



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

TESIS DE LICENCIATURA

*Mejoramiento de la velocidad de disolución de Albendazol a partir de microesferas  
lipídicas modificadas de rápida liberación del fármaco*

**Realizado por:**

Jose Alexis Castro Alpizar  
B11581

**Director:**

Dr. Jorge Andrés Pacheco Molina

**Asesores:**

Dr. Ronny Vargas Monge  
Dr. Zacarías Pereira Vega

2016

## Hoja de aprobación

Esta tesis fue aprobada por el tribunal examinador designado por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia y el título profesional de Doctor en Farmacia.



Dr. Jorge Pacheco Molina

Director de tesis



Dr. Ronny Vargas Monge

Asesor



Dr. Zacarías Pereira Vega

Asesor



Dr. Osman Hidalgo Muñoz

Lector



Dr. Gustavo Carazo Berrocal

Lector



Jose Alexis Castro Alpizar

Estudiante

## **Dedicatoria**

*A mis padres, Alexis y Ana Iris, quienes siempre  
me han apoyado para alcanzar mis metas.*

## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi agradecimiento a los siguientes laboratorios que facilitaron espacio físico, equipos y/o reactivos, necesarios para llevar a cabo este trabajo:

Laboratorio de Tecnología Farmacéutica Industrial, Facultad de Farmacia, UCR.

Laboratorio de Análisis y Asesoría Farmacéutica (LAYAFA), Facultad de Farmacia, UCR.

Laboratorio de Fisicoquímica Farmacéutica, Facultad de Farmacia, UCR.

Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, UCR.

Laboratorio de Servicios Analíticos (LASA), Escuela de Química, UCR

Laboratorio CHEMO Centroamérica S.A.

Además quiero agradecer a las siguientes personas, quienes brindaron su colaboración para desarrollar este proyecto:

Dr. Jorge Andrés Pacheco

Dra. Irene Caravaca

Dr. Ronny Vargas Monge

Dr. German Madrigal

Dr. Zacarías Pereira Vega

B.Q. Carlos Arias

Dra. Jeimy Blanco

Dr. Cristian Campos



## Índice de contenidos

|   |     |
|---|-----|
| Hoja de aprobación .....  | ii  |
| Dedicatoria .....   | iii |
| Agradecimientos .....   | iv  |
| Lista de abreviaturas .....   | xi  |
| Resumen.....  | xii |
| 1. Justificación .....  | 1   |
| 2. Objetivos .....  | 3   |
| 2.1. Objetivo general .....   | 3   |
| 2.2. Objetivos específicos.....   | 3   |
| 3. Marco teórico .....  | 4   |
| 3.1. Parasitosis.....   | 4   |
| 3.1.1. Generalidades .....  | 4   |
| 3.1.2. Tratamiento farmacológico: generalidades del Albendazol .....  | 4   |
| 3.2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).....  | 7   |
| 3.3. Mejoramiento de la velocidad de disolución de fármacos. ....   | 8   |
| 3.3.1. Microencapsulación.....  | 9   |
| 3.3.2. Transportadores coloidales .....   | 14  |
| 3.3.3. Agentes modificadores del desempeño de transportadores lipídicos .....                                 | 21  |
| 3.4. Técnicas de caracterización de microesferas lipídicas .....  | 23  |
| 3.4.1. Difractometría de Rayos X .....  | 23  |
| 3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido .....  | 24  |
| 3.4.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF) .....                                     | 26  |
| 4. Metodología .....  | 29  |
| 4.1. Materiales .....   | 29  |
| 4.2. Procedimiento general de formación de microesferas lipídicas .....                                       | 29  |
| 4.2.1. Preparación de microesferas lipídicas simples .....  | 30  |
| 4.2.2. Preparación de microesferas lipídicas con agente formador de poros .....                               | 32  |
| 4.2.3. Preparación de microesferas lipídicas con desintegrante .....  | 34  |
| 4.2.4. Preparación de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante..... | 35  |
| 4.3. Caracterización de microesferas lipídicas.....   | 37  |
| 4.3.1. Morfología y tamaño .....  | 37  |
| 4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....   | 37  |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 4.3.3. | Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF) .....                          | 37  |
| 4.4.   | Valoración de microesferas lipídicas .....  | 37  |
| 4.5.   | Ensayo de disolución de ABZ .....   | 39  |
| 4.6.   | Determinación de la linealidad del método espectrofotométrico .....                         | 39  |
| 4.7.   | Análisis de datos.....  | 40  |
| 5.     | Resultados y Discusión .....  | 41  |
| 5.1.   | Estudios preliminares .....   | 41  |
| 5.2.   | Morfología y tamaño de partícula.....   | 42  |
| 5.3.   | Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....  | 48  |
| 5.4.   | Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF) .....                          | 60  |
| 5.5.   | Valoraciones.....   | 64  |
| 5.5.1. | Microesferas lipídicas simples.....   | 64  |
| 5.5.2. | Microesferas lipídicas con agente formador de poros. ....                                   | 66  |
| 5.5.3. | Microesferas lipídicas con agente desintegrante. ....                                       | 70  |
| 5.5.4. | Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y<br>desintegrante. .... | 71  |
| 5.6.   | Ensayos de disolución .....   | 73  |
| 5.6.1. | Albendazol materia prima.....   | 73  |
| 5.6.2. | Microesferas lipídicas simples.....   | 74  |
| 5.6.3. | Microesferas lipídicas con agente formador de poros.....                                    | 78  |
| 5.6.4. | Microesferas lipídicas con agente desintegrante. ....                                       | 84  |
| 5.6.5. | Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y<br>desintegrante. .... | 87  |
| 5.7.   | Determinación de la linealidad del método espectrofotométrico .....                         | 93  |
| 6.     | Conclusiones .....  | 94  |
| 7.     | Recomendaciones.....  | 95  |
| 8.     | Referencias bibliográficas .....  | 96  |
| 9.     | Anexos .....  | 102 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Estructura química de los fármacos Benzimidazoles. ....  | 5  |
| <b>Tabla 2.</b> Clasificación y descripción de las principales técnicas de microencapsulación. ....  | 12 |
| <b>Tabla 3.</b> Composición de las microesferas lipídicas simples, obtenidas por el método A. ....   | 31 |
| <b>Tabla 4.</b> Composición de las microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos B y C. ....  | 32 |
| <b>Tabla 5.</b> Composición de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A. ....                              | 33 |
| <b>Tabla 6.</b> Composición de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por los métodos B y C. ....                        | 34 |
| <b>Tabla 7.</b> Composición de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por los métodos B y C. ....                            | 35 |
| <b>Tabla 8.</b> Composición de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por los métodos B y C. ....                            | 36 |
| <b>Tabla 9.</b> Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método A. ....  | 42 |
| <b>Tabla 10.</b> Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método B. ....   | 43 |
| <b>Tabla 11.</b> Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método C. ....   | 44 |
| <b>Tabla 12.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C. ....   | 64 |
| <b>Tabla 13.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A. ....                                | 66 |
| <b>Tabla 14.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B. ....                                | 67 |
| <b>Tabla 15.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C. ....                                | 68 |
| <b>Tabla 16.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B. ....                                    | 70 |
| <b>Tabla 17.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C. ....                                    | 71 |
| <b>Tabla 18.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B. .... | 72 |
| <b>Tabla 19.</b> Valoraciones de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C. .... | 73 |
| <b>Tabla 20.</b> Ensayos de disolución de Albendazol materia prima (ABZ) y Albendazol materia prima con laurilsulfato de sodio al 3% (ABZ-LSS). .... | 74 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 21.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A.....   | 75 |
| <b>Tabla 22.</b> Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas simples, obtenidas por los métodos B y C.....   | 76 |
| <b>Tabla 23.</b> Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.....                                  | 78 |
| <b>Tabla 24.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B.....                                 | 80 |
| <b>Tabla 25.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.....                                 | 81 |
| <b>Tabla 26.</b> Relación del porcentaje peso/peso de Aerosil® 200 con la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución de ABZ.....            | 83 |
| <b>Tabla 27.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B.....                                     | 84 |
| <b>Tabla 28.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.....                                     | 86 |
| <b>Tabla 29.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B. .... | 88 |
| <b>Tabla 30.</b> Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C. .... | 89 |
| <b>Tabla 31.</b> Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros al 6 % (MLAP-3C).....  | 91 |
| <b>Tabla 32.</b> Resumen de resultados de la evaluación del desempeño de las microesferas lipídicas ....  | 92 |
| <b>Tabla 33.</b> Absorbancias correspondientes de las diferentes soluciones de Albendazol para la determinación de la linealidad.....                             | 93 |



## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Diferencias estructurales entre microesferas y microcápsulas.....  | 10 |
| <b>Figura 2.</b> Técnicas de microencapsulación.....  | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Representación de sistemas basados en liposomas.....   | 15 |
| <b>Figura 4.</b> Procedimiento general de formación de nanopartículas sólidas lipídicas por homogenización a alta presión en frío y en caliente.....  | 19 |
| <b>Figura 5.</b> Mecanismo de desintegración por hinchamiento.....  | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Representación gráfica de la ley de Bragg.....   | 24 |
| <b>Figura 7.</b> Representación de termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.....   | 25 |
| <b>Figura 8.</b> Espectro electromagnético.....   | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Morfología de las microesferas lipídicas obtenidas por el método A.....  | 45 |
| <b>Figura 10.</b> Morfología de las microesferas lipídicas obtenidas por el método B.....   | 46 |
| <b>Figura 11.</b> Morfología de las microesferas lipídicas obtenidas por el método C.....   | 47 |
| <b>Figura 12.</b> Termogramas obtenidos por DSC para las materias primas.....   | 49 |
| <b>Figura 13.</b> Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método A.....   | 52 |
| <b>Figura 14.</b> Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método B.A.<br>Microesferas lipídicas simples. <b>B.</b> Microesferas lipídicas con agente formador de poros.....   | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método B.A.<br>Microesferas lipídicas con agente desintegrante. <b>B.</b> Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante.....       | 55 |
| <b>Figura 16.</b> Termograma obtenido por DSC para las microesferas lipídicas del método C. <b>A.</b><br>Microesferas lipídicas simples. <b>B.</b> Microesferas lipídicas con agente formador de poros.....   | 58 |
| <b>Figura 17.</b> Termograma obtenido por DSC para las microesferas lipídicas del método C. <b>A.</b><br>Microesferas lipídicas con agente desintegrante. <b>B.</b> Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante..... | 59 |
| <b>Figura 18.</b> Espectros IRTF. <b>A.</b> Albendazol <b>B.</b> MLS-3C. <b>C.</b> MLAP-2C. <b>D.</b> MLAP-3C.....  | 62 |
| <b>Figura 19.</b> Espectros IRTF. <b>A.</b> MLAP-5C <b>B.</b> MLD-2C. <b>C.</b> MLC-2C.....   | 63 |
| <b>Figura 20.</b> Porcentaje de carga de Albendazol en las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.....  | 69 |
| <b>Figura 21.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A.....  | 75 |
| <b>Figura 22.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C.....   | 77 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 23.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.....                                | 79 |
| <b>Figura 24.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B.....                                | 80 |
| <b>Figura 25.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.....                                | 82 |
| <b>Figura 26.</b> Relación del porcentaje peso/peso de Aerosil® con la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución de ABZ. ....  | 83 |
| <b>Figura 27.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B.....                                    | 85 |
| <b>Figura 28.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.....                                    | 86 |
| <b>Figura 29.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B..... | 88 |
| <b>Figura 30.</b> Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C..... | 90 |
| <b>Figura 31.</b> Determinación gráfica de la linealidad del método espectrofotométrico.....  | 93 |

## **Lista de abreviaturas**

ABZ: Albendazol

BCS: Sistema de clasificación biofarmacéutica

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

DRX: Difractometría de Rayos X

FE: Fase externa

FI: Fase interna

FL: Fase lipídica

HAP: Homogenización a alta presión

IRTF: Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier

MG: Monoestearato de glicerilo

NL: Nanopartículas lipídicas

NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas

PA: Principio activo

PEG: Polietilenglicol

TCC: Triglicérido de ácido caprílico/cáprico

TLN: Transportadores lipídicos nanoestructurados



## Resumen

Castro-Alpízar JA. Mejoramiento de la velocidad de disolución de Albendazol a partir de microesferas lipídicas modificadas de rápida liberación del fármaco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Facultad de Farmacia. 2016.

Director: Dr. Jorge Andrés Pacheco.

En esta investigación se buscó desarrollar un transportador lipídico capaz de mejorar la velocidad de disolución de Albendazol, el cual es un fármaco de tipo benzimidazol, con actividad antihelmíntica. Según el Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) este principio activo es de categoría II, lo que significa que tiene una alta permeabilidad a través de membranas, pero posee una baja solubilidad acuosa.

Durante el proceso de desarrollo, se utilizó el método de difusión de disolvente como técnica de producción y se determinó la utilidad de desarrollar una matriz compuesta por lípidos (monoestearato de glicerilo y triglicérido de ácido caprílico/cáprico) y polímeros hidrofílicos (Poloxámero 407 o Polietilenglicol 6000). Además, con el fin de optimizar la liberación del principio activo, las microesferas simples fueron modificadas con Aerosil® 200, crospovidona y combinaciones de ambos excipientes.

La evaluación del desempeño de los transportadores diseñados se llevó a cabo mediante la determinación de los porcentajes de carga y de encapsulación del fármaco, así como la cantidad de principio activo disuelto a los 30 minutos, siguiendo la metodología descrita en la USP 38. Además, las microesferas se caracterizaron en cuanto a tamaño y morfología, mediante microscopía óptica y se evaluaron las interacciones del principio activo con los excipientes por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IRTF). Se determinó el comportamiento térmico de las formulaciones a partir del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC), el cual aportó información sobre cambios en la estructura cristalina de la matriz y del principio activo.

Esta investigación permitió concluir que al utilizar una alta concentración de lípido líquido (25 %) en la fase lipídica que conforma la matriz, se mejora la velocidad de disolución de Albendazol. Además, se determinó como paso esencial del método de producción, la adición del principio activo completamente disuelto para obtener mejores porcentajes de disolución y por último, se pudo comprobar que la incorporación de Aerosil® 200 (sílice coloidal) y crospovidona logró mejorar en diferentes magnitudes el desempeño de los transportadores en el ensayo de disolución, donde la incorporación del sílice coloidal al 6% demostró los mejores resultados, al registrar un promedio de 85,96 % de Albendazol disuelto. No se obtuvo un efecto sinérgico con la incorporación de ambos excipientes.

**Palabras clave:** Albendazol, velocidad de disolución, microencapsulación por difusión de disolvente, microesferas lipídicas, transportadores lipídicos microestructurados, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.



## 1. Justificación

Las formas de dosificación farmacéutica son necesarias para asegurar la adecuada liberación de un principio activo (PA), con el fin de garantizar la eficacia terapéutica de un fármaco. Los métodos actuales de liberación de medicamentos buscan llevar al PA intacto a un blanco terapéutico específico. Para lograr esto, se puede optar por el uso de sistemas de liberación de fármacos basados en micro y nanotecnología. Dentro de estos sistemas, los que utilizan lípidos como base están adquiriendo mayor popularidad, ya que este tipo de materiales son fácilmente caracterizados y se pueden usar en diferentes vías de administración. <sup>(1)</sup>

El uso de un material lipídico como matriz de una microesfera puede presentar algunas ventajas. Por ejemplo, este tipo de materiales suelen ser biocompatibles, biodegradables, no inmunogénicos y en general son económicos.<sup>(2)</sup> Una de las principales ventajas es que permiten encapsular una gran variedad de compuestos no hidrosolubles. <sup>(2-4)</sup> Dentro de este tipo de compuestos se pueden ubicar los fármacos clase II según el Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS por sus siglas en inglés), los cuales se caracterizan por presentar una baja solubilidad acuosa y una alta permeabilidad a través de membranas. Estas características ocasionan una absorción limitada por una baja velocidad de disolución. <sup>(3)</sup>

Un ejemplo de fármaco clase II según el BCS es el Albendazol, el cual presenta una baja biodisponibilidad que se atribuye a su baja solubilidad en medios acuosos, lo cual se considera el paso limitante para su absorción. <sup>(5)</sup> El Albendazol es un fármaco indicado en el tratamiento de distintos tipos de parasitosis causadas por helmintos y algunas infecciones por protozoos. Sin embargo, por su baja solubilidad, poca absorción y rápido metabolismo, su uso se limita al tratamiento de parasitosis intestinales. Únicamente en dosis altas y prolongadas es útil en el tratamiento de infecciones sistémicas como la hidatidosis y la neurocisticercosis.<sup>(6,7)</sup>

Este proyecto surge a partir de los hallazgos encontrados en la tesis de licenciatura en Farmacia de la Universidad de Costa Rica titulada “Mejoramiento de la disolución del Albendazol mediante formación de dispersiones sólidas en polímeros hidrofílicos, complejos de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y microesferas lipídicas” elaborada por Priscila Ugalde. En dicha investigación, los complejos de Albendazol con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas permitieron mejorar la velocidad de disolución exitosamente. En el caso de las dispersiones sólidas en

polímeros hidrofílicos, también se logró mejorar la velocidad de disolución pero en menor medida. Sin embargo las microesferas lipídicas no resultaron ser la mejor matriz para mejorar este aspecto. <sup>(8)</sup>

En la tesis mencionada, las microesferas se formularon con grasas sólidas (Monoestearato de glicerilo, ácido esteárico y alcohol cetílico).<sup>(8)</sup> Sin embargo se ha demostrado que si se formulan las microesferas con combinaciones de lípidos líquidos y sólidos (transportadores lipídicos nanoestructurados), se pueden mejorar algunas características, como la liberación y la capacidad de carga del principio activo. <sup>(9)</sup>

En esta investigación se pretende estudiar el efecto en la velocidad de disolución de Albendazol a partir de la formulación de microesferas lipídicas modificadas con diferentes excipientes, con el fin de favorecer la rápida desintegración de la matriz lipídica y la liberación del principio activo. Específicamente se va a probar la incorporación de un agente formador de poros (Aerosil<sup>®</sup>), un desintegrante (crospovidona) y la combinación de ambos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

- Estudiar los efectos de diversos factores sobre la velocidad de disolución de Albendazol a partir de transportadores lipídicos microestructurados.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones de proceso necesarias para obtener microesferas lipídicas cargadas con Albendazol.
- Determinar el efecto de diferentes proporciones de lípidos en el desempeño de microesferas lipídicas, mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos.
- Evaluar el efecto de la adición de dióxido de silicio (agente formador de poros) en el desempeño de microesferas lipídicas, mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos.
- Evaluar el efecto de la adición de crospovidona (agente desintegrante) en el desempeño de microesferas lipídicas, mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos.
- Evaluar el efecto de la adición simultánea de dióxido de silicio y crospovidona en el desempeño de microesferas lipídicas, mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos.



### **3. Marco teórico**

#### **3.1. Parasitosis**

##### **3.1.1. Generalidades**

Las infecciones parasitarias afectan a más de la mitad de la población mundial, por lo que son un importante problema a nivel de salud, principalmente en las naciones subdesarrolladas, donde la prevalencia es mayor. <sup>(7)</sup> Este tipo de infecciones afectan la salud de la población de manera importante tanto en las zonas de los trópicos y subtropicos, como en las regiones de climas más templados. <sup>(10)</sup>

Dentro de las infecciones parasitarias más frecuentes se encuentran las provocadas por protozoarios (giardiasis, amebiasis, malaria y enfermedad de Chagas), helmintos (ascariasis, enterobiasis, anquilostomiasis y cestodiasis) e infecciones ectoparasíticas. <sup>(11)</sup>

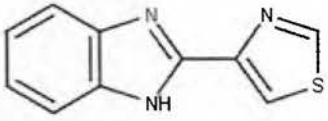
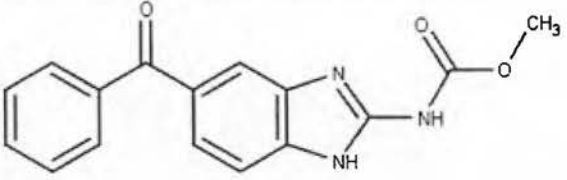
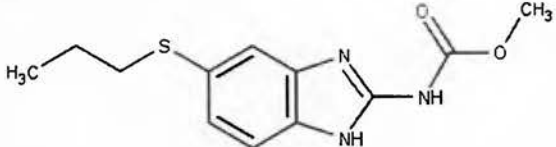
Es importante mencionar que dentro de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs por sus siglas en inglés), se encuentran algunas enfermedades parasitarias como la filariasis linfática, oncocercosis y la enfermedad del gusano de Guinea. <sup>(10)</sup>

En Costa Rica, según la Encuesta Nacional de Nutrición, en el fascículo sobre parasitosis intestinales, se demuestra que la incidencia de este padecimiento en tres grupos etarios, preescolar, escolar y adulto mayor, es respectivamente: 32,5 %, 54,1 % y 58,2 %, para un total de 49,1 % de prevalencia de parásitos intestinales en la población encuestada (782 personas). Se debe tomar en cuenta que esta encuesta consideró la detección de uno o más parásitos patógenos o comensales por persona, por lo que más específicamente, 6,3 % de las infecciones fueron por protozoarios potencialmente patógenos y 2,6 % por helmintos. <sup>(12)</sup>

##### **3.1.2. Tratamiento farmacológico: generalidades del Albendazol**

Los Benzimidazoles son un tipo de fármacos con actividad antihelmíntica. Las tres moléculas correspondientes a este grupo, que han sido extensamente utilizadas son: tiabendazol, mebendazol y albendazol. <sup>(13)</sup> La estructura química de estos tres fármacos se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Estructura química de los fármacos Benzimidazoles.

| Fármaco     | Estructura química   |
|-------------|--|
| Tiabendazol |  |
| Mebendazol  |  |
| Albendazol  |  |

**Fuente:** Modificado de: McCarthy J, Loukas A, Hotez PJ. Chemotherapy of Helminth Infections. En: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editores. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12a ed. New York: McGraw-Hill; 2011.

El Albendazol (ABZ) es un antihelmíntico de amplio espectro. Es la primera elección para el tratamiento de la enfermedad hidatídica y la cisticercosis.<sup>(13,14)</sup> También se utiliza para tratar infecciones por oxiuros y en casos de anquilostomiasis, ascariasis, trichuriasis y estrongiloidiasis.<sup>(14,15)</sup> Además es una alternativa en casos de filarisis y larva migrans visceral y cutánea.<sup>(15)</sup>

El mecanismo de acción consiste en la unión selectiva del fármaco a la  $\beta$ -tubulina presente en los parásitos, lo que provoca la inhibición de la polimerización de microtúbulos<sup>(7,13)</sup> y también inhibe la recaptura de glucosa dependiente de microtúbulos. Esto genera un daño irreversible en las células gastrointestinales del parásito, produciéndole inanición, muerte y por último la expulsión por parte del huésped.<sup>(7)</sup> Los parásitos expuestos al fármaco también sufren otros cambios bioquímicos, como la inhibición de la fumarato reductasa mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.<sup>(6,13)</sup>

La absorción de Albendazol se debe a un proceso de difusión simple, por lo que se ve limitado por su poca solubilidad en los fluidos gastrointestinales,<sup>(6)</sup> lo que genera una biodisponibilidad

reducida después de la administración oral. <sup>(7,14)</sup> Estudios en animales han demostrado una mayor absorción de ABZ en el estómago, respecto a la cantidad absorbida cuando el medicamento llega al intestino. Esto se puede atribuir a que la solubilidad del principio activo es mayor en el medio ácido estomacal, por lo que se podría favorecer la absorción mediante la ralentización del vaciamiento gástrico con la ingesta de una dieta grasosa. <sup>(6)</sup> Es por esto que comúnmente se indica que la absorción del ABZ aumenta (hasta cuatro veces) si se administra en conjunto con alimentos grasos. <sup>(6,7,14)</sup>

La poca absorción puede ser una ventaja en el tratamiento de helmintos intestinales, pero para que sea efectivo en el tratamiento de infecciones de helmintos en tejidos (como en la enfermedad hidatídica y en la neurocisticercosis) es necesario que una cantidad suficiente del fármaco activo llegue al sitio de la infección mediante la circulación sistémica. <sup>(7)</sup>

Posterior a la absorción es rápidamente metabolizado en el hígado, lo que permite la formación del metabolito activo sulfóxido de ABZ, el cual se une a proteínas, se distribuye bien en los tejidos y logra llegar a la bilis, líquido cefalorraquídeo y quistes hidatídicos. <sup>(7,14)</sup> Después de aproximadamente 3 horas de la administración de una dosis de 400 mg de ABZ, se alcanza la máxima concentración plasmática. La vida media se encuentra entre 8 y 12 horas. <sup>(14)</sup>

Respecto a las características fisicoquímicas del principio activo, se puede mencionar que es un polvo cristalino e incoloro, soluble en dimetilsulfóxido, parcialmente soluble en metanol y cloroformo y prácticamente insoluble en agua <sup>(16,17)</sup>. Es una base débil y el logP octanol/agua es de 3,5. <sup>(16)</sup>



### 3.2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica fue propuesto por Amidon *et al* en 1995. <sup>(18)</sup> Consiste en un marco de referencia científico para clasificar un fármaco basándose en su solubilidad y permeabilidad intestinal. <sup>(18,19)</sup> Al combinarlo con las características de disolución *in vitro* del principio activo, el BCS toma en cuenta tres factores principales: la solubilidad, la permeabilidad intestinal y la velocidad de disolución. <sup>(19)</sup>

La clasificación de la solubilidad de un fármaco en el BCS, se basa en la dosis más elevada del principio activo que presenta un producto de liberación inmediata. Se considera un principio activo con alta solubilidad, cuando la dosis más alta es soluble en 250 mL, o menos, de un medio acuoso con pH entre 1,0 – 7,5. De no ser así, el fármaco se clasifica en la categoría de baja solubilidad. <sup>(19-21)</sup>

La determinación de la permeabilidad se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos. Por ejemplo se pueden desarrollar estudios farmacocinéticos en humanos, como balances de masas, biodisponibilidad absoluta o permeabilidad intestinal. También se pueden realizar estudios de perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* en modelos animales adecuados, métodos de permeabilidad *in vitro* o estudios con células epiteliales (células Caco-2 o TC-7). <sup>(22)</sup> Un fármaco es considerado con alta permeabilidad, cuando el grado de absorción intestinal es de 90 % o superior. De lo contrario se clasifica con baja permeabilidad. <sup>(19,21)</sup>

Por último, se considera un producto farmacéutico de liberación inmediata cuando no menos del 85 % de la cantidad declarada de principio activo se disuelve en 30 minutos, utilizando el aparato I a 100 rpm o el aparato II a 50 rpm, con un medio de disolución de 900 mL o menos, compuesto de HCl 0,1 N (o fluido gástrico simulado), buffer de pH 4,5 o solución amortiguadora de pH 6,8 (o fluido intestinal simulado). <sup>(19,21)</sup>

De acuerdo al BCS, los fármacos se clasifican de la siguiente manera: <sup>(18,21)</sup>

- Clase I: Alta permeabilidad, alta solubilidad.
- Clase II: Alta permeabilidad, baja solubilidad.
- Clase III: Baja permeabilidad, alta solubilidad.
- Clase IV: Baja permeabilidad, baja solubilidad.

Como ya se ha mencionado, el Albendazol se clasifica dentro de la clase II del BCS. <sup>(5)</sup>

### 3.3. Mejoramiento de la velocidad de disolución de fármacos.

El desarrollo aislado de nuevos fármacos no es siempre suficiente para asegurar el éxito de un tratamiento, debido a que los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* pueden no ser satisfactorios al probar la sustancia *in vivo*. Esto se puede atribuir a una concentración plasmática insuficiente, causada por una absorción escasa o un rápido metabolismo y eliminación. Otra causa probable es la poca solubilidad del fármaco, lo que imposibilita la formulación de una solución acuosa de administración intravenosa. Y por último, una alta fluctuación de los niveles plasmáticos, debido a una biodisponibilidad impredecible después de la administración oral. <sup>(23)</sup>

Este problema se puede solucionar con el desarrollo de sistemas adecuados de transporte de fármacos, los cuales pueden permitir una liberación controlada y localizada del fármaco de acuerdo a las necesidades específicas del tratamiento.<sup>(23,24)</sup> El tamaño de los transportadores depende de la ruta de administración deseada, por lo que se podrían clasificar en transportadores coloidales (partículas en el rango de nanómetros), micropartículas (rango de micrómetros) e inclusive puede considerarse el empleo de transportadores de tipo implante si las partículas del sistema de transporte del fármaco alcanzan algunos milímetros. <sup>(23)</sup>

Dentro de las técnicas utilizadas para mejorar la velocidad de disolución y permeabilidad de un fármaco, se pueden incluir la micronización, <sup>(3,24)</sup> la formación de complejos con ciclodextrinas, las dispersiones sólidas, el empleo de tensioactivos, <sup>(3)</sup> los nanocristales y los sistemas de liberación por emulsificación de dispersiones del fármaco (sistemas sólidos o semisólidos). <sup>(24)</sup>

En las últimas décadas los lípidos se han convertido en sistemas de liberación de fármacos de gran importancia, debido en gran medida a la disponibilidad de excipientes lipídicos con características aceptables a nivel regulatorio y de seguridad. Además, estos sistemas tienen la capacidad de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles en agua. <sup>(3,4)</sup>

Específicamente, los sistemas de liberación de principios activos basados en lípidos han sido utilizados para mejorar la biodisponibilidad de fármacos de categoría biofarmacéutica II, <sup>(25)</sup> lo que implica que el compuesto tiene poca solubilidad en medio acuoso y alta permeabilidad al



paso a través de membranas. La poca solubilidad limita la velocidad de disolución y esto afecta la absorción del fármaco administrado por la vía oral. <sup>(3,24)</sup>

Dentro de los sistemas de liberación de fármacos basados en lípidos se encuentran las soluciones o suspensiones oleosas y las microemulsiones o nanoemulsiones. Estos sistemas se pueden convertir en intermediarios sólidos (polvos, granulados y pellets) y se utilizan para llenar cápsulas o para comprimir y formar tabletas. <sup>(3,4)</sup>

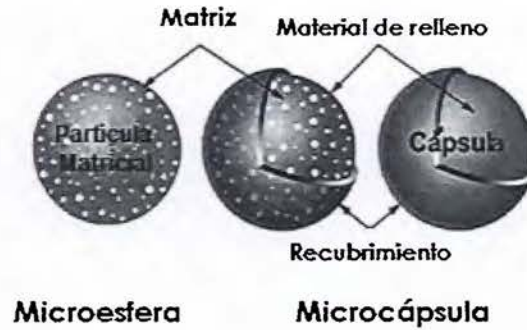
El aumento en la biodisponibilidad se puede atribuir a un aceleramiento del proceso de disolución del principio activo. Además estos sistemas facilitan la formación de fases solubilizadas por reducción del tamaño de partícula hasta el nivel molecular. También se altera el sistema de transporte basado en enterocitos, debido a que se dan cambios en la recaptura, eflujo y disposición del fármaco. Otro mecanismo de mejoramiento de la biodisponibilidad se da por el aumento en el transporte del fármaco en circulación sistémica, por la vía del sistema linfático intestinal. <sup>(3)</sup>

### **3.3.1. Microencapsulación**

#### **3.3.1.1. Generalidades**

La microencapsulación consiste en un proceso en el que se encierran o atrapan partículas micrométricas de sólidos, o gotas de líquidos o de gases, en un material inerte. <sup>(26,27)</sup> El estado físico del material encapsulado, afecta el tamaño y la forma de la microcápsula. Por ejemplo, si el núcleo está compuesto por un material sólido o cristalino, se espera que la microcápsula obtenida tenga una forma irregular, mientras que si el material del núcleo es un líquido, suelen obtenerse microcápsulas esféricas. <sup>(27)</sup>

En general, en la microencapsulación se necesitan dos fases: la fase interna (FI) y la fase externa (FE). La primera consiste en el núcleo de la microcápsula, mientras que la segunda se refiere al material que recubre al núcleo. <sup>(27)</sup> La FE tiene la función de aislar y proteger a las sustancias encapsuladas del ambiente externo. <sup>(26)</sup> En el caso de una microesfera, el material de recubrimiento (FE) también se conoce como la matriz. <sup>(28)</sup> Las diferencias estructurales entre microesferas y microcápsulas se ilustran en la figura 1.



**Figura 1.** Diferencias estructurales entre microesferas y microcápsulas.

**Fuente:** Oxley J. Overview of microencapsulation process technologies. En: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R. Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide. Estados Unidos: Elsevier; 2014. p. 35-46.

Respecto al tamaño de partícula del producto obtenido mediante la microencapsulación, si se encuentra entre 3 y 800  $\mu\text{m}$ , se conocen como micropartículas, microcápsulas o microesferas, donde la diferencia radica en la morfología y estructura interna de la partícula. Si el tamaño de partícula es menor a 1  $\mu\text{m}$ , se conocen como nanopartículas, nanocápsulas o nanoesferas. En el caso de que el tamaño de partícula sea superior a 1000  $\mu\text{m}$ , se les conoce como macropartículas. (26)

Existen diferentes razones por las cuales se utiliza la microencapsulación para modificar tecnológicamente un principio activo. Algunas de estas son: (26,27)

- Proteger sustancias sensibles del ambiente externo.
- Enmascarar propiedades organolépticas de la sustancia (color, sabor u olor).
- Obtener una liberación controlada del fármaco.
- Asegurar el manejo seguro de materiales tóxicos.
- Obtener una liberación selectiva del fármaco.
- Evitar efectos adversos, como la irritación gastrointestinal.
- Convertir sustancias líquidas en un polvo que fluye libremente.
- Prevenir incompatibilidades entre diferentes fármacos.
- Prevenir vaporización de sustancias volátiles.
- Alterar el sitio de absorción del PA.

El efecto terapéutico se va a lograr cuando las microcápsulas liberan el contenido del núcleo. Esto se puede llevar a cabo a partir de diferentes mecanismos, por ejemplo por ruptura mecánica de la pared de la cápsula, por disolución o fusión de la pared o por difusión a través de la pared.<sup>(27)</sup>

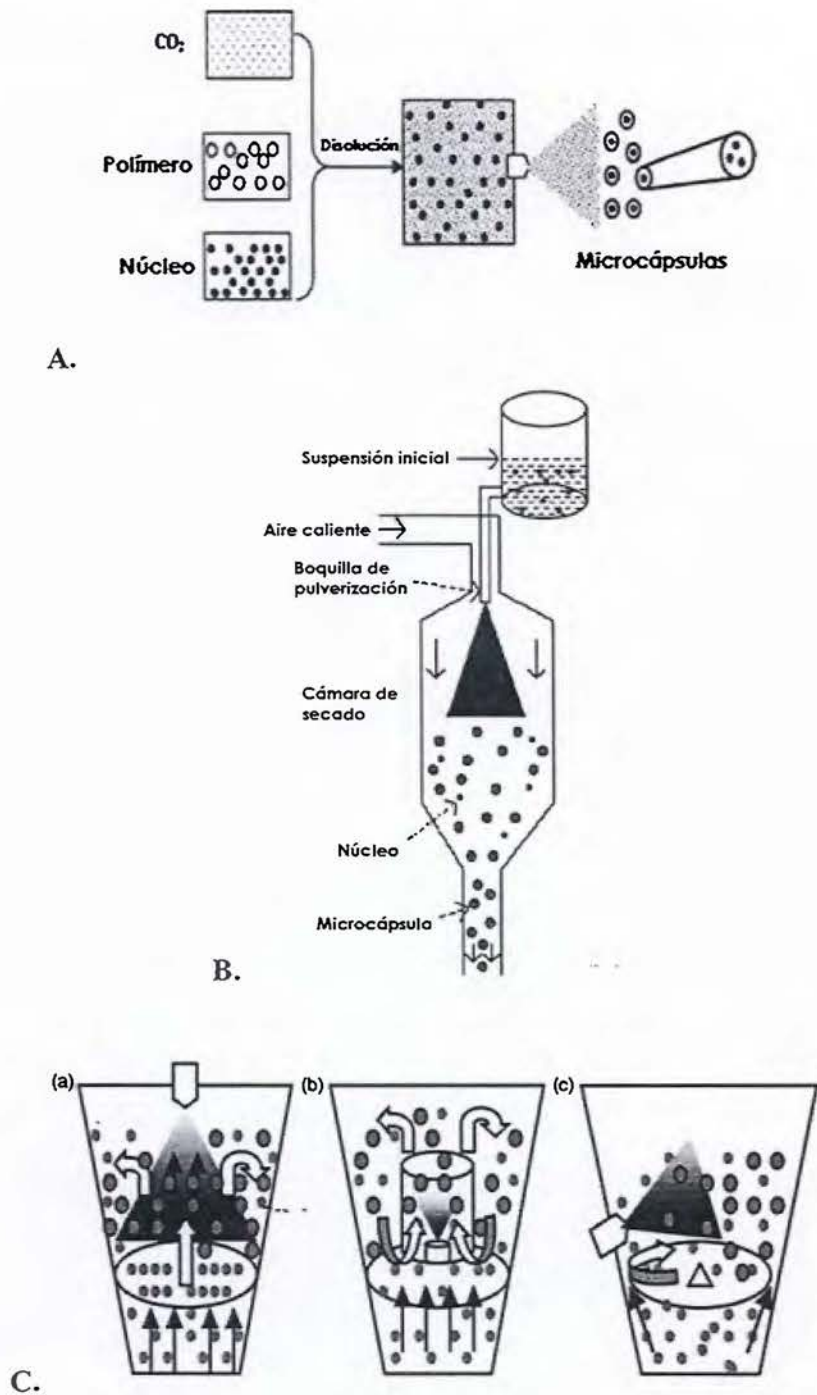
### **3.3.1.2. Métodos de microencapsulación**

Los métodos utilizados para microencapsular sustancias se pueden dividir en: métodos químicos, métodos fisicoquímicos y métodos fisicomecánicos.<sup>(26)</sup> En la tabla 2 se describen las principales técnicas de microencapsulación correspondientes a cada método mencionado.



Tabla 2. Clasificación y descripción de las principales técnicas de microencapsulación.

| Clasificación           | Método   | Descripción  | Fuente     |
|-------------------------|--|--|------------|
| Métodos Químicos        | Polimerización interfacial                                   | Consiste en la formación de la cápsula sobre la superficie de la gota o partícula, a partir de la polimerización de monómeros. Las gotas son formadas por emulsificación de una fase orgánica que contiene al material del núcleo y a un monómero reactivo liposoluble (comúnmente es un isocianato o un cloruro de un ácido orgánico) en una fase acuosa. Se añade un monómero reactivo hidrosoluble (generalmente con grupos amino primarios) produciéndose la reacción de polimerización. | (26,29)    |
|                         | Polimerización <i>in situ</i>                                | Similar a la polimerización interfacial, pero no se añaden compuestos reactivos al material del núcleo. En este caso la polimerización se lleva a cabo únicamente en la fase continua y no en la interfase con las gotas de fase dispersa.   | (26,29)    |
| Métodos Físicoquímicos  | Coacervación y separación de fases                           | Es la desolvatación parcial de una disolución homogénea del polímero. La <u>coacervación simple</u> consiste en la adición de un agente de desolvatación para promover la separación de fases. Por otro lado, la <u>coacervación compleja</u> implica la formación de un complejo entre dos polímeros de carga opuesta, conocidos como polielectrolitos (polianión y policación). Se puede usar como policación la <u>gelatina</u> y como polianión la <u>goma arábiga</u> .                 | (26,29)    |
|                         | Encapsulación por expansión rápida de fluidos supercríticos. | El CO <sub>2</sub> es uno de los compuestos más utilizados como fluido supercrítico. El proceso consiste en mantener al fluido supercrítico, que contiene al PA y al material formador de la cápsula, a alta presión y luego se lleva a presión atmosférica a través de una boquilla. El cambio repentino de presión provoca la coprecipitación de ambas sustancias (Ver figura 2.A).  | (26,30,31) |
| Métodos Físicomecánicos | Secado por nebulización ( <i>Spray drying</i> )              | Las partículas del núcleo se dispersan en una disolución de polímero, se transportan a través de una corriente de gas (puede ser nitrógeno comprimido) y se atomiza en una cámara caliente que favorece el secado de las partículas (Ver figura 2.B).  | (26,29)    |
|                         | Tecnología de lecho fluido                                   | El material de recubrimiento líquido se rocía sobre las partículas del núcleo. La rápida evaporación facilita la formación de una capa externa sobre las partículas (Ver figura 2.C).  | (26,32)    |
|                         | Evaporación de disolvente                                    | Son necesarias tres fases: el núcleo, el material de recubrimiento y un vehículo líquido de fabricación. Se disuelve o dispersa el material del núcleo en una solución del polímero de recubrimiento (en un disolvente volátil). Esta mezcla se agrega al vehículo y se calienta para evaporar el disolvente del polímero, y de esta manera se forma la microcápsula.  | (26,27)    |
|                         | Recubrimiento en bombo ( <i>Pan coating</i> )                | La solución de recubrimiento se aplica por atomización a las partículas del núcleo que se encuentran en un bombo. Para evaporar el disolvente de la solución de recubrimiento se utiliza aire caliente que pasa por las partículas recubiertas.  | (26,27)    |
|                         | Recubrimiento por suspensión en aire                         | Las partículas se recubren mientras se encuentran suspendidas en una corriente de aire ascendente.   | (26,27)    |



**Figura 2.** Técnicas de microencapsulación. A. Microencapsulación por expansión rápida de fluidos supercríticos. B. Microencapsulación por el método de secado por nebulización. C. Microencapsulación en lecho fluido. (a) Atomización superior, (b) atomización inferior y (c) atomización lateral.

**Fuente:** Modificado de Jyothi NV, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. J Microencapsul. 2010; 27(3): 187-197.

### 3.3.2. Transportadores coloidales

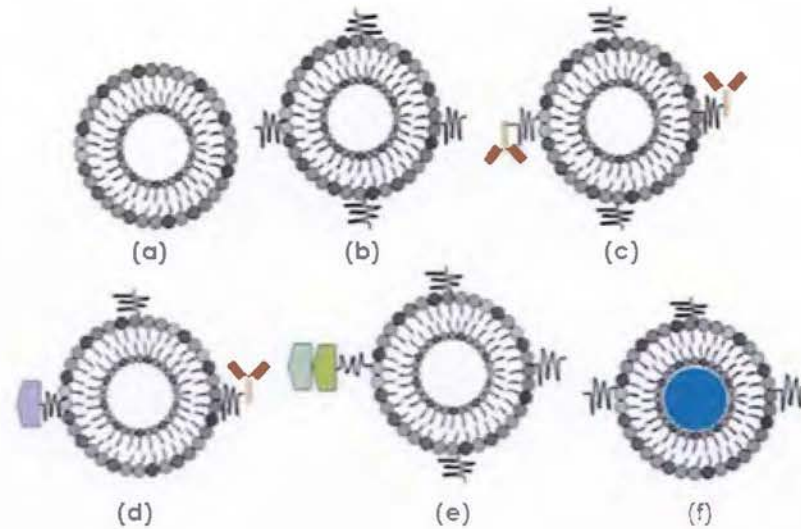
#### 3.3.2.1. Generalidades

Dentro de los sistemas transportadores de fármacos, se encuentran los sistemas coloidales, los cuales incluyen: micelas, nanoemulsiones,<sup>(23)</sup> liposomas, nanosuspensiones y nanopartículas poliméricas.<sup>(9,23)</sup>

Los sistemas basados en polímeros incluyen a los conjugados solubles polímero-fármaco, nanocápsulas poliméricas y nanoesferas. Dentro de las desventajas que presentan este tipo de sistemas se puede mencionar la presencia de residuos de disolventes orgánicos utilizados en la producción de los polímeros, la citotoxicidad del polímero y las dificultades que presenta el escalamiento del proceso productivo. Además se debe tomar en cuenta la hidrólisis del polímero durante el almacenamiento y que para prevenir la degradación del mismo, en algunas ocasiones es necesaria la liofilización.<sup>(23)</sup>

En el caso de los liposomas, estos consisten en vesículas esféricas compuestas por una bicapa de fosfolípidos. La figura 3 representa diferentes tipos de liposomas. Los fármacos lipofílicos se incorporan dentro de la bicapa, mientras que los de naturaleza hidrofílica se solubilizan en el interior acuoso del liposoma.<sup>(23,33)</sup> Dentro de las ventajas que presenta este tipo de transportador, se menciona la buena biocompatibilidad, baja toxicidad, no producen la activación del sistema inmune y permiten dirigir compuestos bioactivos al sitio de acción.<sup>(33)</sup>





**Figura 3.** Representación de sistemas basados en liposomas. (a) liposoma convencional, (b) Liposoma recubierto con conjugado polimérico como PEG, (c) Liposoma unido a un ligando funcional, (d) Liposoma con un único ligando y anticuerpo, (e) Ligando duplicado, (f) Liposoma cargado con gas perfluorocarburo.

**Fuente:** Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, Ndesendo VM. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv.* 2010; 2011: 1-19.

Las nanosuspensiones son dispersiones de partículas coloidales del fármaco, estabilizadas por medio de un tensioactivo, <sup>(23,34)</sup> un polímero o una mezcla de ambos. <sup>(34)</sup> Se pueden obtener a partir de sistemas de molienda y homogenización a alta presión. <sup>(23,35)</sup> El primero presenta la desventaja de que el fármaco puede sufrir transformaciones de la forma cristalina durante el procedimiento. <sup>(35)</sup>

Dentro de las ventajas que han demostrado las nanosuspensiones, se puede citar que tienen una alta concentración de fármaco, baja incidencia de efectos adversos atribuidos a los excipientes y un bajo costo. Además pueden ser administradas por vía oral, parenteral, pulmonar, tópica u ocular. <sup>(34)</sup>

Por otro lado, las nanoemulsiones consisten en una dispersión nanométrica de aceite y agua estabilizada por una interfase de moléculas de tensioactivo, alcanzando un tamaño de globulillo menor a 100 nm. Este tipo de formulación tiene una mayor capacidad de solubilización que las soluciones micelares y además su estabilidad termodinámica permite que tengan una larga vida media. <sup>(36)</sup> Es importante mencionar que la nanoemulsificación requiere de poca energía. <sup>(36,37)</sup>

### 3.3.2.2. Nanopartículas lipídicas (NL)

Las nanopartículas lipídicas son un sistema de transporte de fármacos alternativo a las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas. Se pueden dividir en dos grupos principales.<sup>(38)</sup>

- Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).
- Transportadores lipídicos nanoestructurados (TLN).

Estos tipos de nanopartículas lipídicas, se han investigado para la administración por las siguientes vías: parenteral, oral, ocular, pulmonar y tópica.<sup>(38)</sup> Específicamente para la administración oral, las NL se pueden formular como dispersiones acuosas, tabletas, pellets, cápsulas y otras formas farmacéuticas.<sup>(9)</sup> Además se ha demostrado su eficacia como sistemas de liberación capaces de mejorar la biodisponibilidad oral de diferentes fármacos.<sup>(39)</sup>

El aumento en la biodisponibilidad oral, se puede atribuir al incremento en el área superficial de las partículas, lo que permite mejorar la velocidad de disolución y aumentar la cantidad de principio activo disuelto en los fluidos gastrointestinales. Además las NL pueden aumentar el tiempo de residencia del fármaco en el tracto digestivo, ya que tienen la posibilidad de adherirse a la pared gastrointestinal,<sup>(9)</sup> por el pequeño tamaño de partícula que se encuentra entre 50 nm y 1000 nm.<sup>(9,40)</sup>

Las NL aumentan la permeabilidad del fármaco a través de las bicapas lipídicas del epitelio y además facilitan la absorción linfática del fármaco, lo que evita el metabolismo hepático. (39,41) Otra ventaja consiste en que la matriz lipídica disminuye la exposición del fármaco al sistema intestinal de eflujo.<sup>(39)</sup>

Además este tipo de sistemas de transporte son capaces de ser cargados con moléculas lipofílicas e hidrofílicas,<sup>(9,23)</sup> incluyendo también compuestos lábiles como proteínas y péptidos.<sup>(9)</sup>

Las NL son bien toleradas en organismos vivos si son preparadas con excipientes fisiológicamente adecuados,<sup>(9)</sup> ya que estos presentan una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad.<sup>(39)</sup> Las NLS están compuestas por lípidos que son sólidos a temperatura ambiente y temperatura corporal.<sup>(9,39)</sup>



Las NLS han presentado algunas limitaciones. Por ejemplo, la capacidad de carga con el fármaco es limitada, se puede dar pérdida de encapsulación del fármaco durante el almacenamiento y las dispersiones acuosas de NLS tienen un alto contenido de agua (70 – 95 %).<sup>(42)</sup> Esto ha llevado al desarrollo de una nueva generación de nanopartículas lipídicas: los TLN, que han demostrado una mayor capacidad de carga para un número superior de fármacos, respecto a las NLS. Además, los TLN evitan o minimizan la pérdida de encapsulación del fármaco durante el almacenamiento.<sup>(38)</sup>

Los TLN corresponden a la segunda generación de nanopartículas lipídicas, donde la principal diferencia con las NLS es que se pueden sustituir parcialmente los lípidos sólidos por lípidos líquidos al mezclar ambos tipos de lípidos. Sin embargo se debe considerar que la mezcla debe ser sólida a 40 °C.<sup>(9,39)</sup>

Esta diferencia respecto a las NLS genera una nanoestructuración de la matriz lipídica, es decir la matriz se vuelve menos ordenada, con muchas imperfecciones, lo cual va a generar un aumento de la capacidad de carga del fármaco y disminuye la posibilidad de pérdida de encapsulación. Además permite una mayor flexibilidad respecto a la modulación de la liberación del fármaco.<sup>(9)</sup>

Como se ha mencionado, las NL permiten controlar la liberación del fármaco que contienen, por lo que es importante conocer algunos factores que influyen en su liberación:

- Existe una relación inversa entre la liberación de fármaco y su coeficiente de partición octanol-agua.<sup>(43)</sup>
- Se logra una mayor liberación de fármaco cuando se tiene una mayor área superficial, es decir menor tamaño de partícula (en el rango de nanómetros).<sup>(43)</sup>
- Se obtiene una liberación lenta cuando el fármaco se encuentra homogéneamente disperso en el lípido.<sup>(43)</sup>
- Existe una relación inversa entre la cristalización del transportador lipídico y el grado de movilidad del fármaco. Si la movilidad del fármaco es alta (baja cristalización del lípido), se logra una rápida liberación.<sup>(43)</sup>
- Es posible alcanzar una liberación inicial rápida si la formación de las NL se da a alta temperatura y con una alta concentración de tensioactivo.<sup>(44)</sup>

### 3.3.2.2.1. Producción de nanopartículas lipídicas

Los componentes principales de las NL incluyen lípidos, agentes emulsificantes y agua. La función de los emulsificantes es prevenir la aglomeración de las partículas, lo cual se logra de una manera más eficiente si se utilizan combinaciones de este tipo de compuestos. <sup>(23)</sup>

Respecto al proceso de producción, existen varios métodos que permiten la obtención de este tipo de transportadores de fármacos. Los cinco principales son:

- Homogenización a alta presión (HAP) en caliente o en frío. <sup>(23,40,45-47)</sup>
- Evaporación de disolvente. <sup>(23,47,48)</sup>
- Difusión de disolvente. <sup>(44,47,48)</sup>
- Dilución de microemulsión. <sup>(45,47,49)</sup>
- Técnica de ultrasonido. <sup>(23,25,45)</sup>

De manera general, el primer paso consiste en formar una nanoemulsión con el lípido, el tensioactivo y el fármaco. El paso siguiente consiste en la solidificación de las nanogotas para obtener NL. <sup>(45)</sup>

La homogenización a alta presión se ha utilizado durante mucho tiempo en la producción de nanoemulsiones para nutrición parenteral. Es importante mencionar que en la mayoría de los casos, el proceso de escalamiento no representa problemas, lo que lo convierte en uno de los mejores métodos para producir NL. <sup>(23,40)</sup>

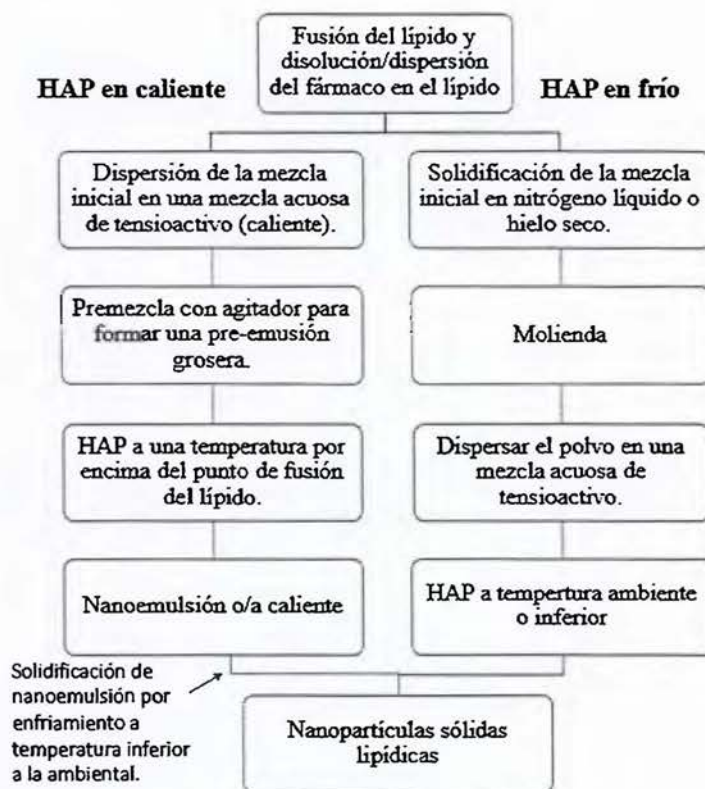
En general, un homogenizador de alta presión promueve el paso de un líquido, mediante una presión de 100-2000 bar, a través de un agujero estrecho que se encuentra en el rango de unos pocos micrómetros. El fluido, en una corta distancia, logra acelerarse a una alta velocidad (por encima de 1000 km/h), lo cual proporciona un alto estrés de cizalla y fuerzas de cavitación que promueven el rompimiento de las partículas hasta un rango submicrométrico. <sup>(23)</sup>

Existen dos tipos de HAP: en caliente y en frío. Ambos métodos se ilustran en la figura 4. El primero consiste en desarrollar el procedimiento a temperaturas por encima del punto de fusión del lípido, puesto que a mayor temperatura se produce un menor tamaño de partícula, debido a la disminución de la viscosidad de la fase interna. Sin embargo, la alta temperatura puede generar la degradación del fármaco y el transportador. Se debe tomar en cuenta que si se



aumenta la presión o el número de ciclos de homogenización, se puede dar un incremento del tamaño de partícula, debido a fenómenos de coalescencia generados por el aumento en la energía cinética.<sup>(23)</sup>

Por otro lado, la HAP en frío se lleva a cabo principalmente cuando se necesita formar NL de principios activos termolábiles.<sup>(45)</sup> En este caso, se utiliza el lípido en estado sólido, por lo que se da una molienda de una suspensión a alta presión.<sup>(23,47)</sup> Es importante cuidar la temperatura con el fin de no llegar a fundir el lípido durante el procedimiento.<sup>(23)</sup>



**Figura 4.** Procedimiento general de formación de nanopartículas sólidas lipídicas por homogenización a alta presión en frío y en caliente.

**Fuente:** Modificado de Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012; 64:83-101.

En cuanto al método de evaporación de disolvente, éste consiste en la disolución del lípido en un disolvente orgánico y en la posterior emulsificación de esta mezcla con una fase acuosa. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, se forma una dispersión de nanopartículas debido a la precipitación del lípido en el medio acuoso.<sup>(23,47)</sup> El tamaño de

partícula promedio es de 30 nm a 100 nm<sup>(47)</sup> y depende de la concentración del lípido en la fase orgánica; a menor concentración de lípidos, menor tamaño de partícula. Éste método permite obtener partículas de menor tamaño que las obtenidas cuando se emulsifica por fusión del lípido.<sup>(23)</sup> A pesar de esta ventaja, presenta el riesgo de generar problemas toxicológicos por residuos del disolvente orgánico. De ahí la importancia de elegir disolventes y tensioactivos de baja toxicidad.<sup>(47)</sup>

El método de difusión de disolvente, es similar al descrito anteriormente, pero se basa en la miscibilidad acuosa del disolvente orgánico en que se disuelven los lípidos. Al transferir una emulsión oleo-acuosa en agua, el material lipofílico disuelto en el disolvente orgánico solidifica de inmediato, debido a la difusión del disolvente orgánico desde los globulillos hacia la fase continua.<sup>(47,48)</sup> A partir de esto surge una de las ventajas que presenta este método, ya que generalmente la velocidad de difusión del disolvente orgánico miscible en agua hacia la fase acuosa, es muy rápida.<sup>(44)</sup> Además, el método de difusión de disolvente permite obtener partículas con tamaños inferiores a los 200 nm y muy baja polidispersidad.<sup>(47,48)</sup> A partir de una metodología basada en el método de difusión de disolvente, se desarrollaron los transportadores lipídicos diseñados en esta investigación.

En el caso de la dilución de microemulsión, consiste en dispersar la microemulsión caliente en agua fría (2 – 3 °C), con agitación.<sup>(23,49)</sup> Un amplio diferencial de temperatura facilita la cristalización y evita la agregación de partículas. La proporción microemulsión:agua por lo general se encuentra entre 1:25 y 1:50.<sup>(23)</sup>

Por último, la técnica de ultrasonido se puede llevar a cabo con una sonda de procesamiento ultrasónico.<sup>(23)</sup> El ultrasonido se aplica a una mezcla de lípidos, tensioactivo y agua (conocida como preemulsión). Permite el rompimiento de globulillos por cavitación acústica, lo que genera la formación de nanopartículas que posteriormente se solidifican por enfriamiento.<sup>(50)</sup>

Este método permite obtener un tamaño de partícula pequeño (entre 30 nm y 80 nm). Sin embargo para lograrlo se necesita la aplicación de ultrasonido por largos periodos de tiempo (más de 15 minutos), lo que pone en riesgo el desprendimiento de partículas metálicas de la sonda y la consecuente contaminación de la muestra.<sup>(23,50)</sup> Otra desventaja de este método es que se dificulta dispersar de manera homogénea altas concentraciones de grasa, por lo que el uso de esta técnica es limitado si hay una alta concentración de lípidos.<sup>(23)</sup>



### 3.3.3. Agentes modificadores del desempeño de transportadores lipídicos

Con el fin de mejorar las características de liberación del principio activo formulado en algún tipo de transportador como los que se han mencionado, se ha optado por la adición de diferentes excipientes a la matriz lipídica. Por ejemplo se ha reportado el uso de diferentes tipos de Aerosil® hidrofílico en transportadores hidrofóbicos para mejorar las propiedades de liberación del principio activo <sup>(51,52)</sup> Otros de los beneficios que se han descrito al utilizar este excipiente es el mejoramiento del flujo y la uniformidad del tamaño de partícula de las microesferas. <sup>(53)</sup>

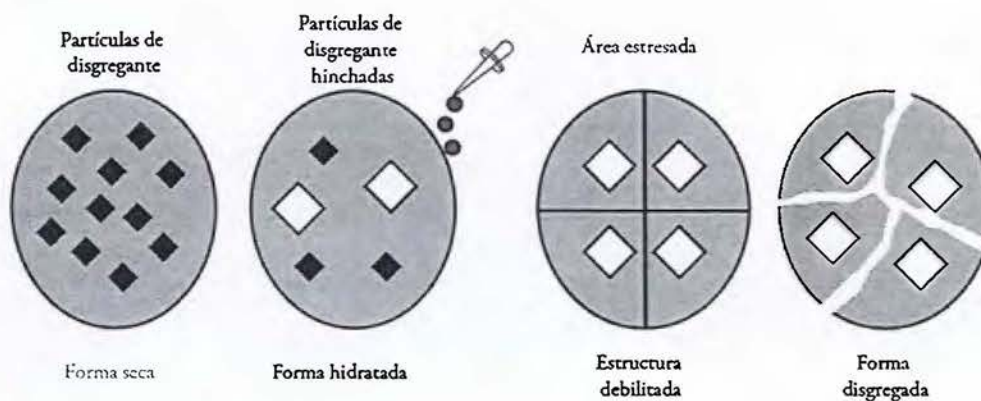
El Aerosil® es uno de los productos comerciales del dióxido de silicio coloidal (SiO<sub>2</sub>). Consiste en un tipo de sílice altamente disperso, amorfo y submicroscópico, <sup>(51,54)</sup> cuyas propiedades se pueden controlar mediante condiciones de reacción apropiadas y modificaciones de la superficie. Estas modificaciones afectan el tamaño de partícula, el área superficial, la naturaleza hidrofílica y la densidad. <sup>(51)</sup>

El Aerosil® hidrofílico se identifica con un número que se refiere al área superficial específica (m<sup>2</sup>/g). Uno de los más comunes en el área farmacéutica es el Aerosil® 200, el cual tiene diferentes aplicaciones. Por ejemplo en la manufactura de tabletas, se utiliza como adsorbente de humedad, deslizante y como desintegrante al influenciar la absorción de agua. Además este excipiente tiene propiedades como agente aumentador de viscosidad y estabilizador de emulsiones. <sup>(51,54)</sup>

Los tensioactivos consisten en otro tipo de excipientes que han sido estudiados como aditivos de microesferas lipídicas. Por ejemplo se han usado tensioactivos iónicos como el colato de sodio, no iónicos como los polisorbatos, anfotéricos como los fosfolípidos e incluso se han utilizado estabilizadores poliméricos como los poloxámeros y alcoholes polivinílicos. <sup>(38)</sup> Este tipo de sustancias pueden generar distintos efectos a nivel de distribución del tamaño de partícula, potencial zeta y estructura cristalina del TLN. <sup>(45)</sup>

La crospovidona es un desintegrante insoluble en agua, con apariencia de polvo blanco, estructura porosa y gran área superficial. Se utiliza ampliamente en la formulación de comprimidos. <sup>(55)</sup> Se han descrito diferentes mecanismos que explican la acción de los desintegrantes en la ruptura de tabletas. Por ejemplo, se ha considerado que la crospovidona utiliza, parcialmente, el hinchamiento, que consiste en que las partículas del desintegrante se

hinchán al entrar en contacto con un medio adecuado, lo que genera la ruptura de la matriz.<sup>(55,56)</sup> Lo anterior se ilustra en la figura 5.



**Figura 5.** Mecanismo de desintegración por hinchamiento.

**Fuente:** Hernández-Torres JE, Melgoza-Contreras LM. Principales superdisgregantes sintéticos, mecanismos y factores que influyen en su actividad. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2014;43(2):234–47.

Sin embargo, los mecanismos principales que caracterizan la efectividad de la crospovidona como desintegrante se basan en la porosidad y la acción capilar.<sup>(55–57)</sup> Las partículas de crospovidona aumentan la porosidad y promueven la formación de vías que favorecen la penetración de fluidos dentro de la tableta. La entrada de líquidos se lleva a cabo por capilaridad, rompiéndose así enlaces entre las partículas de la matriz, lo que provoca la ruptura del comprimido.<sup>(55,56)</sup>

Por otro lado, se ha reportado la capacidad de la crospovidona en el mejoramiento de la solubilidad de fármacos de difícil disolución, esto mediante la técnica de co-evaporación. Este procedimiento consiste en la adsorción del principio activo en la crospovidona, en presencia de un disolvente adecuado, el cual es posteriormente evaporado.<sup>(54)</sup>



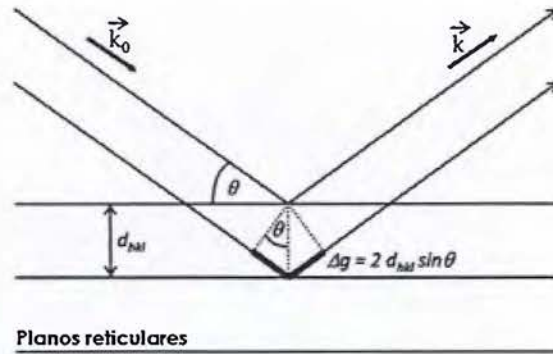
### 3.4. Técnicas de caracterización de microesferas lipídicas

#### 3.4.1. Difractometría de Rayos X

La Difractometría de Rayos X (DRX) y la Calorimetría Diferencial de Barrido son técnicas utilizadas para determinar la forma cristalina del lípido y del fármaco disperso en la matriz lipídica. <sup>(39)</sup>

El uso de la DRX en la cristalografía data de 1915, cuando Bragg recibió el Premio Nobel por desarrollar esta técnica para determinar la estructura reticular de cristales utilizando la interferencia de ondas en sólidos. <sup>(58)</sup> En la actualidad esta técnica permite estudiar los cambios en la microestructura de los transportadores lipídicos nanoestructurados. <sup>(59)</sup>

En general, la DRX se puede describir en términos de óptica geométrica. Cuando una onda incidente con el vector de onda  $k_0$  es dispersada por el plano reticular de un cristal, los rayos paralelos difractados tienen que desplazarse diferentes distancias a través del cristal. Geométricamente la diferencia de longitud está dada por  $\Delta g = 2d \times \text{sen } \theta$ , donde  $d$  es la distancia entre dos planos reticulares continuos y  $\theta$  es el ángulo entre la radiación incidente y el plano. La diferencia de distancia puede causar un cambio de fase que lleve a la extinción de la onda, esto en caso de que exista un gran número de planos paralelos. A partir de esto, se sabe que la interferencia entre los rayos difractados es constructiva solo en caso de que el cambio de fase sea cero, lo cual se da cuando la diferencia en la distancia es un múltiplo entero de la longitud de onda, es decir  $\Delta g = n\lambda$ . Si se combina con la ecuación geométrica descrita anteriormente, <sup>(60)</sup> se obtiene la ecuación de Bragg, para la interferencia constructiva:  $2d \times \text{sen } \theta = n\lambda$ . Esto se ilustra en la figura 6. <sup>(60,61)</sup>



**Figura 6.** Representación gráfica de la ley de Bragg.

**Fuente:** Modificado de Borchert H. X-Ray Diffraction. En: Hull R, Jagadish C, Osgood R, Parisi J, Uchida S, Wang Z, editores. Solar Cells Based on Colloidal Nanocrystals. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 79-94.

Los rayos X se pueden generar mediante diferentes métodos. Uno de los más comunes consiste en el empleo de dos electrodos: un cátodo y un ánodo, sellados dentro de un tubo al vacío. El cátodo, hecho de un filamento, se calienta y los electrones son emitidos bajo un voltaje aplicado. Si el voltaje de aceleración de una fuente de voltaje es aplicado al ánodo, los electrones serán acelerados hacia el ánodo con una energía cinética  $KE$ , que es igual a la carga del electrón. Los electrones a alta velocidad, chocan contra los átomos del metal del ánodo y se desaceleran. Algunos de estos electrones desacelerados, con energía  $KE'$ , irradian una onda electromagnética transversal con una longitud de onda en el rango de los Rayos X. Esto ocurre si la energía cinética del electrón incidente es suficientemente alta y si la deflexión del ángulo de electrones de los átomos del metal, es amplia. Los rayos X generados pasan a través de una ventana de Berilio y chocan contra la muestra, que se encuentra en un goniómetro. <sup>(58)</sup>

### 3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es una técnica que, entre otras funciones, permite detectar reacciones inducidas por la temperatura, mediante la monitorización de la capacidad aparente de calentamiento de una muestra, en relación con una referencia, en función de la temperatura.<sup>(62)</sup> Es decir, esta técnica permite medir temperaturas y flujos de calor relacionados con transiciones de fase de la materia (cristalización, fusión y evaporación) o con reacciones químicas (hidrólisis y oxidación), como función de la



temperatura y el tiempo.<sup>(63)</sup> La figura 7 muestra el aspecto característico de los termogramas obtenidos por DSC.

En la DSC se calientan de forma independiente la muestra y la referencia. Esto permite medir directamente la diferencia en flujo de calor necesaria para mantener una temperatura igual en ambas, por lo que los datos se obtienen en diferencial de calor entrante respecto a la temperatura ( $dH/dT$ ).<sup>(64)</sup>



**Figura 7.** Representación de termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.

**Fuente:** Sandoval A, Rodríguez E, Fernández A. Aplicación de análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*. 2005; 72 (146): 45-53.

Generalmente, los equipos de DSC utilizan portamuestras de aluminio. Con el fin de obtener un pico definido y de alta resolución, se sugiere que la superficie de contacto entre el recipiente y la muestra sea la máxima. Además, la calibración del aparato se realiza con un metal de alta pureza, del cual se debe conocer la entalpía y el punto de fusión. El más utilizado es el Indio, cuya entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) es de 28,55 J/g y el punto de fusión es de 429,8 K.<sup>(64)</sup>

Esta técnica calorimétrica ha sido muy utilizada en el análisis de aceites y grasas,<sup>(63,65,66)</sup> ya que el perfil térmico que genera se puede relacionar con propiedades físicas y químicas de estos materiales.<sup>(63)</sup> La DSC se puede utilizar para el control de calidad durante el fraccionamiento de algunos aceites como el de palma. Además es útil en la caracterización de perfiles térmicos de aceites,<sup>(63)</sup> en estudios de cinética de oxidación y de estabilidad oxidativa de grasas, así como en la determinación de compuestos polares en aceites.<sup>(63,65)</sup>

En el caso del análisis de aceites y grasas, el aspecto más importante de las características físicas corresponde a los cambios de fase de sólido a líquido (fusión) y de líquido a sólido (cristalización).<sup>(65,66)</sup> El primer proceso resulta en una expansión de volumen y en un efecto térmico negativo (endotérmico), mientras que el segundo cambio de fase genera una contracción de volumen y un efecto térmico positivo (exotérmico).<sup>(65)</sup>

La DSC se ha utilizado para determinar el estado y cristalinidad de dispersiones lipídicas, sistemas semisólidos, polímeros y liposomas.<sup>(45)</sup> En relación con las microesferas y nanopartículas lipídicas, este análisis se lleva a cabo con el fin de confirmar la asociación entre el lípido y el fármaco en la partícula lipídica.<sup>(25)</sup> Además permite el estudio del comportamiento de fusión y cristalización de materiales cristalinos como las nanopartículas lipídicas.<sup>(45)</sup>

### **3.4.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF)**

El espectro infrarrojo (IR) se ubica entre las longitudes de onda de 0,78  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, las frecuencias de vibración de la mayoría de moléculas, se encuentran en el espectro IR intermedio, entre 2,5  $\mu\text{m}$  y 25  $\mu\text{m}$ . El espectro IR se ubica entre la región visible (longitudes de onda superiores al IR) y la región de microondas (longitudes de onda inferiores al rango IR).<sup>(67)</sup> Como se muestra en la figura 8.

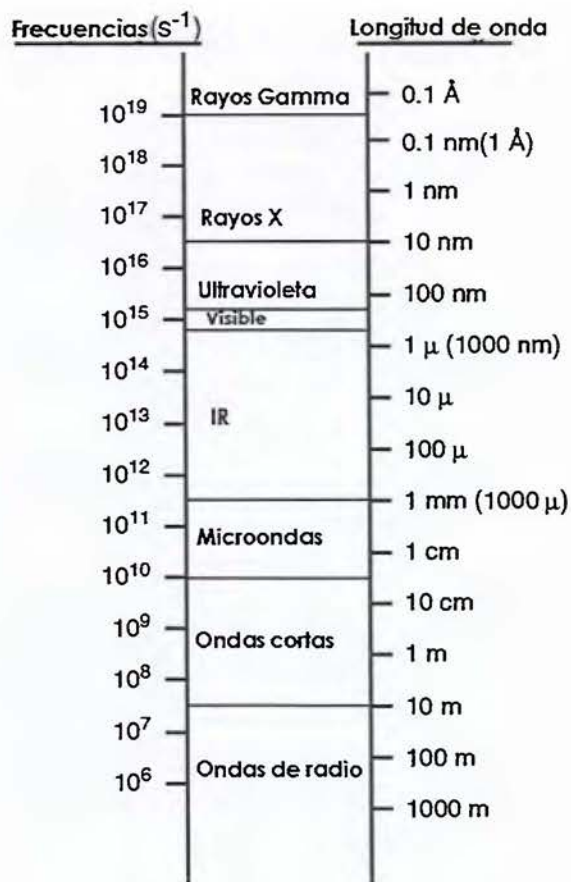


Figura 8. Espectro electromagnético.

**Fuente:** Modificado de Alvarez A, Prieto M. Technical and Methodological Aspects of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology Research. En: Hartel R, editor. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology. New York: Springer US; 2012. p. 1-17.

La espectroscopia infrarroja es una técnica rápida y no destructiva que requiere una cantidad mínima de muestra necesaria para el análisis.<sup>(68)</sup> Esta técnica estudia la relación entre la materia y la energía irradiada en el rango infrarrojo (IR). Este efecto se evalúa mediante la medición de la absorción de diferentes frecuencias IR por una muestra situada en la trayectoria de un haz IR.<sup>(67,69)</sup> La absorción de energía se da a frecuencias correspondientes al modo de vibración molecular de la molécula o grupo químico determinado, debido a que diferentes grupos funcionales absorben energía a frecuencias de radiación IR características. Esta técnica se usa en la identificación de muestras e investigación de estructuras moleculares.<sup>(67)</sup> Otro de los usos se da en la determinación de interacciones moleculares entre un principio activo y los excipientes con que se formula.<sup>(70)</sup>



Cuando la radiación IR es absorbida por una molécula, la energía asociada se convierte en varios tipos de movimientos de vibraciones o rotación, dependiendo de si cambia la longitud o el ángulo del enlace. Las vibraciones se dividen en dos tipos principales: vibraciones de estiramiento (simétrico o asimétrico) y vibraciones de flexión (tijeras, balanceo, oscilación y torsión).<sup>(67,71)</sup>

Dentro de las ventajas que ofrece la espectroscopia IR con transformada de Fourier respecto a la espectroscopia IR convencional, se pueden citar su sensibilidad mayor<sup>(67,71)</sup> y la mayor rapidez con que se obtiene un espectro de absorción reconocible.<sup>(67,69)</sup>

## 4. Metodología

### 4.1. Materiales

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Ácido Clorhídrico.             | Metanol.                                |
| Aerosil® 200 (sílice coloidal) | Monoestearato de glicerilo              |
| Albendazol                     | Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)        |
| Crospovidona                   | Polivinilpirrolidona K25                |
| Etanol                         | Poloxámero 407                          |
| Hidróxido de Sodio             | Triglicérido de ácido cáprilico/cáprico |

### 4.2. Procedimiento general de formación de microesferas lipídicas

Se siguió el método de difusión de disolvente descrito por Hu *et al*, para la formación de transportadores lipídicos nanoestructurados, con algunas modificaciones.<sup>(72)</sup> Los procedimientos se describen a continuación, como métodos A, B y C.

**Método A:** Inicialmente se disolvió el monoestearato de glicerilo (MG), el triglicérido de ácido cáprilico/cáprico (TCC) y el poloxámero 407 en 60 mL de etanol, en un baño de agua a 55 °C. Posteriormente se dispersó el Albendazol (ABZ) en dicha solución. La suspensión orgánica resultante se dispersó rápidamente en 50 mL de una solución acuosa de poloxámero 407 al 0,2 % p/v y se mantuvo con agitación mecánica a 600 rpm en un baño de agua a 55 °C durante 3 minutos.

Con el fin de favorecer la formación de las microesferas, se agregaron 300 mL de agua destilada fría (5 – 10 °C) y se trasladó la dispersión a un baño de agua con hielo, sin detener la agitación. La agitación se detuvo cuando la dispersión registró una temperatura de 20 °C aproximadamente. Se dejó reposar, para promover la sedimentación de las microesferas y se decantó el líquido sobrenadante. Las microesferas se colocaron en toallas de papel absorbente y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas, en un desecador con sílica.

Posteriormente se pesaron y envasaron las microesferas en recipientes de vidrio, con cierre de rosca y cubiertos de papel aluminio para brindar protección de la luz.

**Método B:** Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero se reemplazaron algunos de los materiales. Los lípidos se mantuvieron, el poloxámero 407 que se agregaba inicialmente junto con los lípidos, se cambió por polietilenglicol 6000 (PEG 6000). Además la fase acuosa que consistía en 50 mL de poloxámero 407 al 0,2 % p/v, se sustituyó por 100 mL de polivinilpirrolidona K25 al 0,2 % p/v.

**Método C:** En este caso se procedió a disolver el principio activo en 25 mL de metanol acidificado. Posteriormente se disolvieron los lípidos y el PEG 6000 en la disolución de ABZ, con agitación manual, en un baño de agua a 55 °C. La solución orgánica resultante se dispersó rápidamente en 100 mL de una solución acuosa de polivinilpirrolidona K25 al 0,2 % p/v y se mantuvo con agitación mecánica a 600 rpm en un baño de agua a 55 °C durante 3 minutos. Se agregaron 300 mL de agua destilada fría (5 – 10 °C) y se trasladó la dispersión a un baño de agua con hielo, sin detener la agitación.

La agitación se detuvo cuando la dispersión registró una temperatura de 20 °C aproximadamente. Se dejó reposar, para promover la sedimentación de las microesferas y se decantó el líquido sobrenadante. Las microesferas se colocaron en toallas de papel absorbente y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas, en un desecador con sílica. Posteriormente se pesaron y envasaron las microesferas en recipientes de vidrio, con cierre de rosca y cubiertos de papel aluminio para brindar protección de la luz.

#### **4.2.1. Preparación de microesferas lipídicas simples**

Se prepararon tres formulaciones diferentes de microesferas lipídicas, donde se varió la proporción de triglicérido de ácido caprílico/cáprico en la fase lipídica de la siguiente manera: 0 %, 12,5 % y 25 %. La cantidad de ABZ con que se cargaron las microesferas se estableció en 15 % peso/peso del total de la fórmula y la proporción de poloxámero 407 respecto a la fase lipídica se estableció en 1:1. La tabla 3 detalla la composición de las microesferas lipídicas simples, procesadas según el método A.



**Tabla 3.** Composición de las microesferas lipídicas simples, obtenidas por el método A.

| Código | Porcentaje peso/peso TCC en FL | Material       | Porcentaje peso/peso | Masa (g) |
|--------|--------------------------------|----------------|----------------------|----------|
| MLS-1A | 0                              | Poloxámero 407 | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | MG             | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | TCC            | 0,0                  | 0,00     |
|        |                                | ABZ            | 15,0                 | 1,50     |
|        |                                | <b>Total</b>   |                      | 10,0     |
| MLS-2A | 12,5                           | Poloxámero 407 | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | MG             | 37,2                 | 3,72     |
|        |                                | TCC            | 5,3                  | 0,53     |
|        |                                | ABZ            | 15,0                 | 1,50     |
|        |                                | <b>Total</b>   |                      | 10,0     |
| MLS-3A | 25                             | Poloxámero 407 | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | MG             | 31,9                 | 3,19     |
|        |                                | TCC            | 10,6                 | 1,06     |
|        |                                | ABZ            | 15,0                 | 1,50     |
|        |                                | <b>Total</b>   |                      | 10,0     |

A partir de los resultados obtenidos en esta primera fase del proyecto, se seleccionó la fórmula que incluye un 25 % de TCC en la FL para llevar a cabo modificaciones en la composición de las microesferas con el fin de mejorar el desempeño de las mismas. A partir de esto se produjeron las microesferas lipídicas simples con los métodos B y C, manteniendo la proporción de TCC en 25 %, respecto al total de la FL. La composición de estas microesferas se describe en la tabla 4.

**Tabla 4.** Composición de las microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos B (MLS-3B) y C (MLS-3C).

| Código | Porcentaje peso/peso TCC en FL | Material     | Porcentaje peso/peso | Masa (g) |
|--------|--------------------------------|--------------|----------------------|----------|
| MLS-3B | 25                             | PEG 6000     | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | MG           | 31,9                 | 3,19     |
|        |                                | TCC          | 10,6                 | 1,06     |
|        |                                | ABZ          | 15,0                 | 1,50     |
|        |                                | <b>Total</b> |                      | 10,0     |
| MLS-3C | 25                             | PEG 6000     | 42,5                 | 4,25     |
|        |                                | MG           | 31,9                 | 3,19     |
|        |                                | TCC          | 10,6                 | 1,06     |
|        |                                | ABZ          | 15,0                 | 1,50     |
|        |                                | <b>Total</b> |                      | 10,0     |

Además, las microesferas lipídicas se caracterizaron en cuanto a: morfología, tamaño, porcentaje de carga, porcentaje de encapsulación y ensayos de disolución. También se utilizó la calorimetría diferencial de barrido, con el fin de describir el comportamiento térmico y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para estudiar interacciones entre el principio activo y los excipientes. La metodología correspondiente se describe en los apartados 4.3, 4.4 y 4.5.

#### 4.2.2. Preparación de microesferas lipídicas con agente formador de poros

Se utilizó dióxido de silicio coloidal (Aerosil® 200) como agente formador de poros, en tres concentraciones diferentes: 2%, 4% y 6% del peso total.<sup>(53)</sup> En el método C se probó, además, la incorporación del excipiente al 7% y 8%. Se siguió el mismo procedimiento descrito en 4.3 Procedimiento general de formación de microesferas lipídicas, con una única modificación, que consistió en suspender el dióxido de silicio (previamente tamizado por una malla de 180 µm) en la solución/suspensión de MG, TCC, poloxámero 407 (o PEG 6000) y ABZ. La proporción de TCC en la fase lipídica se estableció en 25 %, debido a que fue la fórmula que dio el mejor desempeño respecto al ensayo de disolución de las microesferas lipídicas simples. El ABZ se mantuvo en 15% del peso total de la fórmula. Las tablas 5 y 6 detallan la composición de las microesferas producidas.

**Tabla 5.** Composición de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.

| <b>Código</b>  | <b>Material</b> | <b>Porcentaje peso / peso</b> | <b>Masa (g)</b> |
|----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| <b>MLAP-1A</b> | Poloxámero 407  | 41,5                          | 4,15            |
|                | MG              | 31,1                          | 3,11            |
|                | TCC             | 10,4                          | 1,04            |
|                | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Aerosil         | 2,0                           | 0,20            |
|                | <b>Total</b>    |                               |                 |
| <b>MLAP-2A</b> | Poloxámero 407  | 40,5                          | 4,05            |
|                | MG              | 30,4                          | 3,04            |
|                | TCC             | 10,1                          | 1,01            |
|                | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Aerosil         | 4,0                           | 0,40            |
|                | <b>Total</b>    |                               |                 |
| <b>MLAP-3A</b> | Poloxámero 407  | 39,5                          | 3,95            |
|                | MG              | 29,6                          | 2,96            |
|                | TCC             | 9,9                           | 0,99            |
|                | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Aerosil         | 6,0                           | 0,60            |
|                | <b>Total</b>    |                               |                 |

Es importante mencionar que las microesferas MLAP-3A no se pudieron formar, ya que al aumentar la cantidad de Aerosil® 200 disminuyó demasiado el tamaño de partícula y no se pudieron recuperar las microesferas. Por esto y por las propiedades de tensioactivo del poloxámero 407, que generaba porcentajes de rendimiento muy bajos, se decidió continuar las siguientes modificaciones solo con los métodos B y C.



**Tabla 6.** Composición de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por los métodos B y C.

| Código       | Material     | Porcentaje peso / peso | Masa (g) |
|--------------|--------------|------------------------|----------|
| MLAP-1B      | PEG 6000     | 41,5                   | 4,15     |
|              | MG           | 31,1                   | 3,11     |
|              | TCC          | 10,4                   | 1,04     |
| MLAP-1C      | ABZ          | 15,0                   | 1,50     |
|              | Aerosil      | 2,0                    | 0,20     |
|              | <b>Total</b> |                        | 10,0     |
| MLAP-2B      | PEG 6000     | 40,5                   | 4,05     |
|              | MG           | 30,4                   | 3,04     |
|              | TCC          | 10,1                   | 1,01     |
| MLAP -2C     | ABZ          | 15,0                   | 1,50     |
|              | Aerosil      | 4,0                    | 0,40     |
|              | <b>Total</b> |                        | 10,0     |
| MLAP-3B      | PEG 6000     | 39,5                   | 3,95     |
|              | MG           | 29,6                   | 2,96     |
|              | TCC          | 9,9                    | 0,99     |
| MLAP-3C      | ABZ          | 15,0                   | 1,50     |
|              | Aerosil      | 6,0                    | 0,60     |
|              | <b>Total</b> |                        | 10,0     |
| MLAP-5C      | PEG 6000     | 39,0                   | 3,90     |
|              | MG           | 29,2                   | 2,92     |
|              | TCC          | 9,8                    | 0,98     |
|              | ABZ          | 15,0                   | 1,50     |
|              | Aerosil      | 7,0                    | 0,70     |
| <b>Total</b> |              | 10,0                   |          |
| MLAP -4C     | PEG 6000     | 38,5                   | 3,85     |
|              | MG           | 28,9                   | 2,89     |
|              | TCC          | 9,6                    | 0,96     |
|              | ABZ          | 15,0                   | 1,50     |
|              | Aerosil      | 8,0                    | 0,8      |
| <b>Total</b> |              | 10,0                   |          |

#### 4.2.3. Preparación de microesferas lipídicas con desintegrante

Como agente desintegrante, se utilizó Crospovidona en tres concentraciones diferentes: 2%, 4% y 6% del peso total. Se siguió el procedimiento descrito en 4.3 Procedimiento general de formación de microesferas lipídicas, específicamente se llevaron a cabo los métodos B y C, con la modificación de suspender la Crospovidona (previamente tamizado por una malla de 180  $\mu\text{m}$ ) en la solución/suspensión de MG, TCC, PEG 6000 y ABZ. La proporción de TCC en la fase lipídica se estableció en 25 %, debido a que, como se verá más adelante, fue la fórmula que dio

el mejor desempeño respecto al ensayo de disolución de las microesferas lipídicas simples del método A. El ABZ se mantuvo en 15% del peso total de la fórmula. La tabla 7 detalla la composición de las microesferas producidas.

**Tabla 7.** Composición de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por los métodos B y C.

| <b>Código</b>  | <b>Material</b> | <b>Porcentaje peso / peso</b> | <b>Masa (g)</b> |
|----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| <b>MLD-1B</b>  | PEG 6000        | 41,5                          | 4,15            |
|                | MG              | 31,1                          | 3,11            |
|                | TCC             | 10,4                          | 1,04            |
| <b>MLD-1C</b>  | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Crospovidona    | 2,0                           | 0,20            |
| <b>Total</b>   |                 |                               | <b>10,0</b>     |
| <b>MLD-2B</b>  | PEG 6000        | 40,5                          | 4,05            |
|                | MG              | 30,4                          | 3,04            |
|                | TCC             | 10,1                          | 1,01            |
| <b>MLD -2C</b> | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Crospovidona    | 4,0                           | 0,40            |
| <b>Total</b>   |                 |                               | <b>10,0</b>     |
| <b>MLD-3B</b>  | PEG 6000        | 39,5                          | 3,95            |
|                | MG              | 29,6                          | 2,96            |
|                | TCC             | 9,9                           | 0,99            |
| <b>MLD-3C</b>  | ABZ             | 15,0                          | 1,50            |
|                | Crospovidona    | 6,0                           | 0,60            |
| <b>Total</b>   |                 |                               | <b>10,0</b>     |

#### 4.2.4. Preparación de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante

Se formularon microesferas con una combinación de dióxido de silicio coloidal y Crospovidona en distintas proporciones: 25:75, 50:50, 75:25. Esta combinación correspondió al 6% del peso total de la formulación. Se siguió el mismo procedimiento descrito en 4.3 Procedimiento general de formación de microesferas lipídicas, específicamente se llevaron a cabo los métodos B y C, con la modificación de suspender la Crospovidona y el Dióxido de silicio coloidal (previamente tamizados por una malla de 180  $\mu\text{m}$ ) en la solución/suspensión de MG, TCC, PEG 6000 y ABZ. La proporción de TCC en la fase lipídica se estableció en 25 %, debido a que fue la fórmula que dio el mejor desempeño respecto al ensayo de disolución de las microesferas lipídicas simples.

El ABZ se mantuvo en 15% del peso total de la fórmula. La tabla 8 detalla la composición de las microesferas producidas.

**Tabla 8.** Composición de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por los métodos B y C.

| <b>Código</b> | <b>Proporción<br/>Aerosil : Crospovidona</b> | <b>Material</b> | <b>Porcentaje<br/>peso / peso</b> | <b>Masa<br/>(g)</b> |      |
|---------------|--|-----------------|-----------------------------------|---------------------|------|
| MLC-1B        | 25 : 75                                      | PEG 6000        | 39,5                              | 3,95                |      |
|               |  | MG              | 29,6                              | 2,96                |      |
|               |  | TCC             | 9,9                               | 0,99                |      |
| MLC-1C        |  | ABZ             | 15,0                              | 1,50                |      |
|               |  | Aerosil         | 1,5                               | 0,15                |      |
|               |  | Crospovidona    | 4,5                               | 0,45                |      |
| <b>Total</b>  |  |                 |                                   | 10,0                |      |
| MLC-2B        |  | 50 : 50         | PEG 6000                          | 39,5                | 3,95 |
|               |  |                 | MG                                | 29,6                | 2,96 |
|               | TCC  |                 | 9,9                               | 0,99                |      |
| MLC-2C        | ABZ  |                 | 15,0                              | 1,50                |      |
|               | Aerosil                                      |                 | 3,0                               | 0,30                |      |
|               | Crospovidona                                 |                 | 3,0                               | 0,30                |      |
| <b>Total</b>  |  |                 |                                   | 10,0                |      |
| MLC-3B        | 75 : 25                                      |                 | PEG 6000                          | 39,5                | 3,95 |
|               |  |                 | MG                                | 29,6                | 2,96 |
|               |  | TCC             | 9,9                               | 0,99                |      |
| MLC-3C        |  | ABZ             | 15,0                              | 1,50                |      |
|               |  | Aerosil         | 4,5                               | 0,45                |      |
|               |  | Crospovidona    | 1,5                               | 0,15                |      |
| <b>Total</b>  |  |                 |                                   | 10,0                |      |



### **4.3. Caracterización de microesferas lipídicas**

#### **4.3.1. Morfología y tamaño**

La forma y tamaño de las microesferas lipídicas se determinaron mediante un microscopio óptico Olympus CX31, las muestras se visualizaron con aumento de 4X y se analizaron con el programa ImageJ.

#### **4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se utilizó un calorímetro Setaram STA, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica. Se tomaron aproximadamente 10 mg de la muestra y se depositaron en el portamuestras de aluminio. La medición se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min, en un rango de temperaturas de 25 °C a 250 °C. El análisis se desarrolló bajo una purga de Helio y se utilizó como muestra de referencia un portamuestras de aluminio vacío. Se analizaron los lípidos y polímeros puros, el Albendazol y las microesferas.

#### **4.3.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF)**

Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrometer Spectrum 1000, del Laboratorio de Servicios Analíticos (LASA) de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. Se utilizaron pastillas de KBr y un detector de Tantalato de Litio. El análisis se llevó a cabo en una región de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , a una velocidad de 0,3  $\text{cm/s}$  y una resolución de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ , en intervalos de 2,0  $\text{cm}^{-1}$ . Se analizó el principio activo y las formulaciones que dieron mejor desempeño en el ensayo de disolución.

### **4.4. Valoración de microesferas lipídicas**

Para determinar el contenido real de ABZ en las microesferas, se siguió el procedimiento descrito para uniformidad de contenido en la monografía de tabletas de Albendazol de la USP 38 <sup>(73)</sup> con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Cada fórmula se analizó por triplicado.

Para preparar la solución de prueba, se colocó una muestra de microesferas equivalente a 40 mg de ABZ en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregaron aproximadamente 60 mL de

metanol acidificado y se agitó mecánicamente durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente se diluyó a volumen con metanol acidificado y se mezcló.

Se filtró una porción de la solución, descartando los primeros 20 mL del filtrado. Se transfirió 1,0 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 200 mL, se diluyó a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y se mezcló.

Para preparar la solución estándar se pesaron, con exactitud, alrededor de 90 mg de Albendazol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL, se agregaron 10 mL de metanol acidificado y se agitó para disolver. Se diluyó a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y se mezcló. Se transfirieron 5,0 mL de la solución preparada a un matraz volumétrico de 200 mL, se diluyó a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y se mezcló.

Para preparar el metanol acidificado, se midieron aproximadamente 500 mL de metanol y se colocaron en un matraz volumétrico de 1000 mL, se agregaron 20 mL de ácido clorhídrico, se diluyó a volumen con metanol y se mezcló.

Se determinó la absorbancia de la solución estándar y la solución de prueba a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 308 nm, y se utilizó hidróxido de sodio 0,1 N como blanco.

La cantidad en miligramos de Albendazol contenida en la muestra de microesferas se determinó con la siguiente fórmula:

$$20 C (A_u/A_s)$$

Donde C es la concentración en  $\mu\text{g/mL}$  del estándar de referencia de Albendazol en la preparación estándar,  $A_u$  y  $A_s$  corresponden a las absorbancias a 308 nm obtenidas con la solución de prueba y la solución estándar respectivamente.

A partir del resultado de la valoración, se calculó el porcentaje de encapsulación del principio activo, según la fórmula:<sup>(2)</sup>

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{PA encapsulado}}{\text{Contenido teórico de PA}} \times 100$$

De igual manera se calculó el porcentaje de carga en términos de porcentaje peso/peso del principio activo en la composición de las microesferas.



#### 4.5. Ensayo de disolución de ABZ

Se siguió la metodología descrita en la monografía de tabletas de Albendazol de la USP 38<sup>(73)</sup>. El medio de disolución fue de 900 mL de ácido clorhídrico 0,1 N a 37 °C ± 0,5 °C y se utilizó el aparato 2 a 50rpm durante 30 minutos. Se utilizaron muestras de microesferas lipídicas equivalentes a 200 mg de ABZ. Además, con el fin de facilitar la incorporación e interacción de las microesferas con el medio de disolución, estas fueron mezcladas con 3 % de laurilsulfato de sodio. Cada fórmula se analizó por triplicado.

El procedimiento consistió en transferir 10,0 mL de una porción filtrada de la solución en análisis a un matraz volumétrico de 250 mL, se diluyó a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y se mezcló. Se determinó la absorbancia de esta solución y la solución estándar a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 308nm, se utilizó hidróxido de sodio 0,1N como blanco.

Se calculó la cantidad, en miligramos, de ABZ disuelto mediante la siguiente fórmula:

$$22,5C (Au/As)$$

Donde C es la concentración en µg/mL del estándar de referencia de Albendazol en la preparación estándar, Au y As corresponden a las absorbancias a 308 nm obtenidas con la solución de prueba y la solución estándar respectivamente.

El criterio de aceptación USP es que no menos de 85 % (Q + 5 %) de la cantidad declarada de ABZ debe haberse disuelto en 30 minutos.

#### 4.6. Determinación de la linealidad del método espectrofotométrico

Se siguió el método descrito por Ugalde.<sup>(8)</sup> Para preparar una solución madre de Albendazol, se pesó con exactitud 100 mg de Albendazol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL, se utilizó metanol acidificado para disolver y llevar a volumen.

Se transfirieron 3,0 mL, 4,0 mL, 4,5 mL, 5,0 mL y 7,0 mL de la solución madre a matraces volumétricos de 200 mL y se diluyó a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N. A partir de esto se obtuvieron soluciones de Albendazol con las siguientes concentraciones: 6 µg/mL, 8 µg/mL, 9 µg/mL, 10 µg/mL y 14 µg/mL. La preparación de cada solución se llevó a cabo por triplicado.



Se determinó la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente 308 nm, usando hidróxido de sodio 0,1 N como blanco.

Para comprobar la linealidad de la medición y obtener el coeficiente de determinación, se utilizó la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \alpha l C_s$$

Donde A es la absorbancia medida,  $\alpha$  representa el coeficiente de absorbancia,  $l$  es la longitud atravesada por la luz en el medio y  $C_s$  es la concentración de la solución de Albendazol en microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.7. Análisis de datos

El análisis cuantitativo se llevó a cabo para las pruebas de valoración de microesferas lipídicas y el ensayo de disolución. Los datos se expresaron como promedios con desviación estándar (DE). Las diferencias significativas se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor y prueba de Tukey *post hoc*. La significancia estadística se dio por un valor de  $p < 0,05$ , donde 0,05 corresponde al error tipo  $\alpha$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 para el análisis estadístico y Microsoft Excel 2013 para la tabulación de datos.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Estudios preliminares

Al inicio de esta investigación se formularon las microesferas únicamente con los lípidos: Monoestearato de glicerilo y triglicérido de ácido cáprilico/cáprico y el principio activo. Sin embargo durante los ensayos preliminares para evaluar la viabilidad de dichas fórmulas, se encontró que las microesferas flotaban en el medio de disolución y no se lograba liberar el principio activo de la matriz, por lo que se decidió incorporar en la fórmula de los transportadores un polímero hidrofílico que ayudara a mejorar la densidad de los mismos. Inicialmente se utilizó el poloxámero 407, sin embargo por las propiedades tensioactivas que presenta dicho polímero, se favorecía la emulsificación de las grasas en la fase acuosa y se obtenían rendimientos muy bajos, por lo que se realizó el cambio por PEG 6000, el cual carece de la función de agente emulsificante.

En uno de los métodos utilizados, que se describe más adelante, fue necesario seleccionar un sistema de disolventes apropiado para solubilizar por completo el principio activo y que además mantuviera la compatibilidad con el método de difusión de disolvente, se determinó la utilidad del metanol acidificado, después de descartar el etanol, metanol, acetona, metanol:etanol (1:1), etanol: acetona (1:1) y metanol:acetona (1:1). Para preparar el metanol acidificado se midieron 500 mL de metanol y se colocaron en un matraz volumétrico de 1000 mL, se agregaron 20 mL de ácido clorhídrico, se diluyó a volumen con metanol y se mezcló.

Respecto al procedimiento general de producción de microesferas lipídicas se siguió el método de difusión de disolvente descrito por Hu *et al.*, para la formación de transportadores lipídicos nanoestructurados, con algunas modificaciones.<sup>(72)</sup> Respecto a los cambios que se hicieron a la metodología original, se puede mencionar que en lugar de utilizar alcohol polivinílico como agente viscosizante de la fase acuosa, se utilizó poloxámero 407. Este polímero cumplía la misma función en el aumento de la viscosidad. Sin embargo como se mencionó anteriormente, al tener propiedades tensioactivas afectaba el rendimiento de la producción, por lo que posteriormente se cambia por polivinilpirrolidona K25. Este último compuesto se empleó como agente viscosizante de la fase acuosa y como coloide protector para evitar la coalescencia de los globulillos de la fase oleosa al inicio de la emulsificación.



Además, al finalizar la emulsificación, la adición de HCl no presentó ningún beneficio, por lo que se descartó y se optó por agregar agua destilada fría y manteniendo la agitación, se pasó la dispersión a un baño de agua con hielo, esto con el fin de promover el endurecimiento de las microesferas y evitar la aglomeración de las mismas.

## 5.2. Morfología y tamaño de partícula

La tabla 9 muestra el resultado de la determinación del tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas mediante el método A. En estos resultados no se evidencia una tendencia clara en el tamaño de partícula de las diferentes fórmulas, que se pudiera atribuir al aumento de la concentración de TCC, lo cual coincide con otros estudios similares, en los cuales se ha establecido que el contenido de lípido líquido no tiene influencia en el tamaño de los transportadores lipídicos.<sup>(72,74)</sup> En el caso de la incorporación de Aerosil® 200 se esperaba observar un efecto de disminución del tamaño de partícula, debido al cambio de viscosidad generado por el excipiente<sup>(51,54)</sup>, sin embargo los resultados más bien demuestran un aumento en el diámetro de partícula respecto a las microesferas simples (MLS-3A).

La morfología de los transportadores obtenidos mediante este método, se puede ver en la figura 9. Se observa que no presentan forma esférica, sino que tienden a ser de formas y tamaños irregulares, con bordes imperfectos que podrían aumentar el área superficial en contacto con el medio de disolución.

**Tabla 9.** Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método A.

| Código  | Rango de tamaño (µm) |        | Promedio ± DE<br>(n = 15) |
|---------|----------------------|--------|---------------------------|
|         | Mínimo               | Máximo |                           |
| MLS-1A  | 160,4                | 473,8  | 306,0 ± 88,91             |
| MLS-2A  | 266,5                | 836,1  | 440,6 ± 155,9             |
| MLS-3A  | 164,5                | 420,4  | 295,6 ± 81,94             |
| MLAP-1A | 347,2                | 661,8  | 511,6 ± 86,31             |
| MLAP-2A | 269,9                | 639,0  | 422,6 ± 101,7             |

Los tamaños correspondientes a los transportadores producidos a partir del método B, se presentan en la tabla 10. En general, no se puede notar una tendencia al comparar los tamaños de partícula promedio de las microesferas modificadas con las distintas combinaciones y concentraciones de Aerosil® 200 y crospovidona, respecto a los diámetros de partícula



correspondientes a las microesferas simples, a excepción de la fórmula con mayor concentración de crospovidona (6%, fórmula MLD-3B), donde se nota una disminución importante del tamaño.

En referencia a la morfología de las microesferas obtenidas por el método B, la figura 10 demuestra que con todas las fórmulas se obtuvieron transportadores con apariencia esférica.

**Tabla 10.** Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método B.

| Código  | Rango de tamaño ( $\mu\text{m}$ ) |        | Promedio $\pm$ DE<br>(n = 15) |
|---------|-----------------------------------|--------|-------------------------------|
|         | Mínimo                            | Máximo |                               |
| MLS-3B  | 206,8                             | 371,6  | 306,4 $\pm$ 47,85             |
| MLAP-1B | 202,0                             | 368,7  | 248,0 $\pm$ 48,13             |
| MLAP-2B | 150,5                             | 406,0  | 284,9 $\pm$ 68,06             |
| MLAP-3B | 139,7                             | 471,7  | 285,2 $\pm$ 113,0             |
| MLD-1B  | 191,5                             | 547,6  | 277,4 $\pm$ 87,88             |
| MLD-2B  | 187,2                             | 426,9  | 313,6 $\pm$ 76,95             |
| MLD-3B  | 93,84                             | 224,1  | 160,2 $\pm$ 37,09             |
| MLC-1B  | 130,4                             | 468,6  | 248,5 $\pm$ 90,73             |
| MLC-2B  | 106,8                             | 349,6  | 243,9 $\pm$ 73,70             |
| MLC-3B  | 119,3                             | 295,1  | 203,1 $\pm$ 47,27             |

En el caso de las microesferas obtenidas por el método C, cuyos resultados se encuentran en la tabla 11, se puede ver una disminución en el tamaño de partícula a partir del uso de concentraciones de Aerosil® 200 de 4% (MLAP-2C) o mayores (MLAP-3C, MLAP-4C y MLAP-5C), al comparar con los resultados de los transportadores simples (MLS-3C). En los casos en que se incorpora agente desintegrante a la fórmula original, no se evidencia una tendencia clara en el efecto de la concentración de dicho agente en el tamaño de partícula, aunque al igual que en el método B, al utilizar la mayor concentración del desintegrante (MLD-3C) se obtiene una considerable disminución del tamaño de partícula. Al utilizar la combinación de excipientes, se evidencia una disminución en el tamaño promedio respecto a las microesferas simples evaluadas.

Respecto a la morfología de estos transportadores, la figura 11 muestra que poseen formas y tamaños irregulares, con bordes indefinidos (múltiples pliegues).

**Tabla 11.** Tamaño de partícula de las microesferas lipídicas obtenidas por el método C.

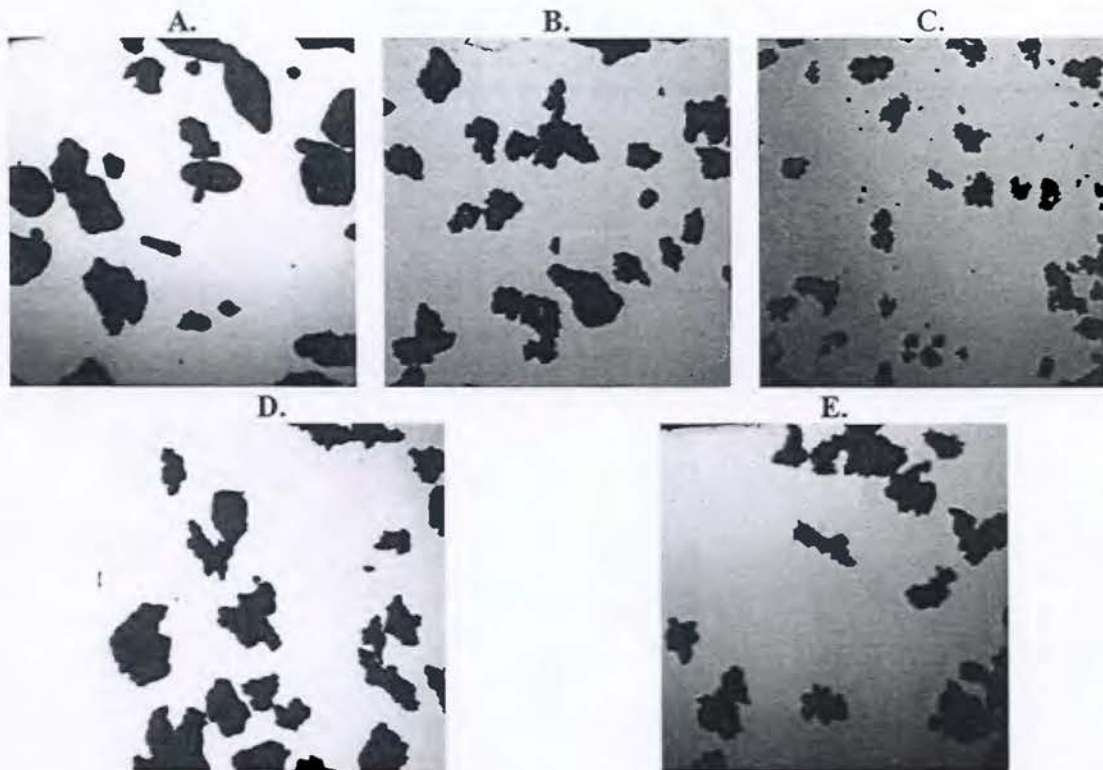
| Código  | Rango de tamaño (µm) |        | Promedio ± DE<br>(n = 15) |
|---------|----------------------|--------|---------------------------|
|         | Mínimo               | Máximo |                           |
| MLS-3C  | 177,4                | 680,1  | 379,8 ± 178,0             |
| MLAP-1C | 249,9                | 1312,0 | 589,7 ± 322,7             |
| MLAP-2C | 114,9                | 474,4  | 216,7 ± 106,7             |
| MLAP-3C | 99,38                | 455,1  | 230,6 ± 83,95             |
| MLAP-5C | 106,1                | 398,5  | 205,2 ± 79,61             |
| MLAP-4C | 152,7                | 380,6  | 253,2 ± 77,93             |
| MLD-1C  | 206,6                | 593,9  | 369,1 ± 107,8             |
| MLD-2C  | 123,5                | 693,9  | 260,5 ± 137,0             |
| MLD-3C  | 131,5                | 433,4  | 249,1 ± 105,3             |
| MLC-1C  | 161,5                | 388,4  | 275,2 ± 69,11             |
| MLC-2C  | 161,4                | 466,9  | 281,8 ± 89,69             |
| MLC-3C  | 175,9                | 536,0  | 292,5 ± 104,8             |

En el caso del Aerosil® 200, se ha reportado que este excipiente tiene la capacidad de actuar como agente aumentador de la viscosidad <sup>(51,54)</sup>, lo que genera una disminución en el tamaño de las micropartículas.<sup>(51)</sup> Este efecto se evidenció únicamente en los transportadores lipídicos del método C.

Respecto al efecto de la crospovidona, a pesar de que no se encontró el uso de este excipiente como parte de la formulación de transportadores lipídicos, se podría atribuir el efecto en el tamaño de partícula a la misma razón descrita para el Aerosil® 200, ya que se ha estudiado la capacidad de algunos superdesintegrantes (glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y crospovidona) como aumentadores de la viscosidad. Los desintegrantes al entrar en contacto con un fluido adecuado, se hinchan y aumentan su tamaño. La absorción del líquido conduce a un aumento de la concentración efectiva de los solutos y a una disminución del volumen de fluido libre, lo cual reduce el movimiento del líquido y esto genera el aumento en la viscosidad.  
(75)

A pesar de que ambos excipientes se adicionan originalmente en la fase orgánica, se debe tomar en cuenta que cierta cantidad logra pasar a la fase acuosa, donde al aumentar la viscosidad se logra una mayor dispersión de la fase orgánica, formando globulillos más pequeños que después de la difusión de disolvente y enfriamiento van a generar micropartículas sólidas de menor tamaño. El estudio de Quintanar-Guerrero *et al.* demuestra que al preparar nanopartículas de

ácido poli(DL-láctico) mediante la técnica de difusión de disolvente, el tamaño promedio de las nanopartículas disminuye conforme se aumenta la viscosidad de la fase externa. <sup>(76,77)</sup>



**Figura 9.** Morfología de las microesferas lipídicas obtenidas por el método A. A. MLS-1A. B. MLS-2A. C. MLS-3A. D. MLAP-1A. E. MLAP-2A.



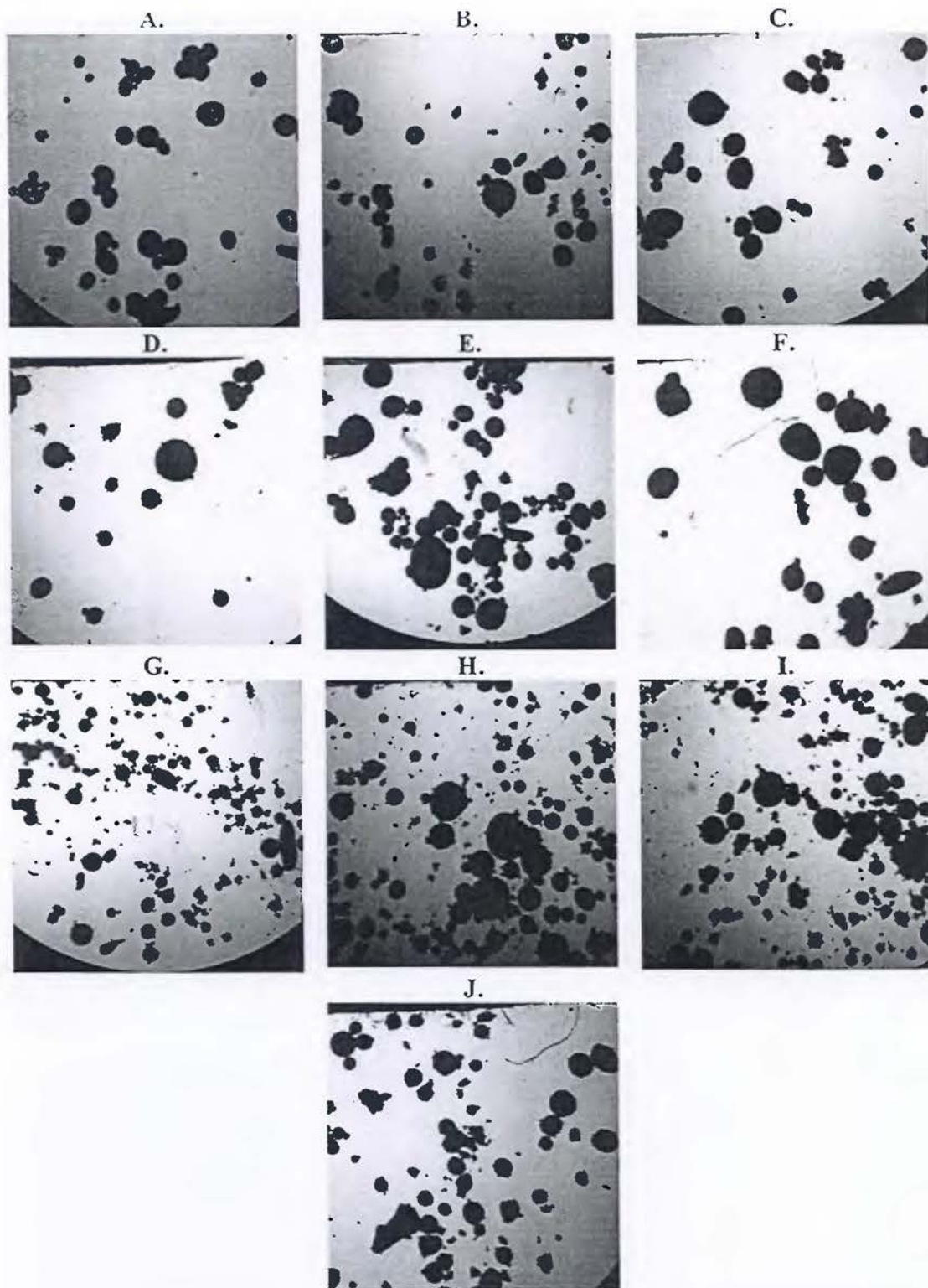


Figura 10. Morfología de las microsferas lipídicas obtenidas por el método B. A. MLS-3B. B. MLAP-1B. C. MLAP-2B. D. MLAP-3B. E. MLD-1B. F. MLD-2B. G. MLD-3B. H. MLC-1B. I. MLC-2B. J. MLC-3B.

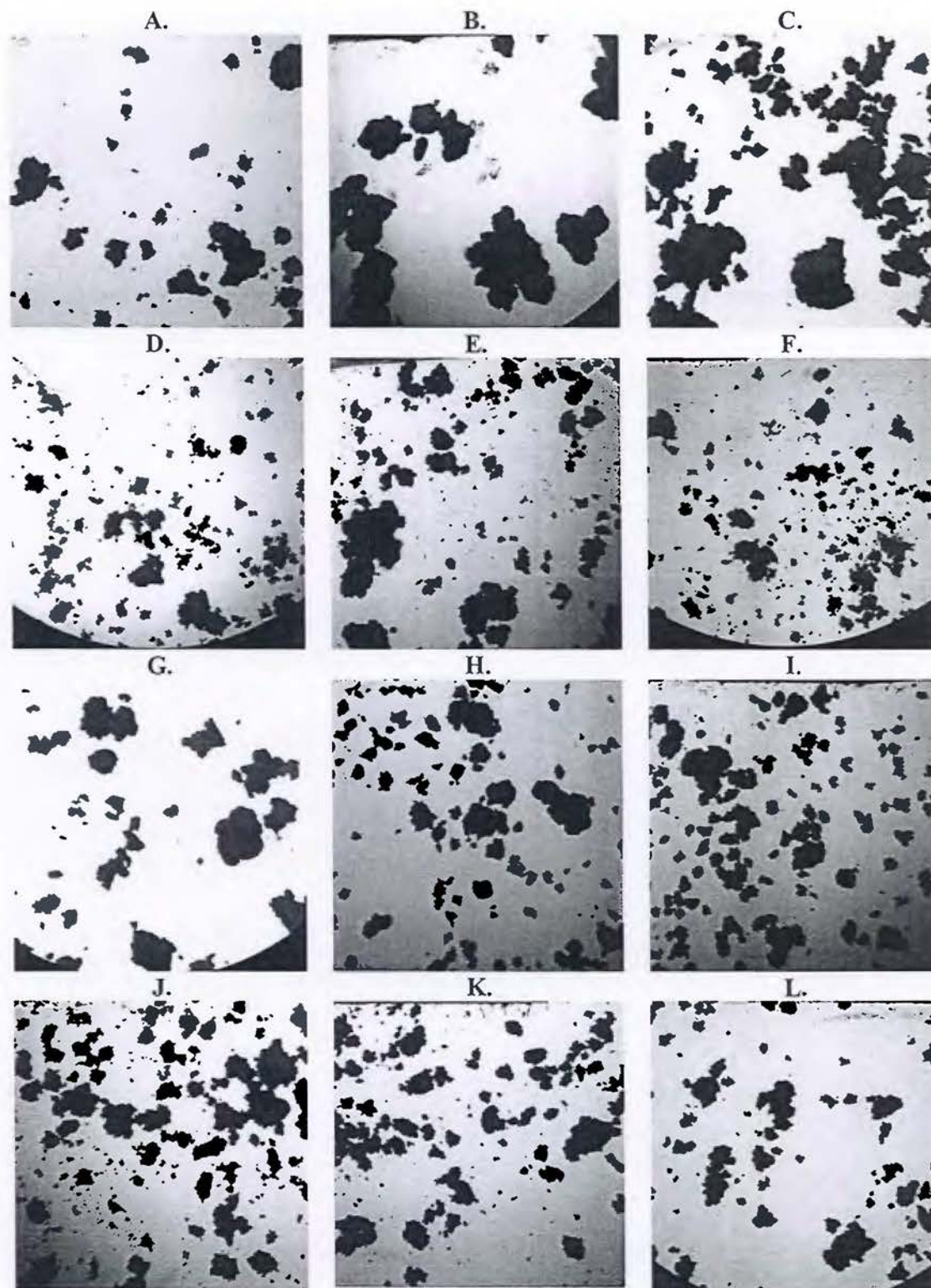


Figura 11. Morfología de las microesferas lipídicas obtenidas por el método C. A. MLS-3C. B. MLAP-1C. C. MLAP-2C. D. MLAP-3C. E. MLAP-4C. F. MLAP-5C. G. MLD-1C. H. MLD-2C. I. MLD-3C. J. MLC-1C. K. MLC-2C. L. MLC-3C.



### 5.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

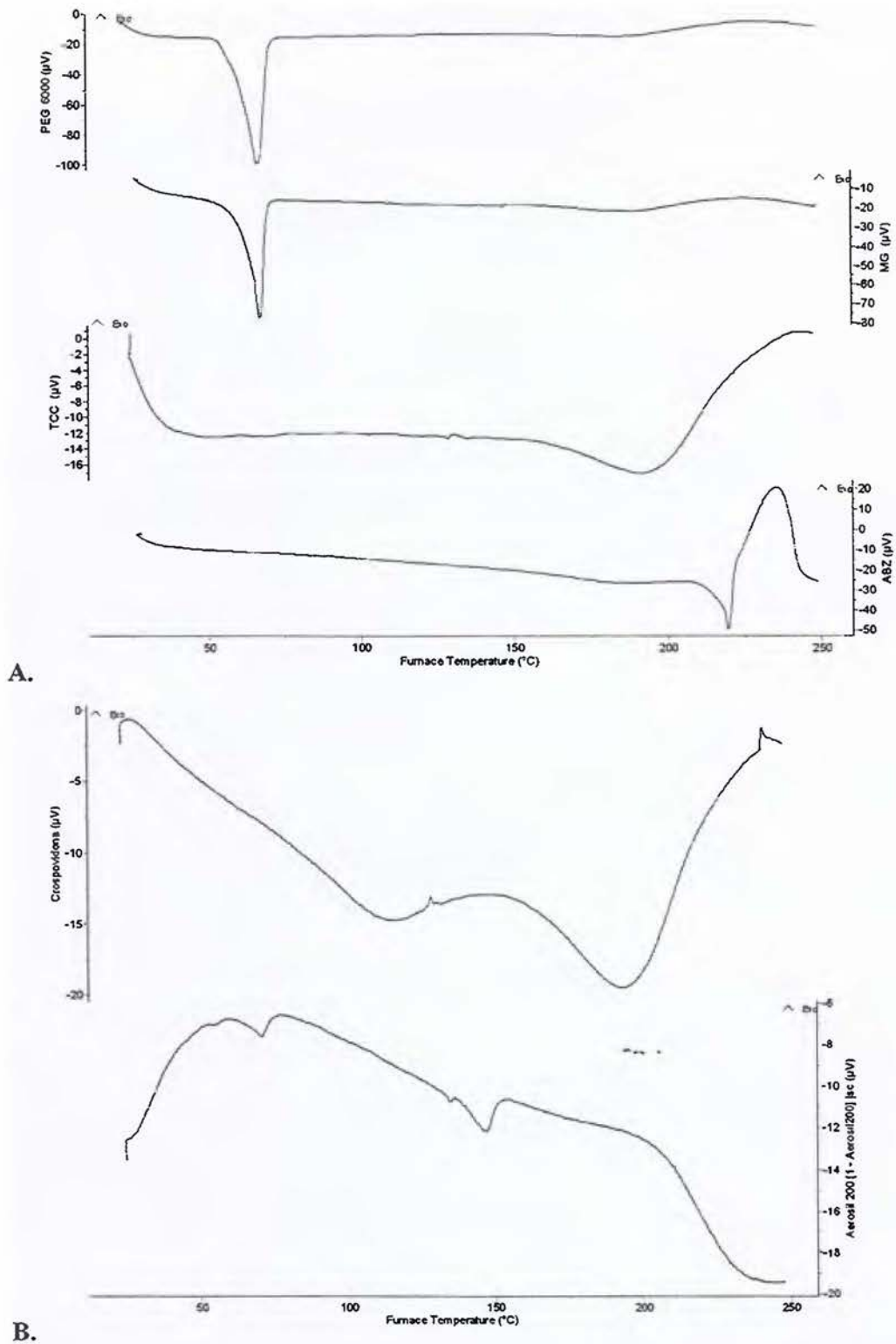
Este ensayo se utiliza para medir la pérdida o ganancia de calor correspondiente a cambios físicos o químicos en función de la temperatura. Esto permite estudiar el proceso de fusión y cristalización de materiales cristalinos, como lo son las dispersiones de lípidos, los polímeros, las nanopartículas lipídicas, entre otros. <sup>(45)</sup>

La figura 12.A muestra las curvas de DSC obtenidas para las materias primas utilizadas en esta investigación. Es importante tener en cuenta que un descenso respecto a la línea base del termograma, corresponde a un proceso endotérmico, mientras que un pico ascendente representa una transición exotérmica. Al observar las curvas de los componentes sólidos de las matrices estudiadas: PEG 6000 y MG, es posible observar en ambos casos un único pico endotérmico a aproximadamente 66 °C y 67 °C respectivamente. Este pico corresponde al punto de fusión de dichos sólidos.

Al analizar el comportamiento térmico del TCC en el rango de temperaturas estudiado, se evidencia un descenso en el diferencial del flujo de calor a aproximadamente 194 °C. Esto se puede relacionar con el proceso de ebullición de la muestra, ya que se reporta que el punto de ebullición para este compuesto es cercano a los 200 °C. <sup>(78)</sup> En el caso del termograma correspondiente al Albendazol puro, se observa un pico endotérmico a aproximadamente 219 °C, que se debe a la fusión del fármaco. <sup>(79)</sup>

La figura 12.B muestra los termogramas correspondientes a los excipientes con que se modificaron los transportadores lipídicos: Crospovidona y Aerosil® 200. Respecto al primero, es posible apreciar dos picos endotérmicos a 115 °C y 193 °C, temperaturas entre las que se reporta que se da la transición vítrea del compuesto. <sup>(80,81)</sup> En relación a la curva del Aerosil® 200, se observan dos picos endotérmicos a 70 °C y 147 °C, que se pueden relacionar con la pérdida del agua presente en la muestra. <sup>(82)</sup>





**Figura 12.** Termogramas obtenidos por DSC para las materias primas. **A.** En orden descendente: Polietilenglicol 6000, Monoestearato de Glicerilo, Triglicérido de ácido caprílico/cáprico. **B.** En orden descendente: Crosopovidona y Aerosil® 200.

La figura 13.A muestra las curvas de DSC correspondientes a los transportadores simples obtenidos por el método A, los cuales permiten evaluar el efecto de la incorporación de distintas proporciones de un lípido líquido en el comportamiento térmico de la matriz. Al analizar los termogramas es posible observar un primer pico endotérmico que corresponde al punto de fusión de la mezcla de MG y PEG 6000 que conforma la matriz.

Al pasar de 0 % de TCC en la fase lipídica (MLS-1A) a 12,5 % (MLS-2A), se observa que el pico se mantiene a la misma temperatura, de aproximadamente 63 °C. Sin embargo al aumentar la concentración de TCC a 25 % (MLS-3A), se registra un descenso en la temperatura de fusión (59 °C). Es importante notar que conforme se aumenta la proporción del lípido líquido, este primer pico se vuelve más amplio y menos pronunciado, lo que implica un descenso en la cristalinidad de los componentes de la matriz; esto apoya el supuesto de que el aceite se encuentra disperso molecularmente en la mezcla.<sup>(38)</sup>

El descenso en el punto de fusión registrado al utilizar la concentración más alta de TCC, se debe a que el punto de fusión de un compuesto disminuye cuando un segundo compuesto se disuelve en el primero, lo que genera una alteración de la pureza. El aumento de la amplitud del pico, que también se puede ver como la disminución de la temperatura a la que se empieza a dar el proceso de fusión, se debe a la distorsión de la red cristalina que provoca la incorporación del lípido líquido en los materiales sólidos.<sup>(38,39,72,83)</sup>

Diferentes estudios demuestran que al formular transportadores lipídicos únicamente con lípidos sólidos, la formulación presenta expulsión del principio activo durante el proceso de almacenamiento, debido a una cristalización en curso que tiende a formar un cristal perfecto. Por otro lado al incluir un lípido líquido, se obtiene una alteración de la estructura cristalina que deja mayor espacio para la incorporación del principio activo, evita la cristalización durante el almacenamiento e impide la expulsión del fármaco a largo plazo.<sup>(72,83)</sup>

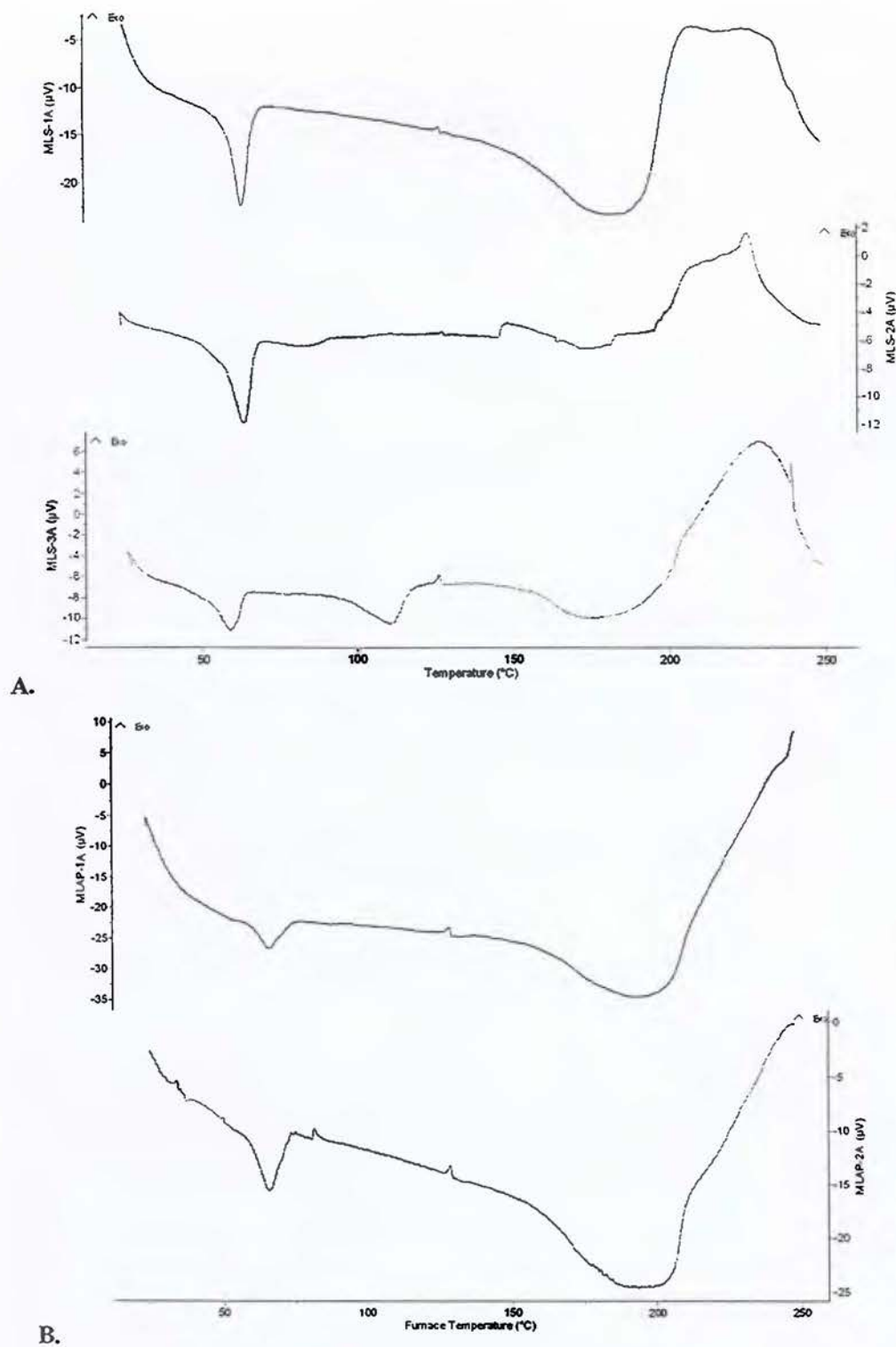
Al seguir analizando el termograma de los transportadores simples obtenidos por el método A, se evidencia la desaparición del pico característico del proceso de fusión del Albendazol a 219 °C. Lo que se observa en las tres formulaciones es un pico endotérmico amplio antes de los 200 °C. La ausencia del pico endotérmico del principio activo se puede atribuir a la disolución del principio activo en la matriz fundida<sup>(25,51)</sup> o a la pérdida de cristalinidad del fármaco, es decir se vuelve un sólido amorfo.<sup>(51,79)</sup>

El termograma correspondiente a la fórmula con mayor proporción de TCC (MLS-3A) registra un pico endotérmico a 110 °C que no se observa en las otras dos formulaciones. Se podría plantear la hipótesis de que a esa temperatura se favorece el proceso de disolución de una parte del principio activo en la matriz fundida.

En la figura 13.B se encuentran los termogramas de las microesferas del método A, modificadas con Aerosil® 200. El primer descenso en el diferencial del flujo de calor se da a aproximadamente 66 °C en ambas formulaciones. Sin embargo es posible notar que al aumentar la cantidad del excipiente de 2 % a 4 % (MLAP-1A y MLAP-2A respectivamente), el pico se vuelve más pronunciado, es decir que consume mayor energía para darse el proceso de fusión de la matriz.

Por otro lado, al igual que en los transportadores simples, se nota un pico amplio cercano a los 200 °C, relacionado con la fusión del principio activo. Se puede asumir un cambio en la estructura cristalina del compuesto, dándose la aparición del fármaco en estado amorfo, debido a que la fusión se da a una menor temperatura y el pico es mucho más amplio y menos intenso que el correspondiente al fármaco puro. <sup>(79)</sup>





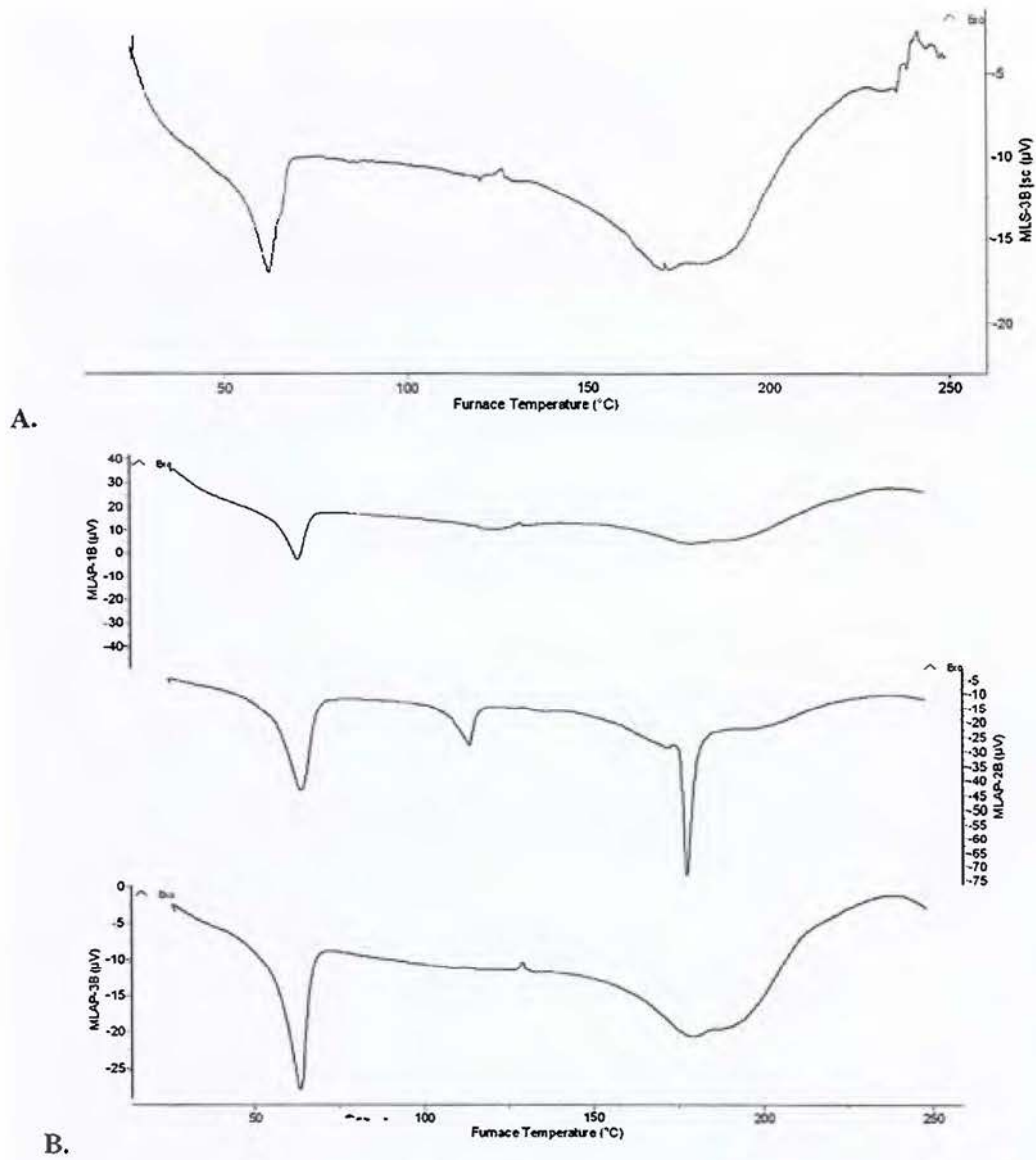
**Figura 13.** Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método A.A. **A.** Microesferas lipídicas simples. **B.** Microesferas lipídicas con agente formador de poros.

La figura 14.A muestra el termograma de las microesferas simples producidas por el método B. Es posible observar que se dan las mismas transiciones endotérmicas que se analizaron en los transportadores del método A. En este caso la fusión de la matriz aparece a 62 °C y las características del pico correspondiente a la fusión del ABZ se mantienen, pues se presenta antes de los 200 °C y es un pico amplio y menos intenso que el correspondiente a la materia prima, característico de la pérdida de cristalinidad del principio activo.

Respecto a la figura 14.B que muestra las microesferas modificadas con sílice coloidal, es posible notar que la fusión de la matriz en las tres fórmulas se da a los 63 °C aproximadamente. Sin embargo las características del pico varían, pues al aumentar la concentración del excipiente, se evidencia un aumento en la amplitud y profundidad del pico.

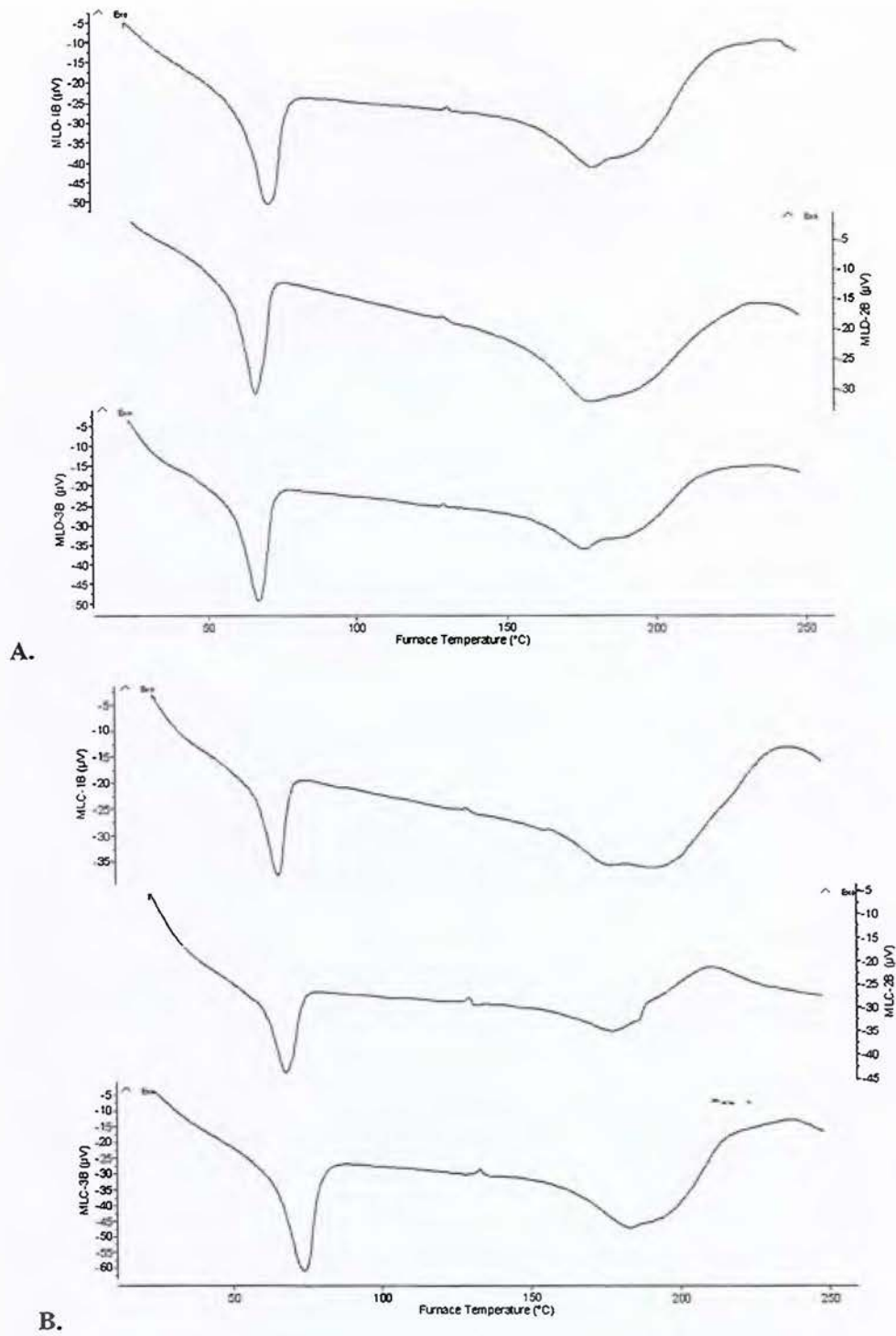
En el caso de la segunda transición característica, correspondiente al comportamiento térmico del ABZ, las tres formulaciones presentaron diferencias. En el caso de la fórmula con 2 % de Aerosil® 200 (MLAP-1B), esta transición es prácticamente imperceptible. Como ya se ha mencionado, esto se podría atribuir a la disolución completa del fármaco en la matriz fundida o a la pérdida de la cristalinidad.<sup>(25,51,79)</sup> Al aumentar la concentración del excipiente a 4 % (MLAP-2B), el pico aparece a los 177 °C y es bien definido. Además en este caso se presenta otro pico a aproximadamente 110 °C. Este último se observó en las microesferas MLS-3A. Al utilizar la máxima concentración de sílice coloidal (MLAP-3B), el pico vuelve a tener las mismas características descritas para la transición correspondiente en las microesferas simples.

La figura 15 muestra los termogramas de las microesferas del método B modificadas con crospovidona y con una combinación de Aerosil® 200 y crospovidona. Es posible notar que en todos los casos se dan las dos transiciones características que se han mencionado en esta sección. La transición correspondiente a la fusión del ABZ, mantiene las mismas propiedades, al darse en todos los casos antes de los 200 °C y se muestra como un pico amplio e indefinido. Es importante destacar que en esta transición también existe influencia de la ebullición del TCC. Por otro lado la transición atribuida a la fusión de la matriz aumenta un poco la temperatura a la que se da, respecto a las microesferas simples. Sin embargo, en todos los casos se da a temperaturas cercanas a los 70 °C y no se evidencia una tendencia definida de acuerdo a la concentración de excipientes y su efecto en la fusión de la matriz.



**Figura 14.** Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método B. **A.** Microesferas lipídicas simples. **B.** Microesferas lipídicas con agente formador de poros.





**Figura 15.** Termogramas obtenidos por DSC para las microesferas lipídicas del método B.A. **A.** Microesferas lipídicas con agente desintegrante. **B.** Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante.

La figura 16.A muestra la curva de DSC obtenida para las microesferas simples del método C. Se observa el mismo comportamiento discutido anteriormente, donde la primera transición endotérmica se da a los 74 °C y la segunda corresponde a un pico amplio antes de los 200 °C. Se puede establecer que el hecho de incorporar el principio activo disuelto (método C) no altera las propiedades térmicas de los transportadores obtenidos, respecto al uso del fármaco disperso (métodos A y B).

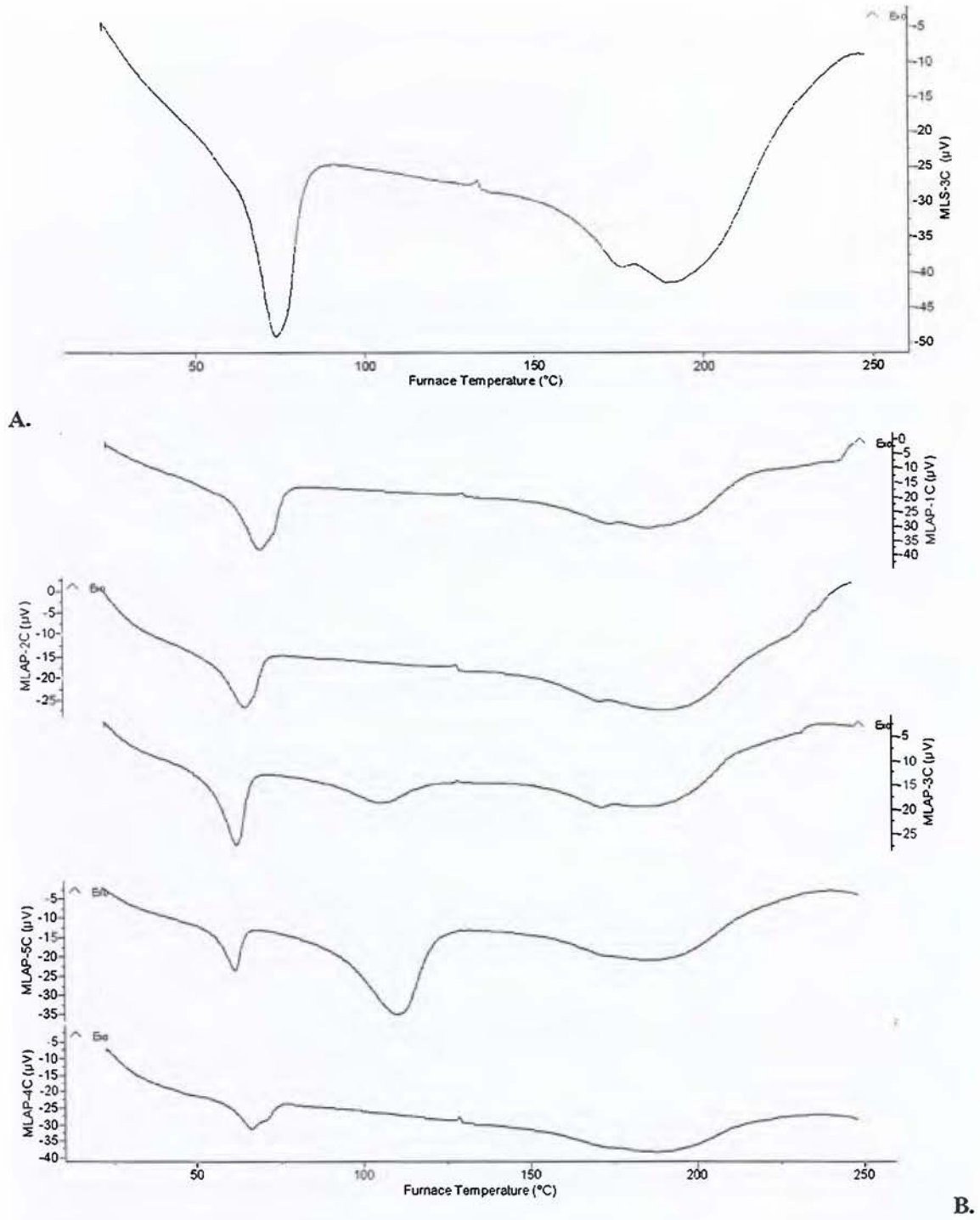
Los termogramas obtenidos para las microesferas del método C modificadas con sílice coloidal se muestran en la figura 16.B. Es posible notar que a pesar de que se dan las transiciones correspondientes a la fusión de la matriz y del principio activo, el segundo descenso endotérmico es menos pronunciado, casi inapreciable, al compararlo con los casos anteriores, lo que podría implicar una mayor pérdida de la cristalinidad del principio activo. Esto explicaría los beneficios observados en el desempeño de estas microesferas en los ensayos de disolución. Además es posible notar que para las microesferas modificadas con 6 % y 7 % del excipiente (MLAP-3C y MLAP-5C respectivamente) existe una tercera transición endotérmica ubicada entre las dos anteriores, a aproximadamente 110 °C. Este comportamiento ya se había descrito en las microesferas MLS-3A y MLAP-2B y se mantiene la hipótesis de que puede ser una temperatura en la que aumenta considerablemente la solubilidad del principio activo en la matriz fundida, por lo que se da un proceso de disolución endotérmico.

En el caso de las temperaturas a las que se da la fusión de la matriz, se evidencia que al aumentar la concentración de Aerosil® 200 entre 2 %, 4 %, 6% y 7 % se da una disminución en la temperatura de fusión (69 °C, 65 °C, 62 °C y 61 °C respectivamente), mientras que al utilizar la concentración de 8 %, la fusión se da a 66 °C. Esta tendencia se relacionará con el efecto en el mejoramiento de la velocidad de disolución en la sección 5.6 Ensayos de disolución.

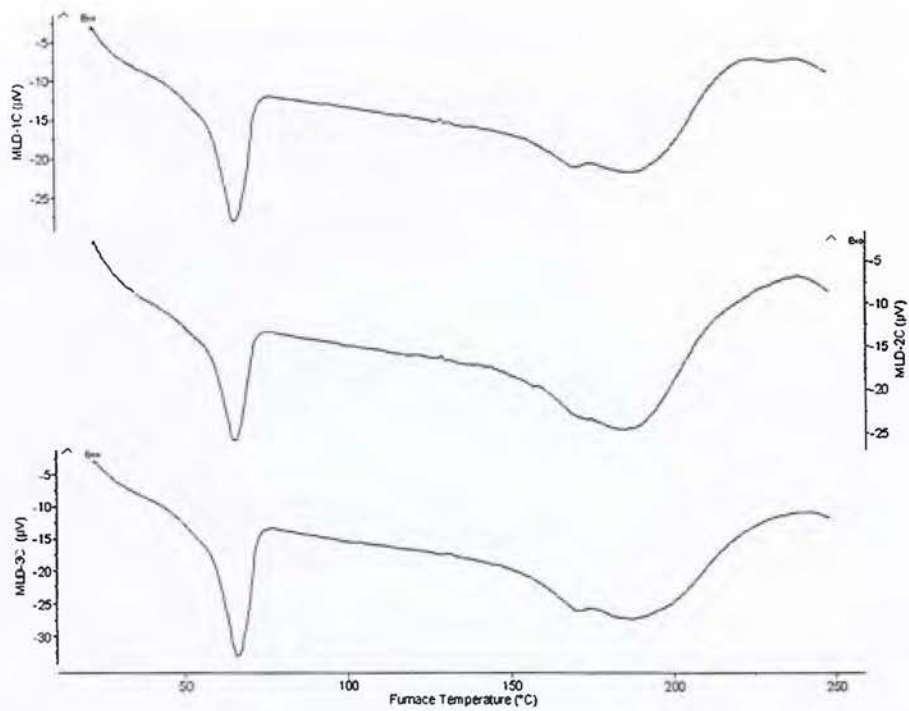
La figura 17.A muestra los termogramas obtenidos para las microesferas del método C, modificadas con crospovidona. Es posible apreciar que la fusión de la matriz se da a aproximadamente 66 °C en las tres formulaciones, mientras que el descenso en el diferencial de calor correspondiente a la fusión del ABZ mantiene las mismas características, al mostrarse antes de los 200 °C y ser un pico amplio y poco pronunciado. Estos termogramas no evidencian un efecto relevante de la incorporación del desintegrante en el comportamiento térmico de los transportadores.

Por último, la figura 17.B muestra las curvas de DSC correspondientes a las microesferas modificadas con combinaciones de Aerosil® 200 y crospovidona, desarrolladas a partir del método C. La fórmula modificada con partes iguales de los excipientes (MLC-2C) muestra la fusión de la matriz a 67 °C y presenta dos ligeras transiciones endotérmicas cercanas a los 200°C. Por otro lado las fórmulas MLC-1C y MLC-3C presentan un comportamiento térmico similar. La fusión de la matriz se da a aproximadamente 63 °C, presentan el pico característico que se ha observado para la fusión del ABZ antes de los 200 °C y además presentan un pico endotérmico a 116 °C, que se podría relacionar con el mismo pico que se mencionó en algunas de las formulas anteriores a los 110 °C, responsable de un proceso de disolución endotérmico del ABZ en la matriz fundida.

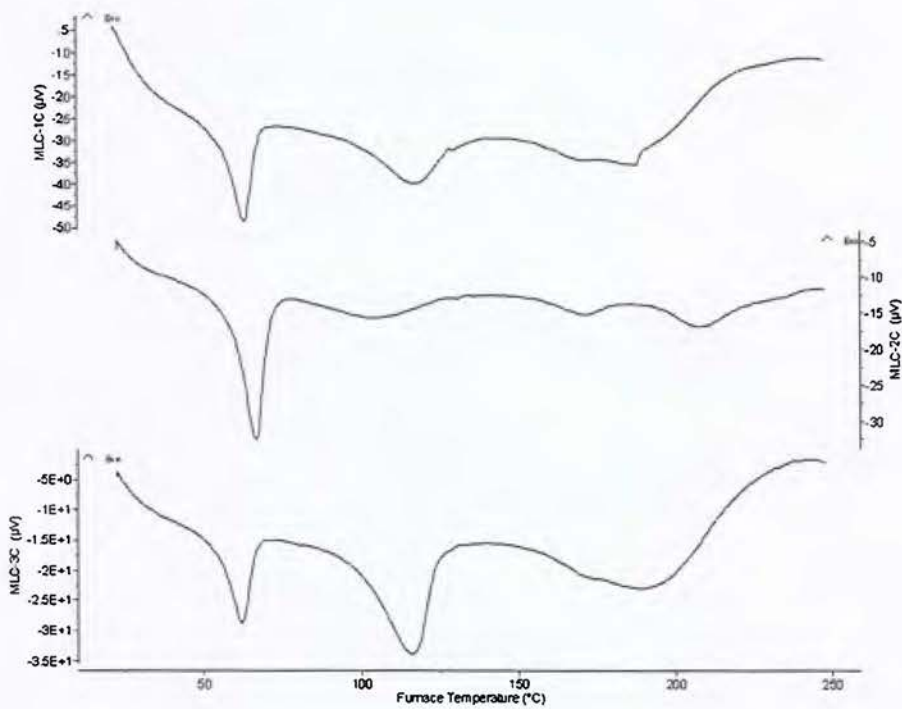




**Figura 16.** Termograma obtenido por DSC para las microsferas lipídicas del método C. **A.** Microesferas lipídicas simples. **B.** Microesferas lipídicas con agente formador de poros.



A.



B.

**Figura 17.** Termograma obtenido por DSC para las microesferas lipídicas del método C.A. **A.** Microesferas lipídicas con agente desintegrante. **B.** Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante.

#### 5.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF)

La espectroscopia infrarroja se utiliza, entre muchas otras aplicaciones, para identificar interacciones moleculares entre el principio activo y los excipientes. <sup>(70,84)</sup>

La figura 18.A muestra el espectro IR del Albendazol puro. La banda de absorción presente a  $3324\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del enlace N-H (ver figura 1). El pico registrado a  $2957\text{ cm}^{-1}$  se asocia con las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H alifáticos. A  $1711\text{ cm}^{-1}$  aparece la señal correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo éster. <sup>(71,85-87)</sup> Las bandas de absorción a  $1632\text{ cm}^{-1}$  y  $1590\text{ cm}^{-1}$  representan las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C del anillo aromático de la molécula. Se debe tomar en cuenta que a  $1600\text{ cm}^{-1}$  existen vibraciones de flexión del enlace N-H, por lo que las bandas de absorción características del grupo aromático se ven más anchas e intensas de lo esperado. La absorción por vibraciones de flexión del enlace C-H se muestra a  $1460\text{ cm}^{-1}$  y  $1441\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas de absorción que aparecen entre  $1350\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de estiramiento del enlace C-N. <sup>(71,85)</sup> Por último, respecto al enlace sulfuro (C-S-C), se establece que el espectro infrarrojo brinda poca información útil. <sup>(85)</sup>

Los demás espectros presentes en las figuras 18 y 19, corresponden a formulaciones del método C, que se considera el método más agresivo por incorporar el principio activo completamente disuelto, además son muestras representativas respecto a las diferentes combinaciones de los excipientes utilizados. Al observar los espectros, en general se puede notar que se mantienen todas las bandas de absorción descritas anteriormente para el principio activo, lo que indica que no parecen existir interacciones químicas entre el principio activo y los excipientes. Se puede observar que la señal a aproximadamente  $3324\text{ cm}^{-1}$  se vuelve un poco más ancha respecto a la original del espectro del ABZ, lo que se atribuye a las vibraciones de estiramientos del enlace O-H presentes en el monoestearato de glicerilo y en el PEG 6000. <sup>(71,85)</sup>

Otra diferencia encontrada en los espectros correspondientes a las formulaciones consiste en dos picos intensos presentes a aproximadamente  $2915\text{ cm}^{-1}$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  que representan estiramientos del enlace C-H de los excipientes. Además la señal correspondiente al éster del ABZ aparece a  $1740\text{ cm}^{-1}$ , lo que se debe a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=O del monoestearato de glicerilo y triglicérido de ácido caprílico/cáprico. <sup>(71,85)</sup>



Al observar que los cambios en las bandas de absorción se atribuyen a los grupos funcionales característicos de las materias primas, y como no se evidencia la aparición de nuevas bandas de absorción que indiquen la formación de compuestos de degradación o productos de interacciones químicas, se puede afirmar que la interacción molecular del PA con los excipientes es de naturaleza física. <sup>(87-89)</sup>

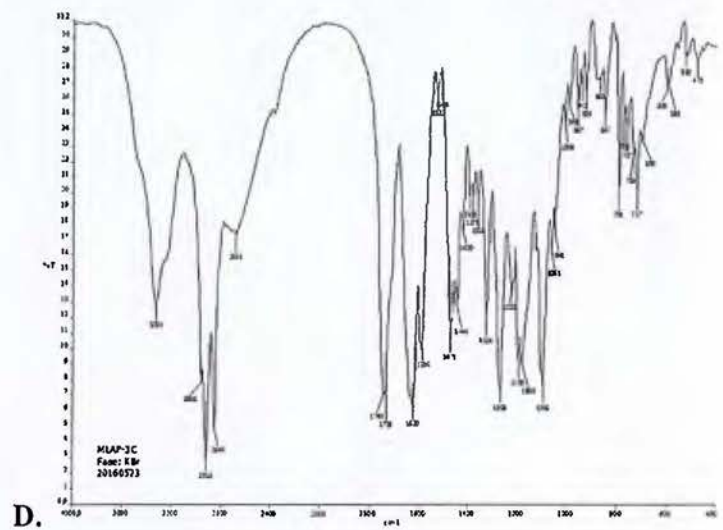
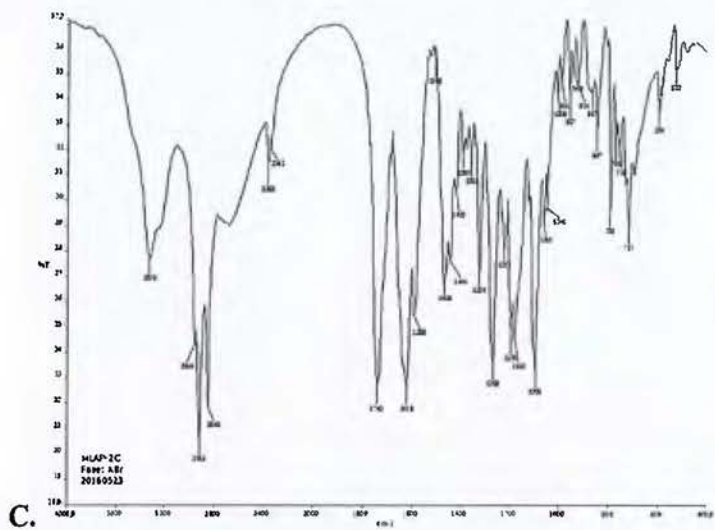
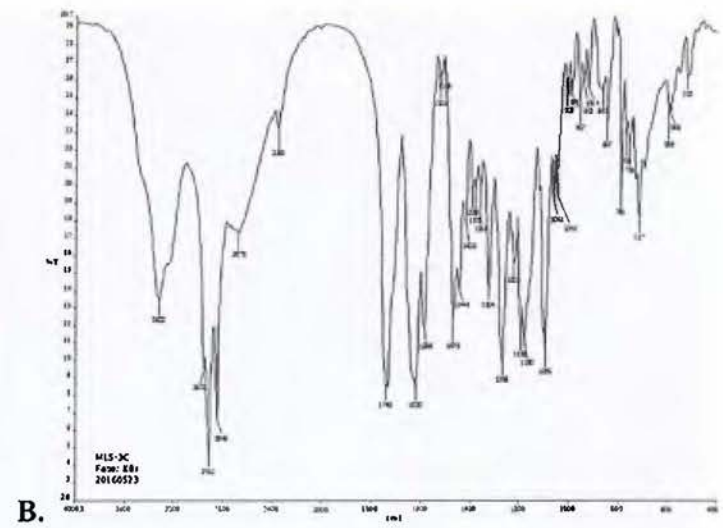
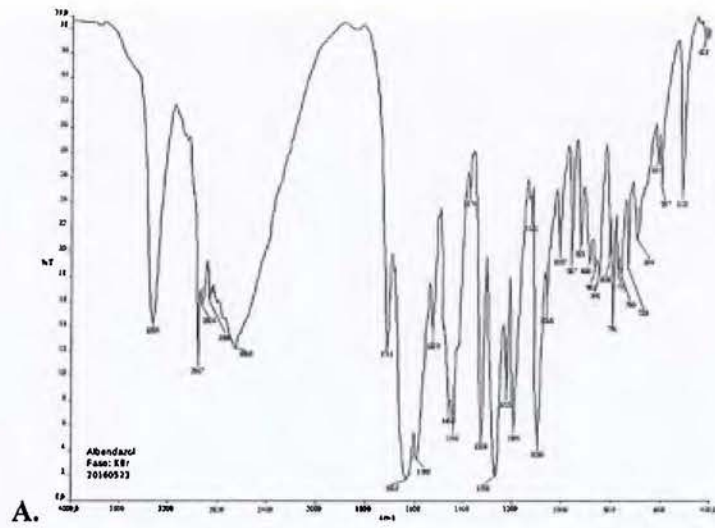


Figura 18. Espectros IRTF. A. Albendazol B. MLS-3C. C. MLAP-2C. D. MLAP-3C.

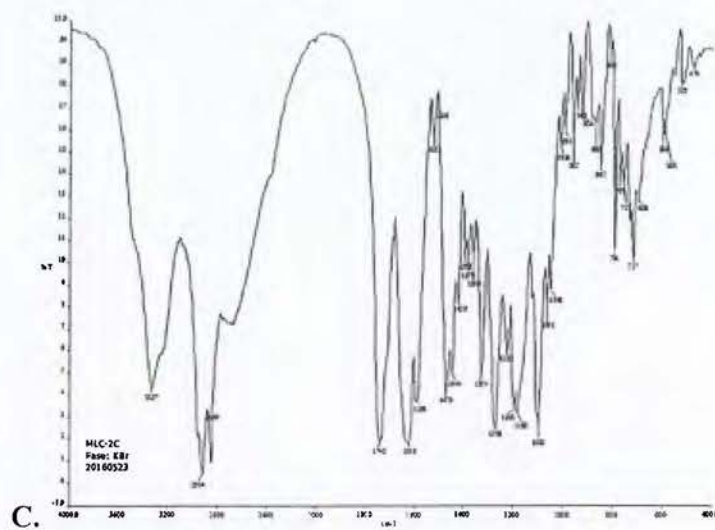
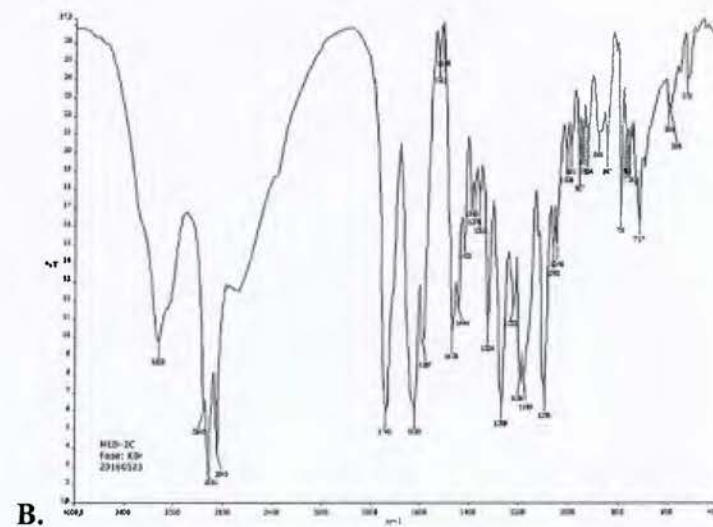
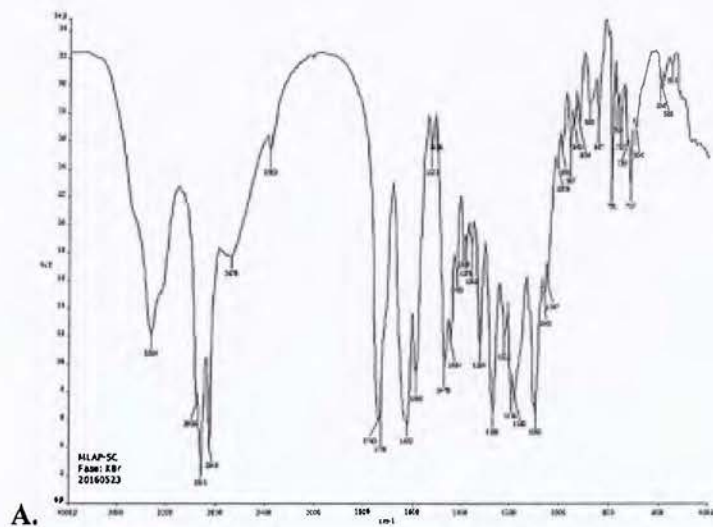


Figura 19. Espectros IRTF. A. MLAP-5C B. MLD-2C. C. MLC-2C.



## 5.5. Valoraciones

### 5.5.1. Microesferas lipídicas simples

La tabla 12 muestra los resultados del ensayo de valoración de las microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C. Esta prueba permitió determinar la cantidad real de Albendazol en la matriz.

**Tabla 12.** Valoraciones de microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C.

| Código | Prueba        | Absorbancia | Porcentaje de carga | Porcentaje de encapsulación |
|--------|---------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| MLS-1A | Estándar      | 0,665       | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,597       | 61,30               | 83,70                       |
|        | 2             | 0,593       | 60,18               | 82,17                       |
|        | 3             | 0,593       | 60,55               | 82,68                       |
|        | Promedio ± DE |             |                     | 60,68 ± 0,57                |
| MLS-2A | Estándar      | 0,645       | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,578       | 60,34               | 79,55                       |
|        | 2             | 0,570       | 59,24               | 78,10                       |
|        | 3             | 0,580       | 60,85               | 80,22                       |
|        | Promedio ± DE |             |                     | 60,14 ± 0,82                |
| MLS-3A | Estándar      | 0,6385      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,5488      | 57,70               | 82,52                       |
|        | 2             | 0,5612      | 57,72               | 82,56                       |
|        | 3             | 0,5296      | 55,90               | 79,97                       |
|        | Promedio ± DE |             |                     | 57,11 ± 1,04                |
| MLS-3B | Estándar      | 0,6694      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,3068      | 31,75               | 86,28                       |
|        | 2             | 0,3103      | 32,08               | 87,16                       |
|        | 3             | 0,3112      | 31,99               | 86,92                       |
|        | Promedio ± DE |             |                     | 31,94 ± 0,17                |
| MLS-3C | Estándar      | 0,6548      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,2861      | 28,12               | 82,33                       |
|        | 2             | 0,2689      | 27,30               | 79,93                       |
|        | 3             | 0,2693      | 26,79               | 78,45                       |
|        | Promedio ± DE |             |                     | 27,40 ± 0,67                |

Las microesferas simples obtenidas por el método A, permiten evaluar el efecto del TCC en el porcentaje de encapsulación, donde se logró evidenciar que la fórmula MLS-1A, al carecer de

TCC, logró una mayor encapsulación del fármaco. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al comparar con las microesferas MLS-2A y MLS-3A, las cuales contienen 12,5 % y 25 % de TCC en la fase lipídica, respectivamente (Ver anexo 1). Además, al observar los porcentajes de carga de estas microesferas, se observa como al aumentar la proporción de TCC, disminuye la carga de ABZ en la matriz.

Teóricamente se esperaba que al incrementar la proporción del lípido líquido, aumentarían los porcentajes de carga y de encapsulación del fármaco, ya que se establece que la incorporación de un lípido líquido a un lípido sólido puede perturbar el orden cristalino, generando imperfecciones dentro de la red cristalina (esto se comprobó con el ensayo de DSC) que dejan espacio para la incorporación de moléculas del fármaco, lo cual conduce al aumento de la capacidad de carga del principio activo en la matriz. <sup>(72,83)</sup>

Este efecto no se ve reflejado en los resultados obtenidos en esta investigación, lo cual se podría atribuir a la incorporación de polímeros hidrofílicos como parte de la matriz lipídica. El ABZ al ser de naturaleza hidrofóbica podría tener dificultad para interactuar con la matriz lipídica-polimérica, lo que explicaría la ausencia de una tendencia clara en el porcentaje de carga y de encapsulación.

También se debe tomar en cuenta la alta concentración de ABZ con que se cargan las microesferas, lo cual podría generar una saturación del sistema que no permite evidenciar el efecto del lípido líquido en la capacidad de carga. Al comparar con otros estudios similares en los que se comprueba el aumento de la capacidad de carga del principio activo al aumentar la proporción del lípido líquido en la matriz, se observa la obtención de porcentajes de carga bajos. Por ejemplo, en un estudio en que se formulan transportadores lipídicos nanoestructurados con propionato de clobetasol aumentando el ácido oleico de 0 % a 30 %, se reportan porcentajes de encapsulación de 47,67 % a 69,95 % y porcentajes de carga de 2,30 % a 3,50 %. <sup>(83)</sup>

Al analizar las microesferas simples obtenidas por los métodos B y C (tabla 12), se puede observar que al agregar el ABZ disperso durante la producción (método B), se logra un porcentaje de encapsulación del fármaco superior que cuando se agrega disuelto (método C), diferencia que también es estadísticamente significativa (ver anexo 1). Al agregar el ABZ disuelto, se facilita la difusión del principio activo hacia la fase acuosa durante el proceso de



producción, por lo que se observa una menor encapsulación y carga del fármaco en los transportadores.

### 5.5.2. Microesferas lipídicas con agente formador de poros.

Como se puede observar en la tabla 13, al incluir el Aerosil® 200 en la matriz de las microesferas del método A, el porcentaje de encapsulación de Albendazol se reduce respecto al porcentaje obtenido en las microesferas lipídicas simples (tabla 12). El análisis de varianza de un factor, con un 95 % de confianza, demostró que las diferencias entre los porcentajes de encapsulación de MLAP-1A, MLAP-2A y MLS-3A son estadísticamente significativas (ver anexo 2).

**Tabla 13.** Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.

| Código  | Prueba        | Absorbancia | Porcentaje de carga | Porcentaje de encapsulación |
|---------|---------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| MLAP-1A | Estándar      | 0,6516      | -                   | -                           |
|         | 1             | 0,6065      | 62,27               | 63,52                       |
|         | 2             | 0,5958      | 60,92               | 62,14                       |
|         | 3             | 0,6024      | 61,85               | 63,09                       |
|         | Promedio ± DE |             | 61,68 ± 0,69        | 62,92 ± 0,71                |
| MLAP-2A | Estándar      | 0,6590      | -                   | -                           |
|         | 1             | 0,5584      | 58,34               | 72,98                       |
|         | 2             | 0,5493      | 55,71               | 69,70                       |
|         | 3             | 0,4993      | 52,25               | 65,36                       |
|         | Promedio ± DE |             | 55,43 ± 3,05        | 69,35 ± 3,82                |

En la tabla 14 se muestran los resultados de los porcentajes de carga y de encapsulación de ABZ de las microesferas modificadas con Aerosil® 200, obtenidas por el método B. En este caso, los datos no permiten establecer una tendencia clara sobre el efecto de la incorporación de Aerosil® 200. Sin embargo se puede mencionar que son altos porcentajes de encapsulación, lo que evidencia una pérdida pequeña de ABZ durante el proceso de producción utilizado en este método.



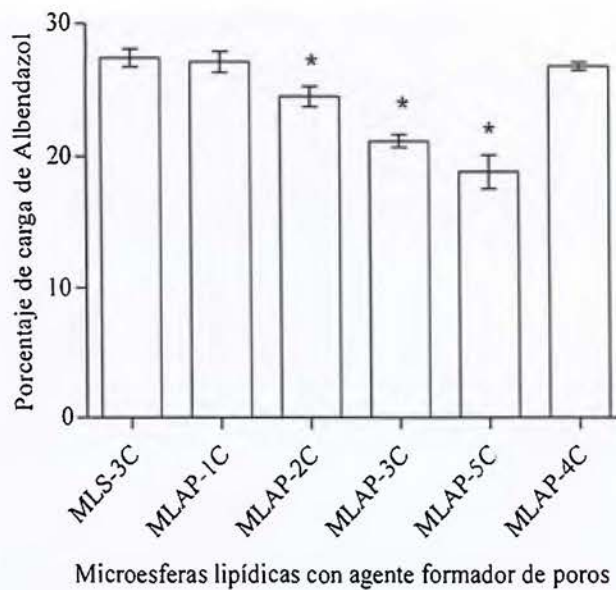
**Tabla 14.** Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B.

| Código  | Prueba        | Absorbancia | Porcentaje de carga | Porcentaje de encapsulación |
|---------|---------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| MLAP-1B | Estándar      | 0,6554      | -                   | -                           |
|         | 1             | 0,2977      | 31,41               | 87,05                       |
|         | 2             | 0,3051      | 31,53               | 87,36                       |
|         | 3             | 0,3013      | 31,83               | 88,20                       |
|         | Promedio ± DE |             | 31,59 ± 0,22        | 87,54 ± 0,60                |
| MLAP-2B | Estándar      | 0,6565      | -                   | -                           |
|         | 1             | 0,2907      | 30,30               | 82,67                       |
|         | 2             | 0,3035      | 31,83               | 86,83                       |
|         | 3             | 0,3023      | 31,75               | 86,61                       |
|         | Promedio ± DE |             | 31,29 ± 0,86        | 85,37 ± 2,34                |
| MLAP-3B | Estándar      | 0,6554      | -                   | -                           |
|         | 1             | 0,3256      | 33,42               | 92,84                       |
|         | 2             | 0,3166      | 33,88               | 94,10                       |
|         | 3             | 0,3371      | 34,11               | 94,75                       |
|         | Promedio ± DE |             | 33,80 ± 0,35        | 93,90 ± 0,97                |

En el caso de la tabla 15, correspondiente a las microesferas obtenidas por el método C, se puede observar como el porcentaje de carga de ABZ disminuye al aumentar la cantidad de agente formador de poros en la matriz. Sin embargo, al analizar la fórmula con mayor cantidad de Aerosil® 200 (8%, fórmula MLAP-4C), se observa un aumento en el porcentaje de ABZ que contiene. Las diferencias son estadísticamente significativas, excepto la comparación entre MLAP-1C, MLAP-4C y MLS-3C (ver figura 20 y anexo 3). Respecto al porcentaje de encapsulación, no se logra evidenciar un comportamiento claro respecto al efecto del Aerosil® 200.

Tabla 15. Valoraciones de microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.

| <b>Código</b> | <b>Prueba</b> | <b>Absorbancia</b> | <b>Porcentaje de carga</b> | <b>Porcentaje de encapsulación</b> |
|---------------|---------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| MLAP-1C       | Estándar      | 0,6577             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2574             | 26,56                      | 73,61                              |
|               | 2             | 0,2515             | 26,76                      | 74,17                              |
|               | 3             | 0,2661             | 28,01                      | 77,61                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 27,11 ± 0,79                       |
| MLAP-2C       | Estándar      | 0,6504             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2330             | 24,40                      | 75,98                              |
|               | 2             | 0,2434             | 25,34                      | 78,90                              |
|               | 3             | 0,2279             | 23,85                      | 74,26                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 24,53 ± 0,75                       |
| MLAP-3C       | Estándar      | 0,6577             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2061             | 21,72                      | 78,78                              |
|               | 2             | 0,2027             | 20,83                      | 75,55                              |
|               | 3             | 0,1981             | 20,96                      | 76,04                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 21,17 ± 0,48                       |
| MLAP-5C       | Estándar      | 0,6828             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,1678             | 17,44                      | 69,59                              |
|               | 2             | 0,1817             | 19,14                      | 76,37                              |
|               | 3             | 0,1906             | 19,92                      | 79,50                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 18,83 ± 1,27                       |
| MLAP-4C       | Estándar      | 0,6828             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2547             | 26,23                      | 81,27                              |
|               | 2             | 0,2603             | 26,84                      | 83,18                              |
|               | 3             | 0,2595             | 27,22                      | 84,32                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 26,76 ± 0,50                       |



**Figura 20.** Porcentaje de carga de Albendazol en las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C (n = 3). \* p < 0,05 al comparar entre todos los grupos.

A pesar de que no todos los resultados obtenidos para las microesferas modificadas con Aerosil® 200 demuestran una disminución de los porcentajes de carga y de encapsulación del principio activo estudiado, se podría pensar que lo esperable sería notar un descenso de estos porcentajes al aumentar la proporción de Aerosil® 200, ya que este compuesto estaría ocupando el espacio que originalmente era exclusivo para el fármaco.

De modo general, se establece que la incorporación de adsorbentes como sílice coloidal, estearato de magnesio y talco, disminuye el tamaño de partícula de las microesferas lipídicas, lo cual aumenta el área superficial y esto conlleva a un aumento del contacto entre las microesferas y la fase acuosa, que genera un incremento en la cantidad de fármaco que pasa a la fase acuosa, disminuyendo la cantidad de principio activo en la matriz. <sup>(53)</sup> Al comparar este supuesto con los resultados de tamaño de partícula obtenidos para las microesferas modificadas con Aerosil® 200, solamente se logró disminuir el tamaño en el caso de las microesferas del método C, por lo que se comprueba que al lograr disminuir el tamaño de partícula adicionando sílice coloidal, se produce una disminución en el porcentaje de carga de ABZ de las microesferas.



### 5.5.3. Microesferas lipídicas con agente desintegrante.

Al añadir un agente desintegrante, como la crospovidona, en diferentes proporciones en la matriz de las microesferas obtenidas por el método B, no se observa un efecto relevante en los porcentajes de carga y de encapsulación al comparar con las microesferas simples (MLS-3B), ni al comparar entre las tres formulaciones producidas. Estos resultados se observan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Valoraciones de microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B.

| Código | Prueba        | Absorbancia | Porcentaje de carga | Porcentaje de encapsulación |
|--------|---------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| MLD-1B | Estándar      | 0,6525      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,3168      | 32,61               | 86,21                       |
|        | 2             | 0,3132      | 32,85               | 86,82                       |
|        | 3             | 0,3125      | 31,97               | 84,50                       |
|        | Promedio ± DE |             | 32,48 ± 0,45        | 85,84 ± 1,20                |
| MLD-2B | Estándar      | 0,6696      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,3101      | 31,96               | 85,76                       |
|        | 2             | 0,3099      | 32,19               | 86,38                       |
|        | 3             | 0,3117      | 32,42               | 87,02                       |
|        | Promedio ± DE |             | 32,19 ± 0,23        | 86,39 ± 0,63                |
| MLD-3B | Estándar      | 0,6696      | -                   | -                           |
|        | 1             | 0,3178      | 32,35               | 91,40                       |
|        | 2             | 0,3107      | 32,02               | 90,45                       |
|        | 3             | 0,3040      | 31,33               | 88,50                       |
|        | Promedio ± DE |             | 31,90 ± 0,52        | 90,12 ± 1,48                |

En el caso de la incorporación de crospovidona en las microesferas producidas a partir del método C, al comparar el porcentaje de carga del fármaco en las microesferas simples (MLS-3C), con los obtenidos en las tres formulaciones (tabla 17), se evidencia una disminución de la carga de ABZ en las microesferas, siendo la diferencia estadísticamente significativa (ver anexo 4). A pesar de que al observar los porcentajes de encapsulación también se ve una disminución respecto a las microesferas simples correspondientes, la diferencia únicamente es significativa al comparar entre MLS-3C y MLD-1C (ver anexo 5). Al evaluar las diferentes concentraciones de crospovidona utilizadas, no se evidencia una tendencia clara en el efecto de la concentración del excipiente en los porcentajes discutidos para las tres formulaciones.

**Tabla 17.** Valoraciones de microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.

| <b>Código</b> | <b>Prueba</b> | <b>Absorbancia</b> | <b>Porcentaje de carga</b> | <b>Porcentaje de encapsulación</b> |
|---------------|---------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <b>MLD-1C</b> | Estándar      | 0,6560             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2304             | 24,77                      | 73,04                              |
|               | 2             | 0,2261             | 24,56                      | 72,41                              |
|               | 3             | 0,2287             | 24,57                      | 72,45                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 24,63 ± 0,12                       |
| <b>MLD-2C</b> | Estándar      | 0,6504             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2467             | 26,05                      | 77,38                              |
|               | 2             | 0,2481             | 26,50                      | 78,74                              |
|               | 3             | 0,2467             | 26,20                      | 77,82                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 26,25 ± 0,23                       |
| <b>MLD-3C</b> | Estándar      | 0,6446             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2408             | 24,97                      | 77,21                              |
|               | 2             | 0,2522             | 25,69                      | 79,43                              |
|               | 3             | 0,2441             | 25,58                      | 79,10                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 25,41 ± 0,39                       |

#### **5.5.4. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante.**

Al modificar la matriz original del método B con una combinación de Aerosil® 200 y crospovidona, se obtuvieron los porcentajes de carga y de encapsulación registrados en la tabla 18. Se puede observar que el mayor porcentaje de carga de ABZ se obtuvo al utilizar la proporción Aerosil:Crospovidona 75:25 (MLC-3B), incluso fue superior al compararlo con las microesferas simples (MLS-3B); esta diferencia fue estadísticamente significativa (ver anexo 6).

Respecto al porcentaje de encapsulación, se observa que al utilizar uno de los dos excipientes en proporción 75:25 respecto al otro, se obtienen porcentajes de encapsulación superiores que el correspondiente a las microesferas simples ( $p < 0,05$ ; ver anexo 7).

**Tabla 18.** Valoraciones de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B.

| Código        | Prueba        | Absorbancia | Porcentaje de carga | Porcentaje de encapsulación |
|---------------|---------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| <b>MLC-1B</b> | Estándar      | 0,6455      | -                   | -                           |
|               | 1             | 0,3224      | 31,43               | 92,79                       |
|               | 2             | 0,3170      | 31,69               | 93,56                       |
|               | 3             | 0,3116      | 31,85               | 94,05                       |
|               | Promedio ± DE |             |                     | 31,66 ± 0,21                |
| <b>MLC-2B</b> | Estándar      | 0,6296      | -                   | -                           |
|               | 1             | 0,2812      | 29,07               | 81,92                       |
|               | 2             | 0,3010      | 29,75               | 83,83                       |
|               | 3             | 0,2932      | 30,22               | 85,17                       |
|               | Promedio ± DE |             |                     | 29,68 ± 0,58                |
| <b>MLC-3B</b> | Estándar      | 0,6296      | -                   | -                           |
|               | 1             | 0,3302      | 34,13               | 90,04                       |
|               | 2             | 0,3521      | 35,69               | 94,19                       |
|               | 3             | 0,3295      | 33,99               | 89,69                       |
|               | Promedio ± DE |             |                     | 34,60 ± 0,94                |

Por último, respecto a las valoraciones, la tabla 19 muestra los resultados de los porcentajes de carga y de encapsulación de ABZ en las microesferas del método C, modificadas con combinaciones de Aerosil® 200 y crospovidona. La diferencia más relevante se da en el porcentaje de encapsulación, donde las tres formulaciones superan al porcentaje de encapsulación obtenido con las microesferas simples MLS-3C ( $p < 0,05$ ; ver anexo 8).



**Tabla 19.** Valoraciones de microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C.

| <b>Código</b> | <b>Prueba</b> | <b>Absorbancia</b> | <b>Porcentaje de carga</b> | <b>Porcentaje de encapsulación</b> |
|---------------|---------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <b>MLC-1C</b> | Estándar      | 0,6740             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2386             | 25,14                      | 84,72                              |
|               | 2             | 0,2471             | 26,04                      | 87,74                              |
|               | 3             | 0,2464             | 25,91                      | 87,32                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 25,70 ± 0,49                       |
| <b>MLC-2C</b> | Estándar      | 0,6714             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2590             | 27,36                      | 88,99                              |
|               | 2             | 0,2642             | 27,87                      | 90,67                              |
|               | 3             | 0,2626             | 27,27                      | 88,71                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 27,50 ± 0,32                       |
| <b>MLC-3C</b> | Estándar      | 0,6714             | -                          | -                                  |
|               | 1             | 0,2414             | 23,85                      | 86,20                              |
|               | 2             | 0,2367             | 23,28                      | 84,16                              |
|               | 3             | 0,2276             | 24,09                      | 87,04                              |
|               | Promedio ± DE |                    |                            | 23,74 ± 0,42                       |

## 5.6. Ensayos de disolución

### 5.6.1. Albendazol materia prima

La tabla 20 muestra el resultado de la prueba de disolución de Albendazol como materia prima y el Albendazol mezclado con 3 % de Laurilsulfato de sodio (LSS). El análisis estadístico demostró que con un 95 % de confianza, existen diferencias significativas en el porcentaje de disolución de ABZ obtenido al utilizar la materia prima con y sin tensioactivo (ver anexo 9), viéndose más favorecida la disolución cuando se mezcla el principio activo con el LSS.

**Tabla 20.** Ensayos de disolución de Albendazol materia prima (ABZ) y Albendazol materia prima con laurilsulfato de sodio al 3% (ABZ-LSS).

| Código  | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|---------|---------------|-------------|--|
| ABZ     | Estándar      | 0,6507      | -  |
|         | 1             | 0,0092      | 1,44   |
|         | 2             | 0,0068      | 1,03   |
|         | 3             | 0,0129      | 2,02   |
|         | Promedio ± DE |             | 1,50 ± 0,50  |
| ABZ+LSS | Estándar      | 0,6379      | -  |
|         | 1             | 0,0701      | 10,97  |
|         | 2             | 0,0942      | 14,88  |
|         | 3             | 0,0548      | 8,51   |
|         | Promedio ± DE |             | 11,45 ± 3,21   |

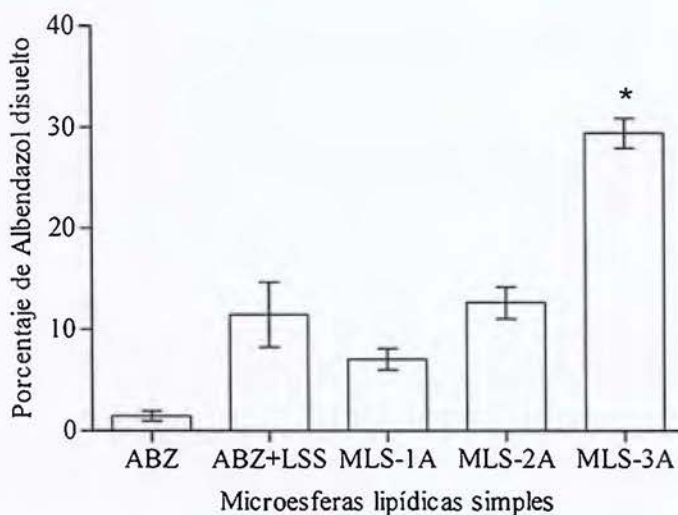
Esta comparación se llevó a cabo debido a que fue necesario mezclar las microesferas obtenidas con 3 % de LSS para facilitar su incorporación en el medio de disolución, por lo que era necesario determinar el efecto en el mejoramiento de la disolución de ABZ proporcionado por el tensioactivo. A partir de esto, al analizar los resultados de las formulaciones en los ensayos de disolución, los beneficios observados en este parámetro, se van a poder atribuir exclusivamente a la formulación, únicamente en los casos en que la diferencia sea estadísticamente significativa respecto a la cantidad de ABZ disuelto que se obtuvo con la mezcla del principio activo y el tensioactivo.

### 5.6.2. Microesferas lipídicas simples

Las microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A, permitieron evaluar el efecto que tenía la proporción de TCC en el porcentaje de disolución de ABZ a los 30 minutos (tabla 21). La figura 21 muestra gráficamente que al aumentar a un 25 % la proporción de TCC en la fase lipídica (fórmula MLS-3A), se logra un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de ABZ disuelto a los 30 minutos (Q<sub>30</sub>), respecto a la materia prima y las otras microesferas con menor proporción de TCC (ver anexo 9). A partir de esto fue que se decidió llevar a cabo el desarrollo de los métodos B y C, así como las modificaciones con agente formador de poros y desintegrante tomando como base la proporción de 25 % de TCC en la fase lipídica de la matriz.

**Tabla 21.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLS-1A | Estándar      | 0,6640      | -  |
|        | 1             | 0,0467      | 7,22   |
|        | 2             | 0,0516      | 7,97   |
|        | 3             | 0,0382      | 5,94   |
|        | Promedio ± DE |             | 7,04 ± 1,03  |
| MLS-2A | Estándar      | 0,7000      | -  |
|        | 1             | 0,0700      | 10,98  |
|        | 2             | 0,0810      | 12,68  |
|        | 3             | 0,0900      | 14,07  |
|        | Promedio ± DE |             | 12,58 ± 1,55   |
| MLS-3A | Estándar      | 0,6640      | -  |
|        | 1             | 0,2019      | 31,03  |
|        | 2             | 0,1895      | 28,96  |
|        | 3             | 0,1789      | 28,14  |
|        | Promedio ± DE |             | 29,38 ± 1,50   |



**Figura 21.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A (n = 3). \* p < 0,05 al comparar con todos los grupos.

Al igual que como se mencionó en el caso del porcentaje de carga y de encapsulación de las microesferas simples del método A, la incorporación de un lípido líquido en la matriz sólida, provoca que los transportadores se vuelvan imperfectos, lo cual en este caso facilita la liberación



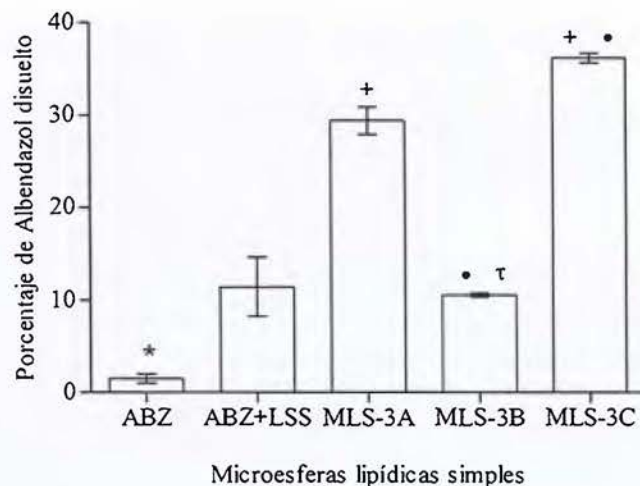
del fármaco cargado en la matriz.<sup>(72)</sup> Este supuesto se comprobó mediante la prueba de calorimetría, donde se obtuvo que al agregar el lípido líquido a la matriz, se registraba un descenso del punto de fusión y aumentaba la amplitud del pico, lo que señala alteraciones en la estructura cristalina de la matriz.

En el método de difusión de disolvente para la producción de los transportadores lipídicos, durante el proceso de enfriamiento, al tener el lípido sólido un punto de fusión más alto que el lípido líquido, puede cristalizar primero formando un pequeño núcleo libre de lípido líquido, por lo que la mayor parte del TCC va a estar ubicado en la capa exterior de los transportadores. Como el fármaco tiende a ser más soluble en el lípido líquido, esta capa externa va a poseer una carga mayor de fármaco que puede ser más fácilmente liberado por difusión o erosión de la matriz.<sup>(83)</sup>

Al evaluar el desempeño en el ensayo de disolución de los transportadores lipídicos simples obtenidos por los tres métodos (tabla 21 y 22), se determinó que los correspondientes al método C (MLS-3C) tuvieron un mayor Q<sub>30</sub> al comparar con ABZ, ABZ+LSS y las microesferas simples obtenidas por los métodos A y B. Esta diferencia fue estadísticamente significativa, al obtenerse valores de p inferiores a 0,05 para todos los casos (figura 22, anexo 10).

**Tabla 22.** Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas simples, obtenidas por los métodos B y C.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLS-3B | Estándar      | 0,6621      | -  |
|        | 1             | 0,0664      | 10,33  |
|        | 2             | 0,0691      | 10,70  |
|        | 3             | 0,0694      | 10,75  |
|        | Promedio ± DE |             | 10,59 ± 0,23   |
| MLS-3C | Estándar      | 0,6506      | -  |
|        | 1             | 0,2323      | 36,48  |
|        | 2             | 0,2330      | 36,38  |
|        | 3             | 0,2258      | 35,54  |
|        | Promedio ± DE |             | 36,13 ± 0,52   |



**Figura 22.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C (n = 3). \* p < 0,05 al comparar entre todos los grupos. + p < 0,05 al comparar con ABZ+LSS. • p < 0,05 al comparar con MLS-3A. τ p < 0,05 al comparar con MLS-3C

Al utilizar el principio activo completamente disuelto, cuando se da el proceso de difusión de disolvente, las moléculas del fármaco van a tener mayor movilidad, lo que va a permitir que aumente la concentración del fármaco en la capa externa del transportador, y esto justificaría el aumento en la cantidad de fármaco disuelto a los treinta minutos que se obtuvo con las microesferas simples del método C.

Es importante agregar el papel del PEG 6000 en la liberación del principio activo. Inicialmente el objetivo primordial por el que se incorporó este polímero en la matriz, fue para alterar la densidad de las microesferas y facilitar su incorporación en el medio de disolución, ya que al formularlas solamente con lípidos tendían a flotar en el medio, lo cual dificultaba la liberación del fármaco.

Herrmann *et al* investigaron el efecto de la adición de PEG 6000 en la liberación de proteínas desde implantes lipídicos, y lograron determinar que al aumentar el contenido del polímero, se incrementaba la liberación de la proteína analizada. Al estudiar la morfología de los implantes antes y después de la exposición al medio de disolución, pudieron concluir que al inicio los implantes eran muy densos y poco porosos, mientras que después del ensayo de disolución, la porosidad aumentaba significativamente. Este fenómeno lo atribuyeron a la solubilidad del PEG en agua <sup>(90)</sup>. A partir de esto, se podría determinar que al incorporarse PEG 6000 en los transportadores lipídicos, una vez que estos se exponen al medio de disolución, el PEG comienza

a disolverse, lo cual favorece la degradación de la matriz, aumentando su porosidad y facilitando la difusión del ABZ al medio de disolución.

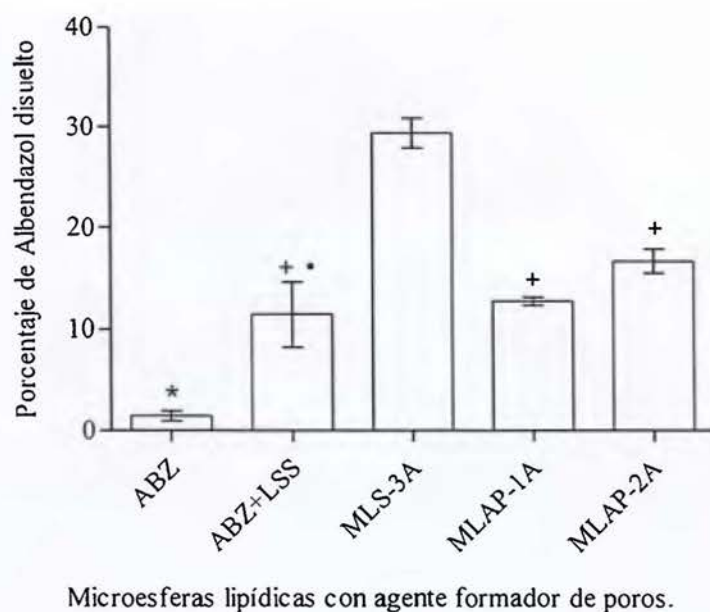
### 5.6.3. Microesferas lipídicas con agente formador de poros.

La primera modificación realizada a las microesferas lipídicas del método A, consistió en agregar un agente formador de poros a la matriz original. Los resultados correspondientes al ensayo de disolución se observan en la tabla 23. Al evaluar el desempeño en la disolución, se obtuvo una disminución en el Q<sub>30</sub> obtenido para las microesferas modificadas con Aerosil® 200 respecto a los transportadores simples MLS-3A ( $p < 0,05$ ; ver anexo 11). Incluso las microesferas lipídicas con Aerosil® 200 no logran superar satisfactoriamente el resultado del ensayo de disolución del Albendazol mezclado con el tensioactivo, lo que significa que la matriz no libera el fármaco rápidamente. Esta comparación se muestra en la figura 23.

**Tabla 23.** Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.

| Código  | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|---------|---------------|-------------|--|
| MLAP-1A | Estándar      | 0,6368      | -  |
|         | 1             | 0,0795      | 12,82  |
|         | 2             | 0,0821      | 13,04  |
|         | 3             | 0,0768      | 12,28  |
|         | Promedio ± DE |             | 12,71 ± 0,39   |
| MLAP-2A | Estándar      | 0,6368      | -  |
|         | 1             | 0,0999      | 15,75  |
|         | 2             | 0,1030      | 16,30  |
|         | 3             | 0,1147      | 18,03  |
|         | Promedio ± DE |             | 16,69 ± 1,19   |



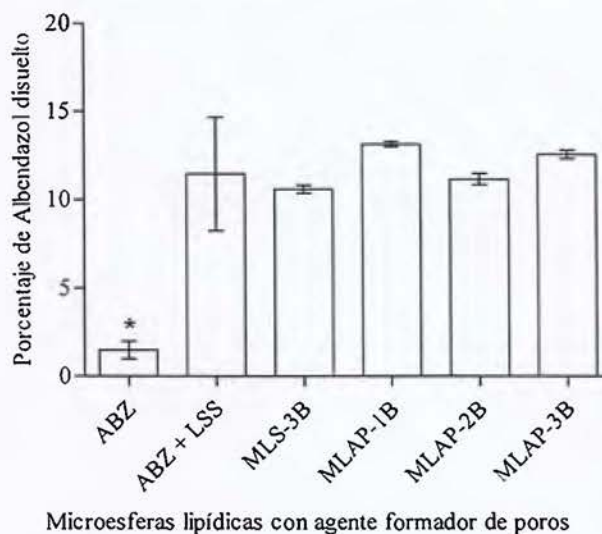


**Figura 23.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A (n = 3). \* p < 0,05 al comparar entre todos los grupos. + p < 0,05 al comparar con MLS-3A. \* p < 0,05 al comparar con MLAP-2A

Al añadir el Aerosil® 200 a las microesferas del método B (tabla 24), no se observó ninguna diferencia significativa en el ensayo de disolución respecto a las microesferas simples, las cuales tampoco mejoraron la velocidad de disolución respecto al ABZ con tensioactivo. Este comportamiento se observa en la figura 24.

**Tabla 24.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B.

| Código  | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|---------|---------------|-------------|--|
| MLAP-1B | Estándar      | 0,6575      | -  |
|         | 1             | 0,0833      | 13,17  |
|         | 2             | 0,0837      | 13,30  |
|         | 3             | 0,0822      | 12,98  |
|         | Promedio ± DE |             | 13,15 ± 0,16   |
| MLAP-2B | Estándar      | 0,6621      | -  |
|         | 1             | 0,0699      | 10,82  |
|         | 2             | 0,0735      | 11,44  |
|         | 3             | 0,0718      | 11,21  |
|         | Promedio ± DE |             | 11,16 ± 0,31   |
| MLAP-3B | Estándar      | 0,6507      | -  |
|         | 1             | 0,0793      | 12,39  |
|         | 2             | 0,0797      | 12,47  |
|         | 3             | 0,0824      | 12,83  |
|         | Promedio ± DE |             | 12,56 ± 0,23   |



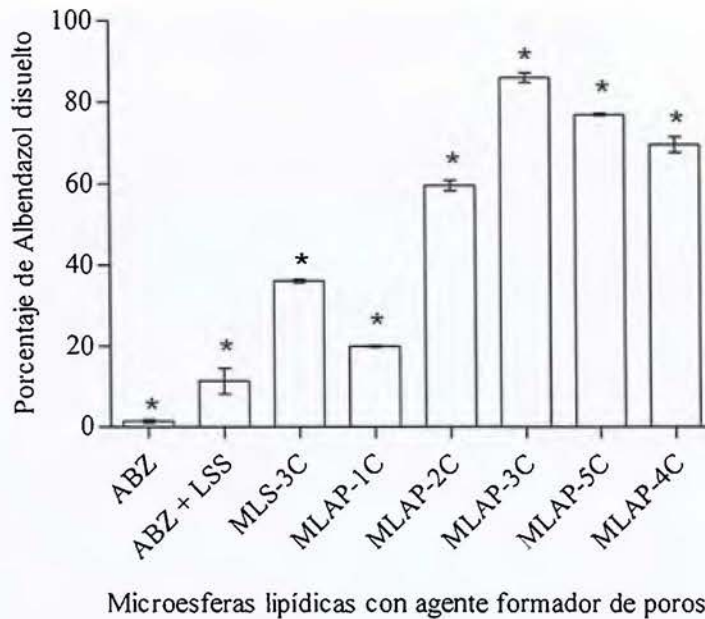
**Figura 24.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método B (n = 3). \* p < 0,05 al comparar con todos los grupos.

Por otro lado, al incluir el agente formador de poros en las microesferas del método C, se observó un comportamiento interesante en el porcentaje de disolución obtenido a los 30 minutos (tabla 25). Al incluir el Aerosil® 200 en concentraciones de 2 %, 4 % y 6 % (MLAP-1C, MLAP-2C y MLAP-3C, respectivamente), se observa un aumento en el Q<sub>30</sub>, mientras que al utilizar concentraciones de 7 % y 8 % (MLAP-5C y MLAP-4C, respectivamente), el Q<sub>30</sub> empieza a disminuir respecto al máximo alcanzado. El análisis de varianza demostró que las diferencias son estadísticamente significativas al comparar entre todos los grupos (figura 25; anexo 12).

**Tabla 25.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.

| Código  | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|---------|---------------|-------------|--|
| MLAP-1C | Estándar      | 0,6462      | -  |
|         | 1             | 0,1267      | 20,14  |
|         | 2             | 0,1239      | 19,69  |
|         | 3             | 0,1258      | 19,99  |
|         | Promedio ± DE |             | 19,94 ± 0,23   |
| MLAP-2C | Estándar      | 0,6487      | -  |
|         | 1             | 0,3651      | 58,23  |
|         | 2             | 0,3796      | 60,26  |
|         | 3             | 0,3798      | 60,44  |
|         | Promedio ± DE |             | 59,64 ± 1,23   |
| MLAP-3C | Estándar      | 0,6462      | -  |
|         | 1             | 0,5464      | 87,29  |
|         | 2             | 0,5339      | 85,50  |
|         | 3             | 0,5316      | 85,08  |
|         | Promedio ± DE |             | 85,96 ± 1,17   |
| MLAP-5C | Estándar      | 0,6664      | -  |
|         | 1             | 0,4851      | 76,71  |
|         | 2             | 0,4869      | 77,25  |
|         | 3             | 0,4836      | 76,64  |
|         | Promedio ± DE |             | 76,87 ± 0,33   |
| MLAP-4C | Estándar      | 0,6664      | -  |
|         | 1             | 0,4446      | 70,60  |
|         | 2             | 0,4468      | 70,68  |
|         | 3             | 0,4231      | 67,34  |
|         | Promedio ± DE |             | 69,54 ± 1,91   |



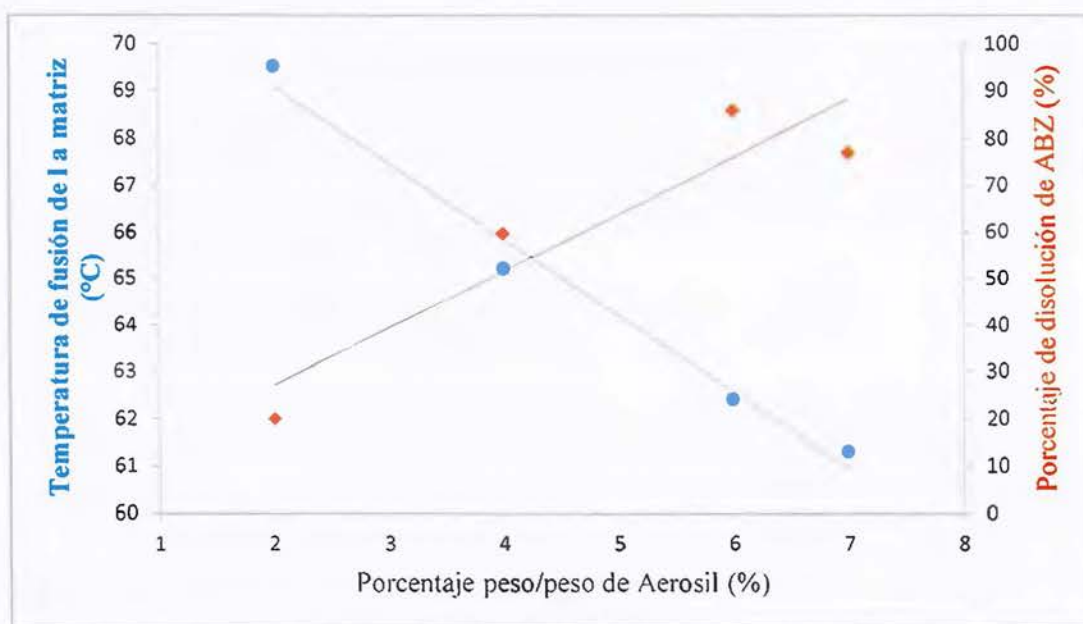


**Figura 25.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C (n = 3). \*p < 0,05 al comparar entre todos los grupos.

Al integrar los resultados obtenidos en la DSC con el desempeño de estos transportadores, se logra identificar una relación inversa entre la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución de Albendazol a los 30 minutos, para los transportadores modificados con concentraciones de Aerosil® 200 de 2 %, 4 %, 6 % y 7 % (ver tabla 26 y figura 26). A partir de esto es posible establecer que para el caso de las microesferas del método C modificadas con sílice coloidal en concentraciones de 2 % a 7 %, existe una relación inversa entre la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución del fármaco conforme se aumenta la concentración del excipiente en la matriz. A pesar de que con la concentración de 7 % se sigue disminuyendo la temperatura de fusión, no se observa el aumento en el Q<sub>30</sub>. En el caso de la incorporación del excipiente al 8 %, se pierde la tendencia observada para las dos variables. Esto se podría atribuir a la adición de un exceso de Aerosil® 200 que satura el sistema y altera las características de liberación.

**Tabla 26.** Relación del porcentaje peso/peso de Aerosil® 200 con la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución de ABZ.

| Código  | Porcentaje peso/peso de Aerosil® 200 | Temperatura de fusión de la matriz (°C) | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q30) |
|---------|--------------------------------------|---|---|
| MLAP-1C | 2                                    | 69                                      | 19,94   |
| MLAP-2C | 4                                    | 65                                      | 59,64   |
| MLAP-3C | 6                                    | 62                                      | 85,96   |
| MLAP-5C | 7                                    | 61                                      | 76,87   |
| MLAP-4C | 8                                    | 66                                      | 69,54   |



**Figura 26.** Relación del porcentaje peso/peso de Aerosil® con la temperatura de fusión de la matriz y el porcentaje de disolución de ABZ.

A pesar de que en los métodos A y B no se logra determinar ningún beneficio en la velocidad de disolución al incorporar Aerosil® 200 en los transportadores estudiados, se establece que este excipiente tiene la capacidad de disminuir el tamaño y la aglomeración de las partículas, por lo que aumenta el área superficial, lo que conlleva a un incremento en la interacción de los transportadores con el medio de disolución, favoreciendo la difusión del fármaco a dicho medio. <sup>(53)</sup> Este efecto se evidencia en los resultados obtenidos para el método C, donde el Aerosil® 200 representó un beneficio en el desempeño de las microesferas, lo que se comprueba con lo

mencionado en la sección de morfología y tamaño de partícula, donde las microesferas producidas por el método C y modificadas con sílice coloidal, registraron disminuciones en el tamaño de partícula, respecto a las microesferas simples correspondientes.

Además, se debe tomar en cuenta que el Aerosil® 200, al ser de naturaleza hidrófila, va a tender a hidratarse, <sup>(91)</sup> por lo que al estar disperso en la matriz del transportador, facilitaría su hidratación, y al aumentarse el contacto del transportador con el medio de disolución, se favorece la difusión del principio activo. La humectación de las micropartículas también es favorecida por la capacidad del excipiente de formar un transportador de superficie porosa, que facilita la entrada de fluidos a la matriz.

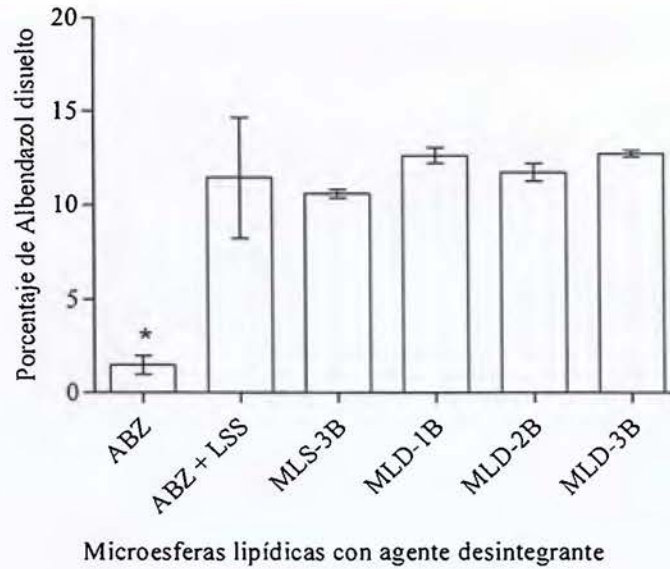
#### 5.6.4. Microesferas lipídicas con agente desintegrante.

La incorporación de un agente desintegrante se llevó a cabo para los métodos B y C. De igual manera que en el caso del Aerosil® 200 en las microesferas del método B, la crospovidona no logró mejorar la velocidad de disolución de ABZ respecto a las microesferas simples correspondientes, ni al compararlo con la mezcla de ABZ y tensioactivo. Los resultados se muestran en la tabla 27 y en la figura 27.

**Tabla 27.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLD-1B | Estándar      | 0,6646      | -  |
|        | 1             | 0,0780      | 12,20  |
|        | 2             | 0,0801      | 12,66  |
|        | 3             | 0,0832      | 13,02  |
|        | Promedio ± DE |             | 12,63 ± 0,41   |
| MLD-2B | Estándar      | 0,6646      | -  |
|        | 1             | 0,0781      | 12,19  |
|        | 2             | 0,0753      | 11,74  |
|        | 3             | 0,0723      | 11,27  |
|        | Promedio ± DE |             | 11,73 ± 0,46   |
| MLD-3B | Estándar      | 0,6575      | -  |
|        | 1             | 0,0790      | 12,55  |
|        | 2             | 0,0810      | 12,78  |
|        | 3             | 0,0813      | 12,88  |
|        | Promedio ± DE |             | 12,74 ± 0,17   |





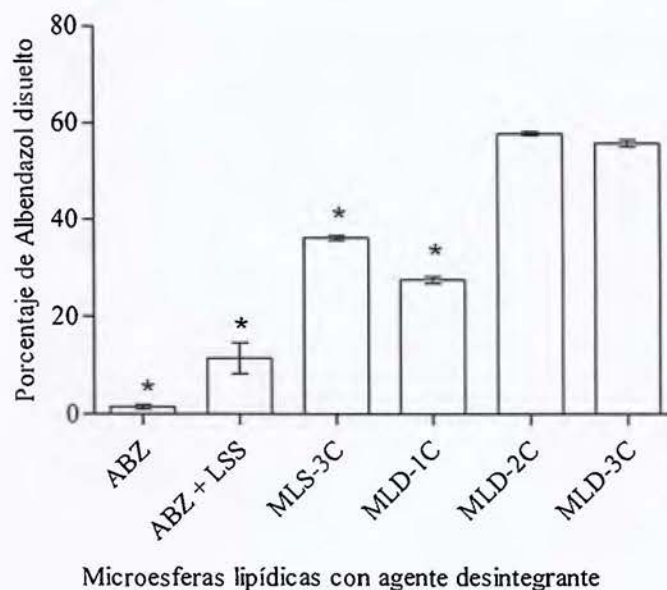
**Figura 27.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método B (n = 3). \* p < 0,05 al comparar con todos los grupos.

En la tabla 28 se observa que al agregar Crospovidona en concentraciones de 4 % y 6 % a la fórmula de las microesferas del método C (MLD-2C y MLD-3C, respectivamente), se logró mejorar de manera significativa la cantidad de ABZ disuelto a los 30 minutos. Al utilizar la concentración de 2 % (MLD-1C), no se logró mejorar el porcentaje de disolución obtenido con las microesferas simples (figura 28; anexo 13)

Como la diferencia entre las microesferas producidas con 4 % y 6 % del desintegrante no fue estadísticamente significativa, no se logra identificar una tendencia en el efecto de la concentración de crospovidona en la velocidad de disolución.

**Tabla 28.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLD-1C | Estándar      | 0,6736      | -  |
|        | 1             | 0,1721      | 26,85  |
|        | 2             | 0,1747      | 27,31  |
|        | 3             | 0,1802      | 28,24  |
|        | Promedio ± DE |             | 27,47 ± 0,71   |
| MLD-2C | Estándar      | 0,6487      | -  |
|        | 1             | 0,3655      | 58,24  |
|        | 2             | 0,3635      | 57,39  |
|        | 3             | 0,3628      | 57,68  |
|        | Promedio ± DE |             | 57,77 ± 0,43   |
| MLD-3C | Estándar      | 0,6407      | -  |
|        | 1             | 0,3577      | 56,43  |
|        | 2             | 0,3527      | 55,89  |
|        | 3             | 0,348       | 54,98  |
|        | Promedio ± DE |             | 55,77 ± 0,73   |



**Figura 28.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C (n = 3). \* p < 0,05 al comparar entre todos los grupos.

A pesar de que la crospovidona no demostró ningún beneficio al utilizarla en los transportadores del método B, teóricamente es posible explicar el beneficio observado en las microesferas obtenidas por el método C. Basándose en que la liberación del fármaco desde los transportadores diseñados en esta investigación se puede dar por difusión y/o por erosión de la matriz <sup>(83)</sup>, y tomando en cuenta que la crospovidona funciona como desintegrante por su capacidad de hinchamiento, porosidad y acción capilar <sup>(55-57)</sup>, se podría pensar que al obtenerse transportadores lipídicos con crospovidona dispersa en su estructura, al entrar en contacto con el medio de disolución, la crospovidona va a promover la erosión de la matriz al hincharse y va a facilitar la penetración del líquido en la microesfera, esto debido a la acción capilar del excipiente, lo que explicaría el mejoramiento en la velocidad de disolución observado. Además, retomando lo discutido en la sección de morfología y tamaño de partícula, el uso de una concentración alta de crospovidona (6 %), generó una disminución en el tamaño de partícula, lo que implica un aumento del área superficial, por lo que aumenta el contacto con el medio de disolución y se incrementa la difusión del principio activo desde la matriz.

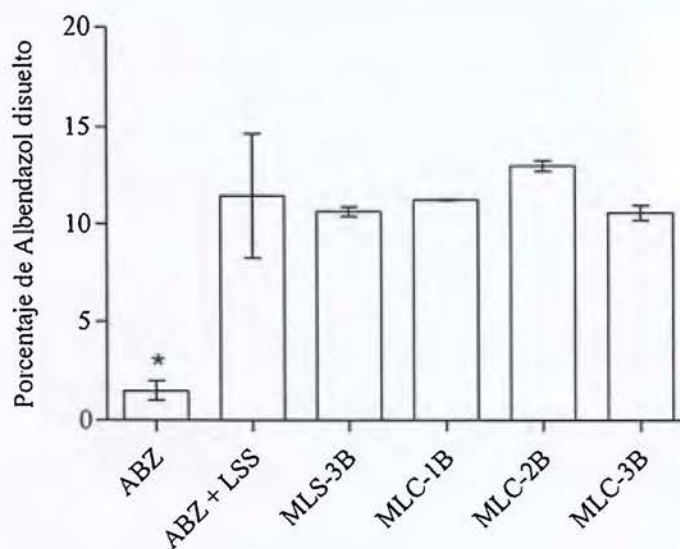
#### **5.6.5. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante.**

Al igual que en la incorporación individual de Aerosil® 200 y crospovidona, el uso en conjunto de ambos excipientes en diferentes proporciones en las microesferas del método B, no logró mejorar la velocidad de disolución respecto a las microesferas simples del mismo método, ni al comparar con la mezcla de ABZ con el tensioactivo (ver tabla 29 y figura 29).



**Tabla 29.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLC-1B | Estándar      | 0,6472      | -  |
|        | 1             | 0,0782      | 11,24  |
|        | 2             | 0,0784      | 11,28  |
|        | 3             | 0,0781      | 11,21  |
|        | Promedio ± DE |             | 11,24 ± 0,04   |
| MLC-2B | Estándar      | 0,6472      | -  |
|        | 1             | 0,0820      | 12,91  |
|        | 2             | 0,0847      | 13,30  |
|        | 3             | 0,0812      | 12,77  |
|        | Promedio ± DE |             | 12,99 ± 0,27   |
| MLC-3B | Estándar      | 0,6379      | -  |
|        | 1             | 0,0660      | 10,41  |
|        | 2             | 0,0694      | 11,01  |
|        | 3             | 0,0649      | 10,29  |
|        | Promedio ± DE |             | 10,57 ± 0,39   |



Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante

**Figura 29.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B (n = 3). \* p < 0,05 al comparar entre todos los grupos.

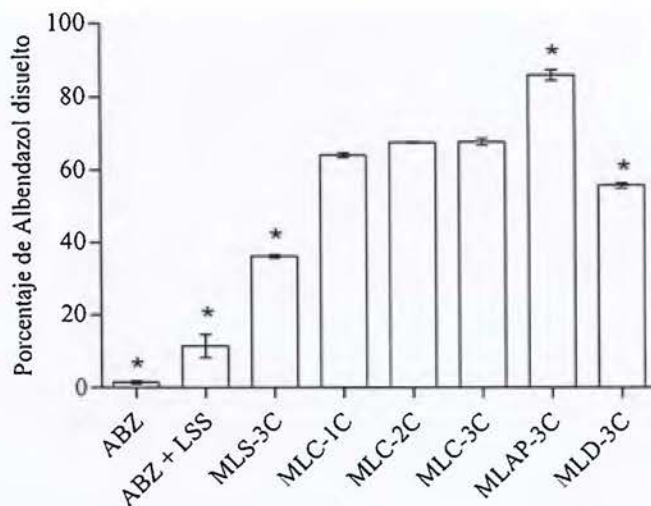
Por otro lado, al introducir la combinación de dichos excipientes en los transportadores obtenidos por el método C, se logró aumentar la cantidad de ABZ disuelto a los treinta minutos, al comparar con las microesferas simples y el ABZ con tensioactivo ( $p < 0,05$ ; ver anexo 14). Sin embargo no se lograron determinar diferencias entre las distintas proporciones de las combinaciones de excipientes utilizadas y su efecto en la disolución del fármaco. Estos resultados se muestran en la tabla 30 y figura 30.

La figura 30 también muestra la comparación al sustituir la fórmula básica de las microesferas con 6 % de los agentes modificadores estudiados, ya sea de manera individual o la combinación de ambos excipientes. Es posible observar que los porcentajes de ABZ disuelto a los treinta minutos obtenidos con la combinación de excipientes son significativamente superiores respecto al resultado obtenido al utilizar la misma proporción de crospovidona de forma individual (MLD-3C). Mientras que el uso de Aerosil® 200 al 6 % (MLAP-3C) da mejores resultados en el ensayo de disolución respecto a los casos anteriores.

Además la tabla 32 resume todos los resultados obtenidos en las pruebas de desempeño de las microesferas lipídicas.

**Tabla 30.** Ensayos de disolución de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C.

| Código | Muestra       | Absorbancia | Porcentaje de disolución a los 30 minutos (Q <sub>30</sub> ) |
|--------|---------------|-------------|--|
| MLC-1C | Estándar      | 0,6582      | -  |
|        | 1             | 0,4038      | 64,75  |
|        | 2             | 0,3948      | 63,98  |
|        | 3             | 0,3935      | 63,37  |
|        | Promedio ± DE |             | 64,03 ± 0,69   |
| MLC-2C | Estándar      | 0,6582      | -  |
|        | 1             | 0,4199      | 67,50  |
|        | 2             | 0,4181      | 67,42  |
|        | 3             | 0,4191      | 67,71  |
|        | Promedio ± DE |             | 67,54 ± 0,15   |
| MLC-3C | Estándar      | 0,6582      | -  |
|        | 1             | 0,4152      | 66,74  |
|        | 2             | 0,4241      | 68,39  |
|        | 3             | 0,4214      | 68,08  |
|        | Promedio ± DE |             | 67,74 ± 0,88   |



Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante

**Figura 30.** Porcentaje de Albendazol disuelto a los treinta minutos. Microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C (n = 3). \*p < 0,05 al comparar con todos los grupos.

Anteriormente se discutieron los posibles mecanismos por los cuales el Aerosil® 200 y la crospovidona podrían estar involucrados en el mejoramiento de la velocidad de disolución del ABZ. Al utilizar una combinación de ambos excipientes, se planeaba investigar si existía un tipo de efecto sinérgico que mejorara aún más la velocidad de disolución. Al comparar los resultados del método C, donde se observaron efectos positivos de los excipientes, se puede notar que la combinación logra mejorar el desempeño que se obtiene utilizando solo crospovidona. Sin embargo la combinación no mejora el Q<sub>30</sub> de algunas de las formulas modificadas únicamente con Aerosil® 200, por lo que se puede asumir que el sílice coloidal tiene un papel importante en el mejoramiento de la velocidad de disolución de ABZ en los transportadores diseñados en esta investigación.

Es importante agregar que, además de los beneficios tecnológicos que aportan los transportadores diseñados en este trabajo, tales como una mayor superficie de contacto del principio activo con el medio de disolución y una rápida liberación del fármaco desde la matriz, se debe tomar en cuenta la influencia de la estructura cristalina.



Existen muchos compuestos sólidos que pueden presentar polimorfismo, debido a su capacidad de cristalizar redes con diferentes arreglos o conformaciones. Por otro lado los sólidos amorfos no poseen una red cristalina definida y sus moléculas se encuentran desordenadas. Los polimorfos de un mismo compuesto químico, además de diferir en la estructura de su estado sólido, también difieren en las propiedades físicas y químicas, lo cual afecta la estabilidad, disolución, biodisponibilidad y otras características propias del fármaco. <sup>(92)</sup> En general se establece que un sólido en estado amorfo es más fácil de disolver que uno con una red cristalina ordenada, ya que se necesita menos energía para distorsionar la red de moléculas del primero. Por ello es importante destacar la comprobación mediante DSC de la disminución en la cristalinidad del principio activo.

Además se debe tomar en cuenta las lipasas del tracto digestivo, producen hidrólisis enzimática de las matrices lipídicas, aumentando la erosión superficial del transportador, lo cual favorece la disolución del principio activo. <sup>(16)</sup> A partir de esto se podría pensar que al evaluar los transportadores diseñados en este trabajo en un medio de disolución que contenga este tipo de enzimas, podrían obtenerse resultados de disolución con valores más altos.

Por último, como prueba confirmatoria, se llevó a cabo el ensayo de disolución para 6 muestras de la fórmula que registró el mayor porcentaje de disolución (MLAP-3C), los resultados se encuentran en la tabla 31.

**Tabla 31.** Ensayo de disolución de las microesferas lipídicas con agente formador de poros al 6 % (MLAP-3C).

| Muestra              | Porcentaje de disolución a los 30 minutos ( $Q_{30}$ ) |
|----------------------|--|
| 1                    | 85   |
| 2                    | 86   |
| 3                    | 85   |
| 4                    | 85   |
| 5                    | 86   |
| 6                    | 86   |
| <b>Promedio ± DE</b> | <b>85,5 ± 0,55</b>                                     |

Según el criterio de aceptación para la etapa S1, ninguna de las 6 muestras analizadas debe registrar un porcentaje de disolución menor a  $Q + 5\%$ , que en este caso corresponde a  $85\%$ . Al analizar los resultados individualmente, se puede concluir que están conforme al criterio de aceptación.

**Tabla 32.** Resumen de resultados de la evaluación del desempeño de las microesferas lipídicas (n = 3).

| <b>Código</b>    | <b>Porcentaje de carga de ABZ (Promedio ± DE)</b> | <b>Porcentaje de encapsulación (Promedio ± DE)</b> | <b>Porcentaje de ABZ disuelto a 30 min (Q<sub>30min</sub>) (Promedio ± DE)</b> |
|------------------|---|--|--|
| Albendazol       | -   | -  | 1,50 ± 0,50  |
| Albendazol + LSS | -   | -  | 11,45 ± 3,21   |
| MLS-1A           | 60,68 ± 0,57                                      | 82,85 ± 0,78                                       | 7,04 ± 1,03  |
| MLS-2A           | 60,14 ± 0,82                                      | 79,29 ± 1,08                                       | 12,58 ± 1,55   |
| MLS-3A           | 57,11 ± 1,04                                      | 81,68 ± 1,48                                       | 29,38 ± 1,50   |
| MLAP-1A          | 61,68 ± 0,69                                      | 62,92 ± 0,71                                       | 12,71 ± 0,39   |
| MLAP-2A          | 55,43 ± 3,05                                      | 69,35 ± 3,82                                       | 16,69 ± 1,19   |
| MLS-3B           | 31,94 ± 0,17                                      | 86,79 ± 0,45                                       | 10,59 ± 0,23   |
| MLAP-1B          | 31,59 ± 0,22                                      | 87,54 ± 0,60                                       | 13,15 ± 0,16   |
| MLAP-2B          | 31,29 ± 0,86                                      | 85,37 ± 2,34                                       | 11,16 ± 0,31   |
| MLAP-3B          | 33,80 ± 0,35                                      | 93,90 ± 0,97                                       | 12,56 ± 0,23   |
| MLD-1B           | 32,48 ± 0,45                                      | 85,84 ± 1,20                                       | 12,63 ± 0,41   |
| MLD-2B           | 32,19 ± 0,23                                      | 86,39 ± 0,63                                       | 11,73 ± 0,46   |
| MLD-3B           | 31,90 ± 0,52                                      | 90,12 ± 1,48                                       | 12,74 ± 0,17   |
| MLC-1B           | 31,66 ± 0,21                                      | 93,47 ± 0,64                                       | 11,24 ± 0,04   |
| MLC-2B           | 29,68 ± 0,58                                      | 83,64 ± 1,63                                       | 12,99 ± 0,27   |
| MLC-3B           | 34,60 ± 0,94                                      | 91,31 ± 2,50                                       | 10,57 ± 0,39   |
| MLS-3C           | 27,40 ± 0,67                                      | 80,24 ± 1,96                                       | 36,13 ± 0,52   |
| MLAP-1C          | 27,11 ± 0,79                                      | 75,13 ± 2,17                                       | 19,94 ± 0,23   |
| MLAP-2C          | 24,53 ± 0,75                                      | 76,38 ± 2,35                                       | 59,64 ± 1,23   |
| MLAP-3C          | 21,17 ± 0,48                                      | 76,79 ± 1,74                                       | 85,96 ± 1,17   |
| MLAP-5C          | 18,83 ± 1,27                                      | 75,15 ± 5,07                                       | 76,87 ± 0,33   |
| MLAP-4C          | 26,76 ± 0,50                                      | 82,92 ± 1,54                                       | 69,54 ± 1,91   |
| MLD-1C           | 24,63 ± 0,12                                      | 72,63 ± 0,35                                       | 27,47 ± 0,71   |
| MLD-2C           | 26,25 ± 0,23                                      | 77,98 ± 0,69                                       | 57,77 ± 0,43   |
| MLD-3C           | 25,41 ± 0,39                                      | 78,58 ± 1,20                                       | 55,77 ± 0,73   |
| MLC-1C           | 25,70 ± 0,49                                      | 86,59 ± 1,64                                       | 64,03 ± 0,69   |
| MLC-2C           | 27,50 ± 0,32                                      | 89,46 ± 1,06                                       | 67,54 ± 0,15   |
| MLC-3C           | 23,74 ± 0,42                                      | 85,80 ± 1,48                                       | 67,74 ± 0,88   |

### 5.7. Determinación de la linealidad del método espectrofotométrico

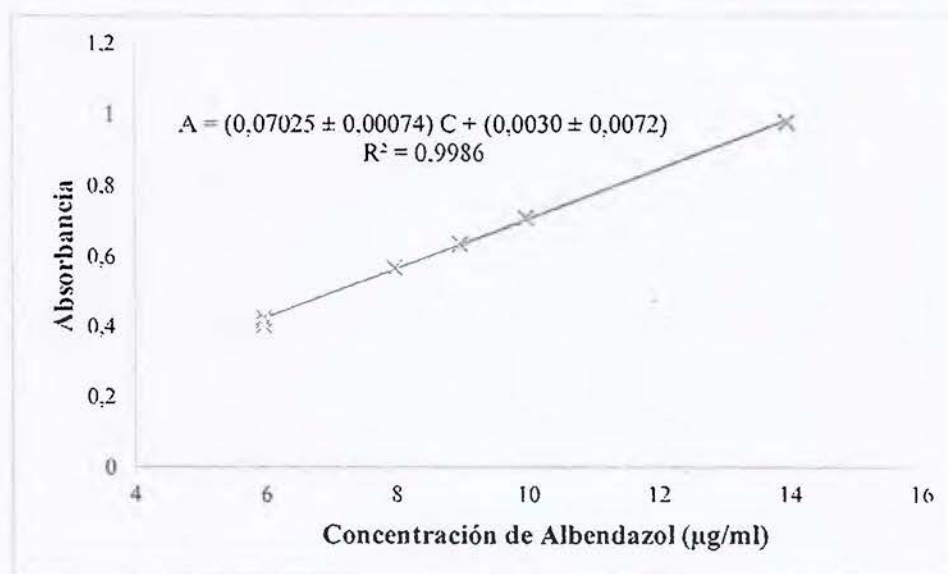
En la tabla 33 se detallan las absorbancias obtenidas para las soluciones de Albendazol, las cuales fueron preparadas por triplicado y analizadas mediante un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 308 nm. Además en la figura 31 se demuestra gráficamente el comportamiento lineal del método espectrofotométrico en el rango de concentraciones utilizado. La curva de calibración se describe por la ecuación:

$$A = (0,07025 \pm 0,00074) C + (0,0030 \pm 0,0072)$$

Donde A corresponde a la absorbancia de la solución de Albendazol y C representa la concentración de dicha solución. El coeficiente de determinación es equivalente a 0,9986.

**Tabla 33.** Absorbancias correspondientes de las diferentes soluciones de Albendazol para la determinación de la linealidad.

| Concentración<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbancia ( $\lambda = 308 \text{ nm}$ ) |        |        |
|---------------------------------------|--|--------|--------|
|                                       | S1   | S2     | S3     |
| 5,98                                  | 0,4042                                     | 0,4251 | 0,4152 |
| 7,98                                  | 0,5691                                     | 0,5655 | 0,5694 |
| 8,97                                  | 0,6370                                     | 0,6334 | 0,6372 |
| 9,97                                  | 0,7102                                     | 0,7092 | 0,7099 |
| 13,96                                 | 0,9792                                     | 0,9788 | 0,9764 |



**Figura 31.** Determinación gráfica de la linealidad del método espectrofotométrico.



## 6. Conclusiones

1. La incorporación de un lípido líquido (triglicérido de ácido caprílico/cáprico) en la matriz de los transportadores lipídicos microestructurados del método A (empleando poloxámero 407) demostró mejorar la velocidad de disolución del Albendazol.
2. La adición del Albendazol disuelto en un disolvente compatible con el método de difusión de disolvente, es un paso esencial para lograr mejorar el desempeño de microesferas lipídicas como transportadores de liberación inmediata del fármaco.
3. Las modificaciones con Aerosil® 200, crospovidona y la combinación de ambos excipientes en el método B (empleando PEG 6000 y PVP K25, fármaco disperso) no representaron beneficios en el desempeño de las microesferas lipídicas respecto al mejoramiento de la disolución de Albendazol.
4. Al modificar los transportadores del método C (empleando PEG 6000 y PVP K25, fármaco disuelto) con Aerosil® 200, se observaron los mejores resultados en el desempeño, específicamente al utilizar el excipiente al 6 %.
5. La incorporación de crospovidona demostró un mejoramiento en la velocidad de disolución del fármaco, al utilizarla en concentraciones de 4 % y 6 % en las microesferas del método C.
6. En este estudio no se pudo demostrar un efecto sinérgico al utilizar la combinación de Aerosil® 200 y crospovidona en el desempeño de microesferas lipídicas de Albendazol.
7. Existe una relación inversa entre la temperatura de fusión de la matriz de los transportadores lipídicos del método C modificados con Aerosil® 200 y el desempeño de los mismos en el ensayo de disolución, al utilizar concentraciones del excipiente de 2 %, 4% y 6 %. Concentraciones mayores demostraron una pérdida en el mejoramiento del desempeño.
8. El mejoramiento en la velocidad de disolución de Albendazol se puede atribuir a la disminución de la cristalinidad del principio activo en las formulaciones.

## 7. Recomendaciones

- Realizar estudios *in vitro* con medios de disolución que incluyan lipasas, con el fin de obtener condiciones de liberación más semejantes a las encontradas en el tracto digestivo, dada la naturaleza lipídica de los transportadores estudiados.
- Estudiar el comportamiento de los transportadores lipídicos microestructurados al incorporarlos en formas farmacéuticas sólidas de administración oral, como tabletas y cápsulas.
- Realizar estudios de estabilidad de los transportadores diseñados en esta investigación.
- Evaluar el desempeño de otros principios activos de difícil disolución al incorporarlos en transportadores lipídicos microestructurados.
- Realizar análisis de residuos de metanol en las microesferas obtenidas mediante la incorporación del Albendazol disuelto en este disolvente.
- Realizar estudios que permitan mejorar el rendimiento del método de obtención de microesferas lipídicas por difusión de disolvente.
- Estudiar los cambios en la estructura cristalina del principio activo a partir de análisis de difracción de rayos X.
- Estudiar la cinética de liberación del fármaco desde los transportadores lipídicos microestructurados a partir de perfiles de disolución.



## 8. Referencias bibliográficas

1. Attama A, Igbonekwu C. In vitro properties of surface-modified solid lipid microspheres containing an antimalarial drug: Halofantrine. *Asian Pac J Trop Med. Hainan Medical College*; 2011;4(4):253–8.
2. Bhoyar PK, Morani DO, Biyani DM, Umekar MJ, Mahure JG, Amgaonkar YM. Encapsulation of naproxen in lipid-based matrix microspheres: characterization and release kinetics. *J young Pharm. Elsevier Masson SAS*; 2011;3(2):105–11.
3. Kalepu S, Manthina M, Padavala V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm Sin B. 2013*;3(6):361–72.
4. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev. 2008*;60(6):734–46.
5. Mayet L, Jung-Cook H, Mendoza O, Rodríguez J. Estudio comparativo de perfiles de disolución de medicamentos del mercado nacional. *Rev Mex Cienc Farm. 2008*;39(4):4–8.
6. Garcia JJ. Estudio biofarmacéutico y parasitológico de una formulación de albendazol en hidroxipropil -  $\beta$  - ciclodextrina. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
7. Moore T. Agents used to treat parasitic infections. En: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J, editores. *Harrison's Principles of Internal Medicine. 19ª ed. New York: McGraw-Hill*; 2015.
8. Ugalde P. Mejoramiento de la disolución del Albendazol mediante formación de dispersiones sólidas en polímeros hidrofílicos, complejos de hidroxipropil-  $\beta$  -ciclodextrina y microesferas lipídicas. [Tesis] Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 2015.
9. Severino P, Andreani T, Macedo AS, Fangueiro JF, Santana MH a., Silva AM, et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *J Drug Deliv. 2011*;2012:1–10.
10. Centers for Disease Control and Prevention. About Parasites [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2014 [citado 29 de diciembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/parasites/about.html>
11. Anandan J V. Parasitic Diseases. En: DiPiro J, Talbert R, Yee G, Matzke G, Wells B, Posey L, editores. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 9ª ed. New York: McGraw-Hill*; 2014.
12. Ministerio de Salud, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, Caja Costarricense del Seguro Social, Instituto Nacional de Estadística y Censos, Instituto Costarricense sobre Fármacos. Encuesta Nacional de Nutrición 2008-2009. Fascículo 5 Parasitosis Intestinales. Costa Rica: El Ministerio; 2013.
13. McCarthy J, Loukas A, Hotez P. Chemotherapy of Helminth Infections. En: Brunton L, Chabner B, Knollmann B, editores. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12ª ed. New York: McGraw-Hill*; 2011.
14. Rosenthal PJ. Clinical Pharmacology of the Antihelminthic Drugs. En: Katzung B, Trevor A, editores. *Basic & Clinical Pharmacology. 13ª ed. New York: McGraw-Hill*; 2015.
15. Trevor A, Katzung B, Kruidering-Hall M, Masters S. Antihelminthic Drugs. En: Trevor A, Katzung B, Kruidering-Hall M, Masters S, editores. *Katzung & Trevor's Pharmacology: Examination & Board Review. 10ª ed. New York: McGraw-Hill*; 2013.
16. Santibáñez B. Evaluación del efecto de un agente dispersante sobre la liberación de albendazol



- desde una matriz lipídica. [Tesis] Chile: Universidad de Chile; 2009.
17. Fernández R. Efecto de un agente dispersante sobre la liberación de Albendazol desde una matriz lipídica. [Tesis] Chile: Universidad Austral de Chile; 2006.
  18. Amidon GL, Lennernäs H, Shah V, Crison J. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in vitro Drug Product Dissolution and in vivo Bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413–20.
  19. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaver extensions. *Pharm Res.* 2002;19(7):921–5.
  20. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm.* 2006;321(1-2):1–11.
  21. Food and Drug Administration. Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. [Internet]. Food and Drug Administration 2010 [citado 8 de junio de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm201453.htm>
  22. Chavda H, Patel C, Anand I. Biopharmaceutics classification system. *Sys Rev Pharm.* 2010;1(1):62–9.
  23. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles Production , characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:83–101.
  24. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci.* 2006;29(3-4):278–87.
  25. Padhye SG, Nagarsenker MS. Simvastatin Solid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery: Formulation Development and In vivo Evaluation. *Indian J Pharm Sci.* 2013;75(5):591–8.
  26. Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul.* 2010;27(3):187–97.
  27. Shekhar K, Madhu MN, Pradeep B, Banji D. A review on microenpsulation . *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;5(2):58–62.
  28. Oxley J. Overview of Microencapsulation Process Technologies. En: Gaonkar A, Vasisht N, Khare A, Sobel R, editores. *Microencapsulation in the Food Industry: A practical implementation guide.* Estados Unidos: Elsevier Inc.; 2014. p. 35–46.
  29. Shannaq R, Farid M. Microencapsulation of phase change materials (PCMs) for thermal energy storage systems. En: Cabeza L, editor. *Advances in thermal energy storage systems Methods and applications.* Reino Unido: Elsevier; 2015. p. 247–84.
  30. Uchida H, Nishijima M, Sano K, Demoto K, Sakabe J, Shimoyama Y. Production of theophylline nanoparticles using rapid expansion of supercritical solutions with a solid cosolvent (RESS-SC) technique. *J Supercrit Fluids.* 2015;105:128–35.
  31. Cocero MJ, Martín Á, Mattea F, Varona S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *J Supercrit Fluids.* 2009;47(3):546–55.
  32. Sobel R, Versic R, Gaonkar AG. Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. En: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare A, Sobel R, editores. *Microencapsulation in the Food*



- Industry. Estados Unidos: Elsevier Inc.; 2014. p. 3–12.
33. Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, et al. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv.* 2010;2011:1–19.
  34. Liu P, Rong X, Laru J, Van Veen B, Kiesvaara J, Hirvonen J, et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. *Int J Pharm.* 2011;411(1-2):215–22.
  35. Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm.* 1998;160(2):229–37.
  36. Doh HJ, Jung Y, Balakrishnan P, Cho HJ, Kim DD. A novel lipid nanoemulsion system for improved permeation of granisetron. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* Elsevier B.V.; 2013;101:475–80.
  37. Shafiq-un-Nabi S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A, et al. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2007;8(2):E12–7.
  38. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):163–72.
  39. Sangsen Y, Wiwattanawongsa K, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Wiwattanapatapee R. Modification of oral absorption of oxyresveratrol using lipid based nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* Elsevier B.V.; 2015;131:182–90.
  40. Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MH a. Crystallinity of Dynasan ®114 and Dynasan ®118 matrices for the production of stable Miglyol ®-loaded nanoparticles. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108(1):101–8.
  41. Tiwari R, Pathak K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int J Pharm.* 2011;415(1-2):232–43.
  42. Müller RH, Radtke M, Wissing S a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 2002;242(1-2):121–8.
  43. Üner M, Yener G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspective. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(3):289–300.
  44. Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm.* 2002;239(1-2):121–8.
  45. Han F, Li S, Yin R, Liu H, Xu L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2008;315(1-3):210–6.
  46. Liedtke S, Wissing S a., Müller RH, Mäder K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. *Int J Pharm.* 2000;196(2):183–5.
  47. Trotta M, Debernardi F, Caputo O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 2003;257(1-2):153–60.
  48. Trotta M, Cavalli R, Carlotti ME, Battaglia L, Debernardi F. Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique. *Int J Pharm.* 2005;288(2):281–8.
  49. Gasco M, Antonelli L, Inventor. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. Estados Unidos, patente 5250236, 1993. p. 1–4.



50. Silva a. C, González-Mira E, García ML, Egea M a., Fonseca J, Silva R, et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;86(1):158–65.
51. Albertini B, Passerini N, González-Rodríguez ML, Perissutti B, Rodríguez L. Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles. *J Control Release*. 2004;100(2):233–46.
52. You J, Cui F De, Li QP, Han X, Yu YW, Yang MS. A novel formulation design about water-insoluble oily drug: Preparation of zedoary turmeric oil microspheres with self-emulsifying ability and evaluation in rabbits. *Int J Pharm*. 2005;288(2):315–23.
53. Mani N, Suh HR, Jun HW. Microencapsulation of a Hydrophilic Drug into a Hydrophobic Matrix Using a Salting-Out Procedure. II. Effects of Adsorbents on Microsphere Properties. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004;30(1):83–93.
54. Rowe R, Sheskey P, Quinn M. Handbook of pharmaceutical excipients. 6ª ed. Rowe R, Sheskey P, Quinn M, editores. Londres: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
55. Hernández-Torres JE, Melgoza-Contreras LM. Principales superdisgregantes sintéticos, mecanismos y factores que influyen en su actividad. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2014;43(2):234–47.
56. Mohanachandran PS, Sindhumol PG, Kiran TS. Superdisintegrants: An overview. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011;6(1):105–9.
57. Shihora H, Panda S. Superdisintegrants , Utility in Dosage Forms : A Quick Review. *J Pharm Sci Biosci Res*. 2011;1(3):148–53.
58. Wang G, Lu T. X-Ray Diffraction. En: Wang G, Lu T, editores. RHEED Transmission Mode and Pole Figures Thin Film and Nanostructure Texture Analysis. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 55–71.
59. Chen Y, Yang X, Zhao L, Almásy L, Garamus VM, Willumeit R, et al. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2014;455:36–43.
60. Borchert H. X-Ray Diffraction. En: Hull R, Jagadish C, Osgood R, Parisi J, Uchida S, Wang Z, editores. Solar Cells Based on Colloidal Nanocrystals. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 79–94.
61. Shvyd'ko Y. Dynamical Theory of X-Ray Diffraction. En: Rhodes W, editor. X-Ray Optics. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 68–71.
62. Reinisch T, Rösger J, Hinz H. Differential Scanning Calorimetry. En: Ganten D, Ruckpaul K, Birchmeier W, Epplen J, Genser K, Gossen M, editores. Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 402–7.
63. Jiménez A, Beltrán G. Aplicación de la Calorimetría Diferencial de Barrido ( CDB ) en la caracterización del aceite de oliva virgen. *Grasas y aceites*. 2003;54(4):403–9.
64. Sandoval A, Rodríguez E, Fernández A. Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*. 2005;72(146):45–53.
65. Tan CP, Man YBC. Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. *Food Chem*. 2002;76(1):89–102.



66. Tan CP, Che Man YB. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. *J Am Oil Chem Soc.* 2000;77(2):143–55.
67. Alvarez A, Prieto M. Technical and Methodological Aspects of Fourier Transform. En: Hartel R, editor. *Fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology.* New York: Springer US; 2012. p. 1–17.
68. Vlachos N, Skopelitis Y, Psaroudaki M, Konstantinidou V, Chatzilazarou A, Tegou E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Anal Chim Acta.* 2006;573-574:459–65.
69. Kong J, Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39(8):549–59.
70. Yuan T, Qin L, Wang Z, Nie J, Guo Z, Li G, et al. Solid lipid dispersion of calcitriol with enhanced dissolution and stability. *Asian J Pharm Sci.* 2013;8(1):36–45.
71. Yurkanis P. Espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja y espectroscopia ultravioleta/visible. En: Cruz L, editor. *Química Orgánica.* 5ª ed. México: Pearson Educación; 2008. p. 512–55.
72. Hu F-Q, Jiang S-P, Du Y-Z, Yuan H, Ye Y-Q, Zeng S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm.* 2006;314(1):83–9.
73. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. *Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional USP 38/ NF33.* 2015. p. 2255-2257
74. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, M??der K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release.* 2004;95(2):217–27.
75. Susarla R, Afolabi A, Patel D, Bilgili E, Dav?? RN. Novel use of superdisintegrants as viscosity enhancing agents in biocompatible polymer films containing griseofulvin nanoparticles. *Powder Technol.* 2015;285:25–33.
76. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996;143(2):133–41.
77. Shahgaldian P, Da Silva E, Coleman AW, Rather B, Zaworotko MJ. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): A detailed study of preparation and stability parameters. *Int J Pharm.* 2003;253(1-2):23–38.
- 78. Cathein E, Stein H, Stoller H, Viardot K. Powdered aqueous carotenoid dispersions. *Estados Unidos de América;* 5364563, 1994.
79. Alanazi FK, El-Badry M, Ahmed MO, Alsarra IA. Improvement of albendazole dissolution by preparing microparticles using spray-drying technique. *Sci Pharm.* 2007;75(2):63–79.
80. Haaf F, Sanner A, Straub F. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and uses. *Polym J.* 1985;17(1):143–52.
81. Nakanishi S, Fujii M, Sugamura Y, Suzuki A, Shibata Y, Koizumi N, et al. Evaluation of the physicochemical characteristics of crospovidone that influence solid dispersion preparation. *Int J Pharm.* 2011;413(1-2):119–25.
82. Khetarpal NA, Sav AR, Rao L, Amin PD. Formulation development of a stable solid oral dosage form of Valproic acid using colloidal silica. *Int J Drug Deliv.* 2012;4:266–74.
83. Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characterization of stearic

- acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2005;45(3-4):167–73.
84. Gaur PK, Mishra S, Bajpai M, Mishra A. Enhanced oral bioavailability of Efavirenz by solid lipid nanoparticles: In vitro drug release and pharmacokinetics studies. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
  85. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introduction to Spectroscopy*. 4ta edició. Estados Unidos de América: Cengage Learning; 2008. 27-87 p.
  86. Rane DR, Gulve HN, Patil VV, Thakare VM, Patil VR. Formulation and evaluation of fast dissolving tablet of albendazole. *Int Curr Pharm J*. 2012;1(10):311–6.
  87. Reddy S, Bandela S. Formulation and Evaluation of Albendazole Sustained Release Matrix Tablets Using Okra Gum. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2013;4(4):1344–53.
  88. Castro SG, Bruni SS, Lanusse CE, Allemandi DA, Palma SD. Improved albendazole dissolution rate in pluronic 188 solid dispersions. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(4):1518–25.
  89. Priyanka K, Sathali AAH. Preparation and evaluation of montelukast sodium loaded solid lipid nanoparticles. *J young Pharm*. 2012;4(3):129–37.
  90. Herrmann S, Winter G, Mohl S, Siepmann F, Siepmann J. Mechanisms controlling protein release from lipidic implants: Effects of PEG addition. *J Control Release*. 2007;118(2):161–8.
  91. Castro-Ruiz JM. Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral. [Tesis] Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
  92. Yu LX, Furness MS, Raw A, Woodland Outlaw KP, Nashed NE, Ramos E, et al. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. *Pharm Res*. 2003;20(4):531–6.



## 9. Anexos

**Anexo 1.** Análisis estadístico para el porcentaje de encapsulación de las microesferas lipídicas simples obtenidas por los métodos A, B y C.

| 1way ANOVA                              |                     |       |                        |         |                   |
|---|---------------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | % Encapsulación MLS |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |                     |       |                        |         |                   |
| P value                                 | 0.0002              |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***                 |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes                 |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 5                   |       |                        |         |                   |
| F                                       | 15.91               |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.8642              |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |                     |       |                        |         |                   |
|   | SS                  | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 102.1               | 4     | 25.53                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 16.05               | 10    | 1.605                  |         |                   |
| Total                                   | 118.2               | 14    |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |                     |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff.          | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| MLS-1A vs MLS-2A                        | 3.560               | 4.867 | Yes                    | *       | 0.1560 to 6.964   |
| MLS-1A vs MLS-3A                        | 1.167               | 1.595 | No                     | ns      | -2.237 to 4.571   |
| MLS-1A vs MLS-3B                        | -3.937              | 5.382 | Yes                    | *       | -7.341 to -0.5327 |
| MLS-1A vs MLS-3C                        | 2.613               | 3.573 | No                     | ns      | -0.7906 to 6.017  |
| MLS-2A vs MLS-3A                        | -2.393              | 3.272 | No                     | ns      | -5.797 to 1.011   |
| MLS-2A vs MLS-3B                        | -7.497              | 10.25 | Yes                    | ***     | -10.90 to -4.093  |
| MLS-2A vs MLS-3C                        | -0.9467             | 1.294 | No                     | ns      | -4.351 to 2.457   |
| MLS-3A vs MLS-3B                        | -5.103              | 6.977 | Yes                    | **      | -8.507 to -1.699  |
| MLS-3A vs MLS-3C                        | 1.447               | 1.978 | No                     | ns      | -1.957 to 4.851   |
| MLS-3B vs MLS-3C                        | 6.550               | 8.955 | Yes                    | ***     | 3.146 to 9.954    |

**Anexo 2.** Análisis estadístico para el porcentaje de encapsulación de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método A.

| 1way ANOVA                              |                        |       |                        |         |                   |
|---|------------------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | % Encapsulación MLAP-A |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |                        |       |                        |         |                   |
| P value                                 | 0.0002                 |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***                    |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes                    |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 3                      |       |                        |         |                   |
| F                                       | 47.29                  |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.9403                 |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |                        |       |                        |         |                   |
|   | SS                     | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 545.7                  | 2     | 272.9                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 34.62                  | 6     | 5.770                  |         |                   |
| Total                                   | 580.3                  | 8     |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |                        |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff.             | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| MLS-3A vs MLAP-1A                       | 18.77                  | 13.53 | Yes                    | ***     | 12.75 to 24.78    |
| MLS-3A vs MLAP-2A                       | 12.34                  | 8.895 | Yes                    | **      | 6.319 to 18.35    |
| MLAP-1A vs MLAP-2A                      | -6.430                 | 4.636 | Yes                    | *       | -12.45 to -0.4124 |



Anexo 3. Análisis estadístico para el porcentaje de carga de ABZ de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.

| 1way ANOVA                              |            |        |                        |         |                    |
|---|------------|--------|------------------------|---------|--------------------|
| One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                    |
| P value                                 | < 0.0001   |        |                        |         |                    |
| P value summary                         | ***        |        |                        |         |                    |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                    |
| Number of groups                        | 6          |        |                        |         |                    |
| F                                       | 61.22      |        |                        |         |                    |
| R squared                               | 0.9623     |        |                        |         |                    |
| ANOVA Table                             |            |        |                        |         |                    |
|   | SS         | df     | MS                     |         |                    |
| Treatment (between columns)             | 190.0      | 5      | 38.00                  |         |                    |
| Residual (within columns)               | 7.448      | 12     | 0.6207                 |         |                    |
| Total                                   | 197.4      | 17     |                        |         |                    |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |        |                        |         |                    |
|   | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff     |
| MLS-3C vs MLAP-1C                       | 0.2933     | 0.6449 | No                     | ns      | -1.868 to 2.454    |
| MLS-3C vs MLAP-2C                       | 2.873      | 6.317  | Yes                    | **      | 0.7123 to 5.034    |
| MLS-3C vs MLAP-3C                       | 6.233      | 13.70  | Yes                    | ***     | 4.072 to 8.394     |
| MLS-3C vs MLAP-5C                       | 8.570      | 18.84  | Yes                    | ***     | 6.409 to 10.73     |
| MLS-3C vs MLAP-4C                       | 0.6400     | 1.407  | No                     | ns      | -1.521 to 2.801    |
| MLAP-1C vs MLAP-2C                      | 2.580      | 5.672  | Yes                    | *       | 0.4190 to 4.741    |
| MLAP-1C vs MLAP-3C                      | 5.940      | 13.06  | Yes                    | ***     | 3.779 to 8.101     |
| MLAP-1C vs MLAP-5C                      | 8.277      | 18.20  | Yes                    | ***     | 6.116 to 10.44     |
| MLAP-1C vs MLAP-4C                      | 0.3467     | 0.7621 | No                     | ns      | -1.814 to 2.508    |
| MLAP-2C vs MLAP-3C                      | 3.360      | 7.387  | Yes                    | **      | 1.199 to 5.521     |
| MLAP-2C vs MLAP-5C                      | 5.697      | 12.52  | Yes                    | ***     | 3.536 to 7.858     |
| MLAP-2C vs MLAP-4C                      | -2.233     | 4.910  | Yes                    | *       | -4.394 to -0.07231 |
| MLAP-3C vs MLAP-5C                      | 2.337      | 5.137  | Yes                    | *       | 0.1756 to 4.498    |
| MLAP-3C vs MLAP-4C                      | -5.593     | 12.30  | Yes                    | ***     | -7.754 to -3.432   |
| MLAP-5C vs MLAP-4C                      | -7.930     | 17.43  | Yes                    | ***     | -10.09 to -5.769   |

**Anexo 4. Análisis estadístico para el porcentaje de carga de ABZ de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.**

| 1way ANOVA                              |                       |       |                        |         |                   |
|---|-----------------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | Valoración MLD-C %p/p |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |                       |       |                        |         |                   |
| P value                                 | 0.0002                |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***                   |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes                   |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 4                     |       |                        |         |                   |
| F                                       | 25.31                 |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.9047                |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |                       |       |                        |         |                   |
|   | SS                    | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 12.66                 | 3     | 4.221                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 1.334                 | 8     | 0.1668                 |         |                   |
| Total                                   | 14.00                 | 11    |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |                       |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff.            | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| MLS-3C vs MLD-1C                        | 2.770                 | 11.75 | Yes                    | ***     | 1.702 to 3.838    |
| MLS-3C vs MLD-2C                        | 1.153                 | 4.891 | Yes                    | *       | 0.08541 to 2.221  |
| MLS-3C vs MLD-3C                        | 1.990                 | 8.439 | Yes                    | **      | 0.9221 to 3.058   |
| MLD-1C vs MLD-2C                        | -1.817                | 6.856 | Yes                    | **      | -2.885 to -0.5487 |
| MLD-1C vs MLD-3C                        | -0.7800               | 3.308 | No                     | ns      | -1.848 to 0.2879  |
| MLD-2C vs MLD-3C                        | 0.8367                | 3.548 | No                     | ns      | -0.2313 to 1.905  |

**Anexo 5. Análisis estadístico para el porcentaje de encapsulación de ABZ de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.**

| 1way ANOVA                              |            |        |                        |         |                  |
|---|------------|--------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed                          | MLD-C %E   |        |                        |         |                  |
| One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                  |
| P value                                 | 0.0003     |        |                        |         |                  |
| P value summary                         | ***        |        |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 4          |        |                        |         |                  |
| F                                       | 22.12      |        |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.8924     |        |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |            |        |                        |         |                  |
|   | SS         | df     | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 97.47      | 3      | 32.49                  |         |                  |
| Residual (within columns)               | 11.75      | 8      | 1.469                  |         |                  |
| Total                                   | 109.2      | 11     |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |        |                        |         |                  |
|   | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| MLS-3C vs MLD-1C                        | 7.603      | 10.87  | Yes                    | ***     | 4.434 to 10.77   |
| MLS-3C vs MLD-2C                        | 2.257      | 3.225  | No                     | ns      | -0.9123 to 5.426 |
| MLS-3C vs MLD-3C                        | 1.657      | 2.368  | No                     | ns      | -1.512 to 4.826  |
| MLD-1C vs MLD-2C                        | -5.347     | 7.641  | Yes                    | **      | -8.516 to -2.178 |
| MLD-1C vs MLD-3C                        | -5.947     | 8.499  | Yes                    | **      | -9.116 to -2.778 |
| MLD-2C vs MLD-3C                        | -0.6000    | 0.8575 | No                     | ns      | -3.769 to 2.569  |

**Anexo 6.** Análisis estadístico para el porcentaje de carga de ABZ de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B.

| 1way ANOVA                              |            |        |                        |         |                  |
|---|------------|--------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed                          | MLC-B %pp  |        |                        |         |                  |
| One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                  |
| P value                                 | < 0.0001   |        |                        |         |                  |
| P value summary                         | ---        |        |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 4          |        |                        |         |                  |
| F                                       | 37.81      |        |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.9341     |        |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |            |        |                        |         |                  |
|   | SS         | df     | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 36.83      | 3      | 12.28                  |         |                  |
| Residual (within columns)               | 2.598      | 8      | 0.3247                 |         |                  |
| Total                                   | 39.43      | 11     |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |        |                        |         |                  |
|   | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| MLS-3B vs MLC-1B                        | 0.2833     | 0.8812 | No                     | ns      | -1.207 to 1.773  |
| MLS-3B vs MLC-2B                        | 2.260      | 6.809  | Yes                    | **      | 0.7700 to 3.750  |
| MLS-3B vs MLC-3B                        | -2.663     | 8.055  | Yes                    | **      | -4.153 to -1.173 |
| MLC-1B vs MLC-2B                        | 1.977      | 6.008  | Yes                    | *       | 0.4806 to 3.467  |
| MLC-1B vs MLC-3B                        | -2.947     | 8.957  | Yes                    | **      | -4.437 to -1.457 |
| MLC-2B vs MLC-3B                        | -4.923     | 14.98  | Yes                    | ***     | -6.413 to -3.433 |

**Anexo 7.** Análisis estadístico para el porcentaje de encapsulación de ABZ de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B.

| 1way ANOVA                              |            |       |                        |         |                   |
|---|------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | MLC-B %E   |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |            |       |                        |         |                   |
| P value                                 | 0.0002     |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***        |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 4          |       |                        |         |                   |
| F                                       | 24.62      |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.9023     |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |            |       |                        |         |                   |
|   | SS         | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 176.2      | 3     | 58.74                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 19.09      | 8     | 2.386                  |         |                   |
| Total                                   | 195.3      | 11    |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff. | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| MLS-3B vs MLC-1B                        | -6.680     | 7.490 | Yes                    | **      | -10.72 to -2.641  |
| MLS-3B vs MLC-2B                        | 3.147      | 3.528 | No                     | ns      | -0.8923 to 7.186  |
| MLS-3B vs MLC-3B                        | -4.520     | 5.068 | Yes                    | *       | -8.559 to -0.4810 |
| MLC-1B vs MLC-2B                        | 9.827      | 11.02 | Yes                    | ***     | 5.788 to 13.87    |
| MLC-1B vs MLC-3B                        | 2.160      | 2.422 | No                     | ns      | -1.879 to 6.199   |
| MLC-2B vs MLC-3B                        | -7.667     | 8.597 | Yes                    | **      | -11.71 to -3.628  |



**Anexo 8.** Análisis estadístico para el porcentaje de encapsulación de ABZ de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método B.

| 1way ANOVA                              |            |        |                        |         |                  |
|---|------------|--------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed                          | MLC-C %E   |        |                        |         |                  |
| One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                  |
| P value                                 | 0.0006     |        |                        |         |                  |
| P value summary                         | ***        |        |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 4          |        |                        |         |                  |
| F                                       | 18.17      |        |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.8720     |        |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |            |        |                        |         |                  |
|   | SS         | df     | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 133.9      | 3      | 44.64                  |         |                  |
| Residual (within columns)               | 19.66      | 8      | 2.457                  |         |                  |
| Total                                   | 153.6      | 11     |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |        |                        |         |                  |
|   | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| MLS-3C vs MLC-1C                        | -6.357     | 7.024  | Yes                    | **      | -10.46 to -2.258 |
| MLS-3C vs MLC-2C                        | -9.220     | 10.19  | Yes                    | ***     | -13.32 to -5.121 |
| MLS-3C vs MLC-3C                        | -5.563     | 6.148  | Yes                    | *       | -9.662 to -1.465 |
| MLC-1C vs MLC-2C                        | -2.863     | 3.164  | No                     | ns      | -6.962 to 1.235  |
| MLC-1C vs MLC-3C                        | 0.7933     | 0.8766 | No                     | ns      | -3.305 to 4.892  |
| MLC-2C vs MLC-3C                        | 3.657      | 4.041  | No                     | ns      | -0.4419 to 7.755 |

**Anexo 9.** Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A.

| 1way ANOVA                              |                  |       |                        |         |                   |
|---|------------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | Disolución MLS-A |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |                  |       |                        |         |                   |
| P value                                 | < 0.0001         |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***              |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes              |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 5                |       |                        |         |                   |
| F                                       | 100.9            |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.9758           |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |                  |       |                        |         |                   |
|   | SS               | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 1310             | 4     | 327.5                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 32.47            | 10    | 3.247                  |         |                   |
| Total                                   | 1343             | 14    |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |                  |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff.       | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| ABZ vs ABZ+LSS                          | -9.957           | 9.571 | Yes                    | ***     | -14.80 to -5.115  |
| ABZ vs MLS-1A                           | -5.547           | 5.332 | Yes                    | *       | -10.39 to -0.7050 |
| ABZ vs MLS-2A                           | -11.08           | 10.65 | Yes                    | ***     | -15.92 to -6.238  |
| ABZ vs MLS-3A                           | -27.88           | 26.80 | Yes                    | ***     | -32.72 to -23.04  |
| ABZ+LSS vs MLS-1A                       | 4.410            | 4.239 | No                     | ns      | -0.4316 to 9.252  |
| ABZ+LSS vs MLS-2A                       | -1.123           | 1.080 | No                     | ns      | -5.965 to 3.718   |
| ABZ+LSS vs MLS-3A                       | -17.92           | 17.23 | Yes                    | ***     | -22.76 to -13.08  |
| MLS-1A vs MLS-2A                        | -5.533           | 5.319 | Yes                    | *       | -10.37 to -0.6917 |
| MLS-1A vs MLS-3A                        | -22.33           | 21.47 | Yes                    | ***     | -27.17 to -17.49  |
| MLS-2A vs MLS-3A                        | -16.80           | 16.15 | Yes                    | ***     | -21.64 to -11.96  |

**Anexo 10.** Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas simples obtenidas por el método A, B y C

| 1way ANOVA                              |            |        |                        |         |                  |
|---|------------|--------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed                          | Dsh MLS    |        |                        |         |                  |
| One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                  |
| P value                                 | < 0.0001   |        |                        |         |                  |
| P value summary                         | ***        |        |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 5          |        |                        |         |                  |
| F                                       | 237.0      |        |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.9896     |        |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |            |        |                        |         |                  |
|   | SS         | df     | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 2484       | 4      | 621.1                  |         |                  |
| Residual (within columns)               | 26.21      | 10     | 2.621                  |         |                  |
| Total                                   | 2511       | 14     |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |        |                        |         |                  |
|   | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| ABZ vs ABZ+LSS                          | -9.957     | 10.65  | Yes                    | ***     | -14.31 to -5.607 |
| ABZ vs MLS-3A                           | -27.88     | 29.83  | Yes                    | ***     | -32.23 to -23.53 |
| ABZ vs MLS-3B                           | -9.097     | 9.732  | Yes                    | ***     | -13.45 to -4.747 |
| ABZ vs MLS-3C                           | -34.64     | 37.06  | Yes                    | ***     | -38.99 to -30.29 |
| ABZ+LSS vs MLS-3A                       | -17.92     | 19.18  | Yes                    | ***     | -22.27 to -13.57 |
| ABZ+LSS vs MLS-3B                       | 0.8600     | 0.9201 | No                     | ns      | -3.490 to 5.210  |
| ABZ+LSS vs MLS-3C                       | -24.63     | 26.40  | Yes                    | ***     | -29.03 to -20.33 |
| MLS-3A vs MLS-3B                        | 18.78      | 20.10  | Yes                    | ***     | 14.43 to 23.13   |
| MLS-3A vs MLS-3C                        | -6.757     | 7.229  | Yes                    | **      | -11.11 to -2.407 |
| MLS-3B vs MLS-3C                        | -25.54     | 27.33  | Yes                    | ***     | -29.89 to -21.19 |

**Anexo 11.** Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas con agente formador de poros obtenidas por el método A.

| 1way ANOVA                              |            |       |                        |         |                   |
|---|------------|-------|------------------------|---------|-------------------|
| Table Analyzed                          | Dsh MLAP-A |       |                        |         |                   |
| One-way analysis of variance            |            |       |                        |         |                   |
| P value                                 | < 0.0001   |       |                        |         |                   |
| P value summary                         | ***        |       |                        |         |                   |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |       |                        |         |                   |
| Number of groups                        | 5          |       |                        |         |                   |
| F                                       | 106.5      |       |                        |         |                   |
| R squared                               | 0.9771     |       |                        |         |                   |
| ANOVA Table                             |            |       |                        |         |                   |
|   | SS         | df    | MS                     |         |                   |
| Treatment (between columns)             | 1223       | 4     | 305.7                  |         |                   |
| Residual (within columns)               | 28.71      | 10    | 2.871                  |         |                   |
| Total                                   | 1251       | 14    |                        |         |                   |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |       |                        |         |                   |
|   | Mean Diff. | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff    |
| ABZ vs ABZ+LSS                          | -9.957     | 10.18 | Yes                    | ***     | -14.51 to -5.404  |
| ABZ vs MLS-3A                           | -27.38     | 28.50 | Yes                    | ***     | -32.43 to -23.33  |
| ABZ vs MLAP-1A                          | -11.22     | 11.47 | Yes                    | ***     | -15.77 to -6.664  |
| ABZ vs MLAP-2A                          | -15.20     | 15.54 | Yes                    | ***     | -19.75 to -10.64  |
| ABZ+LSS vs MLS-3A                       | -17.92     | 18.32 | Yes                    | ***     | -22.48 to -13.37  |
| ABZ+LSS vs MLAP-1A                      | -1.260     | 1.268 | No                     | ns      | -5.813 to 3.293   |
| ABZ+LSS vs MLAP-2A                      | -5.240     | 5.357 | Yes                    | *       | -9.793 to -0.6874 |
| MLS-3A vs MLAP-1A                       | 16.66      | 17.03 | Yes                    | ***     | 12.11 to 21.22    |
| MLS-3A vs MLAP-2A                       | 12.68      | 12.97 | Yes                    | ***     | 8.131 to 17.24    |
| MLAP-1A vs MLAP-2A                      | -3.980     | 4.069 | No                     | ns      | -8.533 to 0.5726  |



Anexo 12. Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas con agente formador de poros, obtenidas por el método C.

| 1way ANOVA                              |             |       |                        |         |                  |
|---|-------------|-------|------------------------|---------|------------------|
| Table Analyzed                          | Dsin MLAP-C |       |                        |         |                  |
| One-way analysis of variance            |             |       |                        |         |                  |
| P value                                 | < 0.0001    |       |                        |         |                  |
| P value summary                         | ***         |       |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes         |       |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 8           |       |                        |         |                  |
| F                                       | 1339        |       |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.9983      |       |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |             |       |                        |         |                  |
|   | SS          | df    | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 21730       | 7     | 3104                   |         |                  |
| Residual (within columns)               | 37.09       | 16    | 2.318                  |         |                  |
| Total                                   | 21760       | 23    |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |             |       |                        |         |                  |
|   | Mean Diff.  | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| ABZ vs ABZ + LSS                        | -9.957      | 11.33 | Yes                    | ***     | -14.26 to -5.652 |
| ABZ vs MLS-3C                           | -34.64      | 39.40 | Yes                    | ***     | -38.94 to -30.33 |
| ABZ vs MLAP-1C                          | -18.44      | 20.98 | Yes                    | ***     | -22.75 to -14.14 |
| ABZ vs MLAP-2C                          | -58.15      | 66.15 | Yes                    | ***     | -62.45 to -53.84 |
| ABZ vs MLAP-3C                          | -84.43      | 96.04 | Yes                    | ***     | -88.73 to -80.12 |
| ABZ vs MLAP-5C                          | -75.51      | 85.91 | Yes                    | ***     | -79.82 to -71.21 |
| ABZ vs MLAP-4C                          | -68.08      | 77.45 | Yes                    | ***     | -72.39 to -63.78 |
| ABZ + LSS vs MLS-3C                     | -24.68      | 28.08 | Yes                    | ***     | -28.98 to -20.38 |
| ABZ + LSS vs MLAP-1C                    | -8.487      | 9.655 | Yes                    | ***     | -12.79 to -4.182 |
| ABZ + LSS vs MLAP-2C                    | -48.19      | 54.82 | Yes                    | ***     | -52.49 to -43.89 |
| ABZ + LSS vs MLAP-3C                    | -74.47      | 84.72 | Yes                    | ***     | -78.77 to -70.17 |
| ABZ + LSS vs MLAP-5C                    | -65.56      | 74.58 | Yes                    | ***     | -69.86 to -61.25 |
| ABZ + LSS vs MLAP-4C                    | -58.13      | 66.13 | Yes                    | ***     | -62.43 to -53.82 |
| MLS-3C vs MLAP-1C                       | 16.19       | 18.42 | Yes                    | ***     | 11.89 to 20.50   |
| MLS-3C vs MLAP-2C                       | -23.51      | 28.75 | Yes                    | ***     | -27.81 to -19.21 |
| MLS-3C vs MLAP-3C                       | -49.79      | 58.64 | Yes                    | ***     | -54.09 to -45.49 |
| MLS-3C vs MLAP-5C                       | -40.88      | 48.50 | Yes                    | ***     | -45.18 to -36.57 |
| MLS-3C vs MLAP-4C                       | -33.45      | 38.05 | Yes                    | ***     | -37.75 to -29.14 |
| MLAP-1C vs MLAP-2C                      | -39.70      | 45.17 | Yes                    | ***     | -44.01 to -35.40 |
| MLAP-1C vs MLAP-3C                      | -65.98      | 75.06 | Yes                    | ***     | -70.29 to -61.68 |
| MLAP-1C vs MLAP-5C                      | -57.07      | 64.92 | Yes                    | ***     | -61.37 to -52.77 |
| MLAP-1C vs MLAP-4C                      | -49.64      | 56.47 | Yes                    | ***     | -53.94 to -45.34 |
| MLAP-2C vs MLAP-3C                      | -26.28      | 29.90 | Yes                    | ***     | -30.58 to -21.98 |
| MLAP-2C vs MLAP-5C                      | -17.37      | 19.76 | Yes                    | ***     | -21.67 to -13.06 |
| MLAP-2C vs MLAP-4C                      | -9.937      | 11.30 | Yes                    | ***     | -14.24 to -5.632 |
| MLAP-3C vs MLAP-5C                      | 8.913       | 10.14 | Yes                    | ***     | 4.609 to 13.22   |
| MLAP-3C vs MLAP-4C                      | 16.34       | 18.59 | Yes                    | ***     | 12.04 to 20.65   |
| MLAP-5C vs MLAP-4C                      | 7.430       | 8.452 | Yes                    | ***     | 3.125 to 11.73   |



**Anexo 13. Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas con agente desintegrante, obtenidas por el método C.**

| 1 way ANOVA                             |            |       |                        |         |                  |
|---|------------|-------|------------------------|---------|------------------|
| One-way analysis of variance            |            |       |                        |         |                  |
| P value                                 | < 0.0001   |       |                        |         |                  |
| P value summary                         | ***        |       |                        |         |                  |
| Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |       |                        |         |                  |
| Number of groups                        | 6          |       |                        |         |                  |
| F                                       | 781.8      |       |                        |         |                  |
| R squared                               | 0.9969     |       |                        |         |                  |
| ANOVA Table                             |            |       |                        |         |                  |
|   | SS         | df    | MS                     |         |                  |
| Treatment (between columns)             | 7856       | 5     | 1571                   |         |                  |
| Residual (within columns)               | 24.12      | 12    | 2.010                  |         |                  |
| Total                                   | 7880       | 17    |                        |         |                  |
| Tukey's Multiple Comparison Test        |            |       |                        |         |                  |
|   | Mean Diff. | q     | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| ABZ vs ABZ + LSS                        | -9.957     | 12.18 | Yes                    | ***     | -13.85 to -6.068 |
| ABZ vs MLS-3C                           | -34.64     | 42.32 | Yes                    | ***     | -38.53 to -30.75 |
| ABZ vs MLD-1C                           | -25.97     | 31.73 | Yes                    | ***     | -29.88 to -22.08 |
| ABZ vs MLD-2C                           | -56.27     | 68.75 | Yes                    | ***     | -60.16 to -52.38 |
| ABZ vs MLD-3C                           | -54.27     | 66.31 | Yes                    | ***     | -58.16 to -50.38 |
| ABZ + LSS vs MLS-3C                     | -24.68     | 30.15 | Yes                    | ***     | -28.57 to -20.79 |
| ABZ + LSS vs MLD-1C                     | -16.01     | 19.56 | Yes                    | ***     | -19.90 to -12.12 |
| ABZ + LSS vs MLD-2C                     | -46.32     | 56.59 | Yes                    | ***     | -50.21 to -42.43 |
| ABZ + LSS vs MLD-3C                     | -44.31     | 54.14 | Yes                    | ***     | -48.20 to -40.42 |
| MLS-3C vs MLD-1C                        | 8.667      | 10.59 | Yes                    | ***     | 4.778 to 12.56   |
| MLS-3C vs MLD-2C                        | -21.64     | 26.43 | Yes                    | ***     | -25.53 to -17.75 |
| MLS-3C vs MLD-3C                        | -19.63     | 23.99 | Yes                    | ***     | -23.52 to -15.74 |
| MLD-1C vs MLD-2C                        | -30.30     | 37.02 | Yes                    | ***     | -34.19 to -26.41 |
| MLD-1C vs MLD-3C                        | -28.30     | 34.58 | Yes                    | ***     | -32.19 to -24.41 |
| MLD-2C vs MLD-3C                        | 2.003      | 2.448 | No                     | ns      | -1.885 to 5.892  |

**Anexo 14.** Análisis estadístico para el porcentaje de ABZ disuelto a los 30 minutos de las microesferas lipídicas con combinación de agente formador de poros y desintegrante, obtenidas por el método C.

| 1way ANOVA |   |            |        |                        |         |                  |
|------------|---|------------|--------|------------------------|---------|------------------|
| 1          | Table Analyzed                          | Dsin MLC-C |        |                        |         |                  |
| 2          |   |            |        |                        |         |                  |
| 3          | One-way analysis of variance            |            |        |                        |         |                  |
| 4          | P value                                 | < 0.0001   |        |                        |         |                  |
| 5          | P value summary                         | ---        |        |                        |         |                  |
| 6          | Are means signif. different? (P < 0.05) | Yes        |        |                        |         |                  |
| 7          | Number of groups                        | 8          |        |                        |         |                  |
| 8          | F                                       | 1437       |        |                        |         |                  |
| 9          | R squared                               | 0.9984     |        |                        |         |                  |
| 10         |   |            |        |                        |         |                  |
| 11         | ANOVA Table                             | SS         | df     | MS                     |         |                  |
| 12         | Treatment (between columns)             | 18480      | 7      | 2641                   |         |                  |
| 13         | Residual (within columns)               | 29.41      | 16     | 1.838                  |         |                  |
| 14         | Total                                   | 18510      | 23     |                        |         |                  |
| 15         |   |            |        |                        |         |                  |
| 16         | Tukey's Multiple Comparison Test        | Mean Diff. | q      | Significant? P < 0.05? | Summary | 95% CI of diff   |
| 17         | ABZ vs ABZ + LSS                        | -9.957     | 12.72  | Yes                    | ---     | -13.79 to -6.124 |
| 18         | ABZ vs MLS-3C                           | -34.84     | 44.25  | Yes                    | ---     | -38.47 to -30.80 |
| 19         | ABZ vs MLC-1C                           | -62.54     | 79.90  | Yes                    | ---     | -66.37 to -58.70 |
| 20         | ABZ vs MLC-2C                           | -66.05     | 84.38  | Yes                    | ---     | -69.88 to -62.21 |
| 21         | ABZ vs MLC-3C                           | -66.24     | 84.63  | Yes                    | ---     | -70.07 to -62.41 |
| 22         | ABZ vs MLAP-3C                          | -84.43     | 107.9  | Yes                    | ---     | -88.26 to -80.59 |
| 23         | ABZ vs MLD-3C                           | -54.27     | 69.33  | Yes                    | ---     | -58.10 to -50.44 |
| 24         | ABZ + LSS vs MLS-3C                     | -24.88     | 31.53  | Yes                    | ---     | -28.51 to -20.85 |
| 25         | ABZ + LSS vs MLC-1C                     | -52.58     | 67.17  | Yes                    | ---     | -56.41 to -48.75 |
| 26         | ABZ + LSS vs MLC-2C                     | -56.09     | 71.66  | Yes                    | ---     | -59.92 to -52.26 |
| 27         | ABZ + LSS vs MLC-3C                     | -56.26     | 71.91  | Yes                    | ---     | -60.12 to -52.45 |
| 28         | ABZ + LSS vs MLAP-3C                    | -74.47     | 95.14  | Yes                    | ---     | -78.30 to -70.64 |
| 29         | ABZ + LSS vs MLD-3C                     | -44.31     | 56.61  | Yes                    | ---     | -48.15 to -40.48 |
| 30         | MLS-3C vs MLC-1C                        | -27.90     | 35.64  | Yes                    | ---     | -31.73 to -24.07 |
| 31         | MLS-3C vs MLC-2C                        | -31.41     | 40.13  | Yes                    | ---     | -35.24 to -27.58 |
| 32         | MLS-3C vs MLC-3C                        | -31.60     | 40.38  | Yes                    | ---     | -35.44 to -27.77 |
| 33         | MLS-3C vs MLAP-3C                       | -49.79     | 63.61  | Yes                    | ---     | -53.62 to -45.96 |
| 34         | MLS-3C vs MLD-3C                        | -19.63     | 25.08  | Yes                    | ---     | -23.47 to -15.80 |
| 35         | MLC-1C vs MLC-2C                        | -3.510     | 4.484  | No                     | ns      | -7.343 to 0.3231 |
| 36         | MLC-1C vs MLC-3C                        | -3.703     | 4.731  | No                     | ns      | -7.536 to 0.1297 |
| 37         | MLC-1C vs MLAP-3C                       | -21.89     | 27.97  | Yes                    | ---     | -25.72 to -18.06 |
| 38         | MLC-1C vs MLD-3C                        | 8.297      | 10.56  | Yes                    | ---     | 4.434 to 12.10   |
| 39         | MLC-2C vs MLC-3C                        | -0.1933    | 0.2470 | No                     | ns      | -4.026 to 3.640  |
| 40         | MLC-2C vs MLAP-3C                       | -18.38     | 23.48  | Yes                    | ---     | -22.21 to -14.55 |
| 41         | MLC-2C vs MLD-3C                        | 11.78      | 15.05  | Yes                    | ---     | 7.944 to 15.81   |
| 42         | MLC-3C vs MLAP-3C                       | -18.19     | 23.23  | Yes                    | ---     | -22.02 to -14.35 |
| 43         | MLC-3C vs MLD-3C                        | 11.97      | 15.29  | Yes                    | ---     | 8.137 to 15.80   |
| 44         | MLAP-3C vs MLD-3C                       | 30.16      | 38.53  | Yes                    | ---     | 26.32 to 33.99   |