



**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

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

**Tesis de Doctorado**

“Desarrollo y caracterización de sistemas transportadores de ingredientes farmacéuticos activos poco solubles en agua. Aplicación de diseños experimentales”

Presentada por:

**Agustina García**

Rosario, Argentina

2015

**“Desarrollo y caracterización de sistemas transportadores de  
ingredientes farmacéuticos activos poco solubles en agua.  
Aplicación de diseños experimentales”**

**Agustina García**

**Farmacéutica, Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Técnica Farmacéutica del Departamento Farmacia dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y el Instituto de Química de Rosario, durante el período comprendido entre Julio de 2011 y Noviembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. María Celina Lamas y la co-dirección del Dr. Darío Leonardi.

*“Nuestro conocimiento es necesariamente finito, mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita.”*

*Karl Popper (1902-1994)*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quisiera agradecer a todas las personas o instituciones que de una u otra manera me han ayudado durante la realización de este trabajo:*

*A mis directores la Dra. María Celina Lamas y el Dr. Darío Leonardi, por haber dedicado su valioso tiempo en la dirección de esta tesis, permitirme trabajar junto a ellos, participar en mi crecimiento profesional, su gran pasión por el trabajo, su paciencia y por su amistad.*

*A la Dra. Lucila I. Hinrichsen, Dra. María Delia Vasconi, Dr. Ricardo Di Masso y Lic. María Victoria Codina, por confiar en nuestro grupo de investigación y emprender proyectos en conjunto que han formado parte del desarrollo de esta tesis doctoral.*

*A mis compañeros docentes e investigadores del Área Técnica Farmacéutica, por compartir sus conocimientos conmigo, su generosidad, su solidaridad, calidez y los buenos momentos compartidos.*

*Al Dr. Claudio Salomón por permitirme trabajar en su laboratorio, el uso de equipos y reactivos.*

*A la Farm. Josefina Priotti, por su grata compañía y su ayuda durante estos años de trabajo.*

*A la Dra. Gisella Piccirilli por su ayuda y principalmente por su amistad.*

*A Sergio Tindiglia y Pablo Duché, por su ayuda y buena predisposición al realizar los espectros.*

*A los docentes del Área de estadística, por ayudarme cada vez que fui a consultarlos.*

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

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

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca otorgada.*

*A mis padres por ser mi ejemplo a seguir, por haberme enseñado a no rendirme frente a los desafíos.*

*A mis hermanos, dos personas que admiro, por sus palabras inspiradoras de siempre y su ayuda.*

*A Nicolás, mi compañero en la vida, por apoyarme incondicionalmente siempre y en particular durante esta etapa.*

*A todos muchas gracias.*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	xx
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	xxiii
<b>PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS</b> .....	xxviii
<b>PRESENTACION A REUNIONES CIENTIFICAS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS</b> .....	xxxi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Sistemas microparticulados .....	5
1.1.1 Secado por aspersión.....	7
1.1.2 Polímeros usualmente empleados en la formulación de sistemas microparticulados .....	8
1.1.2.1 Quitosano.....	8
1.1.2.1.1 Caracterización del Quitosano.....	9
1.1.2.2 Pectina .....	11
1.1.2.3 Carboximetilcelulosa sódica.....	12
1.1.2.4 Determinación del peso molecular promedio de polímeros por viscosimetría .....	13
1.2 Formulación de complejos de inclusión-asociación .....	13

1.2.1	Ciclodextrinas.....	14
1.2.1.1	$\beta$ -Ciclodextrina.....	16
1.2.1.2	Modificaciones químicas de la $\beta$ -ciclodextrina.....	17
1.2.1.3	Metil- $\beta$ -Ciclodextrina.....	20
1.2.1.4	Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina.....	21
1.3	Enfermedades desatendidas .....	22
1.3.1	Triquinelosis.....	22
1.3.1.1	Albendazol.....	24
1.4	Diseño experimental .....	27
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo general.....	31
2.2	Objetivos específicos .....	31
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1	Materiales.....	33
3.2	Métodos .....	33
3.2.1	Formulación de sistemas microparticulados .....	33
3.2.1.1	Caracterización de los polímeros empleados en la formulación de los sistemas microparticulados .....	33
3.2.1.1.1	Caracterización del quitosano.....	33
3.2.1.1.2	Caracterización de la pectina.....	37
3.2.1.1.3	Caracterización de la carboximetilcelulosa sódica.....	38

3.2.1.2	Formulación de micropartículas poliméricas .....	39
3.2.1.3	Programas .....	41
3.2.1.4	Determinación del rendimiento .....	42
3.2.1.5	Determinación del título de las micropartículas .....	42
3.2.1.6	Cálculo de la eficiencia de encapsulación .....	42
3.2.1.7	Estudios de solubilidad aparente .....	43
3.2.1.8	Estudios de velocidad de disolución .....	43
3.2.1.9	Calorimetría diferencial de barrido .....	43
3.2.1.10	Difracción de rayos X.....	44
3.2.1.11	Microscopía electrónica de barrido .....	44
3.2.1.12	Estudios de estabilidad .....	44
3.2.1.13	Determinación de la densidad aparente y la densidad empacada.. .....	45
3.2.1.14	Determinación del índice Carr y el índice de Hausner.....	46
3.2.1.15	Determinación del ángulo de reposo .....	46
3.2.1.16	Reproducibilidad entre lotes.....	47
3.2.2	Síntesis de derivados de $\beta$ -ciclodextrina .....	48
3.2.2.1	Síntesis de citrato- $\beta$ -ciclodextrina .....	48
3.2.2.2	Síntesis de succinil- $\beta$ -ciclodextrina.....	48
3.2.2.3	Síntesis itaconil- $\beta$ -ciclodextrina .....	49
3.2.2.4	Síntesis de hexil- $\beta$ -ciclodextrina .....	50

3.2.3 Caracterización estructural de $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina .....	51
3.2.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución...	51
3.2.3.2 Espectrometría de masas .....	51
3.2.3.3 Determinación del grado de sustitución .....	52
3.2.3.4 Determinación del contenido de carboxilos .....	52
3.2.4 Preparación y caracterización de formulaciones empleando $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina.....	53
3.2.4.1 Evaluación de la afinidad de diferentes ciclodextrinas por el albendazol .....	53
3.2.4.1.1 Diagramas de solubilidad de fase.....	53
3.2.4.2 Preparación de sistemas compuestos por albendazol y diferentes ciclodextrinas .....	53
3.2.4.3 Caracterización fisicoquímica y estructural de los sistemas albendazol:ciclodextrinas .....	54
3.2.4.3.1 Determinación del rendimiento .....	54
3.2.4.3.2 Determinación del título de los sistemas albendazol:ciclodextrinas .....	54
3.2.4.3.3 Estudios de solubilidad aparente .....	54
3.2.4.3.4 Estudios de velocidad de disolución .....	54
3.2.4.3.5 Calorimetría diferencial de barrido .....	55
3.2.4.3.6 Difracción de rayos X.....	55
3.2.4.3.7 Espectroscopía de infrarrojo.....	55

3.2.4.3.8	Microscopía electrónica de barrido .....	55
3.2.4.3.9	Espectrometría de masas .....	55
3.2.4.3.10	Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución .....	56
3.2.4.3.11	Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido .....	56
3.2.5	Ensayos biológicos .....	57
3.2.5.1	Estudios de biodisponibilidad .....	57
3.2.5.1.1	Animales de experimentación .....	57
3.2.5.1.2	Análisis farmacocinético .....	57
3.2.5.1.3	Procedimiento analítico .....	58
3.2.5.1.4	Parámetros de biodisponibilidad .....	58
3.2.5.1.5	Análisis estadístico .....	59
3.2.5.2	Ensayos de actividad antiparasitaria en un modelo murino infectado por <i>Trichinella spiralis</i> .....	59
3.2.5.2.1	Animales de experimentación .....	59
3.2.5.2.2	Parásito .....	60
3.2.5.2.3	Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase aguda de la infección .....	60
3.2.5.2.4	Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase parenteral de la infección por <i>Trichinella spiralis</i> y su dependencia con la dosis de albendazol administrada .....	62
3.2.5.3	Evaluación histológica de la irritación del tracto gastrointestinal	63

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
4.1	Formulación de sistemas microparticulados.....	64
4.1.1	Caracterización de los polímeros empleados en la formulación de los sistemas microparticulados.....	64
4.1.1.1	Caracterización del quitosano.....	64
4.1.1.1.1	Determinación del grado de desacetilación.....	64
4.1.1.1.2	Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico del quitosano .....	70
4.1.1.2	Caracterización de la pectina.....	71
4.1.1.2.1	Determinación del grado de esterificación por espectroscopía de infrarrojo .....	71
4.1.1.2.2	Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico de la pectina .....	71
4.1.1.1	Caracterización de la carboximetilcelulosa sódica.....	72
4.1.1.1.1	Determinación del grado de sustitución de la carboximetilcelulosa sódica por titulación ácido-base .....	72
4.1.1.1.2	Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico de la carboximetilcelulosa sódica .....	73
4.1.2	Formulación de micropartículas poliméricas .....	74
4.1.3	Estudios de solubilidad aparente .....	83
4.1.4	Estudios de velocidad de disolución .....	83
4.1.5	Difracción de Rayos X .....	85
4.1.6	Calorimetría diferencial de Barrido.....	86

4.1.7	Análisis morfológico .....	87
4.1.8	Estudios de estabilidad .....	87
4.1.9	Propiedades de flujo .....	88
4.1.10	Reproducibilidad .....	88
4.2	Caracterización estructural de $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina .....	88
4.2.1	$\beta$ -ciclodextrina.....	88
4.2.2	Metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	90
4.2.3	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	92
4.2.4	Síntesis y caracterización de citrato- $\beta$ -ciclodextrina.....	94
4.2.5	Síntesis y caracterización de succinil- $\beta$ -ciclodextrina .....	98
4.2.6	Síntesis y caracterización de itaconil- $\beta$ -ciclodextrina.....	102
4.2.7	Síntesis y caracterización de hexil- $\beta$ -ciclodextrina.....	106
4.3	Preparación y caracterización de formulaciones empleando $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina.....	109
4.3.1	Evaluación de la afinidad de diferentes ciclodextrinas por el albendazol .....	109
4.3.1.1	Diagramas de solubilidad de fase.....	109
4.3.2	Formulación y caracterización de sistemas albendazol:ciclodextrinas . .....	111
4.3.2.1	Caracterización fisicoquímica y estructural de sistemas compuestos por albendazol y ciclodextrinas obtenidas comercialmente .....	111

4.3.2.1.1	Determinación del rendimiento y el título.....	111
4.3.2.1.2	Estudios de solubilidad aparente .....	112
4.3.2.1.3	Estudios de velocidad de disolución .....	113
4.3.2.1.4	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	117
4.3.2.1.5	Difracción de rayos X.....	119
4.3.2.1.6	Microscopía electrónica de barrido .....	121
4.3.2.1.7	Caracterización estructural de los sistemas formulados a partir de ciclodextrinas obtenidas comercialmente .....	122
4.3.2.2	Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina.....	128
4.3.2.2.1	Determinación del rendimiento y el título.....	128
4.3.2.2.2	Estudios de solubilidad aparente .....	129
4.3.2.2.3	Estudios de velocidad de disolución .....	129
4.3.2.2.4	Calorimetría diferencial de barrido .....	131
4.3.2.2.5	Difracción de rayos X.....	131
4.3.2.2.6	Espectroscopía de infrarrojo.....	133
4.3.2.2.7	Microscopía electrónica de barrido .....	134
4.3.2.2.8	Espectrometría de masas .....	135
4.3.2.2.9	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución .....	136
4.3.2.3	Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:succinil- $\beta$ -ciclodextrina.....	138

4.3.2.3.1	Determinación del rendimiento y el título.....	138
4.3.2.3.2	Estudios de solubilidad aparente .....	139
4.3.2.3.3	Estudios de velocidad de disolución .....	139
4.3.2.3.4	Calorimetría diferencial de Barrido.....	140
4.3.2.3.5	Difracción de rayos X.....	141
4.3.2.3.6	Espectroscopía de infrarrojo.....	142
4.3.2.3.7	Microscopía electrónica de barrido .....	143
4.3.2.3.8	Espectrometría de masas .....	144
4.3.2.3.9	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución .....	145
4.3.2.4	Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:itaconil- $\beta$ -ciclodextrina .....	147
4.3.2.4.1	Determinación del rendimiento y el título.....	147
4.3.2.4.2	Estudios de solubilidad aparente .....	147
4.3.2.4.3	Estudios de velocidad de disolución .....	147
4.3.2.4.4	Calorimetría diferencial de barrido .....	149
4.3.2.4.5	Difracción de rayos X.....	149
4.3.2.4.6	Espectroscopía de infrarrojo.....	150
4.3.2.4.7	Microscopía electrónica de barrido .....	152
4.3.2.4.8	Espectrometría de masas .....	153
4.3.2.4.9	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución .....	153

4.3.2.5	Caracterización estructural del sistema albendazol:hexil- $\beta$ -ciclodextrina .....	155
4.3.2.6	Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido .....	156
4.4	Ensayos biológicos .....	165
4.4.1	Estudios de biodisponibilidad .....	165
4.4.2	Ensayos de actividad antiparasitaria en un modelo murino infectado por <i>Trichinella spiralis</i> .....	166
4.4.2.1	Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase aguda de la infección .....	166
4.4.2.2	Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase parenteral de la infección por <i>Trichinella spirallis</i> y su dependencia con la dosis de albendazol administrada .....	168
4.4.3	Evaluación histológica de la irritación del tracto gastrointestinal... ..	170
5.	CONCLUSIONES .....	174
6.	RESUMEN.....	178
6.1	Presentación del problema .....	178
6.2	Enfoque y planificación del problema .....	178
6.2.1	Formulación de micropartículas poliméricas .....	179
6.2.2	Formulación de complejos con ciclodextrinas .....	179
6.2.3	Ensayos biológicos .....	180
6.3	Datos significativos y hallazgos más importantes .....	180

6.3.1	Formulación de micropartículas poliméricas ternarias mediante secado por aspersión.....	180
6.3.2	$\beta$ -Ciclodextrinas .....	181
6.3.3	Ensayos biológicos .....	183
6.4	Conclusiones .....	184
7.	REFERENCIAS .....	186

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquematación de los procesos que intervienen luego de la administración oral de un fármaco en forma de comprimido o cápsula.....	3
<b>Figura 2.</b> Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.....	4
<b>Figura 3.</b> Esquema de diferentes sistemas microparticulados: microcápsulas (A y B), que consisten en un núcleo de IFA recubierto (A) o varios núcleos de IFA recubiertos (B); y micromatriz (C), una dispersión homogénea del IFA en la matriz de la partícula.....	6
<b>Figura 4.</b> Esquema de un equipo de SA.....	8
<b>Figura 5.</b> Estructura química del Q.....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la P.....	11
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la CMC.....	12
<b>Figura 8.</b> Formación del complejo IFA:CD.....	14
<b>Figura 9.</b> Equilibrio de formación de un complejo soluble o insoluble, entre un compuesto insoluble y una CD. $K_f$ (constante de formación o estabilidad); $S_o$ (solubilidad del compuesto); $S_c$ (solubilidad del complejo formado).....	15
<b>Figura 10.</b> Tipos de isotermas de solubilidad. $A_P$ , $A_L$ y $A_N$ corresponden a complejos que presentan una alta solubilidad; $B_S$ complejos con solubilidad limitada y $B_I$ complejos insolubles. $S_o$ = solubilidad del IFA en ausencia de CD.....	15
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la $\beta$ -CD, señalando sus posibles posiciones de sustitución 2, 3 y 6 (en rojo).....	17
<b>Figura 12.</b> Estructuras químicas de las $\beta$ -CDs empleadas en este trabajo de Tesis.....	21
<b>Figura 13.</b> Estructura química del ABZ.....	25

<b>Figura 14.</b> Viscosímetro capilar de Ostwald-Cannon-Fenske. ....	36
<b>Figura 15.</b> Esquematización de la determinación del ángulo de reposo. ....	47
<b>Figura 16.</b> Curva de titulación potenciométrica del Q (A), curvas obtenidas mediante el método de la derivada primera (B) y derivada segunda (C). ....	65
<b>Figura 17.</b> Gráfico de linealización obtenido por el método de Ke y colaboradores. ....	66
<b>Figura 18.</b> Gráfico de linealización obtenido por el método de Jiang y colaboradores. ....	67
<b>Figura 19.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ del Q (10 mg/mL) disuelto en DCl (1 % v/v) a 25, 40, 55 y 70 °C. ....	69
<b>Figura 20.</b> Gráfico de $\eta_{\text{red}}$ versus concentración de Q. ....	70
<b>Figura 21.</b> Espectro de FT-IR de la P. ....	71
<b>Figura 22.</b> Gráfico de $\eta_{\text{red}}$ versus concentración de P. ....	72
<b>Figura 23.</b> Gráfico de $\eta_{\text{red}}$ versus concentración de CMC. ....	73
<b>Figura 24.</b> Gráficos de probabilidad seminormal correspondientes a las respuestas involucradas en el diseño de Plackett-Burman. ....	76
<b>Figura 25.</b> Gráficos de superficie-respuesta para las respuestas <i>D</i> (A), <i>R</i> (B), <i>EE</i> (C), <i>Q</i> <sub>30</sub> (D) y <i>Q</i> <sub>60</sub> (E) a una concentración fija de CMC como se indica en cada gráfico. ....	80
<b>Figura 26.</b> Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en el “Sistema Óptimo” ....	84
<b>Figura 27.</b> Difractogramas del ABZ (A) y del “Sistema Óptimo” (B). ....	86
<b>Figura 28.</b> Termograma de CDB del ABZ (A) y del “Sistema Óptimo” (B). ....	86

- Figura 29.** Micrografías obtenidas por MEB del “Sistema Óptimo”. Aumento de 2000X (A). Aumento de 5000X (B). ..... 87
- Figura 30.** Espectro HSQC de  $\beta$ -CD (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). Tabla de asignación de las señales de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (C). ..... 89
- Figura 31.** Espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (señales verdes correspondientes a  $\text{CH}_2$  y señales azules a  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$ ) y HMBC (señales rojas), realizados para M- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 91
- Figura 32.** Espectro de masas de alta resolución realizado para la M- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa. .... 92
- Figura 33.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, realizados para la HP- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 93
- Figura 34.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC parcial de C- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 95
- Figura 35.** Espectro de masas de alta resolución, en modo negativo del C- $\beta$ -CD. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa. .... 97
- Figura 36.** Contenido de grupos carboxílicos en mmoles cada 100 g de C- $\beta$ -CD en función del tiempo de reacción. .... 98
- Figura 37.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC parcial de S- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 99
- Figura 38.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY parcial de S- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$ . ..... 100

- Figura 39.** Espectro de masas de alta resolución del S- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa..... 101
- Figura 40.** Espectro HSQC parcial de I- $\beta$ -CD en D<sub>2</sub>O (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 103
- Figura 41.** Espectro TOCSY selectivo de I- $\beta$ -CD, irradiando el protón a  $\delta$  4,44 ppm. .... 104
- Figura 42.** Espectro de masas de alta resolución del I- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa..... 106
- Figura 43.** Espectro HSQC parcial de H- $\beta$ -CD en CDCl<sub>3</sub> (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). ..... 108
- Figura 44.** Diagrama de solubilidad de fase para el ABZ en presencia de concentraciones crecientes de  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD. .... 110
- Figura 45.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ: $\beta$ -CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2). .... 114
- Figura 46.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2). .... 114
- Figura 47.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2). .... 115
- Figura 48.** Esquema representativo de la posible interacción entre el complejo ABZ:CD formado y un exceso de CD en el medio de disolución..... 116

- Figura 49.** Termograma de CDB de ABZ (A),  $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 117
- Figura 50.** Termograma de CDB de ABZ (A), M- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 118
- Figura 51.** Termograma de CDB de ABZ (A), HP- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 118
- Figura 52.** Difractograma del ABZ (A),  $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 119
- Figura 53.** Difractograma del ABZ (A), M- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 120
- Figura 54.** Difractograma del ABZ (A), HP- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D). ..... 120
- Figura 55.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) de ABZ (A),  $\beta$ -CD (B), ABZ: $\beta$ -CD MF (C), ABZ: $\beta$ -CD SA (D), M- $\beta$ -CD (E), ABZ:M- $\beta$ -CD MF (F), ABZ:M- $\beta$ -CD SA (G), HP- $\beta$ -CD (H), ABZ:HP- $\beta$ -CD MF (I) y ABZ:HP- $\beta$ -CD SA (J). ..... 122
- Figura 56.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la M- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de M- $\beta$ -CD realizado en DCI 0,1 M (C y D). ..... 124
- Figura 57.** Espectro de masas de alta resolución en modo negativo, del sistema ABZ:M- $\beta$ -CD obtenido mediante SA, disuelto en una solución de ácido fórmico (A). Ampliación de las regiones del espectro de MS correspondientes a la M- $\beta$ -CD (B) y a ABZ:M- $\beta$ -CD (C). Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa. ..... 125
- Figura 58.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la HP- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de HP- $\beta$ -CD realizado en DCI 0,1 M (C y D). ..... 127

<b>Figura 59.</b> Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD MF, ABZ:C-β-CD MF, ABZ:β-CD SA y ABZ:C-β-CD SA.....	130
<b>Figura 60.</b> Termograma de CDB de ABZ (A), C-β-CD (B) y los sistemas ABZ:C-β-CD obtenidos por MF (C) y SA (D).....	131
<b>Figura 61.</b> Difractograma del ABZ (A), C-β-CD (B) y los sistemas ABZ:C-β-CD preparados por MF (C) y SA (D). ....	132
<b>Figura 62.</b> Espectros de FT-IR del ABZ (A), C-β-CD (B) y los sistemas ABZ:C-β-CD preparados por MF (C) y SA (D).....	133
<b>Figura 63.</b> Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), C-β-CD (B) y los sistemas ABZ:C-β-CD obtenidos por MF (C) y SA (D). ....	135
<b>Figura 64.</b> Espectro de MS-MS del ión molecular con relación m/z 1574,4814. ....	136
<b>Figura 65.</b> Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado del C-β-CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de C-β-CD en DCI 0,1 M (C y D).....	137
<b>Figura 66.</b> Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD MF, ABZ:S-β-CD MF, ABZ:β-CD SA y ABZ:S-β-CD SA. ....	140
<b>Figura 67.</b> Termograma de CDB de ABZ (A), S-β-CD (B) y los sistemas ABZ:S-β-CD obtenidos por MF (C) y SA (D).....	141
<b>Figura 68.</b> Difractograma del ABZ (A), S-β-CD (B) y los sistemas ABZ:S-β-CD preparados por MF (C) y SA (D). ....	141
<b>Figura 69.</b> Espectros de FT-IR del ABZ (A), S-β-CD (B) y los sistemas ABZ:S-β-CD preparados por MF (C) y SA (D).....	143

- Figura 70.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), S- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D)..... 144
- Figura 71.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la S- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de S- $\beta$ -CD en DCl 0,1 M (C y D)..... 146
- Figura 72.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ: $\beta$ -CD MF, ABZ:I- $\beta$ -CD MF, ABZ: $\beta$ -CD SA y ABZ:I- $\beta$ -CD SA. .... 148
- Figura 73.** Termograma CDB de ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D)..... 149
- Figura 74.** Difractograma del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D). .... 150
- Figura 75.** Espectros de FT-IR del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D). .... 151
- Figura 76.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D)..... 152
- Figura 77.** Estructura y etiquetado del ABZ (A), estructura y etiquetado de la I- $\beta$ -CD (B), espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de I- $\beta$ -CD en DCl 0,1 M (C y D)..... 154
- Figura 78.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de H- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de H- $\beta$ -CD en CDCl<sub>3</sub> (C).... 155
- Figura 79.** Espectros de <sup>13</sup>C CP/MAS obtenidos para  $\beta$ -CD (A), M- $\beta$ -CD (B), HP- $\beta$ -CD (C) y C- $\beta$ -CD (D)..... 157
- Figura 80.** Espectros de <sup>13</sup>C CP/MAS obtenidos para el ABZ a diferentes tiempos de contacto: 100 ms (A) y 3 ms (B)..... 159

**Figura 81.** Algunas conformaciones posibles de los grupos unidos al anillo benzimidazólico del ABZ. Las siguientes estructuras representan pares de tautómeros: **a** y **e**, **b** y **f**, **c** y **g**, **d** y **h**. La estructura **ae** es otro tautómero del par **a** y **e**. ..... 159

**Figura 82.** Espectros Completos de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para ABZ: $\beta$ -CD (A), ABZ:M- $\beta$ -CD (B), ABZ:HP- $\beta$ -CD (C) y ABZ:C- $\beta$ -CD (D) (tiempo de contacto: 3ms). ..... 160

**Figura 83.** Región seleccionada con escala vertical expandida de los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenido para ABZ: $\beta$ -CD (A), ABZ:M- $\beta$ -CD (B), ABZ:HP- $\beta$ -CD (C) y ABZ:C- $\beta$ -CD (D) (tiempo de contacto: 3ms)..... 161

**Figura 84.** Espectros de  $^{15}\text{N}$  CP/MAS obtenidos para ABZ (A), ABZ: $\beta$ -CD (B), ABZ:M- $\beta$ -CD (C), ABZ:HP- $\beta$ -CD (D) y ABZ:C- $\beta$ -CD (E)..... 164

**Figura 85.** Microfotografía donde se observa una larva de *T. spiralis* L1 muerta teñida con azul de metileno (señalada), rodeada de larvas viables (Aumento 40X)... 169

**Figura 86.** Microfotografía de un corte transversal de duodeno murino de un animal control, sin alteraciones morfológicas (10X aumentos). ..... 170

**Figura 87.** Microfotografía de un corte de duodeno en un animal tratado con ABZ que exhibe pérdida total de la capa muscular y necrosis. A: 10X aumentos; B: 20X aumentos..... 171

**Figura 88.** Microfotografía de un corte de duodeno en un animal tratado con ABZ que muestra vasodilatación (A: 20X aumentos) e infiltrado inflamatorio mononuclear (B: 40X aumentos). ..... 171

**Figura 89.** Microfotografía de cortes de duodeno de ratones tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD. A: mucosa con estructura conservada (10X aumentos); B: mucosa con lesión leve (20X aumentos). ..... 172

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> GD del Q obtenido por triplicado por el método de Broussignac. ....	66
<b>Tabla II.</b> GD del Q obtenido por triplicado por el método de linealización de Ke y colaboradores. ....	67
<b>Tabla III.</b> GD del Q obtenido por triplicado por el método de linealización propuesto por Jiang y colaboradores. ....	68
<b>Tabla IV.</b> Diseño Plackett-Burman incluyendo los valores de los factores y las respuestas. ....	75
<b>Tabla V.</b> Fase Optimización: Diseño Central Compuesto. ....	77
<b>Tabla VI.</b> ANOVA completo para las cuatro respuestas estudiadas. ....	79
<b>Tabla VII.</b> Coeficientes estimados, sus incertezas y las ecuaciones finales para las cuatro respuestas estudiadas. ....	81
<b>Tabla VIII.</b> Valores de los factores para los cuáles las respuestas son máximas. ....	82
<b>Tabla IX.</b> Comparación entre las respuestas predichas por el programa y los valores obtenidos experimentalmente. ....	83
<b>Tabla X.</b> Estimaciones de los parámetros de la ecuación de Weibull, error estándar, e intervalos de confianza del 95% (IC 95 %). ....	85
<b>Tabla XI.</b> Asignación de las señales de los espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ . ....	96
<b>Tabla XII.</b> Ecuaciones de la recta y valores de $K_f$ obtenidos para $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD. ....	111
<b>Tabla XIII.</b> Valores de los rendimientos de los productos obtenidos por SA y valoración del contenido de ABZ (título). ....	112

<b>Tabla XIV.</b> Valores de solubilidad aparente del ABZ en agua para los sistemas formulados con $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD, mediante las técnica de SA y MF.....	113
<b>Tabla XV.</b> Valores de los parámetros de disolución ( $Q_{30}$ (%), $Q_{60}$ (%) y ED (%)) obtenidos para el ABZ y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, preparados por MF y SA en relación equimolar (1:1).....	116
<b>Tabla XVI.</b> Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$ (%), $Q_{60}$ (%) y ED (%)) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD formulados por SA y MF.....	130
<b>Tabla XVII.</b> Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$ (%), $Q_{60}$ (%) y ED (%)) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD formulados por SA y MF. ....	139
<b>Tabla XVIII.</b> Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$ (%), $Q_{60}$ (%) y ED (%)) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD formulados por SA y MF. ....	148
<b>Tabla XIX.</b> Desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}$ CP/MAS obtenidos para para $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD. ....	158
<b>Tabla XX.</b> Desplazamientos químicos de $^{13}\text{C}$ CP/MAS obtenidos para ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD, ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD. ....	163
<b>Tabla XXI.</b> Desplazamientos químicos de $^{15}\text{N}$ CP/MAS obtenidos para ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD, ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD. ....	165
<b>Tabla XXII.</b> Parámetros farmacocinéticos para el ABZSO después de la administración oral de ABZ (fármaco original) y las micropartículas cargadas con ABZ. ....	166
<b>Tabla XXIII.</b> Promedio del número de larvas de <i>T. spiralis</i> observadas en lengua. ....	167
<b>Tabla XXIV.</b> Porcentajes de reducción de la CPr.....	167

<b>Tabla XXV.</b> Efecto de la dosis de ABZ y ABZ:C- $\beta$ -CD en la CPr en ratones CBI infectados con <i>T. spiralis</i> .....	169
---	-----

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazol sulfóxido
ABC	Área bajo la curva (en inglés, <i>area under curve</i> )
$\alpha$	Ángulo de reposo
ANOVA	Análisis de la varianza (en inglés, <i>analysis of variance</i> )
CMC	Carboximetilcelulosa Sódica
CD	Ciclodextrina
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia (en inglés, <i>HPLC, high performance liquid chromatography</i> )
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
$C_{\max}$	Concentración plasmática máxima
CMC	Carboximetilcelulosa Sódica
CP/MAS	Giro al ángulo mágico/polarización cruzada (en inglés, <i>Magic Angle Spinning/Cross Polarization</i> )
CPr	Carga parasitaria relativa
C- $\beta$ -CD	Citrato- $\beta$ -ciclodextrina
C	Concentración
Da	Dalton
d	Doblete

dd	Doble doblete
<i>D</i>	Deseabilidad
DE	Desvío estándar
$\delta$	Desplazamiento químico
$D_o$	Densidad aparente
$D_e$	Densidad empacada
DRX	Difracción de rayos X
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
D-GlcN	D-glucosamina
D-GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ED	Eficiencia de disolución
EE	Eficiencia de encapsulación
ESI	Ionización por electrospray
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (en inglés, <i>Food and Drug Administration</i> )
FT-IR	Infrarrojo (obtenido mediante transformada de Fourier)
GD	Grado de desacetilación
GE	Grado de esterificación
GL	Grado de libertad
GS	Grado de sustitución

h	Hora(s)
$^1\text{H}$ -H COSY	Correlación espectroscópica $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC	Correlación heteronuclear a varios enlaces $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC - DEPT	Correlación heteronuclear cuántica simple $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - Mejora sin distorsión por transferencia de polarización
H- $\beta$ -CD	Hexil- $\beta$ -ciclodextrina
HP- $\beta$ -CD	2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina
IC	Índice de Carr
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IH	Índice de Hausner
I- $\beta$ -CD	Itaconil- $\beta$ -ciclodextrina
$K_e$	Constante de eliminación
$K_f$	Constante de formación
M	Concentración molar (moles por litro)
M- $\beta$ -CD	Metil- $\beta$ -Ciclodextrina
min	Minuto(s)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
m	multiplete
MS	Espectrometría de masas
MS-MS	Espectrometría de masas en tándem
$M_v$	Peso molecular promedio viscosimétrico

N	Concentración normal (equivalentes por litro)
Pi	Post-infección
P	Pectina
ppm	partes por millón
Q	Qitosano
$Q_{30}$	Porcentaje de ingrediente farmacéutico activo disuelto a los 30 minutos del ensayo de disolución.
$Q_{60}$	Porcentaje de ingrediente farmacéutico activo disuelto a los 60 minutos del ensayo de disolución.
R	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	Espectroscopía de marco giratorio y efecto Overhauser
rpm	Revoluciones por minuto
s	singlete
S	Pendiente
$S_o$	Solubilidad del IFA en ausencia de ciclodextrina
S- $\beta$ -CD	Succinil- $\beta$ -ciclodextrina
sust	Sustituído
t	triplete
$T_{max}$	Tiempo al cuál se alcanza la concentración plásmatica máxima

TOCSY	Correlación espectroscópica total
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (del inglés, <i>United States Pharmacopeia</i> )
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
$\eta_{rel}$	Viscosidad relativa
$\eta_{sp}$	Viscosidad específica
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
$V_e$	Volumen equivalente

## **PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS**

I. Chitosan microparticles: Influence of the gelation process on the release profile and oral bioavailability of albendazole, a class II compound.

Gisela N. Piccirilli, Agustina García, Darío Leonardi, María E. Mamprin, Raul Bolmaro, Claudio J. Salomón, María C. Lamas.

Drug Development and Industrial Pharmacy. Noviembre de 2014; 40(11):1476-82. doi: 10.3109/03639045.2013.829486.

Editorial: Informa Health Care. New York. USA.

ISSN: 0363-904.

II. Novel albendazole formulations given during the intestinal phase of *Trichinella spiralis* infection reduce effectively parasitic muscle burden in mice.

Agustina García, María G. Barrera, Gisela Piccirilli, María D. Vasconi, Ricardo J. Di Masso, Darío Leonardi, Lucila I. Hinrichsen, María C. Lamas.

Parasitology International. Diciembre de 2013; 62(6):568-70. doi: 10.1016/j.parint.2013.08.009.

Editorial: Elsevier, Amsterdam.

ISSN: 1383-5769.

III. Spray drying formulation of albendazole microparticles by experimental design. In vitro-in vivo studies.

Agustina García, Darío Leonardi, Gisela N. Piccirilli, María E. Mamprin, Alejandro C. Olivieri, María C. Lamas.

Drug Development and Industrial Pharmacy. Febrero de 2015; 41(2):244-52. doi: 10.3109/03639045.2013.858737.

Editorial: Informa Health Care. New York. USA.

ISSN: 0363-904.

IV. Modified  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. Complete in vitro evaluation and characterization.

Agustina García, Darío Leonardi, Mario Oscar Salazar, María Celina Lamas.

PLOS ONE. Febrero de 2014; 9(2):e88234. doi: 10.1371/journal.pone.0088234

Editorial: PLOS.

ISSN: 1932-6203.

V. Characterization of albendazole-randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex and in vivo evaluation of its antihelminthic activity in a murine model of Trichinellosis.

Agustina García, Darío Leonardi, María D. Vasconi, Lucila I. Hinrichsen, María C. Lamas

PLOS ONE. Noviembre de 2014; 9(11):e113296. doi: 10.1371/journal.pone.0113296.

Editorial: PLOS.

ISSN: 1932-6203.

VI.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR studies on albendazole and cyclodextrin albendazole complexes

M. João G. Ferreira, Agustina García, Darío Leonardi, Claudio J. Salomon, María C. Lamas, Teresa G. Nunes.

Carbohydrate Polymers. Junio de 2015, 123:130–135.

doi: 10.1016/j.carbpol.2015.01.031.

Editorial: Elsevier, Amsterdam.

ISSN: 1383-5769.

VII. Efficacy of the complex albendazole: $\beta$ -cyclodextrin citrate in decreasing muscle larval load in the parenteral stage of *Trichinella spiralis* infection in CBI-IGE mice

Ana V. Codina, Agustina García, Darío Leonardi, María Delia Vasconi, Ricardo J. Di Masso, María Celina Lamas\*, Lucila I. Hinrichsen\*

International Journal of Biological Macromolecules. Junio de 2015, 77:203–206.

doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.049.

Editorial: Elsevier, Amsterdam.

ISSN: 0141-8130

VIII. Promising applications in drug delivery systems of a novel  $\beta$ -cyclodextrin derivative obtained by green synthesis.

Agustina García, Darío Leonardi, María Celina Lamas.

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. (en prensa)

Editorial: Elsevier, Amsterdam.

ISSN:0960-894X

## **PRESENTACION A REUNIONES CIENTIFICAS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS**

### Internacionales

I. “Characterization and optimization of albendazole loaded ternary polymeric microparticles”. 18° International Symposium on Microencapsulation. Septiembre de 2011, Antalya - Turquía. García, A.; Leonardi, D.; Lamas, M.C.

II. “Efficacy of new albendazole formulations in treating *Trichinella spiralis* infected mice”. 2<sup>da</sup> Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Noviembre de 2012, Rosario - Argentina. García, A.; Barrera, M.G.; Vasconi, M.D.; Di Masso, R.J.; Hinrichsen, L.I.; Leonardi, D.; Lamas M.C.

III. “The influence on the spray drying process in the formulation of albendazole:  $\beta$ -cyclodextrin systems”. 2<sup>da</sup> Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Noviembre de 2012, Rosario - Argentina. García, A.; Leonardi, D.; Lamas M.C.

IV. “Formulation and physicochemical characterization of Albendazole-cyclodextrin citrate complexes obtained by spray drying”. 19° International Symposium on Microencapsulation. Septiembre de 2013, Pamplona - España. García, A.; Leonardi, D.; Salomón C.J.; Salazar, M.; Lamas, M.C.

V. “Physicochemical characterization of albendazole- $\beta$ -cyclodextrin derivative complexes. evaluation in the parenteral stage of trichinellosis in mice”. 9TH WORLD MEETING on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Abril

de 2014, Lisboa. García, A.; Codina, A.V.; Leonardi D; Vasconi, M.D.; Di Masso, R.J.; Hinrichsen L.; Lamas M.C.

VI. “Solid-state NMR Studies on Albendazole and Cyclodextrin Albendazole Complexes”. 3era Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Septiembre de 2014, Córdoba. Ferreira, M. J. G.; García, A.; Leonardi, D.; Salomon, C. J.; Lamas, M. C.; Nunes, T. G.

VII. “Physicochemical characterization of carboxylic beta-cyclodextrin derivatives and albendazole inclusion complexes”. 3era Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Septiembre de 2014, Córdoba. García, A.; Leonardi, D.; Lamas, M. C.

#### Nacionales

I. “Aplicación de diseños experimentales para el desarrollo de micropartículas poliméricas ternarias”. XI Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial. Noviembre de 2011, Buenos Aires. García, A.; Leonardi, D.; Lamas, M.C. Trabajo seleccionado para exposición oral.

II. “Estudio de nuevas formulaciones de albendazol en ratones CBI-IGE infectados con *Trichinella spiralis*”. XIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2012. Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de Rosario. Agosto de 2012, Casilda. Barrera, M.G.; García, A.; Piccirilli, G.N.; Vasconi, M.D.; Di Masso, R.J.; Hinrichsen, L.; Leonardi, D; Lamas, M.C.

III. “Estudio de la eficacia terapéutica de nuevas formulaciones de albendazol”. XLIV Reunión anual de la asociación de farmacología experimental. Noviembre de 2012,

Mendoza. García, A.; Vasconi, M.D.; Di Masso, R.J.; Hinrichsen, L.; Leonardi, D; Lamas, M.C.

IV. “Modificación química de  $\beta$ -ciclodextrina: formación y caracterización de complejos con albendazol”. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica. Noviembre de 2013, Mar del Plata. García, A.; Leonardi, D.; Salazar, M.O.; Lamas, M.C.

V. “Análisis de la eficacia terapéutica del complejo albendazol:citrato de beta-ciclodextrina en la etapa parenteral de la infección con *Trichinella spiralis* en ratones CBI-IGE”. XLV Reunión anual de la asociación de farmacología experimental. Noviembre de 2013, Mar del Plata. García, A.; Codina, M.V.; Vasconi, M.D.; Leonardi, D; Di Masso, R.J.; Hinrichsen, L.; Lamas, M.C.

VI. “Análisis Histológico del tracto gastrointestinal de Ratones CBI-IGE infectados con *Trichinella Spiralis* y Tratados con el Complejo Albendazole:Citrato de  $\beta$ -Ciclodextrina”. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre de 2014, Mar del Plata. Codina, M.V.; García, A.; Roggero, E.; Vasconi, M.D.; Leonardi, D; Di Masso, R.J.; Hinrichsen, L.; Lamas, M.C.

VII. “Caracterización físico-química del complejo albendazol:citrato de  $\beta$ -ciclodextrina Primeras Jornadas Profesionales Farmacéuticas”. Agosto de 2014, San Luis. García, A.; Leonardi, D.; Lamas, M.C.

# 1.INTRODUCCIÓN

Entre las características únicas del *Homo sapiens* se encuentra su interés por aliviar las dolencias, físicas y mentales, con medicamentos. Las evidencias arqueológicas indican que este comportamiento es tan antiguo como la búsqueda de otras herramientas.<sup>1,2</sup> Al igual que las rocas silíceas empleadas para hacer cuchillos y hachas, los medicamentos rara vez se presentan en la naturaleza en su forma adecuada para el consumo. En primer lugar los principios activos deben ser recogidos, procesados y preparados para su incorporación en los medicamentos. Esta actividad, que se viene realizando desde los albores de la humanidad, todavía es el foco central de la farmacia galénica.<sup>2</sup>

En la Farmacopea Argentina VII edición, se define principio activo como “toda sustancia o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana”.<sup>3</sup> La disposición 4990/12 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, sustituyó en el 2012 el término principio activo por ingrediente farmacéutico activo (IFA).

Los IFAs, generalmente no se administran solos, sino que se incorporan en formas farmacéuticas junto con otras sustancias carentes de actividad farmacológica, denominadas excipientes. Los mismos, permiten y/o facilitan la preparación, la aceptación por parte de los pacientes y el funcionamiento de la forma farmacéutica como sistema de administración del IFA.<sup>4,5</sup>

Un medicamento independientemente de su composición o vía de administración, deberá cumplir con los siguientes requisitos que sustentan su eficacia, seguridad y calidad:<sup>6</sup>

- Contener una dosis adecuada.

- Proporcionar al IFA en una forma de dosificación que permita la administración, liberación y acción terapéutica.
- Conservar la calidad durante toda su vida útil y período de uso.
- Ser fabricados mediante un proceso que no comprometa el rendimiento y que sea reproducible.

Pocos IFAs tienen propiedades que les permiten la incorporación directa en unidades de dosificación que cumplan con todos estos criterios, de modo que frecuentemente se hace necesaria la incorporación de excipientes en las mismas.<sup>6</sup>

El proceso de transformación de los IFAs y excipientes en medicamentos estables, seguros y eficaces, es estudiado por la farmacia galénica. Esta ciencia aplicada, se ocupa particularmente de seleccionar las formas farmacéuticas más adecuadas para la acción terapéutica. Se aboca además, al estudio y resolución de los problemas físicos, químicos y tecnológicos que se plantean en la dosificación, elaboración y acondicionamiento de las formas farmacéuticas.<sup>7</sup>

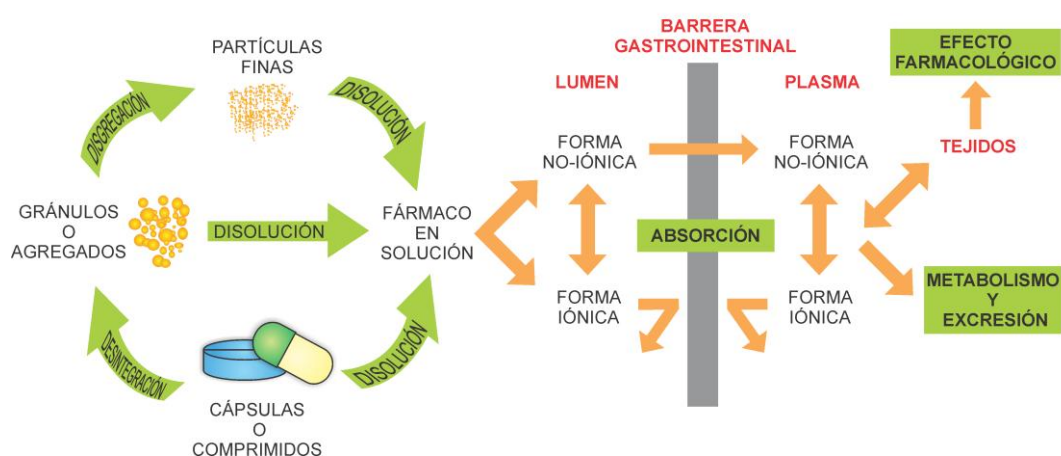
Los IFAs pueden ser administrados por diferentes vías entre ellas: oral, rectal, sublingual, bucal, inhalatoria, tópica y parenteral (comprende las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratecal e intracavitaria, entre otras).<sup>2,8</sup> La actividad farmacológica de un IFA sistémicamente activo es una función de su actividad intrínseca y de su perfil de concentración en la circulación sistémica.<sup>9</sup> Un IFA alcanza la circulación sistémica atravesando una o más barreras, en un proceso llamado absorción.<sup>7</sup> El perfil de absorción depende en forma significativa del sitio de administración empleado. Si bien hay una gran similitud entre las diversas membranas que puede atravesar un compuesto para llegar al líquido extracelular, diversos factores además de la composición y estructura de las membranas, determinan la facilidad con la cual es absorbido el IFA.<sup>2</sup>

La vía de administración oral, (es decir, la ingestión) es la vía de primera elección para la administración de un IFA, debido a que resulta la más cómoda y económica, razón por la cual siempre que sea posible, los medicamentos se administran de esta

manera.<sup>10-14</sup> Las formas farmacéuticas diseñadas para la administración oral de fármacos pueden presentarse en formas líquidas o sólidas.<sup>15,16</sup> Las formas farmacéuticas líquidas presentan la principal desventaja de proveer una dosificación más inexacta que las formas sólidas, debido a que la medida del volumen a suministrar es generalmente realizada por el paciente (excepto en las formas que son monodosis).<sup>5</sup> Las formas farmacéuticas sólidas son más exactas en su dosificación, presentando menores inconvenientes que las formas líquidas en cuanto a su preservación, estabilidad y almacenamiento, entre otros.<sup>17</sup>

El tracto gastrointestinal es el sitio de absorción para la mayoría de los nutrientes, de modo que este sistema ha evolucionado para facilitar la absorción de sustancias. Los fármacos administrados, se absorben mediante mecanismos similares a los de absorción de los nutrientes, siendo este proceso fuertemente dependiente de sus propiedades fisicoquímicas.<sup>18</sup>

Los IFAs que se administran por vía oral en formas farmacéuticas sólidas y tienen por objeto una acción sistémica, deben disolverse para poder atravesar las membranas celulares del tracto gastrointestinal y así acceder al torrente sanguíneo, es decir para absorberse (Figura 1).<sup>19</sup> Por este motivo, muchas veces el paso limitante del proceso de absorción de un IFA poco soluble en agua, es su velocidad de disolución en los fluidos del tracto digestivo.<sup>20</sup>



**Figura 1.** Esquemización de los procesos que intervienen luego de la administración oral de un fármaco en forma de comprimido o cápsula.

Además de la solubilidad del fármaco, hay otras características del mismo que influyen en su absorción, como su tamaño, forma molecular, grado de ionización y coeficiente de reparto.<sup>8,21</sup> Estas características, están relacionadas principalmente con la permeabilidad a través de las membranas biológicas. Por lo tanto, dos de los parámetros más importantes que determinan la absorción de un IFA son: su solubilidad en agua y su permeabilidad a través de la mucosa gastrointestinal.<sup>22</sup> Basándose en estos factores, el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (Figura 2) divide a los IFAs en cuatro grupos:<sup>23,24</sup>

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

**Figura 2.** Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevos fármacos ha producido muchos compuestos que presentan baja solubilidad en agua.<sup>25,26</sup> Adicionalmente, muchos de los IFAs existentes encuentran limitada su aplicación clínica debido a problemas de solubilidad.<sup>27</sup> De acuerdo con Farmacopea de los Estados Unidos (USP), más de un tercio de los IFAs que presentan monografías en dicha Farmacopea, y aproximadamente la mitad de las nuevas entidades químicas o nuevos IFAs, son poco solubles en agua o insolubles.<sup>20</sup> Esto representa una gran dificultad, particularmente para fármacos empleados en el tratamiento de patologías para las cuales no existe una investigación activa en la búsqueda de nuevos compuestos. Por lo tanto, el desarrollo de sistemas farmacéuticos que permitan incrementar la solubilidad y la velocidad de disolución de los IFAs, es uno de los temas más desafiantes dentro del campo de la tecnología farmacéutica.<sup>26,28</sup> Son múltiples las estrategias tecnológicas que pueden emplearse con

este objetivo, entre ellas pueden mencionarse: la modificación de cristales (polimorfos metaestables, formación de sales, cocrystalización), micronización, formulación de dispersiones sólidas, formulación de micropartículas y formación de complejos empleando ciclodextrinas (CDs).<sup>25,28-30</sup> Siendo las dos últimas, las estrategias principales empleadas durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.

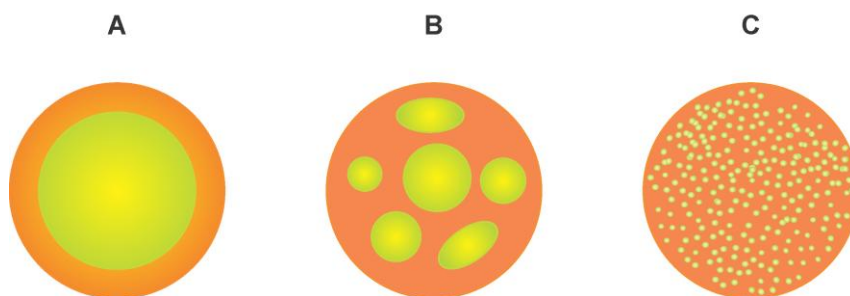
## 1.1 Sistemas microparticulados

Mediante el proceso de microencapsulación se obtienen partículas cuyo tamaño está comprendido entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$ . Estas partículas suelen llamarse con los siguientes nombres de manera indistinta: micropartículas, microesferas, microcapsulas y micromatrices. Sin embargo, pueden hacerse algunas distinciones entre estos términos: las microcápsulas están compuestas por uno o múltiples núcleos de la sustancia a recubrir (líquida o sólida) rodeado por la pared de la cápsula y las micromatrices son matrices poliméricas en las cuáles la sustancia encapsulada se encuentra homogéneamente dispersa (Figura 3).<sup>31,32</sup> Las micropartículas y las microesferas son términos que por lo general involucran a los dos anteriores.<sup>33</sup>

En las tecnologías farmacéuticas y biomédicas, las aplicaciones más importantes de la microencapsulación son:<sup>33-35</sup>

- Reducción el tamaño de partícula para aumentar la solubilidad de IFAs poco solubles.
- Liberación modificada de IFAs.
- Reducción de efectos adversos o tóxicos de IFAs.
- Transporte sitio específico de IFAs.
- Encapsulación de células.
- Encapsulación de productos volátiles para retardar su volatilización.
- Inclusión de aceites u otros líquidos en productos sólidos para facilitar su utilización.
- Protección de fármacos de humedad, luz, temperatura y/o agentes oxidantes.
- Separación de materiales incompatibles (como otros IFAs o excipientes)

- Manejo seguro de productos tóxicos.
- Mejorar las propiedades de flujo de los polvos.
- Mejorar la dispersión de sustancias insolubles en agua en dicho medio.
- Enmascaramiento de olores y sabores.



**Figura 3.** Esquema de diferentes sistemas microparticulados: microcápsulas (A y B), que consisten en un núcleo de IFA recubierto (A) o varios núcleos de IFA recubiertos (B); y micromatriz (C), una dispersión homogénea del IFA en la matriz de la partícula.

Los materiales empleados en el proceso de microencapsulación son muy variados incluyendo diversos polímeros, grasas y ceras, entre otros.<sup>31,36</sup> La elección del material depende de muchos factores, como el objetivo de la microencapsulación, la vía de administración y el costo.<sup>32</sup>

En vistas de la creciente necesidad de emplear recursos renovables y biodegradables, en este trabajo de Tesis se seleccionaron polímeros naturales o semisíntesis que presentan dichas características, siendo además biocompatibles. Por otro lado, en la formulación de micropartículas pueden emplearse combinaciones de polímeros con el objetivo de optimizar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las mismas. Adicionalmente, las interacciones moleculares entre polímeros de carga opuesta permite la formación de complejos polielectrolíticos. Una de las ventajas de la formulación de complejos polielectrolíticos como sistemas transportadores de IFAs, es que presentan la capacidad de encapsular al compuesto activo en la matriz polimérica en forma de dispersión a nivel molecular.<sup>37</sup> Esto último, puede modificar algunas propiedades fisicoquímicas de los IFAs, tales como su solubilidad y velocidad de

disolución, que como se mencionó anteriormente, son de vital importancia en la formulación de sistemas terapéuticos empleando IFAs poco solubles en agua.

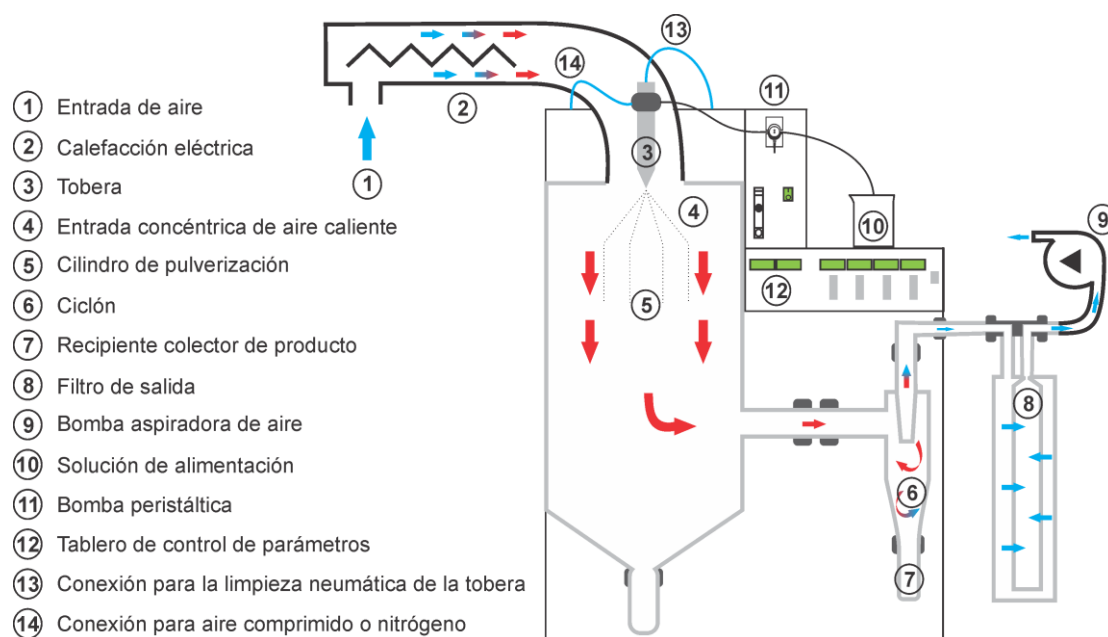
Algunas de las metodologías empleadas para la elaboración de micropartículas son:<sup>33-35</sup>

- Coacervación (simple o compleja).
- Emulsión-solidificación (evaporación de solvente, extracción de solvente, entrecruzamiento).
- Extrusión por fusión.
- Gelación iónica.
- Polimerización interfacial.
- Desolvatación.
- Recubrimiento en lecho fluido.
- Secado por aspersion (SA).

La elección de la metodología empleada para el proceso de microencapsulación puede depender del objetivo de la microencapsulación, el costo, la disponibilidad, la eficiencia de encapsulación, el rendimiento y cuestiones de estabilidad del IFA en las condiciones de preparación, entre otros.<sup>35</sup> Particularmente, el SA ha adquirido gran importancia en las últimas décadas debido a que permite obtener micropartículas con una alta reproducibilidad, eficiencia de encapsulación y rendimiento, sometiendo al IFA a altas temperaturas de secado durante sólo fracciones de segundo.<sup>38,39</sup> En otras palabras, es una metodología que permite escalar la producción a nivel industrial.<sup>32,36</sup>

### **1.1.1 Secado por aspersion**

El proceso de obtención de micropartículas a través de SA, se basa en la conversión de un sistema en estado líquido a uno particulado sólido, rociando el fluido (solución o dispersión) en una cámara en la cual circula aire caliente seco (Figura 4).<sup>40,41</sup>



**Figura 4.** Esquema de un equipo de SA.

En este proceso pueden distinguirse cuatro etapas: <sup>39,42</sup>

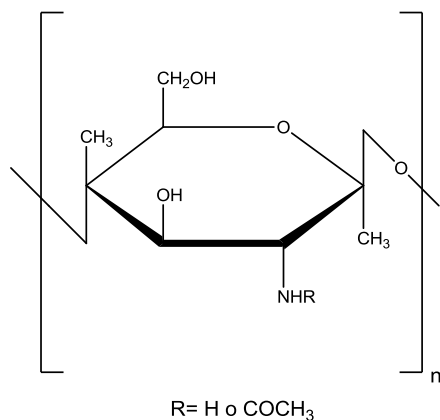
- 1- Atomización del fluido.
- 2- Mezcla del rociado y el aire caliente seco.
- 3- Evaporación del solvente.
- 4- Obtención del producto.

## 1.1.2 Polímeros usualmente empleados en la formulación de sistemas microparticulados

### 1.1.2.1 Quitosano

El quitosano (Q) es un polisacárido derivado de la quitina (obtenido por desacetilación termoquímica en medio alcalino), compuesto por unidades de D-glucosamina (D-GlcN)

y N-acetil-D-glucosamina (D-GlcNAc) con uniones glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).<sup>43</sup> En la Figura 5, se puede observar su estructura química, donde n representa el grado de polimerización.



**Figura 5.** Estructura química del Q.

El Q es un polímero ampliamente utilizado, debido a que la quitina es el segundo polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa, siendo un recurso renovable.<sup>44</sup> Se encuentra tanto en los exoesqueletos de crustáceos e insectos como en la pared celular de algunos hongos.<sup>45,46</sup> Su excelente biocompatibilidad, baja toxicidad, alta biodegradabilidad y capacidad de mucoadhesión justifican su extensa utilización en productos biomédicos y farmacéuticos, donde se lo utiliza como agente de recubrimiento, disgregante, formador de películas, aglutinante y viscosizante.<sup>47,48</sup>

También se ha reportado, que el Q presenta propiedades como promotor de la absorción de IFAs que presentan una baja permeabilidad a través de la mucosa gastrointestinal.<sup>49</sup> Se ha empleado en la formulación de sistemas de liberación controlada de IFAs, como componente de formas farmacéuticas mucoadhesivas, en formas de dosificación de liberación rápida y para sistemas de liberación sitio-específicos, entre otros.<sup>50</sup> También se lo utiliza en las industrias alimentaria y cosmética.<sup>51</sup>

#### **1.1.2.1.1 Caracterización del Quitosano**

##### Determinación del grado de desacetilación

El parámetro de mayor relevancia para caracterizar al Q es el grado de desacetilación (GD), dado que este último influye sobre las propiedades químicas, físicas y biológicas del polímero (por ejemplo propiedades acido-base, características electrostáticas, capacidad de quelar iones metálicos, viscosidad, solubilidad, capacidad de floculación y biodegradabilidad, entre otras).<sup>52</sup> El GD representa la fracción molar de unidades desacetiladas en la cadena del polímero y puede calcularse empleando la ecuación [1]:<sup>46</sup>

$$GD = \frac{n_{D-GlcN}}{n_{D-GlcN} + n_{D-GlcNAc}} \quad [1]$$

donde  $n_{D-GlcN}$  y  $n_{D-GlcNAc}$  representan el número promedio de unidades de D-GlcN y D-GlcNAc en la macromolécula. La mayoría las muestras comerciales presentan un GD promedio de 70-90 %, y siempre menor del 95 %.<sup>52</sup>

Se han utilizado muchos métodos para determinar el GD del Q tales como espectroscopía de infrarrojo (IR), espectrofotometría ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear (RMN), titulación coloidal, métodos enzimáticos y titulación potenciométrica.<sup>53</sup>

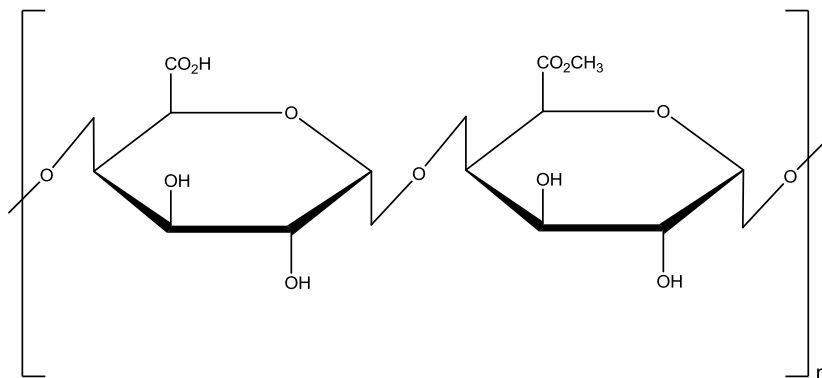
La titulación potenciométrica propuesta por Brousignac,<sup>54</sup> es uno de los métodos más simples. En esta titulación se obtiene una curva que presenta dos puntos de inflexión: el primero corresponde al exceso de HCl y el segundo a los grupos amino libres protonados del Q. La diferencia de volumen de NaOH gastados entre ambos puntos de inflexión permite calcular los moles de  $H^+$  requeridos para protonar los grupos amino libres y consecuentemente la cantidad de grupos D-GlcN en la muestra. Este método presenta una cierta inexactitud ya que el segundo punto de inflexión no coincide con el real debido a la precipitación de este biopolímero a pH neutro.<sup>52</sup>

Han surgido otros métodos que trataron de abolir este error, como el propuesto por Ke y Chen<sup>55</sup> en el cual la titulación del exceso de HCl con NaOH se considera como la titulación de un ácido fuerte con una base fuerte, entonces para linealizar la curva de titulación utilizan una función lineal derivada de la propuesta por Ingman y Still<sup>56</sup>.

Es importante notar que la solución de Q preparada para la titulación es en realidad una mezcla de un ácido fuerte con el polímero protonado (que es un ácido débil con un  $pK_a= 6,5$ ) y la función de Ingman y Still no es aplicable a la titulación de mezclas de ácidos débiles con bases fuertes. Teniendo en cuenta este hecho, Jiang y colaboradores propusieron otra función lineal que corrige este error.<sup>53</sup>

### 1.1.2.2 Pectina

La pectina (P) es un polisacárido complejo obtenido a partir del extracto ácido diluido de la porción interior de la cáscara de frutos cítricos o de la pulpa de manzana. Está compuesto por unidades esterificadas de ácido D-galacturónico cuyos enlaces glicosídicos son del tipo  $\alpha$ -(1→4).<sup>57</sup> En el producto natural, los grupos carboxílicos están ampliamente esterificados con grupos metoxilos (como puede observarse en la Figura 6) y los hidroxilos pueden estar acetilados. Se encuentra cargada negativamente en soluciones neutras o básicas.<sup>58,59</sup>



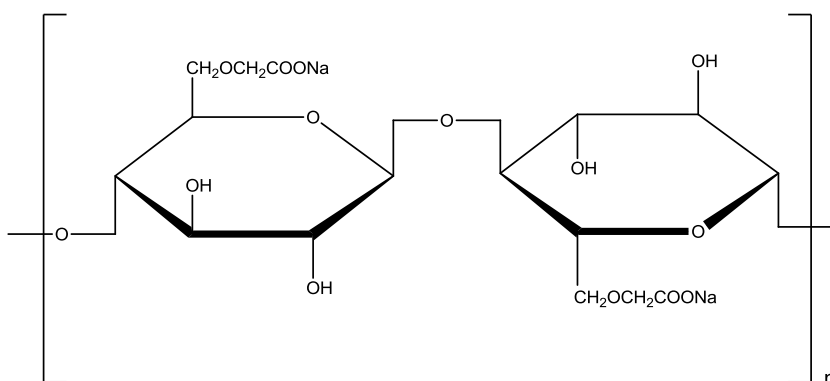
**Figura 6.** Estructura química de la P.

En cuanto a sus aplicaciones tecnológicas, se ha empleado como estabilizante de emulsiones y suspensiones, como agente gelificante, en la formulación de parches transdérmicos y matrices biodegradables con recubrimiento pH-dependiente, entre otras.<sup>19,60</sup> En productos farmacéuticos, la P se utiliza como adsorbente y formador de masa junto con otros componentes para el control de la diarrea, constipación y obesidad.<sup>51,61</sup> Además, se encuentra reportado que el empleo de P podría aportar

múltiples beneficios para la salud humana, tales como estímulo del sistema inmune,<sup>62</sup> inducción de apoptosis en células cancerígenas,<sup>63</sup> disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y glucosa.<sup>64</sup>

### 1.1.2.3 Carboximetilcelulosa sódica

La carboximetilcelulosa sódica (CMC) es un derivado semisintético de la celulosa, que se obtiene por activación de los grupos hidroxilos en una solución alcalina y posterior reacción con monocloroacetato de sodio.<sup>51</sup> Este polielectrolito es un copolímero formado por unidades de  $\beta$ -D-glucosa unidas por enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) a unidades de 2-O-(carboximetil)- $\beta$ -D-glucopiranososa sódica (Figura 7).<sup>65</sup> La carboximetilación de los grupos hidroxilos le otorga a la celulosa modificada propiedades funcionales relevantes, tales como alta solubilidad y viscosidad en agua fría o caliente.<sup>59</sup>



**Figura 7.** Estructura química de la CMC.

El número de grupos carboximetilo en el polímero determinan el grado de sustitución (GS) que conjuntamente con el grado de polimerización (n) influyen sobre la solubilidad, viscosidad y resistencia del gel de CMC.<sup>29</sup> Este derivado semisintético es el éter de celulosa más utilizado en la actualidad en varias industrias como la alimentaria, farmacéutica y en la producción de pinturas, adhesivos, papel, textiles, detergentes y pesticidas, entre otras.<sup>66-68</sup>

#### **1.1.2.4 Determinación del peso molecular promedio de polímeros por viscosimetría**

Una de las características principales de la mayoría de los polímeros hidrosolubles es el incremento en la viscosidad que los mismos le otorgan a una solución en función de su concentración. La viscosidad es la resistencia que presenta un sistema a fluir cuando se le aplica una fuerza, siendo que cuanto mayor es la viscosidad de un fluido mayor será la fuerza requerida para que el mismo fluya a una dada velocidad.<sup>69</sup>

La relación entre la viscosidad de una solución de un polímero y la viscosidad del medio dispersante o solvente puro, se denomina viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ ). Otro de los parámetros de interés, la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), se obtiene restando una unidad al valor anterior. Por otro lado, la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ), se calcula a partir del cociente entre la  $\eta_{sp}$  y la concentración del polímero en la solución.<sup>70</sup> Debido a que  $\eta_{red}$ , es idealmente independiente de la concentración y esto es cierto a concentración cero, un nuevo parámetro puede definirse a partir de la ordenada al origen del gráfico de  $\eta_{red}$  versus  $c$ , este valor se denomina viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ).<sup>69</sup>

La ecuación de Mark-Houwink, relaciona el peso molecular promedio viscosimétrico ( $M_v$ ) de un polímero con la viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) del mismo en un sistema de solventes a una determinada temperatura, mediante una fórmula que involucra dos constantes que son características de dicho sistema.<sup>57</sup> De modo que, el  $M_v$  de un polímero puede obtenerse a partir de la determinación de la viscosidad de soluciones diluidas del mismo a varias concentraciones, y graficando  $\eta_{red}$  versus la concentración.<sup>70</sup>

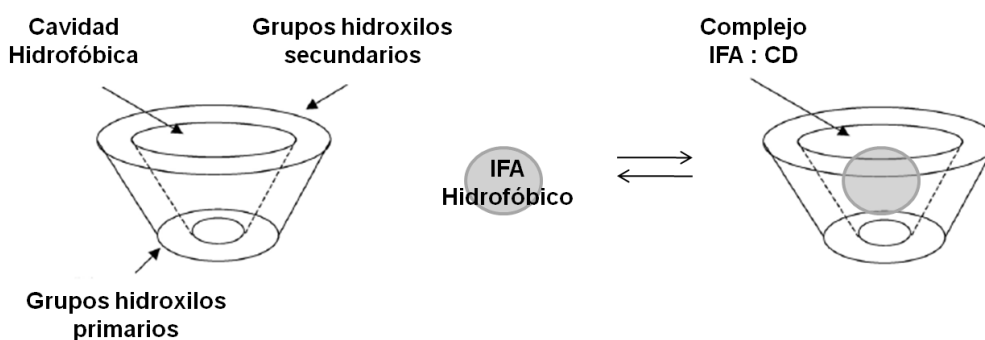
## **1.2 Formulación de complejos de inclusión-asociación**

La formulación de complejos es otra de las estrategias tecnológicas empleadas en este trabajo de Tesis con el objetivo de mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de IFAs poco solubles.

## 1.2.1 Ciclodextrinas

Las CDs son oligosacáridos cíclicos que se obtienen por degradación del almidón por la enzima CD Glucosil Transferasa como resultado de una transglucosilación intramolecular.<sup>71</sup> Se nombran como  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD,  $\delta$ -CD y  $\epsilon$ -CD, cuando presentan 6, 7, 8, 9 y 10 unidades de glucopiranososa, respectivamente.<sup>72</sup>

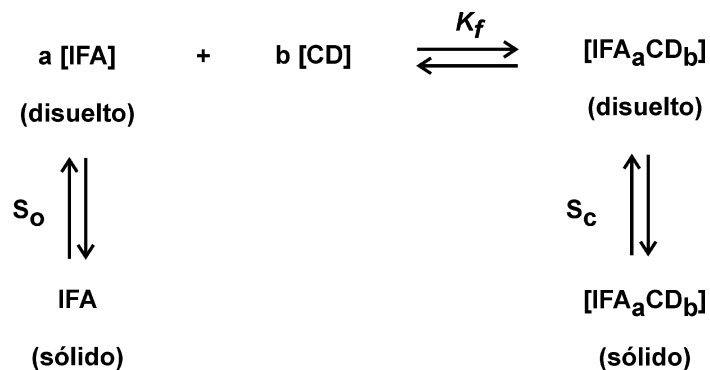
Las unidades de glucopiranososa se encuentran en la conformación de silla, esto justifica la forma de cono truncado que presentan las CDs en lugar de un cilindro perfecto. Las funciones hidroxilo de las moléculas de glucosa, se encuentran orientadas hacia el exterior del cono presentando los hidroxilos secundarios (correspondientes a C-2 y C-3) en la base más ancha del cono y los primarios (correspondientes a C-6) en la base más angosta. En la parte interior del anillo se encuentra el esqueleto carbonado y los oxígenos que están formando el grupo éter de los residuos de glucosa, que le dan cierto carácter lipofílico a esta región de la molécula (se estima una polaridad similar a las soluciones hidroalcohólicas). A esta cavidad hidrofóbica deben su habilidad para formar complejos de inclusión con varios compuestos de baja polaridad, aumentando así su solubilidad aparente (Figura 8).



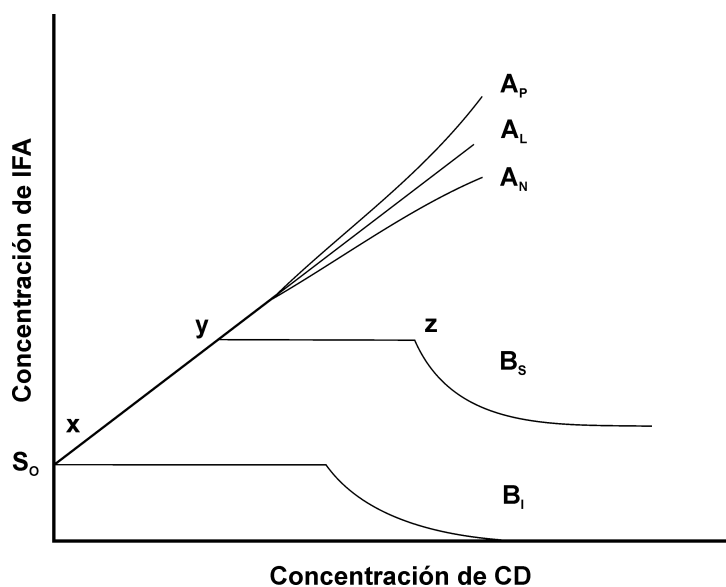
**Figura 8.** Formación del complejo IFA:CD.

Las CDs forman complejos de inclusión con IFAs hidrofóbicos mediante un proceso de equilibrio químico y pueden hacerlo con diferentes relaciones estequiométricas (Figura 9). Para determinar esta relación y las constantes de formación del complejo, uno de los métodos empleados es el diagrama de solubilidad de fase o

isotermas de solubilidad, descrito por Higuchi y Connors.<sup>71,73</sup> Estas isotermas correlacionan la solubilidad de la sustancia en estudio con la concentración de CD (Figura 10).



**Figura 9.** Equilibrio de formación de un complejo soluble o insoluble, entre un compuesto insoluble y una CD.  $K_f$  (constante de formación o estabilidad);  $S_o$  (solubilidad del compuesto);  $S_c$  (solubilidad del complejo formado).



**Figura 10.** Tipos de isotermas de solubilidad.  $A_P$ ,  $A_L$  y  $A_N$  corresponden a complejos que presentan una alta solubilidad;  $B_S$  complejos con solubilidad limitada y  $B_I$  complejos insolubles.  $S_o$  = solubilidad del IFA en ausencia de CD.

Si el complejo formado es soluble las isotermas son de tipo A, mientras que si el complejo presenta solubilidad limitada las isotermas son de tipo B.

Existen tres subtipos de isoterma tipo A:

- $A_L$ , indica un incremento lineal en la concentración del IFA en función de la concentración de CD.<sup>71</sup> No presenta cambios en la estequiometría del complejo con el aumento de la concentración.<sup>74</sup>
- $A_P$ , esta isoterma presenta un desvío positivo de la función lineal.
- $A_N$ , presenta un desvío negativo de la función lineal.<sup>72</sup>

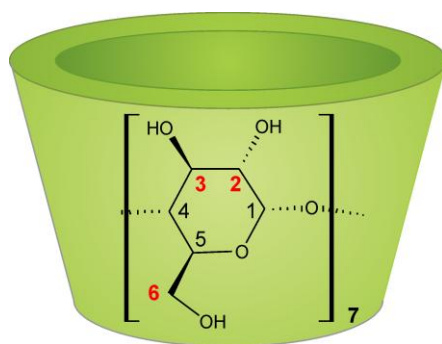
En el caso de las isotermas de tipo B pueden ser:

- $B_S$ , en los diagramas de este tipo puede observarse que el complejo es más soluble que la molécula de IFA libre, pero su solubilidad se encuentra limitada. Es decir, la cantidad de IFA disuelta aumenta hasta el punto **y** (Figura 10) donde se alcanza la solubilidad del complejo. Al aumentar la concentración de CD, esta solubilidad se mantiene constante hasta alcanzar el punto **z**, y luego el complejo comienza a precipitar hasta alcanzar el valor de la solubilidad del mismo.<sup>29</sup>
- $B_I$ , la solubilidad de la molécula huésped permanece inalterada hasta que todas las moléculas huésped se convierten en complejo insoluble, a partir de entonces la concentración del IFA disuelto comienza a decrecer.<sup>74</sup>

Los valores de  $K_f$  para un complejo 1:1, se pueden calcular a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la porción lineal del diagrama de solubilidad de fase.<sup>74,29</sup>

### **1.2.1.1 $\beta$ -Ciclodextrina**

La  $\beta$ -CD (Figura 11) presenta una limitada solubilidad en agua (18,5 mg/mL a 25 °C) que puede deberse a los fuertes enlaces de hidrogeno intramoleculares formados en la estructura cristalina, esto se correlaciona con el cuantioso aumento en la solubilidad que se observa al sustituir alguno de los grupos hidroxilos formadores de puente de hidrogeno.<sup>74</sup>



**Figura 11.** Estructura química de la  $\beta$ -CD, señalando sus posibles posiciones de sustitución 2, 3 y 6 (en rojo).

La baja solubilidad de las CDs naturales puede implicar que los complejos que se formen con moléculas lipófilas sean también poco solubles, resultando en la precipitación de los mismos.<sup>72</sup>

Por este motivo y por sus efectos adversos (por ejemplo nefrotoxicidad y efecto hemolítico), la  $\beta$ -CD no se utiliza en formulaciones parenterales, pero sí en numerosas formulaciones orales, tópicas, bucales y rectales, ya que no se absorbe significativamente por estas vías. Esto se debe a su alto peso molecular y a su hidrofiliidad, teniendo un gran número de donores y aceptores de hidrogeno.<sup>72</sup> Por otro lado, la capacidad que poseen las CDs para extraer componentes lipídicos de las membranas celulares (colesterol y fosfolípidos) pueden explicar sus efectos hemolítico y nefrotóxico.<sup>75</sup>

### **1.2.1.2 Modificaciones químicas de la $\beta$ -ciclodextrina**

El empleo de las CDs en el diseño de sistemas terapéuticos tiene como función principal mejorar la solubilidad acuosa de IFAs poco solubles en agua mediante la formación de complejos de inclusión-asociación.

Como ya se ha mencionado, una de las mayores limitaciones de la  $\beta$ -CD (Figura 11) es su escasa solubilidad en agua, debido a su estructura cristalina. La sustitución de los hidroxilos correspondientes a los carbonos 2, 3 y 6 de las unidades de glucopiranosas de la  $\beta$ -CD incrementa la solubilidad de la misma, incluso cuando se sustituye con

grupos lipófilos.<sup>72</sup> La modificación de la  $\beta$ -CD produce una mejora en la solubilidad mediante al menos dos mecanismos:

- Ruptura de los enlaces de hidrógeno en entre los hidroxilos 2 y 3.
- Impedimento de la cristalización como consecuencia de la sustitución aleatoria presentando diferentes isómeros y dando lugar compuestos amorfos.

La modificación química produce una mezcla compleja debido a todas las combinaciones posibles de sustituciones. La  $\beta$ -CD presenta 21 grupos hidroxilos que pueden modificarse químicamente, (de los cuales, los que corresponden a los C-6 son los más reactivos y los asociados a C-3 los menos reactivos) y por lo tanto  $2^{21}-1$  posibles combinaciones de sustituciones. Además, el núcleo  $\beta$ -CD contiene 28 centros quirales con lo cual el número de isómeros geométricos y ópticos que se producen a partir de la sustitución es extremadamente grande. Es razonable pensar entonces, que la funcionalidad como excipiente de estas mezclas de isómeros pueda variar con la extensión y el GS, razón por la cual, estos factores tienen que ser evaluados y especificados para el producto. En la práctica, esto se hace por analogía con otros almidones y celulosas modificados químicamente, tales como hidroxipropil-celulosa e hidroxipropilmetil-celulosa, entre otros.<sup>76</sup>

Además de afectar las propiedades fisicoquímicas de la  $\beta$ -CD, el tipo de sustituyente seleccionado para la modificación química y el GS, pueden influenciar tanto la formación como el desempeño del complejo molécula huésped: $\beta$ -CD.<sup>77</sup> Para el proceso de complejación, el tamaño de la cavidad de la CD debe ser adecuado para permitir el acomodamiento de la molécula huésped de un tamaño en particular.<sup>72</sup> Por otro lado, se encuentra reportado en la bibliografía que puede mejorarse la complejación cuando la CD y el IFA presentan cargas opuestas, en comparación con las CD neutras y las que presentan la misma carga.<sup>78,79</sup> De este modo, si se pretende diseñar derivados de  $\beta$ -CD con alta afinidad por fármacos con características básicas podrían introducirse grupos funcionales ácidos en la estructura. En el campo del desarrollo de excipientes, es imprescindible que el sustituyente seleccionado no sea tóxico por sí mismo, o formando parte del nuevo compuesto. En particular, los ácidos policarboxílicos que forman parte

del ciclo de Krebs representarían una opción viable y atractiva, debido a su biocompatibilidad, bajo costo y al mismo tiempo, su empleo representa un bajo impacto para el medio ambiente, por tratarse de recursos renovables y atóxicos. Por otro lado, se han reportado numerosas reacciones de esterificación y entrecruzamiento de polisacáridos (incluyendo CDs) empleando ácidos policarboxílicos como reactivo, especialmente ácido cítrico. Estas reacciones se basan en la formación del anhídrido del ácido policarboxílico por deshidratación mediante calentamiento en un medio con mínima cantidad de agua. El proceso de esterificación se ha llevado a cabo en presencia de agentes catalizadores como hipofosfito de sodio<sup>80,81</sup> y también en ausencia de los mismos, con el objetivo de simplificar el proceso de purificación, obteniéndose resultados similares.<sup>82,83</sup> Estas reacciones son altamente sustentables, debido a que se producen con elevados rendimientos y empleando reactivos “amigables” para el medio ambiente, dos premisas fundamentales para la denominada química verde.

Como ya fue discutido, el GS de los derivados de  $\beta$ -CD puede modificar de manera significativa el acomodamiento de la molécula huésped en el interior del anillo de la CD y por tanto su afinidad. El GS puede determinarse principalmente mediante espectrometría de masas, espectroscopía de RMN y cromatografía de exclusión molecular.

No sólo el GS es relevante para la formación de los complejos, sino también el patrón de sustitución. Como se mencionó anteriormente, la  $\beta$ -CD presenta tres sitios de sustitución posibles de los cuáles los sitios de sustitución 2 y 3 están situados en el borde más amplio de la CD (hidroxilos secundarios), mientras que el sitio de sustitución 6 se encuentra en el borde estrecho (hidroxilos primarios) (Figura 11). De modo que es lógico pensar que en el proceso de asociación, un sustituyente en la posición 6, podría afectar la formación de complejos de manera diferente que un sustituyente en las posiciones 2 o 3.

La identificación de los sitios de sustitución puede realizarse mediante el empleo numerosas técnicas de RMN en 2D, además de los experimentos en 1D. Dentro de los experimentos en 2D tradicionales se encuentra el  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC que muestra un

espectro de  $^1\text{H}$  a lo largo de un eje y un espectro de  $^{13}\text{C}$  a lo largo del otro eje. Los núcleos H y C unidos a un solo enlace dan lugar a picos de correlación y por lo tanto, las señales de  $^{13}\text{C}$  pueden ser asignadas si se identifican los protones unidos, y viceversa. Además, el experimento HSQC acoplado a DEPT, permite diferenciar los picos de metilo y de metino (carbonos que son positivos), de los picos de metileno (carbonos que son negativos). El experimento de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC es una técnica similar en la que los núcleos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  separados por dos, tres o cuatro enlaces presentan picos de correlación. La aplicación de estas técnicas reduce los problemas en la asignación de espectros en 1D que presentan picos superpuestos.<sup>84</sup> Además, se establecen las conectividades entre los núcleos, lo cual es una gran ayuda en la asignación de las señales.

De los tres tipos de grupos hidroxilo presentes en las CDs, los que se encuentran en la posición 6 son los más básicos (y muchas veces más nucleofílicos), los que están en la posición 2 son los más ácidos, y los que están en la posición 3 son los más inaccesibles.<sup>85</sup> Por lo tanto, en circunstancias normales, los reactivos electrofílicos atacan en la posición 6. Es importante destacar que los reactivos con mayor reactividad atacan los grupos hidroxilo menos selectivamente. De modo que, dichos reactivos no sólo reaccionan con los grupos hidroxilo ubicados en la posición 6 (hidroxilo primario), sino también los ubicados en las posiciones 2 y 3 (hidroxilos secundarios); mientras que, los reactivos que presentan menor reactividad sustituirán más selectivamente los grupos hidroxilo ubicados en la posición 6.<sup>86</sup>

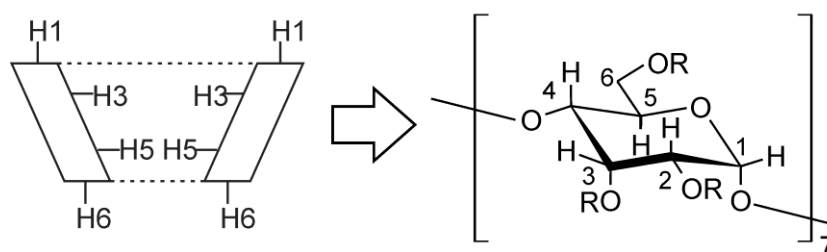
### **1.2.1.3 Metil- $\beta$ -Ciclodextrina**

La metil- $\beta$ -ciclodextrina (M- $\beta$ -CD) (Figura 12) es un derivado lipofílico de la  $\beta$ -CD, que presenta una mayor solubilidad en agua que la  $\beta$ -CD (> 500 mg/mL), pero se absorbe en mayor extensión a partir del tracto gastrointestinal,<sup>87</sup> lo que limita su administración por vía enteral debido a su potencial toxicidad. No se utiliza en formulaciones inyectables ya que se observan efectos tóxicos cuando se administra por vía parenteral debido a que posee una gran actividad de superficie y alta afinidad por el colesterol.<sup>72,74</sup>

Adicionalmente a sus propiedades de encapsulamiento molecular, se han reportado actividades terapéuticas para la M- $\beta$ -CD. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), ha aprobado su uso para el tratamiento de las enfermedades de Niemann-Pick y Tangier y se ha sugerido que puede tener aplicación en el tratamiento de la nefropatía diabética. Por otro lado, Llanos y colaboradores demostraron que el compuesto disminuye la resistencia a la insulina en ratones obesos diabéticos mediante mecanismos derivados de su capacidad de secuestrar el colesterol de las membranas celulares.<sup>88</sup>

#### 1.2.1.4 Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina

La HP- $\beta$ -CD (Figura 12) se obtiene por reacción de la  $\beta$ -CD en medio alcalino con óxido de propileno. El parámetro que caracteriza a este producto es el GS, expresado como el número de grupos hidroxilo sustituidos en una unidad de glucopiranososa.<sup>74</sup> Esta CD presenta una solubilidad en agua mucho mayor (> 600 mg/mL) y es menos tóxica que la  $\beta$ -CD. Se utiliza en numerosas formulaciones comerciales tanto en formas de administración oral como parenteral.<sup>72</sup>



$\beta$ -CD	R =	H
M- $\beta$ -CD	R =	H ó -CH <sub>3</sub>
HP- $\beta$ -CD	R =	H ó -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>

**Figura 12.** Estructuras químicas de las  $\beta$ -CDs empleadas en este trabajo de Tesis.

## **1.3 Enfermedades desatendidas**

Las enfermedades desatendidas u olvidadas son un conjunto de enfermedades infecciosas, en su mayoría parasitarias, que afectan principalmente a las poblaciones más vulnerables y con un limitado acceso a los servicios de salud; especialmente aquellos que viven en áreas rurales y en barrios marginales.<sup>89</sup>

Las enfermedades olvidadas siguen siendo una de las mayores causas de morbi-mortalidad a nivel mundial y representan una carga de enfermedad del 11%, según una evaluación de años de vida ajustados por discapacidad realizada en el 2010.<sup>90</sup>

Pedrique y colaboradores, han reportado que a pesar los esfuerzos en investigación y desarrollo, la falta de nuevos tratamientos para las enfermedades desatendidas es todavía persistente. De los 850 nuevos productos terapéuticos registrados durante el período 2000-2011, 37 (4%) fueron indicados para enfermedades olvidadas, que comprende 25 productos con una nueva indicación o formulación y ocho vacunas o productos biológicos. Sólo cuatro nuevas entidades químicas fueron aprobadas para enfermedades olvidadas (tres para la malaria y una para las enfermedades diarreicas), que representan el 1% de las 336 nuevas entidades químicas aprobadas durante el período de estudio. De 148.445 ensayos clínicos registrados al 31 de diciembre 2011, solamente 2.016 (1%) fueron para enfermedades olvidadas.<sup>91</sup>

En el marco del escaso descubrimiento de nuevos IFAs para el tratamiento de enfermedades desatendidas,<sup>92</sup> cabe destacar la importancia que adquiere el desarrollo de sistemas transportadores de IFAs poco solubles con el objeto de mejorar su actividad terapéutica.<sup>27</sup>

### **1.3.1 Triquinelosis**

La triquinelosis es una afección considerada por la Organización Mundial de la Salud como “una de las enfermedades desatendidas en las Américas” y se origina en las zonas rurales agrícolas y peri-urbanas. Esta patología, es una enfermedad zoonótica emergente y/o re-emergente en muchos lugares del mundo, producida por nemátodos

del género *Trichinella*, que se transmite por carnivorismo.<sup>93</sup> Si bien existen diversas especies dentro del género, el agente etiológico predominante en Argentina es *T. spiralis*.<sup>94,95</sup> Esta especie es la más importante en el ciclo evolutivo doméstico, en el cual se encuentra involucrado el hombre.<sup>96</sup> Se descubrió como una infección de los seres humanos y animales domésticos, razón por la cual durante muchos años las investigaciones se basaron en los vectores del ciclo evolutivo doméstico del parásito (cerdos y ratas sinantrópicas).<sup>97</sup> La principal fuente de infección en humanos es el consumo de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida y productos de carne de cerdo que no han sido sometidos a un control sanitario adecuado.<sup>98</sup> Los cerdos adquieren la infección mediante la ingestión de animales infectados, que encuentran en los criaderos o en los basurales, principalmente, ratas. Esto último, tiene lugar cuando son criados en malas condiciones higiénicas o cuando deben buscar su propia fuente de alimentación. Asimismo, en las ratas la infección se mantiene por sus hábitos de canibalismo.

Cuando una persona ingiere carne con larvas de *T. spiralis*, los jugos digestivos digieren la carne y las larvas quedan en libertad en el intestino, donde a las cuarenta y ocho horas se diferencian en machos y hembras. Estos nemátodos copulan en el lumen intestinal, los machos son eliminados con las deposiciones del hospedero y las hembras grávidas se introducen en la mucosa del duodeno y del yeyuno. Entre el tercero y quinto día, comienza la postura de las larvas que profundizan en la pared intestinal y llegan a la circulación general a través de los capilares y vasos linfáticos.<sup>99</sup> Si bien estas larvas se diseminan por todo el organismo, se enquistan sólo en la musculatura esquelética.<sup>100</sup> El enquistamiento consiste en la introducción de las larvas en las fibras esqueléticas, quedando rodeadas por una envoltura constituida por el sarcolema, transcurridos quince días desde la infección. Las larvas comienzan a invadir la musculatura esquelética alrededor del séptimo día de ocurrida la infección, y este proceso continúa mientras existan hembras grávidas en el intestino. El proceso de crecimiento y maduración de las larvas se completa transcurridos aproximadamente veinte días de la infección, resultando en larvas maduras (L<sub>1</sub>), que han crecido de aproximadamente 83 a 900 µm de

longitud y que son infectantes para los mamíferos al ser ingeridas.<sup>99</sup> El enquistamiento de las larvas se completa al cabo de un mes.

Por otro lado, los signos, síntomas y la gravedad del cuadro de la enfermedad están directamente relacionados con el número de larvas ingeridas y el estado del sistema inmune del hospedero.<sup>101</sup>

Desde su descubrimiento en 1835 por Owen y Piaget,<sup>102</sup> esta parasitosis no pudo ser erradicada. Hay muchos factores que intervienen, entre ellos, el complejo ciclo de vida *T. spiralis*, la falta de especificidad de huésped, las diferentes formas estructurales y los diversos nichos ecológicos a lo largo del ciclo. Además, la fase aguda de la infección no presenta signos patognomónicos y el diagnóstico de las personas infectadas se hace más complejo, cuando las larvas han invadido las células del músculo esquelético.<sup>98,103</sup>

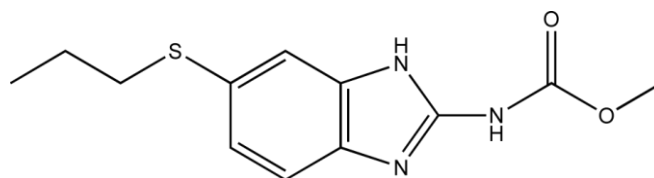
Es importante destacar que Argentina es un país con alto riesgo endémico de triquinelosis.<sup>93,100,104</sup> En la actualidad, los IFAs más comúnmente utilizados para el tratamiento de la triquinelosis son derivados de benzimidazol como albendazol (ABZ), flubendazol, mebendazol y tiabendazol.<sup>105</sup> Sin embargo, cuando se incluyen en las formas farmacéuticas convencionales, estos IFAs presentan una eficacia limitada para eliminar las larvas enquistadas en el músculo.<sup>106-108</sup>

### **1.3.1.1 Albendazol**

El ABZ (Figura 13), el éster metílico del ácido [5-(propil-tio)-1H-benzimidazol-2-il]carbámico, es un compuesto antihelmíntico ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones por nemátodos sistémicos y es de primera elección en el tratamiento de la triquinelosis.<sup>109,110</sup> Es también, la primera opción para el tratamiento de la cisticercosis y la hidatidosis quística, sobre todo en los casos diseminados o inoperables y en el tratamiento pre-quirúrgico.<sup>109,111</sup> Sin embargo, su eficacia se encuentra limitada debido a su baja solubilidad en agua y su consecuente absorción errática.<sup>112</sup> La acción de este IFA contra los helmintos intestinales no depende de la concentración que se alcanza a

nivel sistémico, pero esta concentración es importante en el tratamiento de las patologías antes mencionadas.

En este trabajo de Tesis, se utilizó ABZ como modelo de IFA poco soluble en agua debido a su relevancia en el tratamiento de parasitosis endémicas en nuestro país y por estar incluido en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud. Estos medicamentos son aquellos que cubren las necesidades de atención de salud prioritarias de la población.<sup>113</sup> Su selección se hace atendiendo a la prevalencia de las enfermedades, a la evidencia de seguridad y eficacia.<sup>114,115</sup>



**Figura 13.** Estructura química del ABZ.

Los benzimidazoles ocasionan muchos cambios bioquímicos en los nemátodos susceptibles, por ejemplo, inhibición de la fumarato reductasa de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.<sup>116</sup> No obstante, numerosas publicaciones señalan que la acción primaria de ellos comprende la inhibición de la polimerización de microtúbulos al unirse a  $\beta$ -tubulina.<sup>112</sup> La toxicidad selectiva de dichos compuestos se debe a que presentan una afinidad mucho mayor por la  $\beta$ -tubulina del parásito con respecto a la de los mamíferos.<sup>8</sup>

El ABZ se presenta como un polvo blanco o levemente amarillento, fácilmente soluble en ácido fórmico y ácido acético, pobremente soluble en éter y cloroformo, prácticamente insoluble en etanol y en agua.<sup>117</sup> Este IFA, presenta dos valores de pKa de 2,68 y 11,83, manifestando características levemente básicas.<sup>118</sup> Es decir, su solubilidad se incrementa cuando el pH de la solución es bajo. A un valor de pH de 1,2, se reportó una solubilidad de 900  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que a un pH superior a 5, su solubilidad reportada fue incluso menor de 1  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>119,120</sup> Si bien existe una amplia

discusión sobre la clasificación de este IFA en cuanto al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, la mayoría de los autores encuadran a este fármaco como perteneciente a la clase II.<sup>121</sup> Es decir, que presenta una baja solubilidad acuosa pero una alta permeabilidad.<sup>24</sup>

Por otro lado, las propiedades de estado sólido pueden desempeñar un papel crucial en la velocidad de disolución y solubilidad, especialmente cuando están involucrados polimorfos con diferente estabilidad termodinámica. De hecho, las diferencias de empaque en el arreglo cristalino, así como en la energía reticular y la entropía a menudo resultan en cambios significativos en las propiedades físicas de los fármacos. Esto puede tener influencia en propiedades como la densidad, dureza, compresibilidad, índice de refracción, punto de fusión, entalpía de fusión, presión de vapor, solubilidad, velocidad de disolución e incluso el color, que pueden variar entre los diferentes polimorfos de un mismo compuesto.<sup>122</sup>

Fueron identificados dos polimorfos del ABZ, de los cuales la Forma I (metaestable a temperatura ambiente) corresponde a la forma comercializada del fármaco y la Forma II, fue aislada y caracterizada por Panzo y colaboradores en el 2011.<sup>123</sup> La Forma II se encuentra enantiótrópicamente relacionada a la Forma I, pero ambas son físicamente estables, debido a la alta barrera energética requerida para la activación de la interconversión.<sup>124</sup> Dos polimorfos son enantiótopos cuando la temperatura de transición se encuentra por debajo del punto de fusión de ambas formas polimórficas. La temperatura de transición es la temperatura a la cual los polimorfos tienen la misma estabilidad.<sup>125</sup>

Panzo y colaboradores concluyeron que el ABZ en estado sólido representa un sistema complejo, en el cuál las diferencias estructurales que pueden estar asociadas con el polimorfismo, son al menos de cuatro tipos o combinaciones entre ellas: a) tautoméricas, por ejemplo, que se encuentren ambos átomos de N del anillo benzimidazólico del ABZ protonados (correspondería a la Forma II), o que sólo uno de los átomos de N se encuentre protonado (como en el esquema convencional de la estructura química del ABZ que puede observarse en la Figura 13); b) diferentes

conformaciones de una o de las dos cadenas laterales unidas al sistema de anillos bicíclico; c) la existencia de desorden molecular o su ausencia y d) diferentes arreglos de puentes de hidrogeno en los dos polimorfos, sin diferencia en la estructura molecular.<sup>124,126</sup>

Se ha reportado que la distribución de cargas negativas se encuentra localizada en el nitrógeno del anillo aromático, el grupo carbonilo del residuo de carbamoilo y el oxígeno del éster. Mientras que la distribución de cargas positivas se encuentra en el protón del grupo amida y el protón del grupo amino del anillo aromático. En base a estos datos, se ha inferido que el ABZ puede participar de enlaces de puente hidrógeno tanto inter- como intramoleculares y que la contribución de las diferentes estructuras dependería de las interacciones del ABZ con su entorno.<sup>127</sup>

## 1.4 Diseño experimental

El diseño experimental se puede definir como una estrategia, basada en métodos estadísticos, para la creación de experimentos de manera eficiente, sistemática y precisa, que brindará información segura y coherente.<sup>128</sup> La importancia del empleo del diseño experimental en procesos de desarrollo, radica en que muchas veces un proceso inadecuado de planificación y diseño de los experimentos puede conducir a que los mismos no cumplan con su propósito.<sup>129</sup>

Un factor o variable independiente, es cualquier aspecto de las condiciones experimentales que puede tener efecto sobre el resultado de un experimento (respuesta o variable dependiente). Estos factores pueden ser cualitativos o cuantitativos y los diferentes valores que pueden tomar los mismos se denominan niveles.<sup>129</sup> Debido a que normalmente son numerosos los factores que pueden afectar la respuesta del sistema estudiado (haciendo prácticamente imposible identificar y controlar las pequeñas contribuciones de cada uno de ellos), se hace necesario seleccionar aquellos factores que tienen un mayor efecto sobre la misma.<sup>130</sup> Para ello se llevan a cabo experimentos con el objetivo de determinar relaciones (usualmente en forma de modelos

matemáticos) entre factores que pueden influir sobre un sistema y las respuestas o propiedades del mismo.<sup>131</sup>

Una de las formas tradicionales para hallar cuales factores tienen efecto sobre una respuesta, sería variar un factor a la vez. Esta metodología puede ser ineficiente y arribar a resultados engañosos, y en líneas generales debería ser evitada.<sup>132,133</sup> Otra manera de abordar esta problemática sería emplear un diseño estadístico que permita variar todos los factores a la vez.

El término diseño experimental, se emplea normalmente para referirse a las etapas de:<sup>129,130</sup>

- Identificar los factores que pueden tener influencia sobre el resultado de un experimento.
- Diseño del experimento de modo que se minimicen los efectos de los factores que no pueden controlarse.
- Utilización del análisis estadístico para evaluar los efectos de los factores implicados.

Los diseños factoriales completos, que estudian todos los factores que afectan a la variable respuesta, empleando al menos dos niveles por factor, pueden dar un número inaceptablemente grande de experimentos. Esto se debe a que incluso los sistemas que parecen simples pueden encontrarse afectados por un gran número de factores. Por otro lado, muchos de los factores estudiados pueden afectar a la respuesta interactivamente, es decir, el efecto de un factor puede depender de los niveles de otros. Cualquier interacción entre los factores debe ser distinguida de los errores aleatorios en las mediciones.<sup>134</sup> De modo que es más común el uso de diseños factoriales parciales, que proporcionan menor información sobre algunos aspectos como las interacciones, con el objetivo de conseguir un número manejable de experimentos.<sup>135</sup>

Un diseño muy utilizado y económico, que aporta información sobre los factores individuales pero no sobre las interacciones es el método de Plackett-Burman.<sup>128</sup> Este

diseño es muy adecuado para las pruebas de robutez, por ejemplo establecer si el resultado de una técnica analítica se ve afectado por variaciones en determinados factores.<sup>136</sup> La característica de estos diseños es que están compuestos por un número de experimentos múltiplo de 4 (4n experimentos, donde n=1, 2, 3...). El número máximo de factores que pueden evaluarse con un diseño determinado es 4n – 1.<sup>137</sup> Estos diseños incluyen unos factores llamados “ficticios”, que no tienen significado químico. Sin embargo, los efectos aparentes de estos factores “ficticios” se pueden utilizar para estimar los errores aleatorios de las determinaciones.<sup>138</sup> Cuanto más factores “ficticios” haya en el diseño, mejor es la estimación de este tipo de errores, por lo que no es raro que se emplee un diseño de Plackett-Burman con un número de experimentos superior que el estrictamente necesario, consiguiendo así una información de mayor calidad en la evaluación de la influencia de un factor sobre la respuesta.<sup>134</sup>

El diseño de Plackett-Burman emplea dos niveles por cada factor, los cuales normalmente se denominan “+” para el valor más alto y “-” para el más bajo. Otra característica del diseño es que asigna de manera cíclica el “+” y el “-” para cada experimento.<sup>137</sup> Los efectos para cada factor sobre la respuesta pueden estimarse mediante la ecuación [2]:<sup>139</sup>

$$\text{Efecto} = \frac{2 \times [\sum (y+) - \sum (y-)]}{N} \quad [2]$$

Donde “N” es el número de experimentos, “y+” son los valores de la respuesta obtenidos para el valor más alto del factor, e “y-” son los valores de la respuesta para el valor más bajo del mismo.<sup>136</sup>

La significancia de cada factor se evalúa empleando cálculos asociados al análisis de la varianza (ANOVA). La suma de cuadrados para cada factor en un diseño a dos niveles se calcula mediante la ecuación [3]:<sup>134</sup>

$$\text{Suma de cuadrados} = N \times \frac{(\text{efecto estimado})^2}{4} \quad [3]$$

Cada una de las sumas de cuadrados tiene un grado de libertad, por lo que dicha suma es igual al cuadrado medio. El error aleatorio se estima promediando la suma de cuadrados de los factores “ficticios” y dividiéndolo por el número de los mismos (que serían los grados de libertad). Cada uno de los factores se compara con el error aleatorio estimado, mediante una prueba F de una sola cola con un nivel de significancia de  $p=0,05$ .<sup>134</sup>

Posteriormente a la determinación de los factores influyentes sobre la respuesta, se pueden emplear diseños para optimizar los valores de los factores de modo de obtener las mejores condiciones que permitan obtener un sistema con las características buscadas. La metodología de superficie de respuesta incluye una serie de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de los datos a ecuaciones polinómicas, las cuales deben describir el comportamiento de un grupo de datos con el objetivo de hacer predicciones estadísticas.<sup>140</sup> Esta metodología puede ser aplicada cuando una o varias respuestas de interés son afectadas por diferentes variables. El objetivo principal es optimizar los niveles de las distintas variables para obtener un sistema con el mejor desempeño.<sup>131</sup> Cuando se optimizan varias respuestas al mismo tiempo, se suele recurrir a la función de deseabilidad ( $D$ ), que es una relación de compromiso entre los valores óptimos de todas las variables a optimizar.<sup>141</sup>

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue diseñar, preparar, caracterizar y evaluar sistemas transportadores de albendazol.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Generar nuevos sistemas transportadores a partir de interacciones iónicas entre diferentes polímeros.
- Formular micropartículas poliméricas como sistemas transportadores que permitan incrementar la solubilidad y velocidad de disolución del albendazol.
- Generar y caracterizar nuevos sistemas transportadores a partir de modificaciones químicas de macromoléculas (ciclodextrinas).
- Caracterizar las macromoléculas obtenidas mediante espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Evaluar la interacción del albendazol con las macromoléculas obtenidas mediante diagramas de solubilidad de fase, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Obtener complejos de inclusión entre el albendazol y las macromoléculas en estado sólido.
- Identificar las estructuras sólidas obtenidas (complejos de inclusión-asociación) por difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de infrarrojo.
- Analizar la morfología de los sistemas obtenidos por microscopía electrónica de barrido.

- Caracterizar fisicoquímicamente a los sistemas obtenidos mediante estudios de velocidad de disolución y solubilidad.
- Evaluar la eficacia antiparasitaria del albendazol incluido en los sistemas estudiados durante la fase aguda y parenteral de la infección por *Trichinella spiralis* en un modelo murino.
- Evaluar la irritación gástrica producida por el albendazol y por el complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina en un modelo murino.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Materiales

El ABZ, Q, P y CMC, Laboratorio Parafarm, fueron adquiridos en Droguería Saporiti (Argentina). La  $\beta$ -CD fue donada por Roquette SA (Francia). El D<sub>2</sub>O, ácido cítrico, ácido succínico, ácido itacónico, 1-bromo-hexano, carbonildiimidazol, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y albendazol sulfóxido (ABZSO) fueron obtenidos en SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (USA). El alcohol isopropílico, el ácido acético, ácido fórmico, etanol absoluto, cloroformo, éter etílico, metanol, acetato de etilo, N-N-dimetilformamida, HCl y NaOH fueron de Laboratorios Cicarelli (Argentina). El DMSO y el NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O se adquirieron en Anhedra (Argentina). El agua y el metanol para los ensayos de ESI-TOF-MS, fueron adquiridos en Carlo Erba (Argentina). El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Formulación de sistemas microparticulados

##### 3.2.1.1 Caracterización de los polímeros empleados en la formulación de los sistemas microparticulados

###### 3.2.1.1.1 Caracterización del quitosano

###### 3.2.1.1.1.1 Determinación del grado de desacetilación

###### A. *Determinación del grado de desacetilación por titulación ácido-base*

Esta determinación se realizó mediante titulación potenciométrica ácido-base por los métodos de Boussignac y colaboradores;<sup>54</sup> Ke y colaboradores;<sup>55</sup> y Jiang y colaboradores.<sup>53</sup>

Para los tres métodos las muestras se prepararon de igual forma: se disolvieron 200,0 mg de Q exactamente pesados en 25,00 mL de HCl 0,1 M, esta solución se llevó a 100 mL con agua destilada y se ajustó la fuerza iónica a 0,1 con KCl. Se tituló el exceso de ácido en la muestra anterior con una solución de NaOH 0,1 M/ KCl 0,1 M estandarizado contra un patrón primario de ftalato ácido de potasio.<sup>53</sup> El pH fue monitoreado con un electrodo de membrana de vidrio calibrado sensible a pH. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

En el caso de la determinación de los dos puntos de inflexión (Broussignac) se prosiguió la valoración hasta que se observaron ambos saltos. Los volúmenes equivalentes ( $V_e$ ) se determinaron por el método de las derivadas, empleando para el cálculo de GD la ecuación [4].

$$GD = \frac{\Delta V \times C_{NaOH} \times 10^{-3} \times 16}{m \times 0,0994} \quad [4]$$

donde  $\Delta V$  es la diferencia de volumen de NaOH gastado entre ambos puntos de inflexión,  $C_{NaOH}$  es la concentración de NaOH ( $\text{mol. L}^{-1}$ ); m, es el peso de la muestra de Q, los valores 16 y 0,0994 están relacionados con el peso molecular y la cantidad teórica de grupos amino.<sup>142</sup>

En el método de Ke y colaboradores, se utilizó la ecuación [5] para la determinación del  $V_e$  y el GD se calculó mediante la ecuación [6].<sup>55</sup>

$$V = V_e - \frac{V_o + V}{C_B} [H^+] - [OH^-] \quad [5]$$

donde  $V_o$  es el volumen de la solución de Q antes de la valoración, V es el volumen de base fuerte agregada y  $C_B$  es la concentración del titulante. Se graficó la función [5] y de la intersección de esta función lineal con el eje V se obtuvo el  $V_e$ . El GD se calculó mediante la ecuación [6]:

$$GD = \frac{d}{\frac{m - 161 \times d}{204} + d} \times 100 \quad d = C_1 V_1 - C_b V_e \quad [6]$$

donde  $C_1$  y  $V_1$  son la concentración y el volumen de HCl empleado para disolver la masa de Q (m).

En el método de Jiang y colaboradores, se emplearon las ecuaciones [7], [8] y [9] para calcular el  $V_e$ , empleando también la ecuación [6] para el cálculo del GD.<sup>53</sup>

$$Y = V_e + K_a X \quad [7]$$

$$Y = V + \frac{V_o + V}{C_B} [H^+] - [OH^-] \quad [8]$$

$$X = \frac{C_1 V_1}{C_B [H^+]} + \frac{K_w (V_o + V)}{C_B [H^+]^2} - \frac{(V_o + V)}{C_B} - \frac{V}{[H^+]} \quad [9]$$

donde  $K_a$  y  $K_w$  son la constante de disociación del Q y del agua, respectivamente.

#### *B. Determinación del grado de desacetilación por RMN*

Con el fin de identificar y caracterizar la estructura del Q empleado; se disolvieron 10 mg del polímero en 1 mL de DCl (1 % v/v) y se registraron los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC. El equipo empleado fue un espectrómetro de RMN Bruker, Avance 300 MHz. Una vez identificados los protones de interés se calculó el GD según Lavertu y colaboradores (2003),<sup>143</sup> mediante la ecuación [10]:

$$GD (\%) = \frac{100 \times H-1D}{(H-1D + H-Ac/3)} \quad [10]$$

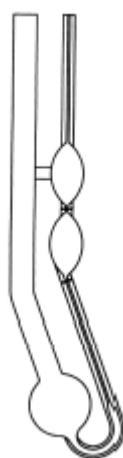
donde H-1D y H-Ac, corresponden a las integrales de las señales del protón anomérico del monómero desacetilado y a los tres protones del grupo N-acetilo, respectivamente.

#### **3.2.1.1.1.2 Determinación del peso molecular promedio por viscosimetría**

Para determinar el  $M_v$  del polímero se realizaron soluciones diluidas del mismo a varias concentraciones, se les determinó la viscosidad y se graficó  $\eta_{sp}/c$  versus  $c$ . Para ello, se realizaron 5 soluciones de Q con las siguientes concentraciones 0,1; 0,15; 0,2;

0,3 y 0,4 % p/v, cada una de ellas por triplicado. El solvente utilizado para disolver el polímero fue una solución acuosa de ácido acético 0,2 M y acetato de sodio 0,1 M.<sup>144</sup>

Las mediciones de la viscosidad se llevaron a cabo con un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske n° 75 (Figura 14), en un baño termostatzado a 30 °C. Se introdujeron en el viscosímetro 10,00 mL de solución, se dejó estabilizar la temperatura durante 5 min. Se procedió a medir el tiempo (t) que demoró la solución en atravesar los dos enrrases del capilar.



**Figura 14.** Viscosímetro capilar de Ostwald-Cannon-Fenske.

El mismo procedimiento se repitió 10 veces con cada solución y para el disolvente puro ( $t_0$ ). Debido a que se trabajó con soluciones muy diluidas de polímeros, su densidad ( $\rho$ ) fue prácticamente idéntica a la del disolvente puro ( $\rho_0$ ) y el cálculo de  $\eta_{rel}$  (ecuación [11]) pudo simplificarse a  $t/t_0$ .

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho \cdot t}{\rho_0 \cdot t_0} \quad [11]$$

Teniendo en consideración lo anteriormente mencionado, sobre la densidad de las soluciones, la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ) se calculó mediante la ecuación [12]:

$$\eta_{sp} = \frac{t}{t_0} - 1 = \eta_{rel} - 1 \quad [12]$$

Por lo tanto la  $\eta_{red}$  fue calculada según la ecuación [13]:<sup>69</sup>

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/C = t/t_o - 1 / C \quad [13]$$

donde C, es la concentración del polímero.

Con los datos anteriores se obtuvo la gráfica de la  $\eta_{red}$  versus la concentración de Q y se verificó linealidad. De la ecuación de la recta se obtuvo la  $[\eta]$  que se corresponde con la ordenada al origen (ecuación [14]).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{\eta_{rel} - 1}{C} = \eta_{red} = \eta + k_1 \cdot \eta^2 \cdot C \quad [14]$$

De acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink (ecuación [15]) se calculó el  $M_v$ :

$$\eta = K \cdot M_v^\alpha \quad [15]$$

donde, K y  $\alpha$  son constantes características del sistema polímero – solvente.<sup>142,145</sup>

Los valores de K y  $\alpha$  fueron  $1,64 \cdot 10^{-30} \cdot GD^{14}$  y  $-1,02 \cdot 10^{-2} \cdot GD + 1,82$ , respectivamente.<sup>142,144-146</sup> El valor de GD empleado para calcular K, fue el obtenido en la caracterización de Q y se encontró expresado en porcentaje.

### 3.2.1.1.2 Caracterización de la pectina

#### 3.2.1.1.2.1 Determinación del grado de esterificación por espectroscopía de infrarrojo

La P se secó en estufa de vacío durante 72 h a 60 °C, se realizó el espectro en un espectrómetro FT-IR-Prestige-21 (Shimadzu, Tokio, Japón) empleando el método de la pastilla de BrK (1 mg de muestra en 100 mg de KBr). El rango de escaneo fue de 450 a 3900  $cm^{-1}$ . La determinación del grado de esterificación (GE) se llevó a cabo comparando las áreas de dos bandas obtenidas en el espectro de IR, una a 1636  $cm^{-1}$  que corresponde a los grupos carbonilos libres y otra a 1740  $cm^{-1}$  correspondientes a los carbonilos unidos a los grupos éster.<sup>147</sup> El GE se calculó según la ecuación [16]:

$$GE (\%) = \frac{A_{1740}}{(A_{1740} + A_{1636})} \times 100 \quad [16]$$

donde  $A_{1636}$  y  $A_{1740}$ , son las áreas correspondientes a los picos a  $1636 \text{ cm}^{-1}$  y  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>148,149</sup>

#### **3.2.1.1.2.2 Determinación del peso molecular promedio por viscosimetría**

La determinación del  $M_v$  de la P se realizó utilizando un procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.1.1.1.2, con la salvedad que las mediciones se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y el sistema de solventes empleado para disolver el polímero fue una solución de NaCl 0,09 M. El cálculo del  $M_v$  se realizó utilizando la ecuación [15], empleando los valores de  $K = 9,55 \cdot 10^{-2} \text{ mL/g}$  y  $\alpha = 0,73$ , reportados por Anger y Berth.<sup>150-152</sup>

#### **3.2.1.1.3 Caracterización de la carboximetilcelulosa sódica**

##### **3.2.1.1.3.1 Determinación del grado de sustitución por titulación ácido-base**

Se determinó el GS mediante el método reportado en la norma ASTM D1439/03. Para realizar esta determinación se procedió a la conversión de la CMC en su forma ácida. Para ello, se pesaron 4,0 g de CMC, se suspendieron en 75 mL de etanol ( $96^\circ$ ), y posteriormente se adicionaron 5 mL de  $\text{HNO}_3$ . Se calentó la mezcla hasta ebullición durante 5 min y se dejó decantar la carboximetilcelulosa ácida suspendida. El precipitado se lavó con 150 mL etanol ( $80^\circ$ ) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , manteniéndolo con agitación mecánica durante 10 min, y se filtró. Este último procedimiento de lavado, se repitió hasta eliminar el exceso de ácido. Finalmente, la carboximetilcelulosa ácida retenida en el filtro se lavó con una pequeña cantidad de metanol anhidro y se secó en estufa durante 3 h a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>153</sup>

Para llevar a cabo la valoración se pesaron 0,5000 g carboximetilcelulosa ácida, se añadieron 25,00 mL de una solución de NaOH 0,3 M y 100 mL de agua, se calentó esta solución hasta ebullición y se mantuvo durante 20 min. Se valoró el exceso de NaOH con una solución de HCl 0,3 M, mientras la solución a valorar se encontraba a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . El cálculo del GS se realizó empleando las ecuaciones [17] y [18]:<sup>66,153</sup>

$$A = \frac{B \times C - D \times E}{F} \quad [17]$$

$$GS = \frac{0,162 \times A}{(1 - 0,058 \times A)} \quad [18]$$

donde:

A = miliequivalentes de ácido consumidos por cada g de muestra

B = mL de NaOH añadidos

C = molaridad del NaOH

D = mL de HCl consumidos

E = molaridad del HCl

F= gramos de muestra empleados en la valoración

Además, los valores 0,162 y 0,058, se encuentran relacionados al peso molecular de la unidad de glucosa y al peso molecular del sustituyente carboximetilo, respectivamente.

### **3.2.1.1.3.2 Determinación del peso molecular promedio por viscosimetría**

La determinación del  $M_v$  de la CMC, se realizó utilizando un procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.1.1.1.2, exceptuando que las mediciones se realizaron a 25 °C y el sistema de solventes empleado para disolver el polímero fue una solución de NaOH 0,5 M. El cálculo del  $M_v$  se realizó utilizando la ecuación [15], empleando los valores de  $K = 5,37 \cdot 10^{-4}$  dL/g y  $\alpha = 0,73$ .<sup>154</sup>

### **3.2.1.2 Formulación de micropartículas poliméricas**

Para la formulación de la micropartículas poliméricas se recurrió a la formación de un complejo polielectrolítico compuesto por Q, CMC y P. Las micropartículas formuladas fueron del tipo matricial.

Como herramienta para optimizar el sistema se utilizaron diseños experimentales. En una primera fase del diseño se evaluaron los factores (concentración de Q, P y CMC) en orden de identificar aquellos que ejercían un efecto significativo sobre las respuestas: rendimiento (R), eficiencia de encapsulación (EE), porcentaje de IFA disuelto a los 30 ( $Q_{30}$ ) y a los 60 min del ensayo de disolución ( $Q_{60}$ ). El diseño experimental seleccionado para realizar esta tarea fue el Plackett-Burman (Tabla IV, pág. 75) evaluando los factores a tres niveles y adicionando un punto central por triplicado. Se realizó un test ANOVA a los datos experimentales correspondientes al diseño, empleando el efecto de las variables “ficticias” para obtener una estimación de los errores estándares de los coeficientes. En la fase de optimización se utilizó un diseño central compuesto (Tabla V, pág. 77) con objeto de hallar las condiciones experimentales en las cuáles el sistema en estudio presenta valores máximos para cada respuesta. Debido a que se planteó optimizar varias respuestas simultáneamente se recurrió a la función *D*.

### **Las partículas se elaboraron en tres etapas:**

#### **1) Preparación de las siguientes soluciones:**

##### *A- Solución de ABZ y Q en ácido acético al 30 % v/v*

- Se solubilizaron 100 mg de ABZ en 30 mL de ácido acético bajo agitación magnética (750 rpm durante 5 min).
- Se incorporaron 70 mL de agua destilada (750 rpm durante 5 min).
- Se dispersó el Q con ayuda de agitación magnética (750 rpm durante 60 min).
- Se verificó el pH.

##### *B- Solución de P en agua*

- Se dispersó la P en 100 mL agua destilada bajo agitación magnética (750 rpm durante 2 h)
- Se verificó el pH.

- *C- Solución de CMC en agua*

- Se dispersó la CMC en 100 mL de agua destilada bajo agitación magnética (750 rpm durante 2 h)
- Se verificó el pH.

Las cantidades de Q, P y CMC empleadas en la preparación de las soluciones A, B y C variaron según lo planteado en el diseño experimental (Tabla IV, Pág. 75 y Tabla V, Pág. 77)

### **2) Mezclado de las soluciones según el diseño experimental:**

- Se calentó la solución A a 50 °C bajo agitación magnética.
- Se mezclaron las soluciones B y C, luego se calentó a 45-50 °C.
- Se incorporó lentamente la mezcla de B y C sobre la solución de A con agitación magnética a 1000 rpm, de manera de evitar la coacervación.
- Se verificó el pH.

### **3) Secado por aspersión**

- Para llevar a cabo esta etapa se utilizó el equipo Mini Spray Dryer Buchi B-290 (Suiza). Las condiciones de secado seleccionadas fueron las siguientes: temperatura de entrada de aire filtrado: 130°C y de salida: 70 °C; flujo de aire: 38 m<sup>3</sup>/h, velocidad de alimentación: 5 mL/min, la eficiencia de aspiración: 100 %.
- Una vez que se estabilizó el equipo, se procedió a secar la muestra en el equipo.
- Se pesó el producto obtenido.

#### **3.2.1.3 Programas**

Se empleó el programa Design Expert version 7.0.3 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) para realizar los diseños experimentales, los ajustes polinómicos y los ANOVA.

#### **3.2.1.4 Determinación del rendimiento**

El R se calculó empleando la ecuación [19], como la proporción entre el peso de las partículas que se obtuvo experimentalmente ( $P_{\text{producto}}$ ) y la suma de los pesos de todos los componentes del sistema:

$$R (\%) = \frac{P_{\text{Producto}}}{P_{\text{ABZ}} + P_{\text{Q}} + P_{\text{P}} + P_{\text{CMC}}} \quad [19]$$

siendo  $P_{\text{ABZ}}$ ,  $P_{\text{Q}}$ ,  $P_{\text{P}}$  y  $P_{\text{CMC}}$ , los pesos de ABZ, Q, P y CMC incorporados respectivamente.

#### **3.2.1.5 Determinación del título de las micropartículas**

La determinación del título del ABZ incluido en las micropartículas se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV, empleando un espectrofotómetro Boeco S-26 UV-Vis (Alemania). Para ello, se realizó un barrido espectral y posteriormente, la correspondiente curva de calibración para el ABZ disuelto en HCl 0,1 M, a la longitud de onda del máximo de absorción (292 nm). Se pesaron 20,0 mg de partículas, a los cuales se le incorporaron 50 mL de HCl 0,1 M y se agitó a 220 rpm en un agitador elíptico durante 24 h. Posteriormente, la solución se llevó a 100 mL con HCl 0,1 M en un matraz, se filtró y se determinó la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 292 nm. Se calculó la concentración de ABZ microencapsulado, interpolando el valor de absorbancia obtenido en la curva de calibración.

#### **3.2.1.6 Cálculo de la eficiencia de encapsulación**

La EE % fue calculada mediante la ecuación [20]:

$$EE (\%) = \frac{ABZ_r}{ABZ_t} \times 100 \quad [20]$$

donde  $ABZ_r$  es el contenido de ABZ obtenido en la titulación y  $ABZ_t$  es el contenido teórico de dicho IFA en las micropartículas.

### **3.2.1.7 Estudios de solubilidad aparente**

La determinación de la solubilidad aparente en agua del ABZ incluido en las micropartículas formuladas, se realizó adicionando un exceso del complejo a 10,00 mL de agua destilada y manteniendo el sistema en agitación constante durante 72 h en un agitador elíptico a 200 rpm. Transcurrido el tiempo estipulado se filtraron las soluciones a través de un filtro de 0,45 µm y se determinaron las concentraciones de las mismas por espectrofotometría UV. Se empleó un espectrofotómetro Boeco S-26 (Alemania), la longitud de onda a la cual se realizaron las mediciones fue 292 nm.

### **3.2.1.8 Estudios de velocidad de disolución**

Las micropartículas se sometieron a ensayos de disolución en un aparato de disolución estándar USP (Hanson Research SR8 Plus, Chatsworth, USA), equipado con paletas rotacionales (50 rpm). Para realizar este ensayo se siguieron las condiciones descritas en la USP XXXII.<sup>155</sup> El medio de disolución (900 mL de HCl 0,1 N) se mantuvo a 37°C. Las micropartículas conteniendo ABZ (100 mg) se introdujeron en los vasos y se tomaron muestras de 5 mL a través de un filtro a los siguientes tiempos: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 min. Se determinó la concentración de las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 292 nm.

La determinación de la eficiencia de disolución (ED) se realizó empleando la ecuación [21]:

$$ED \% = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100 \quad [21]$$

donde y es el porcentaje de IFA disuelto al tiempo t, e  $y_{100}$  es porcentaje máximo de IFA disuelto.

### **3.2.1.9 Calorimetría diferencial de barrido**

Se realizaron análisis de calorimetría diferencial de barrido (CDB) para el ABZ y las micropartículas formuladas, empleado un calorímetro diferencial de barrido

Shimadzu TA-60 con rango de temperatura entre -150 y 600°C. El ensayo se realizó en un rango de temperaturas de 25 a 350 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> (velocidad de flujo de 30 mL/min).

### **3.2.1.10 Difracción de rayos X**

Se registraron los patrones de difracción de rayos X (DRX) para el ABZ y las micropartículas formuladas para estudiar la estructura al estado sólido de los mismos. El equipo que se utilizó fue un difractómetro X'Pert Phillips 5000 (Países Bajos), en modo de reflexión a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron empleando Cu (K $\alpha$ ), monocromador ( $\lambda=1,540562$  Å), utilizando radiación incidente. Las condiciones de medida fueron 40 kV, 20 mA y 0,02° (2 $\theta$ ).

### **3.2.1.11 Microscopía electrónica de barrido**

Se analizó la morfología de las micropartículas a partir de las micrografías obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido, Leitz SEM AMR 1600 T. Las muestras fueron previamente recubiertas con una capa de oro de manera de hacerlas conductivas.

El tamaño de partícula fue estimado empleando el programa para análisis de imágenes Image-pro Plus (IPP). El cálculo de distribución de tamaño de partícula, se realizó considerando el diámetro de 200 partículas.<sup>156</sup>

### **3.2.1.12 Estudios de estabilidad**

Se evaluó la estabilidad de las micropartículas luego de su conservación durante 14 meses a 25 °C, mediante la determinación de la concentración de ABZ por CLAE. Se empleó un equipo Hewlett-Packard serie 1100, equipado con un inyector manual, una bomba cuaternaria con desgasificador en línea por vacío y un detector con arreglo de diodos. La columna empleada fue una LiCroCART<sup>®</sup> 250-4 LiCrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (250 x 4 mm diámetro interno, 4  $\mu$ m).

La metodología fue una adaptación de la empleada en la Farmacopea Europea 8<sup>o</sup> Edición,<sup>157</sup> utilizando las siguientes condiciones: la fase móvil estuvo compuesta por una solución de (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,67 g/L) y metanol en una proporción 3:7, la velocidad de flujo fue de 0,7 mL/min, la detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm y el volumen de inyección fue de 20 µL. Bajo esas condiciones, el tiempo de retención para el ABZ fue de 11,2 min. La linealidad fue estudiada en el rango 2-100 µg/mL y el coeficiente de correlación fue 0,999. La especificidad del método fue evaluada mediante la determinación de la pureza de los picos empleando el detector de arreglo de diodos. Las microesferas fueron disueltas en 5 mL de metanol:ácido sulfúrico (99:1) y llevadas a 50 mL con fase móvil.

### **3.2.1.13 Determinación de la densidad aparente y la densidad empacada**

La densidad aparente (D<sub>o</sub>) y densidad empacada (D<sub>e</sub>) fueron determinadas de manera indirecta, como describe la Farmacopea Europea.<sup>157</sup> Una cantidad exactamente pesada de polvo (m), fue colocada en una probeta graduada y se midió su volumen (V<sub>o</sub>).

La D<sub>o</sub> de un polvo es una relación entre la masa de un polvo no compactado y su volumen, incluyendo la contribución de los espacios interparticulares. De este modo, la densidad aparente depende de la densidad de las partículas de polvo y del arreglo espacial de las partículas en el lecho del polvo. La D<sub>o</sub> fue determinada vertiendo lentamente la muestra en una probeta graduada hasta completar el 60 % del volumen del contenedor y conociendo su peso, fue calculada mediante la ecuación [22].

$$D_o = \frac{m}{V_o} \quad [22]$$

La densidad empacada (D<sub>e</sub>) fue determinada aplicando una fuerza controlada sobre la muestra. La probeta graduada con la muestra en su interior se sometió a impactos verticales hasta que el volumen final ocupado por el polvo se mantuvo constante, obteniendo el volumen final (V<sub>f</sub>). La D<sub>e</sub> se calculó empleando la ecuación [23].

$$D_e = \frac{m}{V_f} \quad [23]$$

La porosidad interparticular ( $I_e$ ) del polvo fue calculada mediante la ecuación [24]

$$I_e = \frac{(D_o - D_e)}{(D_o \times D_e)} \quad [24]$$

### **3.2.1.14 Determinación del índice Carr y el índice de Hausner**

El índice de Carr (IC) es un cociente entre  $D_o$  y  $D_e$  expresado como porcentaje. La compresibilidad porcentual da una idea de la cohesión, uniformidad de tamaño y el área superficial de los polvos. El IC se calculó mediante la ecuación [25]:

$$IC (\%) = \frac{(D_o - D_e)}{D_e} \times 100 \quad [25]$$

El índice de Hausner (IH) está relacionado con la fricción interparticular y fue calculado mediante la ecuación [26]:

$$IH = \frac{D_e}{D_o} \quad [26]$$

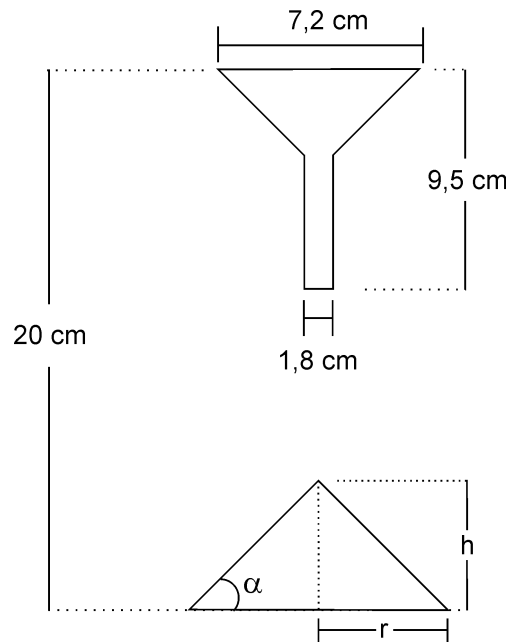
### **3.2.1.15 Determinación del ángulo de reposo**

Esta determinación se realizó haciendo pasar el material microparticulado a través del orificio de un embudo (altura de 9,5 cm, diámetro superior de 7,2 cm y diámetro interior de la parte inferior de 1,8 cm) sobre una placa de diámetro conocido, obteniendo de esta forma el material apilado en forma de cono. La altura y el radio del cono formado por el material al caer fueron medidas con un calibre (Figura 15).

El ángulo de reposo ( $\alpha$ ) se calculó empleando la ecuación [27]:

$$\alpha = \tan^{-1} \left( \frac{h}{r} \right) \quad [27]$$

donde  $h$  y  $r$ , son la altura y el radio de la base del cono formado, respectivamente.<sup>158</sup>



**Figura 15.** Esquematización de la determinación del ángulo de reposo.

### 3.2.1.16 Reproducibilidad entre lotes

Se evaluó la reproducibilidad en la disolución de las micropartículas realizadas en las condiciones óptimas de formulación. Para ello, se realizaron los ensayos de disolución *in vitro* de tres lotes de micropartículas, siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.1.8. Los datos se evaluaron mediante el cálculo de los factores de diferencia ( $f_1$ ) y de similitud ( $f_2$ ), que se realizó empleando de las ecuaciones [28] y [29], respectivamente.<sup>23</sup>

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \quad [28]$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad [29]$$

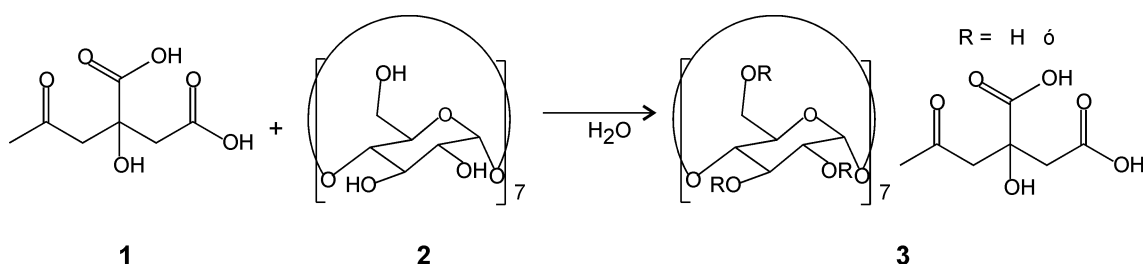
donde  $R_i$  y  $T_i$ , son los porcentajes disueltos promedio del IFA en la referencia y en la muestra, respectivamente.

## 3.2.2 Síntesis de derivados de $\beta$ -ciclodextrina

### 3.2.2.1 Síntesis de citrato- $\beta$ -ciclodextrina

La C- $\beta$ -CD se preparó mediante el método de la reacción semiseca.<sup>81</sup> Se disolvió el ácido cítrico (**1**; 10,57 mmol; 2,03 g) en agua (1,2 mL) formando una solución concentrada y a esta mezcla se le incorporó la  $\beta$ -CD (**2**; 1,76 mmol; 2,00 g) (Esquema 1).<sup>82</sup> La relación molar entre los reactivos fue 1 mol de  $\beta$ -CD y 6 moles de ácido cítrico. La cantidad de agua empleada fue 0,6 mL por g de  $\beta$ -CD. Se colocó la mezcla de reacción a reflujo a 100 °C por 4 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se eliminó el ácido cítrico remanente mediante la precipitación del producto de reacción con 15,0 mL de alcohol isopropílico (el ácido cítrico es soluble en este solvente) y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min (Microcentrífuga Mikro 220R, Hettich). El procedimiento de lavado y centrifugación se repitió hasta que el pH del sobrenadante fue neutro. El producto obtenido, C- $\beta$ -CD (**3**), se secó en estufa a 60°C durante 24 h.

**Esquema 1**

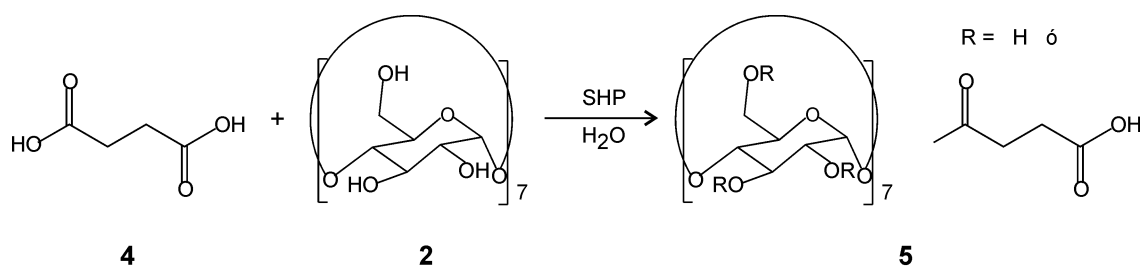


### 3.2.2.2 Síntesis de succinil- $\beta$ -ciclodextrina

Se disolvió el ácido succínico (**4**; 8,12 mmol; 959 mg) en agua (0,8 mL) formando una solución concentrada a la cual se le incorporó  $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$  (0,58 mmol; 63 mg) y

$\beta$ -CD (**2**; 1,16 mmol; 1316 mg) (Esquema 2). La relación molar entre los reactivos fue 1 mol de  $\beta$ -CD y 7 moles de ácido succínico. Se colocó la mezcla de reacción a reflujo a 118°C (temperatura a la cual se logró la disolución de todos los reactivos) durante 5 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se eliminó el ácido succínico y el  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  remanente mediante la precipitación del producto de reacción con 20 mL de etanol absoluto (el ácido succínico tiene una solubilidad de 0,6 M en este solvente).<sup>159</sup> Se filtró el precipitado y el procedimiento de lavado se repitió hasta que el pH del sobrenadante fue neutro. El producto obtenido, S- $\beta$ -CD (**5**), se secó en estufa a 60°C durante 24 h.

**Esquema 2**



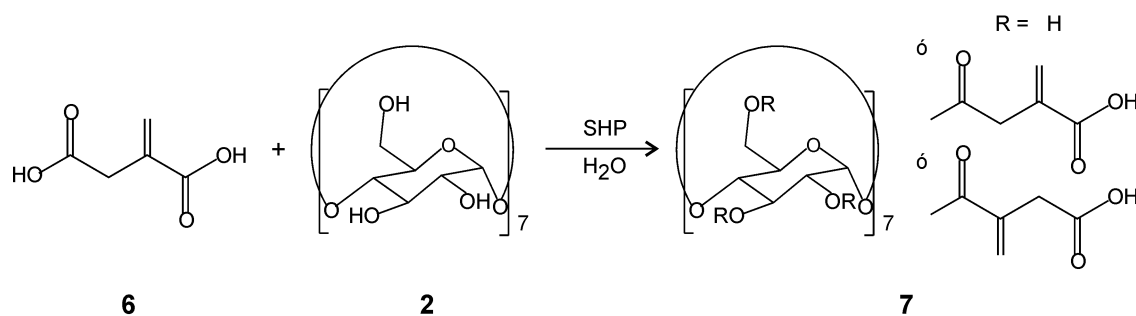
### 3.2.2.3 Síntesis itaconil- $\beta$ -ciclodextrina

La síntesis de I- $\beta$ -CD se llevó a cabo mediante dos procedimientos similares:

1- Reacción con calentamiento a reflujo: Se disolvió ácido itacónico (**6**; 8,12 mmol; 1056 mg) en agua (0,8 mL) formando una solución concentrada a la cual se le incorporó  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,58 mmol; 62,5 mg) y  $\beta$ -CD (**2**; 1,16 mmol; 1316 mg) (Esquema 3). La relación molar entre los reactivos fue 1 mol de  $\beta$ -CD y 7 moles de ácido itacónico. Se colocó la mezcla de reacción a reflujo a 100°C (temperatura a la cual se logra la disolución de todos los reactivos) durante 5 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se eliminó el  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  y el ácido itacónico remanente mediante la precipitación del producto de reacción con 20 mL de etanol absoluto. Se filtró el precipitado y el procedimiento de lavado se repitió hasta que el pH del sobrenadante fue neutro. El producto obtenido, I- $\beta$ -CD (**7**) se secó en estufa a 60°C durante 24 h.

2- Reacción con calentamiento en estufa: Se procedió de forma similar que en la reacción con calentamiento a reflujo, adicionando 436,6 mg (4,05 mmol) de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a la solución de **6** y **2**.

### Esquema 3



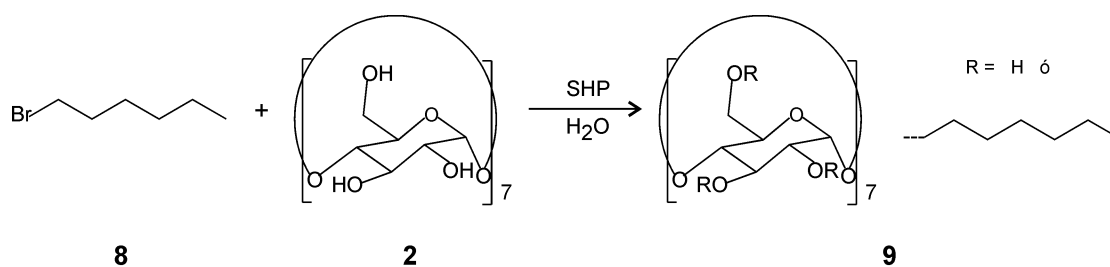
#### 3.2.2.4 Síntesis de hexil-β-ciclodextrina

A una solución de β-CD (**2**; 0,44 mmol; 500 mg) en DMSO anhidro (10 mL), se agregó Na(OH) (9,13 mmol; 365 mg), se dejó reaccionar durante 2 h a 60°C. Transcurrido el tiempo, se le adicionó 1-bromo-hexano (**8**; 9,13 mmol; 1507 mg) y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente 2 h, luego se calentó a 60°C durante 7 h (Esquema 4). La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se precipitó el producto de reacción (H-β-CD, **9**) mediante el agregado de agua. Posteriormente, se disolvió el precipitado en éter dietílico (inmiscible con el DMSO), y se purificó la muestra mediante dos procedimientos diferentes:

1-La fase etérea se colocó en una ampolla de decantación y se emulsionó con 10 mL agua, la fase emulsionada (que tenía como fase externa el agua) se separó y se centrifugó descartando el sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta que no se produjo emulsión en la fase acuosa. El producto obtenido se secó en estufa a 40°C.

2- Se evaporó el solvente (éter dietílico), se disolvió el producto obtenido en acetato de etilo y se precipitó mediante el agregado de hexano. El precipitado obtenido se filtró y se secó en estufa a 40°C.

#### Esquema 4



### 3.2.3 Caracterización estructural de $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina

#### 3.2.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución

Con el fin de identificar y caracterizar la estructura obtenida, se realizaron espectros de RMN. Los experimentos realizados fueron  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY 1D,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. El equipo empleado fue un espectrómetro de RMN Bruker, Avance 300 MHz.

#### 3.2.3.2 Espectrometría de masas

La determinación del peso molecular del producto obtenido, se realizó empleando un espectrómetro de masas micrOTOF-Q II de Bruker Daltonics. Para el análisis se disolvió 1 mg de la muestra en 1 mL de agua y luego se realizó una dilución 1/100 en agua. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: se empleó el método ESI, ventana del escaneo de 200 a 2000 m/z, presión del nebulizador de 0,4 bar, temperatura de 180 °C, flujo de gas seco de 4,0 L/min, voltaje del capilar de 4500 V, energía de colisión de 35 eV.

### **3.2.3.3 Determinación del grado de sustitución**

El número de hidroxilos promedio sustituidos por unidad de glucopiranososa del anillo de CD se determinó por RMN y por MS.

Bajo el supuesto de que el espectrómetro presenta la misma sensibilidad hacia todas las CDs que presentan diferente sustitución en la muestra, el GS se calculó mediante la ecuación [30]:

$$GS = \frac{\sum_i I_i \times GS_i}{\sum_i I_i} \quad [30]$$

donde "I<sub>i</sub>" y "GS<sub>i</sub>" denotan la intensidad y el GS del i-ésimo pico, respectivamente.

La determinación del GS de los derivados de β-CD se realizó también, a partir de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H. Para este análisis se emplearon las áreas de las nuevas señales generadas a partir de la sustitución. Esto se hizo de varias maneras empleando diferentes picos, dependiendo en cada caso de la resolución que hayan tenido del resto de las señales en el espectro, por lo que el cálculo y las señales seleccionadas dependieron de cada derivado en particular.

### **3.2.3.4 Determinación del contenido de carboxilos**

Para determinar el contenido de carboxilos presentes en la C-β-CD se realizó una titulación ácido-base. Se pesó una cantidad conocida del producto y se disolvió en un exceso conocido de NaOH 0,1 N (estandarizado con ftalato ácido de potasio) dejándolo en agitación durante 1 h. El exceso de NaOH se determinó por titulación con HCl 0,1 N empleando fenoftaleína como indicador.<sup>83</sup>

## 3.2.4 Preparación y caracterización de formulaciones empleando $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina

### 3.2.4.1 Evaluación de la afinidad de diferentes ciclodextrinas por el albendazol

#### 3.2.4.1.1 Diagramas de solubilidad de fase

Para llevar a cabo los diagramas de solubilidad de fase, se realizaron soluciones de concentraciones crecientes de  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, C- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD e I- $\beta$ -CD. Se adicionó un exceso de ABZ a las soluciones antes mencionadas y se las mantuvo en agitación constante durante 72 h en un agitador elíptico a 200 rpm. Transcurrido el tiempo estipulado se filtraron las soluciones a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m y se determinó la concentración de ABZ en las mismas por espectrofotometría UV. Se empleó un espectrofotómetro Boeco S-26 (Alemania), la longitud de onda a la cual se realizaron las mediciones fue 292 nm.

Los valores de la  $K_f$  para los complejos 1:1 se calcularon a partir de la pendiente (S) y la  $S_o$  de la porción lineal del diagrama de solubilidad de fase, según la ecuación [31]:<sup>29,73,74</sup>

$$K_f = S/S_o (1-S) \quad [31]$$

### 3.2.4.2 Preparación de sistemas compuestos por albendazol y diferentes ciclodextrinas

#### Metodologías de preparación de los sistemas:

Mezcla física: El ABZ (0,56 mmoles) y la correspondiente CD (0,56 mmoles) se interpusieron en un mortero, y se procedió a la mezcla de ambos compuestos.

Secado por aspersion: Los sistemas ABZ:CD se formularon en una relación molar 1:1 mediante SA.

Se procedió en dos etapas:

- Se solubilizaron 150 mg de ABZ (0,56 mmoles) en 10 mL de ácido acético y por otro lado, se disolvió la correspondiente CD (0,56 mmoles) en 20 mL de agua, finalmente se mezclaron ambas soluciones.
- Se procedió al SA utilizando el mismo equipo y condiciones de secado que las empleadas en la sección 3.2.1.2.
- Se pesó el producto obtenido.

### **3.2.4.3 Caracterización fisicoquímica y estructural de los sistemas albendazol:ciclodextrinas**

#### **3.2.4.3.1 Determinación del rendimiento**

El R se calculó como la proporción entre el peso del producto que se obtuvo experimentalmente ( $P_{\text{producto}}$ ) y la suma de los pesos de todos los componentes del sistema, según la ecuación [32]:

$$R (\%) = \frac{P_{\text{Producto}}}{P_{\text{ABZ}} + P_{\text{CD}}} \times 100 \quad [32]$$

siendo  $P_{\text{ABZ}}$  y  $P_{\text{CD}}$ , los pesos de ABZ y de CD incorporados, respectivamente.

#### **3.2.4.3.2 Determinación del título de los sistemas albendazol:ciclodextrinas**

Para la determinación del título de ABZ en los sistemas ABZ:CDs, se procedió empleado el mismo procedimiento que en la sección 3.2.1.5

#### **3.2.4.3.3 Estudios de solubilidad aparente**

La determinación de la solubilidad aparente en agua del ABZ incluido en los sistemas ABZ:CDs se realizó según lo descrito en la sección 3.2.1.7.

#### **3.2.4.3.4 Estudios de velocidad de disolución**

Los sistemas ABZ:CDs obtenidos por MF y SA, se sometieron a ensayos de disolución siguiendo un procedimiento similar al descrito en la sección 3.2.1.8, con la

salvedad de que las muestras fueron tomadas en los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240 y 300 min.

#### **3.2.4.3.5 Calorimetría diferencial de barrido**

Se realizaron análisis de CDB con el objetivo de evidenciar las posibles interacciones en el estado sólido entre el ABZ, la  $\beta$ -CD y los derivados de  $\beta$ -CD. Para ello se empleó el mismo equipo y condiciones de análisis que en la sección 3.2.1.9

#### **3.2.4.3.6 Difracción de rayos X**

Los análisis de DRX se realizaron para estudiar la estructura al estado sólido del ABZ, la  $\beta$ -CD, los derivados de  $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:CDs obtenidos por SA y MF. Las condiciones de medida y el equipo fueron los mismos que los empleados en la 3.2.1.10.

#### **3.2.4.3.7 Espectroscopía de infrarrojo**

Los espectros de IR del ABZ, los derivados de  $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:CDs obtenidos por SA y MF, se realizaron en un espectrómetro FT-IR-Prestige-21 (Shimadzu, Tokio, Japón) empleando el método de la pastilla de BrK (1 mg de muestra en 100 mg de KBr). El rango de escaneo fue de 450 a 3900  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.2.4.3.8 Microscopía electrónica de barrido**

Se analizó la morfología del ABZ, las CDs y los sistemas ABZ:CDs obtenidos por MF y SA, a partir de las micrografías obtenidas empleando el mismo equipo y condiciones de análisis descriptos en la sección 3.2.1.11.

#### **3.2.4.3.9 Espectrometría de masas**

La estequiometría del complejo se confirmó mediante espectrometría de masas, el equipo empleado fue un espectrómetro micrOTOF-Q II, de Bruker-Daltonics (Alemania). Para realizar este análisis se disolvió 1 mg del complejo ABZ:derivado de  $\beta$ -CD preparado mediante SA en 1 mL de ácido fórmico (0,4 % v/v), y luego se realizó

una dilución 1/100 con una mezcla metanol:agua (50:50). Las condiciones del análisis fueron las siguientes: se empleó el método ESI, la ionización se realizó en modo negativo, energía de colisión: -10 eV, nebulizador: 0,4 bar, temperatura: 180°C, velocidad de flujo del gas de secado: 4,0 L/min. Los espectros del complejo estudiado fueron adquiridos en el rango m/z 50-3000.

#### **3.2.4.3.10 Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución**

Se realizaron espectros de RMN con el objetivo de caracterizar los complejos obtenidos. Los experimentos realizados fueron  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC y ROESY. Los experimentos de ROESY se realizaron bajo las siguientes condiciones: 32 acumulaciones, tiempo de adquisición 0,222 s y retraso del pulso 2 s. Las muestras para los sistemas ABZ:CDs se prepararon disolviendo 10 mg de los mismos en DCl 0,1 N en  $\text{D}_2\text{O}$ . La muestra para el sistema ABZ:H- $\beta$ -CD se preparó disolviendo 17 mg de H- $\beta$ -CD y 1 mg de ABZ en  $\text{CDCl}_3$ .

#### **3.2.4.3.11 Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido**

Para los estudios de NMR de estado sólido del ABZ, las CDs y los sistemas ABZ:CDs, las muestras (~ 200 mg) se empaquetaron en un rotor cilíndrico de zirconio de 7 mm de diámetro externo. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  empleando las técnicas de giro al ángulo mágico/polarización cruzada (CP/MAS, *Magic Angle Spinning/Cross Polarization*) y  $^{15}\text{N}$  CP/MAS se obtuvieron a 75,49 MHz y 30,42 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Tecmag Redstone/Bruker 300 WB, a una velocidad de 3,5 kHz con pulsos de radiofrecuencia a 90° de aproximadamente 4 ms y 6 ms, tiempo de contacto de 100 ms o 3 ms y un retraso de relajación de 5 s y 15 s, respectivamente.

## **3.2.5 Ensayos biológicos**

### **3.2.5.1 Estudios de biodisponibilidad**

#### **3.2.5.1.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas, con un peso que osciló entre los 300 y 380 g. Los animales fueron mantenidos con alimento balanceado estándar y agua ad libitum; y sometidos a una ciclo de iluminación de 12 h de luz y 12 h de oscuridad hasta el momento de su utilización. Los animales fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, y tratados respetando las normas nacionales e internacionales de manipulación de animales de laboratorio.

Los experimentos se realizaron utilizando protocolos aprobados por la Comisión de Bioética para el Manejo de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, en concordancia con reglamentaciones internacionales. (Resolución: 648/2012).

#### **3.2.5.1.2 Análisis farmacocinético**

Se realizaron los análisis farmacocinéticos para el ABZ sin transportador y el ABZ incluido en las micropartículas formuladas bajo las condiciones óptimas. Para ello, las micropartículas cargadas con ABZ, las micropartículas sin ABZ y el ABZ, suspendidos en agua destilada se administraron por vía oral a las ratas Wistar en una única dosis. El grupo control fue medido para comparar las curvas plasmáticas luego de la administración oral de las tres formulaciones antes mencionadas.

Las formulaciones fueron administradas por vía oral mediante un tubo bucofaríngeo. Se emplearon 4 grupos de 3 animales (n=3) para evaluar la biodisponibilidad de cada una de las formulaciones.

Grupo I: ABZ

Grupo II: Micropartículas cargadas con ABZ (“Sistema Óptimo”)

Grupo III: Micropartículas sin ABZ.

Grupo IV: Control (sin tratamiento)

La dosis de ABZ empleada en los grupos tratados con el IFA fue de 5 mg/Kg. Luego de la administración del tratamiento, se colectaron muestras de sangre de la vena de la cola, en los siguientes tiempos: 15, 30, 45, 180, 300, 500 y 1440 min. Posteriormente, las muestras de sangre fueron heparinizadas y centrifugadas.

### **3.2.5.1.3 Procedimiento analítico**

Las muestras de plasma (200 µL) fueron tratadas con 1 mL de metanol en un tubo de centrifuga y almacenadas a -20 °C. Este procedimiento produjo la precipitación de las proteínas presentes en la muestra que fueron separadas por centrifugación a 6800 rpm a 4 °C por 12 min.<sup>160</sup> Posteriormente, las muestras fueron concentradas a sequedad y reconstituidas con 500 µL de fase móvil (acetonitrilo:acetato de amonio 0,05 M, 50:50) antes de ser analizadas mediante un método validado de CLAE. Se empleó un equipo Agilent 1100 acoplado a un detector UV. Cada análisis se realizó inyectando 50 µL de muestra y los analitos fueron eluidos (velocidad de flujo: 1,2 mL/min) de la columna cromatográfica (Columna Zorbax XDB-C18 150 x 4,6 mm, 5 µm) empleando un gradiente lineal (acetonitrilo:acetato de amonio 0,05 M).<sup>120,161,162</sup> El metabolito principal, ABZSO, fue identificado por el tiempo de retención comparado con el de un estándar de referencia y la determinación de su concentración se realizó a una longitud de onda de 292 nm.

### **3.2.5.1.4 Parámetros de biodisponibilidad**

Las curvas de concentración albendazol sulfóxido en plasma en función del tiempo para cada animal luego del tratamiento fueron ajustadas con el programa PK Solution 2.0. Las áreas bajo la curva (ABC) de los perfiles estudiados, fueron obtenidas de la siguiente forma: el  $ABC_{0-24}$  fue obtenida mediante la regla del trapecio; y el  $ABC_{24-\infty}$  fue estimada como un cociente entre la concentración plasmática a las 24 h y

la constante de eliminación ( $K_e$ ). El valor de  $K_e$  fue calculado como la pendiente de la fase final de las curvas  $\ln(\text{concentración})$  en función del tiempo.

#### **3.2.5.1.5 Análisis estadístico**

Los resultados se presentaron como un promedio  $\pm$  desvío estándar (DE). Para evaluar las diferencias entre los grupos se realizó un test ANOVA, seguido del test de Scheffe's.

### **3.2.5.2 Ensayos de actividad antiparasitaria en un modelo murino infectado por *Trichinella spiralis***

#### **3.2.5.2.1 Animales de experimentación**

Se utilizó un modelo experimental en ratones con el objetivo de evaluar el efecto del ABZ, incluido en sistemas microparticulados y en los complejos de inclusión con CDs, sobre la formación de quistes de *T. spiralis*. Se utilizaron ratones machos CBI y CBI+ de 80 a 100 días de edad, susceptibles a *T. spiralis*, del modelo murino del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario).

Los ratones CBI+, se caracterizan por alto peso corporal y cola larga, corresponden a una de las sub-líneas provenientes de la población CBI. Los reproductores, que dieron origen a las diferentes sub-líneas CBI, se originaron en el Centro de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, a partir del cruzamiento de cuatro cepas distintas: Rockland, Balb, Suiza y NIH.<sup>163</sup>

Los ratones utilizados en los experimentos se mantuvieron en bioterio bajo las siguientes condiciones:

- Ciclo de iluminación de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.
- Temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C).

- Humedad relativa  $50 \pm 10$  %.
- Dieta de laboratorio estándar y agua, *ad-libitum*.

El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo a las normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio (Resolución 648/2012, del Comité de ética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario).<sup>164</sup>

### **3.2.5.2.2 Parásito**

Las larvas infectantes de *Trichinella spiralis* (L1), fueron obtenidas a partir de un raton CBI de mantenimiento infectado. El animal fue sacrificado y la masa muscular fue sometida a digestión artificial en un medio que contenía pepsina al 1 % p/v en HCl 0,1 N, para liberar las larvas enquistadas en el tejido.<sup>165</sup> Posteriormente, las mismas fueron lavadas y suspendidas con solución salina estéril. A partir de esta suspensión, se prepararon las soluciones infectantes para cada animal contando individualmente las larvas en microscopio.

### **3.2.5.2.3 Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase aguda de la infección**

Los ratones CBI +, (peso promedio de  $54 \pm 3$  g) se infectaron por vía oral con 2 larvas musculares de *T. spiralis* por g de peso. Las larvas infectantes se obtuvieron a partir de animales de mantenimiento de la misma sub-línea.<sup>164</sup> Los animales se dividieron en 4 grupos de 5 ratones (n=5) y fueron sometidos a distintos tratamientos post-infección:

Grupo I: ABZ

Grupo II: Micropartículas cargadas con ABZ (“Sistema Óptimo”)

Grupo III: Sistema ABZ:M- $\beta$ -CD obtenido por SA (relación molar 1:1)

Grupo IV: Control de infección (sin tratamiento)

A los grupos I, II y III se les administraron 2 dosis correspondientes a 50 mg de ABZ por kg de peso. La primera dosis se suministró el quinto y la segunda el sexto día, contados a partir de la infección de los animales.

La actividad antiparasitaria se evaluó estimando el grado de infección del hospedero a los 30 días post-infección, por recuento del número de larvas enquistadas en lengua (carga parasitaria, CP).<sup>166</sup>

La lengua se procesó inmediatamente después de realizadas las autopsias a los animales sacrificados, mediante digestión artificial. Se colocó el órgano entero en 2 mL de jugo gástrico artificial (la composición se detalló en la sección 3.2.5.2.2) y se incubó en estufa a 37°C durante un periodo de 24 h, agitando periódicamente.<sup>165</sup>

Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la digestión por agregado de solución fisiológica hasta completar 14 mL y se dejaron decantar las larvas durante 1 h.<sup>167</sup>

Inmediatamente se retiró el sobrenadante y se incorporaron 5 mL de formol (10 % v/v) con el objetivo de inactivar y preservar intacta la estructura de las larvas. Por último, se realizó al recuento de cada muestra al microscopio con un aumento de 100 X.<sup>165</sup>

El estimador empleado fue la carga parasitaria relativa (CPr) que se obtiene dividiendo el número de larvas (CP) por los gramos de órgano analizado. El porcentaje de reducción de CPr se calculó según la ecuación [33]:

$$\text{Porcentaje de reducción de CPr} = \frac{\text{CPr grupo en estudio} - \text{CPr grupo control}}{\text{CPr grupo control}} \times 100 \quad [33]$$

### **3.2.5.2.4 Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase parenteral de la infección por *Trichinella spiralis* y su dependencia con la dosis de albendazol administrada**

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antiparasitario de la dosis de ABZ incluido en C- $\beta$ -CD sobre la viabilidad de larvas de *T. spiralis* enquistadas (fase crónica de la infección).

Como modelo animal se emplearon ratones machos CBI de entre 80-100 días de edad infectados con *T. spiralis*. Los ratones (peso promedio de  $38 \pm 2$  g) se infectaron por vía oral con 2 larvas musculares de *T. spiralis* por g de peso, se dividieron al azar en 5 grupos de 6 ratones (n=6) y fueron sometidos a distintos tratamientos post-infección:

Grupo I: Tratados con ABZ (30 mg/kg)

Grupo II: Tratados con ABZ (50 mg/kg)

Grupo III: Tratados con ABZ incluido en el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD (30 mg/kg)

Grupo IV: Tratados con ABZ incluido en el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD (50 mg/kg)

Grupo V: Control de infección (sin tratamiento)

El tratamiento se llevó a cabo en los días 28, 29 y 30 post-infección, resultando un total de tres dosis por ratón. Transcurridos 45 días desde la infección, se realizó el sacrificio de los animales, se aisló la lengua y se procesó inmediatamente, mediante digestión artificial. Se colocó el órgano entero en 2 mL de jugo gástrico artificial y se incubó en estufa a 37°C durante un periodo de 24 h, agitando periódicamente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la digestión por agregado de solución fisiológica hasta completar 14 mL y se dejaron decantar las larvas durante 1 h.<sup>166</sup> A los fines de determinar la viabilidad de las larvas se realizó una tinción con azul de metileno que produce coloración azul en las larvas muertas.<sup>168</sup> La actividad antiparasitaria se evaluó estimando el porcentaje de larvas muertas en el hospedero, por

recuento del número de larvas teñidas (muertas) y sin teñir (viables), relativizadas al peso del órgano, según la ecuación [34]:

$$\text{Porcentaje de larvas muertas} = \frac{\text{Larvas muertas}}{\text{Larvas muertas} + \text{Larvas viables}} \times 100 \quad [34]$$

### **3.2.5.3 Evaluación histológica de la irritación del tracto gastrointestinal**

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con ABZ y el complejo ABZ:C-β-CD podían producir irritación y/o lesión de los tejidos del tracto gastrointestinal se realizó el tratamiento siguiendo la misma metodología que en la sección 3.2.5.2.4, empleando también seis animales por grupo (n=6), con la excepción de que los animales fueron sacrificados 2 h después de la última dosis. Posteriormente, se les realizó la autopsia para extraer el esófago, estómago y duodeno. Los tejidos se fijaron con el fijador BOUIN, se seccionaron con un micrótomo y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

## **4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Formulación de sistemas microparticulados**

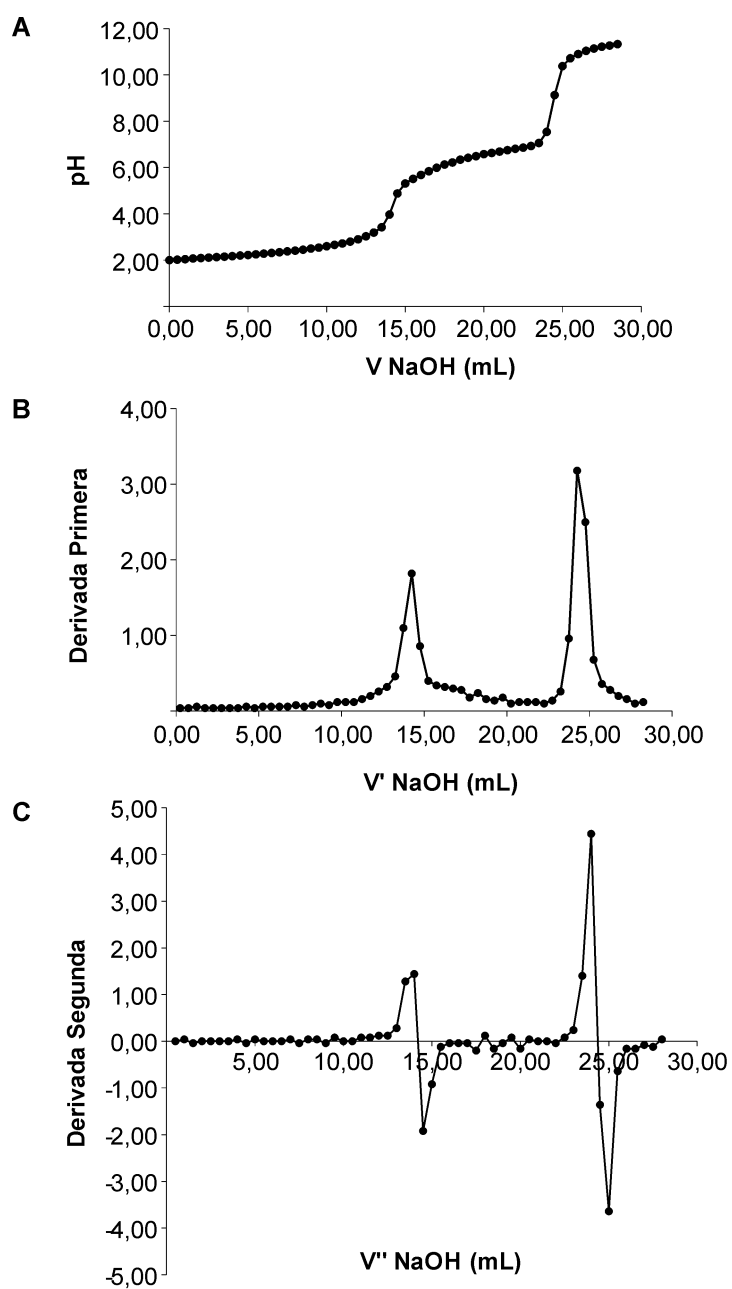
#### **4.1.1 Caracterización de los polímeros empleados en la formulación de los sistemas microparticulados**

##### **4.1.1.1 Caracterización del quitosano**

###### **4.1.1.1.1 Determinación del grado de desacetilación**

###### *A. Determinación del grado de desacetilación por titulación ácido-base*

En la curva de titulación (Figura 16 A), pueden observarse dos saltos en los valores de pH. El primero se produce una vez agregados 14,5 mL de NaOH; y corresponde al exceso de HCl agregado y el segundo ocurre una vez agregados 24,5 mL de NaOH y corresponde al exceso de ácido y a los grupos amino protonados del Q. La diferencia entre estos volúmenes nos permitió determinar los grupos amino libres en el Q. Estos puntos de inflexión fueron determinados mediante el método de las derivadas y en la Figura 16 B y C se pueden visualizar las curvas obtenidas. En el caso del método de la derivada primera (Figura 16 B), el punto de inflexión de la curva de titulación corresponde al volumen para el cual la función derivada primera alcanza un valor máximo, mientras que el método de la derivada segunda (Figura 16 C) corresponde al volumen para el cual la función derivada segunda vale cero. Una vez obtenidos los  $V_e$  por el método de las derivadas, se empleó la ecuación [4] para el cálculo de GD. Los resultados obtenidos por este método pueden observarse en la Tabla I.



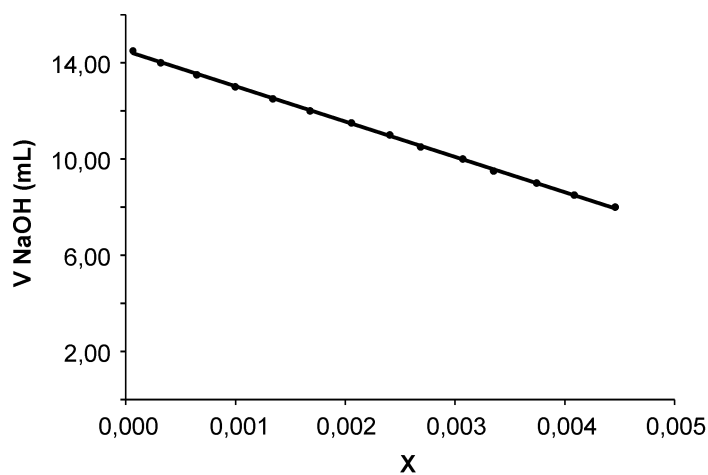
**Figura 16.** Curva de titulación potenciométrica del Q (A), curvas obtenidas mediante el método de la derivada primera (B) y derivada segunda (C).

**Tabla I.** GD del Q obtenido por triplicado por el método de Broussignac.

Muestra			Promedio	Desvío Estándar
1	2	3		
81,1	80,3	80,6	80,6	0,5

### **Método gráfico de obtención del volumen equivalente según Ke colaboradores**

Como se mencionó anteriormente, el método de linealización propuesto por Ke y colaboradores, es un método que intenta reducir el error por defecto producido por la precipitación del Q en pH alcalino.<sup>55</sup> En la Figura 17, puede observarse el gráfico obtenido por este método empleando la ecuación [5], donde el  $V_e$  es obtenido a partir de la ordenada al origen.



**Figura 17.** Gráfico de linealización obtenido por el método de Ke y colaboradores.

En la Tabla II se observan los valores de GD calculados a partir de la ecuación [6] donde puede apreciarse, que si bien el desvío entre las repeticiones es similar que para

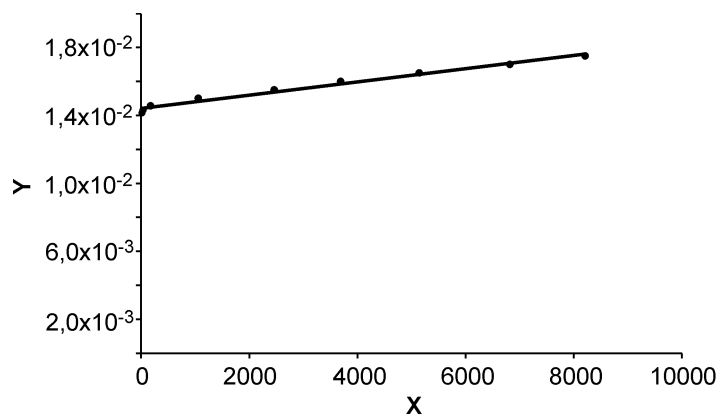
el método de Broussignac, los valores son estadísticamente superiores ( $P=0,0002$ ) a este último.

**Tabla II.** GD del Q obtenido por triplicado por el método de linealización de Ke y colaboradores.

Muestra			Promedio	Desvío Estándar
1	2	3		
84,9	85,0	84,1	84,7	0,5

**Método gráfico de obtención del volumen equivalente según Jiang et colaboradores**

En la Figura 18, se observa el gráfico obtenido de acuerdo a los cálculos realizados según las ecuaciones [7], [8] y [9]. Se obtuvo el valor de  $V_e$  a partir de la ordenada al origen de esta función y se calculó el GD mediante la ecuación [6]. Los resultados obtenidos para las muestras analizadas se presentan en la Tabla III.



**Figura 18.** Gráfico de linealización obtenido por el método de Jiang y colaboradores.

Si bien se encuentra reportado, que éste método de linealización corrige el error introducido en la postulación de Ke y colaboradores, al considerar a los analitos como si se tratase de la titulación de una base fuerte, no se hallaron diferencias significativas entre ambos métodos ( $P=0,2551$ ). Sin embargo, los valores obtenidos por el método de Broussignac fueron significativamente inferiores ( $P= 0,0005$ ), reafirmando la necesidad de corregir el error introducido por la precipitación del biopolímero a pHs superiores a 6,5.

**Tabla III.** GD del Q obtenido por triplicado por el método de linealización propuesto por Jiang y colaboradores.

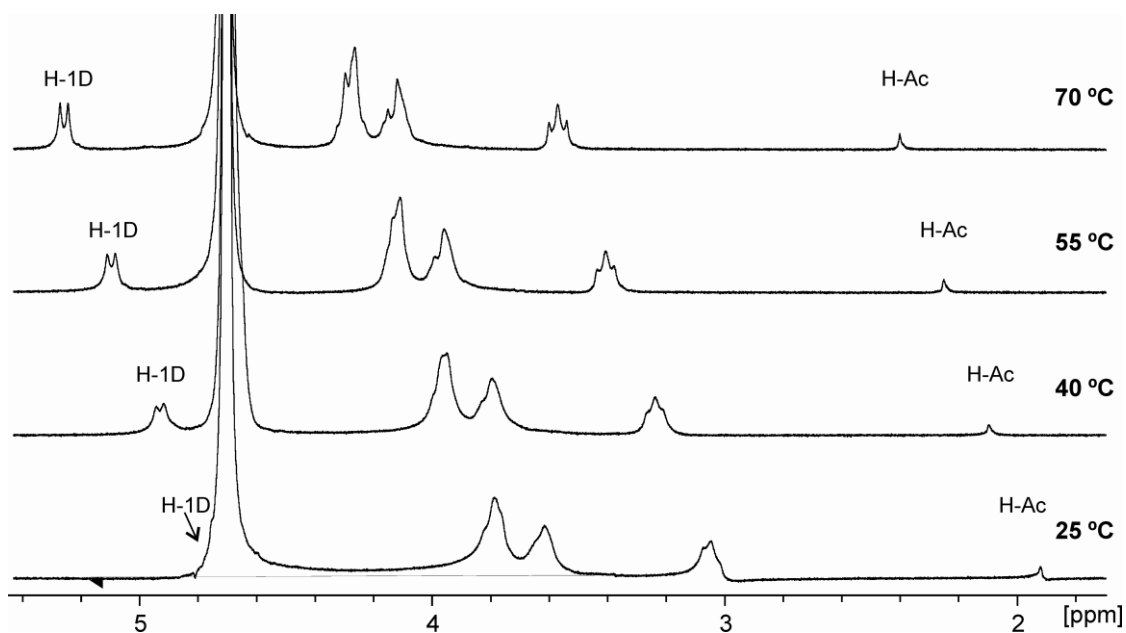
Muestra			Promedio	Desvío Estándar
1	2	3		
85,3	86,4	84,7	85,5	0,9

Los valores obtenidos por ambos métodos de linealización fueron mayores a los obtenidos por el método de Broussignac. Estos resultados fueron coincidentes con lo reportado en la bibliografía respecto a que el método presenta un error sistemático por defecto, debido a la precipitación del Q a valores de pH superiores a 6,5 ( $pK_a$  del Q).<sup>52</sup> En esta etapa aceptamos como valor del GD de esta muestra al obtenido por el método de Jiang y colaboradores ( $85,5 \pm 0,9$ ), debido a que se encuentra reportado que provee valores más cercanos a los obtenidos por RMN de  $^1H$  dentro de los métodos potenciométricos.<sup>52</sup>

#### *B. Determinación del grado de desacetilación y caracterización por RMN*

Se realizó la determinación del GD por RMN  $^1H$  debido a que es el método de referencia por presentar el menor error instrumental.<sup>143</sup> Como puede observarse en la Figura 19, los espectros de RMN de  $^1H$  del Q, mejoran su resolución a medida que se incrementa la temperatura a la cuál se registra el espectro. Este hecho está relacionado con la disminución de la viscosidad de la solución. Se puede apreciar además, el corrimiento de la señal del proton anomérico correspondiente a las subunidades de D-

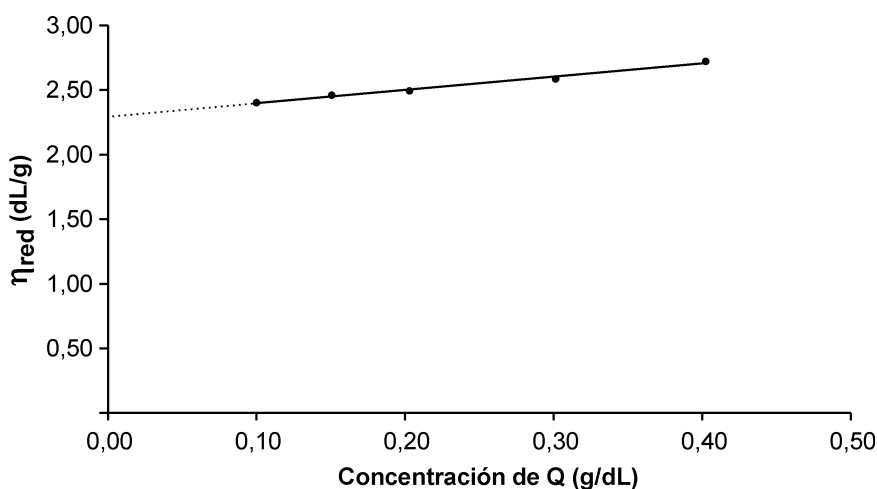
GlcN sin acetilar (H-1D) de  $\delta=4,70$  ppm a 25 °C (solapado con la señal del H<sub>2</sub>O) a 5,25 ppm a 70 °C, permitiendo de este modo realizar las determinaciones de las áreas. Se seleccionó la señal del protón unido al carbono anomérico de la D-GlcN (H-1D) y la de los 3 protones pertenecientes al grupo acetilo de la D-GlcNAc (H-Ac). Los cálculos realizados empleando la ecuación [10], indicaron que el GD del Q fue del 89,2 %. Estos resultados, fueron superiores a los obtenidos por los métodos potenciométricos y esto podría deberse a la presencia de ácidos presentes como impurezas en el biopolimero, o a errores instrumentales en sí. Por otro lado, si bien es recomendable realizar las determinaciones del GD del Q por RMN debido a que presenta una alta exactitud, este método requiere equipamiento costoso, procedimientos complicados y personal altamente calificado.<sup>46</sup> Por lo tanto, para determinaciones de rutina podrían aceptarse los métodos potenciométricos debido a su rapidez, accesibilidad y bajo costo; reservando las determinaciones por RMN para la validación de métodos más simples.



**Figura 19.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H del Q (10 mg/mL) disuelto en DCl (1 % v/v) a 25, 40, 55 y 70 °C.

#### 4.1.1.1.2 Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico del quitosano

Para realizar este análisis, se determinó la  $\eta_{red}$  de soluciones de Q en un rango de concentraciones de 0,1 a 0,4 % p/v. En la Figura 20, puede observarse el gráfico de la  $\eta_{red}$  en función de la concentración de una solución de Q. Los datos obtenidos se ajustaron a una función lineal mediante el método de regresión por cuadrados mínimos.



**Figura 20.** Gráfico de  $\eta_{red}$  versus concentración de Q.

La ecuación de la recta correspondiente al gráfico anterior fue:

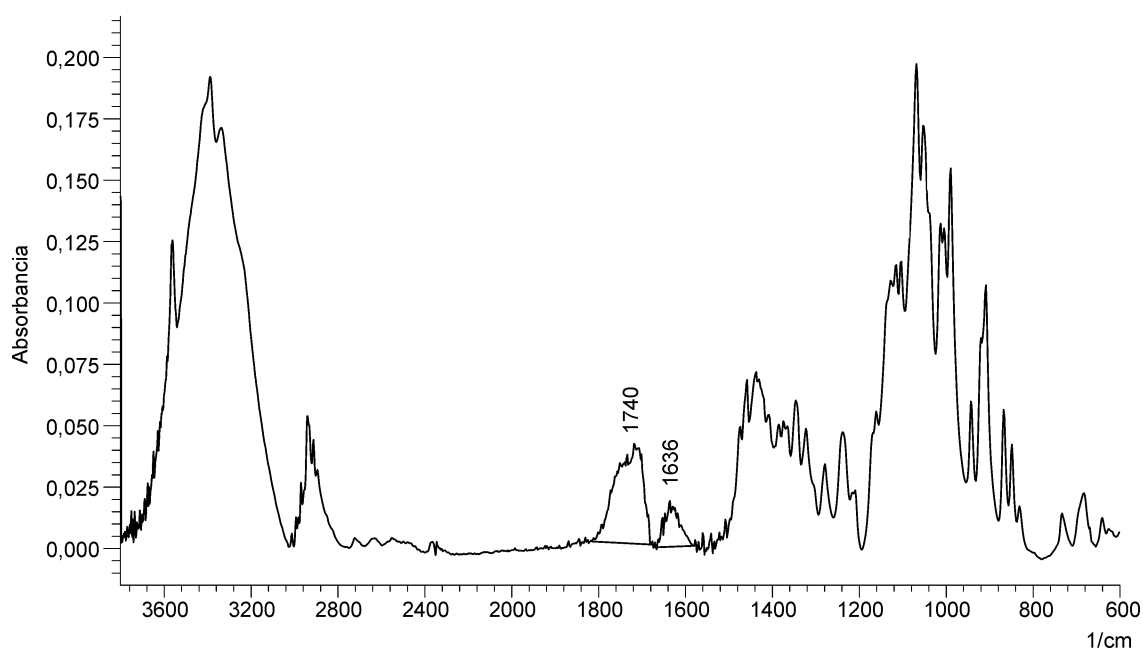
$$y = 1,025 \cdot x + 2,296 \quad R^2 = 0,9938 \quad [35]$$

La  $[\eta]$  se obtuvo a partir de la ordenada al origen del gráfico anterior (ecuación [35]), y su valor fue 2,296 dL/g (o 229,6 mL/g). Este resultado, permitió calcular el  $M_v$  del Q empleando la ecuación de Mark-Houwink (ecuación [15]). En esta ecuación, los valores de K y  $\alpha$  para el Q fueron  $1,859 \cdot 10^{-3}$  mL/g y 0,948, respectivamente. De acuerdo con estos cálculos, el  $M_v$  obtenido para el Q fue 239,2 KDa. Cabe destacar que el método viscosimétrico permite obtener el  $M_v$  empleando instrumental más sencillo y en forma más económica que otros métodos disponibles.

## 4.1.1.2 Caracterización de la pectina

### 4.1.1.2.1 Determinación del grado de esterificación por espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 21 puede observarse el espectro de FT-IR realizado para la P, en el que se señalaron los dos picos de interés. Se determinó el área de los mismos y se calculó el GE mediante la ecuación [16] obteniendo un valor del 81 %.



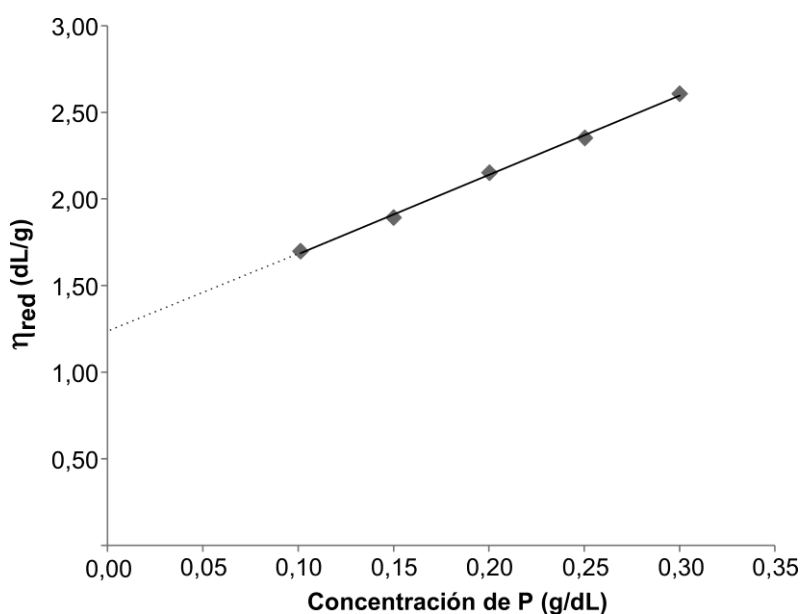
**Figura 21.** Espectro de FT-IR de la P.

### 4.1.1.2.2 Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico de la pectina

Se determinó la  $\eta_{red}$  de soluciones de P en un rango de concentraciones de 0,1 a 0,3 % p/v y se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación [36]) a partir de la curva de  $\eta_{red}$  versus concentración de P, presentada en la Figura 22.

$$y = 4,577 \cdot x + 1,224 \quad R^2 = 0,9981 \quad [36]$$

De acuerdo con las determinaciones realizadas, la  $[\eta]$  fue 122,4 mL/g. Los valores de  $K$  y  $\alpha$  empleados en la ecuación de Mark-Houwink (ecuación [15]) para el cálculo del  $M_v$  fueron  $9,55 \cdot 10^{-2}$  mL/g y 0,73, respectivamente. De esta forma, el valor de  $M_v$  obtenido fue 18,1 kDa.



**Figura 22.** Gráfico de  $\eta_{red}$  versus concentración de P.

#### **4.1.1.1 Caracterización de la carboximetilcelulosa sódica**

##### **4.1.1.1.1 Determinación del grado de sustitución de la carboximetilcelulosa sódica por titulación ácido-base**

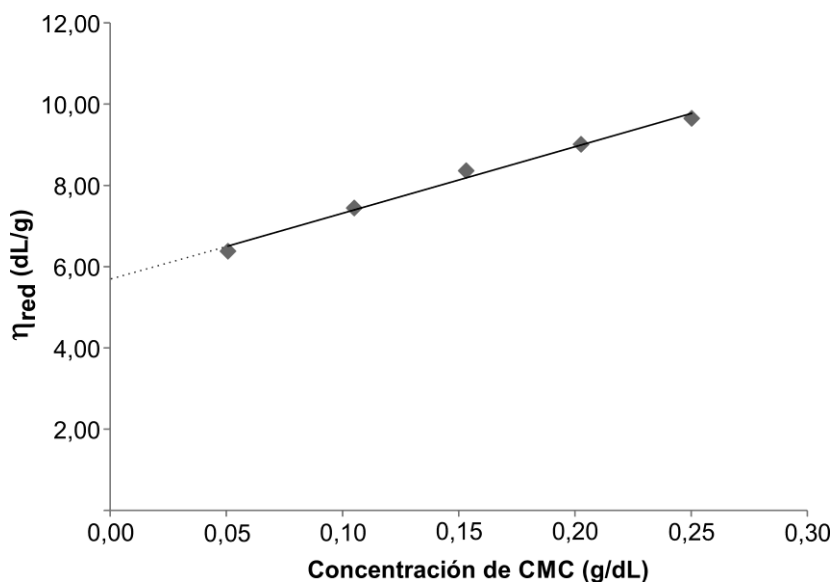
Se realizó la valoración de los grupos carboxílicos presentes en la CMC empleada para la formulación de las micropartículas poliméricas, realizando posteriormente el cálculo del GS según las ecuaciones [17] y [18]. A partir de este análisis se obtuvo un GS de  $0,77 \pm 0,01$ .

Si bien el máximo GS que podría obtenerse teniendo en cuenta la estructura química de la subunidad de glucosa que compone a la celulosa es 3, las CMCs

obtenidas comercialmente presentan un valor de GS que varía usualmente entre 0,4 a 1,5.<sup>169</sup> Además, el GS que presenta la CMC está directamente relacionado con la solubilidad en agua de este polímero. De modo que las CMCs que presentan un GS superior a 0,6 se hidratan fácilmente, siendo que las que presentan una sustitución inferior a 0,2 retienen mayoritariamente las propiedades del polímero de partida, resultando prácticamente insolubles en agua.<sup>170</sup> De acuerdo con los valores de GS obtenidos para la CMC empleada en la formulación de las micropartículas, esta presentó un GS intermedio.

#### 4.1.1.1.2 Determinación del peso molecular promedio viscosimétrico de la carboximetilcelulosa sódica

Para llevar a cabo esta determinación se realizaron soluciones de CMC en NaOH 0,5 M, en el rango de 0,05 a 0,25 g/dL. Se encuentra reportado que este solvente disminuye el volumen hidrodinámico del polímero.<sup>154</sup> En la Figura 23, se presenta la curva de  $\eta_{red}$  en función de la concentración de CMC, que fue ajustada a un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos, obteniendo la ecuación [37].



**Figura 23.** Gráfico de  $\eta_{red}$  versus concentración de CMC.

$$y = 16,363.x + 5,678 \quad R^2 = 0,9903 \quad [37]$$

A partir de la ordenada al origen obtenida de la ecuación de la recta, se obtuvo el valor de  $[\eta] = 5,678 \text{ dL/g}$ .

Los valores de las constantes  $K$  y  $\alpha$ , reportados para el sistema de solventes empleado en esta determinación fueron de  $5,37 \cdot 10^{-4} \text{ dL.g}^{-1}$  y  $0,73$ , respectivamente.<sup>154</sup>

De acuerdo con estos resultados, se calculó el  $M_v$  empleando la ecuación [15], obteniendo un valor de  $326,6 \text{ kDa}$ . Este valor correspondería a una CMC con un  $M_v$  intermedio.

## 4.1.2 Formulación de micropartículas poliméricas

### Fase Inicial: Diseño Plackett-Burman

La formulación de micropartículas que cumplan con los requerimientos buscados depende de muchos factores, es por este motivo que se empleó un diseño experimental de Plackett-Burman para estimar cuáles factores influían significativamente en las respuestas de interés. Los factores estudiados fueron las concentraciones de  $Q$ ,  $P$  y  $CMC$  y sus rangos fueron seleccionados en base a conocimientos previos sobre el sistema bajo estudio. Las respuestas estudiadas fueron el  $R$  (%),  $EE$  (%),  $Q_{30}$  (%) y  $Q_{60}$  (%), los resultados para cada experimento se presentan en la Tabla IV. Del análisis de los datos se dedujo que no hubo interacciones entre los factores, razón por la cual pudo emplearse este diseño para evaluar la influencia de los factores sobre las respuestas.

Cuando los grados de libertad (GL) disponibles para estimar el error experimental son pocos, la prueba formal  $F$  conducida en el ANOVA puede no tener mucha potencia, de modo que los efectos más pequeños pueden parecer no significativos. Por otro lado, probando un número grande de efectos, cada uno a un nivel de significancia del 5%, podemos generar resultados más significativos que en lo que realidad son. Una manera menos rigurosa de juzgar cuales efectos son verdaderos y cuales son probablemente sólo manifestaciones del ruido, es a través del gráfico de probabilidad semi-normal de efectos (Figura 24).

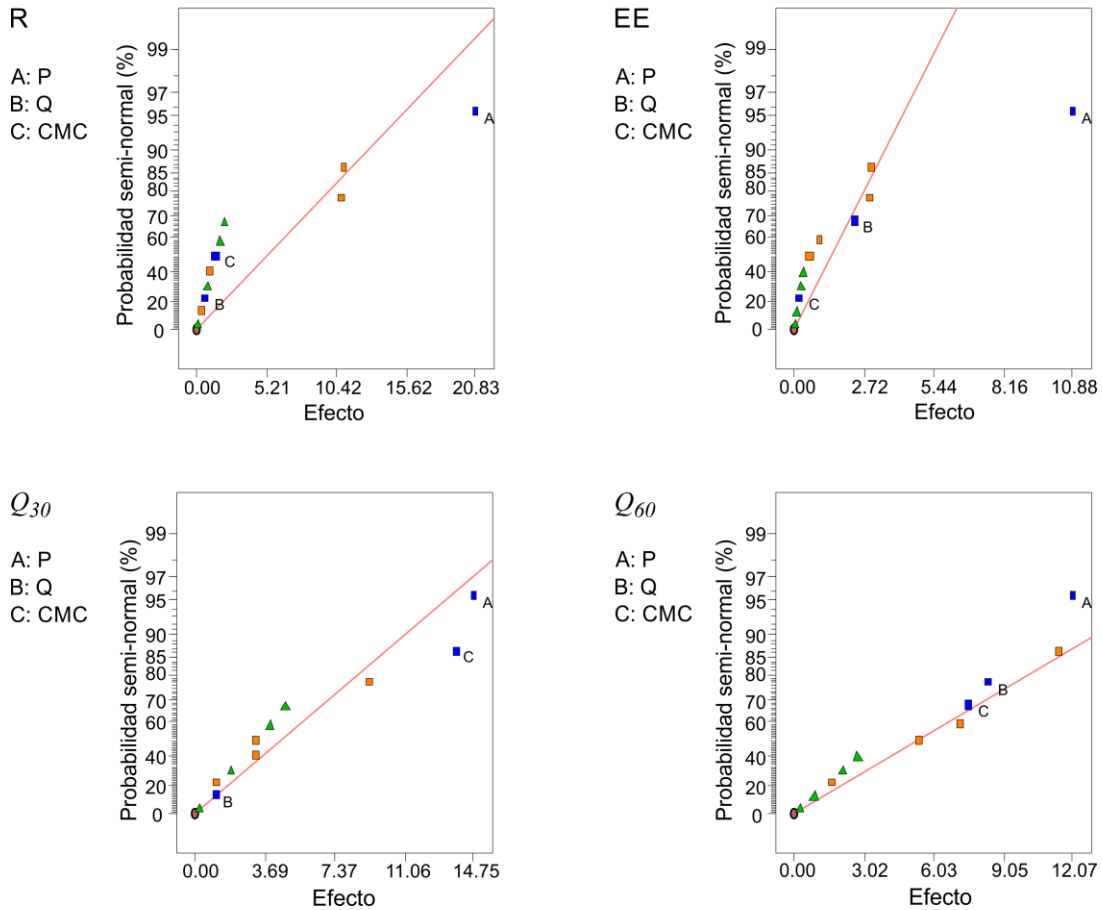
En el gráfico de probabilidad semi-normal se emplean los valores absolutos de los efectos. En estos gráficos los factores que quedan fuera de la línea recta (que se traza desde el cero de las coordenadas), no tienen el comportamiento de una población normal y no corresponden al error aleatorio, es decir son significativos para la respuesta estudiada.<sup>136</sup>

**Tabla IV.** Diseño Plackett-Burman incluyendo los valores de los factores y las respuestas.

Sistema	Factores			Respuestas			
	P (%)	Q (%)	CMC (%)	R (%)	EE (%)	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)
1	0,00	1,00	0,00	100,0	83,9	58,0	67,4
2	0,40	1,00	0,10	64,8	98,3	47,2	71,6
3	0,40	0,40	0,00	63,7	97,7	47,4	57,0
4	0,00	1,00	0,10	85,4	81,1	57,0	82,0
5	0,40	0,40	0,10	68,4	96,1	27,0	41,3
6	0,00	0,40	0,00	83,7	86,9	75,1	85,8
7	0,40	1,00	0,00	51,5	95,7	57,8	79,0
8	0,00	0,40	0,10	71,4	92,1	56,8	70,0
9	0,40	1,00	0,00	58,0	95,4	55,1	78,5
10	0,00	1,00	0,10	83,5	83,6	49,5	76,0
11	0,40	0,40	0,10	76,3	94,6	49,1	65,7
12	0,00	0,40	0,00	83,8	84,9	75,7	84,3

Como puede observarse en la Figura 24, todos los factores estudiados fueron significativos (valores de  $p < 0,05$ ) para al menos una de las respuestas (los factores P, Q y CMC fueron significativos para la respuesta R; P para EE; P y CMC para  $Q_{30}$  y; P y Q

para  $Q_{60}$ ), por lo tanto en el diseño empleado para la optimización se incluyeron los mismos factores.



**Figura 24.** Gráficos de probabilidad seminormal correspondientes a las respuestas involucradas en el diseño de Plackett-Burman.

### Fase de Optimización: Diseño Central Compuesto

Debido a que los tres factores estudiados tuvieron un efecto significativo sobre alguna de las respuestas, se llevó a cabo un procedimiento de optimización sistemático empleando la metodología de superficie de respuesta. El objetivo de este procedimiento fue estimar el mejor compromiso entre los valores máximos de R, EE,  $Q_{30}$  y  $Q_{60}$ . Se

empleó un diseño central compuesto, donde los experimentos fueron combinaciones de los factores seleccionados en los siguientes rangos de concentraciones: Q de 0,1 % a 1,27 %, P de 0,1 % a 0,5 % y CMC de 0,01 % a 0,20 % (Tabla V).

Los experimentos fueron realizados en un orden aleatorio, para minimizar los efectos de los factores que no pueden controlarse, y que pueden introducir una tendencia en las mediciones.

**Tabla V.** Fase Optimización: Diseño Central Compuesto.

Sistema	Factores			Respuestas			
	Q (%)	P (%)	CMC (%)	R (%)	EE (%)	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)
1	0,60	0,25	0,11	63,8	88,5	40,2	63,3
2	1,00	0,40	0,20	61,6	97,5	43,3	66,7
3	1,00	0,10	0,01	85,6	80,0	56,6	79,3
4	0,20	0,40	0,20	59,9	92,5	21,4	29,5
5	0,60	0,25	0,26	63,7	101,1	49,4	72,3
6	0,10	0,25	0,11	66,9	95,3	27,5	37,7
7	0,60	0,00	0,11	78,7	81,3	56,1	76,9
8	0,60	0,25	0,11	73,9	88,1	43,5	66,2
9	1,00	0,10	0,20	72,3	95,9	49,4	68,1
10	0,60	0,50	0,11	65,0	95,9	31,4	49,0
11	0,60	0,25	0,11	69,9	88,8	35,4	55,4
12	0,60	0,25	0,00	78,2	88,4	50,7	73,9
13	0,20	0,40	0,01	63,4	87,3	50,0	72,3
14	0,20	0,10	0,20	67,6	97,6	21,3	28,2
15	0,20	0,10	0,01	62,3	87,5	76,6	89,5
16	1,27	0,25	0,11	74,0	85,2	41,5	67,5
17	1,00	0,40	0,01	67,3	95,6	52,6	69,2

Las respuestas de todos los experimentos fueron ajustadas a modelos polinómicos. A partir del análisis de los datos de los experimentos realizados (Tabla V), se obtuvieron modelos significativos para las respuestas, por lo tanto los resultados obtenidos en la predicción por el programa se consideraron confiables. En la Tabla VI se presenta un ANOVA completo para las cuatro respuestas estudiadas. Los coeficientes estimados, los errores estándares y las ecuaciones para las cuatro respuestas estudiadas, se obtuvieron mediante el ajuste a un modelo lineal en las respuestas R y EE, y un modelo cuadrático para las respuestas  $Q_{30}$  y  $Q_{60}$  (Tabla VII). En esta prueba se observó falta de ajuste en el análisis de EE, pudiendo deberse a que el error puro fue demasiado bajo para esta respuesta (Tabla VI).

En la Figura 25 pueden observarse los gráficos de superficie de respuesta estimados mediante el uso del programa Design-Expert®. Las cuatro respuestas fueron optimizadas simultáneamente, para obtener valores máximos de las mismas. Luego del procedimiento de optimización, se graficó la función de deseabilidad ( $D$ ) global de los factores estudiados (Figura 25 A). La función de  $D$ , puede tomar valores entre 0 (valor que indica que las respuestas no pueden alcanzar el valor buscado simultáneamente) y 1 (implica que todas las respuestas se encuentran en el valor deseado simultáneamente) y se define según la ecuación [38], donde  $d_1, d_2, \dots, d_N$  corresponden a la función de deseabilidad individual de cada respuesta optimizada:

$$D = \left[ \prod_{n=1}^N (d_n)^{wn} \right] x \frac{1}{\sum_{n=1}^N wn} \quad [38]$$

Donde  $wn$  es el peso que controla la importancia relativa de cada factor analizado. En este caso, se les dio la misma importancia a todos los factores, por lo que el valor de  $wn$  fue 1 para todos ellos, simplificando la ecuación de la siguiente forma:

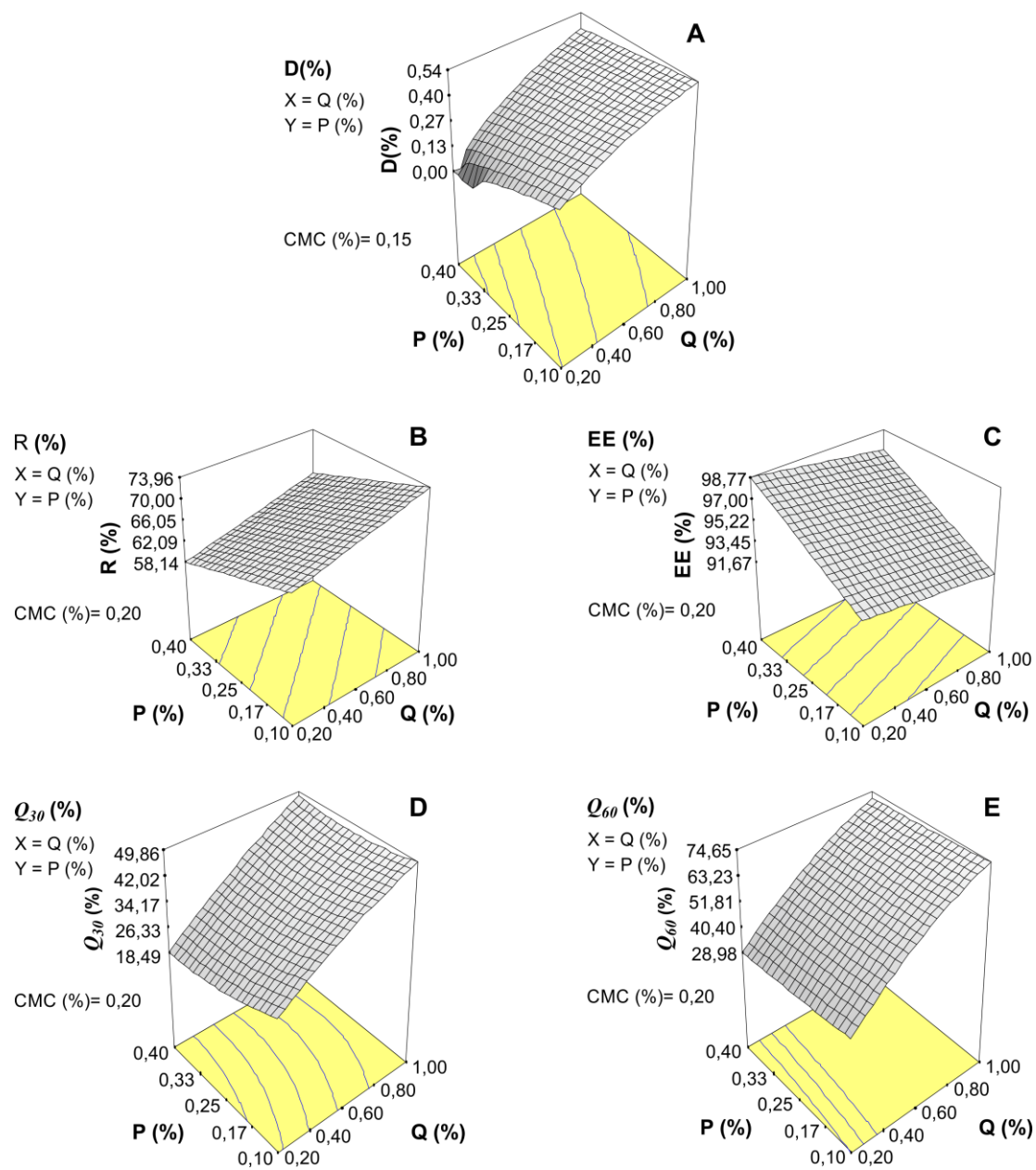
$$D = \left[ \prod_{n=1}^N d_n \right]^{1/N} \quad [39]$$

**Tabla VI.** ANOVA completo para las cuatro respuestas estudiadas.

		Suma de Cuadrados	GL*	Cuadrados medios	F	Probabilidad > F
EE	Modelo	330,11	2	165,05	9,33	0,0027
	B	97,32	1	97,32	5,50	0,0343
	C	232,80	1	232,80	13,15	0,0027
	Residuos	247,79	14	17,70		
	Falta de Ajuste	247,58	12	20,63	194,57	0,0051
	Error puro	0,21	2	0,11		
	Cor Total <sup>#</sup>	577,90	16			
Y	Modelo	523,00	3	174,33	7,86	0,0030
	A	160,95	1	160,95	7,25	0,0184
	B	252,34	1	252,34	11,37	0,0050
	C	109,39	1	109,39	4,93	0,0448
	Residuos	288,49	13	22,19		
	Falta de Ajuste	236,19	11	21,47	0,82	0,6672
	Error Puro	52,31	2	26,15		
Cor Total <sup>#</sup>	811,49	16				
$Q_{30}$	Modelo	2602,78	5	520,56	10,77	0,0006
	A	213,58	1	213,58	4,42	0,0594
	B	444,62	1	444,62	9,20	0,0114
	C	1174,07	1	1174,07	24,29	0,0005
	C <sup>2</sup>	583,82	1	583,82	12,08	0,0052
	AC	567,17	1	567,17	11,73	0,0057
	Residuos	531,75	11	48,34		
	Falta de Ajuste	498,82	9	55,42	3,37	0,2499
	Error Puro	32,92	2	16,46		
	Cor Total <sup>#</sup>	3134,53	16			
$Q_{60}$	Modelo	4020,98	5	804,20	11,62	0,0004
	A	901,51	1	901,51	13,02	0,0041
	B	402,61	1	402,61	5,81	0,0345
	C	1510,53	1	1510,53	21,82	0,0007
	C <sup>2</sup>	659,43	1	659,43	9,52	0,0104
	AC	1020,16	1	1020,16	14,73	0,0028
	Residuos	761,61	11	69,24		
	Falta de Ajuste	699,49	9	77,72	2,50	0,3181
	Error Puro	62,11	2	31,06		
	Cor Total <sup>#</sup>	4782,59	16			

\*Grados de libertad (GL)

<sup>#</sup>Suma de cuadrados totales corregida (Cor total)



**Figura 25.** Gráficos de superficie-respuesta para las respuestas  $D$  (A),  $R$  (B),  $EE$  (C),  $Q_{30}$  (D) y  $Q_{60}$  (E) a una concentración fija de CMC como se indica en cada gráfico.

**Tabla VII.** Coeficientes estimados, sus incertezas y las ecuaciones finales para las cuatro respuestas estudiadas.

	Factor	Coeficiente estimado	GL	Error estándar	Ecuación final
R	Intercepción	69,06	1	1,14	$R=69,06 + 3,61A - 4,31B - 3,02C$
	A	3,61	1	1,34	
	B	-4,31	1	1,28	
	C	-3,02	1	1,36	
EE	Intercepción	90,80	1	1,02	$EE=90,80+2,67B+4,40C$
	A	2,67	1	1,14	
	C	4,40	1	1,21	
$Q_{30}$	Intercepción	38.19	1	2,40	$Q_{30}= 38,19 + 4,16A - 5,72B - 10,32C + 8,44C^2 + 8,42AC$
	A	4.16	1	1,98	
	B	-5.72	1	1,88	
	C	10.32	1	2,09	
	$C^2$	8.44	1	2,43	
	AC	8.42	1	2,46	
$Q_{60}$	Intercepción	56,47	1	2,87	$Q_{60}= 56,47 + 8,54A - 5,44B - 11,70C + 8,97C^2 + 11,29AC$
	A	8,54	1	2,37	
	B	5,44	1	2,26	
	C	-11.70	1	2,51	
	$C^2$	8,97	1	2,91	
	AC	11,29	1	2,94	

Las condiciones óptimas de trabajo obtenidas del análisis mediante el programa se presentan en la Tabla VIII:

**Tabla VIII.** Valores de los factores para los cuáles las respuestas son máximas.

Solución	Q (%)	P (%)	CMC (%)	R (%)	EE (%)	$Q_{30}$	$Q_{60}$	$D$
1	1,00	0,10	0,20	73,96	91,67	49,86	74,65	0,59
2	1,00	0,10	0,20	74,00	91,61	49,70	74,47	0,59
3	0,39	0,10	0,01	74,51	84,21	70,20	89,46	0,56
4	0,40	0,10	0,01	74,58	84,20	70,12	89,50	0,56
5	0,42	0,10	0,01	74,66	84,27	69,04	88,61	0,56
6	0,63	0,10	0,02	76,22	84,37	62,67	84,55	0,55
7	0,90	0,10	0,03	78,55	83,91	57,88	80,83	0,52
8	1,00	0,10	0,12	76,53	87,93	45,65	69,45	0,52

En los gráficos de la Figura 25, puede observarse que con concentraciones altas de Q se obtienen valores mayores para el R,  $Q_{30}$  y  $Q_{60}$ , pero los de la EE son menores. Por otro lado, cuando se trabaja a concentraciones bajas de P se obtiene mejor R, si bien disminuye la EE (Figura 25 A y B). Esta contraposición entre los factores para obtener valores máximos de las respuestas justifica el bajo valor de la  $D$  (Tabla VIII).

### Verificación experimental

Las condiciones óptimas de preparación se verificaron mediante un experimento adicional independiente. La combinación ensayada fue la Solución 1 (Tabla VIII). Los valores experimentales estuvieron de acuerdo con los presentados en la Tabla VIII y las diferencias halladas estuvieron dentro del error del método (Tabla IX).

**Tabla IX.** Comparación entre las respuestas predichas por el programa y los valores obtenidos experimentalmente.

Solución 1	Predicho por el programa	Valor Experimental
R %	73,9	74,0
EE %	91,7	92,1
$Q_{30}$	49,8	47,5
$Q_{60}$	74,5	72,6

#### 4.1.3 Estudios de solubilidad aparente

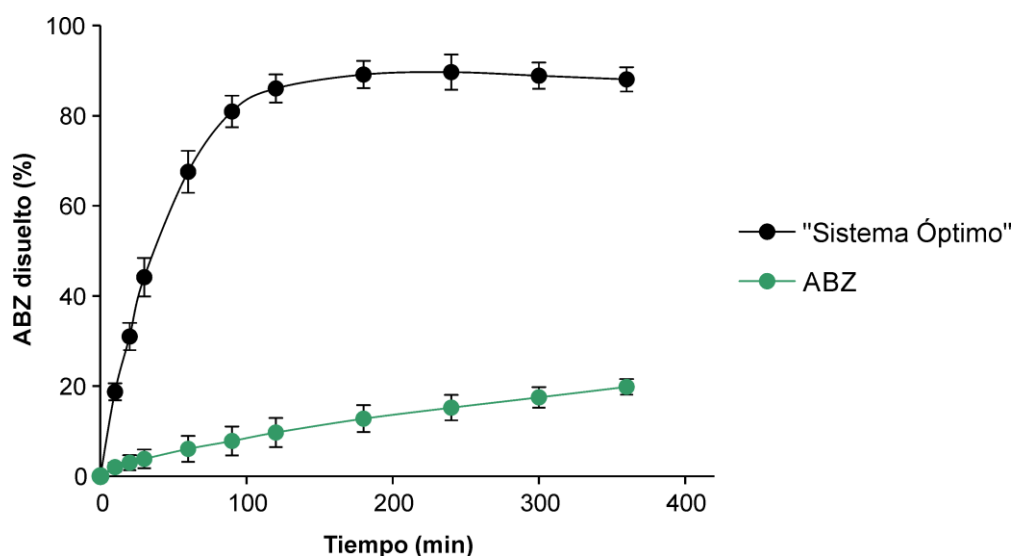
El ABZ incluido en las micropartículas formuladas bajo las condiciones óptimas, presentó una solubilidad aparente en agua a 25 °C de  $0,095 \pm 0,003$  mg/mL. Por lo tanto, considerando que la solubilidad del ABZ sin transpotador en agua fue de 0,001 mg/mL, el sistema formulado incrementó 95 veces la solulidad del IFA.

#### 4.1.4 Estudios de velocidad de disolución

El perfil de disolución para la formulación obtenida bajo las condiciones de la Solución 1 (“Sistema Óptimo”) se contrastó contra el perfil del ABZ sin tratamiento (Figura 26).

Como puede observarse, la formulación del ABZ incluido en micropartículas poliméricas ternarias aumenta considerablemente la velocidad de disolución del IFA. Asimismo, esta formulación presentó una ED del 78,9 %, incrementando de este modo en un 69,7 % la ED del ABZ.

Para evaluar la cinética de la liberación del ABZ desde la matriz polimérica, se ajustaron los perfiles de disolución obtenidos a las ecuaciones de Peppas, Higuchi, Weibull, Hixon y Crowell, sigmoidea y primer orden. La selección del modelo se realizó en base a los  $R^2$  ajustados, criterio de Akaike (AIC) y análisis de los residuos (Tabla X).



**Figura 26.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en el “Sistema Óptimo”.

Según los criterios mencionados, las ecuaciones de Weibull (ecuación [40]) y primer orden fueron las que permitieron obtener el mejor ajuste. La comparación de ambos modelos mediante la prueba F, permitió concluir que el modelo de Weibull fue el que proporcionó un mejor ajuste ( $p=0,078$ ).

$$Q (\%) = Q_{\infty} \cdot \left( 1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^b} \right) \quad [40]$$

El parámetro  $Q_{\infty}$  está relacionado con la cantidad de IFA disuelto a tiempo infinito, mientras que  $t_d$  representa el tiempo necesario para la disolución del 63,2 % del IFA presente en la formulación. El parámetro  $b$ , es un valor adimensional que se relaciona con la forma de la curva y se asemeja al orden cinético que sigue el proceso.<sup>171,172</sup> El hecho de que este último parámetro haya exhibido un valor próximo a 1, justifica que la curva de disolución presentara un buen ajuste también para la ecuación de primer orden. A partir de la inversa de  $t_d$  ( $1/t_d$ ), se obtuvo la constante de disolución ( $k_d$ ), que presentó un valor de 0,02 %/min.

**Tabla X.** Estimaciones de los parámetros de la ecuación de Weibull, error estándar, e intervalos de confianza del 95% (IC 95 %).

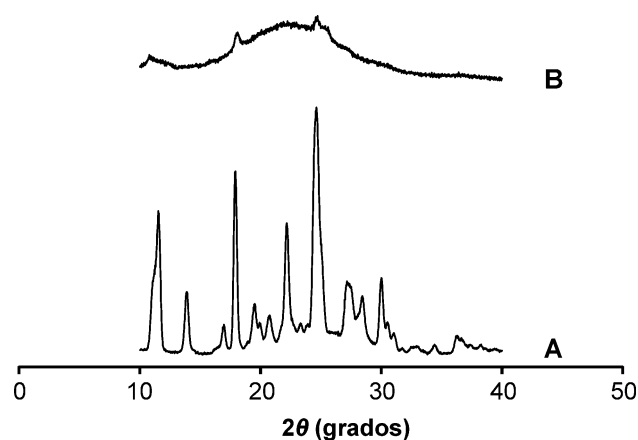
Parámetro	Estimación	Error Estándar	IC 95 %
$Q_{30}$	89,37	0,8748	87,58-91,16
$t_d$	42,46	1,4930	39,41-45,51
b	1,08	0,0478	0,98-1,18

A pesar de que el modelo de Weibull puede aplicarse con éxito a casi todo tipo de curvas de disolución y se utiliza comúnmente en estos estudios, no se deduce de ninguna ley física o fundamento cinético.<sup>173,174</sup> Este modelo es muy empleado en el estudio de perfiles de disolución de IFAs incluidos en sistemas matriciales, en donde la liberación se produce mediante procesos de difusión a través de la matriz.<sup>175,176</sup>

#### 4.1.5 Difracción de Rayos X

A partir del análisis de los difractogramas realizados para el ABZ sin transportador, se determinó que el mismo se encontró en forma cristalina, como lo demuestran los picos intensos y agudos a  $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54 que pueden observarse en su patrón de DRX (Figura 27).

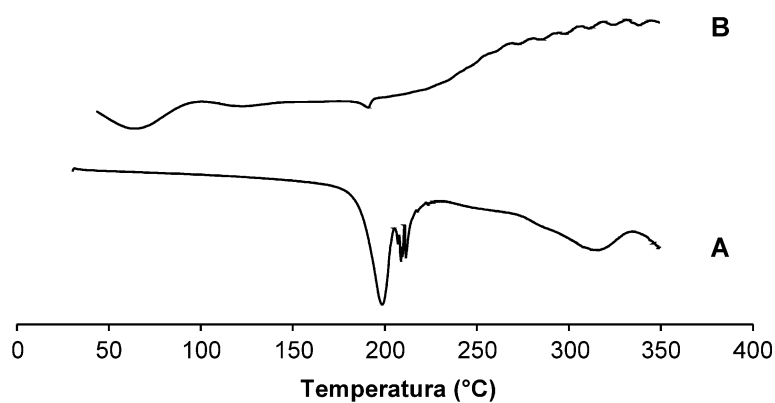
En los difractogramas obtenidos para el “Sistema Óptimo” se visualizaron bandas anchas y poco definidas, siendo estas señales características de los polímeros amorfos (Figura 27). Observándose además, dos picos de muy baja intensidad a  $2\theta$  17,85 y 24,54. Podría postularse que el ABZ incluido en las micropartículas forma una dispersión molecular con los polímeros, o que se ha convertido parcialmente en su forma amorfa. Debido a que los materiales en estado amorfo presentan velocidades de disolución más elevadas que sus formas cristalinas, los resultados antes presentados podrían justificar la alta velocidad de disolución que se obtiene con el sistema formulado respecto del ABZ sin transportador (Figura 26).<sup>177,178</sup>



**Figura 27.** Difractogramas del ABZ (A) y del “Sistema Óptimo” (B).

#### 4.1.6 Calorimetría diferencial de Barrido

En el termograma del ABZ (Figura 28) se observa un pico endotérmico agudo a 196,84 °C y un pico doble a 202,04 °C. Estos picos podrían indicar la presencia de polimorfos. En el termograma del “Sistema Óptimo” puede observarse la existencia de un pico endotérmico de baja intensidad a 174,49 °C.

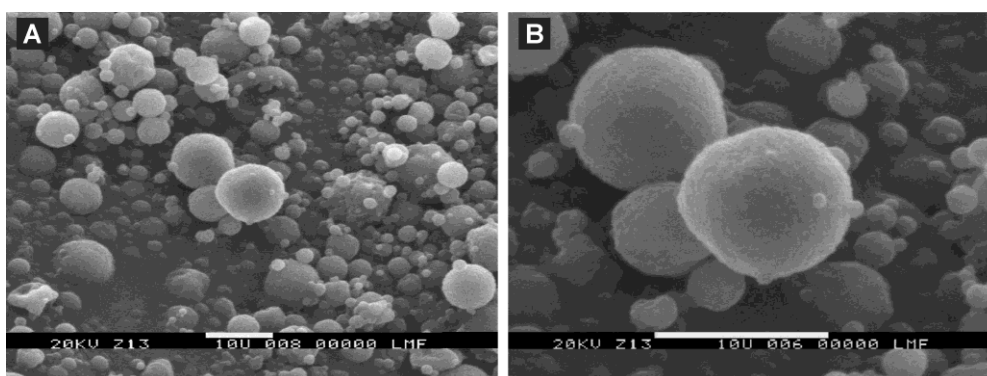


**Figura 28.** Termograma de CDB del ABZ (A) y del “Sistema Óptimo” (B).

Los resultados obtenidos en este análisis coincidieron con los obtenidos por DRX, en el sentido de que si bien hubo una disminución de la cristalinidad del ABZ en el sistema formulado, este no se encontró en estado completamente amorfo.

#### 4.1.7 Análisis morfológico

De acuerdo con los análisis realizados por microscopía electrónica de barrido (MEB), las micropartículas obtenidas bajo las condiciones óptimas (Figura 29) presentaron forma esférica, superficie lisa y tamaño uniforme (1-10  $\mu\text{m}$ ). El diámetro promedio de las micropartículas fue  $2,8 \pm 1,9 \mu\text{m}$ , el tamaño mínimo de partícula observado fue  $0,8 \mu\text{m}$  y el valor máximo,  $10,7 \mu\text{m}$ . No se observó formación de cristales en la superficie de las micropartículas.



**Figura 29.** Micrografías obtenidas por MEB del “Sistema Óptimo”. Aumento de 2000X (A). Aumento de 5000X (B).

#### 4.1.8 Estudios de estabilidad

Se realizaron estudios de estabilidad para las micropartículas formuladas bajo las condiciones óptimas luego de un periodo de catorce meses. Las micropartículas fueron almacenadas a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y se evaluó contenido residual de ABZ mediante CLAE. El contenido promedio de ABZ en las micropartículas fue del  $96 \pm 1 \%$  del valor original. Los resultados obtenidos revelaron que no hubo cambios significativos en el contenido de ABZ de las micropartículas luego de catorce meses,

mostrando que las modificaciones fisicoquímicas realizadas mediante la inclusión del ABZ en las micropartículas para incrementar la solubilidad y velocidad de disolución del IFA, no alteraron su estabilidad.

#### **4.1.9 Propiedades de flujo**

Los resultados fueron obtenidos por triplicado de acuerdo con las metodologías descritas fueron:  $D_o = 0,338$ ;  $D_e = 0,575$ ;  $I_e = 1,214$ ;  $IC = 41,16$ ;  $IH = 1,698$  y el ángulo de reposo  $\alpha = 38,48^\circ$ . Estos parámetros indican que las micropartículas formuladas presentan una pobre compresibilidad y propiedades de flujo, indicados claramente por los valores del IC y  $\alpha$ . Adicionalmente, los resultados de IH sugieren una alta cohesión y un comportamiento de flujo inadecuado. Por lo tanto, en orden de obtener una formulación apta para ser comprimida o encapsulada, uno o más excipientes deberían ser adicionados, para mejorar las características reológicas de las micropartículas.

#### **4.1.10 Reproducibilidad**

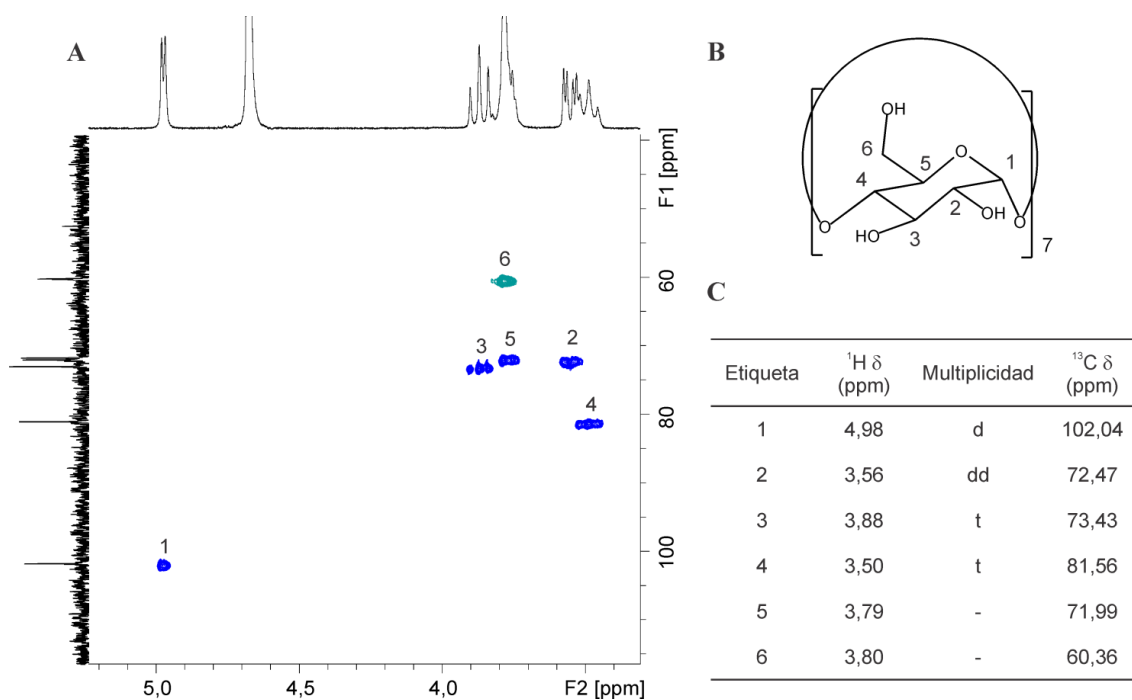
Se prepararon tres lotes del “Sistema Óptimo” y se realizaron los perfiles de disolución como se describió en la sección 3.2.1.8. Estos se compararon de a dos empleando el cálculo de  $f_2$  mediante la ecuación [41]. Un valor de  $f_2$  superior al 50 % y de  $f_1$  inferior a 15 % implican que no existe diferencia significativa entre los perfiles estudiados.<sup>179</sup> Los valores de  $f_2$  obtenidos para los lotes analizados fueron 76,8; 64,0 y 61,9 y los de  $f_1$  fueron 3,3; 7,7 y 8,0; indicando de este modo que no existen diferencias significativas entre los perfiles de disolución de micropartículas de distinto lote.

### **4.2 Caracterización estructural de $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina**

#### **4.2.1 $\beta$ -ciclodextrina**

Se realizaron espectros de RMN, con el fin de identificar y caracterizar la estructura de la  $\beta$ -CD. En el espectro de RMN de  $^1H$ , la simetría aparente de las siete

unidades de glucopiranososa que conforman el anillo macrocíclico de la  $\beta$ -CD y la rápida interconversión entre varias conformaciones posibles del anillo macrocíclico, así como las de los anillos de glucopiranosicos en solución, resultan en la aparición de un único conjunto de resonancias como si se tratase de un sólo un residuo glucopiranosilo. En este espectro puede observarse además, cierta superposición de las señales de **H-2** y **H-4**, así como las de **H-5** y **H-6**, estas señales pueden diferenciarse claramente en los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 30 A). Este espectro de HSQC editado de la  $\beta$ -CD discrimina las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los grupos  $\text{CH}_2$  en la posición 6 de la  $\beta$ -CD (en verde), de las señales de CH en las posiciones 1-5 (en azul). Por otro lado, el **H-1** (protón anomérico) presenta un característico desplazamiento a campos bajos.



**Figura 30.** Espectro HSQC de  $\beta$ -CD (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B). Tabla de asignación de las señales de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (C).

### 4.2.2 Metil- $\beta$ -ciclodextrina

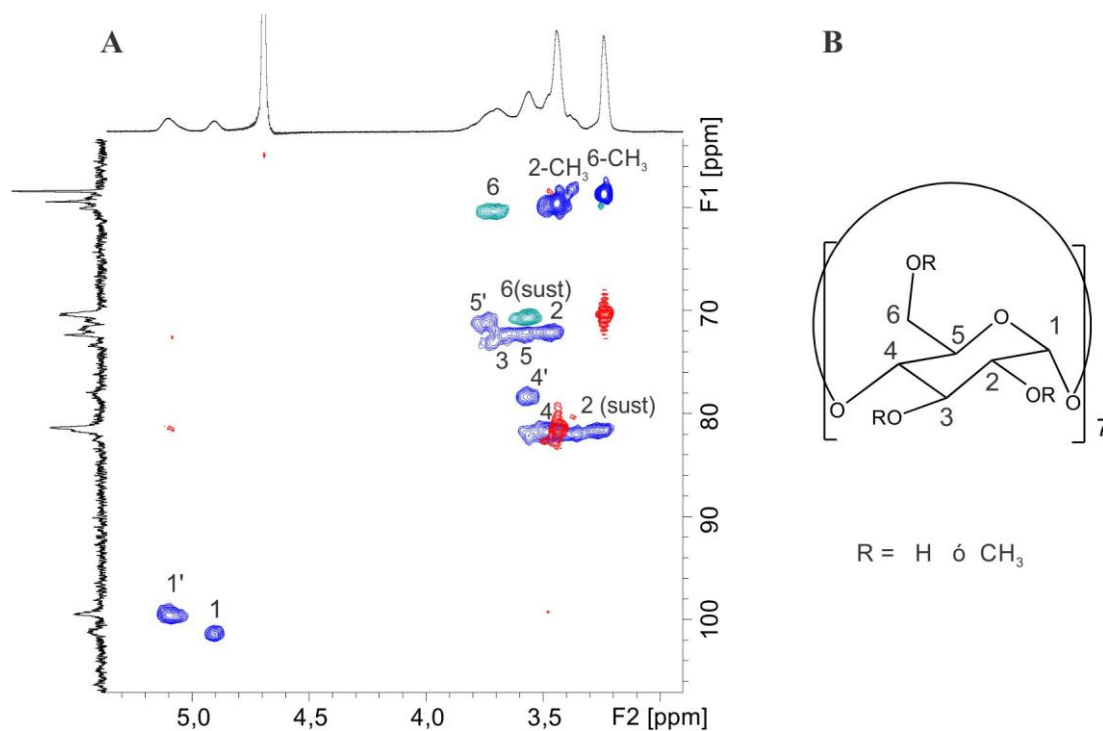
Se realizaron experimentos de RMN para estudiar el patrón de sustitución de la M- $\beta$ -CD. A partir de los mismos pudo observarse que las posiciones sustituidas fueron la 2 y la 6, mientras que no se evidenciaron señales que indiquen sustitución en la posición 3.

En la Figura 31 A se observan los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y HMBC obtenidos para la M- $\beta$ -CD, que se encuentran superpuestos para facilitar la interpretación de los mismos. En el espectro HSQC es posible observar fuertes correlaciones entre los H y los átomos de C de los sustituyentes metilo (**6-CH<sub>3</sub>** y **2-CH<sub>3</sub>**), permitiendo diferenciar las señales de dichos protones con las de los H de 1 a 5 de la  $\beta$ -CD, debido a que los carbonos de los grupos metoxilo presentan desplazamientos a campos más altos que los de dicho carbohidrato. Por otro lado, el **C-6** sin sustitución presentó un desplazamiento químico muy similar a los C de los metilos, pero pudo ser distinguido por la edición del HSQC DEPT, presentándose como una señal en verde. Los núcleos de los sitios sustituidos fueron fácilmente identificados por las fuertes correlaciones en el HMBC entre los núcleos de C de los sitios sustituidos (**C-2 sust** o **C-6 sust**) y los protones de los sustituyentes metilo (señales en rojo). También se identificaron los núcleos de los sitios no sustituidos, mostrando de este modo que cada uno de los sitios fue sustituido sólo parcialmente.

La sustitución no solo desplazó los picos del sitio sustituido, sino también los picos de núcleos vecinos. A este último factor, que incrementó la complejidad de los espectros, se adicionó la superposición de las señales muy similares de las subunidades con diferente sustitución de las CDs asimétricamente funcionalizadas.

Los átomos de C directamente sustituidos (**C-2** y **C-6**) presentaron un desplazamiento en los espectros de  $^{13}\text{C}$  de unas 10 ppm a campos más bajos con respecto a sus homólogos no sustituidos, mientras que los carbonos vecinos (**C-1'**, **C-4'** y **C-5'**) experimentaron cambios en sus desplazamientos de entre 1,5 y 3,5 ppm a campos más altos. Los protones unidos a carbonos directamente sustituidos se

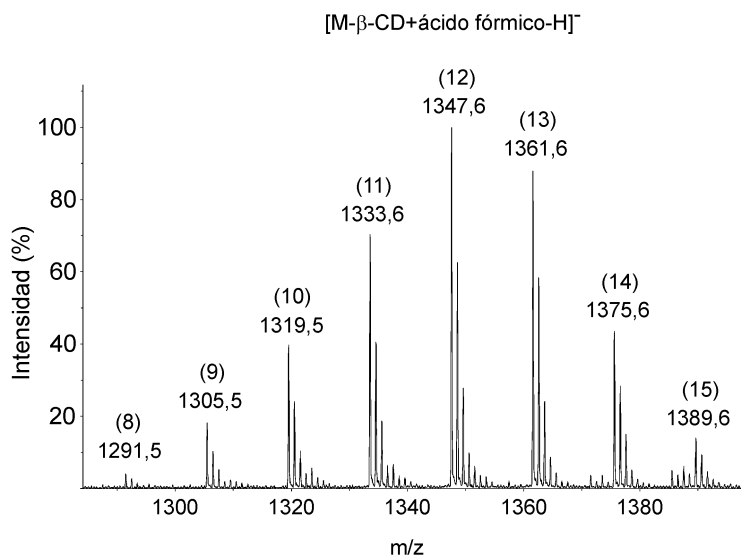
desplazaron a campos más altos entre 0,15-0,22 ppm, mientras que los protones en carbonos vecinos se desplazaron a campos más bajos unas 0,1 ppm.



**Figura 31.** Espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (señales verdes correspondientes a  $\text{CH}_2$  y señales azules a  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$ ) y HMBC (señales rojas), realizados para  $\text{M-}\beta\text{-CD}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

El GS obtenido a partir de los espectros de masas de alta resolución, fue 12,2 por molécula de  $\beta\text{-CD}$  calculado mediante la ecuación [30] (Figura 32). Considerando que el número máximo de hidroxilos que podrían ser sustituidos es 21,<sup>72</sup> la  $\text{M-}\beta\text{-CD}$  analizada presentó más del 50 % de estas posiciones sustituidas. Por otro lado, como se discutió anteriormente sólo los hidroxilos ubicados en las posiciones 2 y 6 de la  $\beta\text{-CD}$  se encontraron sustituidos en la  $\text{M-}\beta\text{-CD}$  estudiada, teniendo en cuenta que el número

total de hidroxilos en la molécula que ocupan esa posición son 14, el valor de GS obtenido indicaría una sustitución del 87,1 % de los sitios en dicha posición.



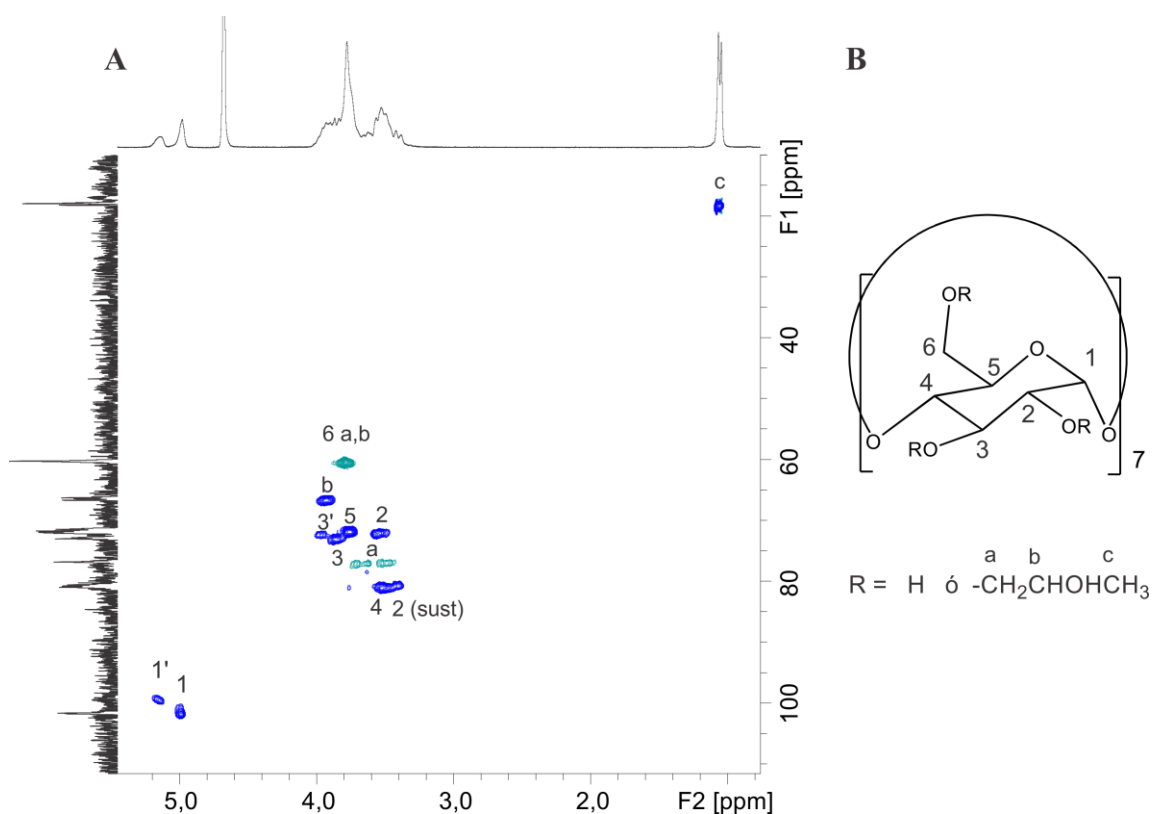
**Figura 32.** Espectro de masas de alta resolución realizado para la M- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa.

Además, el GS se determinó mediante RMN de  $^1\text{H}$  a partir de las áreas de los picos de protones. Como se puede observar en la Figura 31 A, los únicos picos que no presentan superposición son **H-1** y **H-1'**, por lo que el GS se determinó mediante la comparación de la suma de estos dos picos (que integra el H anomérico) y las áreas de los picos sumados de todos los otros protones. El GS obtenido de esta forma fue 1,66 por molécula de glucosa (11,62 por molécula de CD). Los valores de GS obtenidos a partir de  $^1\text{H}$  RMN fueron consistentemente más bajos que los obtenidos a partir de MS.

### 4.2.3 Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

En la Figura 33, puede observarse el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC con las asignaciones de las señales correspondientes. La sustitución en la posición 2 de la CD, produjo en los espectros de  $^1\text{H}$  un corrimiento hacia campos más bajos de los protones

**H-1** y **H-3** (**H-1'** y **H-3'**), y en los espectros de  $^{13}\text{C}$  un corrimiento hacia campos más altos de los **C-1** y **C-3** (**C-1'** y **C-3'**). Los estudios de RMN realizados, permitieron determinar que la HP- $\beta$ -CD empleada presentó sustitución en la posición 2 de la CD, mientras que no pudieron evidenciarse sustituciones en las posiciones 3 y 6. Asimismo, se identificaron núcleos correspondientes a la posición 2 sin sustitución, indicando una sustitución parcial del derivado de  $\beta$ -CD.



**Figura 33.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, realizados para la HP- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

Como se mencionó en la sección 3.2.3.3, la determinación del GS por RMN debe realizarse aislando la señales en los espectros por lo cual la formula empleada depende de cada derivado de CD en particular. En el caso de la HP- $\beta$ -CD, el GS fue determinado mediante la ecuación [42], donde la combinación de las áreas **H-1** y **H-1'** integran para

un protón (protón anómero) y el área de la señal **H-c**, corresponde a los protones del metilo del grupo 2-hidroxipropilo e integra para tres protones.

$$GS = \frac{A_{Hc}}{3 \times A_{H-1} + A_{H-1'}} \quad [42]$$

Empleando la ecuación [42], el GS obtenido para la HP- $\beta$ -CD analizada fue de 0,67 sustituyentes por unidad de glucopiranososa. Si consideramos que mediante los análisis realizados por RMN sólo se detectó sustitución en la posición 2, el resultado obtenido indicaría que fueron sustituidos el 67 % de los hidroxilos posibles en esta posición.

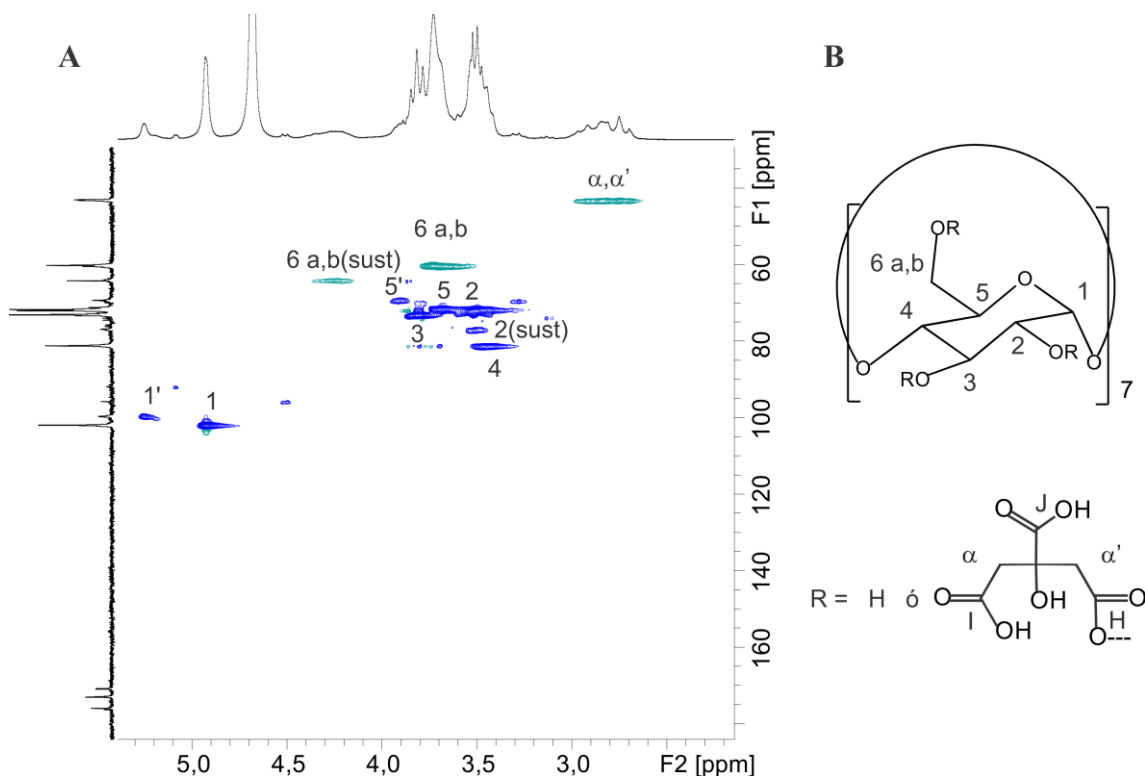
#### 4.2.4 Síntesis y caracterización de citrato- $\beta$ -ciclodextrina

La mezcla de reacción se purificó mediante sucesivos lavados hasta corroborar la ausencia de ácido cítrico (reactivo sin reaccionar) y se secó en estufa. El producto de reacción se obtuvo con un rendimiento del 73 % y se le realizaron los espectros de RMN.

La señal **a** a 2,87 ppm (Tabla XI) se presentó en forma de multiplete, en lugar de doble doblete correspondiente a los protones metilénicos del ácido cítrico, observada en los espectros de  $^1\text{H}$  obtenidos para la mezcla de reacción (no mostrados). Esto indicaría la formación del producto de reacción.<sup>82</sup>

Además de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se realizaron espectros en 2D. Se realizó un  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, en el cuál se observaron correlaciones entre protones, es decir nos permitieron determinar H vecinos en la molécula. Por otro lado, el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 34) permitió asignar las señales de  $^1\text{H}$  a las de  $^{13}\text{C}$ , es decir las uniones directas entre protones y carbonos. En este último, se presentan señales de correlación correspondientes a la sustitución en la posición 2 y en la posición 6. La sustitución en la posición 2 (**2 sust**), se evidencia mediante una señal de correlación observada a 77,21 ppm del espectro de  $^{13}\text{C}$  y a 3,49 ppm del espectro de  $^1\text{H}$ , mientras

que la sustitución en la posición 6 (**6 a,b sust**), corresponde a la señal presente a 64,17 ppm del espectro de  $^{13}\text{C}$  y a 4,25 ppm del espectro de  $^1\text{H}$ .



**Figura 34.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC parcial de C- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observó también que las señales correspondientes a los carbonos carboxílicos de los extremos del ácido cítrico se encontraron diferenciadas (Tabla XI, carbonos **H** y **J**) y presentaron señales de correlación con los protones metilénicos de dicho ácido (protones  $\alpha$ - $\alpha'$ , Figura 34 y Tabla XI) en el  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (este espectro no se muestra, nos permitió detectar uniones entre carbonos y protones a dos o tres enlaces). Estas señales, indicaron que ambos carbonos estaban unidos al carbono metilénico y presentaban un entorno diferente.

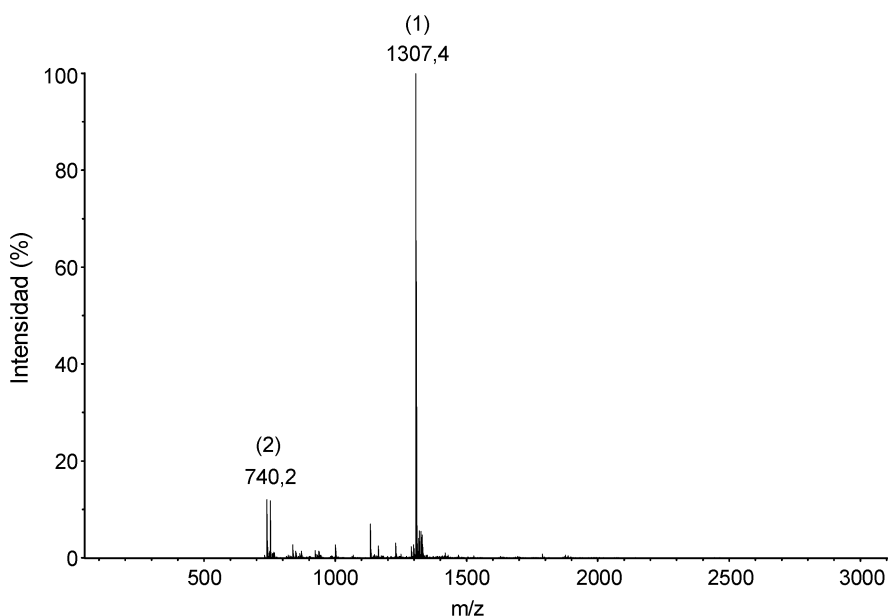
Los núcleos etiquetados como 1' y 5' (Figura 34 y Tabla XI) correspondieron a los átomos vecinos a la sustitución en las posiciones 2 y 6, respectivamente.

**Tabla XI.** Asignación de las señales de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Etiqueta	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	Multiplicidad
$\alpha$	43,19	2,87	m
6 a,b	60,20	3,77	-
6 a,b (sust)	64,17	4,25	-
5'	69,34	3,90	-
3	71,74	3,75	m
2	72,02	3,55	m
5	73,04	3,86	m
2 (sust)	77,21	3,49	-
4	81,08	3,49	m
1'	99,81	5,27	s
1	101,82	4,98	s
H	170,69		
I	173,12		
J	176,15		

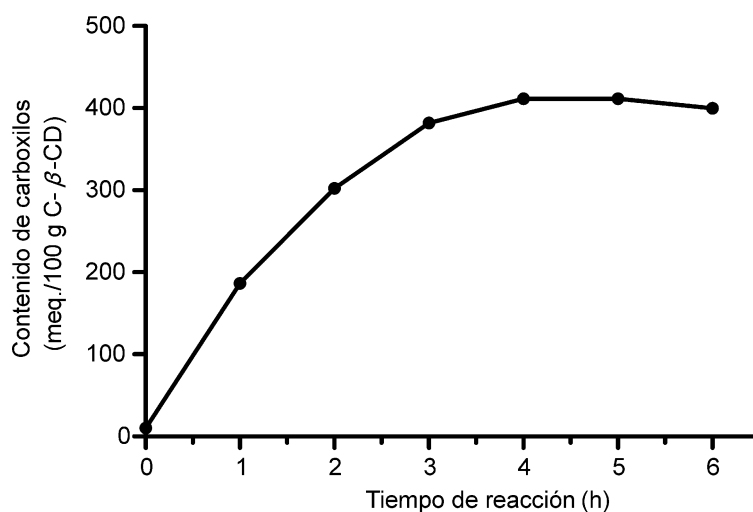
El GS obtenido a partir de la integración del espectro de RMN  $^1\text{H}$  arrojó un valor de 0,22, correspondiente a la integración de los protones  $\alpha$  que integran para 4 protones y los protones **H-1** y **H-1'** que integran para un proton.

Al realizar los análisis de MS en modo de ionización negativo, se observó un ion molecular con una relación  $m/z$  de 1307,4 (Figura 35). La deconvolución de los datos obtenidos, nos permitió inferir que este ión correspondía al éster formado entre la molécula de  $\beta$ -CD y el ácido cítrico. El ión con una relación  $m/z$  de 740,2 se debió al derivado C- $\beta$ -CD con dos sustituyentes, presentando dos cargas que correspondieron a la pérdida dos protones. La presencia de este derivado justificaría el valor obtenido para el GS por RMN, que implicaría 1,54 sustituyentes por molécula de CD.



**Figura 35.** Espectro de masas de alta resolución, en modo negativo del C- $\beta$ -CD. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa.

Se realizó la valoración del contenido de carboxilos en las muestras de C- $\beta$ -CD según lo descrito en la sección 3.2.3.4, a diferentes tiempos de iniciada la reacción. Los resultados de éste análisis mostraron un contenido constante de carboxilos en la muestra, a partir de las 4 h de reacción (Figura 36), y nos permitieron definir el tiempo de reacción.



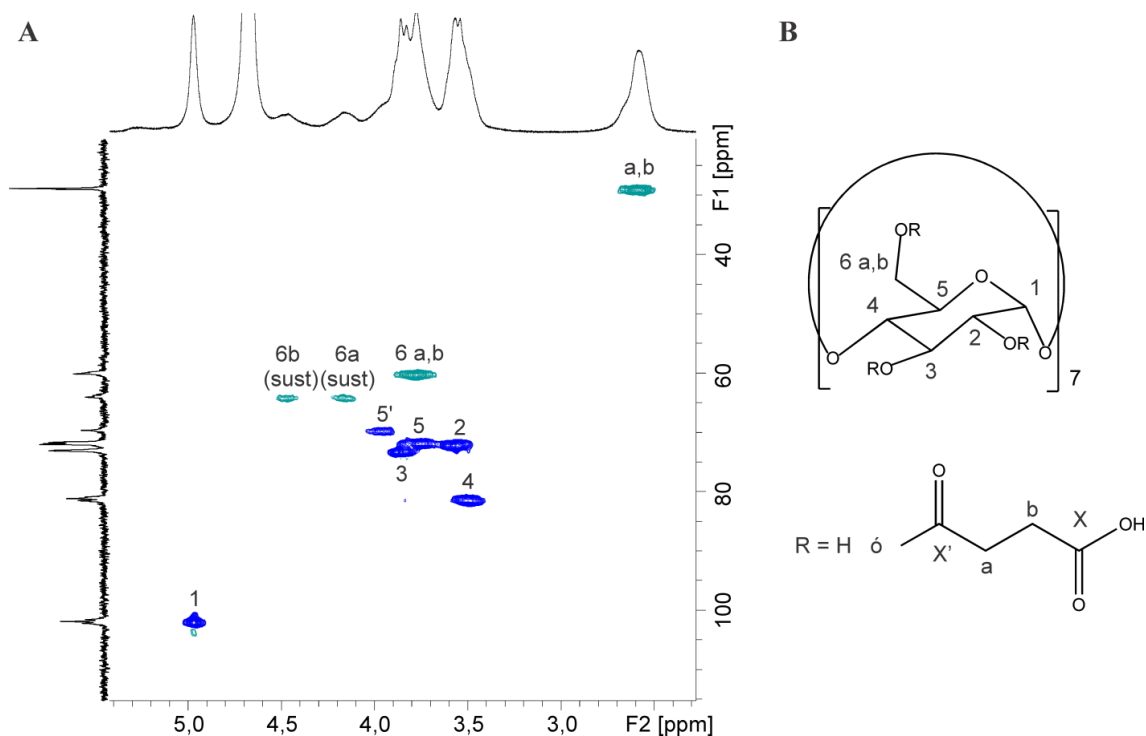
**Figura 36.** Contenido de grupos carboxílicos en mmoles cada 100 g de C-β-CD en función del tiempo de reacción.

#### 4.2.5 Síntesis y caracterización de succinil-β-ciclodextrina

La reacción planteada en el Esquema 2 (sección 3.2.2.2), se llevó a cabo con un rendimiento del 76,2 %. A continuación se realizó una extensiva caracterización de este derivado de β-CD, mediante RMN y MS.

Los espectros de RMN realizados para la S-β-CD mostraron claramente la monofuncionalización en el 6-OH (alcohol primario). En el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 37), se observan las señales de  $^1\text{H}$  debidas a las subunidades de glucopiranososa funcionalizadas además de las señales debidas a la glucopiranososa no sustituida. En los campos más altos se observa una señal a 2,58 ppm, debida a la cadena etilénica del grupo succinilo (**a** y **b**; Figura 37 A). Esta señal se encontró ensanchada y desplazada en comparación con la señal obtenida para el ácido succínico en presencia y en ausencia de β-CD. Las señales a  $\delta$  4,47 y 4,16 ppm corresponden a los protones diastereotópicos **H-6 sust**. Estas señales se encontraron desplazadas a campos más bajos respecto de su homólogo sin sustitución, como consecuencia del desapantallamiento que produjo sobre dichos H la unión del grupo carboxílico. Además, se observó una señal a  $\delta$  3,97 ppm, que en el espectro de COSY (Figura 38) presentó correlación con los **H-6a sust** (línea punteada roja) y con **H-4** (línea punteada celeste). Estos datos indicaron que dicha señal

correspondía a **H-5'**, que presentó un corrimiento a campos más bajos que su homólogo en una molécula no sustituida por la existencia del grupo carboxilo.

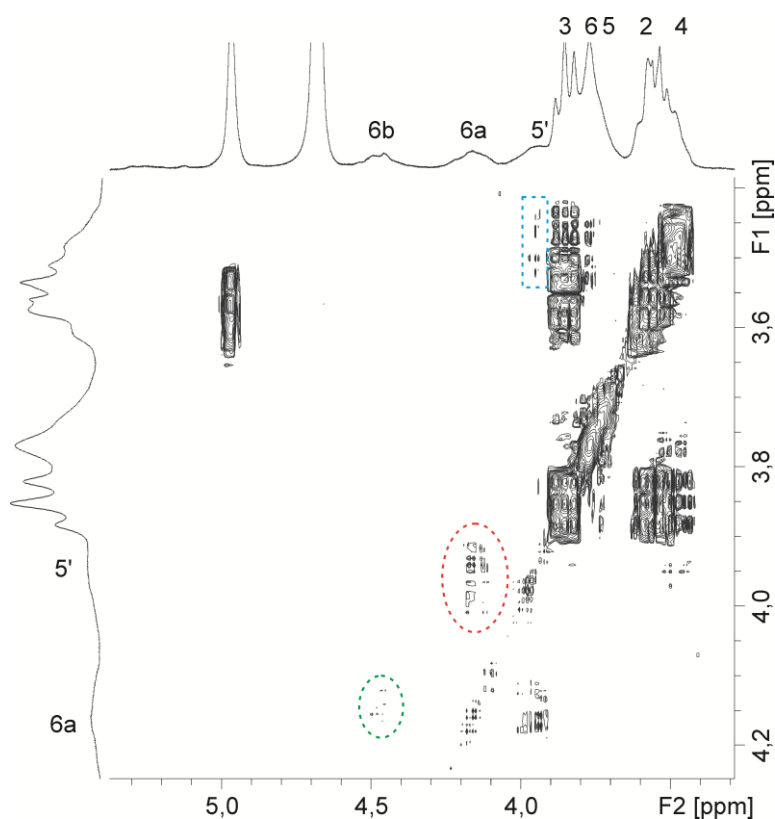


**Figura 37.** Espectro de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC parcial de S-β-CD en D<sub>2</sub>O (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

En el espectro de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de S-β-CD (Figura 37 A), se observa una señal de <sup>13</sup>C debida al carbono **C-6 sust** a δ 64 ppm, que muestra correlación con los **H-6 sust** y una señal a debida al **C-5'** a δ 68,9 ppm correlacionada con los protones **H-5'**. También se identificaron los núcleos homólogos de los sitios no sustituidos, mostrando de este modo que la posición 6 se encuentra sustituida parcialmente.

Se realizaron espectros de <sup>13</sup>C del ácido succínico en presencia y ausencia de β-CD. En los mismos, se observó la señal de los carbonos carboxílicos a δ 177,09 ppm, verificando que la presencia de β-CD no produjo corrimiento de la señal. En el espectro de <sup>13</sup>C de S-β-CD se observaron las señales correspondientes a los carbonos carboxílicos de los extremos del ácido succínico, presentando una señal a δ 173,99 ppm

correspondiente al carbonilo del éster formado (**X'**, Figura 37 B) y otra señal a  $\delta$  176,33 ppm que corresponde al grupo carboxilo libre (**X**, Figura 37 B). Estos carbonos presentaron correlación con los protones metilénicos (**a** y **b**) en el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, indicando que ambos carbonos se encontraban unidos al carbono metilénico y presentaban un entorno diferente.



**Figura 38.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY parcial de S- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$ .

El GS se determinó a partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , partiendo del conocimiento que el área del protón **H-1** integra para 1 H (1 protón por unidad de glucopiranososa) y el área de los protones de los grupos metileno del succinilo (**H-a** y **a'**) integran para 4 H:

$$\text{GS} = \frac{A_{\text{H-a y a}'}}{4 \times A_{\text{H-1}}} \quad [43]$$

A partir de esta relación entre las áreas de los protones y empleando la ecuación [43], se obtuvo un GS de 0,37 por unidad de glucosa y por lo tanto de 2,3 por unidad de CD.

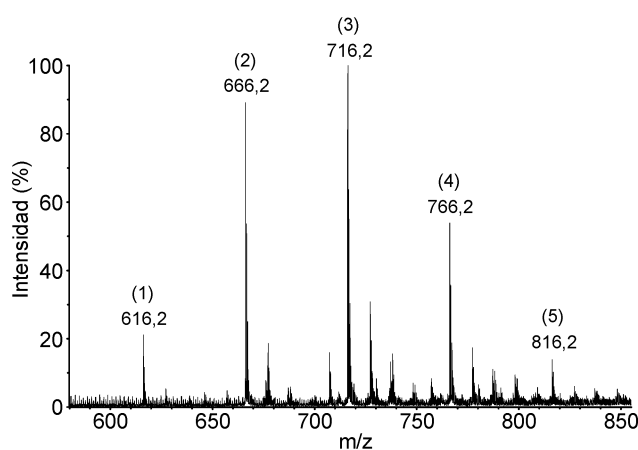
Pudo realizarse el cálculo de modo análogo a partir del área correspondiente a los **H-6a,b** conociendo que integra para 2 H (ecuación [44]):

$$GS = \frac{A_{H-6a,b}}{2 \times A_{H-1}} \quad [44]$$

El GS obtenido mediante la aplicación de esta ecuación fue de 0,42 por molécula de glucosa y 2,94 por molécula de CD.

La diferencia entre los valores obtenidos mediante ambas ecuaciones podría atribuirse a diferencias en la integración de las señales.

A partir de los análisis de MS se determinó que el derivado obtenido, estaba compuesto por una mezcla de S- $\beta$ -CDs con distintos GSs. En la Figura 39 puede observarse que los picos presentes en el espectro de masas presentan una distribución normal.



**Figura 39.** Espectro de masas de alta resolución del S- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa.

En este espectro, los picos con las relaciones m/z: 616,2; 666,2; 716,2; 766,2 y 816,2 están relacionados a especies doblemente cargadas (por la pérdida de dos protones) y corresponden a los valores de masa exacta: 1234,4; 1334,4; 1434,4; 1534,4 y 1634,4. El análisis de estos datos, permitió deducir que el producto contenía una mezcla de moléculas de S- $\beta$ -CD que presentaban de uno a cinco sustituyentes. El GS obtenido mediante la ecuación [30], fue de 2,83 por molécula de CD. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos por RMN.

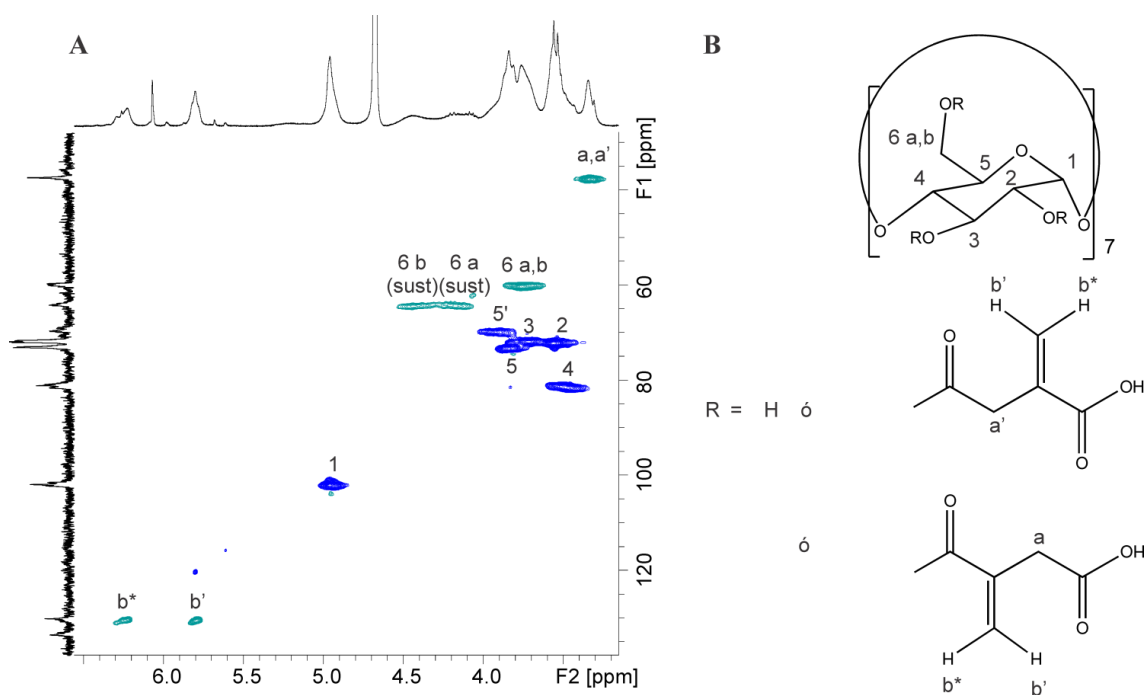
#### 4.2.6 Síntesis y caracterización de itaconil- $\beta$ -ciclodextrina

Se detallará en esta sección los resultados correspondientes a la síntesis de I- $\beta$ -CD (Esquema 3) con calentamiento en estufa, ya que el producto obtenido por calentamiento a reflujo presentó características muy similares sólo que con un menor GS.

En el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC realizado para el compuesto I- $\beta$ -CD (Figura 40 A), se observa una señal de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  3,34 ppm que presenta correlación con una señal de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  37,90 ppm, estas señales corresponden a los grupos metileno del grupo itaconilo (**a** y **a'**, Figura 40 B). Estas señales se encontraron ensanchadas y desplazadas a campos más bajos en comparación con la señal obtenida para el ácido itacónico en presencia y en ausencia de  $\beta$ -CD. El protón vinílico **b\*** se encontró más desapantallado que el **b'** por su configuración cis con respecto al grupo carbonilo y por lo tanto su señal se presentó a campos más bajos.

En el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 40 A), se observan señales de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  4,45 y 4,18 ppm que se correlacionan con la señal de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  64,38 ppm. Estas señales corresponden a los núcleos en la posición **6 sust** y se encuentran desplazadas a campos más bajos respecto a las de las producidas por los núcleos homólogos sin sustitución, como consecuencia del desapantallamiento que produce sobre dichos núcleos la unión del grupo carboxílico.

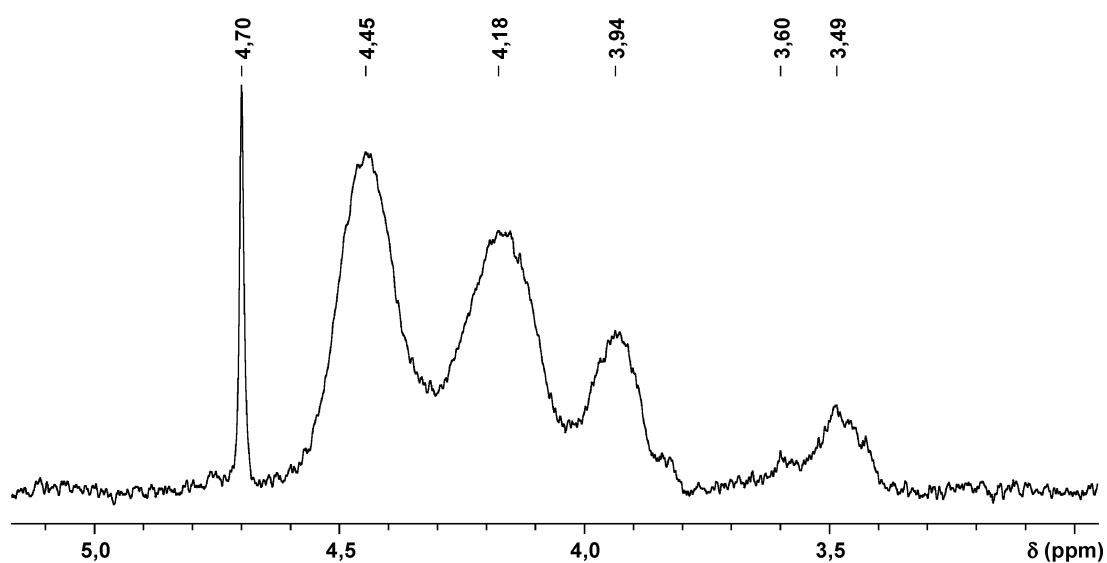
En el espectro HSQC se observa una señal de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  3,94 ppm, que presenta correlación con una señal de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  69,80 ppm. En los espectros  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY realizados, no se hallaron correlaciones de dicha señal de  $^1\text{H}$  con ninguna otra señal de  $^1\text{H}$  de la molécula, por lo que se decidió estudiar el sistema de *spins* mediante otro de experimento de RMN, el TOCSY selectivo. Al intentar estudiar el sistema de *spin* al que pertenecía este H, se planteó el problema que para realizar este experimento y obtener conclusiones válidas la señal no debía estar superpuesta con otra señal de  $^1\text{H}$ .



**Figura 40.** Espectro HSQC parcial de I- $\beta$ -CD en  $\text{D}_2\text{O}$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

Efectivamente, si se observa el espectro de HSQC puede notarse que la señal de interés se superpone parcialmente con las pertenecientes a **H-6**, **H-5** y **H-3**. Partiendo de la hipótesis de que este H podría estar relacionado a los **H-6 a,b sust** y los resultados discutidos en la sección 4.2.5, se decidió irradiar selectivamente la señal a  $\delta$  4,45 ppm correspondiente a **H-6 b sust** que no presentaba solapamiento con otras señales.

Al realizar este experimento pudo observarse que la señal irradiada pertenecía al mismo sistema de *spin* que las señales a  $\delta$  4,18, 3,94, 3,60 y 3,48 ppm (Figura 41). Estos resultados indicaron que la señal a  $\delta$  3,94 ppm correspondía a un H perteneciente a una subunidad de glucopiranososa funcionalizada, y que se trataría de **H-5'**. Como se comentó anteriormente, la señal a  $\delta$  4,18 se debe a **H-6 a sust.** Por otro lado, las señales a  $\delta$  3,60 y 3,48 ppm corresponderían a **H-4'** y **H-2'**, que debido a que el corrimiento no fue lo suficientemente amplio respecto de las señales de sus homólogos sin sustitución, no pudieron ser observadas como señales diferenciadas en el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC.



**Figura 41.** Espectro TOCSY selectivo de I- $\beta$ -CD, irradiando el protón a  $\delta$  4,44 ppm.

En los espectros de  $^{13}\text{C}$  se observaron señales a  $\delta$  172,60 y 169,37 ppm, estas señales se encontraron desplazadas a campos más altos respecto de las señales correspondientes a los grupos ácidos libres en los espectros de  $^{13}\text{C}$  del ácido itacónico en presencia y ausencia de  $\beta$ -CD. La señal a  $\delta$  169,37 ppm correspondió al C del grupo carbonilo más próximo al grupo vinílico ya que presentó correlación con los protones vinílicos (**b\*** y **b'**) en los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, mientras que el C del grupo carbonilo con desplazamiento a  $\delta$  172,60 ppm, no presentó dicha correlación. Adicionalmente, la correlación de este último carbono carbonilílico con **H-a** y **a'** es más intensa que la correlación de dichos H con el C con  $\delta$  a 169,3 ppm.

El GS se determinó a partir de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , empleando el área del protón **H-1** que integra para 1 H (1 protón por unidad de glucopiranososa) y el área de uno de los H vinílicos del itaconilo (**H-b'** y **b\***) que integran para 2 H (ecuación [45]):

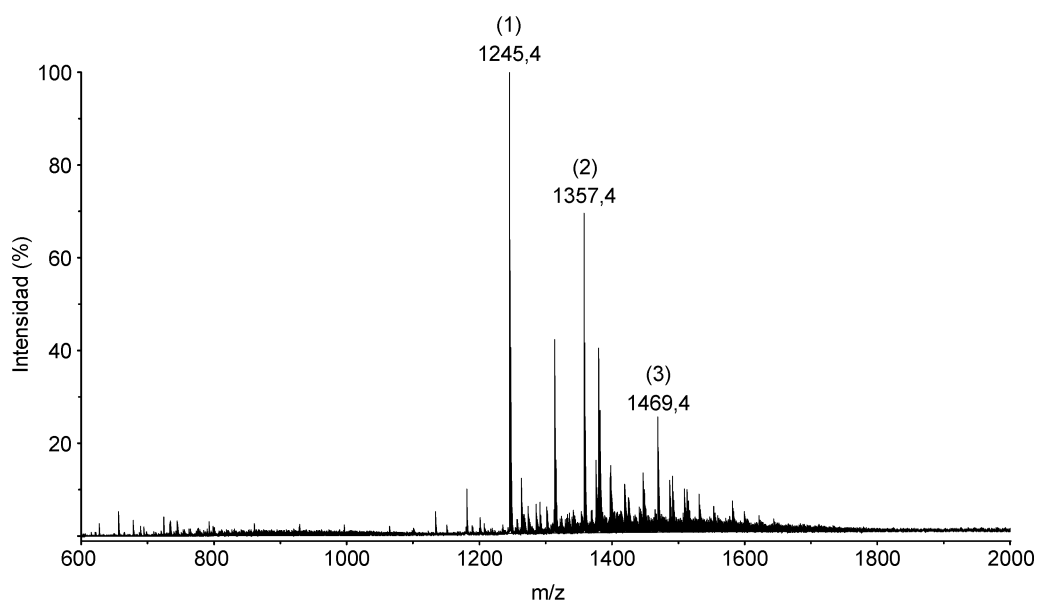
$$\text{GS} = \frac{A_{\text{H-b}'} + A_{\text{H-b}^*}}{2 \times A_{\text{H-1}}} \quad [45]$$

A partir de esta relación entre las áreas de los protones se obtuvo un GS de 0,36 por unidad de glucosa y por lo tanto de 2,52 por unidad de CD.

Cabe mencionar que el GS obtenido para el I- $\beta$ -CD obtenido por calentamiento a reflujo fue de 0,20 por unidad de glucosa, es decir 1,40 por unidad de CD. Posteriormente, se empleó este derivado para formular los sistemas con ABZ.

No pudieron realizarse los cálculos de modo análogo a partir del área correspondiente a los **H-6a,b**; debido a que dichas señales se encontraban distorsionadas por la señal del agua.

En la Figura 42 puede observarse el espectro de masas del I- $\beta$ -CD obtenido mediante el método a reflujo. En este espectro, realizado en modo de ionización negativo, se observan los iones con una relación m/z de 1245,4; 1357,4 y 1469,4, que corresponden a moléculas de I- $\beta$ -CD con uno, dos y tres sustituyentes, respectivamente. Estos iones presentaron una distribución claramente asimétrica, siendo el pico con mayor intensidad el correspondiente al derivado con un sustituyente. El GS calculado mediante la ecuación [30] fue de 1,52, siendo este valor consistente con el obtenido por RMN.



**Figura 42.** Espectro de masas de alta resolución del I- $\beta$ -CD, en modo negativo. Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa.

#### 4.2.7 Síntesis y caracterización de hexil- $\beta$ -ciclodextrina

La reacción planteada en el Esquema 4 (sección 3.2.2.4), se llevó a cabo con un rendimiento del 42 %. La función del NaOH en la primera etapa de la reacción fue generar el ión alcohóxido de  $\beta$ -CD, que reaccionó posteriormente con el 1-bromohexano. Una función adicional que cumplió el NaOH en esta reacción es la retención del agua generada durante la reacción del alcohóxido con el haluro de alquilo,<sup>180,181</sup> que podría disminuir el rendimiento de la misma por formación de productos de reacción secundarios tales como 1-hexanol. El producto se disolvió fácilmente en solventes como cloroformo, acetato de etilo y éter dietílico. Si bien el producto obtenido no fue soluble en agua presentó propiedades anfifílicas, emulsionándose en presencia de agua y solventes orgánicos.

Los procedimientos planteados para la purificación del producto obtenido se basaron en las propiedades fisicoquímicas de los posibles productos de reacción secundarios y del 1-bromo-hexano. El primer procedimiento de purificación se basó en

la recristalización del producto, para lo cual se disolvió el mismo en acetato de etilo y se agregó hexano, debido a que la H- $\beta$ -CD era insoluble en este último solvente y las posibles impurezas serían teóricamente solubles en dicho solvente o se encontrarían en estado líquido a temperatura ambiente. Asimismo, se intentó recristalizar sin éxito el producto disolviéndolo en una mínima cantidad de cloroformo y agregando metanol (solvente en el cuál el producto no se disuelve), probablemente el producto fue demasiado soluble en dicha mezcla de solventes.

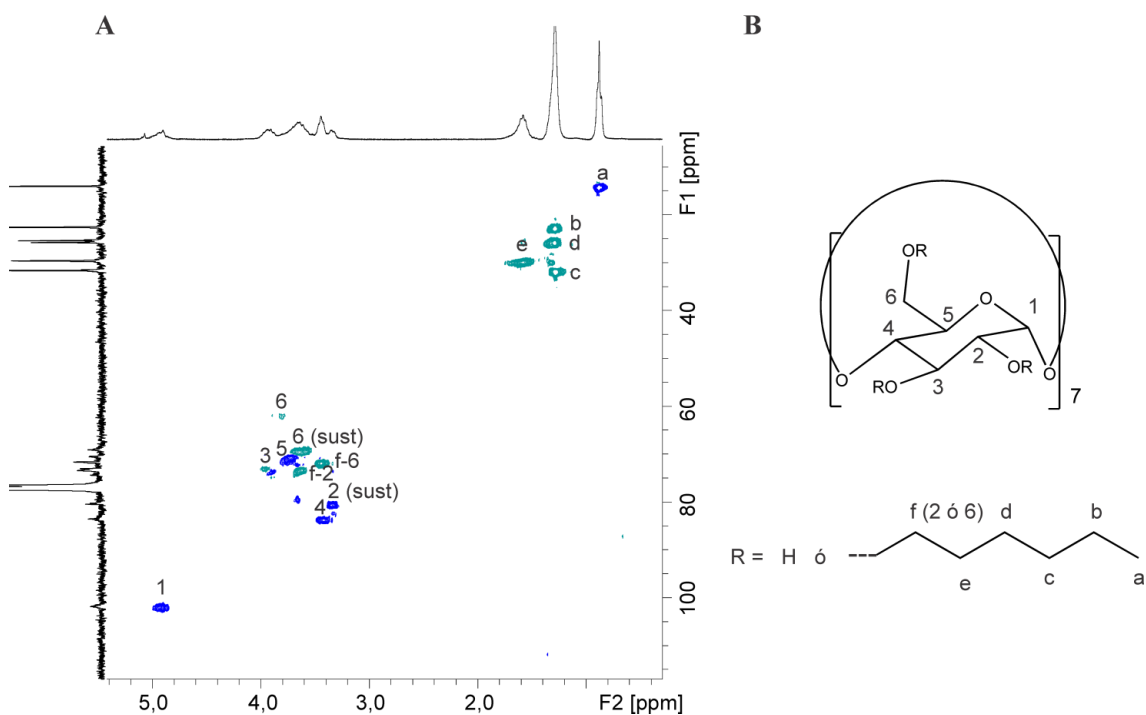
El segundo procedimiento de purificación, se basó en la propiedad fisicoquímica observada en el producto de emulsionarse en agua.

El producto obtenido mediante los dos procedimientos empleados para la purificación fue un sólido blanco pulverulento, que fundió en estufa a 40 °C generando un semisólido amarillento translúcido.

El hexil derivado de  $\beta$ -CD se caracterizó mediante espectroscopía de RMN. El espectro HSQC DEPT de H- $\beta$ -CD (Figura 43 A) discrimina las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los grupos  $\text{CH}_2$  en la posición 6 de la  $\beta$ -CD (en verde) y los del grupo hexilo (**b**, **c**, **d**, **e** y **f**), de las señales de CH en las posiciones 1-5 y el  $\text{CH}_3$  del grupo hexilo (en azul).

En el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC realizado para el H- $\beta$ -CD (este espectro no se muestra), se presentaron señales de correlación entre **H-f2** y **H-f6** con **H-e** de la cadena hidrocarbonada, permitiendo diferenciar el metileno correspondiente a la posición 6 sustituida de los metilenos **f** pertenecientes al grupo hexilo. El grupo metileno **f** presentó diferentes desplazamientos químicos en los espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  de acuerdo con la posición de la sustitución, por presentar diferente entorno químico. De este modo, un mayor el desapantallamiento sufrido por el metileno **f2**, justificaría su desplazamiento a campos más altos respecto del **f6** en el espectro de  $^1\text{H}$ . En los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 43), los protones **f** presentaron correlación con los protones 6 y 2 de la  $\beta$ -CD. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , las señales de **C-6** ( $\delta$  69,54 ppm) y **C-2** ( $\delta$  80,67 ppm) sustituidos se encontraron desplazadas a campos más bajos que sus homologas sin sustitución, siendo el  $\Delta\delta \sim 10$  ppm, datos congruentes con la formación de un enlace éter. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observó algo similar en

los **H-6** y **H-2** unidos a C sustituidos, evidenciando un desplazamiento a campos más altos que sus homólogos en moléculas de  $\beta$ -CD sin sustitución, indicando un mayor apantallamiento de estos protones por la formación del enlace éter que disminuye la electronegatividad del oxígeno.



**Figura 43.** Espectro HSQC parcial de H- $\beta$ -CD en  $\text{CDCl}_3$  (A). Asignación de la estructura química de acuerdo a los espectros de RMN obtenidos (B).

Mediante la purificación por recristalización desde acetato de etilo con hexano o la emulsificación con agua, se obtuvieron productos que presentaron una sustitución del 6-OH prácticamente completa, siendo la señal de **H-6** muy baja. Por otro lado, podríamos inferir que la sustitución en la posición 2 fue completa, ya que no se observaron señales correspondientes al C o H homólogo en dicha posición no sustituida.

El GS de H- $\beta$ -CD se determinó a partir de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , empleando para la relación de áreas la del protón **H-1** que integra para 1 H (1 protón por unidad de glucopiranososa) y el área de los protones del grupo metilo del hexilo (**H-a**) que integran para 3 H (ecuación [46]):

$$GS = \frac{A_{H-a}}{3 \times A_{H-1}} \quad [46]$$

A partir de esta relación entre las áreas de los protones se obtuvo un GS de 1,12 por unidad de glucosa y por lo tanto de 7,87 por unidad de CD.

Se realizó el cálculo de modo análogo a partir del área correspondiente a todos los protones de la cadena hidrocarbonada exceptuando los **f (H a-e)**, siendo que estos integran para 11 H (ecuación [47]):

$$GS = \frac{A_{H-a-e}}{11 \times A_{H-1}} \quad [47]$$

El GS obtenido mediante la aplicación de esta ecuación fue de 1,15 por molécula de glucosa y 8,03 por molécula de CD.

La diferencia entre los valores obtenidos mediante ambas ecuaciones puede deberse a diferencias en la integración de las señales. Por otro lado, debe destacarse que el GS obtenido fue relativamente alto, considerando que el número máximo posible de sustituyentes por molécula de CD es 21.<sup>72</sup>

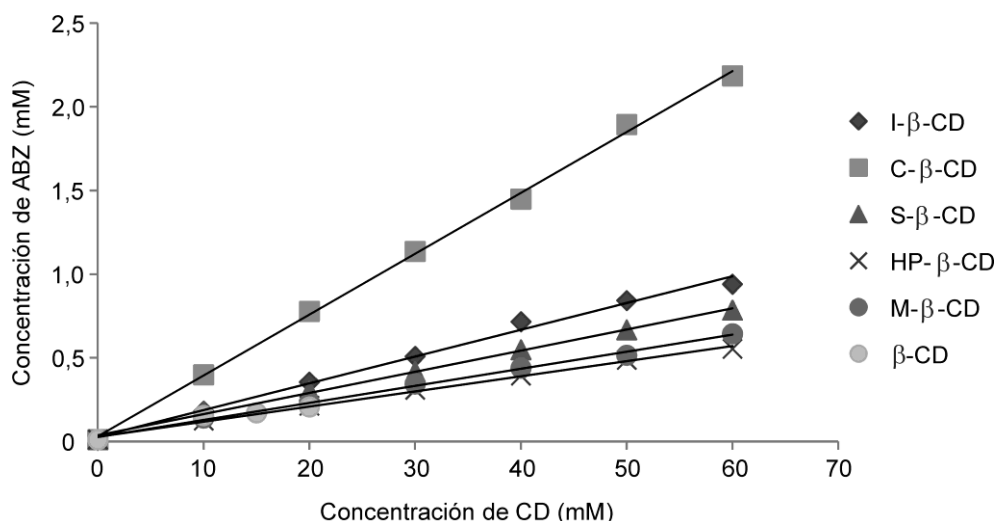
## **4.3 Preparación y caracterización de formulaciones empleando $\beta$ -ciclodextrina y derivados de $\beta$ -ciclodextrina**

### **4.3.1 Evaluación de la afinidad de diferentes ciclodextrinas por el albendazol**

#### **4.3.1.1 Diagramas de solubilidad de fase**

Se realizaron los diagramas de solubilidad de fase de las CDs:  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD, con el objetivo de comparar su afinidad con respecto al ABZ (Figura 44). El parámetro empleado para dicha comparación fue la  $K_f$

obtenida mediante la ecuación [31] y su valor puede observarse para cada CD en la Tabla XII. Un valor elevado de  $K_f$  indica una alta afinidad de la CD por la molécula huésped.



**Figura 44.** Diagrama de solubilidad de fase para el ABZ en presencia de concentraciones crecientes de  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD.

Se observó en los diagramas de solubilidad de fase para la M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD que la concentración del ABZ presenta un comportamiento lineal en función de la concentración de dichas CDs, por lo tanto puede concluirse que las isothermas obtenidas fueron de tipo  $A_L$  (de acuerdo al modelo propuesto por Higuchi y Connors).<sup>71</sup> Esto indicó, que los complejos se formaron con una estequiometría 1:1.

Puede observarse tanto en la Figura 44 como en las ecuaciones de la recta (Tabla XII), que la pendiente obtenida a partir de la isoterma de la C- $\beta$ -CD fue superior a las pendientes calculadas para las demás CDs evaluadas. Como consecuencia de esto, el valor de  $K_f$  para la C- $\beta$ -CD superó aproximadamente en tres veces a los valores de  $K_f$  para la HP- $\beta$ -CD y la M- $\beta$ -CD, que presentaron valores comparables a los reportados en la bibliografía.<sup>111,182</sup>

**Tabla XII.** Ecuaciones de la recta y valores de  $K_f$  obtenidos para  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, I- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD.

CD	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>	$K_f$ (M <sup>-1</sup> )
$\beta$ -CD	$y = 0,006.x + 0,075$	0,722	74
M- $\beta$ -CD	$y = 0,010.x + 0,030$	0,995	337
HP- $\beta$ -CD	$y = 0,009.x + 0,029$	0,996	313
C- $\beta$ -CD	$y = 0,036.x + 0,036$	0,998	1037
S- $\beta$ -CD	$y = 0,013.x + 0,029$	0,997	440
I- $\beta$ -CD	$y = 0,016.x + 0,027$	0,993	602

La curva correspondiente a la  $\beta$ -CD presentó un valor bajo de R<sup>2</sup>, debido a que la concentración de ABZ no presentó una relación lineal con respecto a la de dicha CD, esto pudo ser originado en parte por la baja solubilidad acuosa de la misma. Se observó además, que la concentración de ABZ no aumentó a concentraciones superiores a la solubilidad de la  $\beta$ -CD.

### **4.3.2 Formulación y caracterización de sistemas albendazol:ciclodextrinas**

#### **4.3.2.1 Caracterización fisicoquímica y estructural de sistemas compuestos por albendazol y ciclodextrinas obtenidas comercialmente**

##### **4.3.2.1.1 Determinación del rendimiento y el título**

Los sistemas compuestos por el ABZ y las CDs obtenidas comercialmente ( $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD) que se prepararon mediante SA, presentaron rendimientos dentro del rango comprendido entre el 82,4 y el 90,7 %; los menores rendimientos fueron los obtenidos para los sistemas formulados con  $\beta$ -CD (Tabla XIII). En cuanto a los títulos

de ABZ obtenidos para los sistemas ABZ:CDs, se encontraron en el rango del 8,9-19,5 %. Estos valores se encontraron en concordancia con los pesos moleculares de los componentes de los sistemas y la relación estequiométrica en la que fueron formulados.

**Tabla XIII.** Valores de los rendimientos de los productos obtenidos por SA y valoración del contenido de ABZ (título).

Sistemas obtenidos por SA	Relación molar	Rendimiento (%)	Título (%)
ABZ:β-CD	1:1	82,4	19,5
	1:2	84,5	11,5
ABZ:M-β-CD	1:1	85,4	17,1
	1:2	89,5	9,5
ABZ:HP-β-CD	1:1	86,8	16,3
	1:2	90,7	8,9

#### 4.3.2.1.2 Estudios de solubilidad aparente

Los sistemas formados por ABZ y las CDs obtenidas comercialmente, incrementaron la solubilidad aparente del ABZ entre 13 y 85 veces (la solubilidad del ABZ en agua fue 0,001 mg/mL). En la Tabla XIV, puede observarse que las concentraciones de ABZ en agua más elevadas se obtuvieron con los sistemas formulados mediante SA y dentro de estos sistemas, los preparados en una relación molar 1:2 de ABZ:CD. De los derivados de CD estudiados en esta etapa, la M-β-CD mostró la mayor capacidad de solubilizar al ABZ.

**Tabla XIV.** Valores de solubilidad aparente del ABZ en agua para los sistemas formulados con  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD, mediante las técnica de SA y MF.

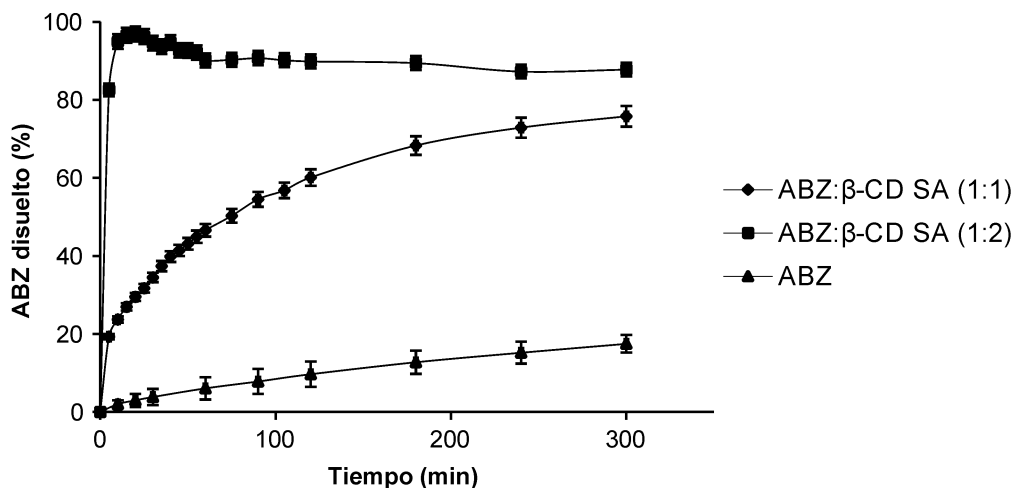
Sistemas	Relación molar	Método de obtención	Solubilidad en agua (mg/mL)
ABZ: $\beta$ -CD	1:1	MF	0,013 $\pm$ 0,002
		SA	0,024 $\pm$ 0,001
	1:2	MF	0,045 $\pm$ 0,001
		SA	0,052 $\pm$ 0,002
ABZ:M- $\beta$ -CD	1:1	MF	0,016 $\pm$ 0,001
		SA	0,069 $\pm$ 0,002
	1:2	MF	0,051 $\pm$ 0,001
		SA	0,085 $\pm$ 0,003
ABZ:HP- $\beta$ -CD	1:1	MF	0,011 $\pm$ 0,004
		SA	0,048 $\pm$ 0,001
	1:2	MF	0,045 $\pm$ 0,001
		SA	0,065 $\pm$ 0,001

#### 4.3.2.1.3 Estudios de velocidad de disolución

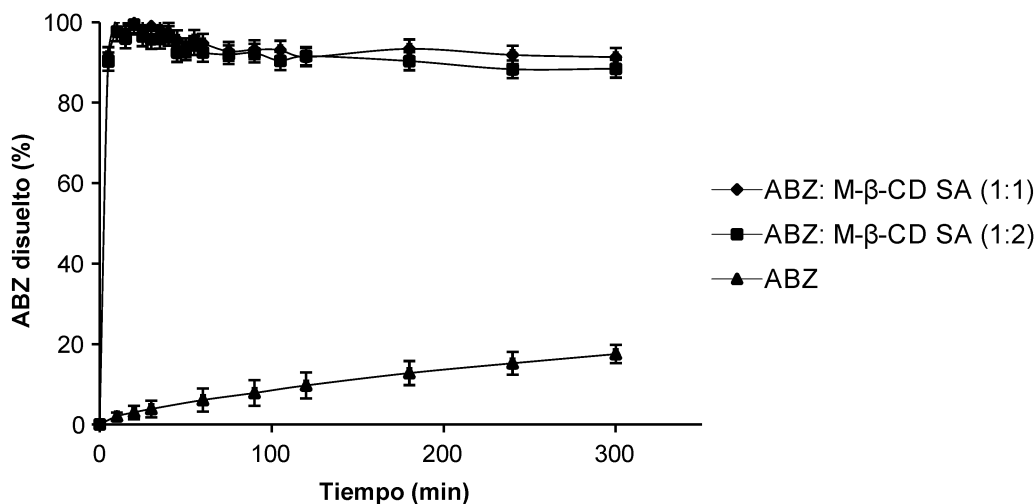
En las Figuras 45, 46 y 47 se puede observar un considerable aumento en la velocidad de disolución del ABZ en todos los sistemas ABZ:CDs obtenidos mediante SA, respecto del IFA sin transportador.

Los perfiles de disolución de los sistemas ABZ:CD obtenidos por SA en una relación 1:2, fueron prácticamente superponibles entre sí. El sistema ABZ:M- $\beta$ -CD con una relación 1:1 presentó un perfil de disolución similar al de la relación molar 1:2 (Figura 46). Estos hechos podrían estar relacionados, con la mayor afinidad que presentó la M- $\beta$ -CD por el ABZ, con respecto al resto de las CDs estudiadas en esta

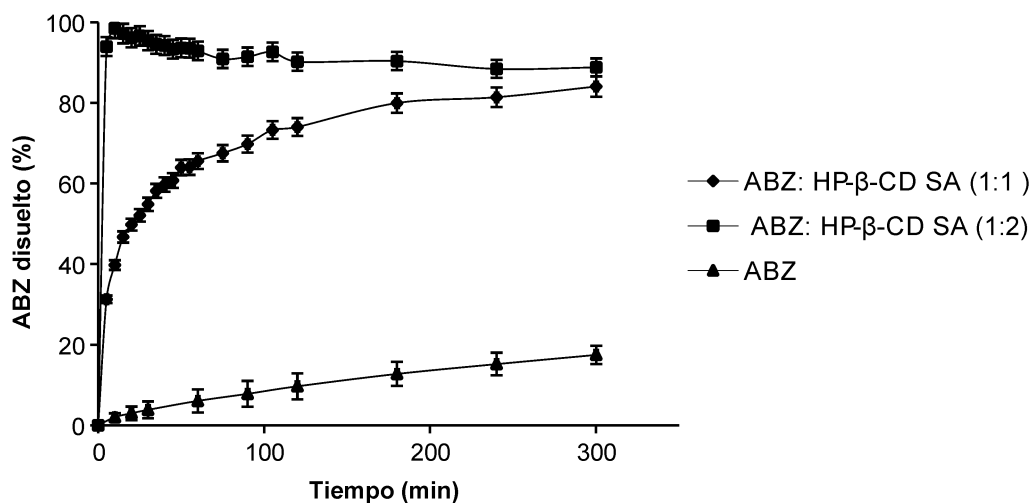
sección, como se evidenció en los valores de  $K_f$  obtenidos en la sección 4.3.1. En los demás sistemas ABZ:CDs con relación molar 1:1, la velocidad de disolución fue menor que cuando se formularon en una relación 1:2.



**Figura 45.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2).



**Figura 46.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:M-β-CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2).

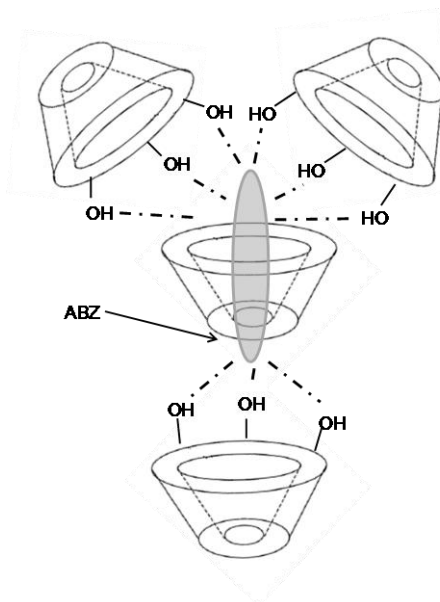


**Figura 47.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:HP-β-CD obtenidos por SA en dos relaciones molares (1:1 y 1:2).

Como pudo determinarse en el estudio de las isotermas de solubilidad, las isotermas obtenidas fueron del tipo  $A_L$ , es decir que la estequiometría del complejo debería ser 1:1. Por lo tanto el aumento de la velocidad de disolución de los complejos 1:2 respecto de los 1:1, podría deberse a una estabilización del sistema por la presencia de la macromolécula en exceso mediante un proceso de adsorción sobre la superficie y/o formación de puentes hidrógeno entre la CD en exceso y las zonas del IFA expuestas al medio de disolución (Figura 48). También podría suceder que al aumentar la concentración de CD en el medio de disolución, el equilibrio se desplazaría hacia la formación del complejo (Figura 9).

Por otro lado, en la Tabla XV pueden observarse los valores de ED (%) calculados según la ecuación [21], además de los valores de  $Q_{30}$  y  $Q_{60}$  para los sistemas compuestos por ABZ y las CDs obtenidas comercialmente, preparados por MF y SA en relación equimolar. Estos resultados indicaron que el método de SA permitió un incremento considerable en la ED para el ABZ, respecto de los sistemas obtenidos por MF, mostrando en este caso el sistema ABZ:M-β-CD la mayor ED. Asimismo, los

valores más altos de  $Q_{30}$  y  $Q_{60}$  fueron los obtenidos para el sistema ABZ:M- $\beta$ -CD formulado por SA.



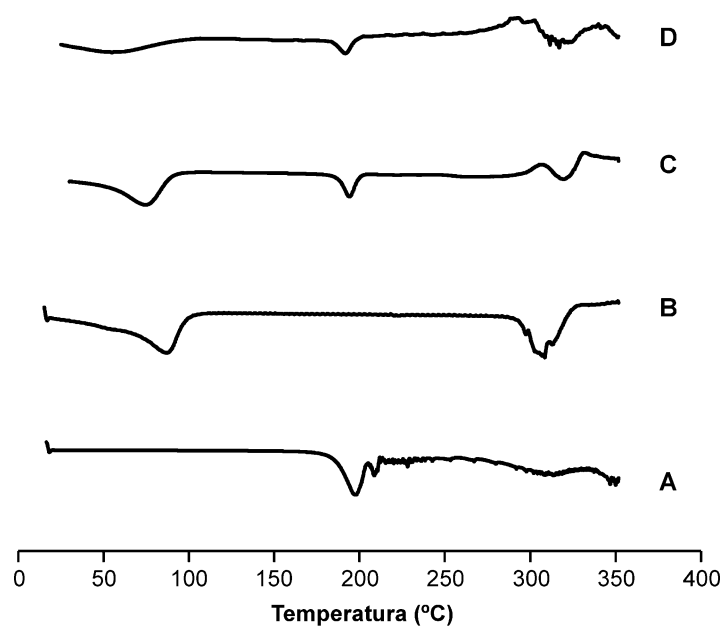
**Figura 48.** Esquema representativo de la posible interacción entre el complejo ABZ:CD formado y un exceso de CD en el medio de disolución.

**Tabla XV.** Valores de los parámetros de disolución ( $Q_{30}$  (%),  $Q_{60}$  (%) y ED (%)) obtenidos para el ABZ y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, preparados por MF y SA en relación equimolar (1:1).

Sistemas	Método de obtención	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)	ED (%)
ABZ	-	$3,8 \pm 2,1$	$6,1 \pm 2,9$	9,2
ABZ: $\beta$ -CD	MF	$7,7 \pm 0,1$	$12,6 \pm 0,2$	16,9
	SA	$34,5 \pm 1,9$	$46,6 \pm 1,4$	55,4
ABZ:M- $\beta$ -CD	MF	$62,9 \pm 1,1$	$68,3 \pm 1,4$	70,3
	SA	$99,0 \pm 2,1$	$94,8 \pm 1,3$	92,8
ABZ:HP- $\beta$ -CD	MF	$22,5 \pm 0,9$	$31,3 \pm 1,1$	36,6
	SA	$54,8 \pm 2,0$	$65,6 \pm 1,2$	69,8

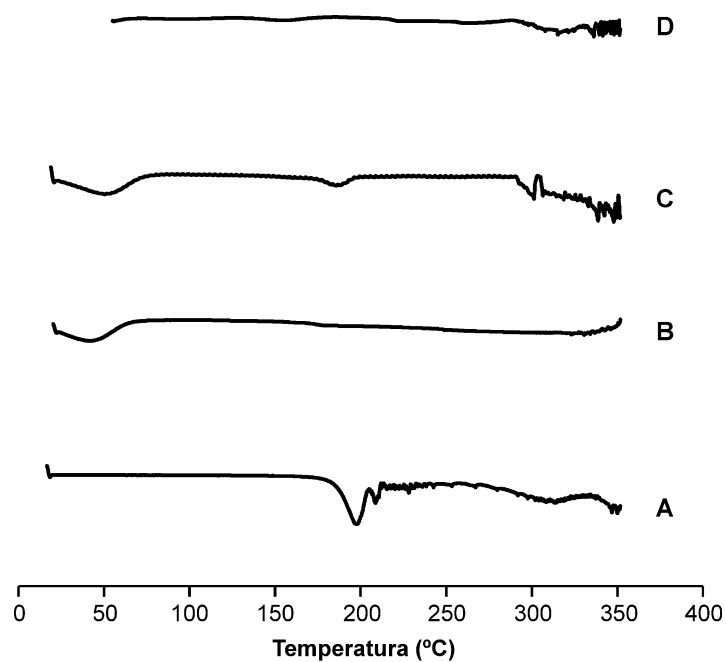
#### 4.3.2.1.4 Calorimetría Diferencial de Barrido

Con el fin de evaluar la formación del complejo de inclusión entre el IFA y las correspondientes CDs se realizaron los estudios de CDB del ABZ, los sistemas ABZ:CDs en relación molar 1:1 (obtenidos por SA y MF) y cada una de las CDs (Figuras 49, 50 y 51).

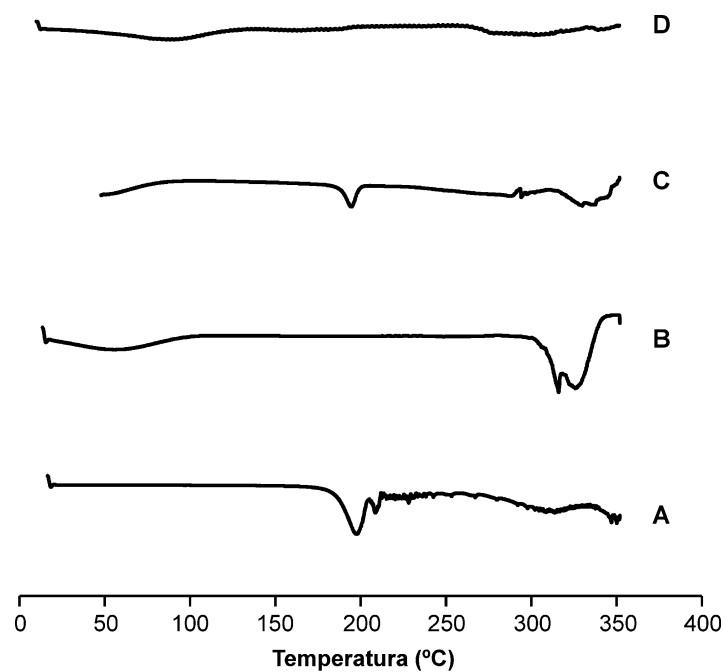


**Figura 49.** Termograma de CDB de ABZ (A),  $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).

La ausencia de los picos endotérmicos de fusión a 196,84 °C del ABZ en los termogramas de los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:M- $\beta$ -CD obtenidos por SA, indicaría la formación del complejo de inclusión (Figuras 51 D y 52 D). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en los ensayos de disolución para estos sistemas, que presentaron una ED del ABZ superior respecto de los sistemas formulados por MF.



**Figura 50.** Termograma de CDB de ABZ (A), M-β-CD (B) y los sistemas ABZ:M-β-CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).

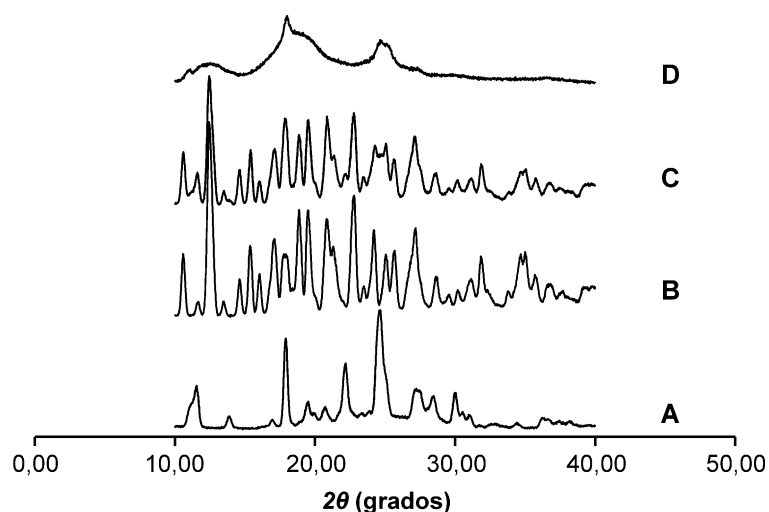


**Figura 51.** Termograma de CDB de ABZ (A), HP-β-CD (B) y los sistemas ABZ:HP-β-CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).

En el termograma del sistema ABZ: $\beta$ -CD obtenido por SA (Figura 49 D) se observó el pico endotérmico de fusión del ABZ a 196,84°C, que si bien redujo su amplitud con respecto la MF, su presencia nos indicó que no se formó un verdadero complejo de inclusión.

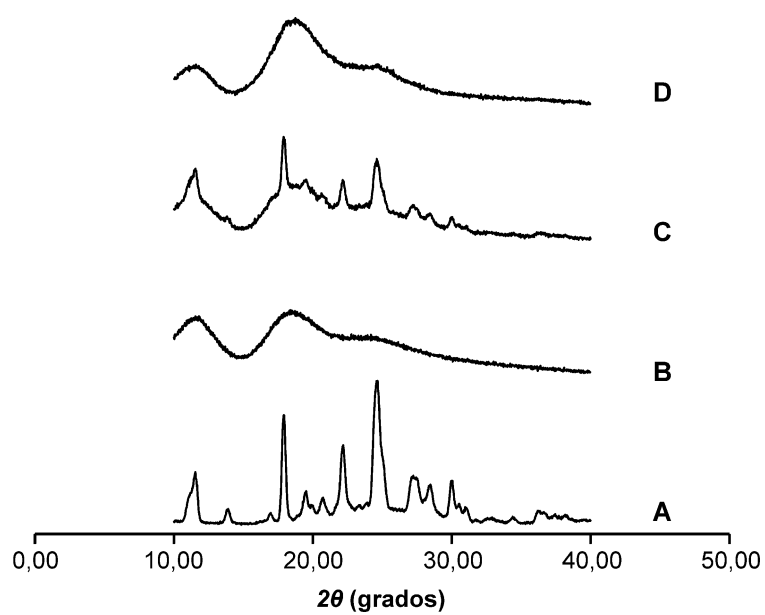
#### 4.3.2.1.5 Difracción de rayos X

El difractograma de la  $\beta$ -CD (Figura 52 B) indicó que la misma se encontró en forma cristalina, los dos picos más intensos se observaron a  $2\theta$  12,71 y 21,77. Como puede observarse en los patrones de DRX (Figuras 53 B y 54 B), la HP- $\beta$ -CD y la M- $\beta$ -CD se encuentran en estado amorfo. Esto podría deberse a que sus sustituyentes impiden el acomodamiento ordenado de las moléculas en estado sólido, favoreciendo su solubilidad en agua (sección 1.2.1.2).

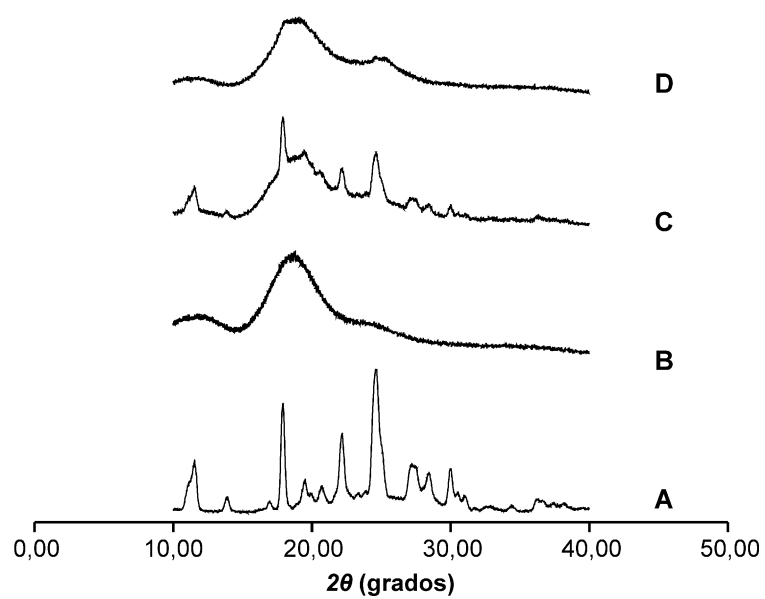


**Figura 52.** Difractograma del ABZ (A),  $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ: $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).

Por otra parte, los patrones de DRX de las MF del ABZ con cualquiera de las tres CDs fueron una sumatoria de las señales obtenidas para el ABZ y la CD correspondiente (Figuras 52 C, 53 C y 54 C).



**Figura 53.** Difractograma del ABZ (A), M- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).



**Figura 54.** Difractograma del ABZ (A), HP- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD con relación molar 1:1 preparado por MF (C) y SA (D).

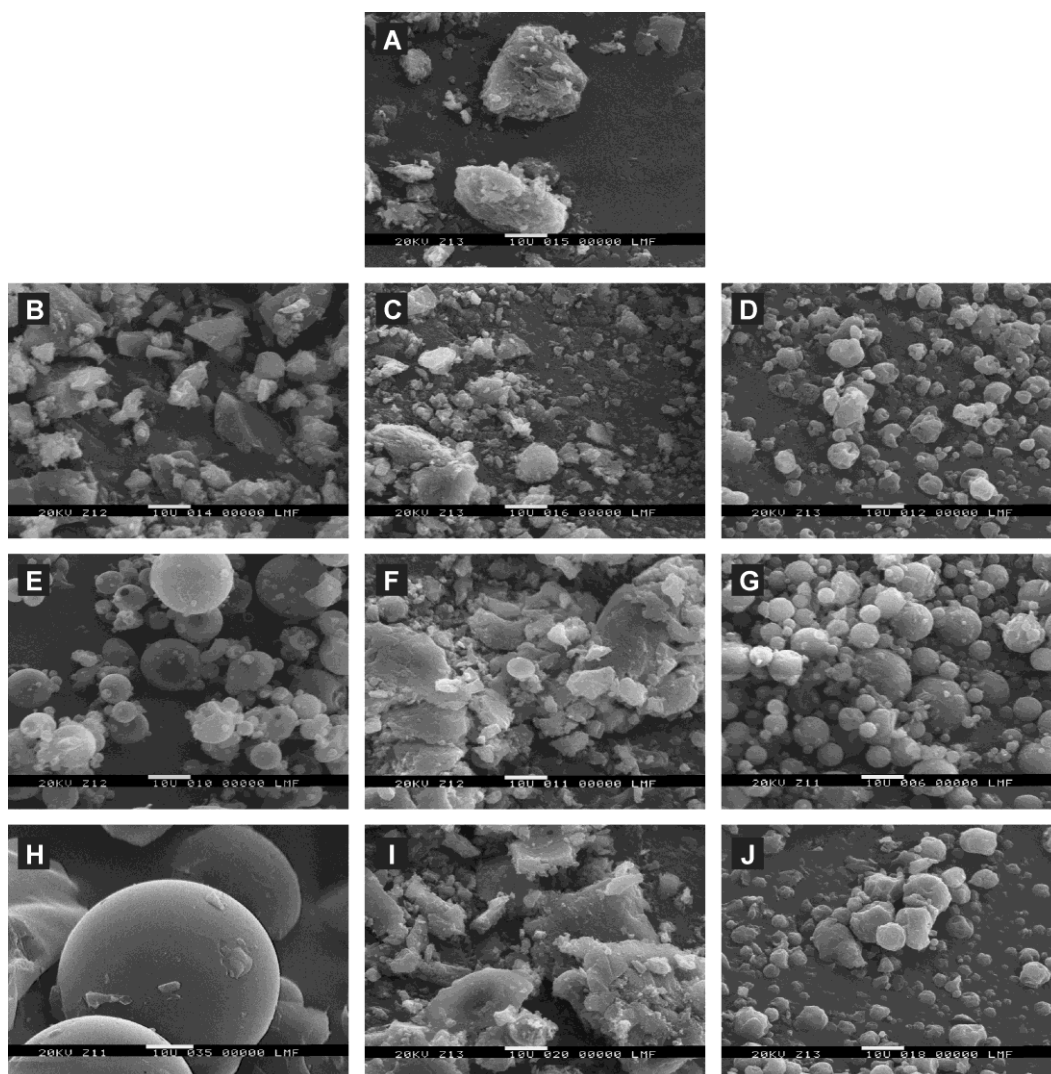
Los sistemas ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:M- $\beta$ -CD obtenidos por SA, presentaron bandas anchas y poco definidas en sus patrones DRX, indicando que los mismos se encontraban en estado amorfo. Asimismo, estos difractogramas fueron similares a los de la CD con la que fue formulado el sistema, de modo que podríamos postular la formación un complejo de inclusión.

A partir del análisis de las señales obtenidas para el sistema ABZ: $\beta$ -CD formulado por SA (Figura 52 D), pudo concluirse que la  $\beta$ -CD perdió su cristalinidad, ya que no se observan sus picos característicos. En el mismo, se distinguieron sólo dos de las señales características del ABZ a  $2\theta$  17,85 y 24,54, permitiendo inferir que el IFA se encontraría en estado parcialmente amorfo. Estos resultados podrían justificar el incremento en la ED obtenido para los sistemas ABZ: $\beta$ -CD formulados por SA, respecto a la ED obtenida para los mismos sistemas formulados por MF. Como se ha mencionado, la baja solubilidad de la  $\beta$ -CD muchas veces limita la solubilidad de los complejos formados, de modo que podría postularse que una disminución del grado de cristalinidad de este compuesto podría contribuir en el incremento de la velocidad de disolución.

#### **4.3.2.1.6 Microscopía electrónica de barrido**

En la Figura 55 pueden observarse las micrografías obtenidas para el ABZ, la  $\beta$ -CD, la M- $\beta$ -CD y la HP- $\beta$ -CD, y para los sistemas formulados con ABZ y dichas CDs mediante las técnicas de MF y SA. En las mismas, pudo evidenciarse que las partículas de ABZ (Figura 54 A) y las de  $\beta$ -CD (Figura 54 B) presentaron forma irregular, mientras que las partículas de M- $\beta$ -CD (Figura 54 E) y las de HP- $\beta$ -CD (Figura 54 H), fueron mayoritariamente esféricas, siendo las últimas de mayor tamaño.

Por otro lado, en las micrografías realizadas para los sistemas ABZ: $\beta$ -CD preparados por MF (Figura 54 C, F e I), se visualizaron partículas que se correspondieron con la morfología de los materiales de partida. Contrariamente, en las imágenes capturadas para los sistemas ABZ: $\beta$ -CD preparados por SA (Figura 54 D, G y J), pudo observarse la formación de nuevas estructuras, predominantemente esféricas y con un tamaño en el rango de los 1-10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 55.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) de ABZ (A),  $\beta$ -CD (B), ABZ: $\beta$ -CD MF (C), ABZ: $\beta$ -CD SA (D), M- $\beta$ -CD (E), ABZ:M- $\beta$ -CD MF (F), ABZ:M- $\beta$ -CD SA (G), HP- $\beta$ -CD (H), ABZ:HP- $\beta$ -CD MF (I) y ABZ:HP- $\beta$ -CD SA (J).

#### 4.3.2.1.7 Caracterización estructural de los sistemas formulados a partir de ciclodextrinas obtenidas comercialmente

##### 4.3.2.1.7.1 Sistema albendazol:metil- $\beta$ -ciclodextrina

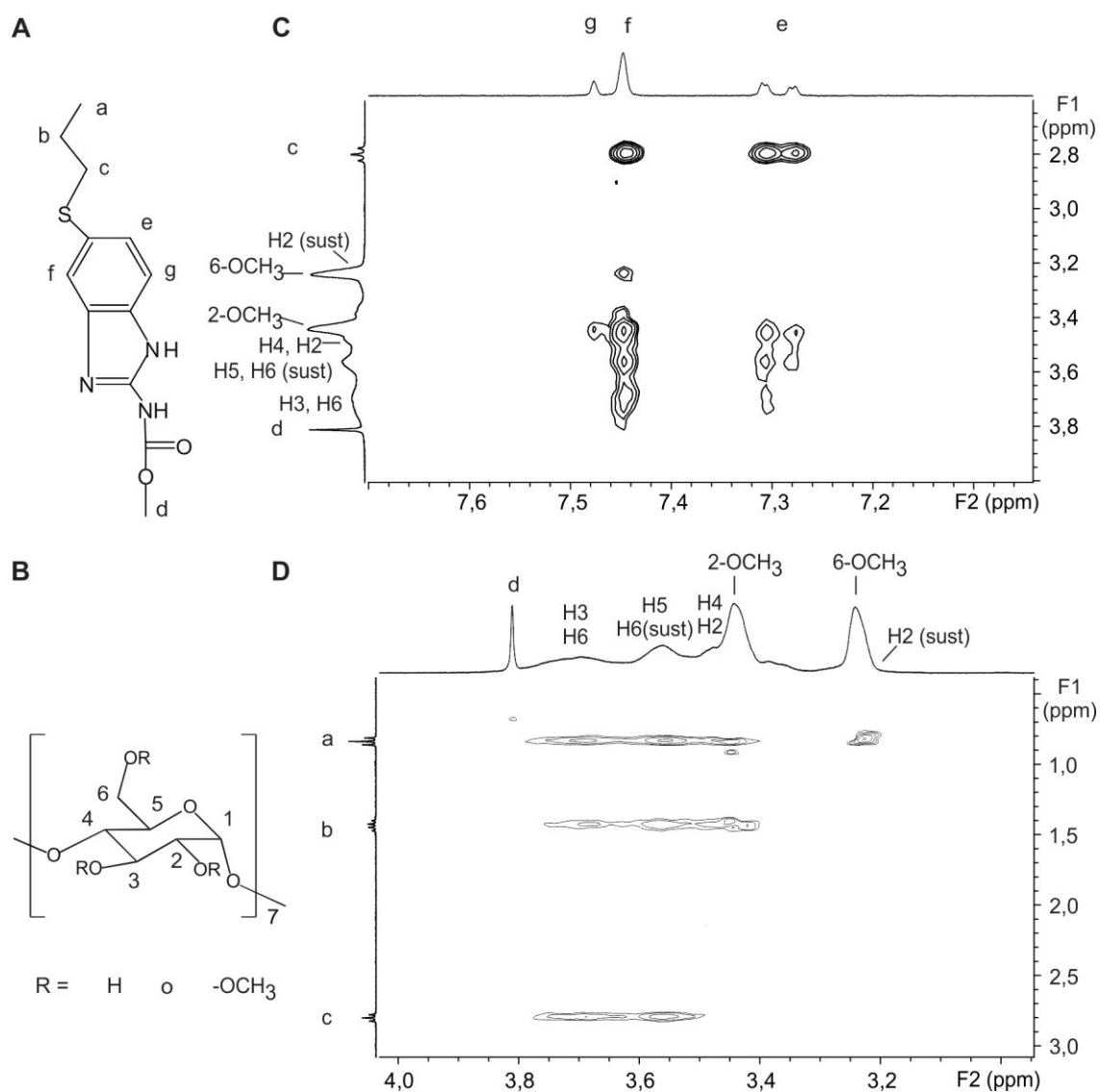
El experimento de ROESY 2D es una de las herramientas más eficaces para investigar las interacciones inter e intra-moleculares de los complejos huésped:CD. La

presencia de señales de correlación, que son generadas por los efectos nucleares Overhauser (NOE), entre los protones de las moléculas huésped y las de CDs indican contactos espaciales dentro de 5 Å.<sup>183</sup>

Se requiere una asignación inequívoca de las señales en los espectros de <sup>1</sup>H de RMN para establecer el modo de inclusión del ABZ en la cavidad M-β-CD. El etiquetado de todas las señales en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de ABZ y M-β-CD se llevaron a cabo utilizando la información obtenida de los espectros de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC y <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC. La estructura de ambas moléculas se muestra en la Figura 56 A y B.

Como se discutió en la sección 4.2.2, los cambios en los desplazamientos químicos inducidos por metilación directa y los efectos sobre los núcleos próximos a un sitio metilado generaron un espectro de <sup>1</sup>H de RMN con varios picos anchos sin resolver. Se puede observar que las señales de **H2** y **H6** de los sitios sustituidos produjeron señales solapadas con los protones de **6-CH3** y **H5**, respectivamente.

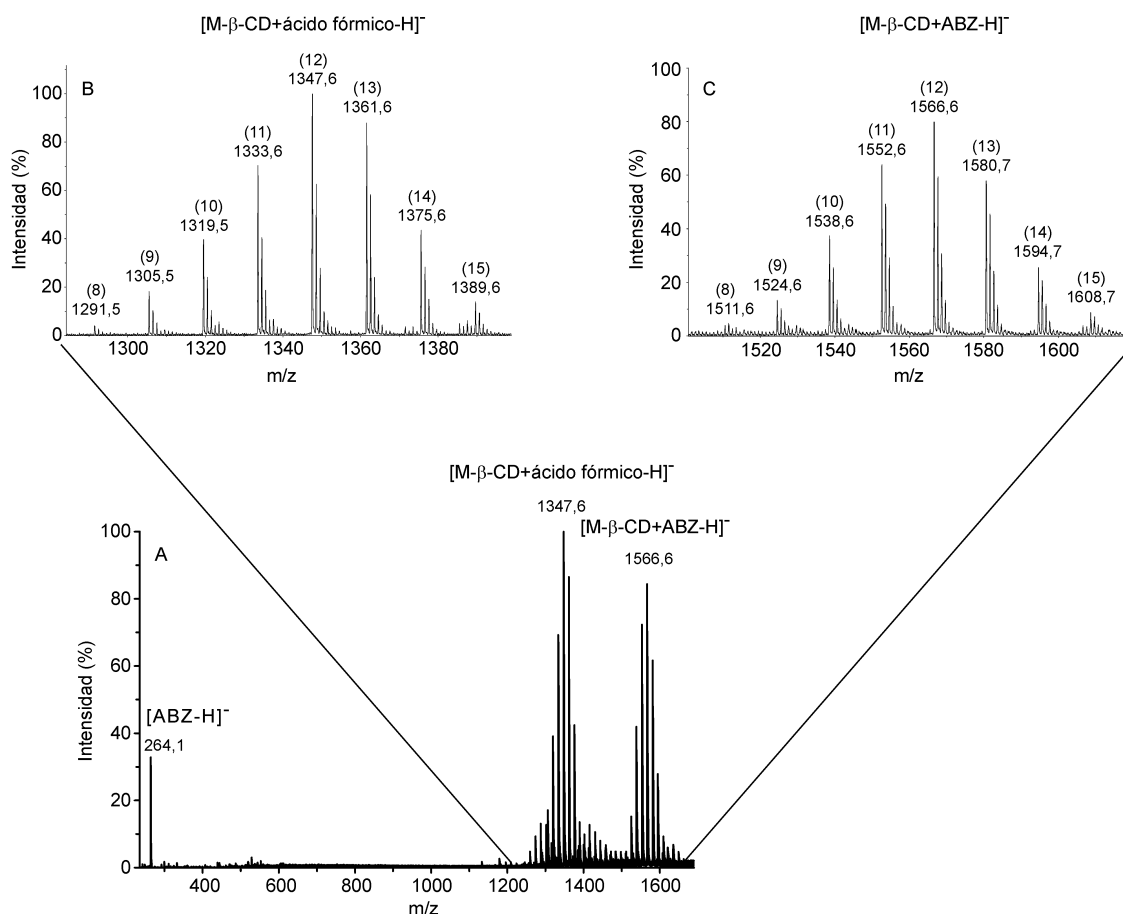
La Figura 56 (C y D) muestra el espectro de ROESY 2D parcial del sistema ABZ:M-β-CD obtenido por SA, disuelto en DCl (0,1 M). Este espectro mostró picos de correlación entre los protones del anillo aromático (Figura 56, A: **e**, **f** y **g**) y los protones de la M-β-CD (**H3** y **H5**). Estos datos sugieren que las interacciones del anillo tienen lugar en la cavidad de CD. Además, la presencia de picos de correlación entre los protones de los grupos metoxilo de M-β-CD y los protones **a**, **b** y **f** de ABZ, indicaría que estos protones del IFA se encontrarían en una posición de poca profundidad en la cavidad de la CD. Asimismo, también se observaron señales de correlación entre los protones del grupo propilo del ABZ (**a**, **b** y **c**) y los protones internos de la M-β-CD.



**Figura 56.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la M- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de M- $\beta$ -CD realizado en DCl 0,1 M (C y D).

La Figura 57 muestra el espectro de masas en modo negativo, del sistema ABZ:M- $\beta$ -CD disuelto en una solución de ácido fórmico. La presencia de múltiples picos para cada especie iónica se debió a la sustitución al azar del anillo de  $\beta$ -CD. Los iones con una relación m/z de 1291,5; 1305,5; 1319,5; 1333,5; 1347,6; 1361,6; 1375,6 y 1389,6 corresponden a la M- $\beta$ -CD sustituida con 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 grupos

metilo, respectivamente. Los picos más intensos para cada GS corresponden a aductos formados con  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . El GS promedio para la M- $\beta$ -CD fue del 12,2 por molécula de CD calculado en función de su razón de abundancia (ecuación [30]).



**Figura 57.** Espectro de masas de alta resolución en modo negativo, del sistema ABZ:M- $\beta$ -CD obtenido mediante SA, disuelto en una solución de ácido fórmico (A). Ampliación de las regiones del espectro de MS correspondientes a la M- $\beta$ -CD (B) y a ABZ:M- $\beta$ -CD (C). Los números de sustituyentes por molécula de CD, se encuentran escritos entre paréntesis arriba de cada valor de masa.

Los iones que presentaron valores de m/z entre 1511,5 y 1608,7 correspondieron al complejo ABZ:M- $\beta$ -CD en una relación molar 1:1. Los valores comprendidos en

dicho rango presentaron una distribución normal (Figura 57), esto se debió a la formación del complejo con la M- $\beta$ -CD sustituida aleatoriamente que presenta distribución normal. No se detectaron picos por encima de una relación m/z de 1608,7, indicando de este modo la formación de complejos ABZ:M- $\beta$ -CD con una relación molar 1:1 y no en otras relaciones molares.

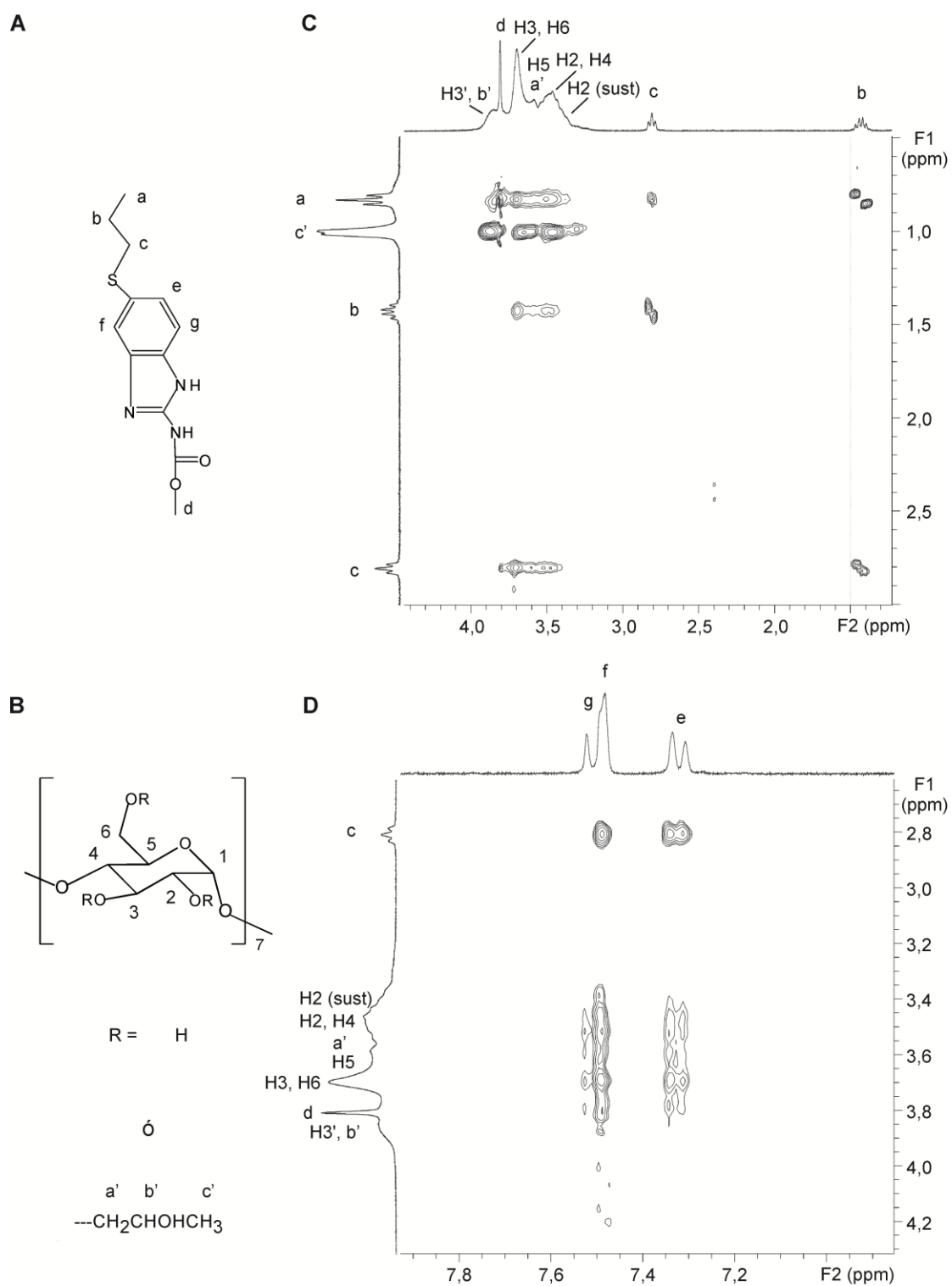
#### **4.3.2.1.7.2 Sistema albendazol:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Se realizaron los espectros de ROESY 2D para el sistema ABZ:HP- $\beta$ -CD disuelto en DCl 0,1 M, con el objetivo de obtener información sobre la relación entre ambas moléculas. Como se mencionó en la sección anterior, en estos espectros la presencia de señales de correlación entre los protones son indicativas de contactos espaciales dentro de 5 Å.<sup>183</sup>

Para obtener información válida sobre el modo de inclusión del ABZ en la cavidad HP- $\beta$ -CD, es preciso realizar una correcta asignación de las señales en los espectros de  $^1\text{H}$  de RMN. En la Figura 58 A y B, se presenta el etiquetado de todas las señales en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de ABZ y HP- $\beta$ -CD. La asignación de estos espectros, se realizó mediante el análisis de la información obtenida a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

En el espectro de  $^1\text{H}$  de RMN realizado para la HP- $\beta$ -CD pueden observarse varios picos anchos sin resolver y un gran solapamiento de las señales, dificultando la interpretación de las relaciones entre los protones. Se puede observar que las señales de **H5** se encuentran solapadas con los protones **a'** de los sustituyentes de la HP- $\beta$ -CD. Por otro lado, también se encuentran superpuestas en estos espectros de  $^1\text{H}$ , las señales correspondientes a los protones **b'** del sustituyente, los protones **d** del ABZ y los **H3'** de la CD (Figura 58).

La Figura 58 (C y D) muestra el espectro de ROESY 2D parcial del complejo de inclusión ABZ:HP- $\beta$ -CD. En este espectro se observan señales de correlación entre los protones del anillo aromático (Figura 58, A: **e**, **f** y **g**) y los protones de la HP- $\beta$ -CD. Estos datos sugieren que las interacciones del anillo tendrían lugar en la cavidad de CD.



**Figura 58.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la HP- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de HP- $\beta$ -CD realizado en DCI 0,1 M (C y D).

Además, se evidenciaron picos de correlación entre los protones de **a**, **b** y **c** del ABZ y los protones internos de la HP- $\beta$ -CD, indicando que esta región de la molécula del ABZ también se encontraría incluida en el interior de la cavidad de la CD. Se observó además una señal de correlación entre los protones **a** del ABZ y los protones **H3'** o los protones **b'** del sustituyente, no pudo establecerse con qué protones se produjo la correlación debido al solapamiento de las señales discutido anteriormente.

#### **4.3.2.1.7.3 Sistema albendazol: $\beta$ -ciclodextrina**

La muestra ABZ: $\beta$ -CD obtenida por SA, se disolvió en una solución de DCI 0,1 M en D<sub>2</sub>O, para recrear el fluido gástrico y evaluar las interacciones entre el ABZ y la  $\beta$ -CD en este medio, mediante espectroscopía de RMN. Para ello, se realizó un espectro de ROESY, en el que no se observaron señales de correlación entre los protones de ambas moléculas estudiadas. Aunque la ausencia de señales en un espectro de ROESY, no nos permite establecer que no existen interacciones en solución entre ambas moléculas, si podemos postular que la intensidad de la interacción podría ser diferente a la observada en los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, donde se manifestó una clara correlación entre algunos protones del ABZ y estas CDs. Además, podría suceder que las interacciones entre el ABZ y la  $\beta$ -CD fueran demasiado débiles para poder ser detectadas por el método empleado. Es decir, el valor bajo de  $K_f$  observado en los diagramas de solubilidad de fase realizados, podría justificar este hecho, de modo que si la afinidad entre las moléculas estudiadas es baja, la frecuencia de encuentro entre ambas también es baja, encontrándose en forma de complejo a una concentración demasiado baja.

#### **4.3.2.2 Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina**

##### **4.3.2.2.1 Determinación del rendimiento y el título**

La técnica de SA realizada en las condiciones descritas en la sección 3.2.4.2, nos permitió obtener el producto con un R del 77 % y un título de ABZ del 17,0 % (p/p) de complejo ABZ:C- $\beta$ -CD. El valor del título estuvo relacionado con los pesos

moleculares de ambos compuestos y la relación estequiométrica que en el caso de este complejo fue equimolar.

#### **4.3.2.2.2 Estudios de solubilidad aparente**

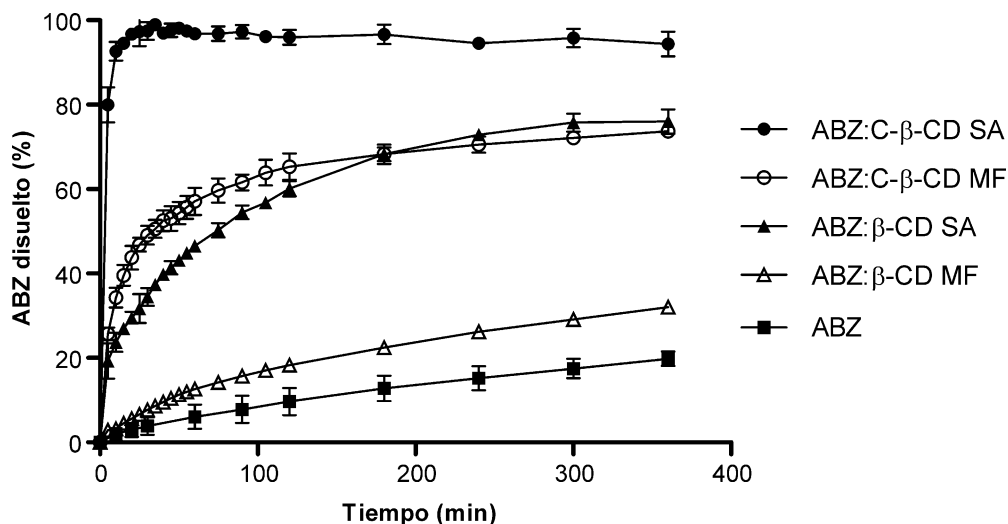
Las concentraciones de ABZ alcanzada para los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF luego de 72 h de agitación, fueron de 0,799 y 0,172 mg/mL, respectivamente (Tabla XVI). En la Tabla XIV, puede observarse que la solubilidad del ABZ alcanzada con los sistemas formulados por MF con  $\beta$ -CD, la M- $\beta$ -CD y la HP- $\beta$ -CD, fue unas diez veces menor que la solubilidad lograda con sistema formulado por el mismo método con el C- $\beta$ -CD. Estos resultados evidencian la mayor eficiencia de este transportador para incrementar la solubilidad del ABZ, respecto de las CDs obtenidas comercialmente.

#### **4.3.2.2.3 Estudios de velocidad de disolución**

En la Figura 59, se observan los perfiles de disolución de los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD preparados por SA y MF. Ambos sistemas mostraron un notorio incremento en la velocidad de disolución y en la ED con respecto al ABZ sin transportador (Tablas XV y XVI). Sin embargo, el porcentaje de IFA disuelto fue menor en el caso del sistema obtenido por MF. Se realizaron además los perfiles de disolución de los sistemas ABZ: $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF, presentando ambos sistemas una liberación más lenta que el sistema ABZ:C- $\beta$ -CD MF.

En el caso particular del sistema ABZ: $\beta$ -CD formulado por SA los porcentajes de IFA disuelto a partir de los 180 min fueron comparables a los obtenidos a partir del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por MF. Sin embargo, desde el comienzo del ensayo hasta los 180 min se observó una diferencia significativa entre ambos perfiles. Por otro lado, debe destacarse que con el sistema ABZ:C- $\beta$ -CD SA se consiguió una completa disolución del fármaco transcurridos 20 min del ensayo de disolución.

Los sistemas formulados con C- $\beta$ -CD facilitaron en mayor medida la solubilización del ABZ respecto de aquellos que se formularon con  $\beta$ -CD sin sustituir, siendo esperados estos resultados por el elevado valor de  $K_f$  obtenido para la C- $\beta$ -CD.



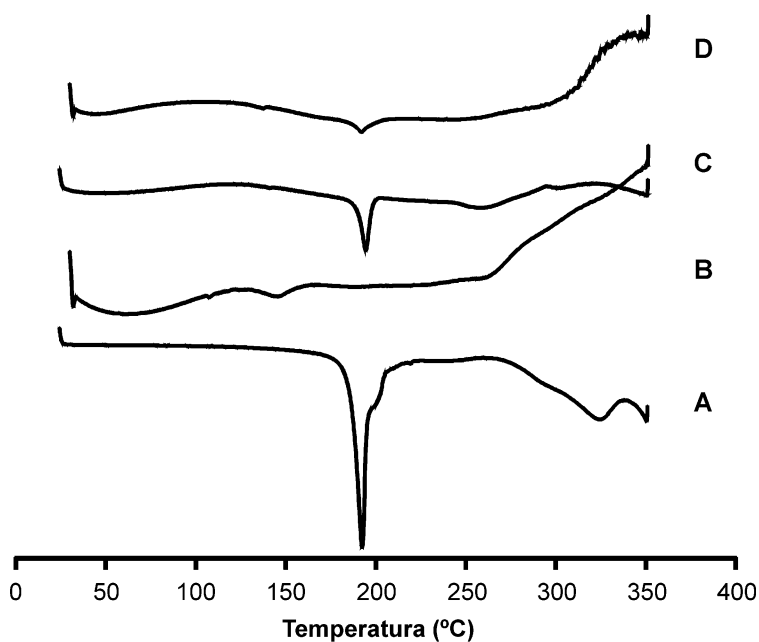
**Figura 59.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD MF, ABZ:C-β-CD MF, ABZ:β-CD SA y ABZ:C-β-CD SA.

**Tabla XVI.** Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$  (%),  $Q_{60}$  (%)) y ED (%) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:C-β-CD formulados por SA y MF.

Sistema	Método de obtención	Solubilidad (mg/mL)	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)	ED (%)
ABZ:C-β-CD	MF	0,172 ± 0,004	49,0 ± 2,2	57,0 ± 3,2	60,6 ± 2,2
	SA	0,799 ± 0,009	97,5 ± 2,1	96,8 ± 1,3	95,0 ± 1,7

#### 4.3.2.2.4 Calorimetría diferencial de barrido

La CDB aporta información sobre las interacciones en estado sólido entre el fármaco y la CD. En las curvas de CDB realizadas para el ABZ y el sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por MF (Figura 60 A y C) se observa un pico endotérmico agudo a 196,84 °C correspondiente a la fusión del ABZ, indicando que no se ha formado el complejo de inclusión (en estado sólido) por MF.<sup>184</sup> En el termograma del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por SA (Figura 60 D) se observa que el pico endotérmico de fusión del ABZ, redujo notoriamente su amplitud con respecto a la MF, su presencia indicaría que una proporción de IFA no se encontraría formando parte del complejo en estado sólido.<sup>185</sup>

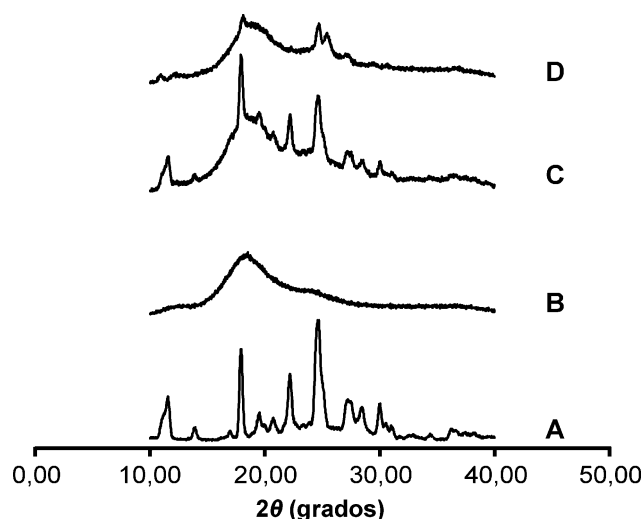


**Figura 60.** Termograma de CDB de ABZ (A), C- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

#### 4.3.2.2.5 Difracción de rayos X

Como se mencionó en la sección 1.2.1.2, la sustitución aleatoria de la  $\beta$ -CD produce materiales amorfos,<sup>76</sup> esto pudo corroborarse en los patrones de DRX de la C-

$\beta$ -CD (Figura 61), donde no hubo evidencia de picos agudos y definidos, que caracterizan a los compuestos con estructura cristalina.



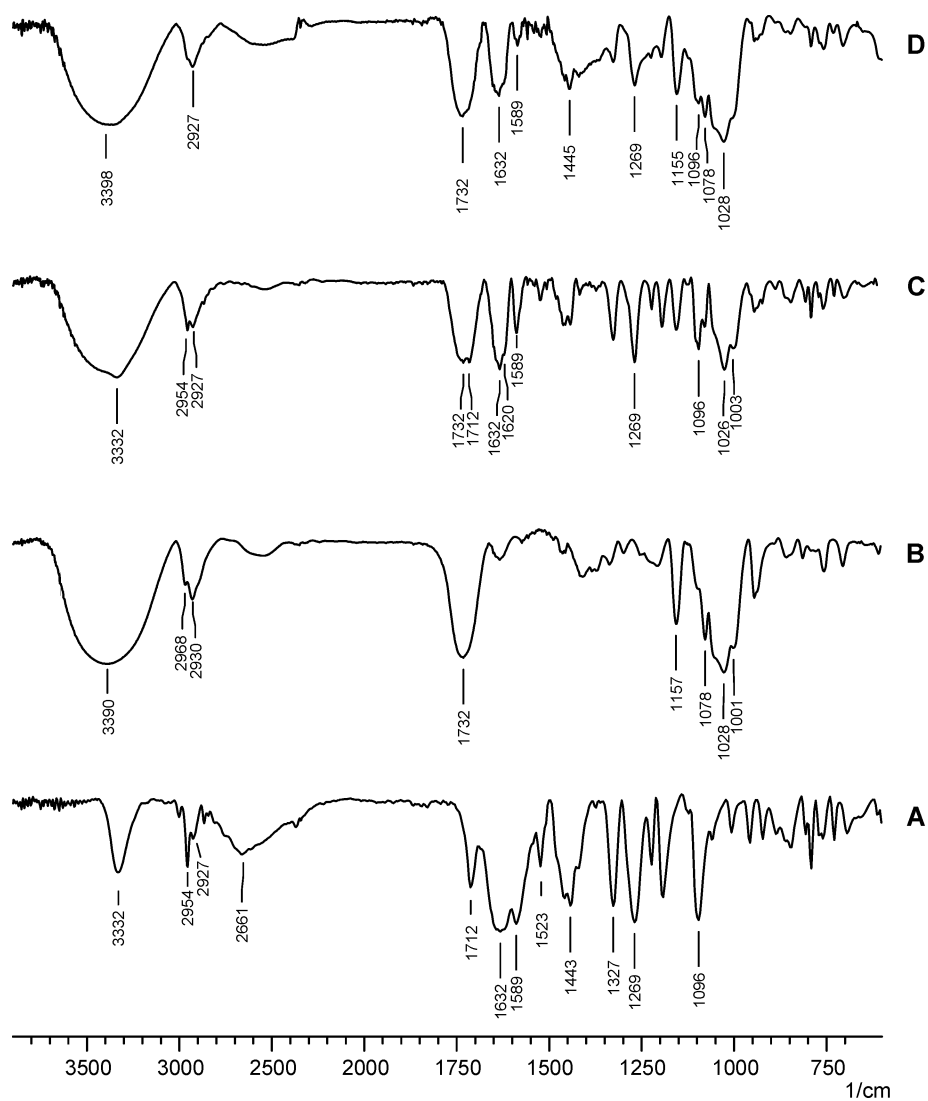
**Figura 61.** Difractograma del ABZ (A), C- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

El ABZ se encuentra en forma cristalina como lo demuestran los picos intensos y agudos a  $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54 que pueden observarse en su patrón de DRX (Figura 61).

En el sistema ABZ:C- $\beta$ -CD MF pudieron observarse las señales características del ABZ, indicando que no se produce la formación del complejo de inclusión por MF (resultado que concuerda con el obtenido por CDB). El método SA produjo un material parcialmente amorfo, ya que en el difractograma del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por dicho método, se distinguieron sólo dos de las señales características del ABZ a  $2\theta$  17,85 y 24,54. Si bien estas señales presentaron una menor intensidad que las observadas en el difractograma del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por MF, su presencia nos indicaría que una proporción de IFA no se encontraría formando parte del complejo en estado sólido.

#### 4.3.2.2.6 Espectroscopía de infrarrojo

Se realizaron los espectros de FT-IR del ABZ, la C- $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD preparados por SA y MF (Figura 62).



**Figura 62.** Espectros de FT-IR del ABZ (A), C- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

El espectro del ABZ (Figura 62 A) presentó las bandas de transmitancia características a:  $3332\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión de los enlaces N-H);  $2954$  y  $2927\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión correspondientes a los grupos  $\text{CH}_3/\text{CH}_2$ );  $2661$  (vibraciones de tensión de los enlaces C-H);  $1712\text{ cm}^{-1}$  (banda amida);  $1632\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión de los anillos aromáticos);  $1589\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión de los enlaces C-N aromáticos) y  $1523\text{ cm}^{-1}$  (banda amida).<sup>186</sup>

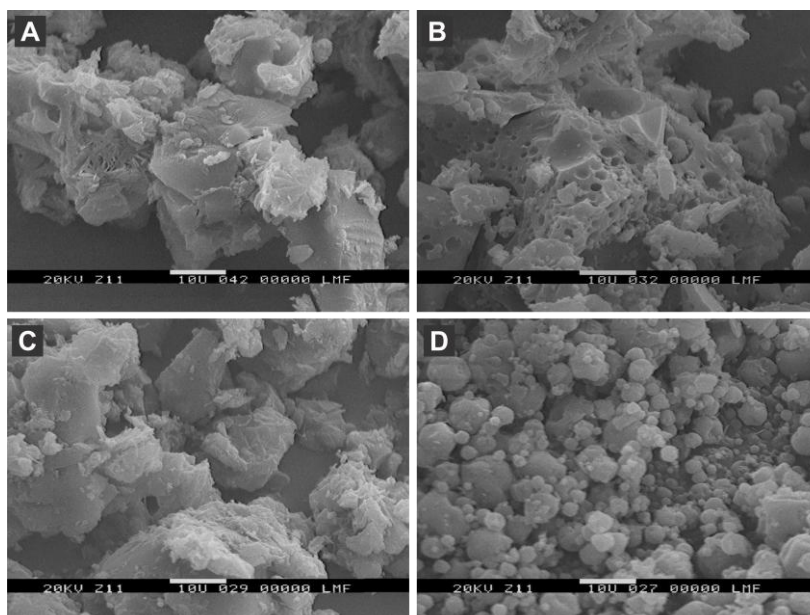
En el espectro de FT-IR de la C- $\beta$ -CD (Figura 62 B) se observa una señal a  $1732\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al éster formado entre el grupo carboxilo del ácido cítrico y los alcoholes libres de la  $\beta$ -CD (esta señal no se observó en el espectro de la  $\beta$ -CD). Esta banda también se presentó en los espectros realizados para los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD preparados por ambos métodos, en los cuales también se visualizó una banda correspondiente al carbonilo del ABZ a  $1634\text{ cm}^{-1}$ .

Cabe destacar, que en el espectro del ABZ:C- $\beta$ -CD MF (Figura 62 C) pueden distinguirse los picos correspondientes a la huella dactilar del ABZ, y esto no es posible de apreciar en el espectro de ABZ:C- $\beta$ -CD SA (Figura 62 D). De esta manera los espectros de IR, nos dan una confirmación de la formación del C- $\beta$ -CD y del complejo mediante SA.

#### **4.3.2.2.7 Microscopía electrónica de barrido**

En la Figura 63 se observan las micrografías obtenidas para el ABZ, el C- $\beta$ -CD y para los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF. En estas imágenes, se pudo observar que el ABZ (Figura 63 A) se presentó en forma de partículas irregulares de un tamaño superior a los  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Por otro lado, en las micrografías del C- $\beta$ -CD (Figura 63 B) se visualizaron partículas fragmentadas de superficie porosa y de tamaño variable. En la micrografía correspondiente al sistema ABZ:C- $\beta$ -CD obtenido por MF (Figura 63 C) se observó que tanto el ABZ como el C- $\beta$ -CD, mantuvieron la estructura y tamaño de partida, evidenciando la simple mezcla de los mismos. Contrariamente, en las micrografía del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD preparado por SA (Figura 63 D) se visualizó la formación de una nueva estructura formada entre el ABZ y el C- $\beta$ -CD, consistente en

partículas con forma predominantemente esférica y un tamaño que oscila entre los 1-10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 63.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), C- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:C- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

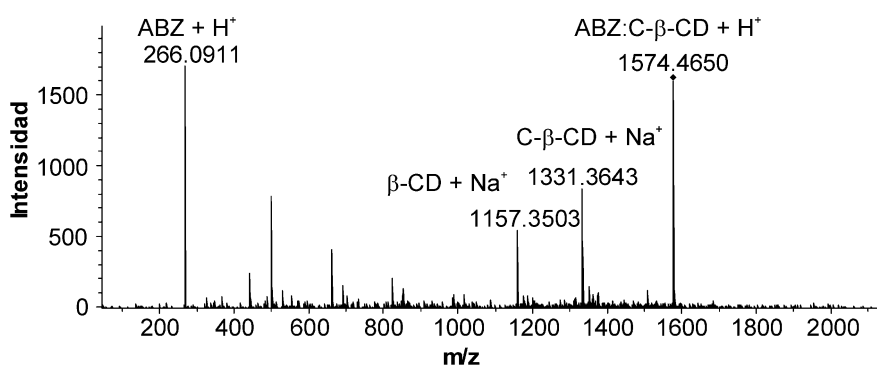
#### 4.3.2.2.8 Espectrometría de masas

La ESI es una técnica de ionización relativamente suave, empleada en el análisis de biomoléculas, siendo muy efectiva en la determinación de la asociación molecular en uniones no covalentes.<sup>187</sup> La habilidad de ESI de mantener la estructura no covalente de una biomolécula en la transición del estado líquido a la fase gaseosa, provee la posibilidad de estudiar la formación de complejos de inclusión entre CDs y diferentes moléculas orgánicas.<sup>188</sup>

Previo al análisis del complejo, se realizaron los análisis de C- $\beta$ -CD (Figura 35) y del ABZ (no se presenta este espectro) con los fines de confirmar los pesos moleculares de ambos compuestos. Se realizaron luego los análisis del complejo en modo de ionización positivo y negativo, detectándose solo en modo positivo un ión que se atribuye a dicho complejo como  $(M+H^+)$ . Los resultados de este análisis revelaron que

el complejo entre el ABZ y la C- $\beta$ -CD se presenta en una relación molar 1:1, debido a la presencia de un ión molecular con una relación m/z de 1574,4814 (Complejo 1:1+H<sup>+</sup>).

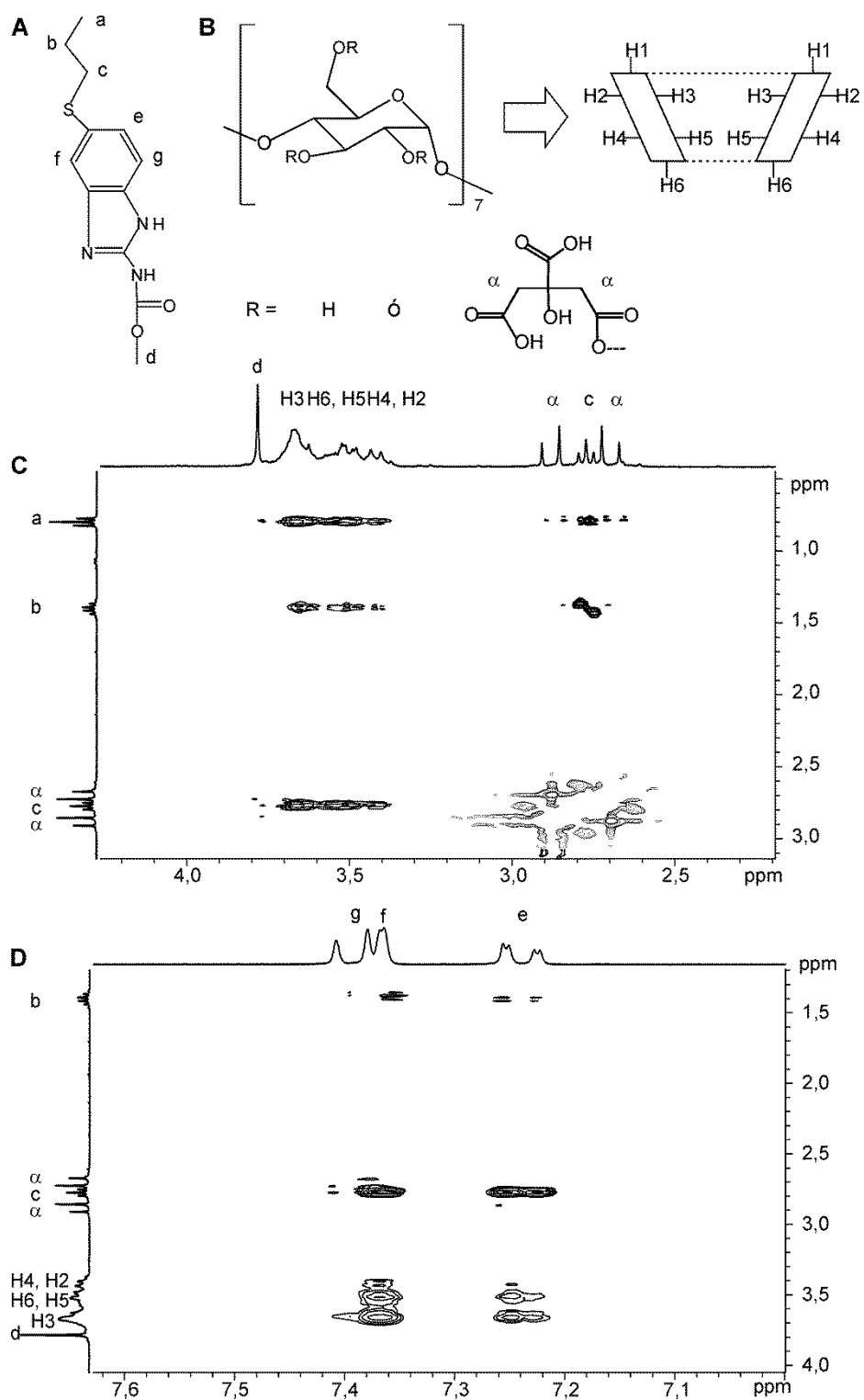
Posteriormente se realizó el análisis de MS-MS del ión molecular antes mencionado (Figura 64), que nos aportó evidencia adicional de la formación del complejo, ya que los principales fragmentos observados corresponden al complejo ABZ:C- $\beta$ -CD (1574,4814), a la C- $\beta$ -CD (1331,3643), a la  $\beta$ -CD producto de fragmentación del éster (1157,3503) y al ABZ (266,0911).



**Figura 64.** Espectro de MS-MS del ión molecular con relación m/z 1574,4814.

#### 4.3.2.2.9 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución

Para realizar los espectros de RMN se disolvió la muestra en medio ácido, a fines de recrear la interacción que existe al disolver el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD a pH estomacal. Por cuestiones de sensibilidad instrumental no pudieron obtenerse los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del ABZ en medio acuoso, ni tampoco en medio ácido. Por lo tanto, todos ensayos correspondientes al ABZ se realizaron en combinación con la C- $\beta$ -CD que nos permitió alcanzar la concentración requerida. Al no contar con un espectro del ABZ no pudieron realizarse cálculos de diferencia de desplazamiento químico por formación del complejo. Se realizó la asignación de las señales del ABZ y la C- $\beta$ -CD observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H obtenido para el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD (Figura 65 A y B), empleando la información obtenida en los experimentos de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC y <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC.



**Figura 65.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado del C-β-CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de C-β-CD en DCl 0,1 M (C y D).

La proximidad en el espacio entre los núcleos de la molécula huésped y la CD puede ser monitoreada mediante los efectos intermoleculares Overhauser, medidos a través de un experimento ROESY. La cercanía de los núcleos se determinó por la aparición de una señal en la intersección de las señales de protón en el espectro en dos dimensiones antes mencionado (señales de correlación).

En los espectros de ROESY en 2D puede observarse señales correspondientes a los protones internos de la C- $\beta$ -CD que presentan señales de correlación con los protones aromáticos **e**, **f** y **g** (Figura 65) con desplazamientos a 7,24; 7,37 y 7,40 ppm (Figura 65). Además, se observa proximidad de los protones internos de la C- $\beta$ -CD con los protones **b** ( $\delta$  1,40 ppm) y **c** ( $\delta$  2,79 ppm) correspondientes a la cola del ABZ (Figura 65). Por otro lado, también se observan señales de correlación entre los protones de la cola del ABZ (Figura 65 C) con los protones aromáticos de dicha molécula (Figura 65 D).

De acuerdo a los resultados obtenidos, puede postularse que las regiones del ABZ que se encuentran en el interior la C- $\beta$ -CD, son el anillo aromático y la cola. Con respecto a la conformación del ABZ en el interior del anillo, puede inferirse que existe proximidad entre la cola y el anillo aromático del mismo.

#### **4.3.2.3 Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:succinil- $\beta$ -ciclodextrina**

##### **4.3.2.3.1 Determinación del rendimiento y el título**

La técnica de SA realizada en las condiciones descriptas en la sección 3.2.4.2, nos permitió obtener el complejo ABZ:S- $\beta$ -CD con un R del 84 % y un título de ABZ del 16,0 % (p/p). El valor del título se encontró relacionado con los pesos moleculares de ambos compuestos y la relación estequiométrica que en el caso de este complejo fue equimolar.

#### 4.3.2.3.2 Estudios de solubilidad aparente

El ABZ incluido en el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido por SA, presentó una solubilidad aparente en agua (25 °C) de 0,224 mg/mL, mientras que para el mismo sistema obtenido por MF la solubilidad fue de 0,066 mg/mL (Tabla XVII). La solubilidad del ABZ alcanzada con el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido por MF fue superior a la obtenida empleando  $\beta$ -CD (Tabla XIV). Por otro lado, la solubilidad del ABZ alcanzada por el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD formulado por SA fue al menos tres veces más alta, que la obtenida para los sistemas ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD preparados por el mismo método (Tabla XIV).

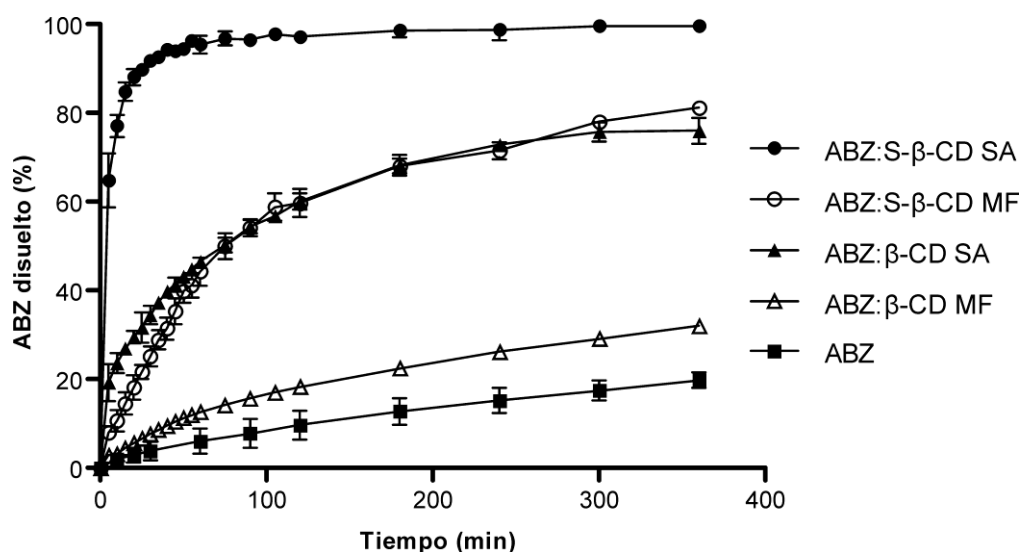
#### 4.3.2.3.3 Estudios de velocidad de disolución

Los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD preparados por SA y MF mostraron un incremento en la ED con respecto al ABZ (Tabla XV, Tabla XVII y Figura 66). Se realizó además la comparación con los perfiles de disolución de los sistemas ABZ: $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF, presentando ambos una ED del ABZ menor que la obtenida para el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD formulado por SA. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la ED calculada para el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido por MF y para el sistema ABZ: $\beta$ -CD obtenido por SA.

Es preciso destacar que la ED calculada para el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido por SA superó a la del ABZ en un 87 % (Tablas XV y XVII), y fue al menos un 35 % superior que para cualquiera de los demás sistemas presentados en la Figura 66.

**Tabla XVII.** Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$  (%),  $Q_{60}$  (%) y ED (%)) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD formulados por SA y MF.

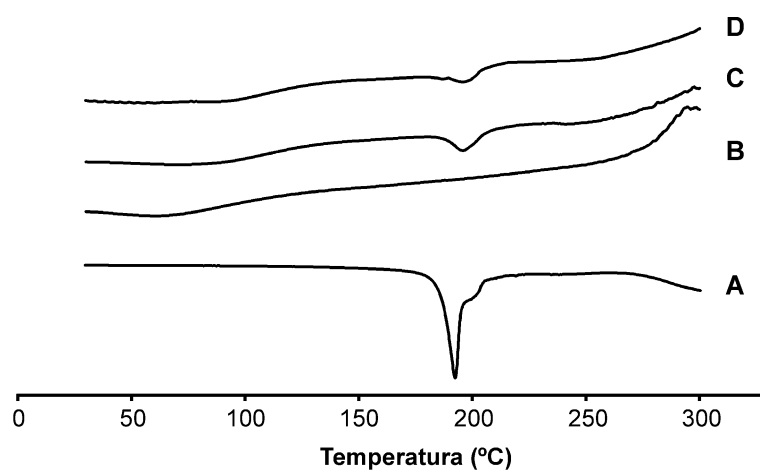
Sistema	Método de obtención	Solubilidad (mg/mL)	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)	ED (%)
ABZ:S- $\beta$ -CD	MF	0,066 $\pm$ 0,005	25,2 $\pm$ 2,2	44,3 $\pm$ 3,2	61,1 $\pm$ 1,1
	SA	0,224 $\pm$ 0,002	91,8 $\pm$ 0,4	95,5 $\pm$ 1,9	96,2 $\pm$ 0,8



**Figura 66.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD MF, ABZ:S-β-CD MF, ABZ:β-CD SA y ABZ:S-β-CD SA.

#### 4.3.2.3.4 Calorimetría diferencial de Barrido

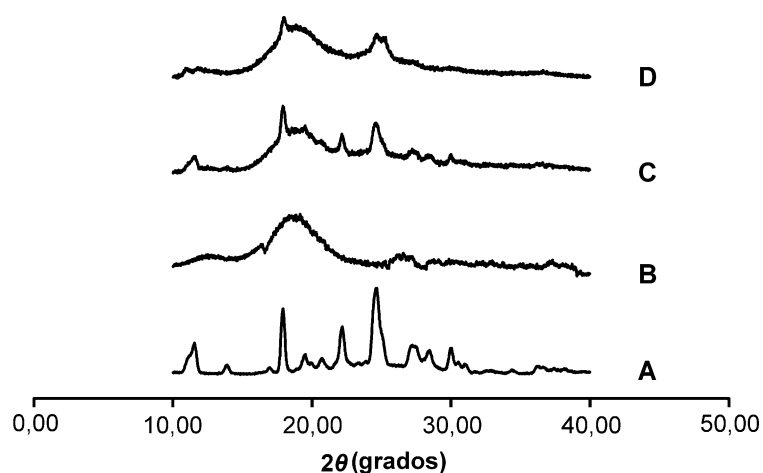
Los termogramas de CDB para el ABZ, S-β-CD y los sistemas ABZ:S-β-CD preparados por MF y SA, se realizaron para evaluar cambios en el pico de fusión del ABZ cuando este IFA se encontraba en combinación con el S-β-CD y la influencia del método de preparación. En la Figura 67 A, se observa el pico de fusión característico del ABZ a 196,84 °C. Este mismo pico endotérmico de fusión, se presentó en los termogramas realizados para los sistemas ABZ:S-β-CD preparados por MF y SA, solo que en el último caso la intensidad fue menor. Esto último, podría indicar que en el sistema ABZ:S-β-CD obtenido por SA, una proporción del IFA se encontraría formando parte del complejo de inclusión en estado sólido.



**Figura 67.** Termograma de CDB de ABZ (A), S- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

#### 4.3.2.3.5 Difracción de rayos X

El ABZ se encontró en forma cristalina como lo demostraron los picos intensos y agudos a  $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54 que pueden observarse en su patrón de DRX (Figura 68 A).



**Figura 68.** Difractograma del ABZ (A), S- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

Por otro lado, los picos anchos y poco definidos que se observaron en el difractograma del S- $\beta$ -CD indicaron que este compuesto se encontró en estado amorfo. Los patrones de DRX del sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido por MF, mostraron los picos característicos del ABZ ( $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54), con una menor intensidad que en el difractograma del ABZ, lo que podría deberse al efecto de dilución por la presencia del S- $\beta$ -CD.

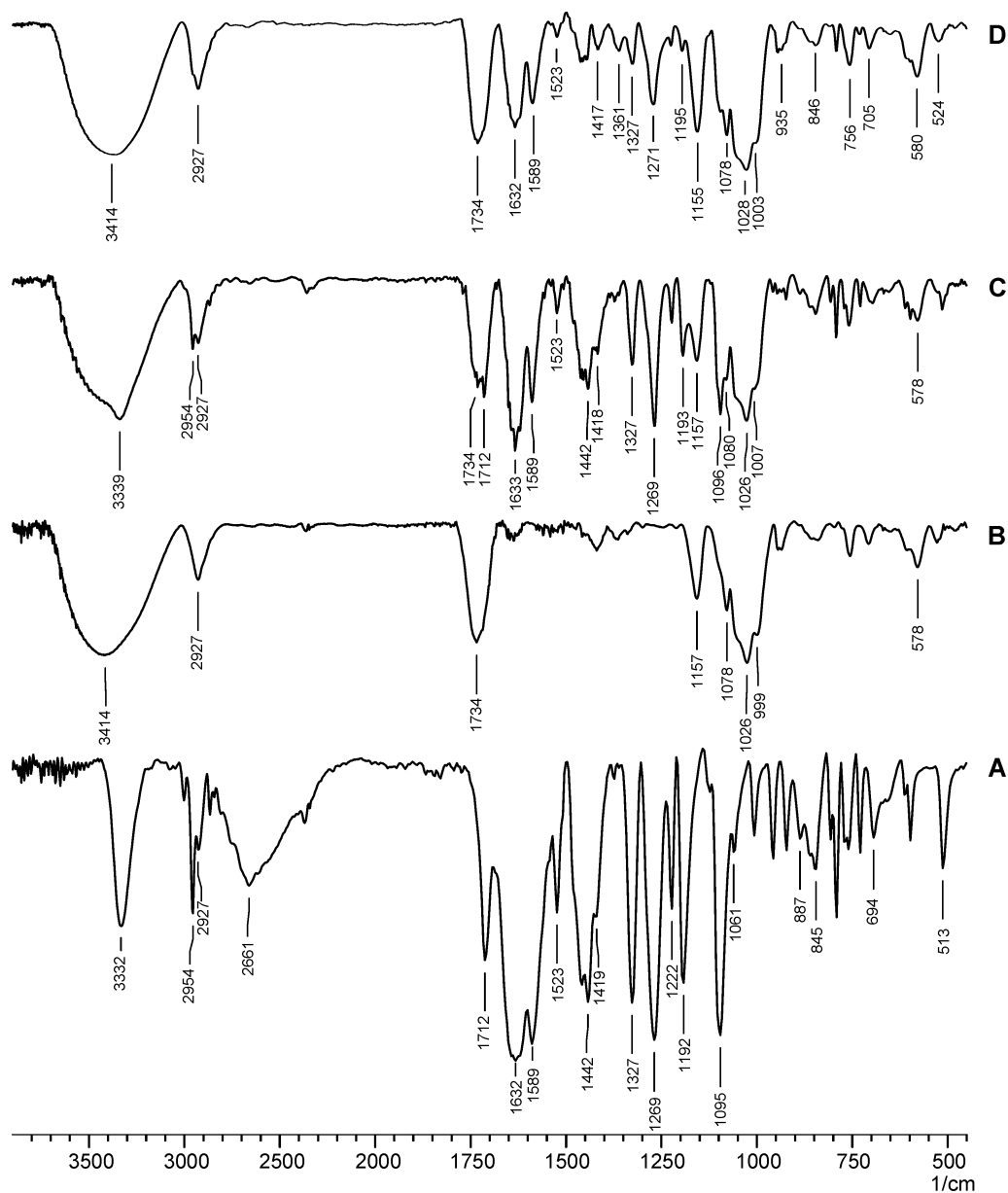
Los patrones de DRX del sistema obtenido por SA mostraron sólo dos picos débiles del IFA a  $2\theta$  17,85 y 24,54, con menor intensidad que en el sistema obtenido por MF. Sin embargo, su presencia nos indicaría que una proporción de IFA no se encontraría formando parte del complejo de inclusión en estado sólido.

#### **4.3.2.3.6 Espectroscopía de infrarrojo**

En la Figura 69 se presentan los espectros de FT-IR del ABZ, del S- $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos mediante SA y MF. Las bandas de absorción correspondientes al ABZ en el espectro de FT-IR fueron discutidas en la sección 4.3.2.2.6, de modo que sólo se discutirán en esta sección las señales correspondientes al ABZ presentes en los espectros registrados para los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos por MF y SA.

Los picos principales en el espectro del S- $\beta$ -CD fueron: un pico ancho a  $3414\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión de los enlaces O-H), un pico a  $2927\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión de C-H) y otro a  $1734\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo ester (el cuál se formó en la reacción química entre el grupo carboxílico del ácido succínico y los grupos hidroxilos de la  $\beta$ -CD).

El espectro del sistema ABZ:S- $\beta$ -CD obtenido mediante MF exhibió claramente los picos correspondientes al ABZ y a la S- $\beta$ -CD y no se observaron corrimientos. En el espectro del sistema ABZ:S- $\beta$ -CD preparado por SA se detectaron solo algunos de los picos correspondientes al ABZ (como por ejemplo el pico a  $1632\text{ cm}^{-1}$  debido al grupo carbonilo). Estos hechos indicarían que en este sistema, el ABZ se podría encontrarse incluido en la cavidad del S- $\beta$ -CD.

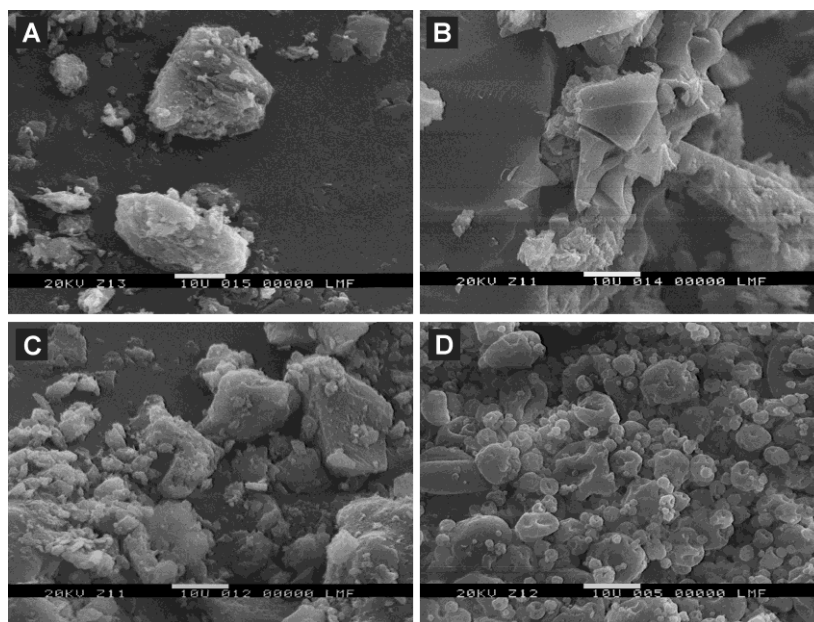


**Figura 69.** Espectros de FT-IR del ABZ (A), S- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

#### 4.3.2.3.7 Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 70 se observan las micrografías del ABZ, del S- $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF. En las mismas, el ABZ (Figura 70 A) se presentó en forma de partículas irregulares de un tamaño de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ , mientras que el S- $\beta$ -

CD (Figura 70 B) consistió en una mezcla de partículas de superficie lisa de diferentes tamaños (10-300  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 70.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), S- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:S- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

En la micrografía correspondiente al sistema obtenido por MF (Figura 70 C) se pudo observar que tanto el ABZ como el S- $\beta$ -CD, mantuvieron su morfología y tamaño original. Por otro lado, al observar el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD preparado por SA (Figura 70 D) resultó imposible distinguir partículas de S- $\beta$ -CD o de ABZ, mostrando una nueva estructura formada entre el ABZ y el S- $\beta$ -CD, que podría corresponderse con la formación de un complejo de inclusión entre ambos compuestos.

#### 4.3.2.3.8 Espectrometría de masas

Las abundancias relativas y las estequiometrias del complejo de inclusión ABZ:S- $\beta$ -CD formado mediante SA fueron determinadas mediante MS. Los iones moleculares con una relación de  $m/z$  de 748,8; 798,8; 848,8 y 898,7 correspondieron a especies doblemente cargadas que pueden atribuirse a complejos formados en una relación equimolar entre moléculas de ABZ y moléculas de S- $\beta$ -CD con diferentes GSs (1-4

sustituyentes). Estos resultados fueron confirmados, mediante el análisis MS-MS de los picos antes mencionados, obteniendo fragmentos relacionados al ABZ y al S- $\beta$ -CD.

Por otro lado, no se observaron señales con una relación m/z que pudiera relacionarse con complejos formados en otra relación estequiométrica, de modo que estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en los diagramas de solubilidad de fase realizados.

#### 4.3.2.3.9 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución

El ROESY, es un experimento de RMN en 2D que provee información sobre las interacciones espaciales entre protones inter e intramoleculares, permitiendo establecer posibles formas de interacción entre dos moléculas. En esta técnica, la observación de una señal de correlación indica que la distancia entre los protones involucrados es de alrededor de 0,4 nm.<sup>189</sup>

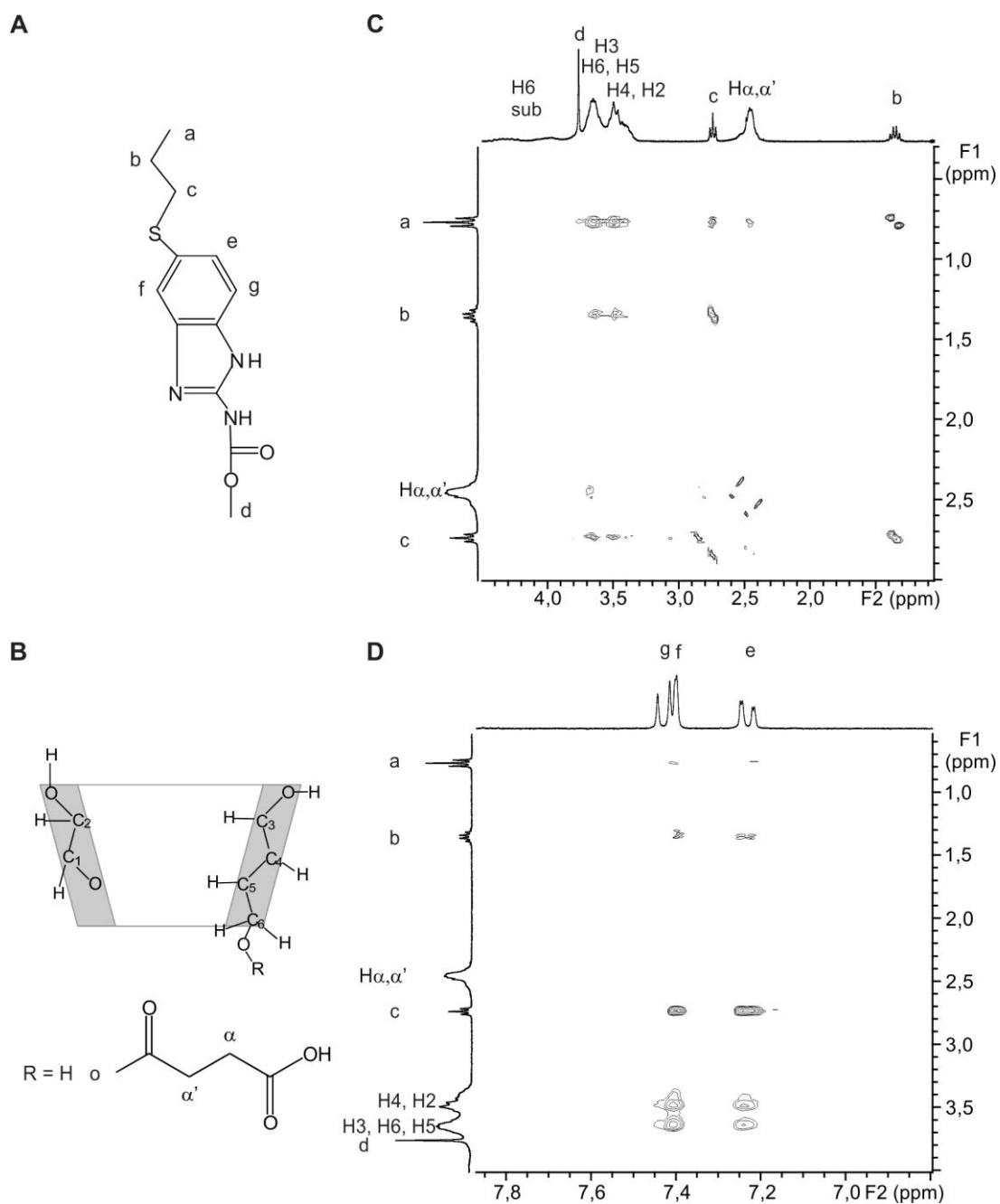
En la Figura 71 se presentan el espectro de ROESY realizado para el sistema ABZ:S- $\beta$ -CD y las etiquetas de los protones del ABZ y de la S- $\beta$ -CD. En los mismos pudo apreciarse que las señales de correlación entre los protones internos de la S- $\beta$ -CD y los protones **f** del ABZ fueron más intensas que las señales observadas con los protones **e** y también se observó la ausencia de correlación con los protones **g**. Estos datos, podrían sugerir que el anillo aromático ABZ podría encontrarse parcialmente incluido en la cavidad del S- $\beta$ -CD.

Adicionalmente, se observaron señales de correlación entre los protones “a” del ABZ y los protones  $\alpha$ - $\alpha'$  del grupo succinilo, indicando que esta región del IFA podría encontrarse del lado más estrecho de la apertura del S- $\beta$ -CD.

Además, los protones  $\alpha$ - $\alpha'$  presentaron señales de correlación en la región correspondiente a los **H3**, **H5** y **H6**, sugiriendo de este modo que el grupo succinilo podría encontrarse próximo a otras subunidades de glucopiranosas sin sustituir.

De acuerdo al análisis de los espectros de ROESY, se postuló que las regiones del ABZ (Figura 71 A) que se encontrarían en el interior del anillo de la S- $\beta$ -CD, serían el

anillo aromático (protones e, f y g) y la cola (protones a, b y c). Además, los protones aromáticos y los de la cola del ABZ presentaron señales de correlación (Figura 71 D), indicando una posible interacción entre estas regiones.



**Figura 71.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de la S- $\beta$ -CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de S- $\beta$ -CD en DCI 0,1 M (C y D).

#### **4.3.2.4 Caracterización fisicoquímica y estructural del sistema albendazol:itaconil- $\beta$ -ciclodextrina**

##### **4.3.2.4.1 Determinación del rendimiento y el título**

La técnica de SA realizada en las condiciones descriptas en la sección 3.2.4.2, nos permitió obtener el complejo ABZ:I- $\beta$ -CD con un R del 80 % y un título de ABZ del 17,2 % (p/p). Este título se encontró en concordancia con las relaciones molares entre ambos compuestos (1:1) y sus pesos moleculares.

##### **4.3.2.4.2 Estudios de solubilidad aparente**

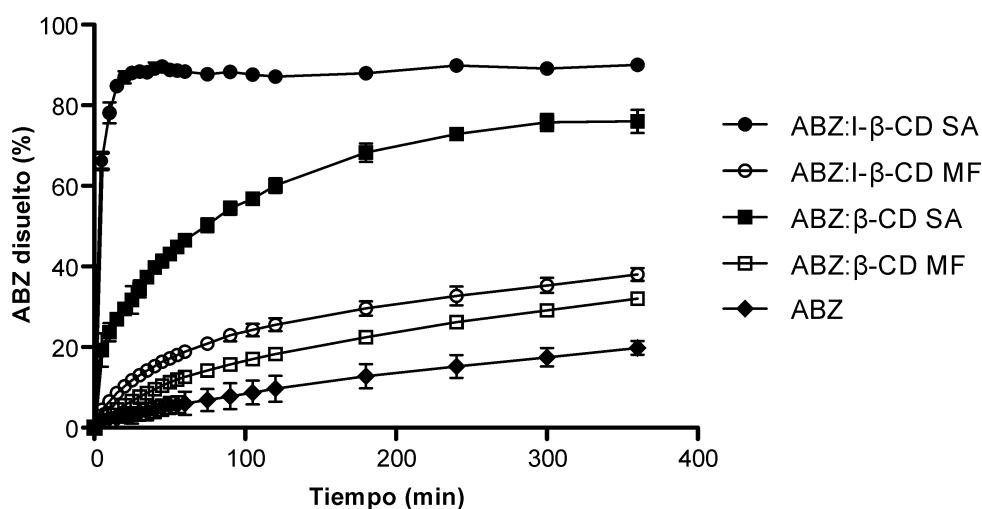
La concentración de ABZ alcanzada para el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF fue de 0,088 mg/mL, mientras que para el mismo sistema preparado por SA la concentración de ABZ fue de 0,344 mg/mL (Tabla XVIII). Estos resultados indican que la eficiencia de este derivado de  $\beta$ -CD como agente solubilizante es superior a la de la  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD y S- $\beta$ -CD (Tabla XIV, Tabla XVII y Tabla XVIII).

##### **4.3.2.4.3 Estudios de velocidad de disolución**

En la Figura 72, pueden observarse los perfiles de disolución realizados para los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF, presentándose también los sistemas análogos formulados con  $\beta$ -CD y el ABZ sin incluir con el propósito de evaluar la eficiencia del I- $\beta$ -CD como transportador. En el perfil de disolución del sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por SA, pudo visualizarse que el porcentaje máximo de ABZ disuelto se alcanzó a los 15 min de iniciado el ensayo. La ED calculada para este sistema (Tabla XVIII), fue menor que la obtenida para los sistemas análogos formulados con M- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD, aunque resultó mayor a la obtenida para los sistemas formulados con  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD preparados por el mismo método.

Por otro lado, aunque el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF mostró una diferencia estadísticamente significativa en la ED del ABZ respecto del sistema análogo formulado con  $\beta$ -CD, la misma fue menor que para el resto de los sistemas formulados por MF. Este resultado, no se encontró en concordancia con los valores de  $K_f$  obtenidos

para las CDs antes mencionadas en presencia de ABZ (Tabla XII), donde la I- $\beta$ -CD presentó el segundo valor más alto de  $K_f$ . Este valor más bajo de lo esperado de ED para los sistemas formulados con I- $\beta$ -CD, podrían deberse a una menor velocidad en la solubilización del ABZ, ya que las concentraciones de ABZ obtenidas en los estudios de solubilidad fueron concordantes con los resultados de  $K_f$  calculados en la sección 4.3.1.



**Figura 72.** Perfiles de disolución en HCl 0,1 M a 37 °C, del ABZ sin transportador y del ABZ incluido en los sistemas ABZ:β-CD MF, ABZ:I-β-CD MF, ABZ:β-CD SA y ABZ:I-β-CD SA.

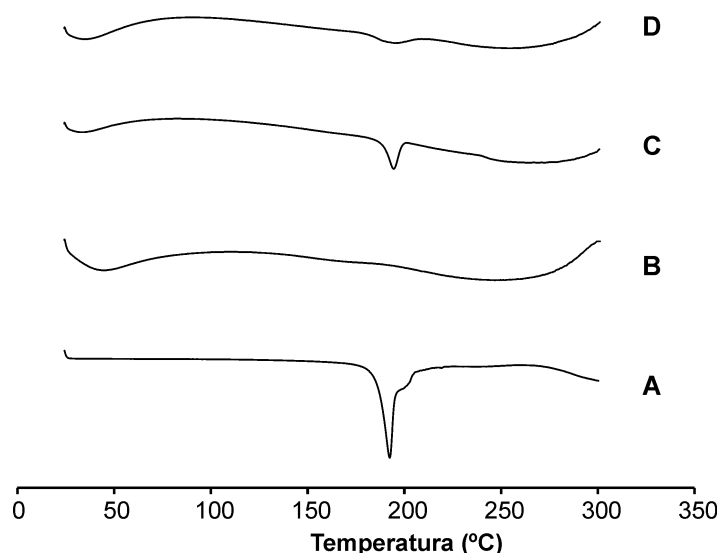
**Tabla XVIII.** Valores de solubilidad aparente en agua a 25 °C y parámetros de disolución ( $Q_{30}$  (%),  $Q_{60}$  (%)) y ED (%) del ABZ, obtenidos para los sistemas ABZ:I-β-CD formulados por SA y MF.

Sistema	Método de obtención	Solubilidad (mg/mL)	$Q_{30}$ (%)	$Q_{60}$ (%)	ED (%)
ABZ:I-β-CD	MF	0,088 ± 0,003	13,0 ± 0,12	18,9 ± 0,81	23,4 ± 1,32
	SA	0,344 ± 0,002	88,3 ± 1,11	88,4 ± 0,33	86,5 ± 0,37

#### 4.3.2.4.4 Calorimetría diferencial de barrido

Los termogramas de CDB para el ABZ, la I- $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD preparados por MF y SA (Figura 73), se realizaron para evaluar si se producían cambios en el pico de fusión del ABZ cuando este IFA se encontraba en combinación con el I- $\beta$ -CD y la influencia del método de preparación.

En la Figura 73 A, se observó el pico de fusión característico del ABZ a 196,84 °C. El pico endotérmico de fusión del ABZ, también se presentó en el termograma realizado para el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD preparado por MF.

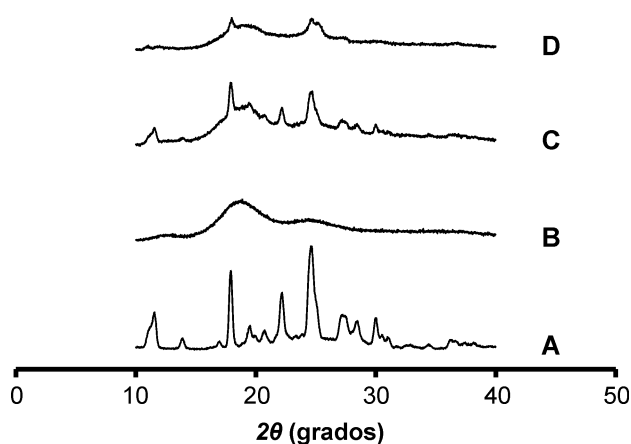


**Figura 73.** Termograma CDB de ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

#### 4.3.2.4.5 Difracción de rayos X

En la Figura 74, se muestra el difractograma del ABZ donde pueden observarse picos intensos y agudos a  $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54, indicando que este compuesto se encuentra en estado cristalino. Por otro lado, los picos anchos presentes en el difractograma del I- $\beta$ -CD, indicaron que este compuesto se encontró en estado amorfo. El patrón de DRX del sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF, exhibió los picos

característicos del ABZ ( $2\theta$  11,51; 17,85; 22,09 y 24,54), además de los observados en el patrón de DRX del I- $\beta$ -CD. Contrariamente, en el difractograma realizado para el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por SA, se observaron sólo las señales a  $2\theta$  17,85 y 24,54 correspondientes al ABZ, con una menor intensidad que en el difractograma del ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF. Estos resultados evidenciarían un cambio en la estructura al estado sólido del complejo formulado respecto de los materiales de partida.



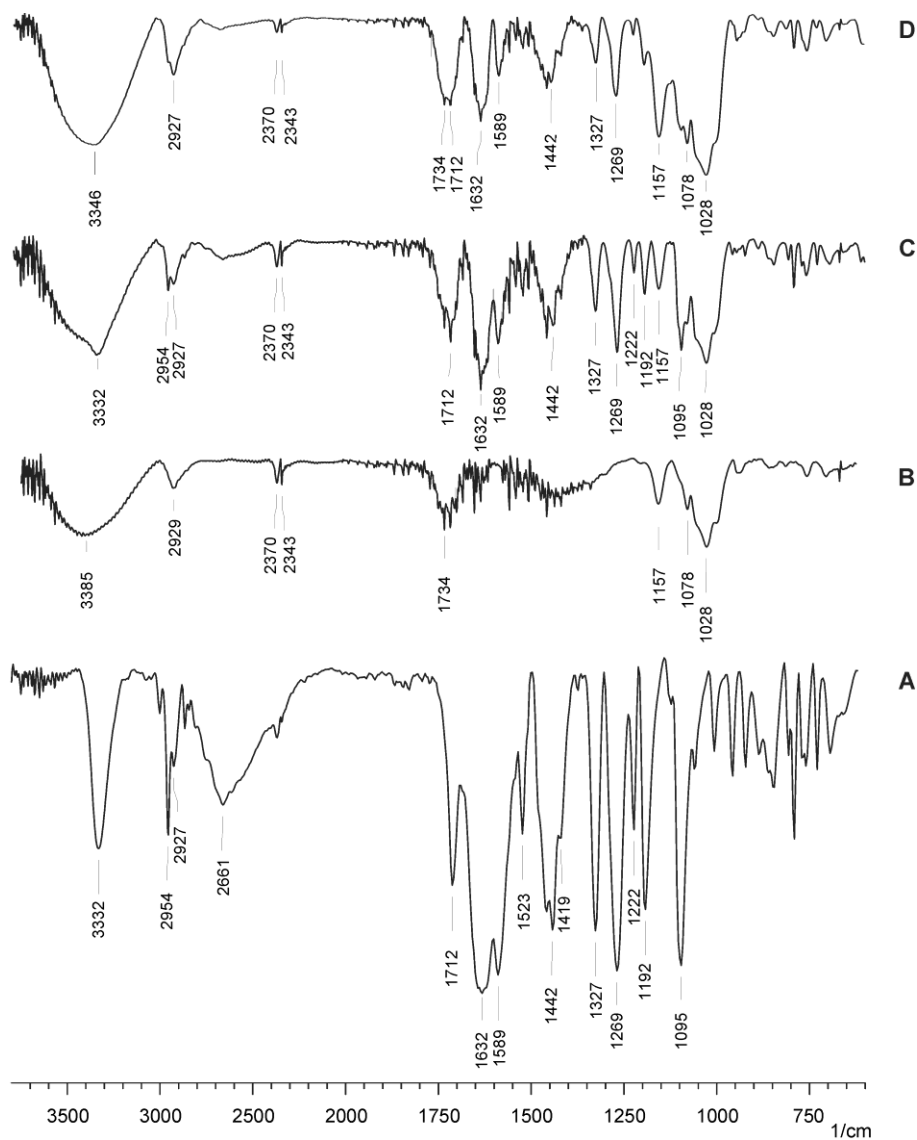
**Figura 74.** Difractograma del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

#### 4.3.2.4.6 Espectroscopía de infrarrojo

Las bandas de absorción producidas por el ABZ en el espectro de FT-IR fueron mencionadas en la sección 4.3.2.2.6, por lo tanto sólo se discutirán en esta sección las señales correspondientes al ABZ presentes en los espectros registrados para los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF y SA.

El espectro de FT-IR del I- $\beta$ -CD (Figura 75 B), presentó bandas anchas con un pico de transmitancia a  $3385\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas correspondientes a los grupos  $-\text{OH}$ , y otra banda que se visualiza a  $2929\text{ cm}^{-1}$  relacionada con las vibraciones de tensión de los enlaces C-H. Los picos de transmitancia a  $1157\text{ cm}^{-1}$  y  $1028\text{ cm}^{-1}$  se debieron a las vibraciones de

tesión asimétricas y simétricas correspondientes a los enlaces C–O–C. Por otro lado, el pico a  $1734\text{ cm}^{-1}$ , evidenció el enlace éster formado entre los grupos carboxílico del ácido itacónico y los hidroxilos de la  $\beta$ -CD.

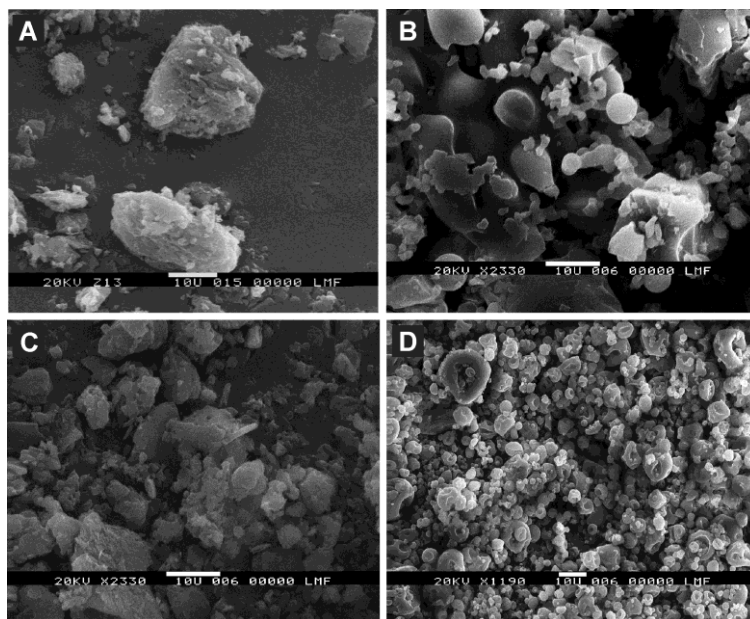


**Figura 75.** Espectros de FT-IR del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD preparados por MF (C) y SA (D).

En los espectros de FT-IR realizados para los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF y SA, se observaron además de las bandas de absorción correspondientes al I- $\beta$ -CD, bandas originadas por el ABZ presente en estas muestras. No hay diferencias notorias entre ambos espectros, excepto por las bandas de absorción a  $3332\text{ cm}^{-1}$  (que se encontró superpuesta con la originada por los grupos OH de la CD) y a  $2954\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al ABZ, observadas sólo en el espectro del sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF. Estos resultados, indicarían una diferencia estructural producida por el proceso de SA en el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD, respecto de sus materiales de partida.

#### 4.3.2.4.7 Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 76 se presentan las micrografías del ABZ, del I- $\beta$ -CD y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por SA y MF.



**Figura 76.** Micrografías obtenidas por MEB (2000X) del ABZ (A), I- $\beta$ -CD (B) y los sistemas ABZ:I- $\beta$ -CD obtenidos por MF (C) y SA (D).

En estas imágenes, se pudo observar que el ABZ (Figura 76 A) se presentó en forma de partículas irregulares de un tamaño superior a los  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Por otro lado, en las micrografías del I- $\beta$ -CD (Figura 76 B) se visualizaron partículas de forma esférica de

superficie lisa y de tamaño variable, también se observaron fragmentos y partículas con forma irregular. En la micrografía correspondiente al sistema ABZ:I- $\beta$ -CD obtenido por MF (Figura 76 C) se pudo visualizar que tanto el ABZ como el I- $\beta$ -CD, mantuvieron la estructura y tamaño de partida. Por otro lado, en la micrografía del sistema ABZ:I- $\beta$ -CD preparado por SA (Figura 76 D) se observó la presencia de partículas de forma predominantemente esférica, es decir que estas imágenes confirmarían la formación de una nueva estructura en estado sólido entre el ABZ y el I- $\beta$ -CD.

#### 4.3.2.4.8 Espectrometría de masas

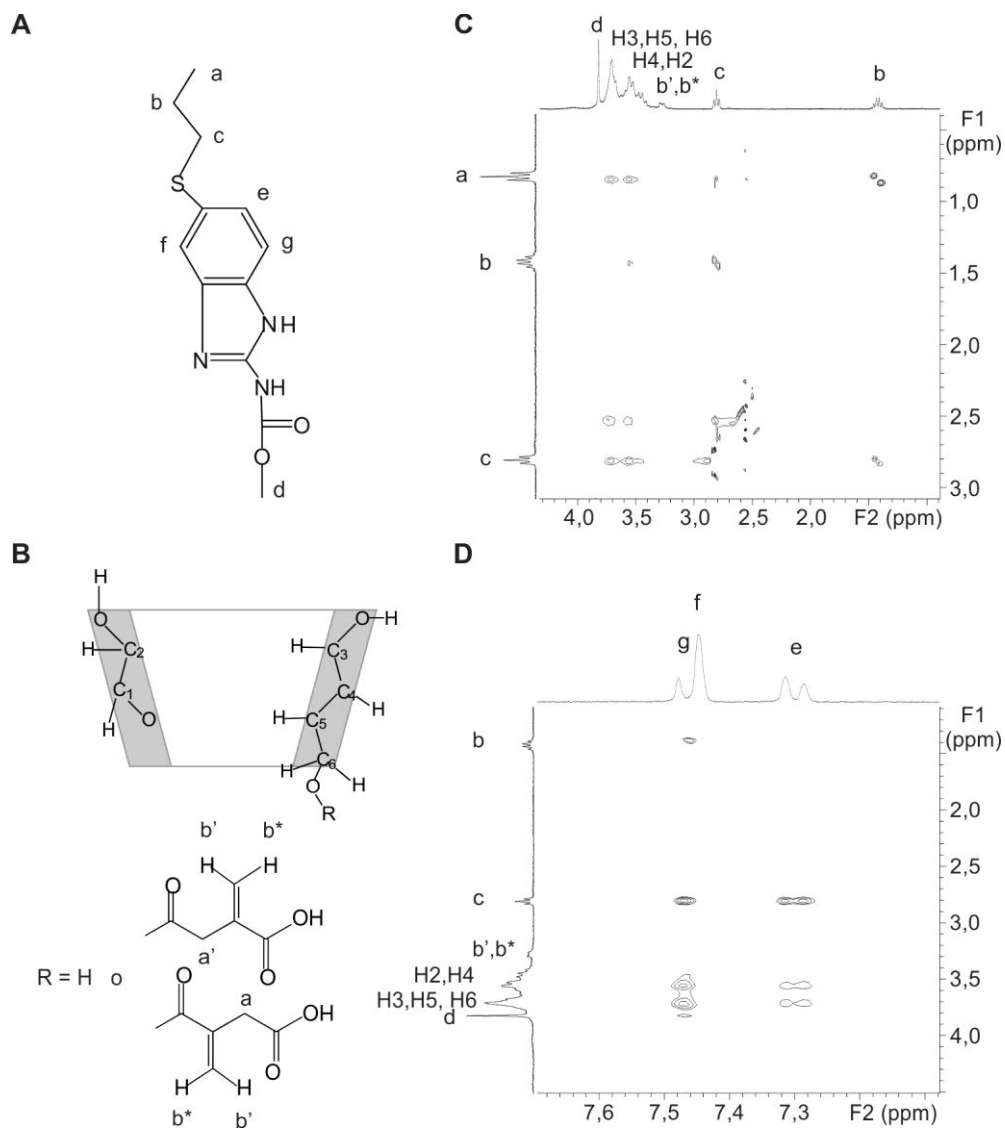
Las abundancias relativas y las estequiometrias del complejo de inclusión ABZ:I- $\beta$ -CD preparado por SA fueron determinadas mediante MS. En los espectros realizados se observó un ión molecular con una relación  $m/z$  de 1512,5 que correspondió a complejos formados en una relación equimolar entre moléculas de ABZ y moléculas de I- $\beta$ -CD con único sustituyente. Estos resultados fueron confirmados, mediante el análisis de MS-MS del ión mencionado, obteniendo fragmentos relacionados al ABZ y al I- $\beta$ -CD. Además, no se observaron señales con una relación  $m/z$  que pudiera relacionarse con complejos formados con moléculas de I- $\beta$ -CD con más de un sustituyente o en otra relación estequiométrica que no fuera 1:1. Este último dato, se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en los diagramas de solubilidad fase realizados para el ABZ en presencia de I- $\beta$ -CD.

#### 4.3.2.4.9 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución

En la Figura 77 puede observarse el espectro de ROESY registrado para el sistema ABZ:I- $\beta$ -CD y las correspondientes asignaciones de las señales del espectro de  $^1\text{H}$  de RMN.

En el espectro de ROESY parcial (Figura 77 D), pudieron observarse señales de correlación entre los protones **e**, **f** y **g** pertenecientes al anillo aromático del ABZ, con los protones internos de I- $\beta$ -CD (**H3** y **H5**). Estos últimos protones, también presentaron señales de correlación con los protones **a**, **b** y **c** del ABZ, siendo la correlación con los protones **b** débil.

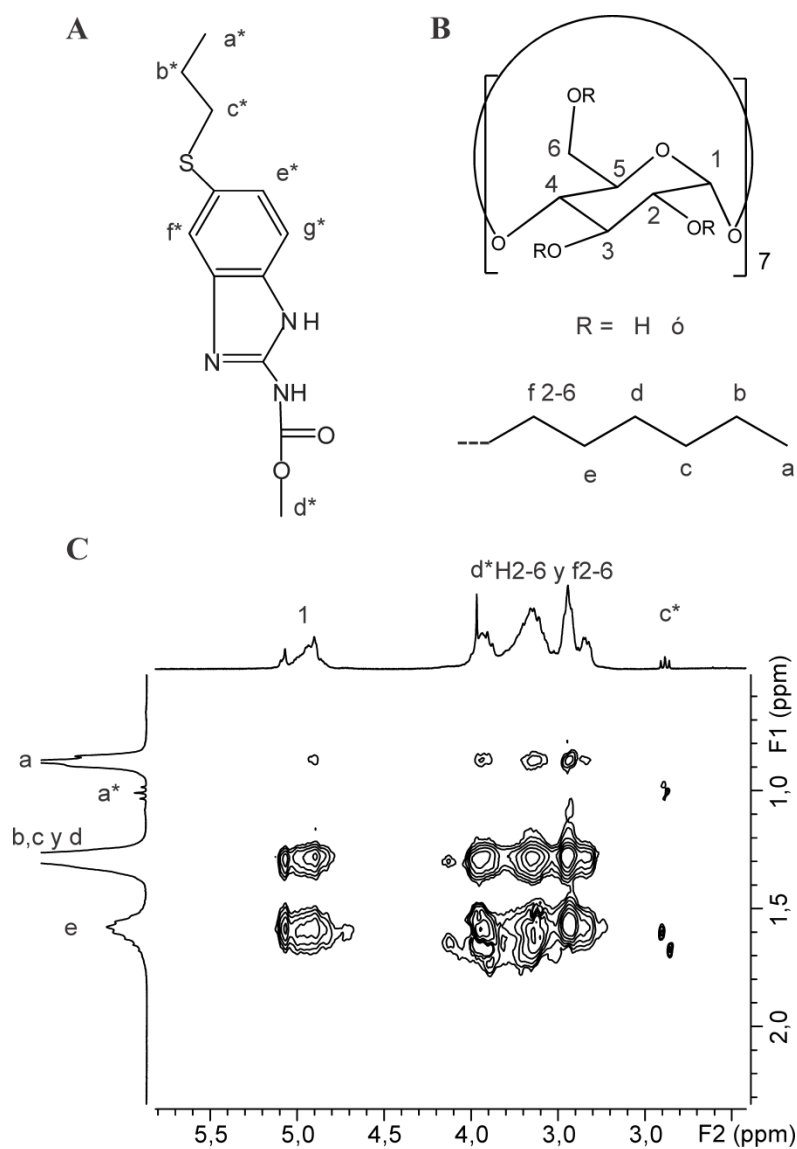
El espectro de ROESY exhibió también, señales de correlación entre los protones del grupo propilo del ABZ (**a**, **b** y **c**) y los protones internos de I- $\beta$ -CD (**H3** y **H5**).



**Figura 77.** Estructura y etiquetado del ABZ (A), estructura y etiquetado de la I- $\beta$ -CD (B), espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de I- $\beta$ -CD en DCI 0,1 M (C y D).

#### 4.3.2.5 Caracterización estructural del sistema albendazol:hexil-β-ciclodextrina

Se estudió la posible interacción entre el ABZ y H-β-CD en un medio de baja polaridad, mediante la realización de espectros de ROESY en CDCl<sub>3</sub>. En la Figura 78 A y B se presentan las asignaciones de las señales de los espectros de <sup>1</sup>H de RMN.



**Figura 78.** Estructura y etiquetado del ABZ (A). Estructura y etiquetado de H-β-CD (B). Espectro ROESY parcial de ABZ en presencia de H-β-CD en CDCl<sub>3</sub> (C).

El espectro de ROESY parcial puede observarse en la Figura 78 C, en donde se evidenciaron señales de correlación entre los protones **c\*** del ABZ con los protones **e** de la cola hidrocarbonada de H- $\beta$ -CD. Sin embargo, no se observaron correlaciones entre los protones del ABZ y los del anillo de la CD. Podríamos postular entonces, que en el medio seleccionado para realizar el estudio el ABZ no se introduciría en la cavidad de la H- $\beta$ -CD e interaccionaría preferentemente con el solvente o bien con las regiones de la cadena hidrocarbonada próximas al anillo de la CD mencionada.

Por otro lado, pueden observarse señales de correlación entre los protones del anillo de la CD y los protones **a**, **b**, **c**, **d** y **e** de la cola hidrocarbonada de H- $\beta$ -CD. Estos resultados indicarían la cercanía de los protones de la cadena hidrocarbonada con los de la  $\beta$ -CD en el medio en estudio. Teniendo en cuenta que la intensidad de las señales de correlación es proporcional a la distancia entre los núcleos, puede observarse que los protones **a** son los que se encuentran más alejados a los protones del hidrato de carbono, mientras que los protones **e** son los más próximos.

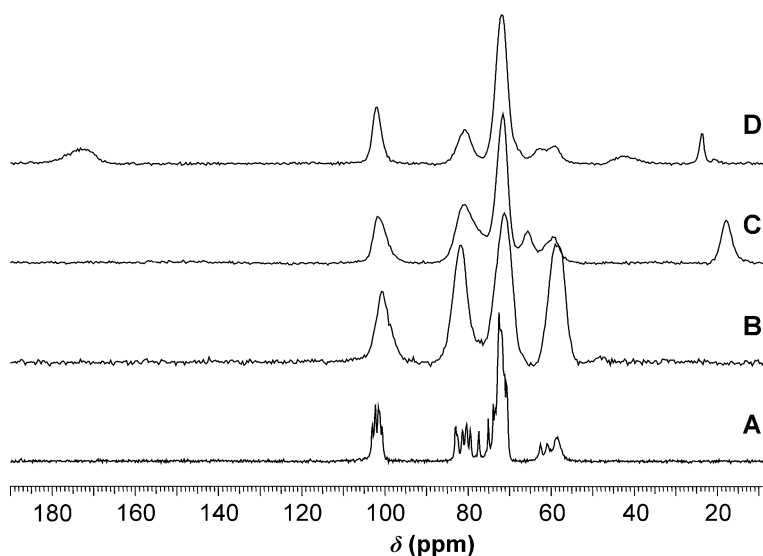
#### **4.3.2.6 Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido**

La RMN de estado sólido es una técnica no destructiva, que permite estudiar las conformaciones y las interacciones químicas en estado sólido. En solución las moléculas se mueven rápidamente, y las rotaciones alrededor de los enlaces simples es rápida, de modo que núcleos que son equivalentes en espectros realizados en solución, en espectros adquiridos en estado sólido pueden no serlo.<sup>190</sup> En un sólido los movimientos rotacionales de las moléculas se encuentran restringidos. Asimismo en los sólidos que se encuentran en forma de polvo, cada cristal tiene su propia orientación angular y como resultado se obtienen señales anchas. Con el objeto de mejorar la resolución se aplica la técnica MAS. La CP es una técnica que permite incrementar la sensibilidad para núcleos de baja abundancia isotópica como el  $^{13}\text{C}$ , a través de la transferencia de magnetización desde el  $^1\text{H}$  (que presenta alta abundancia isotópica).

Se realizaron estudios de RMN de sólidos a los sistemas formados por ABZ y CDs obtenidos mediante SA, con la finalidad de obtener evidencia de la potencial

formación de complejos de inclusión en estado sólido, utilizando esta técnica no destructiva.

La Figura 79 presenta los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD. Las señales de resonancia observadas en los espectros de la  $\beta$ -CD fueron más estrechas que en las demás CDs, esta observación fue consistente con el alto orden de corto alcance en la  $\beta$ -CD.



**Figura 79.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para  $\beta$ -CD (A), M- $\beta$ -CD (B), HP- $\beta$ -CD (C) y C- $\beta$ -CD (D).

Los espectros obtenidos para la  $\beta$ -CD fueron comparables a espectros reportados en la bibliografía.<sup>191</sup> En los mismos, puede observarse más de una señal para cada carbono de la  $\beta$ -CD, debido a los ángulos de torsión relacionados con diversas orientaciones de grupos hidroxilo y a la variedad de ángulos de torsión de los enlaces glucosídicos entre los C1 y C4.<sup>192</sup> Los espectros registrados a partir de M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD, mostraron señales anchas reflejando el estado amorfo de estos compuestos. En la Tabla XIX se presentan los desplazamientos químicos observados en los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD.

La Figura 80 muestra los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS del ABZ registrados a diferentes tiempos de contacto. En la Tabla XX se presentan los desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS del ABZ. En una primera aproximación, puede advertirse que el espectro del ABZ corresponde a un compuesto cristalino con más de una molécula en la celda unidad, ya que pudo asignarse más de una señal a un mismo tipo de carbono. Por ejemplo, se identificaron tres señales de resonancia correspondientes al C12 (Figura 81 A).

**Tabla XIX.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para para  $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y C- $\beta$ -CD.

CD	Carbono				Sustituyente
	1	2,3,5	4	6	
$\beta$ -CD	103,7-101,5 (102,64) <sup>a</sup>	76,1-71,7 (72,17) <sup>a</sup>	82,3-78,3 (81,6) <sup>a</sup>	63,6-59,4 (60,77) <sup>a</sup>	-
M- $\beta$ -CD	101,8	71,9	83,0	59,4	-CH <sub>3</sub> : 59,4
HP- $\beta$ -CD	102,9	72,9	81,8	63,9 <sup>b</sup> ; 60,3 <sup>b</sup>	-OCH <sub>2</sub> C(OH)CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> : ~72 C: 66,9 CH <sub>3</sub> : 19,3
C- $\beta$ -CD	102,9	72,9	81,9	62	-CO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> H) <sub>2</sub> OH CO: 168-183 <sup>c</sup> C: 64,1, CH <sub>2</sub> : 44,2 <sup>c</sup>

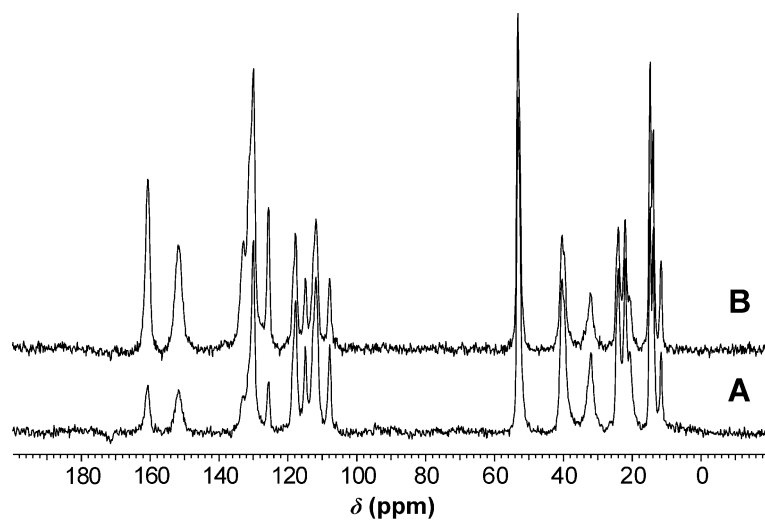
<sup>a</sup> Reportado por Wullf y colaboradores, 2002

<sup>b</sup> Superpuestos

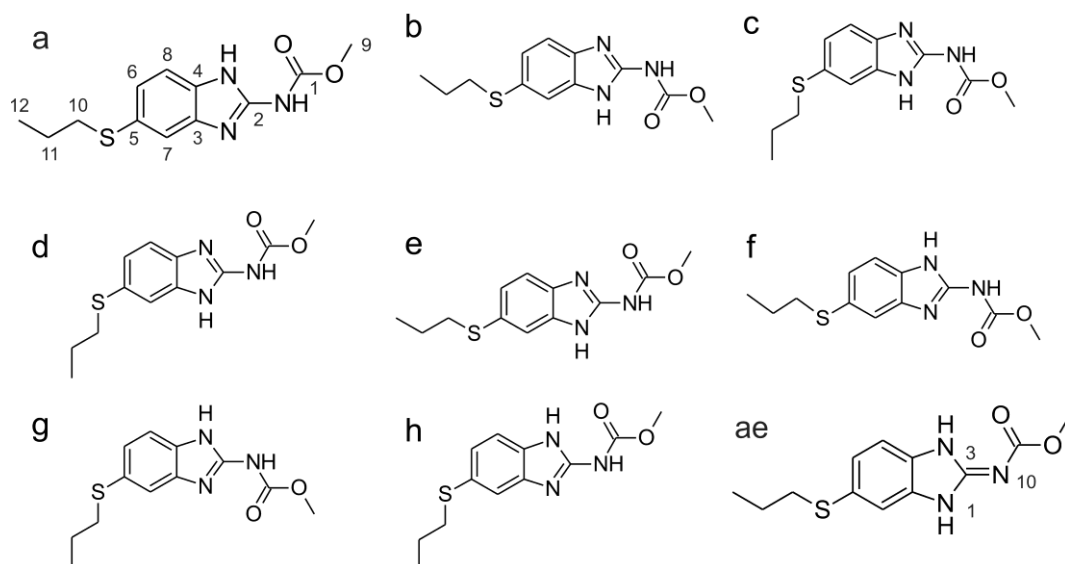
<sup>c</sup> señales anchas

La influencia de la duración de la transferencia de magnetización de los  $^1\text{H}$  a los  $^{13}\text{C}$  (CP), en las intensidades de las señales de  $^{13}\text{C}$ , fue evaluada para facilitar la asignación completa del espectro. La comparación de las intensidades de los espectros puede observarse en la Figura 80 A y B, en donde se puede apreciar que las señales más afectadas por el acortamiento del tiempo en la CP de 3 ms a 100  $\mu\text{s}$ , fueron las de C1, C2, C3, C4, C5 y C6. Estos resultados son esperables para carbonos cuaternarios, pero no para el C6 ya que el H directamente unido al C favorece fuertemente la CP. Los datos cristalográficos del ABZ permitirían explicar este resultado. Como se mencionó en la sección 1.3.1.1, la Forma I es la forma comercializada del ABZ y por lo tanto fue

la empleada en este trabajo, pero la única forma descrita en la bibliografía es la Forma II. El tautómero que mejor explicaría esta última forma polimórfica es el **ae** (Figura 81).



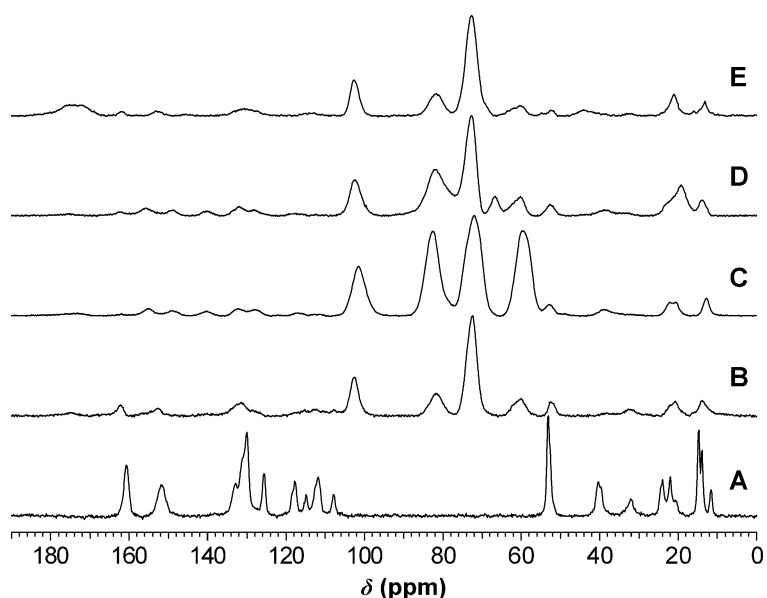
**Figura 80.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para el ABZ a diferentes tiempos de contacto: 100 ms (A) y 3 ms (B).



**Figura 81.** Algunas conformaciones posibles de los grupos unidos al anillo benzimidazólico del ABZ. Las siguientes estructuras representan pares de tautómeros: **a** y **e**, **b** y **f**, **c** y **g**, **d** y **h**. La estructura **ae** es otro tautómero del par **a** y **e**.

Los datos de los espectros de RMN en estado sólido, sugieren que el grupo propilo, se puede presentar en dos posiciones diferentes en la Forma I. Los datos obtenidos en este análisis, indican también orden a corta distancia. No se ha podido determinar con certeza si la Forma I, se puede describir mejor mediante el tautómero **ae**, o si se trata de una mezcla de los tautómeros **a**, **e** y **ae**.

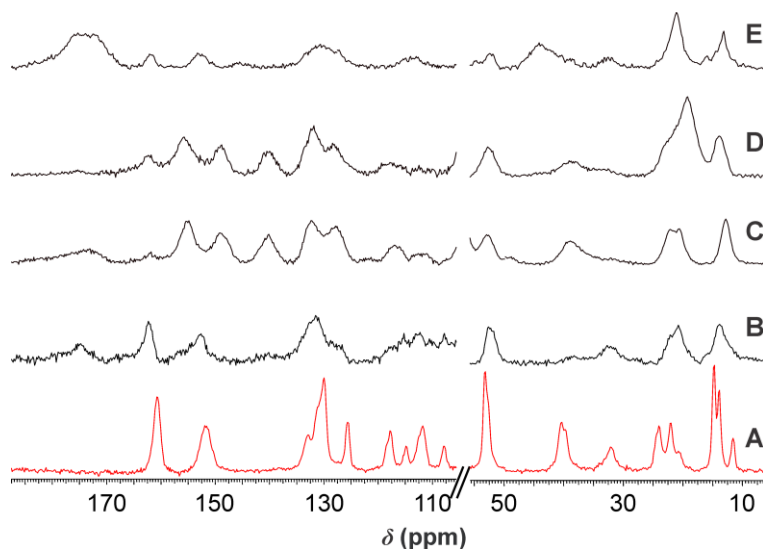
En la Figura 82 pueden observarse los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para los complejos: ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD, ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD. Como se señaló anteriormente los espectros del ABZ sin transportador presentan señales estrechas características de compuestos cristalinos.



**Figura 82.** Espectros Completos de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenidos para ABZ: $\beta$ -CD (A), ABZ:M- $\beta$ -CD (B), ABZ:HP- $\beta$ -CD (C) y ABZ:C- $\beta$ -CD (D) (tiempo de contacto: 3ms).

Contrariamente, en los espectros de  $^{13}\text{C}$  obtenidos para cada complejo ABZ:CD las señales correspondientes al ABZ se presentaron ensanchadas, siendo esto característico de los compuestos amorfos. En lo que concierne a la  $\beta$ -CD, se observó una pérdida de la resolución espectral en los espectros de  $^{13}\text{C}$  realizados para el complejo ABZ: $\beta$ -CD. Estos resultados, fueron consistentes con los obtenidos en los análisis por DRX y CDB que mostraron que los sistemas ABZ:CDs se encontrarían en

estado amorfo, explicando parcialmente la eficacia que presentó la técnica de SA para producir sólidos que exhibieron mayores ED que el ABZ sin transportador.



**Figura 83.** Región seleccionada con escala vertical expandida de los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtenido para ABZ: $\beta$ -CD (A), ABZ:M- $\beta$ -CD (B), ABZ:HP- $\beta$ -CD (C) y ABZ:C- $\beta$ -CD (D) (tiempo de contacto: 3ms).

En los espectros de todos los sistemas ABZ:CDs estudiados, las señales de los C3, C4, C5 y C6 del ABZ, colapsaron en dos señales anchas (con diferentes intensidades), excepto en el espectro del sistema ABZ:C- $\beta$ -CD, en cuyo caso sólo se observó una señal ancha. Se pudo observar un hecho similar para las resonancias en el rango de 107 a 118 ppm, correspondientes a C7 y C8 en los espectros de todos los sistemas ABZ:CDs, pero en el caso del sistema ABZ: $\beta$ -CD las señales se resolvieron parcialmente. En base a la similitud de las señales de  $^{13}\text{C}$  del ABZ registradas en el rango de 135 a 158 ppm, los sistemas ABZ:CDs podrían dividirse en dos grupos: (1) ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, (2) ABZ: $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD. Esta asociación es más evidente a partir de los datos obtenidos de los espectros de  $^{15}\text{N}$  (Figura 84, Tabla XXI), debido a que en los mismos los sistemas ABZ: $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD presentan una señal a alrededor de 133 ppm (más intensa en el espectro de ABZ:C- $\beta$ -CD). Estas resonancias pueden ser

atribuídas a los NH del grupo carbamato involucrados en enlaces de hidrógeno, estas señales no se observaron en los espectros de ABZ:M- $\beta$ -CD o de ABZ:HP- $\beta$ -CD.

Los complejos ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, mostraron señales similares en lo que respecta al ABZ con algunas diferencias en las intensidades relativas y un desplazamiento hacia campos más altos de la resonancia del C12 para el sistema ABZ:M- $\beta$ -CD. Adicionalmente, en los espectros de estos sistemas dos señales pueden ser asignadas al C2 (a alrededor de 155 y 149 ppm), siendo esto consistente con moléculas de ABZ que presentan diferente entorno electrónico en el C2. Tales diferencias en los desplazamientos químicos no pueden ser explicadas por la presencia de diferentes conformeros y se encontrarían asociadas con diferentes tautómeros, ya que este carbono se encuentra directamente unido a tres nitrógenos (Figura 81). Por lo tanto, no puede descartarse la presencia de dos tautómeros. Esto es corroborado, mediante la aparición de una nueva señal a 103,44 ppm en los espectros de  $^{15}\text{N}$  del complejo ABZ:M- $\beta$ -CD (Figura 84), que podría ser asignada al N10 en el tautómero **ae** que puede observarse en la Figura 81 (la relación señal/ruido en espectro del sistema ABZ:HP- $\beta$ -CD impidió la identificación de señales en el mismo rango de frecuencias). Al comparar los espectros de  $^{13}\text{C}$  del ABZ sin transportador con los de estos dos sistemas, se aprecian diferencias importantes en la región aromática y el C1, que aparece a 162 ppm, es decir exhibió un corrimiento de 1 ppm a campos magnéticos más bajos. Por tanto, sería posible que en estos sistemas el carbamato presentara una interacción de puente hidrógeno con un OH, posiblemente con un OH de la CD. Estos resultados no permiten concluir inequívocamente sobre la presencia de complejos de inclusión, ya que estos datos de RMN pueden ser asignados a complejos ABZ:CDs con diferentes reordenamientos: (a) el ABZ dentro de la cavidad de la CD, teniendo en cuenta la diversidad de posibles conformaciones (algunas se muestran en la Figura 81), (b) el ABZ fuera de la cavidad con varias orientaciones probables respecto de la estructura toroidal, por ejemplo con los grupos carbonilo unidos por enlaces de hidrógeno a hidroxilos de la CD.

Como ya se mencionó, los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de la  $\beta$ -CD presentan señales resueltas, como es esperable para un compuesto cristalino (Figura 79). Las resonancias

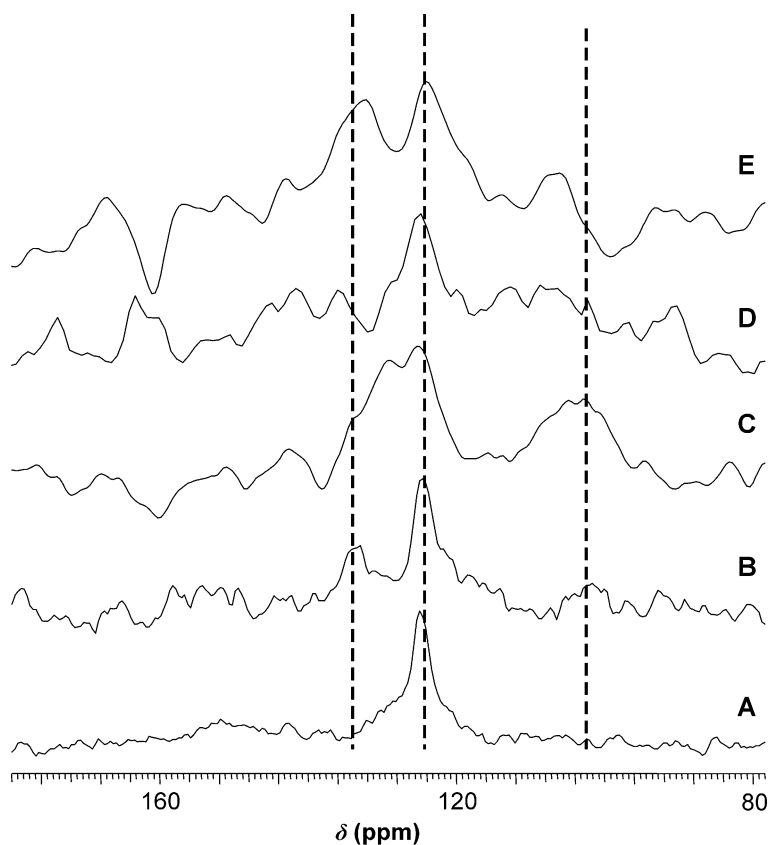
correspondientes al sistema ABZ:β-CD obtenido mediante SA, fueron señales anchas y poco definidas, lo que indicaría la pérdida de la naturaleza cristalina de la β-CD.

**Tabla XX.** Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C CP/MAS obtenidos para ABZ:β-CD, ABZ:M-β-CD, ABZ:HP-β-CD y ABZ:C-β-CD.

Carbono	δ <sup>13</sup> C (ppm)				
	ABZ	ABZ:β-CD	ABZ:M-β-CD	ABZ:HP-β-CD	ABZ:C-β-CD
1	160,81	174,99; 162,54	173,4; 162,0 (débil)	175,3; 162,5	162,19
2	151,82	156,14; 153,02	155,10; 149,05; 140,22	155,96; 149,05; 140,22	153,02; 150,8; 145,76 (débil)
3	132,96	131,75	132,44	132,09	131,4
4	131,23				
5	130,02	128,81	127,94	128,29	128,5
6	125,69				
7	117,74; 111,86	117,2 a 107,8	116,87	117,9	117 a 111
8	114,97; 107,88		111,85	-	
9	53,21; 52,87	52,18	52,87; 49,06	52,70	52,52
10	40,59; 39,90	38,51	39,03	38,68	38,51
11	32,11; 24,50; 24,15; 22,08; 20,87	32,46; 22,25; 20,87	22,25; 21,56; 20,69	33,32; 22,25	32,46; 21,04
12	14,81; 13,95; 11,70	13,95	12,91	13,95	13,26

También se presentaron cambios significativos en las señales correspondientes a la β-CD. No se observaron las señales a 78,30 y 76,05 ppm, y las resonancias a 82,3 ppm y 63,6 ppm mostraron una disminución de la intensidad. Las siguientes diferencias se hallaron cuando se comparó el espectros de <sup>13</sup>C del sistema ABZ:β-CD con el

espectro ABZ: (a) ausencia de las señales en 125,69; 53,21 y 25,15 ppm, (b) ensanchamiento de las señales a 52,18; 38,51 y 13,95 ppm, (c) desplazamiento de la señal del C1 a campos más bajos (de 160,81 a 162,54 ppm).



**Figura 84.** Espectros de  $^{15}\text{N}$  CP/MAS obtenidos para ABZ (A), ABZ: $\beta$ -CD (B), ABZ:M- $\beta$ -CD (C), ABZ:HP- $\beta$ -CD (D) y ABZ:C- $\beta$ -CD (E).

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de los sistemas ABZ: $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD, mostraron características similares, como los desplazamientos químicos correspondientes a C1 y C2 del ABZ. Sin embargo, se hallaron las siguientes diferencias entre ambos espectros: (a) dos señales asimétricas anchas (superpuestas) en la región de 120 a 130 ppm en el espectro de ABZ: $\beta$ -CD y una sola señal ancha en la misma región del espectro de ABZ:C- $\beta$ -CD; y (b) las señales a  $\delta$  117,74; 114,97; 111,86 y 107,88 ppm observadas en el espectro del ABZ sin transportador, se observaron como

una única señal ancha en el espectro de ABZ:C- $\beta$ -CD pero permanecieron parcialmente resueltas en el espectro de ABZ: $\beta$ -CD espectro (como ya se ha señalado).

De este modo, la mejora en la solubilidad del ABZ incluido en el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD, se explicaría por la presencia de una especie altamente estable, que aunque también fue identificada en el sistema ABZ: $\beta$ -CD, no sería la única especie presente en este sistema. En cuanto a los sistemas ABZ:M- $\beta$ -CD y ABZ:HP- $\beta$ -CD, las diferencias en los desplazamientos químicos que se encontraron entre los compuestos aislados y los sistemas sugieren algún tipo de interacción, pero más débiles que en el sistema ABZ:C- $\beta$ -CD.

**Tabla XXI.** Desplazamientos químicos de  $^{15}\text{N}$  CP/MAS obtenidos para ABZ: $\beta$ -CD, ABZ:M- $\beta$ -CD, ABZ:HP- $\beta$ -CD y ABZ:C- $\beta$ -CD.

Grupo	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)				
	ABZ	ABZ: $\beta$ -CD	ABZ:M- $\beta$ -CD	ABZ:HP- $\beta$ -CD	ABZ:C- $\beta$ -CD
Imidazol	150,00				
Carbamato	125,10	133,94; 124,71	129,50; 125,10; 103,44	125,50	133,14; 124,31

## 4.4 Ensayos biológicos

### 4.4.1 Estudios de biodisponibilidad

Se evaluó la biodisponibilidad del ABZ cargado en las micropartículas poliméricas formuladas en la sección 4.1.2. El ABZ se detectó en plasma debido al rápido metabolismo hepático (efecto de primer paso). Los datos farmacocinéticos se presentan en la Tabla XXII, donde se observa la concentración del metabolito activo del ABZ, el ABZSO, en función del tiempo. Este metabolito fue detectado en plasma durante 24 h. El ABZ cargado en las partículas obtenidas en las condiciones óptimas presentó una  $ABC_{0-\infty}$  al menos 10 veces mayor que la obtenida con el IFA sin tratamiento. Por otro lado la concentración plasmática máxima ( $C_{\max}$ ) observada para el

ABZ cargado en las micropartículas fue de 1274 ng/mL, contrastando con los 179 ng/mL obtenidos para el ABZ sin transportador. Estos resultados, se encuentran en concordancia con las diferencias halladas en los perfiles de disolución obtenidos para ambas formulaciones (Figura 26), mostrando la relevancia de velocidad de disolución del ABZ en los fluidos gastrointestinales para conseguir una adecuada absorción y consecuentemente incrementar la biodisponibilidad del IFA.

**Tabla XXII.** Parámetros farmacocinéticos para el ABZSO después de la administración oral de ABZ (fármaco original) y las micropartículas cargadas con ABZ.

	$ABC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	$K_e$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$T_{\text{max}}$ (h)
ABZ	$106,16 \pm 24$	$0,57 \pm 0,09$	$1,2 \pm 0,4$	$1,95 \pm 0,2$
Micropartículas cargadas con ABZ	$1011,21 \pm 25$	$0,25 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,1$

#### 4.4.2 Ensayos de actividad antiparasitaria en un modelo murino infectado por *Trichinella spiralis*

##### 4.4.2.1 Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase aguda de la infección

Se considera fase aguda de la infección al estadio previo al encapsulamiento de las larvas en el tejido muscular, este proceso ocurre durante los primeros 15 días de la infección.

A partir del análisis de los resultados obtenidos se pudo concluir que la CPR promedio de los Grupos I, II y III fue significativamente menor que la CPR que presentó el Grupo IV (Tabla XXIII), esto puede apreciarse en los elevados porcentajes de reducción de CPR que presentaron los tres grupos (Tabla XXIV).

**Tabla XXIII.** Promedio del número de larvas de *T. spiralis* observadas en lengua.

Grupo	CPr	Desvío Estándar
I (ABZ)	580	298
II (Sistema Óptimo)	406	58
III (Sistema ABZ:M-β-CD 1:1 SA)	435	140
IV (Control de infección)	2853	1240

Si bien se observó que el “Sistema Óptimo” y el complejo ABZ: M-β-CD (1:1) tendieron a reducir en mayor medida la CPr respecto al ABZ puro, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la CPr de los ratones tratados con el IFA sin transportador (Grupo I) y la CPr de los ratones tratados con las formulaciones realizadas (Grupos II y III). Por otro lado pudo observarse que los desvíos estándares de la CPr de los animales dentro un mismo grupo, fue menor en el caso de los tratados con los sistemas formulados respecto de los tratados con ABZ y los controles positivos de infección.

De lo anteriormente expuesto puede concluirse que los sistemas formulados presentan una menor variabilidad en la actividad antiparasitaria que el ABZ puro.

**Tabla XXIV.** Porcentajes de reducción de la CPr.

Grupo	Porcentaje de reducción de CPr	Desvío Estándar
I (ABZ)	79,7	10,5
II (Sistema Óptimo)	85,8	2
III (Sistema ABZ:M-β-CD 1:1 SA)	84,8	4,9

#### **4.4.2.2 Evaluación de la actividad antiparasitaria en la fase parenteral de la infección por *Trichinella spirallis* y su dependencia con la dosis de albendazol administrada**

La Tabla XXV muestra la actividad antiparasitaria del ABZ y del complejo ABZ:C- $\beta$ -CD, contra las larvas encapsuladas. La CPr total se redujo significativamente en los animales tratados con respecto a los controles ( $p = 0,0057$ ). Esta reducción de la CP se observó tanto en los ratones tratados con ABZ como con ABZ:C- $\beta$ -CD, independientemente de la dosis administrada. Asimismo, en los animales tratados con 50 mg de ABZ la reducción de la CPr, aunque no presentó diferencia estadísticamente significativa, fue mayor en el grupo que recibió ABZ:C- $\beta$ -CD, 68% contra el 35% alcanzado para los ratones tratados con ABZ sin transportador. Además de la disminución observada en CPr total, el tratamiento también indujo una pérdida de viabilidad en las larvas evaluada mediante la tinción vital (Figura 85, Tabla XXV). De este modo, cuando se consideraron el número de larvas recuperadas y sin viabilidad, el tratamiento con el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD, administrando 30 mg de ABZ, produjo una reducción del 88% en la carga muscular en comparación con el 69% obtenido con ABZ.

Cabe destacar que si bien no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD y con ABZ sin transportador en el porcentaje de larvas muertas, la diferencia en dicho porcentaje sí es significativa en entre los animales tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD y los controles, mientras que, en los tratados con ABZ sin transportador, esta diferencia no tiene significado estadístico. Por otro lado, no hubo diferencias en el porcentaje de larvas muertas ni en el porcentaje de reducción de la CPr, entre los grupos tratados con 30 mg y con 50 mg de ABZ incluidos en el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD.

Por lo tanto, los resultados que se discutieron anteriormente, indican que la administración de altas dosis de ABZ para mejorar su absorción oral, no provocan una mejora en la eficacia antiparasitaria de este IFA, en particular contra las larvas enquistadas, y presentarían la desventaja de acentuar sus efectos secundarios típicos.

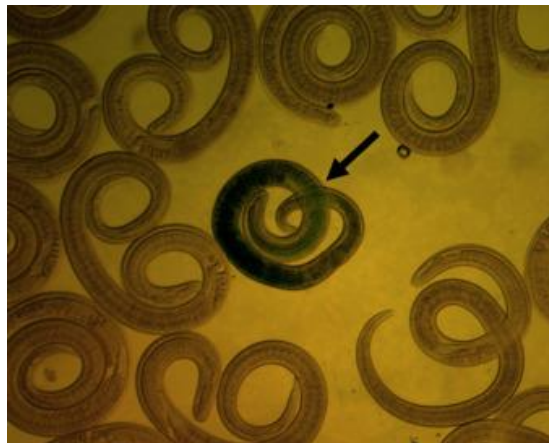
**Tabla XXV.** Efecto de la dosis de ABZ y ABZ:C- $\beta$ -CD en la CPr en ratones CBI infectados con *T. spiralis*.

Tratamiento	Dosis de ABZ (mg/kg peso corporal)	CPr'		Eficacia antiparasitaria#	
		Total	Larvas muertas	Porcentaje de reducción de CPr	Porcentaje de larvas muertas
ABZ	50	795 $\pm$ 145,7 <sup>a</sup>	464 $\pm$ 103,7 <sup>a</sup>	35 (0-70) <sup>a</sup>	57 (35-95) <sup>a,b</sup>
	30	634 $\pm$ 103,5 <sup>a</sup>	381 $\pm$ 48,8 <sup>a</sup>	52 (17-72) <sup>a</sup>	69 (39-84) <sup>a,b</sup>
ABZ:C- $\beta$ -CD	50	511 $\pm$ 109,7 <sup>a</sup>	333 $\pm$ 83,6 <sup>a,b</sup>	68 (29-82) <sup>a</sup>	72 (31-100) <sup>b</sup>
	30	766 $\pm$ 154,2 <sup>a</sup>	552 $\pm$ 46,5 <sup>a</sup>	51 (0-66) <sup>a</sup>	88 (54-100) <sup>b</sup>
Control	---	1226 $\pm$ 98,6 <sup>b</sup>	132 $\pm$ 25,9 <sup>b</sup>	---	11 (5-21) <sup>a</sup>

' Promedio  $\pm$  Error Estándar

#Mediana (rango)

Las diferencias entre grupos fueron evaluadas por ANOVA de una variable, empleando el post-test de Bonferroni para la comparación entre grupos (CPr), o mediante la prueba no paramétrica Kruskal–Wallis, y el test de Dunn para la comparación entre grupos (Porcentaje de reducción de la CPr y Porcentaje de larvas muertas). Para cada variable, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias significativas con un nivel del 0,05.

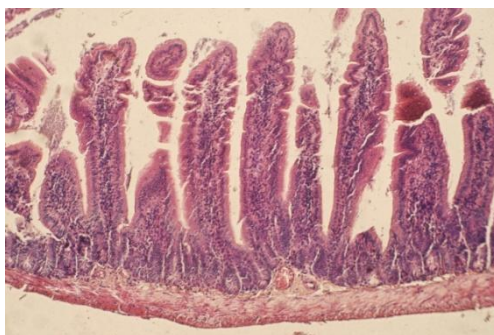


**Figura 85.** Microfotografía donde se observa una larva de *T. spiralis* L1 muerta teñida con azul de metileno (señalada), rodeada de larvas viables (Aumento 40X).

#### 4.4.3 Evaluación histológica de la irritación del tracto gastrointestinal

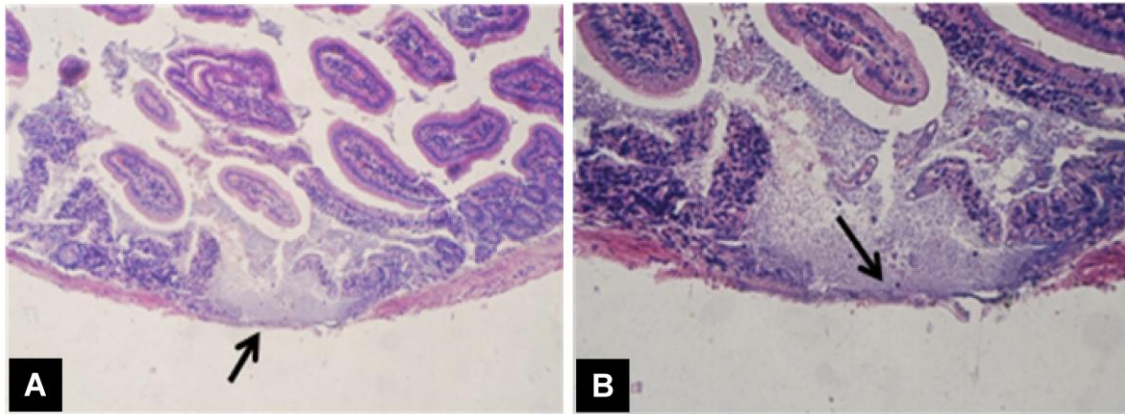
Se analizó el efecto del tratamiento por vía oral con ABZ o complejo ABZ:C- $\beta$ -CD sobre la morfología del tracto gastrointestinal de ratones machos CBI infectados con *Trichinella spiralis*. El estudio histológico se realizó en la fase parenteral (30 días post-infección) de la infección.

No se observaron lesiones en el intestino delgado (Figura 86) en los ratones control, infectados con *T. spiralis*, que no recibieron tratamiento alguno. Hubo cambios comunes, dentro de los márgenes habituales de variabilidad, sin significado patológico, tales como variación leve del tamaño de las vellosidades intestinales y cantidades variables de células linfoides.



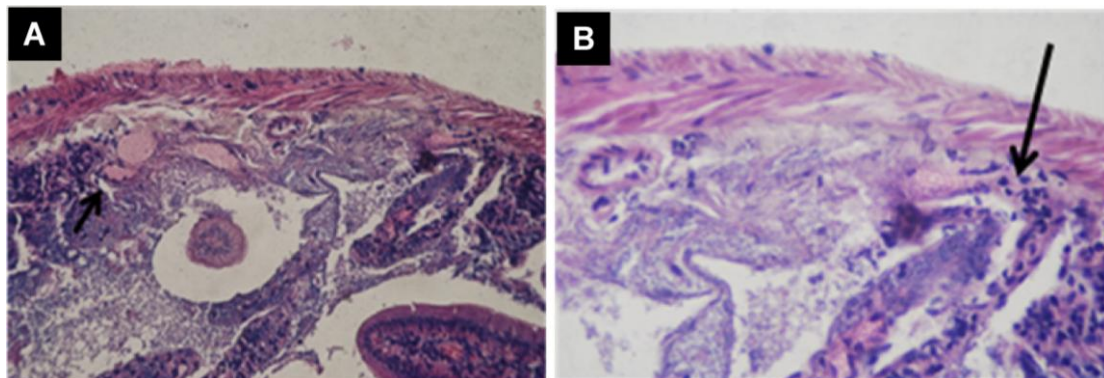
**Figura 86.** Microfotografía de un corte transversal de duodeno murino de un animal control, sin alteraciones morfológicas (10X aumentos).

Los animales tratados con ABZ sin transportador presentaron alteraciones de la estructura normal de la mucosa duodenal. La Figura 87 muestra pérdida total de la capa muscular, acompañada de necrosis. También se observó vasodilatación y, en parte de la capa mucosa, se visualizaron importantes infiltrados inflamatorios mononucleares (Figura 88).



**Figura 87.** Microfotografía de un corte de duodeno en un animal tratado con ABZ que exhibe pérdida total de la capa muscular y necrosis. A: 10X aumentos; B: 20X aumentos.

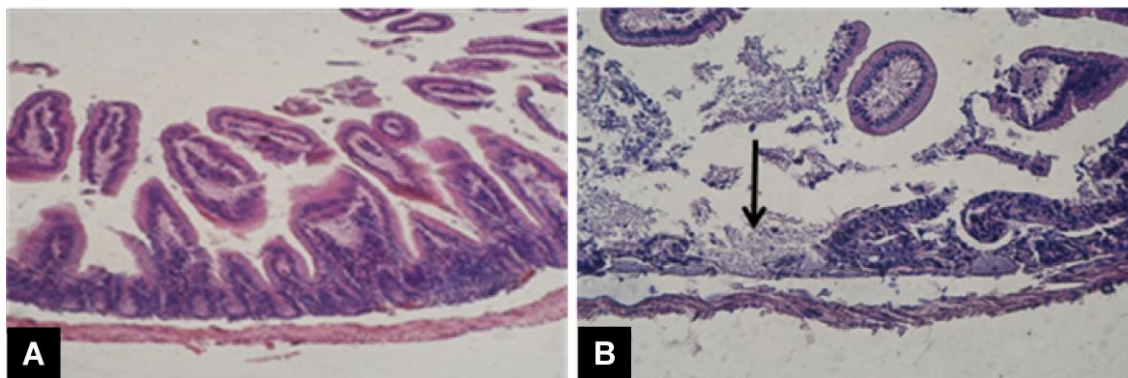
En la Figura 88 A y B, se observa también alteración de la mucosa pero en este caso la capa muscular sólo se ve comprometida superficialmente. En la Figura 88 A, se evidencia vasodilatación y en la Figura 88 B, una elevada cantidad de infiltrados inflamatorios, observándose también un proceso de necrosis.



**Figura 88.** Microfotografía de un corte de duodeno en un animal tratado con ABZ que muestra vasodilatación (A: 20X aumentos) e infiltrado inflamatorio mononuclear (B: 40X aumentos).

Estas alteraciones en la histología duodenal se presentaron en el 60 % de los animales tratados con ABZ sin transportador.

Por otro lado, los animales tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD presentaron una estructura conservada de la mucosa duodenal (Figura 89 A), comparable con los resultados obtenidos para los ratones control.



**Figura 89.** Microfotografía de cortes de duodeno de ratones tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD. A: mucosa con estructura conservada (10X aumentos); B: mucosa con lesión leve (20X aumentos).

Sin embargo, se observaron algunas lesiones leves de la capa muscular duodenal en el 50% de los animales tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD. En la Figura 89 B se muestra una lesión mínima focal con necrosis parcial de la mucosa (de menor intensidad que la de la Figura 87). Exceptuando hallazgos aislados como éste, la mucosa de los animales tratados con ABZ:C- $\beta$ -CD presentó características normales.

En el análisis histológico del esófago y estómago no se hallaron diferencias significativas entre los animales tratados con ABZ sin transportador y ABZ:C- $\beta$ -CD en relación al grupo control.

Las lesiones causadas por el ABZ sobre la mucosa duodenal de los animales tratados con el fármaco sin transportador podrían deberse a las altas concentraciones locales del IFA sobre la mucosa, por el depósito de partículas de ABZ sobre el epitelio. Esto sucedería porque el ABZ presenta un elevado ángulo de contacto (ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido), por lo que la ubicación de las partículas de este IFA en el seno de la solución representaría un estado de alta energía libre. Por esta razón, el desplazamiento de las partículas de ABZ hacia la

interfase líquido-aire y la interfase formada entre la solución y la mucosa sería un proceso espontáneo. Contrariamente, en los animales tratados con el complejo ABZ:C- $\beta$ -CD, el ABZ se encontraría en solución en los fluidos gastrointestinales, evitando de esta forma la concentración del IFA sobre la mucosa. Asimismo, se encuentra ampliamente reportado que las CDs pueden disminuir la irritación causada por los IFAs administrados por vía oral, e incluso reducir su toxicidad al permitir que los mismos sean efectivos a dosis menores.<sup>78</sup>

## 5.CONCLUSIONES

El proceso de secado por aspersión permitió formular un sistema transportador formado por un complejo polielectrolítico microparticulado que permitió incrementar significativamente la eficiencia de disolución y la solubilidad aparente del albendazol incluido en el mismo, presentándose el fármaco en estado amorfo. El tamaño de las partículas obtenidas fue del orden de 1-10  $\mu\text{m}$ .

El empleo de diseños experimentales en la formulación de los sistemas poliméricos ternarios, facilitó el manejo de la información y el análisis estadístico. En la fase inicial, se pudieron determinar cuáles de los factores estudiados fueron influyentes sobre las respuestas seleccionadas. En la etapa de optimización multirespuesta, se obtuvieron modelos significativos para las mismas. Al realizar la verificación experimental de una de las soluciones predichas por el programa se obtuvieron resultados similares a los esperados.

El sistema polimérico ternario diseñado fue estable en el tiempo en cuanto al título del fármaco por un período de al menos catorce meses. La metodología de elaboración resultó reproducible en cuanto al rendimiento, la eficiencia de encapsulación y la liberación del albendazol a partir de la matriz.

Se lograron sintetizar con éxito tres derivados de  $\beta$ -ciclodextrina que presentaron grupos carboxílicos en su estructura (citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina), mediante reacciones que fueron llevadas a cabo en medio acuoso empleando reactivos atóxicos, de fácil adquisición, económicos y que no son perjudiciales para el medio ambiente.

Los derivados citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina se presentaron como materiales amorfos (verificado en el patrón de difracción de rayos X), en contraste a la  $\beta$ -ciclodextrina que se encontró en estado

crystalino, mejorando de esta forma la solubilidad en agua de los derivados respecto del material de partida.

El compuesto citrato- $\beta$ -ciclodextrina presentó un peso molecular promedio de 1308 g/mol (grado de sustitución=0,2) y un patrón de sustitución aleatorio, siendo las posiciones 2 y 6 de la  $\beta$ -ciclodextrina, las sustituidas de manera preferente.

La succinil- $\beta$ -ciclodextrina presentó un peso molecular promedio de 1415,4 g/mol (grado de sustitución=0,4) y un patrón de sustitución aleatorio, sustituido preferentemente en la posición 6 de la  $\beta$ -ciclodextrina.

La itaconil- $\beta$ -ciclodextrina obtenida presentó un peso molecular promedio de 1299,1 g/mol (grado de sustitución=0,2) y un patrón de sustitución aleatorio, sustituido preferentemente en la posición 6 de la  $\beta$ -ciclodextrina.

La constante de formación que se obtuvo para el sistema albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina fue superior, respecto de las constantes obtenidas para los sistemas formados por el albendazol y las demás  $\beta$ -ciclodextrinas estudiadas.

La formulación de los sistemas albendazol-ciclodextrinas, produjo un incremento considerable en la solubilidad aparente y en la eficiencia de disolución de todos los sistemas formulados respecto del albendazol sin transportador.

Los sistemas albendazol:ciclodextrinas obtenidos mediante secado por aspersión, presentaron una mayor eficiencia de disolución que los mismos sistemas preparados por mezcla física.

El sistema albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina desarrollado mediante secado por aspersión, tuvo una eficiencia de disolución superior a la de los sistemas albendazol: $\beta$ -ciclodextrina obtenidos por mezcla física y secado por aspersión.

Los complejos entre el albendazol y las ciclodextrinas estudiadas se formaron en relación equimolar, según lo observado en los diagramas de solubilidad de fase.

Los valores de solubilidad aparente para los sistemas formulados con albendazol y citrato- $\beta$ -ciclodextrina fueron superiores a los obtenidos para los sistemas formulados con  $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, itaconil- $\beta$ -ciclodextrina y succinil- $\beta$ -ciclodextrina.

Los estudios de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  en estado sólido presentaron evidencia de dos tipos de interacciones químicas diferentes entre el albendazol y las ciclodextrinas empleadas en el presente trabajo. Para los complejos formados con metil- $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, se identificaron tres moléculas de albendazol con diferentes entornos electrónicos en el anillo de imidazol, que corresponden muy probablemente al albendazol libre y a dos tautómeros del albendazol. Por otro lado, cuando se analizaron los complejos con  $\beta$ -ciclodextrina y citrato- $\beta$ -ciclodextrina, se evidenciaron los NH de los grupos carbamato implicados en un enlace puente de hidrógeno, siendo este efecto más pronunciado en el complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina.

El hexil derivado de  $\beta$ -ciclodextrina sintetizado presentó características anfifílicas. Esta propiedad fisicoquímica resultó relevante para las futuras aplicaciones de este compuesto en el diseño de sistemas de transportadores de fármacos.

En cuanto a los ensayos biológicos realizados, el albendazol incluido en las micropartículas formuladas bajo las condiciones óptimas (“Sistema Óptimo”) incrementó notoriamente la biodisponibilidad del metabolito activo del albendazol (albendazol sulfóxido) en un modelo animal en ratas Wistar.

Los sistemas formulados (“Sistema Óptimo” y complejo albendazol:metil- $\beta$ -ciclodextrina) presentaron una menor variabilidad en la respuesta terapéutica que el ingrediente farmacéutico activo sin transportador, contra *Trichinella spiralis* durante la fase aguda de la infección en un modelo murino.

El albendazol incluido en el complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina, mostró una mayor eficacia que el albendazol sin transportador administrado durante las etapas parenterales de larvas de *Trichinella spiralis*. El incremento en la eficacia antiparasitaria

podría deberse a una mejora de la biodisponibilidad del fármaco que resultaría de la mayor solubilidad y velocidad de disolución, que conducen a una mejor absorción.

Los animales tratados con el complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina presentaron una menor irritación y efectos lesivos sobre los tejidos del tracto gastrointestinal que los que tratados con albendazol, siendo que estos últimos presentaron incluso tejidos necróticos. Por lo tanto, el sistema propuesto muestra resultados prometedores para el tratamiento de la etapa parenteral de la infección por *Trichinella spiralis*.

## **6. RESUMEN**

### **6.1 Presentación del problema**

Los IFAs que se administran por vía oral en formas farmacéuticas sólidas, deben disolverse en los fluidos biológicos para poder atravesar las membranas celulares del tracto gastrointestinal, y así acceder al torrente sanguíneo y llegar al sitio de acción para ejercer su actividad farmacológica. De modo que la solubilidad acuosa del IFA afecta de manera directa, su absorción y por ende su actividad terapéutica.

La mayoría de los IFAs que se han descubierto durante la última década han exhibido una escasa solubilidad en agua. Este mismo problema también se presenta, en fármacos que se emplean para el tratamiento de enfermedades para las cuales no existe una investigación activa en la generación de nuevos compuestos. Es por esto que además de la búsqueda de nuevos IFAs, es imprescindible la investigación en el campo de estrategias para mejorar las propiedades biofarmacéuticas de los IFAs poco solubles en agua. Un área muy importante dentro de este campo de investigación, se encuentra representada por el estudio de polímeros y macromoléculas, que actúan como transportadores de IFAs. Adicionalmente, estos materiales pueden modificarse químicamente para otorgarles nuevas propiedades o potenciar las características ya presentes.

### **6.2 Enfoque y planificación del problema**

En este trabajo de Tesis se seleccionó al albendazol como modelo de IFA poco soluble en agua, debido a su relevancia en el tratamiento de las parasitosis endémicas en nuestro país y por estar incluido en el listado de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud. Este IFA es un agente antihelmíntico de amplio espectro, que muchas veces encuentra limitada su actividad terapéutica debido a su absorción errática como consecuencia de su escasa solubilidad. Si bien existen numerosas estrategias tecnológicas que permiten mejorar las propiedades

biofarmacéuticas de los IFAs poco solubles en agua, en este trabajo de Tesis se recurrió en la formulación de micropartículas poliméricas y complejos con ciclodextrinas.

### **6.2.1 Formulación de micropartículas poliméricas**

Para ello, se planificó la formulación de micropartículas de albendazol basadas en complejos polielectrolíticos (compuestos por quitosano, pectina y carboximetilcelulosa sódica), empleando el secado por aspersion como método de obtención. Se proyectó además, la optimización de las condiciones de elaboración de las micropartículas para obtener valores máximos de rendimiento, eficiencia de encapsulación y parámetros de disolución del albendazol, mediante el empleo de diseños experimentales utilizando el programa Design-Expert ®. Adicionalmente, se planteó realizar estudios de estado sólido, morfológicos y de estabilidad sobre las micropartículas formuladas.

### **6.2.2 Formulación de complejos con ciclodextrinas**

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que poseen una cavidad hidrofóbica a la cual deben su habilidad para formar complejos de inclusión con varios compuestos de baja polaridad, aumentando así su solubilidad aparente. Particularmente, la  $\beta$ -ciclodextrina está constituida por siete unidades de glucopiranososa, y es poco soluble en agua debido a su estructura cristalina. La sustitución de los grupos hidroxilos correspondientes a los carbonos 2, 3 y 6 de las unidades de glucopiranososa de la  $\beta$ -ciclodextrina incrementa la solubilidad de la misma, mejorando sus propiedades como sistema transportador de IFAs. Adicionalmente, el sustituyente empleado puede modificar la afinidad de la  $\beta$ -ciclodextrina por la molécula a incluir. De modo que proyectó:

- Introducir grupos funcionales ácidos en la estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina para evaluar si podrían incrementar su afinidad por el albendazol, ya que el mismo presenta características débilmente básicas.
- Estudiar la influencia de los grupos funcionales introducidos en la estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina, en la formación de complejos con

albendazol y comparar los resultados con los obtenidos para ciclodextrinas modificadas mediante eterificación (como la 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina y la metil- $\beta$ -ciclodextrina).

- Evaluar la afinidad del albendazol por las ciclodextrinas estudiadas mediante análisis de solubilidad de fases, espectroscopía de RMN y espectrometría de masas.
- Estudiar la formación del complejos en estado sólido en sistemas albendazol:ciclodextrinas obtenidos empleando las técnicas de mezcla física y secado por aspersion. Finalmente, caracterizar fisicoquímicamente los sistemas mediante estudios de solubilidad aparente, velocidad de disolución, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo.

### **6.2.3 Ensayos biológicos**

Se planificó realizar estudios de biodisponibilidad y de actividad antiparasitaria sobre los sistemas formulados con albendazol que presenten las mejores propiedades físicoquímicas.

## **6.3 Datos significativos y hallazgos más importantes**

### **6.3.1 Formulación de micropartículas poliméricas ternarias mediante secado por aspersion**

El empleo de diseños experimentales nos permitió obtener una gran cantidad de información respecto de los complejos polielectrolíticos estudiados. El programa Design-Expert® predijo (según algoritmos matemáticos a partir de los datos experimentales) como “Sistema Optimo” para obtener los máximos valores de todas las respuestas estudiadas, al obtenido mediante la combinación de una solución de quitosano al 1 % (conteniendo 1 mg/mL de albendazol), pectina al 0,1 % y carboximetilcelulosa sódica 0,2 %.

Al caracterizar el “Sistema Optimo” mediante estudios de difracción de rayos X, se observó la ausencia de los picos de cristalinidad característicos del albendazol, permitiéndonos postular que el mismo se hallaría incluido en el complejo polielectrolítico en estado amorfo. Se realizaron además estudios de calorimetría diferencial de barrido al “Sistema Optimo”, donde no se observó el pico endotérmico de fusión característico del albendazol, aportando evidencia adicional del estado amorfo del IFA incluido en el complejo polielectrolítico.

El estado amorfo del IFA en el complejo polielectrolítico podría explicar los elevados valores de los porcentajes de liberación obtenidos en los estudios de disolución ( $Q_{30}$ = 44 % y  $Q_{60}$ = 68 %), debido a que los materiales amorfos presentan mayores solubilidades que los arreglos cristalinos.<sup>178,193</sup> Contrariamente, el fármaco sin transportador presentó un valor de  $Q_{30}$  de 3,8 % y un valor de  $Q_{60}$  de 6,1 %. Adicionalmente, se analizó la morfología de las partículas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, las mismas presentaron forma esférica, superficie lisa y tamaño uniforme (1-10  $\mu\text{m}$ ) y no se observó formación de cristales en la superficie de las partículas.

La aplicación de diseños experimentales al desarrollo de sistemas terapéuticos resultó una herramienta muy útil permitiendo obtener formulaciones que cumplen con los requisitos buscados de manera rápida y eficaz.

### **6.3.2 $\beta$ -Ciclodextrinas**

#### **Síntesis y caracterización de derivados de $\beta$ -Ciclodextrina**

Durante este trabajo de Tesis se han sintetizado tres ésteres de  $\beta$ -ciclodextrina con ácidos poli-carboxílicos (citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina) mediante métodos de síntesis sustentables. Además, se sintetizó un hexil derivado de  $\beta$ -ciclodextrina, que presentó propiedades anfífilicas, mediante una reacción de eterificación.

Los espectros de RMN que se realizaron permitieron determinar el patrón de sustitución de los derivados de  $\beta$ -ciclodextrina estudiados. En el caso del citrato de  $\beta$ -ciclodextrina se presentaron sustituciones parciales en los hidroxilos 2 y 6 de la unidad de glucopiranososa, mientras que el succinato de  $\beta$ -ciclodextrina y el itaconato de  $\beta$ -ciclodextrina, exhibieron sustituciones parciales sólo en la posición 6 del anillo de glucopiranososa.

Los derivados de  $\beta$ -ciclodextrina sintetizados se presentaron en estado amorfo, esto se verificó en los estudios de difracción de rayos X, donde se observaron bandas anchas congruentes con los materiales amorfos, a diferencia de los picos agudos e intensos, característicos de las estructuras cristalinas, que se presentaron en el difractograma de la  $\beta$ -ciclodextrina. Estos datos, justifican el notorio incremento de la solubilidad acuosa de los derivados obtenidos respecto de la  $\beta$ -ciclodextrina sin sustituir.

#### **Evaluación de la afinidad de $\beta$ -ciclodextrinas por el albendazol**

Se estudió la afinidad de  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina con respecto al albendazol, mediante la realización de diagramas de solubilidad de fase.<sup>74</sup>

A partir de los mismos se observó un comportamiento lineal entre la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina, y la concentración del albendazol. De modo que las isotermas obtenidas fueron de tipo  $A_L$  de acuerdo al modelo propuesto por Higuchi y Connors,<sup>73</sup> indicando que estos complejos se formaron con una estequiometría 1:1. Es necesario destacar, que el valor de la  $K_f$  obtenido para el citrato- $\beta$ -ciclodextrina fue al menos tres veces superior que los obtenidos para las demás ciclodextrinas estudiadas.

#### **Formulación y caracterización de los sistemas albendazol: $\beta$ -ciclodextrinas**

Se elaboraron sistemas albendazol: $\beta$ -ciclodextrinas en una relación equimolar, empleando  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina mediante los métodos de mezcla física y secado por aspersion. Estos sistemas, produjeron un incremento considerable en la eficiencia de disolución del albendazol respecto del mismo sin transportador.

Los sistemas formulados con derivados de  $\beta$ -ciclodextrina facilitaron en mayor medida la solubilización del albendazol en comparación con los formulados con  $\beta$ -ciclodextrina. Es preciso destacar que con el sistema albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina obtenido mediante secado por aspersion, se consiguió una completa disolución (100 %) del fármaco transcurridos 20 min del inicio del ensayo de disolución.

Por otro lado, los estudios de difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido indicarían que los sistemas albendazol:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y albendazol:metil- $\beta$ -ciclodextrina obtenidos por secado por aspersion, se encontraron en estado amorfo y formando complejos de inclusión en estado sólido. Estos resultados concuerdan, con la mayor eficiencia de disolución del albendazol incluido en los sistemas obtenidos mediante secado por aspersion, respecto de aquellos que se obtuvieron por mezcla física.

### **6.3.3 Ensayos biológicos**

El albendazol incluido en el complejo polielectrolítico optimizado, presentó un incremento de diez veces en la biodisponibilidad de su metabolito activo en un modelo animal en ratas Wistar. Este mismo sistema, presentó una menor variabilidad en la respuesta antiparasitaria que el albendazol sin transportador, en el tratamiento durante la fase aguda de la infección por *Triquinella spiralis* en un modelo animal en ratones. Se obtuvieron resultados similares en cuanto a la actividad antiparasitaria para el complejo albendazol:metil- $\beta$ -ciclodextrina, siendo la variabilidad en cuanto a la respuesta terapéutica todavía menor que para el albendazol incluido en las micropartículas poliméricas.

La actividad antiparasitaria del complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina, fue evaluada en animales infectados con *Trichinella spiralis* durante fase crónica de la infección. En este estudio, la muerte larval fue estadísticamente superior en los animales tratados con el complejo respecto de los animales control (72-88 % *versus* 11 %,  $P=0,0032$ ); mientras que los animales tratados con albendazol sin transportador no presentaron diferencias significativas en la muerte larval respecto del grupo control. Se realizaron además estudios de irritación gástrica en el mismo modelo animal, en los cuales el complejo produjo una menor irritación que el albendazol administrado sin transportador, siendo que éste último produjo incluso necrosis sobre la mucosa gastrointestinal.

## 6.4 Conclusiones

El proceso de secado por aspersión permitió formular un sistema transportador formado por un complejo polielectrolítico microparticulado que permitió incrementar significativamente la eficiencia de disolución del albendazol incluido en el mismo, presentándose el fármaco en estado amorfo. Adicionalmente, las micropartículas diseñadas fueron estables en el tiempo en cuanto al título del fármaco por un período de al menos catorce meses. La metodología de elaboración resultó reproducible en cuanto al rendimiento, la eficiencia de encapsulación y la liberación del albendazol a partir de la matriz. Estas micropartículas incrementaron notoriamente la biodisponibilidad del metabolito activo del albendazol (albendazol sulfóxido) en un modelo animal en ratas Wistar.

Se sintetizaron tres derivados de  $\beta$ -ciclodextrina que presentaron grupos carboxílicos en su estructura (citrato- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina e itaconil- $\beta$ -ciclodextrina), mediante reacciones que fueron llevadas a cabo en medio acuoso empleando reactivos atóxicos, de fácil adquisición, económicos y que no son perjudiciales para el medio ambiente.

Los derivados de  $\beta$ -ciclodextrina sintetizados, presentaron una mayor solubilidad acuosa que la  $\beta$ -ciclodextrina, y además una mayor afinidad por el albendazol que esta

última y que los éteres de  $\beta$ -ciclodextrina estudiados (2-hidroxipropil- $\beta$ -CD y la metil- $\beta$ -ciclodextrina). Adicionalmente, todos los sistemas albendazol:ciclodextrinas obtenidos mediante secado por aspersión, presentaron una mayor eficiencia de disolución que los mismos sistemas preparados por mezcla física.

Los complejos albendazol:metil- $\beta$ -ciclodextrina y albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina, presentaron una mayor eficacia en su actividad antiparasitaria que el albendazol sin transportador en un modelo en ratones infectados con *Triquinella spiralis*. Además, es preciso destacar que los animales tratados con el complejo albendazol:citrato- $\beta$ -ciclodextrina presentaron una menor irritación y efectos lesivos sobre los tejidos del tracto gastrointestinal que los tratados con albendazol sin transportador.

## 7.REFERENCIAS

1. Kremers, E. y Sonnedecker, G. (1986), *Kremers and Urdang's History of Pharmacy*. American Institute of the History of Pharmacy.
2. Remington, J. P. y Gennaro, A. R. (1998), *Remington farmacia: 19 edición*. Editorial Médica Panamericana.
3. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003) *Farmacopea Argentina*. 7° ed. Imprenta del Congreso de la Nación, Buenos Aires, Argentina, 41
4. Hak-Kim, C. y Nora, Y. K. C. (2013), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Taylor & Francis, Vol. III, pp. 1646-1655.
5. Aulton, M. E. y Taylor, K. (2013), *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. Churchill Livingstone/Elsevier, pp. 232-252, 309-322.
6. Patrick, J. C. y Luigi, G. M. (2013), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Taylor & Francis, Vol. III, pp. 1609-1621.
7. Trillo, C. F. (1993), *Tratado de farmacia galénica*. Luzán 5, pp. 16-23, 48-75.
8. Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S. y Parker, K. L. (2006), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, pp. 19-20, 1073-1093.
9. Peter, G. W. (2013), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Taylor & Francis, Vol. null, pp. 19-33.

10. Verma, P., Thakur, A., Deshmukh, K., Jha, A. y Verma, S. (2010) Routes of drug administration. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 1, 54-59.
11. Renukuntla, J., Vadlapudi, A. D., Patel, A., Boddu, S. H. S. y Mitra, A. K. (2013) Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, 75-93.
12. Sastry, S. V., Nyshadham, J. R. y Fix, J. A. (2000) Recent technological advances in oral drug delivery – a review. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3, 138-145.
13. van Hoogdalem, E. J., de Boer, A. G. y Breimer, D. D. (1989) Intestinal drug absorption enhancement: An overview. *Pharmacology & Therapeutics*, 44, 407-443.
14. Sultatos, L. (2007) Routes of Drug Administration. *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-3.
15. Robert, A. B. y Gregory, J. H. (2013), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Taylor & Francis, Vol. II, pp. 948-974.
16. Ramos, B. S. y Aznar, G. (1994), *Administración de medicamentos: teoría y práctica*. Díaz de Santos.
17. Gibson, M. (2009), *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*. CRC Press, pp. 267-429.
18. Pang, K. S. (2003) Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 31, 1507-1519.
19. Wong, S. M., Kellaway, I. W. y Murdan, S. (2006) Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water soluble drug by formation

- of surfactant-containing microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 61-68.
20. Watano, S., Matsuo, M., Nakamura, H. y Miyazaki, T. (2015) Improvement of dissolution rate of poorly water-soluble drug by wet grinding with bio-compatible phospholipid polymer. *Chemical Engineering Science*, 125, 25-31.
  21. Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M. A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G. K., Warsi, M. H. y Ahmad, F. J. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal*.
  22. Rao, V. M., Sanghvi, R. y Zhu, H. (2009) In Porter, Y. Q. C. G. Z. Z. L. R. (ed.), *Developing Solid Oral Dosage Forms*. Academic Press, San Diego, pp. 1-24.
  23. FDA, C. D. E. R. (1997) *Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*
  24. Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. y Crison, J. R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12, 413-420.
  25. Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J. T., Kim, H., Cho, J. M., Yun, G. y Lee, J. (2014) Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 304-316.
  26. Vogt, M., Kunath, K. y Dressman, J. B. (2008) Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 330-337.
  27. Kang Moo, H., Sang Cheon, L., Tooru, O. y Kinam, P. (2006), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare, Vol. V, pp. 2913-2924.

28. Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S. y Onoue, S. (2011) Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 420, 1-10.
29. Swarbrick, J. (2007) *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Tercera ed. Informa Healthcare USA, Inc., New York. 83-91, 1885, 2315-2337.
30. Mrsny, R. J. (2012) Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release*, 161, 247-253.
31. Diane, J. B. y Anthony, J. H. (2006), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare, Vol. IV, pp. 2328-2338.
32. Liu, W., Chen, X. D. y Selomulya, C. (2015) On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*, 22, 1-12.
33. Kinam, P. y Yoon, Y. (2006), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare, Vol. IV, pp. 2315-2327.
34. Benita, S. (2006), *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. Taylor & Francis.
35. Madhav, N. S. y Kala, S. (2011) Review on microparticulate drug delivery system. *Int J PharmTech Res*, 3, 1242-1254.
36. Mu, L., Teo, M.-M., Ning, H.-Z., Tan, C.-S. y Feng, S.-S. (2005) Novel powder formulations for controlled delivery of poorly soluble anticancer drug: Application and investigation of TPGS and PEG in spray-dried particulate system. *Journal of Controlled Release*, 103, 565-575.
37. Garcia, A., Leonardi, D., Piccirilli, G. N., Mamprin, M. E., Olivieri, A. C. y Lamas, M. C. (2015) Spray drying formulation of albendazole microspheres by experimental design. In vitro-in vivo studies. *Drug Dev Ind Pharm*, 41, 244-252.

38. Arpagaus, C., Rütli, D. y Meuri, M. (2013), *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*. John Wiley & Sons Ltd, pp. 551-585.
39. Sosnik, A. y Seremeta, K. P. (2015) Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40-54.
40. Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S. y Douroumis, D. (2012) Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 8-15.
41. Fu, Y.-J., Shyu, S.-S., Su, F.-H. y Yu, P.-C. (2002) Development of biodegradable co-poly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 269-279.
42. Deasy, P. B. (1984) *Microencapsulation and Related Drug Processes*. Marcel Dekker, Inc., New York 352.
43. Chang, S.-H., Lin, H.-T. V., Wu, G.-J. y Tsai, G. J. (2015) pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 134, 74-81.
44. Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y. y Liu, G. (2016) Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, 190, 1174-1181.
45. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. y Chiellini, E. (2011) Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36, 981-1014.
46. Zhang, Y., Zhang, X., Ding, R., Zhang, J. y Liu, J. (2011) Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment. *Carbohydrate Polymers*, 83, 813-817.

47. Choi, C., Nam, J.-P. y Nah, J.-W. (2015) Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
48. Baldrick, P. (2010) The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56, 290-299.
49. Thanou, M., Verhoef, J. C. y Junginger, H. E. (2001) Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 117-126.
50. Elgadir, M. A., Uddin, M. S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A. J. K. y Sarker, M. Z. I. (2014) Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*.
51. Rowe, R. C., Sheskey, P. J. y Owen, S. C. (2006). 5th ed. Pharmaceutical Press, London, UK; Washington DC, USA, pp. 918 p.
52. Balázs, N. y Sipos, P. (2007) Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydrate Research*, 342, 124-130.
53. Jiang, X., Chen, L. y Zhong, W. (2003) A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54, 457-463.
54. Broussignac, P. (1968) Chitosan a natural polymer not well known by the industry. *Chim. Ind. Genie Chim.*, 99, 1241-1247.
55. Ke, H., Chen, Q. . (1990) Potentiometric titration of chitosan by linear method. *Huaxue Tongbao*, 10, 44-46.
56. Ingman, F. y Still, E. (1966) Graphic method for the determination of titration end-points. *Talanta*, 13, 1431-1442.
57. Walter, R. H. y Taylor, S. (2012). Elsevier Science, pp. 189-221.

58. Sundar Raj, A., Rubila, S., Jayabalan, R. y Ranganathan, T. (2012) A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses. *Open Access Scientific Reports*, 1, 1-4.
59. Souza, C. J. F., Garcia Rojas, E. E., Melo, N. R., Gaspar, A. y Lins, J. F. C. (2013) Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30, 375-381.
60. Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. y Rao, M. A. (1997) Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47-73.
61. Casas-Orozco, D., Villa, A. L., Bustamante, F. y González, L.-M. (2015) Process development and simulation of pectin extraction from orange peels. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 86-98.
62. Inngjerdingen, K. T., Patel, T. R., Chen, X., Kenne, L., Allen, S., Morris, G. A., Harding, S. E., Matsumoto, T., Diallo, D., Yamada, H., Michaelsen, T. E., Inngjerdingen, M. y Paulsen, B. S. (2007) Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*, 17, 1299-1310.
63. Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., Gao, M. Y., Shirley, R. B., Stoffel, M. T., Kumar, M. V. y Mohnen, D. (2007) Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17, 805-819.
64. Maran, J. P., Swathi, K., Jeevitha, P., Jayalakshmi, J. y Ashvini, G. (2015) Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel. *Carbohydrate Polymers*, 123, 67-71.
65. Haleem, N., Arshad, M., Shahid, M. y Tahir, M. A. (2014) Synthesis of carboxymethyl cellulose from waste of cotton ginning industry. *Carbohydrate Polymers*, 113, 249-255.

66. Pushpamalar, V., Langford, S. J., Ahmad, M. y Lim, Y. Y. (2006) Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. *Carbohydrate Polymers*, 64, 312-318.
67. Rachtanapun, P., Luangkamin, S., Tanprasert, K. y Suriyatem, R. (2012) Carboxymethyl cellulose film from durian rind. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 52-58.
68. Yang, X. H. y Zhu, W. L. (2007) Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. *Cellulose*, 14, 409-417.
69. Martin, A. N. y Bustamante, P. (1993), *Physical pharmacy : physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 404-405, 461-462.
70. Seymour, R. B. y Carraher, C. E. (1995), *Introducción a la química de los polímeros*. Reverté, pp. 91-120.
71. Del Valle, E. M. M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.
72. Brewster, M. E. y Loftsson, T. (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666.
73. Higuchi, T. y Connors, K. A. (1965) Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum*, 4, 117-212.
74. Frömring, K. H. y Szejtli, J. (1994), *Cyclodextrins in Pharmacy*. Kluwer Academic Publishers, pp. 224.
75. Gad, S. C. (2008), *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. Wiley-Interscience, pp. 1228-1338.
76. Davis, M. E. y Brewster, M. E. (2004) Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 1023-1035.

77. Schönbeck, C., Westh, P., Madsen, J. C., Larsen, K. L., Städe, L. W. y Holm, R. (2011) Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins: Influence of Degree and Pattern of Substitution on the Thermodynamics of Complexation with Tauro- and Glyco-Conjugated Bile Salts. *Langmuir*, 27, 5832-5841.
78. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. y Khar, R. K. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6, E329-357.
79. García, A., Leonardi, D., Salazar, M. O. y Lamas, M. C. (2014) Modified  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex to Improve the Physicochemical Properties of Albendazole. Complete *In Vitro* Evaluation and Characterization. *PLoS ONE*, 9, e88234.
80. Salam, A., Venditti, R. A., Pawlak, J. J. y El-Tahlawy, K. (2011) Crosslinked hemicellulose citrate-chitosan aerogel foams. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1221-1229.
81. El-Tahlawy, K., Gaffar, M. A. y El-Rafie, S. (2006) Novel method for preparation of  $\beta$ -cyclodextrin-grafted chitosan and it's application. *Carbohydrate Polymers*, 63, 385-392.
82. Chaleawlert-umpon, S., Nuchuchua, O., Saesoo, S., Gonil, P., Ruktanonchai, U. R., Sajomsang, W. y Pimpha, N. (2011) Effect of citrate spacer on mucoadhesive properties of a novel water-soluble cationic  $\beta$ -cyclodextrin-conjugated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 84, 186-194.
83. Shuaiyang, W., Huiling, L., Junli, R., Chuanfu, L., Feng, P. y Runcang, S. (2013) Preparation of xylan citrate—A potential adsorbent for industrial wastewater treatment. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1960-1965.
84. Plainchont, B., Martinez, A., Tisse, S., Bouillon, J. P., Pilard, F., Wieruszkeski, J. M., Lippens, G., Jeannerat, D. y Nuzillard, J. M. (2011) New and old NMR experiments for the resonance assignment of complex oligosaccharides--application to a cyclodextrin derivative. *Magn Reson Chem*, 49, 781-787.

85. Frömmling, K.-H. y Szejtli, J. (1993), *Cyclodextrins in pharmacy*. Springer, Vol. 5.
86. Khan, A. R., Forgo, P., Stine, K. J. y D'Souza, V. T. (1998) Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1977-1996.
87. Stella, V. J. y He, Q. (2008) Cyclodextrins. *Toxicol Pathol*, 36, 30-42.
88. Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Georgiev, T., Osorio-Fuentealba, C., Espinosa, A., Hidalgo, J., Hidalgo, C. y Jaimovich, E. (2015), Vol. 308, pp. E294-E305.
89. Hotez, P. J. y Pecoul, B. (2010) “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e718.
90. Beyrer, C., Villar, J. C., Suwanvanichkij, V., Singh, S., Baral, S. D. y Mills, E. J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *The Lancet*, 370, 619-627.
91. Pedrique, B., Strub-Wourgaft, N., Some, C., Olliaro, P., Trouiller, P., Ford, N., Pécoul, B. y Bradol, J.-H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. *The Lancet Global Health*, 1, e371-e379.
92. Pink, R., Hudson, A., Mouries, M. A. y Bendig, M. (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 727-740.
93. Costantino, S. N., Sosa, N., Calcagno, M. A., Forastiero, M. A., Farabello, S. P., Taus, M. R. y Venturiello, S. M. (2009) Detection of trichinellosis in a historically *Trichinella*-free area of Argentina. *Veterinary Parasitology*, 159, 354-357.
94. Pozio, E. (2007) World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol*, 149, 3-21.
95. Ribicich, M., Gamble, H. R., Bolpe, J., Scialfa, E., Krivokapich, S., Cardillo, N., Betti, A., Cambiaggi Holzmann, M. L., Pasqualetti, M., Fariña, F. y Rosa, A.

- (2010) *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitology Research*, 107, 377-380.
96. Pozio, E. (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary Parasitology*, 93, 241-262.
97. Murrell, K. D. y Pozio, E. (2000) Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*, 30, 1339-1349.
98. Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Torgerson, P. R., Haagsma, J. A., De Smet, K., Murrell, K. D., Pozio, E. y Dorny, P. (2015) The low global burden of trichinellosis: evidence and implications. *International Journal for Parasitology*, 45, 95-99.
99. Jasmer, D. P. (1990) *Trichinella spiralis*: Altered expression of muscle proteins in trichinosis. *Experimental Parasitology*, 70, 452-465.
100. Bruschi, F. (2012) Trichinellosis in developing countries: is it neglected? *Journal of infection in developing countries*, 6, 216-222.
101. Bălescu, A., Nemet, C., Zamfir, C., Ispas, D. y Idomir, M. (2013) Identifying risk factors for symptoms of severe trichinellosis – A case study of 143 infected persons in Brasov, Romania 2001–2008. *Veterinary Parasitology*, 194, 142-144.
102. Gajadhar, A. A. y Gamble, H. R. (2000) Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology*, 93, 183-189.
103. Vu Thi, N., Pozio, E., Van De, N., Praet, N., Pezzotti, P., Gabriël, S., Claes, M., Thuy, N. T. y Dorny, P. (2014) Anti-*Trichinella* IgG in ethnic minorities living in *Trichinella*-endemic areas in northwest Vietnam: Study of the predictive value of selected clinical signs and symptoms for the diagnosis of trichinellosis. *Acta Tropica*, 139, 93-98.

104. Calcagno, M. A., Bourlot, I., Taus, R., Saracino, M. P. y Venturiello, S. M. (2014) Description of an outbreak of human trichinellosis in an area of Argentina historically regarded as *Trichinella*-free: The importance of surveillance studies. *Veterinary Parasitology*, 200, 251-256.
105. McKellar, Q. A. y Scott, E. W. (1990) The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 223-247.
106. Pozio, E., Sacchini, D., Sacchi, L., Tamburrini, A. y Alberici, F. (2001) Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae. *Clin Infect Dis*, 32, 638-642.
107. Siritiyasatien, P., Yingyouard, P. y Nuchprayoon, S. (2003) Efficacy of albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. *J Med Assoc Thai*, 86, S257-262.
108. Chung, M. S., Joo, K. H., Quan, F. S., Kwon, H. S. y Cho, S. W. (2001) Efficacy of flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*, 8, S195-S198.
109. Venkatesan, P. (1998) Albendazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 145-147.
110. Yépez-Mulia, L., Morales-Hurtado, R., Viveros-Guzmán, N., Cedillo-Rivera, R., Hernández-Luis, F., Castillo, R., Hernández-Campos, A. y Muñoz, O. (1999) Evaluation of Albendazole Prodrugs in Experimental Trichinellosis. *Archives of Medical Research*, 30, 368-374.
111. Torrado, S., Torrado, S., Torrado, J. J. y Cadórniga, R. (1996) Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 140, 247-250.
112. Dayan, A. D. (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86, 141-159.

113. Yang, L., Liu, C., Ferrier, J. A. y Zhang, X. Organizational barriers associated with the implementation of national essential medicines policy: A cross-sectional study of township hospitals in China. *Social Science & Medicine*.
114. Mayor, S. (2015) WHO includes 16 new cancer drugs on list of essential medicines. *The Lancet Oncology*, 16, 757.
115. Millard, C., Brhlikova, P. y Pollock, A. (2015) Social networks and health policy: The case of misoprostol and the WHO model essential medicine list. *Social Science & Medicine*, 132, 190-196.
116. Singh, G. y Prabhakar, S. (2002), *Taenia Solium Cysticercosis: From Basic to Clinical Science*. CABI, pp. 368-370.
117. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003) *Farmacopea Argentina*. 7° Ed. ed. Imprenta del Congreso de la Nación, 51-52
118. Raval, M. K., Vaghela, P. D., Vachhani, A. N. y Sheth, N. R. Role of excipients in the crystallization of Albendazole. *Advanced Powder Technology*.
119. Kohri, N., Yamayoshi, Y., Xin, H. E., Iseki, K. E. N., Sato, N., Todo, S. y Miyazaki, K. (1999) Improving the Oral Bioavailability of Albendazole in Rabbits by the Solid Dispersion Technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 159-164.
120. Piccirilli, G. N., Garcia, A., Leonardi, D., Mamprin, M. E., Bolmaro, R. E., Salomon, C. J. y Lamas, M. C. (2014) Chitosan microparticles: influence of the gelation process on the release profile and oral bioavailability of albendazole, a class II compound. *Drug Dev Ind Pharm*, 40, 1476-1482.
121. Daniel-Mwambete, K., Torrado, S., Cuesta-Bandera, C., Ponce-Gordo, F. y Torrado, J. J. (2004) The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 272, 29-36.

122. Lee, E. H. (2014) A practical guide to pharmaceutical polymorph screening and selection. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 163-175.
123. Ferreira, M. J. G., García, A., Leonardi, D., Salomon, C. J., Lamas, M. C. y Nunes, T. G. (2015) <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N solid-state NMR studies on albendazole and cyclodextrin albendazole complexes. *Carbohydrate Polymers*, 123, 130-135.
124. Pranzo, M. B., Cruickshank, D., Coruzzi, M., Caira, M. R. y Bettini, R. (2010) Enantiotropically related albendazole polymorphs. *J Pharm Sci*, 99, 3731-3742.
125. Zhang, G. G. Z. y Zhou, D. (2009) In Porter, Y. Q. C. G. Z. Z. L. R. (ed.), *Developing Solid Oral Dosage Forms*. Academic Press, San Diego, pp. 25-60.
126. Acton, Q. A. (2012), *Carbamates: Advances in Research and Application: 2011 Edition: ScholarlyBrief*. Scholarly Editions.
127. Fernández, L., Sigal, E., Otero, L., Silber, J. J. y Santo, M. (2011) Solubility improvement of an anthelmintic benzimidazole carbamate by association with dendrimers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 679-689.
128. Lewis, G. A., Mathieu, D. y Phan, R. T. L. (1999), *Pharmaceutical Experimental Design*. Dekker.
129. Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002), *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta ed. Pearson Educación, Madrid.
130. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J. y Bergman, R. (1998) Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42, 3-40.
131. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. y Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
132. Leardi, R. (2009) Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 652, 161-172.

133. Araujo, P. W. y Brereton, R. G. (1996) Experimental design II. Optimization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15, 63-70.
134. Analytical Methods Committee, A. N. (2013) Experimental design and optimisation (4): Plackett-Burman designs. *Analytical Methods*, 5, 1901-1903.
135. Dejaegher, B. y Vander Heyden, Y. (2011) Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 141-158.
136. Dejaegher, B. y Heyden, Y. V. (2007) Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158, 138-157.
137. Hibbert, D. B. (2012) Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2-13.
138. Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M. y Massart, D. L. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 723-753.
139. Vander Heyden, Y., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L. y Hoogmartens, J. (1999) Determination of system suitability limits with a robustness test. *Journal of Chromatography A*, 845, 145-154.
140. Baş, D. y Boyacı, İ. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845.
141. Leonardi, D., Lamas, M. C. y Olivieri, A. C. (2008) Multiresponse optimization of the properties of albendazole-chitosan microparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 802-807.
142. Wang, Q. Z., Chen, X. G., Liu, N., Wang, S. X., Liu, C. S., Meng, X. H. y Liu, C. G. (2006) Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 65, 194-201.

143. Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D. y Gupta, A. (2003) A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal*, 32, 1149-1158.
144. Wang, W., Bo, S., Li, S. y Qin, W. (1991) Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 281-285.
145. Kasai, M. R. (2007) Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.
146. Rong Huei, C. y Hwa, H.-D. (1996) Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*, 29, 353-358.
147. Sato, M. d. F., Rigoni, D. C., Canteri, M. H. G., Petkowicz, C. L. d. O., Nogueira, A. y Wosiacki, G. (2011) Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33, 383-389.
148. Faravash, R. S. y Ashtiani, F. Z. (2008) The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. *Food Hydrocolloids*, 22, 196-202.
149. Zanella, K. y Taranto, O. P. (2015) Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from ‘pera’ sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *Journal of Food Engineering*, 166, 111-118.

150. Anger, H. y Berth, G. (1986) Gel permeation chromatography and the Mark-Houwink relation for pectins with different degrees of esterification. *Carbohydrate Polymers*, 6, 193-202.
151. Anger, H. y Dongowski, G. (1988) Amidated pectins—characterization and enzymatic degradation. *Food Hydrocolloids*, 2, 371-379.
152. Harding, S. E., Berth, G., Ball, A., Mitchell, J. R. y de la Torre, J. G. (1991) The molecular weight distribution and conformation of citrus pectins in solution studied by hydrodynamics. *Carbohydrate Polymers*, 16, 1-15.
153. Joshi, G., Naithani, S., Varshney, V. K., Bisht, S. S., Rana, V. y Gupta, P. K. (2015) Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from office waste paper: A greener approach towards waste management. *Waste Management*, 38, 33-40.
154. Eremeeva, T. E. y Bykova, T. O. (1998) SEC of mono-carboxymethyl cellulose (CMC) in a wide range of pH; Mark-Houwink constants. *Carbohydrate Polymers*, 36, 319-326.
155. United States Pharmacopoeial Convention (2009) *United States Pharmacopeia (USP)*. Rockville (MD)
156. Tansel, B. y Nagarajan, P. (2004) SEM study of phenolphthalein adsorption on granular activated carbon. *Advances in Environmental Research*, 8, 411-415.
157. Council of Europe (2007) *European Pharmacopoeia: Published in Accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No. 50)*. Council of Europe
158. Carstensen, J. T. 1993 *Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms*. Taylor & Francis

159. Yu, Q., Black, S. y Wei, H. (2009) Solubility of Butanedioic Acid in Different Solvents at Temperatures between 283 K and 333 K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 54, 2123-2125.
160. Torrado, S., López, M. L., Torrado, G., Bolás, F., Torrado, S. y Cadórniga, R. (1997) A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 156, 181-187.
161. Kitzman, D., Cheng, K.-J. y Fleckenstein, L. (2002) HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 801-813.
162. Dib, A., Palma, S., Suarez, G., Farias, C., Cabrera, P., Castro, S., Allemandi, D., Moreno, L., Lanusse, C. y Sanchez Bruni, S. (2011) Albendazole sulphoxide kinetic disposition after treatment with different formulations in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 34, 136-141.
163. Di Masso, R. J., Abdala, S., Sanchez, S. M. y Font, M. T. (1989) Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana*, 9, 79-92.
164. Vasconi, M. D., Malfante, P., Bassi, A., Giudici, C., Revelli, S., Di Masso, R., Font, M. T. y Hinrichsen, L. (2008) Phenotypic differences on the outcome of the host-parasite relationship: behavior of mice of the CBI stock in natural and experimental infections. *Vet Parasitol*, 153, 157-163.
165. Muñoz, J. E., Saldivar, E., Reveles Hernández, R. G. y Moreno García, M. A. (2007) Características de la célula nodriza en diferentes modelos experimentales infectados con *trichinella spiralis*. *Red. Vet.*, 8.
166. García, A., Barrera, M. G., Piccirilli, G., Vasconi, M. D., Di Masso, R. J., Leonardi, D., Hinrichsen, L. I. y Lamas, M. C. (2013) Novel albendazole formulations given during the intestinal phase of *Trichinella spiralis* infection

- reduce effectively parasitic muscle burden in mice. *Parasitology International*, 62, 568-570.
167. Boris, K., Vasconi, M. D., Bertorin, G., Di Masso, R. y Hinrichsen, L. (2011) Efecto del genotipo del huésped en la capacidad reproductiva de *Trichinella spiralis* en ratones CBI-IGE infectados con dosis crecientes. *J. Basic Appl. Genet.*, XLI.
  168. Randazzo, V. R. y Costamagna, S. R. (2010) Coloración de azul de metileno como alternativa para determinar la viabilidad de larvas libres de *Trichinella spiralis*. *Revista argentina de microbiología*, 42, 95-97.
  169. Heinze, T. y Koschella, A. (2005) Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch – A Review. *Macromolecular Symposia*, 223, 13-40.
  170. Almlöf, H., Schenzel, K. y Germgård, U. (2013) Carboxymethyl cellulose produced at different mercerization conditions and characterized by NIR FT Raman spectroscopy and chemometric methods. *BioResources*, 8, 1918-1932.
  171. Langenbucher, F. (1972) Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24, 979-981.
  172. Cupera, J., Lansky, P. y Sklubalova, Z. (2015) Sampling times influence the estimate of parameters in the Weibull dissolution model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, 171-176.
  173. Costa, P. y Sousa Lobo, J. M. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 123-133.
  174. Farr, R. S., Goh, S. M. y Yong, F. Y. S. (2012) Use of the Weibull equation to approximate diffusive release from particles in a closed system. *Computers & Chemical Engineering*, 39, 33-40.

175. Ramteke K.H., D. P. A., Kharat A. R., Patil S.V. (2014) Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 3, 388-396.
176. Pascoal, A. D. S. M. R., da Silva, P. M. y Coelho Pinheiro, M. N. (2015) Drug dissolution profiles from polymeric matrices: Data versus numerical solution of the diffusion problem and kinetic models. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 61, 118-127.
177. Laitinen, R., Lobmann, K., Strachan, C. J., Grohgan, H. y Rades, T. (2013) Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *Int J Pharm*, 453, 65-79.
178. Blagden, N., de Matas, M., Gavan, P. T. y York, P. (2007) Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 617-630.
179. Polli, J. E., Rekhi, G. S., Augsburger, L. L. y Shah, V. P. (1997) Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets. *J Pharm Sci*, 86, 690-700.
180. Shibata, M., Nozawa, R., Teramoto, N. y Yosomiya, R. (2002) Synthesis and properties of etherified pullulans. *European Polymer Journal*, 38, 497-501.
181. Ciucanu, I. y Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.
182. Castillo, J. A., Palomo-Canales, J., Garcia, J. J., Lastres, J. L., Bolas, F. y Torrado, J. J. (1999) Preparation and Characterization of Albendazole  $\beta$ -Cyclodextrin Complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 1241-1248.
183. Linde, G. A., Junior, A. L., Faria, E. V. d., Colauto, N. B., Moraes, F. F. d. y Zanin, G. M. (2010) The use of 2D NMR to study  $\beta$ -cyclodextrin complexation

- and debittering of amino acids and peptides. *Food Research International*, 43, 187-192.
184. Giordano, F., Novak, C. y Moyano, J. R. (2001) Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380, 123-151.
185. Salústio, P. J., Feio, G., Figueirinhas, J. L., Pinto, J. F. y Cabral Marques, H. M. (2009) The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a  $\beta$ -cyclodextrin cavity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 377-386.
186. Gunasekaran, S. y Uthra, D. (2008) Vibrational spectra and qualitative analysis of albendazole and mebendazole. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 6310-6324.
187. Marangoci, N., Mares, M., Silion, M., Fifere, A., Varganici, C., Nicolescu, A., Deleanu, C., Coroaba, A., Pinteala, M. y Simionescu, B. C. (2011) Inclusion complex of a new propiconazole derivative with  $\beta$ -cyclodextrin: NMR, ESI-MS and preliminary pharmacological studies. *Results in Pharma Sciences*, 1, 27-37.
188. Dotsikas, Y. y Loukas, Y. L. (2003) Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14, 1123-1129.
189. Schneider, H. J., Hacket, F., Rudiger, V. y Ikeda, H. (1998) NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.*, 98, 1755-1786.
190. Saitô, H., Ando, I. y Naito, A. (2006), *Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers*. Springer Netherlands, pp. 1-6.
191. Wulff, M., Aldén, M. y Tegenfeldt, J. (2002) Solid-State NMR Investigation of Indomethacin-Cyclodextrin Complexes in PEG 6000 Carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 13, 240-248.

192. Sfihi, H., Legrand, A. P., Doussot, J. y Guy, A. (1996) Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR study of  $\beta$ -cyclodextrin/substituted aromatic ketone complexes: Evidence for two kinds of complexation of the guest molecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 115, 115-126.
193. Laitinen, R., Löbmann, K., Strachan, C. J., Grohgan, H. y Rades, T. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *International Journal of Pharmaceutics*.