iónico que no puede atravesar la membrana de celulosa.

Cuando se usa solución fosfato tamponada como medio de liberación, el sistema sigue la reacción descrita en la Ecuación 6.1.



donde PO_4^- y K^+ representan los iones en solución [33].

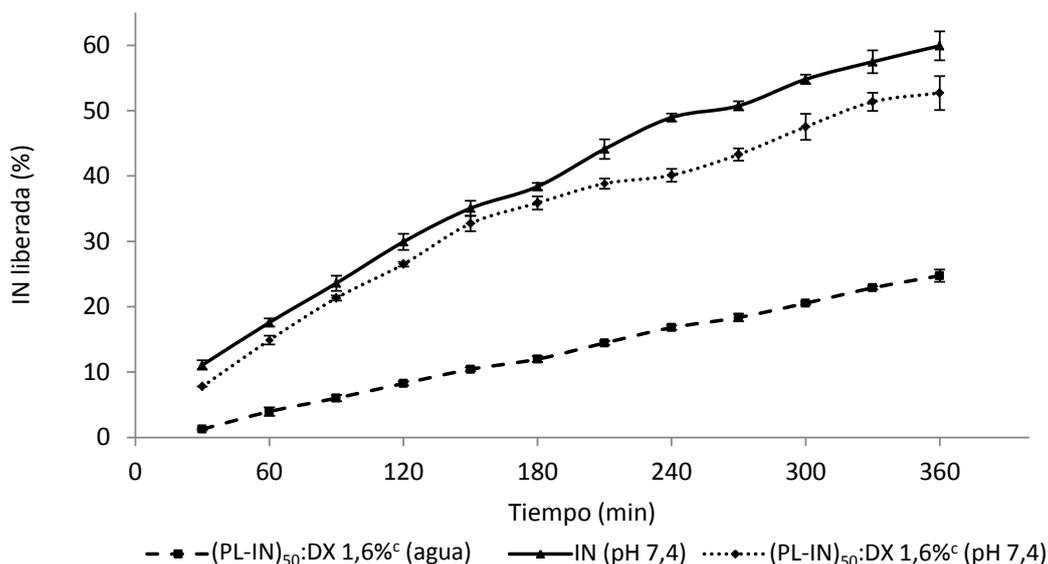


Figura 6.5. Liberación de IN a partir de soluciones de los materiales en solución fosfato tamponada pH 7,4 y en agua destilada. Los perfiles a pH 7,4 para IN y el producto sólidos resultaron similares

Como puede verse en la Figura 6.5, cuando el ensayo se realiza en solución fosfato tamponada pH 7,4, el transporte de IN a través de la membrana de celulosa es mayor que el observado en agua. Este resultado sugiere que el equilibrio se desplaza hacia la disociación del complejo por intercambio de iones (Ecuación 6.1). Luego de seis horas, el 53 % de la IN contenida inicialmente en el complejo pasó a través de la membrana de celulosa. Este valor es próximo al porcentaje de IN pura que atravesó la membrana utilizando el mismo medio, siendo los perfiles similares ($f_2=63$). Como el pulmón es el único órgano a través del cual pasa todo el gasto cardíaco, es de esperarse que la velocidad de absorción de IN sea mucho mayor que la observada en este ensayo debido a la dilución en el torrente sanguíneo.

Por otra parte, se estudió el pasaje de IN a través de la membrana de celulosa cuando en el compartimiento donador se colocaron los complejos o la IN pura (D_{43} : 5,48 μ m) en polvo. El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de las micropartículas de mojarse y liberar la indometacina mediante intercambio iónico, la cual tendría la capacidad de atravesar la membrana de celulosa y cuantificarse en el compartimiento receptor. El medio del ensayo fue solución fosfato tamponada pH 7,4. Como puede verse en la Figura 6.6, el fármaco contenido en los materiales co-procesados atravesó la membrana en mucha mayor proporción que el

principio activo puro. Esto indica que en un medio fisiológico, el complejo sólido toma humedad y libera el fármaco por intercambio de iones. Esta es la situación que se espera ocurra en regiones profundas del pulmón, lugar donde deben llegar las micropartículas, disolverse en el fluido pulmonar y liberar el fármaco para tratar la afección pulmonar local o absorberse para tratamiento sistémico. La baja solubilidad de IN pura explicaría la menor tendencia de este ingrediente farmacéutico activo a disolverse en el medio y pasar al compartimiento receptor. Por su parte, el factor f_2 para la comparación entre el material $(PL-IN)_{50}:DX 1,6\%^c$ colocando en el compartimiento donador una solución de las micropartículas o las micropartículas sólidas es de 70. Esto indica que el comportamiento de este complejo iónico es similar en cuanto a la capacidad de atravesar la membrana de celulosa aun cuando se agrega el paso de mojado de las micropartículas.

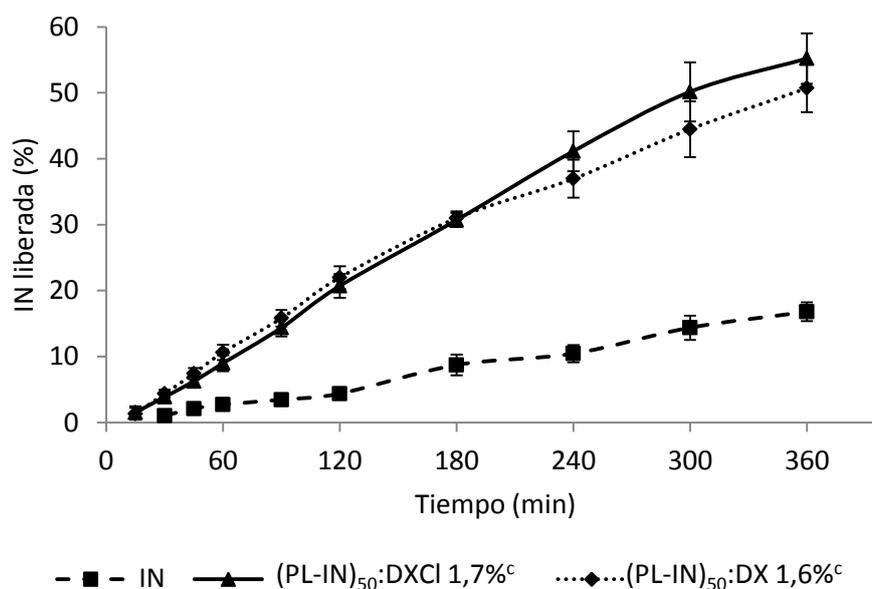


Figura 6.6. Liberación de IN a partir de las micropartículas de los productos secados por atomización y de fármaco puro en solución fosfato tamponada pH 7,4. Los perfiles de los materiales particulados resultaron similares

Finalmente, la comparación de los perfiles de $(PL-IN)_{50}:DX 1,6\%^c$ y $(PL-IN)_{50}:DXCl 1,7\%^c$ a través del factor f_2 indicó que ambos materiales tienen similar tendencia a liberar el fármaco en contacto con solución fosfato tamponada pH 7,4 ($f_2=76$), por lo que el ajuste del pH no afecta la reversibilidad de la interacción iónica.

Estos ensayos en celdas de Franz permitieron corroborar que en agua existe una alta proporción de pares iónicos. Sin embargo, en solución fosfato tamponada pH 7,4, la cual

simula el entorno fisiológico del pulmón, el equilibrio se desplaza hacia la liberación del fármaco por intercambio iónico. Cuando en el compartimiento donador se coloca el sistema particulado, los complejos iónicos muestran una importante tendencia a liberar el fármaco, el cual pasa al compartimiento receptor en mucha mayor cantidad que IN pura.

6.2.4. Ensayo de viabilidad celular

La capacidad citotóxica de los materiales portando IN y de PL pura se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. La Figura 6.7 muestra una placa de cultivo, luego de aplicar los tratamientos y agregar el reactivo MTT. Cuanto más intensa es la coloración en los pocillos de cultivo, medida por espectrofotometría a 540 nm, mayor es la viabilidad celular.

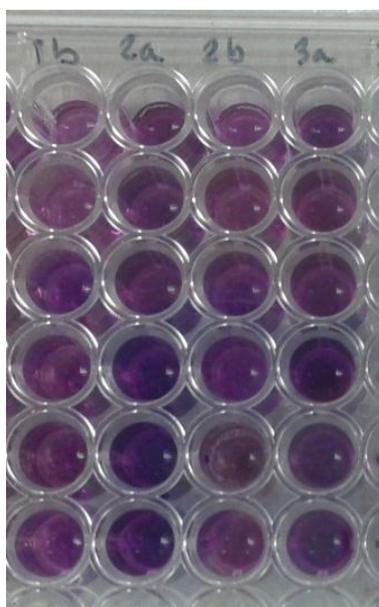


Figura 6.7. Fotografía a modo de ejemplo de una placa de cultivo luego de tratar las células A-549 con los materiales seleccionados, agregar el reactivo de MTT y disolver los cristales de formazán formados

Para evaluar el efecto citotóxico de los materiales conteniendo IN para tratamientos sistémicos por administración inhalatoria se utilizó la línea celular A-549, representativa del epitelio alveolar [14]. La viabilidad celular se evaluó luego de incubar durante 24 horas las células con las micropartículas, disueltas en medio de cultivo en cantidad suficiente como para proveer una concentración de IN de 0,075 mg/mL. Esta concentración para un volumen pulmonar de 100 mL equivaldría a una dosis de 7,5 mg, un orden de magnitud superior a la que llegaría a regiones profundas del pulmón (0,75 mg de IN contenida en las micropartículas y cargada en las cápsulas mostraron una fracción respirable menor a 5 μ m). Como se mencionó

en la Sección 6.2.1, esta dosis está muy por encima (varios órdenes de magnitud) que la recomendada como terapéutica para tratamientos sistémicos por vía inhalatoria [29].

La Figura 6.8 presenta la viabilidad celular del cultivo A-549, expresada como porcentaje de la absorbancia del control. Como puede verse, las células tratadas con las micropartículas (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c y (PL-IN)₅₀:DXCI 1,7%^c mostraron viabilidad de aproximadamente 90 % respecto de control, siendo la diferencia para ambos productos estadísticamente no significativa respecto del mismo (valor $p > 0,05$).

Como se dijo anteriormente, se utilizó una concentración de IN al menos cuatro órdenes de magnitud superior a la dosis que demostró efecto antiinflamatorio sistémico, por lo que el tratamiento sistémico por vía inhalatoria con las micropartículas conteniendo IN se espera que no afecte la viabilidad celular. Si bien estos resultados son auspiciosos, son necesarios estudios de citotoxicidad en líneas celulares representativas de tratamientos locales, además de ensayos complementarios de toxicidad (e.g., toxicidad aguda y crónica).

Adicionalmente se ensayó PL:DX, que con fines comparativos se usó en una cantidad equivalente a que la proveyeron las soluciones conteniendo las micropartículas evaluadas. La viabilidad celular resultó ser similar para el polímero y las micropartículas conteniendo IN. En efecto, la diferencia entre la viabilidad celular del control y de PL:DX no fue estadísticamente significativa (valor $p > 0,05$).

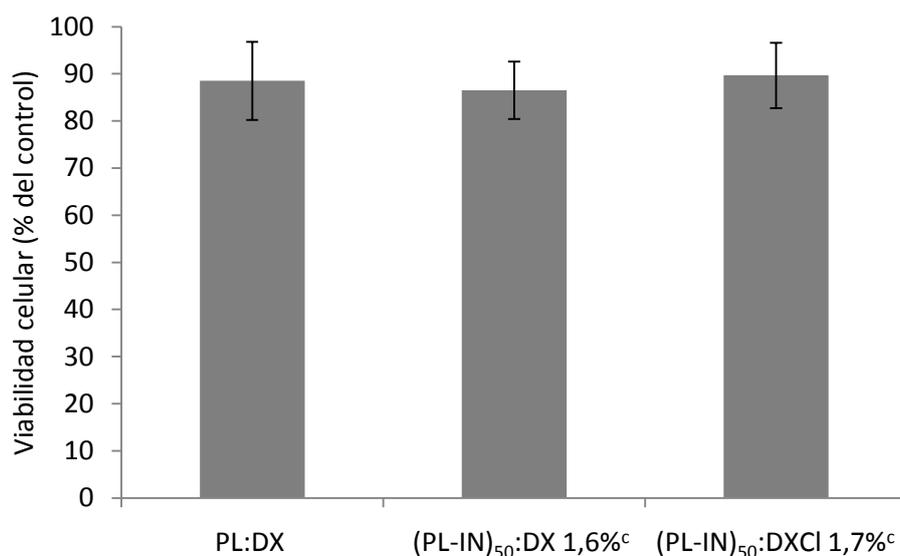


Figura 6.8. Ensayo de toxicidad celular en células A-549 para PL:DX y las micropartículas conteniendo IN

6.2.5. Efecto antiinflamatorio de IN contenida en las micropartículas

Anteriormente se mencionó que la administración inhalatoria de IN permitiría, además de la terapéutica de enfermedades articulares sistémicas, el tratamiento de enfermedades inflamatorias localizadas en el pulmón [32]. Por ello, es relevante estudiar si el incorporar a IN en un material polimérico podría interferir en la actividad farmacológica del principio activo.

Se sabe que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ejercen su efecto farmacológico por inhibición de la ciclooxigenasa (COX), enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. La ciclooxigenasa posee dos isoformas: la ciclooxigenasa 1 (COX-1), considerada constitutiva, y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducible en tejidos inflamados y cuya activación genera mediadores de la inflamación y el dolor [16]. Las prostaglandinas intervienen en la respuesta inflamatoria provocando vasodilatación, aumentando la permeabilidad de los tejidos, permitiendo el paso de los leucocitos y estimulando las terminaciones nerviosas del dolor [34].

Reportes previos demostraron que el tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) aumentaba la expresión de COX-2 en las células RAW 264.7 [18]. Por otra parte, se determinó que indometacina en una concentración 10 μ M reducía la expresión de COX-2 inducida por peptidoglicano en estos macrófagos [35]. Con el objetivo de estudiar la efectividad de las micropartículas de (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c para reducir la expresión de COX-2 en un modelo de inflamación *in vitro*, la línea celular de macrófagos RAW 264.7 se pre-incubó con IN, con las micropartículas conteniendo el fármaco y con PL:DX. La Figura 6.9 muestra la expresión de COX-2 evaluada mediante el *Western Blot*, donde los números en la parte superior derecha indican los pesos moleculares. El gráfico de barras muestra los valores de densitometría de la relación COX-2/ α -tubulina, expresados en unidades arbitrarias. Aquellas barras identificadas con letras diferentes (a-d) presentan diferencias estadísticamente significativas (valores $p < 0,05$).

Puede verse que la exposición al LPS durante 24 horas aumenta la expresión de COX-2 un 350 % respecto de la condición control. En células pre-incubadas con las micropartículas (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c, la expresión de la COX-2 inducida por el LPS se redujo un 30 % respecto del tratamiento con esta endotoxina. Adicionalmente, la pre-incubación con las micropartículas poliméricas redujo la expresión de COX-2 inducida por el LPS en la misma medida que la observada en las células pre-tratadas con IN pura. Ni la pre-incubación con PL:DX ni con IN afectó la expresión de COX-2 en condiciones control. Estos resultados

demuestran que las micropartículas desarrolladas tienen la misma capacidad de reducir la expresión de COX-2 que la IN pura en un modelo inflamatorio *in vitro* en macrófagos. De esta manera, se han encontrado evidencias de que la presencia PL:DX no altera el efecto de IN en un modelo de inflamación celular. Este resultado está en acuerdo con que el fármaco se disocia del polímero portador en medios fisiológicos simulados (Sección 6.2.3) y, en consecuencia, se encuentra disponible para ejercer su acción local.

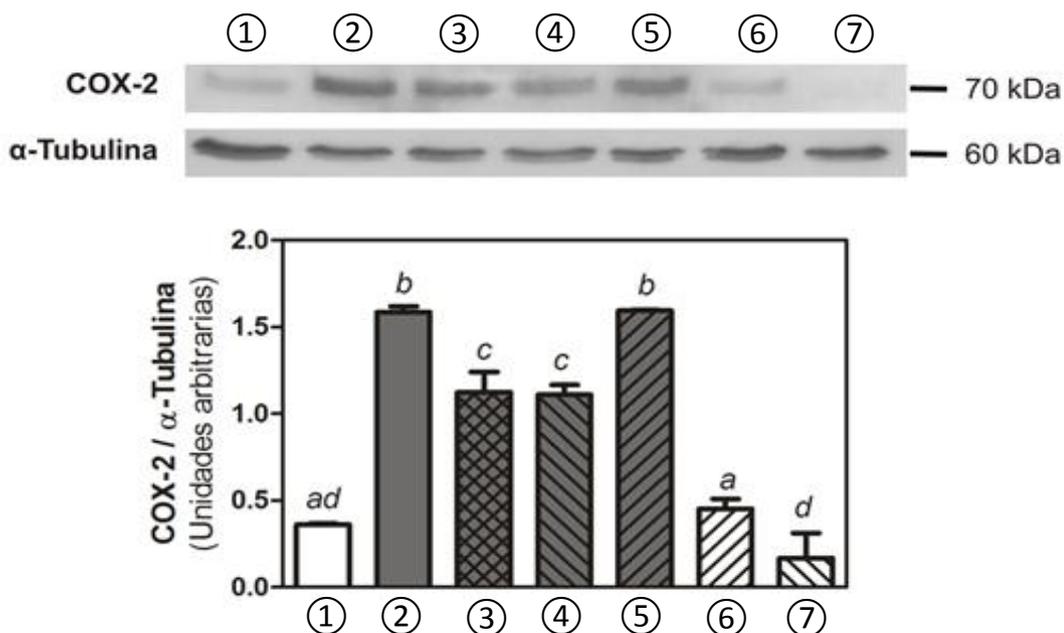


Figura 6.10. Efecto antiinflamatorio del complejo iónico $(PL-IN)_{50}:DXCI$ 1,7%^c y de los materiales precursores. ①: control; ②: LPS; ③: LPS: $(PL-IN)_{50}:DXCI$ 1,7%^c, ④: PLS:IN; ⑤: PLS:PL:DX; ⑥: control:PL:DX; ⑦: control:IN. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas

6.3. Conclusiones

En este capítulo se estudiaron las propiedades biofarmacéuticas de los sistemas portando IN. Las micropartículas demostraron poseer buenas propiedades de aerosolización, con fracciones respirables adecuadas tanto para tratamientos locales como para tratamientos sistémicos. El desempeño de las formulaciones fue dependiente de la caída de presión a la cual se realizaron los ensayos. Por otra parte, el agregado de lactosa como excipiente *carrier* empeoró las propiedades de aerosolización de las micropartículas. Por esta razón los sistemas desarrollados que presentaron las mejores propiedades para su administración inhalatoria se proponen como formulaciones libres de *carrier*.

Los complejos iónicos mostraron ser reversibles en ensayos en celdas de Franz. Los mismos liberaron el fármaco de manera similar al principio activo puro cuando se colocaron soluciones (usando un medio adecuado para simular condiciones fisiológicas) en el compartimiento donador. Cuando se partió de los sistemas particulados y se usó el mismo medio arriba mencionado, se liberó IN y atravesó la membrana de celulosa en mayor proporción que el ingrediente farmacéutico activo puro.

Por otra parte, las micropartículas no modificaron significativamente la viabilidad de cultivos celulares representativos del epitelio alveolar a una dosis marcadamente superior que la reportada para tratamientos sistémicos por vía inhalatoria. Finalmente, los sistemas conteniendo IN tuvieron la misma capacidad de inhibir la producción de COX-2 estimulada por lipopolisacáridos en células RAW 264.7 que el fármaco puro. Estos resultados indican que la interacción iónica no afectó el efecto terapéutico del fármaco.

6.4. Bibliografía

- [1] N. Islam and M. J. Cleary, "Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery: a review for multidisciplinary researchers.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 34, no. 4, pp. 409–427, 2012.
- [2] G. Pilcer, V. De Bueger, K. Traina, H. Traore, T. Sebti, F. Vanderbist, and K. Amighi, "Carrier-free combination for dry powder inhalation of antibiotics in the treatment of lung infections in cystic fibrosis.," *Int. J. Pharm.*, vol. 451, pp. 112–120, 2013.
- [3] K. Bowey and R. J. Neufeld, "Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying," *BioDrugs*, vol. 24, no. 6, pp. 359–377, 2010.
- [4] M. Yang, H. Yamamoto, H. Kurashima, H. Takeuchi, T. Yokoyama, H. Tsujimoto, and Y. Kawashima, "Design and evaluation of inhalable chitosan-modified poly (dl-lactic-co-glycolic acid) nanocomposite particles," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 47, no. 1, pp. 235–243, 2012.
- [5] L. Gallo, V. Bucalá, and M. V. Ramírez-Rigo, "Formulation and characterization of polysaccharide microparticles for pulmonary delivery of sodium cromoglycate," *AAPS PharmSciTech*, En prensa, 2016.
- [6] F. Martinelli, A. G. Balducci, A. Kumar, F. Sonvico, B. Forbes, R. Bettini, and F. Buttini, "Engineered sodium hyaluronate respirable dry powders for pulmonary drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 517, pp. 286–295, 2016.
- [7] P. Rivera, M. Martinez-Oharriz, M. Rubio, J. Irache, and S. Espuelas, "Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying," *J. Microencapsul.*, vol. 21, no. 2, pp. 203–211, 2004.
- [8] C. Colonna, B. Conti, I. Genta, and O. H. Alpar, "Non-viral dried powders for respiratory gene delivery prepared by cationic and chitosan loaded liposomes.," *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 1, pp. 108–118, 2008.
- [9] T. Yang, D. Nyiawung, A. Silber, J. Hao, L. Lai, and S. Bai, "Comparative studies on chitosan and polylactic- co -glycolic acid incorporated nanoparticles of low molecular weight heparin," *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 4, pp. 1309–1318, 2012.
- [10] S. Bai, C. Thomas, and F. Ahsan, "Dendrimers as a carrier for pulmonary delivery of Enoxaparin , a low-molecular weight heparin," *J. Pharmaceutical Sci.*, vol. 96, no. 8, pp. 2090–2106, 2007.
- [11] S. Bai, V. Gupta, and F. Ahsan, "Cationic liposomes as carriers for aerosolized formulations of an anionic drug: Safety and efficacy study," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 38, pp. 165–171, 2009.
- [12] T. Yang, A. Hussain, S. Bai, I. A. Khalil, H. Harashima, and F. Ahsan, "Positively charged polyethylenimines enhance nasal absorption of the negatively charged drug, Low Molecular Weight Heparin," *J Control Release*, vol. 115, no. 3, pp. 289–297, 2006.
- [13] S. P. Newman and H. K. Chan, "In Vitro/In Vivo Comparisons in Pulmonary Drug Delivery," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 21, no. 1, pp. 77–84, 2008.

- [14] B. Forbes and C. Ehrhardt, "Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, no. 2, pp. 193–205, 2005.
- [15] J. Tamaoki, J. Nakata, K. Nishimura, M. Kondo, K. Aoshiba, K. Kawatani, and A. Nagai, "Effect of inhaled indomethacin in asthmatic patients taking high doses of inhaled corticosteroids," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 105, pp. 1134–1139, 2000.
- [16] R. E. Badesso, C. Bustos-Fierro, M. L. Seguro, G. Nuñez, C. B. Romañuk, S. Naeko Uema, Andrea, and M. E. Olivera, "Seguridad gastrointestinal de los Antiinflamatorios No Esteroides (AINE) administrados por vía oral," *Bitácora Digit. Fac. Ciencias Químicas*, pp. 1–7, 2014.
- [17] S. L. Weinstein, M. R. Gold, and A. L. DeFranco, "Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. May, pp. 4148–4152, 1991.
- [18] M. Griet, H. Zelaya, M. V. Mateos, S. Salva, G. E. Juárez, G. F. De Valdez, J. Villena, G. A. Salvador, and A. V. Rodríguez, "Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, pp. 1–11, 2014.
- [19] "United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30–NF 25," *United States Pharmacopeial Conv.*, Rockville, MD, 2007.
- [20] Y. B. Wang, A. B. Watts, J. I. Peters, S. Liu, A. Batra, and R. O. Williams, "In Vitro and In Vivo performance of dry powder inhalation formulations: comparison of particles prepared by thin film freezing and micronization," *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 4, pp. 981–993, 2014.
- [21] M. B. Dolovich and R. Dhand, "Aerosol drug delivery: developments in device design and clinical use.," *Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1032–1045, 2011.
- [22] S. S. Razavi Rohani, K. Abnous, and M. Tafaghodi, "Preparation and characterization of spray-dried powders intended for pulmonary delivery of insulin with regard to the selection of excipients.," *Int. J. Pharm.*, vol. 465, pp. 464–478, 2014.
- [23] G. Pilcer, N. Wauthoz, and K. Amighi, "Lactose characteristics and the generation of the aerosol.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 233–256, Mar. 2012.
- [24] S. K. Tee, C. Marriott, X. M. Zeng, and G. P. Martin, "The use of different sugars as fine and coarse carriers for aerosolised salbutamol sulphate," *Int. J. Pharm.*, vol. 208, pp. 111–123, 2000.
- [25] H. Adi, I. Larson, H. Chiou, P. Young, D. Traini, and P. Stewart, "Agglomerate strength and dispersion of salmeterol xinafoate from powder mixtures for inhalation," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 11, pp. 2556–2565, 2006.
- [26] T. H. H. Thi, F. Danède, M. Descamps, and M. P. Flament, "Comparison of physical and inhalation properties of spray-dried and micronized terbutaline sulphate," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, no. 1, pp. 380–388, 2008.
- [27] W. Azouz, P. Chetcuti, H. S. R. Hosker, D. Saralaya, J. Stephenson, and H. Chrystyn, "The inhalation characteristics of patients when they use different dry powder inhalers.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 28, no. 1, pp. 35–42, 2015.

- [28] S. R. Carvalho, A. B. Watts, J. I. Peters, and R. O. Williams, "Dry Powder Inhalation for Pulmonary Delivery: Recent Advances and Continuing Challenges," in *Pulmonary Drug Delivery. Advances and Challenges*, 1st Edition, A. Nokhodchi and G. Martin, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 2015, pp. 35–62.
- [29] A. A. Onischuk, T. G. Tolstikova, I. V. Sorokina, N. A. Zhukova, A. M. Baklanov, V. V. Karasev, G. G. Dultseva, V. V. Boldyrev, and V. M. Fomin, "Anti-inflammatory effect from indomethacin nanoparticles inhaled by male mice.," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–243, 2008.
- [30] N. R. Labiris and M. B. Dolovich, "Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 56, no. 6, pp. 588–599, 2003.
- [31] A. K. Yazdi and H. D. C. Smyth, "Hollow crystalline straws of diclofenac for high-dose and carrier-free dry powder inhaler formulations," *Int. J. Pharm.*, vol. 502, pp. 170–180, 2016.
- [32] S. Bianco, "US6051566. Anti-reactive anti-asthmatic activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs by inhalation," 2000.
- [33] D. Quinteros, M. V. Ramirez Rigo, A. Jimenez Kairuz, M. E. Olivera, R. H. Manzo, and D. Allemandi, "Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 72–79, 2008.
- [34] D. Enrique-Santos, "Fisiopatología de la respuesta inflamatoria durante el perioperatorio," *Rev. Mex. Anesthesiol.*, vol. 30, no. 1, pp. 157–159, 2007.
- [35] B. C. Chen, C. C. Liao, M. J. Hsu, Y. T. Liao, C. C. Lin, J. R. Sheu, and C. H. Lin, "Peptidoglycan-Induced IL-6 Production in RAW 264.7 Macrophages Is Mediated by Cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 Receptors, Protein Kinase A, I κ B Kinase, and NF- κ B," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 1, pp. 681–693, 2006.

*La vida es el arte de sacar conclusiones suficientes
a partir de datos insuficientes.*

Samuel Butler

Capítulo 7.

Conclusiones y trabajo futuro

7.1. Conclusiones y trabajo futuro

El trabajo de investigación realizado en la presente Tesis permitió la producción de micropartículas poliméricas portando fármacos para administración por vía inhalatoria, mediante la técnica de secado por atomización. La formación en la alimentación líquida de pares iónicos entre los polielectrolitos y los fármacos seleccionados condujo a la obtención de complejos iónicos en polvo luego del procesamiento. Para la producción de los sistemas particulados se ensayaron diferentes combinaciones de variables operativas y de diseño. Las propiedades finales de las partículas resultaron ser función de la naturaleza de las materias primas, la composición relativa de los componentes y la concentración de sólidos de la alimentación. Por lo tanto, el co-procesamiento de polielectrolitos y fármacos permitió el diseño flexible de productos inhalatorios ya que facilitó modular las propiedades finales de los materiales particulados. Por otra parte, la combinación del uso de un alto caudal del aire de atomización y de un ciclón de alta performance condujo a la obtención de partículas de pequeño tamaño, aptas para la administración inhalatoria, con un muy buen rendimiento del proceso de secado. El ciclón de alta performance permitió la colección de partículas finas, razón por la cual se obtuvieron mejoras en el rendimiento. Para escalas de producción piloto e industrial el caudal del aire de atomización es una variable de fácil manipulación. Especial cuidado será requerido en la selección de los ciclones para garantizar una recolección eficiente de las partículas finas. Teniendo en cuenta que ya existe un producto comercial de administración inhalatoria para el tratamiento de infecciones pulmonares que se produce por secado por atomización y tiene tamaños geométricos entre 1 y 5 μm (*PulmoSphere*[®]), la producción a mayor escala de las partículas propuestas en esta Tesis sería factible. De hecho el proceso debería ser más simple porque las formulaciones aquí propuestas se basan en alimentaciones acuosas a diferencia de las utilizadas para la producción de las *PulmoSpheres*, las cuales están constituidas por mezclas complejas de solutos y solventes orgánicos.

Aun cuando AT e IN son principios activos que en estado puro son cristalinos, los sistemas particulados polielectrolito-fármaco presentan una estructura amorfa, situación que podría mejorar la biodisponibilidad de los activos. Esta propiedad es particularmente relevante para IN, por tratarse de un fármaco de baja solubilidad acuosa. Los complejos iónicos amorfos fueron capaces de disociarse por intercambio de iones cuando los sistemas particulados se

disolvieron en solución fosfato tamponada pH 7,4, medio que simula las condiciones fisiológicas en el pulmón. Esto indica que luego de la administración, los materiales tienen la capacidad de disolverse en el fluido pulmonar y liberar los fármacos para que puedan ejercer su efecto farmacológico a nivel local o absorberse y actuar a nivel sistémico. Las velocidades iniciales de disolución para los complejos en medio fisiológico fueron mayores que para los fármacos puros, característica que resultó ser más acentuada para IN debido a su baja solubilidad acuosa. En este contexto, los materiales desarrollados en esta Tesis deberían presentar una mayor biodisponibilidad respecto a la de los fármacos puros micronizados.

Si bien en la literatura relacionada con la caracterización de productos inhalatorios se recomienda el uso de la densidad empaquetada para la estimación del diámetro aerodinámico ($D_{aer}^{e, min}$) a partir del tamaño geométrico, esta práctica no resulta una estrategia conservativa, ya que subestima la predicción del D_{aer} . En esta Tesis se propuso también utilizar la densidad de la muestra para estimar el diámetro aerodinámico ($D_{aer}^{e, max}$). Este enfoque sobreestima los valores de diámetros aerodinámicos ya que la densidad de la muestra será siempre superior a la de la partícula exceptuando el caso de partículas no porosas. El método propuesto en esta Tesis permite establecer un rango de tamaños donde el diámetro aerodinámico real debe ubicarse. Esta estrategia, validada con los resultados del impactador, permite una selección rápida de los materiales con los mejores tamaños para la administración inhalatoria.

Los ensayos de aerosolización *in vitro* demostraron que ambos sistemas particulados tuvieron buenas propiedades para la administración inhalatoria de los fármacos, tanto para tratamientos locales como sistémicos. En efecto, la fracción respirable obtenida siguiendo los lineamientos de la USP para los sistemas AA-AT y PL-IN fue del orden o mayor a la que presentan la mayoría de los productos comerciales. Si bien son necesarios estudios *in vivo*, las formulaciones óptimas proveerían la dosis de fármaco requerida en un número razonable de disparos diarios comparado con el recomendado para productos inhalatorios comerciales (de 1 a 4 disparos).

Las propiedades de flujo de los sistemas particulados formulados, en concordancia con los pequeños tamaños obtenidos, fueron pobres y mejoraron cuando se agregó lactosa como excipiente *carrier*. Sin embargo, el agregado de lactosa no mejoró las propiedades de aerosolización. Si bien es una práctica común la adición de *carriers*, los estudios realizados en esta Tesis demuestran que las ventajas de su inclusión en formulaciones inhalatorias están ligadas a las propiedades fisicoquímicas de las partículas. Considerando que actualmente se están desarrollando tecnologías para la dosificación de partículas cohesivas, y que el agregado

de lactosa no mejoró la performance de aerosolización, los materiales se proponen como libres de *carrier*.

Los resultados del test de aerosolización *in vitro* confirmaron que las muestras obtenidas utilizando altos caudales de atomización y con el ciclón de alta performance presentaron las mayores fracciones de partículas finas y respirables, con o sin el agregado de contraiones inorgánicos. Los ensayos de estos sistemas seleccionados en la línea A-549 indicaron que los materiales no son citotóxicos para aplicaciones sistémicas. Sin embargo se observó una mayor viabilidad celular para las formulaciones conteniendo los contraiones inorgánicos. Por esta razón, los materiales seleccionados para los estudios de mucoadherencia y efecto farmacológico fueron: (AA-AT)₇₅:K 2%^c y (PL-IN)₅₀:DXCI 1,7%^c.

Para el sistema conteniendo AT, el agregado del polielectrolito permitió aumentar la mucoadherencia de las partículas, lo que permitiría incrementar el tiempo de residencia del sistema en el pulmón. Por su parte, los complejos iónicos conteniendo IN mostraron el mismo efecto farmacológico que el fármaco puro, lo cual demuestra que los materiales desarrollados no alteran la disminución de la producción de COX-2 respecto de IN pura en un modelo celular de macrófagos murinos.

En síntesis, se desarrollaron formulaciones innovadoras de antihipertensivos/antiarrítmicos y antiinflamatorios para ser administrados por vía inhalatoria. Estos materiales, basados en coprocesados con polielectrolitos de carga opuesta mediante secado por atomización, demostraron tener buenas propiedades biofarmacéuticas. Por lo tanto, podrían ser utilizados como opciones terapéuticas para tratamientos locales y sistémicos de enfermedades crónicas, disminuyendo los efectos adversos y el tiempo de acción. Por otra parte, esta estrategia podría extrapolarse a otros fármacos con alto impacto terapéutico, mediante la interacción con los polielectrolitos seleccionados en esta tesis o con otros polielectrolitos.

En esta Tesis se han realizado estudios biofarmacéuticos *in vitro* que permitieron identificar las formulaciones con mayor potencial para la aplicación inhalatoria. Para estos materiales, la siguiente etapa de desarrollo involucra estudios en modelos animales. Por ello, son necesarios ensayos de instilación intratraqueal del sistema particulado, para determinar *in vivo* la deposición real de las micropartículas y la dosis terapéutica. Por otro lado, son de interés estudios histopatológicos para confirmar la seguridad de las micropartículas en tejido pulmonar. Finalmente, será necesario realizar todas las pruebas tendientes a comprobar que los productos inhalatorios desarrollados presentan ventajas competitivas con productos disponibles para otras vías de administración.

Abreviaturas

IDM:	inhalador presurizado de dosis medida
IPS:	inhalador de polvo seco
AA:	ácido algínico
AT:	atenolol
PL:	polilisina
IN:	indometacina
DX:	dextrina
KOH:	hidróxido de potasio
K:	potasio (usado como contraión)
HCl:	ácido clorhídrico
Cl:	cloro (usado como contraión)
AINE:	antiinflamatorio no esteroideo
SA:	secado por atomización
T_s :	temperatura de salida del aire de secado
T_g :	temperatura de transición vítrea
MF:	mezcla física
D_{libre} :	densidad libre

$D_{empaquetada}$:	densidad empaquetada
$D_{muestra}$:	densidad de la muestra
IC:	índice de Carr
D_{43} :	diámetro volumétrico medio
D_{50} :	diámetro volumétrico mediano
PSD:	distribución de tamaño de partícula (de su sigla en inglés: <i>Particle Size Distribution</i>)
D_{aer} :	diámetro aerodinámico
D_{aer}^e :	diámetro aerodinámico medio estimado
$D_{aer}^{e, máx}$:	diámetro aerodinámico máximo estimado
$D_{aer}^{e, mín}$:	diámetro aerodinámico mínimo estimado
NGI:	equipo de impacto en cascada (de su sigla en inglés: <i>next generation impactor</i>)
ΔP :	caída de presión (en KPa)
PS:	preseparador
FE:	fracción emitida
FPF:	fracción de partículas finas
FR:	fracción respirable
MMDA:	mediana en masa del diámetro aerodinámico
GSD:	desviación geométrica estándar (de su sigla en inglés: <i>geometric standard deviation</i>)
HR:	humedad relativa
f_2 :	factor de similitud
COX:	enzima ciclooxigenasa
LPS:	lipopolisacárido

Figuras

Figura 1.1. Esquema del tracto respiratorio, dividido en la vía conductiva y la vía respiratoria

Figura 1.2. Esquema de la vía respiratoria del tracto respiratorio

Figura 1.3. Cargado de la cápsula de gelatina en un dispositivo de IPS

Figura 1.4. Esquema del interior de un inhalador de polvo seco

Figura 1.5. Esquema de la administración del fármaco mediante la inhalación del paciente

Figura 2.1. Esquema del equipo de secado por atomización

Figura 2.2. Esquema de la obtención de las micropartículas para administración inhalatoria

Figura 2.3. Esquema del equipo de impacto en cascada. Para $\Delta P = 4\text{KPs}$, $FE = \textcircled{2}/\textcircled{1}$; $FPF < 5 \mu\text{m} = \textcircled{4}/\textcircled{2}$; $FPF < 3 \mu\text{m} = \textcircled{3}/\textcircled{2}$; $FR < 5 \mu\text{m} = \textcircled{4}/\textcircled{1}$; $FR < 3 \mu\text{m} = \textcircled{3}/\textcircled{1}$

Figura 2.4. Esquema de una celda de Franz

Figura 3.1. Estructura química de atenolol en la cual se resalta el grupo amino

Figura 3.2. Estructura química de ácido algínico en la cual se resaltan los grupos ácidos

Figura 3.3. Espectros FT-IR de AT comercial y AT 0,6%^a. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.4. Espectros FT-IR de AA comercial y AA 1%^a. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.5. FTIR de la mezcla física y de los materiales co-procesados (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a. Los recuadros sin relleno muestran las bandas asociadas a los grupos básicos o ácidos no disociados. Los recuadros rellenos resaltan las bandas atribuidas a los grupos básicos o ácidos disociados. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.6. Comportamiento térmico de los materiales precursores tal como se recibieron de los proveedores (AA y AT) o procesados mediante secado por atomización (AA 1% y AT 0,6%), (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.7. Comportamiento térmico de los materiales co-procesados binarios y la mezcla física (MF), (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.8. Difractograma de los materiales puros procesados por SA y sin procesar. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.9. Difractograma de la mezcla física (MF) y los materiales co-procesados (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 3.10. Micrografías MEB de las materias primas a 3000X: a) ácido algínico (AA) y b) atenolol (AT)

Figura 3.11. Micrografías a distintas magnificaciones de AA y AT secados por atomización. a) AA 1%^a (3000X); b) AT 0,6%^a (3000X); c) AA 1%^a (10000X); d) AT 0,6%^a (10000X).

Figura 3.12. Micrografías de las micropartículas (AA-AT)₅₀ 1,6-8%^a. a) (AA-AT)₅₀ 1,6%^a (8000X); b) (AA-AT)₅₀ 1,6%^a (10000X); c) (AA-AT)₅₀ 4%^a (10000X); d) (AA-AT)₅₀ 8%^a (8000X)

Figura 3.13. Imágenes MEB de las micropartículas: a) (AA-AT)₇₅ 1,9%^b (15000X); b) (AA-AT)₇₅ 1,9%^c (15000X); c) (AA-AT)₇₅:K 2%^b (15000X); d) (AA-AT)₇₅:K 2%^c (15000X)

Figura 3.14. Distribución de diámetros aerodinámicos medios estimados (usando la densidad de la muestra) para los materiales (AA-AT)₇₅ 1,9%^{a, b y c}

Figura 4.1. Estructura química de indometacina en la cual se resalta el grupo ácido carboxílico

Figura 4.2. Estructura química de polilisina en la cual se resalta el grupo básico de su estructura

Figura 4.3. Espectros FT-IR de los complejos iónicos, el fármaco puro y PL:DX. (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.4. Diagrama de difracción de rayos X de los materiales puros comerciales y secados por atomización (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.5. Diagrama de difracción de rayos X de los materiales secados por atomización y la mezcla física (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.6. Diagrama de difracción de rayos X de la muestra (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a a distintos tiempos de almacenamiento (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.7. Termograma de IN (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.8. Termograma de la muestra PL:DX comercial y de la secada por atomización (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.9. Termograma de los complejos iónicos en polvo y la mezcla física (u.a.: unidades arbitrarias)

Figura 4.10. Micrografías de IN comercial (800X)

Figura 4.11. Micrografías PL:DX: a) PL:DX comercial (8000X); b) PL:DX 1,6%^a (8000X)

Figura 4.12. Micrografías de los complejos iónicos obtenidos mediante secado por atomización a 8000X: a) (PL-IN)₂₅:DX 1,6%^a ; b) (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^a; c) (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^c; d) (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c

Figura 4.13. Distribución del diámetro aerodinámico estimado para las muestras (PL-IN)₅₀:DX 1,6%^{a y c}

Figura 5.1. Resumen de la caracterización biofarmacéutica de los materiales AA-AT

Figura 5.2. Fotografía de las muestras de (AA-AT)₇₅:K 2%^c colectadas en las etapas de separación 3 y 4 del equipo NGI (que, para una caída de presión de 4 KPa, presentan diámetros de corte de 2,85 y 1,68 μm , respectivamente)

Figura 5.3. Captación de humedad de los sistemas secados por atomización y de las mezclas micropartículas:lactosa

Figura 5.4. Micrografías de la muestra (AA-AT)₇₅:K 2%^c (2500X) obtenidas con la técnica de presión variable, almacenadas a diferentes humedades relativas: a) 0 %; b) 40 %; c) 60 %; d) 75 %

Figura 5.5. Valores de los $D_{aer}^{e,máx}$, $D_{aer}^{e,mín}$ y MMDAs obtenidas mediante el ensayo de impacto en cascada

Figura 5.6. Perfil de liberación de AT a partir de los materiales particulados y del fármaco secado por atomización. Todos los perfiles resultaron similares, de acuerdo al factor f_2 .

Figura 5.7. Perfil de liberación de (AA-AT)₇₅:K 2%^c partiendo de una solución o del polvo seco

Figura 5.8. Fotografía a modo de ejemplo de una placa de cultivo luego de tratar las células con los materiales particulados y los productos puros, agregar el reactivo de MTT y disolver los cristales de formazán formados

Figura 5.9. Viabilidad celular (expresada como % del control) de los materiales co-procesados y el polímero puro. (*): diferencia estadísticamente significativa

Figura 5.10. Viabilidad celular (expresada como % del control) de los materiales co-procesados y el fármaco puro

Figura 6.1. Resumen de la caracterización biofarmacéutica de los materiales PL-IN

Figura 6.2. Micropartículas PL-IN depositadas en las etapas 3 y 4 del equipo NGI (que, para una caída de presión de 4 KPa, presentan diámetros de corte de 2,85 y 1,68 μm , respectivamente)

Figura 6.3. Retención de IN en las diferentes etapas del equipo de impacto en cascada NGI para la formulación (PL-IN)₅₀:DXCl 1,7%^c con y sin el agregado de lactosa

Figura 6.4. Comparación entre los $D_{aer}^{e,máx}$ y $D_{aer}^{e,mín}$ con los valores de MMDA

Figura 6.5. Liberación de IN a partir soluciones de los materiales en solución fosfato tamponada pH 7,4 y agua destilada. Los perfiles a pH 7,4 para IN y el producto sólidos resultaron similares.

Figura 6.6. Liberación de IN a partir de las micropartículas de los productos secados por atomización y de fármaco puro en solución fosfato tamponada pH 7,4.

Figura 6.7. Fotografía a modo de ejemplo de una placa de cultivo luego de tratar las células A-549 con los materiales seleccionados, agregar el reactivo de MTT y disolver los cristales de formazán formados

Figura 6.8. Ensayo de toxicidad celular en células A-549 para PL:DX y las micropartículas conteniendo IN

Figura 6.10. Efecto antiinflamatorio del complejo iónico $(\text{PL-IN})_{50}:\text{DXCl } 1,7\%^c$ y de los materiales precursores. ①: control; ②: LPS; ③ LPS: $(\text{PL-IN})_{50}:\text{DXCl } 1,7\%^c$, ④: PLS:IN; ⑤: PLS:PL:DX; ⑥: control:PL:DX; ⑦: control:IN. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas

Tablas

Tabla 2.1. Clasificación de la propiedad de flujo de polvos según el Índice de Carr (*IC*)

Tabla 2.2. Clasificación de la propiedad de flujo de polvos según el ángulo de reposo

Tabla 2.3. Contenido de glicerina en soluciones acuosas y humedad relativa provista

Tabla 2.4. Diámetros aerodinámicos de corte de las etapas del NGI al utilizar diferentes caudales de aire

Tabla 3.1. Composición de las soluciones y dispersiones preparadas

Tabla 3.2. Condiciones operativas y de diseño

Tabla 3.3. Composición, pH y viscosidad de la alimentación líquida para secar por atomización

Tabla 3.4. Temperatura de salida del aire de secado y rendimiento

Tabla 3.5. Humedad residual y cargado de AT en los productos

Tabla 3.6. Comportamiento térmico de los materiales puros, la mezcla física (MF) y los productos de secado (AA-AT)_x 1,3-1,9%^a

Tabla 3.7. Diámetro medio volumétrico y *span* para los materiales comerciales, puros secados por atomización y micropartículas co-procesadas

Tabla 3.8. Densidad de la muestra, libre y empaquetada, índice de Carr (*IC*) y ángulo de reposo de los materiales secados por atomización

Tabla 3.9. Índice de Carr (*IC*) de las micropartículas sin lactosa y con lactosa en proporción 1:3

Tabla 3.10. Contenido de humedad en el equilibrio de los materiales obtenidos por SA a 25°C y 75 % HR

Tabla 3.11. Diámetro mediano (D_{50}) y diámetro aerodinámico medio estimado (D_{aer}^e)

Tabla 4.1. Composición teórica de las alimentaciones líquidas de PL/IN

Tabla 4.2. Composición experimental, viscosidad y pH de las soluciones preparadas para procesar por SA

Tabla 4.3. Temperatura del aire de salida, rendimiento y humedad de las muestras obtenidas por SA

Tabla 4.4. Composición de las micropartículas conteniendo IN

Tabla 4.5. Comportamiento térmico de los materiales puros, los polvos obtenidos por SA y la MF

Tabla 4.6. Diámetro volumétrico medio y *span* para materiales co-procesados y puros

Tabla 4.7. Densidad libre y empaquetada e Índice de Carr de los materiales portando IN

Tabla 4.8. Densidad de la muestra de los materiales puros y secados por atomización

Tabla 4.9. Mediana en volumen y diámetros aerodinámicos estimados medios

Tabla 5.1. Propiedades de aerosolización *in vitro* a 4KPa de caída de presión

Tabla 5.2. Aerosolización *in vitro* de los sistemas ensayados a 2 KPa de caída de presión

Tabla 5.3. Aerosolización *in vitro* de las mezclas micropartículas:lactosa en proporción 1:3, ensayadas a 4KPa de caída de presión

Tabla 5.4. Retención de AT en el preseparator (PS) para los materiales (AA-AT)₇₅ 1,9%^c y (AA-AT)₇₅:K 2%^c, con y sin el agregado de lactosa

Tabla 5.5. Parámetros relevantes para la deposición *in vitro* a diferentes humedades relativas (HR %)

Tabla 5.6. Parámetros relevantes para la deposición *in vitro* a diferentes humedades relativas (HR %)

Tabla 5.7. Fuerza y trabajo máximo de despegue en el ensayo de mucoadhesión

Tabla 6.1. Parámetros obtenidos del impactador en cascada para las micropartículas portando IN

Tabla 6.2. Parámetros obtenidos del impactador en cascada para las mezclas micropartículas:lactosa (1:3) a 4KPa de caída de presión

Producción científica

Parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se publicaron en revistas indexadas de alto impacto y/o presentaron en congresos nacionales e internacionales, según se lista a continuación:

Artículos en revistas científicas

1. Impact of feed counterion addition and cyclone type on aerodynamic behavior of alginic-atenolol microparticles produced by spray drying. Nazareth Eliana Ceschan, Verónica Bucalá, María Verónica Ramírez Rigo, Hugh David Charles Smyth. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 109 (2016) 72-80.
2. Polymeric microparticles containing indomethacin for inhalatory administration. Nazareth Eliana Ceschan, Verónica Bucalá, María Verónica Ramírez Rigo. *Powder Technology* 285 (2015) 51–61.
3. New alginic acid–atenolol microparticles for inhalatory drug targeting. Nazareth Eliana Ceschan, Verónica Bucalá, María Verónica Ramírez Rigo. *Materials Science & Engineering C* 41 (2014) pp. 255-266.

Congresos Internacionales

1. Aerosolization and delivery properties of polypeptide microparticles for pulmonary administration of indomethacin (resumen). Ceschan, N, Bucalá, V, Ramírez-Rigo, M, Smyth, H. IV Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, 27-28 de octubre de 2016.
2. Mucoadhesive microparticles obtained by spray drying for Atenolol lung delivery (resumen). Ceschan, N, Garay, A, Gallo, L, Bucalá, V, Ramírez-Rigo, MV. IV Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, 27-28 de octubre de 2016.

3. Solid state characterization and cytotoxicity evaluation of inhalatory microparticles based on indomethacin-polylysine complex (resumen). Ceschan,N.E., Bucalá,V., Smyth, H.D.C., Ramírez-Rigo,M.V. XVIII Congresso da Federação Farmacéutica Sudamericana (FEFAS)- 8 RioPharma (Congresso da Ciências Farmacêuticas). Río de Janeiro, 15-17 de octubre de 2015.
4. Aerodynamic behavior of alginic-atenolol microparticles obtained by spray drying (resumen). Ceschan,N.E., Bucalá,V., Ramírez-Rigo,M.V., Smyth,H.D.C. XVIII Congresso da Federação Farmacéutica Sudamericana (FEFAS)- 8 RioPharma (Congresso da Ciências Farmacêuticas). Río de Janeiro, 15-17 de octubre de 2015.
5. Characterization of indomethacin microparticles for inhalatory administration (trabajo completo). Ceschan,N.E., Gallo, L.C., Bucalá,V., Ramírez-Rigo,M.V. 7th International Granulation Workshop. Sheffield, 1-3 de julio de 2015.
6. Influencia de la composición de la alimentación en la producción de micropartículas de polilisina-indometacina mediante secado por atomización (resumen). Ceschan,N.E., Bucalá,V., Ramírez-Rigo,M.V. III Reunión Internacional De Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Córdoba, 18-19 de septiembre de 2014. Resumen publicado en: International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. pp 80. 2015.
7. La difracción de rayos x de polvos aplicada al estudio de micropartículas algínico-atenolol obtenidas mediante secado por atomización (resumen). N.E. Ceschan, V. Bucalá, M.V. Ramírez Rigo. I Reunión Latinoamericana De Cristalografía-IX Reunión anual de la asociación argentina de cristalografía. Córdoba, 29 de Octubre-1 de Noviembre de 2013.
8. Nuevos materiales particulados para administración inhalatoria de atenolol: preparación y caracterización del estado sólido (resumen). Ceschan,N.E., Manzo,R.H., Bucalá,V., Ramírez-Rigo,M.V. XXI Congreso de la federación panamericana de farmacia, XIV Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana, XXI Congreso Farmacéutico Argentino. Salta, 3-5 De Octubre De 2013.
9. Materiales particulados polielectrolito-fármaco para la vía nasal y pulmonar obtenidos mediante secado por atomización. Revisión (resumen). Ceschan,N.E., Manzo,R.H., Piña,J., Bucalá,V., Ramírez-Rigo,M.V. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). Rosario, 21-22 de noviembre de 2012.

Congresos Nacionales

1. Morfología y aerosolización de micropartículas inhalables portadoras de fármacos acondicionadas a diferentes humedades relativas (resumen). Ana Julia Ávila, Cecilia Gutierrez Ayesta, Nazareth Ceschan, María Julia Yañez, María Verónica Ramírez Rigo. 4to Congreso argentino de microscopía (SAMIC) 2016. Bariloche, 6-8 de abril de 2016. Resumen publicado en: Acta Microsc., vol. 25, (4) pp. 163–164. 2016.
2. Micropartículas algínico-atenolol obtenidas mediante secado por atomización. Relación producto-proceso de interés farmacéutico (resumen). Ceschan N., Bucalá V., Ramírez Rigo, M. LVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS)-XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar Del Plata, 20-23 de Noviembre 2013. Resumen publicado en: Medicina 73 (III) (2013) pp. 271.

