



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia - Programa de Magister en Cs. Farmacéuticas

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE  
MICROPARTÍCULAS DE PRAMIPEXOL OBTENIDAS  
MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas

FELIPE ANDRÉS BELTRÁN GARCÉS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: Dr. Marcos Fernández Escobar  
Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

# Tabla de contenido

Índice de tablas .....	vi
Índice de figuras .....	viii
Índice de ecuaciones.....	x
Índice de abreviaturas .....	xi
Resumen.....	xvi
1 Introducción.....	1
1.1 Enfermedad de Parkinson .....	1
1.1.1 Fisiopatología.....	2
1.1.2 Tratamiento.....	3
1.1.2.1 Levodopa .....	6
1.1.2.2 Pramipexol .....	7
1.2 Microencapsulación.....	10
1.2.1 Métodos de microencapsulación .....	11
1.2.1.1 Emulsión y evaporación del solvente .....	13
1.2.1.2 Secado por atomización.....	14
1.2.2 Material encapsulante .....	19
1.2.2.1 Polímero del ácido láctico-co-glicólico.....	19
1.2.3 Caracterización de micropartículas .....	22
1.2.3.1 Eficacia de encapsulación y carga .....	22
1.2.3.2 Tamaño y morfología .....	22
1.2.3.3 Potencial zeta .....	23
1.2.3.4 Interacciones moleculares.....	24
1.2.3.4.1 Difracción de rayos X (DRX) .....	25
1.2.3.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	26
1.2.3.4.3 Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	26
1.2.3.5 Evaluación de cinética de liberación.....	27
1.2.3.5.1 Adaptación a modelo matemático existente .....	28
1.3 Desarrollo de formulaciones mediante diseños experimentales .....	32
2 Objetivos .....	39
3 Hipótesis .....	40

4	Metodología.....	41
4.1	Materiales y reactivos.....	41
4.2	Equipos.....	43
4.3	Métodos .....	44
4.3.1	Elaboración micropartículas de PLGA mediante secado por atomización .....	44
4.3.2	Optimización de la obtención de micropartículas mediante un diseño experimental .....	47
4.3.3	Caracterización de las micropartículas.....	49
4.3.3.1	Eficacia de encapsulación (%EE) y carga .....	49
4.3.3.2	Tamaño y morfología .....	50
4.3.3.2.1	Microscopía óptica .....	50
4.3.3.2.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	51
4.3.3.2.3	Difracción láser .....	52
4.3.3.3	Potencial zeta .....	52
4.3.3.4	Interacciones moleculares.....	53
4.3.3.4.1	Difracción de rayos X .....	53
4.3.3.4.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	54
4.3.3.4.3	Espectroscopía infrarroja (FTIR) .....	55
4.3.4	Evaluación <i>in vitro</i> de las micropartículas mediante cinética de liberación y su adecuación a modelos cinéticos conocidos.....	56
4.3.4.1	Evaluación de cinética de liberación.....	56
4.3.4.2	Adaptación a modelo matemático existente .....	57
4.4	Desarrollo y validación de metodología analítica HPLC para la cuantificación de pramipexol en matriz biológica.....	58
4.4.1	Trabajo preliminar .....	58
4.4.2	Elección de fase móvil.....	59
4.4.3	Elección de estándar interno .....	60
4.4.4	Elección de un método de Extracción .....	61
4.4.5	Validación del método analítico.....	62
4.4.5.1	Evaluación del “efecto matriz” sobre PMX e IS .....	64
4.4.5.2	Linealidad.....	66
4.4.5.3	Precisión instrumental .....	67
4.4.5.4	Repetibilidad y precisión intermedia .....	68
4.4.5.5	Exactitud .....	69

4.4.5.6	Límites .....	69
4.4.5.7	Selectividad.....	70
4.4.6	Utilidad del método .....	71
5	Resultados y discusión.....	74
5.1	Formulaciones preliminares. ....	74
5.1.1	Emulsión W/O/W.....	75
5.1.2	Emulsión W/O y suspensión.....	78
5.1.3	Emulsión O/W .....	80
5.1.4	Solución .....	83
5.2	Optimización de la obtención de micropartículas, ajustando los parámetros de proceso. .....	96
5.2.1	Morfología y tamaño .....	96
5.2.2	Resultados diseño experimental .....	98
5.2.2.1	Tamaño de partícula .....	99
5.2.2.2	Eficacia de encapsulación.....	101
5.2.2.3	Rendimiento de proceso (RP) .....	103
5.2.2.4	Gráfica de superficie de respuesta.....	104
5.2.2.5	Evaluación de cinética de liberación.....	107
5.3	Caracterización de las micropartículas optimizadas .....	109
5.3.1	Microscopía electrónica de barrido.....	109
5.3.2	Distribución de tamaño de partículas .....	111
5.3.3	Potencial Z.....	113
5.3.4	Interacciones moleculares.....	114
5.3.4.1	Difracción de rayos X .....	114
5.3.4.2	Calorimetría diferencial de barrido .....	115
5.3.4.3	Espectroscopía infrarroja .....	118
5.4	Evaluación <i>in vitro</i> de las micropartículas mediante cinética de liberación y su adecuación a modelos cinéticos conocidos .....	121
5.5	Desarrollo y validación de metodología analítica HPLC para la cuantificación de pramipexol en matriz biológica.....	124
5.5.1	Pruebas preliminares .....	124
5.5.1.1	Elección de un estándar interno .....	124
5.5.1.2	Elección de la fase móvil.....	125
5.5.1.3	Elección de un método de extracción.....	126

5.5.2	Validación del método .....	127
5.5.2.1	Evaluación del “efecto matriz” sobre PMX e IS .....	127
5.5.2.2	Linealidad.....	128
5.5.2.3	Precisión .....	130
5.5.2.3.1	Precisión instrumental.....	130
5.5.2.3.2	Repetibilidad y precisión intermedia.....	131
5.5.2.4	Exactitud .....	131
5.5.2.5	LOQ y LOD .....	132
5.5.2.6	Especificidad.....	132
5.5.3	Utilidad del método .....	135
6	Conclusiones.....	140
7	Asistencia a congresos.....	142
8	Publicaciones .....	143
9	Bibliografía .....	144



## Índice de tablas

<i>Tabla 1: Tipos de liberación predicha según la constante “n” calculada.</i>	31
<i>Tabla 2: Esquema de bloque experimental generado para el diseño central compuesto utilizado.</i>	34
<i>Tabla 3: Niveles codificados y reales de las variables del diseño para la optimización de micropartículas de BPMX.</i>	47
<i>Tabla 4: Composición de buffer fosfato isotónico pH 7,4.</i>	57
<i>Tabla 5: Columnas probadas para determinar PMX en fluidos biológicos.</i>	58
<i>Tabla 6: Configuración HPLC-MS usado en la validación del método desarrollado.</i>	62
<i>Tabla 7: Condiciones del HPLC-MS obtenidas en tiempo real mediante el software de operación.</i>	63
<i>Tabla 8: Preparación de muestras en matriz de trabajo para evaluar “efecto matriz”</i>	65
<i>Tabla 9: Preparación de muestras analíticas para comparar contra muestras en matriz.</i>	65
<i>Tabla 10: Preparación de soluciones para curva de calibración de 5 puntos.</i>	67
<i>Tabla 11: Condiciones iniciales para micropartículas preparadas por emulsión doble W/O/W.</i>	75
<i>Tabla 12: formulaciones de micropartículas obtenidas a partir de una emulsión doble W/O/W.</i>	76
<i>Tabla 13: Condiciones de proceso para emulsión W/O y suspensión.</i>	78
<i>Tabla 14: Formulaciones de micropartículas obtenidas a partir de una emulsión W/O y a partir de una suspensión.</i>	79
<i>Tabla 15: Condiciones de secado de micropartículas preparadas por emulsión simple O/W y rendimiento de proceso.</i>	82
<i>Tabla 16: Condiciones iniciales para micropartículas preparadas a partir de una solución.</i>	84
<i>Tabla 17: formulación de micropartículas obtenida a partir de una solución.</i>	84
<i>Tabla 18: Micropartículas por solución trabajadas entre el 4-5 % de sólidos totales, parámetros de operación y resultados.</i>	85
<i>Tabla 19: Liberación acumulada cinéticas AB1 AB2 Y AB3.</i>	88
<i>Tabla 20: Condiciones de atomización de micropartículas preparadas por solución (segundo bloque).</i>	89
<i>Tabla 21: Condiciones de atomización de micropartículas preparadas por solución (último bloque) y su rendimiento de proceso.</i>	91
<i>Tabla 22: Datos de tamaño obtenidos para micropartículas desde el diseño experimental.</i>	97
<i>Tabla 23: Variables y respuestas medidas en el diseño experimental.</i>	99
<i>Tabla 24: Resumen de deseabilidades obtenidas según las respuestas obtenidas en el diseño experimental.</i>	106
<i>Tabla 25: Optimización final de las respuestas obtenidas mediante software.</i>	106
<i>Tabla 26: Datos experimentales obtenidos desde la formulación optimizada de micropartículas y su comparación con los datos entregados.</i>	107
<i>Tabla 27: Comparativa de tamaños entre micropartículas medidas por microscopía óptica y mediante difracción láser.</i>	111
<i>Tabla 28: Datos de potencial Z promedio obtenidos desde el equipo Zetasizer®.</i>	113

<i>Tabla 29: Datos obtenidos desde el análisis estadístico adaptado al modelo Korsmeyer-Peppas</i>	122
<i>Tabla 30: Ajuste de otros modelos probados</i>	123
<i>Tabla 31: Análisis de regresión lineal para la curva de calibración obtenida</i>	129
<i>Tabla 32: Análisis por ANOVA a la curva de calibración obtenida</i>	129
<i>Tabla 33: CV % Intra- and Inter-día para PMX/IS</i>	131
<i>Tabla 34: Datos de recuperación para PMX y su IS</i>	132
<i>Tabla 35: Valores de la ecuación de la recta para la curva obtenida</i>	136
<i>Tabla 36: Constantes farmacocinéticas obtenidas desde el gráfico 46</i>	136
<i>Tabla 37: Valores de la ecuación de la recta para las muestras concentradas</i>	138
<i>Tabla 38: Constantes farmacocinéticas obtenidas desde las muestras concentradas</i>	138



## Índice de figuras

<i>Figura 1: Esquema de sitios terapéuticos para el tratamiento de la EP.</i>	5
<i>Figura 2: Estructura química del PMX.</i>	8
<i>Figura 3: Preparación de micropartículas mediante técnica de emulsión/evaporación de solvente (emulsión simple y doble).</i>	14
<i>Figura 4: Esquema de funcionamiento de un mini spray dryer Buchi B-290.</i>	16
<i>Figura 5: Esquema de distribución de experimentos para diseño central compuesto centrado en las caras rotatable.</i>	33
<i>Figura 6: Esquema de diagrama de Pareto, medición de respuesta estandarizada.</i>	35
<i>Figura 7: Gráfica de efectos principales.</i>	36
<i>Figura 8: Gráfica de interacciones.</i>	36
<i>Figura 9: Gráfico de superficie de respuesta.</i>	37
<i>Figura 10: Esquema resumido para la obtención de micropartículas mediante secado por atomización.</i>	44
<i>Figura 11: Esquema de SPE para PMX + IS.</i>	62
<i>Figura 12: Esquema de producción de micropartículas.</i>	74
<i>Figura 13: Gráfica de cinéticas de liberación para formulación ED4 en 3 lotes distintos (n=2).</i>	77
<i>Figuras 14 y 15: Imágenes de microscopía óptica obtenidas desde las muestras E4.</i>	78
<i>Figura 16: Fotografía de la muestra A1.</i>	85
<i>Figura 17: Gráfica de cinéticas de liberación para formulación A1, A2 y A3 (n=2).</i>	87
<i>Figura 18 y 19: Fotografías SEM de formulaciones (derecha) DDE2 (aumento: 5000x), (izquierda) DD10 (aumento 3500x).</i>	96
<i>Figura 20: Diagrama de Pareto obtenido para tamaño de partícula.</i>	100
<i>Figura 21: Gráfica de efectos principales obtenida para tamaño de partícula.</i>	100
<i>Figura 22: Gráfica de interacciones obtenida para tamaño de partícula.</i>	101
<i>Figura 23: Diagrama de Pareto obtenido para EE.</i>	102
<i>Figura 24: Gráfica de efectos principales obtenida para EE.</i>	102
<i>Figura 25: Gráfica de interacciones obtenida para EE.</i>	102
<i>Figura 26: Diagrama de Pareto obtenido para rendimiento de proceso.</i>	103
<i>Figura 27 : Gráfica de efectos principales obtenida para rendimiento de proceso.</i>	104
<i>Figura 28 : Gráfica de interacciones obtenida para rendimiento de proceso.</i>	104
<i>Figura 29: Gráfica de superficie de respuesta obtenida para optimización de 2 parámetros: temperatura y alimentación.</i>	105
<i>Figura 30: Gráfica de cinéticas de liberación desde el diseño experimental.</i>	108
<i>Figura 31: Fotografía de muestra optimizada a 5000x de aumento.</i>	109
<i>Figura 32: Fotografía de muestra optimizada a 10000x de aumento.</i>	110
<i>Figura 33: Fotografía de muestra optimizada a 3000x de aumento.</i>	110
<i>Figura 34: Histograma obtenido en número para la formulación optimizada.</i>	112
<i>Figura 35: Difractogramas de rayos X.</i>	115
<i>Figura 36: Termogramas.</i>	116

<i>Figura 37: Gráficos de FT-IR.....</i>	118
<i>Figura 38: Cinética de liberación para formulación optimizada realizada a 3 lotes (n=2). .....</i>	121
<i>Figura 39: Gráfica de adaptación estadística a modelo de Korsmeyer-Peppas .....</i>	122
<i>Figura 40: Gráfica de curvas de calibración para revisión de efecto matriz .....</i>	128
<i>Figura 41: Gráfica de curva de calibración obtenida, comprendía entre 25-250 ng/mL. ....</i>	129
<i>Figura 42: Cromatograma SIM de suero blanco + PMX e IS a 250 ng/mL.....</i>	133
<i>Figura 43: Cromatograma MRM de suero blanco.....</i>	133
<i>Figura 44: Cromatograma MRM de suero blanco + PMX 100 ng/mL + IS.....</i>	134
<i>Figura 45 y 46: Perfil farmacocinético de muestras analizadas.....</i>	135
<i>Figura 47: Esquema de SPE para PMX + IS con concentración de muestra.....</i>	137
<i>Figura 48 y 49: Perfil farmacocinético de muestras concentradas.....</i>	138



## Índice de ecuaciones

<i>Ecuación 1: Cinética de orden cero.....</i>	29
<i>Ecuación 2: Cinética de primer orden .....</i>	29
<i>Ecuación 3: Modelo de Higuchi.....</i>	30
<i>Ecuación 4: Modelo de Korsmeyer-Peppas .....</i>	31
<i>Ecuación 5: Diseño central compuesto.....</i>	32
<i>Ecuación 6: Cálculo de puntos estrella .....</i>	33
<i>Ecuación 7: cálculo de la carga de BPMX en micropartículas de PLGA.....</i>	49
<i>Ecuación 8: cálculo del %EE de PMX en micropartículas de PLGA.....</i>	49
<i>Ecuación 9: Cálculo de coeficiente de variación porcentual. ....</i>	68
<i>Ecuación 10: Cálculo de concentración plasmática a tiempo cero.....</i>	72
<i>Ecuación 11: Cálculo de constante de eliminación.....</i>	72
<i>Ecuación 12: Cálculo de semivida biológica .....</i>	73
<i>Ecuación 13: Cálculo de área bajo la curva .....</i>	73
<i>Ecuación 14: Calculo de índice Span.....</i>	112



## Índice de abreviaturas

% p/v: Porcentaje peso-volumen.

% v/v: Porcentaje volumen-volumen.

% C.V: Coeficiente de variación porcentual.

°/min: Grados por minuto

°C: Grados Celsius.

μL: Microlitros

μm: Micrometros

2θ: 2-tetha.

3D: Tres dimensiones.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de varianza.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATR: Atenuancia total reflejada.

AUC: Área bajo a curva.

BPMX: Pramipexol forma base.

C<sub>0</sub>: Concentración a tiempo cero.

cm<sup>-1</sup>: Número de onda.

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono.

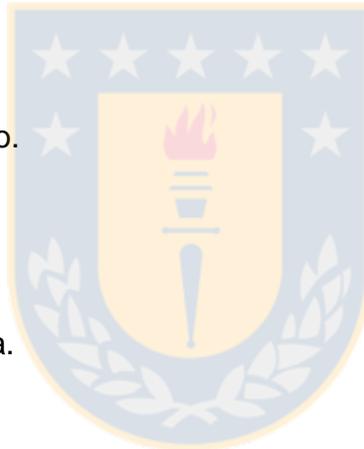
COMT: Catecol orto-amino-transferasa.

COMTIs: Inhibidores de la catecol orto-amino-transferasa.

C<sub>p</sub>: Concentración plasmática.

C<sub>p0</sub>: Concentración plasmática a tiempo cero.

D<sub>2</sub>: Receptor de dopamina tipo 2.



D<sub>3</sub>: Receptor de dopamina tipo 3.

D<sub>4</sub>: Receptor de dopamina tipo 4.

DA: Dopamina.

DCM: Diclorometano.

DDCIs: Inhibidores de la dopa-descarboxilasa.

DDE: Diseño de experimentos.

DPMX: Pramipexol forma diclorhidrato.

DRX: Difracción de rayos X.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

EE: eficacia de encapsulación

EP: enfermedad de Parkinson

ESI: Ionización por electrospray.

FDA: Food and Drug Administration.

FT-IR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.

g/L: Gramos por litro.

g: Gramos.

h: Horas.

H<sub>2</sub>O: Agua.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

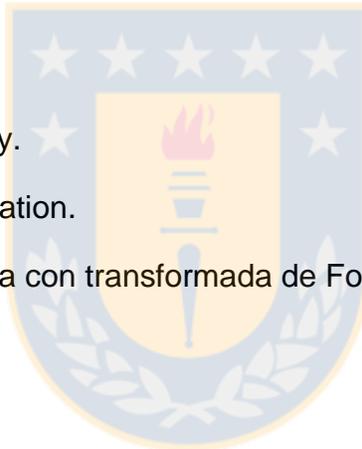
HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectrometría de masas.

ICH: International Conference of Harmonisation.

IS: Estándar interno.

K: Constante de eliminación de primer orden.

k: Numero de factores estudiados en diseño experimental.



$K_0$ : Constante de eliminación de orden cero.

$K_e$ : Constante de eliminación.

kg: Kilogramos.

$K_h$ : Constante de Higuchi.

$k_{k-p}$ : Constante de Korsmecker-Peppas.

L/h: Litros por hora.

L: Litros.

LOD: Limite de detección.

Log: Logaritmo.

LogP: Logaritmo de coeficiente de partición.

LOQ: Límite de cuantificación.

MAO-B: Mono-amino-oxidasa tipo B.

MAOBIs: Inhibidores de la mono-amino-oxidasa tipo B.

mg/kg: miligramos por kilogramo.

mg: Miligramos.

mL: Mililitros.

MRM: Multiple Reaction Monitoring.

mV: Milivolts.

N: Exponente de liberación, modelo de Korsmeyer-Peppas.

$N_0$ : Puntos centrales de diseño experimental.

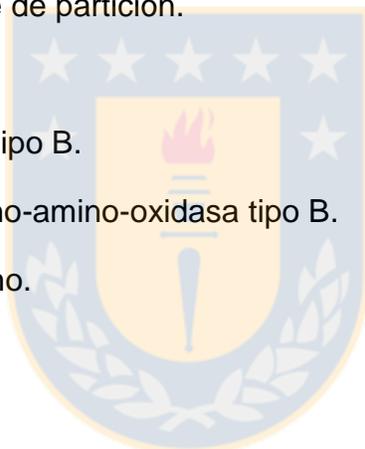
ng/mL: Nanogramos por mililitro.

nm: Nanometros.

O/O: Aceite en aceite (emulsión).

O/W: aceite en agua (emulsión)

pH: Logaritmo de concentración de protones.



pKa: Logaritmo de constante de acidez.

PLGA: polímero del ácido láctico-co-glicólico

PM: Peso molecular.

PMX: Pramipexol

PVA: Poli-vinil-alcohol.

PVDF: Polifluoruro de polivinilideno.

Q: Cantidad de fármaco liberado a tiempo t.

Q<sub>0</sub>: Cantidad total administrada a tiempo cero.

Q<sub>t</sub>: Cantidad liberada a tiempo t.

R: Cantidad de experimentos si este fuese un diseño factorial.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlación.

RP: rendimiento de proceso

RPM: Revoluciones por minuto.

SEM: Microscopía óptica de barrido.

SIM: Selected Ion Monitoring.

SN: Substantia nigra.

SNC: Sistema nervioso central.

SPE: Extracción en fase sólida.

t: Tiempo.

T°: Temperatura.

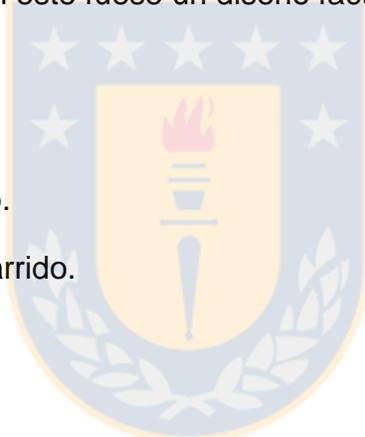
t<sub>1/2</sub>: Semivida biológica.

Tg: Temperatura de transición vítrea.

UV: Ultravioleta.

W/O/W: agua en aceite en agua (emulsión)

W/O: agua en aceite (emulsión)



$\alpha$ : Distancia desde punto central hasta un experimento determinado.



## Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar y caracterizar micropartículas de PLGA conteniendo pramipexol mediante secado por atomización. Se desarrollaron y evaluaron diferentes formulaciones de partida, tales como: emulsiones simples (O/W y W/O), emulsiones dobles (W/O/W), suspensiones y soluciones. Estas formulaciones fueron atomizadas y secadas en un equipo mini spray dryer Büchi B-290. Finalmente, se obtuvo como formulación de partida una solución, compuesta por PLGA al 4 % y pramipexol base al 0,4 %, que fue secada bajo las siguientes condiciones: T° entrada 50 °C, flujo de aire de atomización 601 L/h, aspiración 100 % y flujo de alimentación 15 %. Luego de definir una formulación de partida y condiciones de proceso, se procedió a optimizar el método de obtención de micropartículas mediante un diseño experimental, donde se modificaron las siguientes variables: temperatura de entrada (45 °C – 65 °C) y velocidad de alimentación (5 % - 20 %); manteniendo fijas la aspiración (100%) y el flujo de aire de atomización (601 L/h). Las formulaciones de micropartículas fueron evaluadas y caracterizadas mediante: eficacia de encapsulación (EE), rendimiento de proceso (RP), morfología y tamaño de partícula (SEM y difracción láser), interacciones moleculares (DSC, DRX y FT-IR) y cinética de liberación. Para las condiciones optimizadas, se obtuvieron partículas esféricas y lisas con un diámetro medio de  $2,1 \mu\text{m} \pm 0,9 \mu\text{m}$ , un RP de  $32,9 \% \pm 1,9 \%$  y una EE de  $93,7 \% \pm 0,5 \%$ , con una liberación constante del fármaco durante los primeros 18 días de estudio, ajustándose al modelo cinético de Kosmeyer-Peppas ( $R^2 = 0,98$ ). Dicha formulación no presentó interacciones aparentes entre fármaco y polímero, atribuibles al proceso de microencapsulación. Se

desarrolló y validó un método HPLC-MS para cuantificar PMX desde muestras de suero de rata. El método resultó ser lineal, exacto, preciso, sensible y selectivo.



# 1 Introducción

## 1.1 Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y reconocible en nuestros tiempos después de la Enfermedad de Alzheimer <sup>(1)</sup>. A escala mundial la tasa de personas afectadas por la EP es de 20/100.000 a los 55 años y de 120/100.000 después de los 70 años <sup>(2)</sup>. En Chile no se conocen cifras exactas, pero utilizando los estándares internacionales se estima que 40.000 chilenos se encontrarían afectados por la EP <sup>(3)</sup>. La EP puede presentar componentes tanto idiopáticos como genéticos, donde estos últimos representan el 5-10 % de los casos totales, los cuales se presentan a edades menores (< 50 años) del inicio normal <sup>(4)</sup>. Algunos factores que predisponen a la enfermedad son: ser hombre, factores hereditarios, vida rural, exposición a pesticidas y daño en la cabeza entre otros <sup>(5) (6) (7)</sup> <sup>(8)</sup>. También se pueden considerar algunos factores protectores tales como: beber café, fumar y uso de analgésicos no esteroideos <sup>(9) (10)</sup>.

La EP fue descrita por primera vez por James Parkinson en el año 1817 mediante un ensayo titulado “*An essay of shaking palsy*”. En esta obra Parkinson describe la sintomatología como: “temblores involuntarios, potencia muscular disminuida mientras que los sentidos y la inteligencia del paciente no se ven afectados”, manifestaciones que se observan en gran parte de los afectados por la EP <sup>(11)</sup>. Con el pasar de los años y los avances tecnológicos se sabe mucho más de la enfermedad, sin embargo al día

de hoy sigue siendo una patología sin cura, cuyo tratamiento se limita al control de los síntomas de la enfermedad <sup>(12)</sup>.

### 1.1.1 Fisiopatología

La EP se manifiesta principalmente en el sistema nervioso central (SNC), específicamente en una estructura conocida como la *substantia nigra* (SN) <sup>(13)</sup>, la cual se comunica con el cuerpo estriado mediante una transmisión dopaminérgica regulando: el tono muscular, movimientos inconscientes, automáticos y movimientos voluntarios finos <sup>(14)</sup> <sup>(15)</sup>. El cuerpo estriado también tiene influencia en los movimientos de la cara, brazos, piernas y procesos cognitivos <sup>(16)</sup> <sup>(17)</sup>.

La EP se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SN siendo la *pars compacta*, la subestructura más afectada, y por la presencia de estructuras eosinófilas cuyo principal componente es la  $\alpha$ -sinucleína, conocidas como cuerpos de Lewy y que se encuentran en el citoplasma de las neuronas que sobreviven <sup>(18)</sup>. Esta pérdida neuronal disminuye drásticamente los niveles de dopamina (DA) en el cerebro, teniendo consecuencias directas en las funciones mencionadas anteriormente y cuyo deterioro se manifiesta en los síntomas característicos de la EP <sup>(19)</sup>. La sintomatología comprende la bradicinesia (movimientos lentos), temblores en reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural, otros síntomas no-motores de la enfermedad son el deterioro cognitivo, trastornos de ánimo (depresión y ansiedad), insomnio y dificultades en el habla <sup>(20)</sup> <sup>(21)</sup>.

La etiología de la enfermedad posee variadas aristas, en muchos casos asocia la neurodegeneración a factores genéticos, ambientales, inflamatorios, excitotoxicidad, apoptosis, agregación de proteínas, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (22) (23). A pesar de esta gran cantidad de factores, no se ha llegado a un consenso del origen de la enfermedad, pero se cree que puede tener su origen por la interacción de todos estos (24).

### 1.1.2 Tratamiento

El tratamiento farmacológico actúa a distintos niveles para restaurar la transmisión dopaminérgica en el circuito nigro-estriado (25). Hasta el momento ningún tratamiento ha sido capaz de detener la progresión de la enfermedad, solo se consigue un alivio de la sintomatología, que permite mejorar la calidad de vida de los pacientes (12) (26).

Comprende una gama de fármacos con distintos mecanismos de acción a nivel del SNC, que restauran las funciones deterioradas por la pérdida neuronal, y pueden ser asociados con el fin de obtener una mejor respuesta por parte del paciente (27). Los agentes disponibles se pueden clasificar como:

- Levodopa + Inhibidor de la dopa-descarboxilasa (28)
  - Levodopa + Carbidopa
  - Levodopa + Benserazida

- Agonistas dopaminérgicos
  - No ergóticos
    - Pramipexol <sup>(29)</sup>
    - Ropirinol <sup>(30)</sup>
    - Rotigotina <sup>(31)</sup>
    - Apomorfina <sup>(32)</sup>
  - Ergóticos (en desuso por efectos adversos)
    - Bromocriptina <sup>(33)</sup>
    - Pergolida <sup>(34)</sup>
    - Cabergolina <sup>(35)</sup>
- Inhibidores de la monoaminoxidasa-B (MAO-B)
  - Seleginina <sup>(36)</sup>
  - Rasagilina <sup>(37)</sup>
  - Safinamida <sup>(38)</sup>
- Inhibidores de la catecolortometiltransferasa (COMT)
  - Entacapona <sup>(39)</sup>
  - Tolcapona <sup>(40)</sup>
  - Opicapona <sup>(41)</sup>
- Anticolinérgicos
  - Benzotropina <sup>(42)</sup>
  - Trihexifenidilo <sup>(43)</sup>
- Sin clasificar
  - Amantadina <sup>(44)</sup>



La figura 1 esquematiza las distintas dianas terapéuticas utilizadas hasta ahora, donde figuran los fármacos mencionados anteriormente y la ubicación específica de su acción.

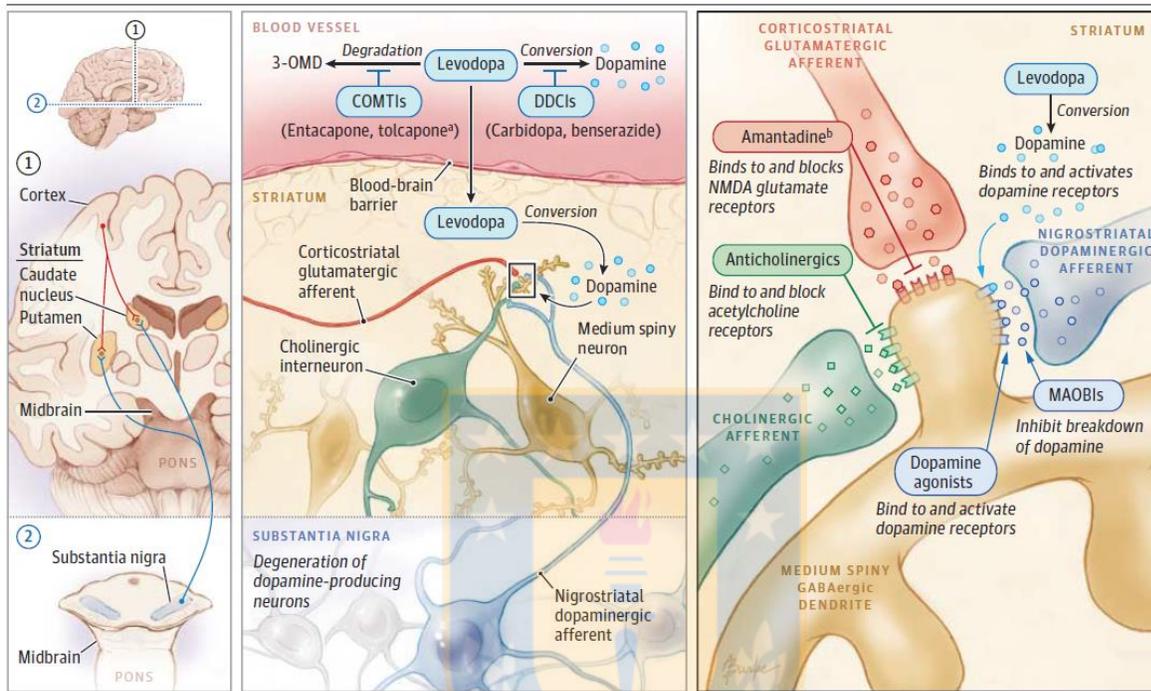


Figura 1: Esquema de sitios terapéuticos para el tratamiento de la EP. COMTis: inhibidor de la COMT; DDCis: inhibidor de la dopa descarboxilasa; MAOBis: inhibidor de la MAO-B; Amantadine: amantadina; Anticholinergics: anticolinérgicos; Dopamine agonists: agonistas dopaminérgicos. Adaptada desde: JAMA;2014;311(16):1670-1683.

La base del tratamiento radica en que sólo la transmisión entre las neuronas de la SN y el cuerpo estriado se encuentra debilitada o cortada, por lo tanto, los receptores de dopamina permanecen activos y se pueden estimular, restableciendo en parte las funciones normales y recuperando al paciente momentáneamente. Sin embargo, por fenómenos de down-regulation los fármacos utilizados pueden perder su eficacia disminuyendo la efectividad del tratamiento y reapareciendo los síntomas (fenómeno

on-off) <sup>(45)</sup> <sup>(46)</sup>. Las estrategias terapéuticas actuales están orientadas a mantener la enfermedad controlada, disminuyendo lo más posible la sintomatología <sup>(45)</sup>.

Dependiendo del estadio en que se encuentre la enfermedad se recurre a tratamientos con 1 o más Fármacos. Otro postulado importante tiene en cuenta que la estimulación continua de los receptores de dopamina genera una menor gama de complicaciones a largo plazo (discinesias y fluctuaciones motoras) que la estimulación pulsátil del receptor <sup>(47)</sup>.

### **1.1.2.1 Levodopa**

La levodopa fue el primer fármaco empleado en el manejo de la EP, disminuyendo de gran manera los síntomas ocasionados por la enfermedad. Hasta la fecha no se dispone de un fármaco más efectivo que la levodopa en términos de potencia y efectividad, por lo que se le considera como el “gold standard” para el tratamiento de la EP <sup>(48)</sup>.

Sin embargo, este fármaco posee desventajas como los fenómenos on-off (exacerbación súbita de la enfermedad que luego se recupera), wearing-off (pérdida de funciones motoras justo antes de la siguiente dosis) y la pérdida de efectividad de la misma en el tiempo que se reporta en el 50 % de los casos al estar entre 2-5 años de tratamiento con el fármaco <sup>(48)</sup>. Esto lleva a una etapa descompensada de la enfermedad en los pacientes, caracterizada por discinesias (movimientos anormales e involuntarios) y atribuible a la progresiva disminución de la densidad de receptores de

dopamina cerebrales y a la estimulación pulsátil que se genera debido a la corta semivida plasmática del fármaco<sup>(49)</sup>. Los problemas asociados a la levodopa llevaron a la investigación y desarrollo de nuevas moléculas como los agonistas dopaminérgicos, que pueden generar una estimulación dopaminérgica más prolongada y que además tienen una acción sinérgica con la levodopa <sup>(50)</sup>. Entre los agonistas dopaminérgicos podemos destacar el pramipexol al que además se le atribuyen propiedades neuroprotectoras <sup>(51)</sup>.

### 1.1.2.2 Pramipexol

El pramipexol (PMX) es un agonista directo de los receptores D<sub>2</sub> (asimismo activa receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, siendo el más afín de todos el D<sub>3</sub>) del cuerpo estriado <sup>(52)</sup>. La estereoquímica de la molécula juega un papel importante en su afinidad a receptores dopaminérgicos, siendo el isómero S más potente que el R <sup>(53)</sup>. Las propiedades químicas más relevantes del PMX <sup>(54)</sup> <sup>(55)</sup> <sup>(56)</sup>:

- Derivado del núcleo químico 2-amino-benzotiazol (Figura 2).
- Peso molecular: 211,3 g/mol.
- pKa: 5,0 y 9,6.
- T° Fusión: 296 – 301 °C.
- Solubilidad: > 20% en agua, 8% soluble en metanol.
- LogP: 0,87 (octanol/agua).
- Estable a temperatura ambiente.

- Estable en pH ácido.
- El fármaco es higroscópico debido a su alta afinidad por el agua en su forma clorhidrato, el diclorhidrato monohidrato no se considera higroscópico.

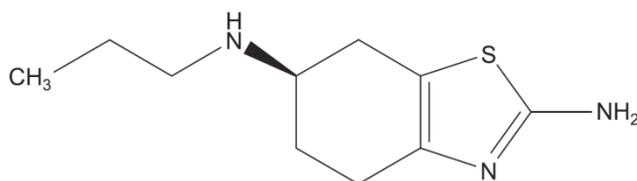


Figura 2: Estructura química del PMX. Adaptada desde: *Biomed. Chromatogr.*;2007;21:1151-1158.

En clínica se puede utilizar en cualquier estadio de la enfermedad, mostrando mejoras significativas por parte del paciente, tanto en monoterapia como asociado a levodopa <sup>(57)</sup>. En el año 2000 la revista JAMA publicó un estudio comparativo entre PMX y levodopa llevado a cabo por el “Parkinson Study Group”, donde el PMX mostró menos incidencia en discinesias, complicaciones dopaminérgicas y fenómenos wearing-off<sup>(29)</sup>. Otra propiedad interesante de este fármaco, es su efecto neuroprotector que ha sido demostrado en modelos animales de EP, donde la administración de PMX mantiene la densidad neuronal en la SN del animal <sup>(58)</sup>. También existen estudios *in vitro* que avalan su potencial neuroprotector, relacionándolo a un mecanismo de tipo antioxidante o de “actividad de barrido” (scavenging activity) independiente de su unión a receptores <sup>(59)</sup>.

PMX alcanza la concentración plasmática máxima aproximadamente a las 2 horas (pudiendo aumentar si se administra con alimentos) <sup>(50) (60) (61)</sup>. La

biodisponibilidad absoluta de PMX es de aproximadamente 90 %. Se distribuye ampliamente por los tejidos y atraviesa la barrera hemato-encefálica, con un volumen de distribución de aproximadamente 400 L y una unión a proteínas plasmáticas del orden del 15%. PMX sufre una biotransformación casi nula, excretándose casi en un 90% en forma inalterada a través de la orina. Su semivida plasmática de eliminación es de 8 a 12 horas <sup>(54)</sup>.

En Chile se encuentran disponibles las siguientes especialidades registradas: Sifrol® (Boehringer Ingelheim), Muvend® (Synthon), Biopsol® (Drugtech-Recalcine), Parmital® (Tecnofarma) y su forma genérica, en dosificaciones de 0,25 mg y 1 mg como tabletas de liberación inmediata, y 0,375 mg, 0,75 mg y 1,5 mg en tabletas de liberación prolongada (Biopsol ER® y Sifrol ER®).

La principal desventaja del tratamiento oral con PMX radica en su semivida biológica de 8 a 12 horas, que implica que los comprimidos de liberación inmediata se deban tomar hasta tres veces al día en tres dosis iguales para asegurar los requerimientos diarios, lo que puede ser una dificultad para este tipo de pacientes, especialmente con tratamiento crónico <sup>(62)</sup>. Por otra parte, es universalmente aceptado que la estimulación dopaminérgica continua es la estrategia terapéutica más eficaz para prevenir o retrasar la aparición de discinesias en la EP <sup>(47)</sup>. Estos hechos, unidos a que PMX se utiliza en un tratamiento crónico, hacen que este fármaco sea un candidato idóneo para el desarrollo de un sistema de liberación controlada. Entre las alternativas disponibles para desarrollar un sistema de esta naturaleza, se encuentran los sistemas microparticulados elaborados con polímeros biodegradables y biocompatibles <sup>(63)</sup>. Estos sistemas tienen la particularidad de que pueden administrarse vía parenteral y actuar

como una formulación de depósito, disminuyendo las administraciones y a su vez, generando una liberación constante del fármaco durante un tiempo prolongado, lo que sería bastante beneficioso en la reducción de las discinesias <sup>(64)</sup>.

## 1.2 Microencapsulación

Las micropartículas como tales se definen como estructuras con un tamaño entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$ , compuestas principalmente por un agente encapsulante que puede ser de variada naturaleza: proteínas, lípidos, tensioactivos, polímeros naturales y derivados sintéticos, capaces de formar una estructura sólida que puede contener moléculas de distinta naturaleza <sup>(65)</sup> <sup>(66)</sup>. Estos sistemas poseen muchas ventajas que justifican su uso como sistemas de vehiculización de fármacos, entre las que se destacan <sup>(65)</sup> <sup>(66)</sup>:

- Permiten transformar compuestos líquidos en sólidos, facilitando su manejo.
- Protección de compuestos inestables al medio ambiente (oxígeno, luz, humedad).
- Pueden ser modificadas químicamente para actuar en un sitio específico.
- Disminución de la dosis de fármaco administrado. Si se usa como sistema de administración parenteral se evita el efecto de primer paso hepático y disminuye la incidencia de efectos adversos.
- Mejor utilización de los fármacos (optimización). Al disminuir la cantidad de fármaco utilizada disminuyen los costos de fabricación.
- Disminución de fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas.
- Mejoramiento sustancial de la biodisponibilidad del fármaco.

- Optimización del tratamiento y aceptación por el paciente.
- Enmascaramiento de olores o sabores.

Estas partículas pueden ser preparadas mediante diferentes técnicas, todas con distintos requerimientos, ventajas y desventajas. Cabe destacar que no todos los materiales encapsulantes son compatibles con todas las técnicas de encapsulación, por lo que este aspecto debe ser considerado al momento de planificar la formulación a desarrollar. En muchos casos el objetivo de desarrollar este tipo de sistemas, es modular la liberación de fármacos en el tiempo, haciéndola más lenta y controlada. Para esto, una de las estrategias es diseñarlos como sistemas de administración parenteral de depósito, para que desde ahí el fármaco comience a ser liberado mediante distintos mecanismos (solubilización, difusión y erosión); esta liberación debe ser constante y predecible en el tiempo para asegurar concentraciones plasmáticas constantes y evitar intoxicaciones o ventanas de tiempo en las que no haya fármaco circulando <sup>(67)</sup>.

### **1.2.1 Métodos de microencapsulación**

Existe una gran variedad de métodos de microencapsulación, pudiéndose clasificar como métodos químicos y físicos, generando diferentes posibilidades para la microencapsulación de moléculas activas de diversa naturaleza (proteínas, material genético, principios activos *per se*). Utilizando la clasificación anterior se podrían ordenar de la siguiente manera:

- Métodos químicos
  - Polimerización
  - Condensación interfacial
- Métodos físicos
  - Físico-químicos
    - Coacervación
    - Gelación iónica
    - Tecnología de fluidos supercríticos
    - Evaporación de solvente
  - Físico mecánicos
    - Secado por atomización
    - Extrusión

Cada uno de estos métodos posee requerimientos específicos para su utilización y pueden entregar diferentes resultados a pesar de obtener micropartículas con todos ellos <sup>(65)</sup> <sup>(68)</sup> <sup>(69)</sup> <sup>(70)</sup>. El utilizar los mismos materiales con dos métodos distintos no asegura los mismos resultados, por lo que se debe estudiar y definir el objetivo del trabajo para implementar un método adecuado. A continuación se describirán 2 métodos de microencapsulación en particular: emulsión-evaporación de solvente y secado por atomización. El primero, es un método relativamente sencillo de implementar a escala de laboratorio, el segundo tiene la ventaja de ser un método fácilmente escalable.

### 1.2.1.1 Emulsión y evaporación del solvente

Desarrollada alrededor del año 1970, esta técnica posee una aplicabilidad en una variada gama de materiales encapsulantes y principios activos. La técnica requiere de dos fases: una fase dispersa (fase orgánica, en menor cantidad) que contiene el fármaco a encapsular y el polímero disuelto o disperso en ella, y la fase continua (fase acuosa, en mayor cantidad) que posee un surfactante para estabilizar la emulsión que posteriormente se formará. Este sistema se somete a un proceso de emulsificación en condiciones adecuadas de agitación y temperatura donde se forma una emulsión (O/W), que luego es puesta bajo agitación suave en una campana de extracción donde se produce la evaporación del solvente orgánico y se forma la micropartícula. Finalmente, las partículas se recuperan por filtración y son secadas para eliminar el agua remanente en ellas <sup>(71)</sup>. La figura 3 muestra el desarrollo de la técnica.

Dependiendo de las características del principio activo, esta técnica puede tener diferentes variaciones:

- Emulsión W/O/W: este proceso mejora el rendimiento de la encapsulación de fármacos hidrosolubles, adicionando otra fase de emulsificación para capturar de mejor manera el fármaco <sup>(72)</sup>.
- Emulsión O/O: preparada con 2 solventes oleosos (apolares) inmiscibles entre ellos, siendo útil en la microencapsulación de moléculas altamente liposolubles como corticoides <sup>(73)</sup>.

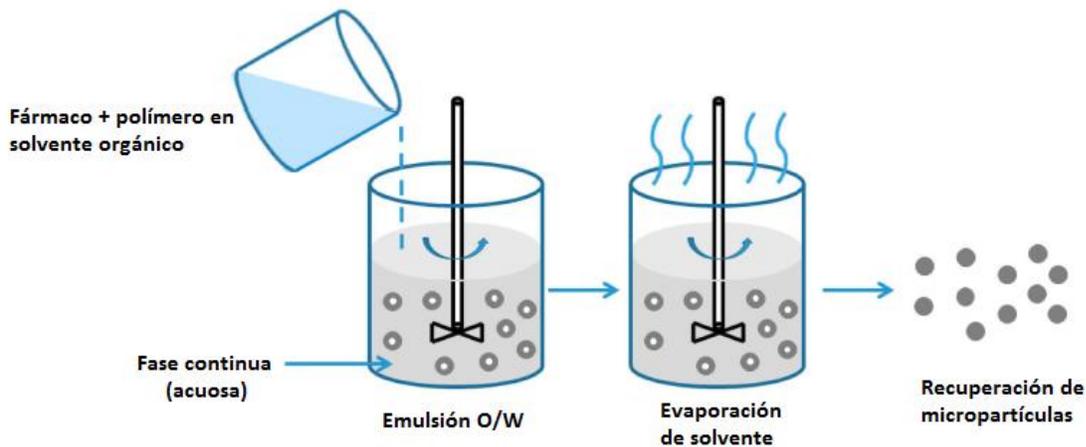


Figura 3: Preparación de micropartículas mediante técnica de emulsión/evaporación de solvente (emulsión simple y doble). Estas partículas son preparadas mezclando 2 fases inmiscibles con un surfactante que permita la generación de una emulsión para luego evaporar el solvente orgánico solidificando las partículas tras la evaporación de este. Adaptada y traducida desde: *Nanomaterials*;2016;6(26);1-18.

### 1.2.1.2 Secado por atomización

Conocido también como “spray drying”, se basa en la disolución, suspensión o emulsión del agente encapsulante y el principio activo juntos, que son aspirados mediante una bomba peristáltica para luego ser atomizados en el equipo y así obtener un producto seco. El líquido bombeado es forzado a salir mediante una corriente de aire caliente presurizado por una boquilla de diámetro definido, formándose gotas de tamaño variable que son secadas en una cámara hecha para este fin. El producto ya seco es aspirado hacia un ciclón que separa las partículas, dejándolas en un colector de producto y aspirando el polvo fino que no fue capaz de depositarse en él <sup>(74)</sup>. La imagen 4, muestra el esquema de funcionamiento del equipo. Existe una gran variedad de trabajos con esta técnica, siendo una de sus principales aplicaciones la industria

alimentaria, el secado de materiales y la industria farmacéutica <sup>(74)</sup> <sup>(75)</sup>. Entre sus usos específicos se encuentra la generación de partículas para inhalación, ya que las especificaciones del equipo permiten la obtención de partículas de pequeño tamaño (< 20  $\mu\text{m}$ ) que se pueden depositar en los pulmones permitiendo la entrega eficiente de fármacos por esta vía <sup>(77)</sup>. Entre las ventajas que entrega la técnica se encuentran:

- Uso en moléculas termolábiles: la muestra al ser sometida durante un pequeño lapso a temperatura puede mantener totalmente o disminuir levemente su actividad, evitando su degradación <sup>(76)</sup>.
- Alta eficiencia de encapsulación: en teoría, al atomizar una mezcla determinada y evaporar solamente el solvente que la contiene, el polvo obtenido es representativo de la solución inicial. Por lo que se debería esperar una alta eficacia de encapsulación, superior al 80% en la mayoría de los casos <sup>(78)</sup>.
- Buen rendimiento de producción: una configuración adecuada y optimizada del equipo, permitiría un alto índice de recuperación de producto seco. Siendo una de las ventajas más atractivas de la técnica <sup>(78)</sup>.
- Alta compatibilidad con encapsulantes y fármacos: la variedad de temperaturas de atomización, permite al equipo el uso de una gama de solventes para ser atomizados sin problemas, siempre y cuando estos no se inflamen con las condiciones de atomización. Se puede trabajar con solventes orgánicos (cloruro de metileno, diclorometano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, entre otros), agua o mezclas de solventes afines <sup>(79)</sup> <sup>(80)</sup> <sup>(81)</sup> <sup>(82)</sup>.
- Cualquier solución que fluya por el equipo puede ser atomizada.

- Escalamiento industrial relativamente sencillo: si se mantienen las condiciones utilizadas, en un equipo de mayor envergadura los resultados deberían ser los mismos, o muy similares (74).

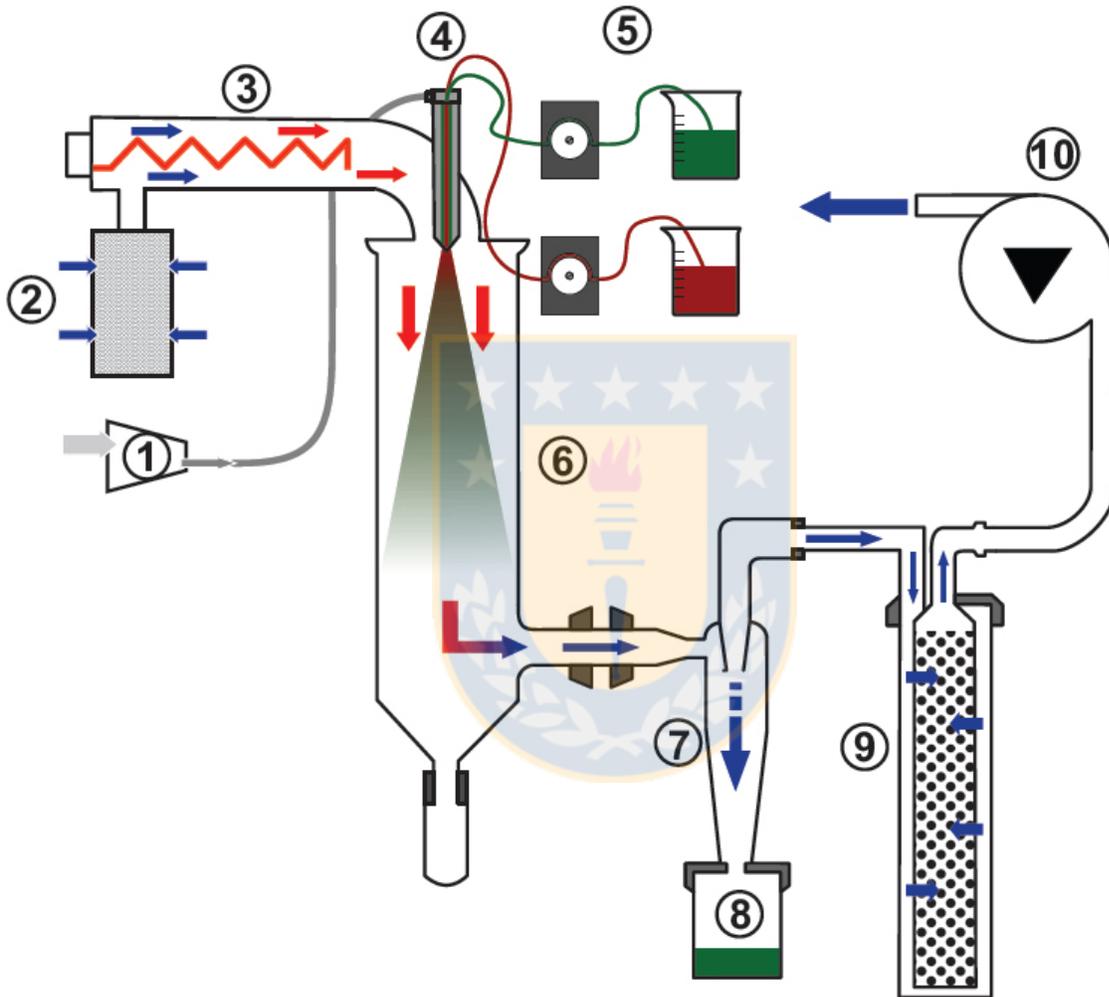


Figura 4: Esquema de funcionamiento de un mini spray dryer Buchi B-290. La muestra es aspirada (5) mediante una bomba peristáltica donde esta es mezclada con un flujo de aire filtrado a una temperatura definida (2-3) y un flujo de aire comprimido (1) que confluyen en la boquilla (4) que luego es expulsado hacia la cámara de secado (6) para luego ser aspirado (10) hacia un ciclón de separación que recolecta las partículas (8) y el resto es filtrado y eliminado (9). Adaptada desde: FBP;2013;91(4);525-533.

En el área farmacéutica esta técnica ha cobrado una especial importancia, siendo una alternativa viable para la inclusión de principios activos en matrices de distinta naturaleza debido a su facilidad de escalamiento, alta eficacia de encapsulación (>80% en muchos casos) y porque es posible atomizar cualquier cosa que pueda ser bombeada a través del equipo <sup>(78)</sup>.

El tamaño y forma de las partículas se encuentra definido por diferentes parámetros que pueden ser modificados, tales como:

- Temperatura del aire: la temperatura del aire es un factor crítico debido a que si el aire no está lo suficientemente caliente, la muestra atomizada no se secará. Obteniéndose un producto pastoso o húmedo sin las características requeridas <sup>(83)</sup>. Esto se ve reflejado en una condensación del líquido atomizado en el receptor, disminuyendo el rendimiento drásticamente.
- Flujo del aire: está en relación con el tamaño de la gota atomizada que incide directamente en el tamaño de partícula final, a medida que este aumenta, el tamaño de gota disminuye, asimismo la temperatura de salida disminuye ya que hay un mayor flujo de aire que calentar en el mismo tiempo <sup>(84)</sup>.
- Alimentación del equipo: el aumento de este disminuye la temperatura de salida debido a que se debe secar una mayor cantidad de líquido en el mismo tiempo, pudiendo aumentar la humedad del producto final. Aumenta también el tamaño de gota, y con esto el tamaño de partícula <sup>(83)</sup>.
- Concentración de sólidos: una mayor concentración de sólidos mejora el rendimiento del proceso y produce un aumento en el tamaño de las partículas <sup>(84)</sup>.

- Aspiración: el aumento de este parámetro puede ofrecer una mejor separación y mejoras en el rendimiento del proceso <sup>(84)</sup>.
- Tamaño de boquilla: este parámetro cobra importancia en el tamaño de partícula obtenido al final del proceso <sup>(84)</sup>.

En farmacia, la técnica de secado por atomización ha sido utilizada para encapsular moléculas de distinta naturaleza; un ejemplo interesante es el secado de insulina para administración nasal propuesto por Stahl y cols. <sup>(85)</sup>, donde a pesar de producirse degradación parcial de la proteína (y una pérdida indirecta de actividad biológica), esta se encapsula finalmente y podría ser utilizada con fines clínicos. Asimismo, existe la encapsulación de otro tipo de moléculas biológicas tales como ADN, ARN, enzimas, aminoácidos, anticuerpos monoclonales para uso humano hasta encapsulación de microorganismos (probióticos) <sup>(86) (87) (88) (89) (90) (91)</sup>. En algunos casos se observa pérdida de actividad biológica, pero a pesar de esta merma, los productos secados preservan una buena parte de su actividad biológica y adquieren propiedades propias de los encapsulados según su fin <sup>(85) (91)</sup>. Otras moléculas de importancia en farmacia han sido encapsuladas para liberación a largo plazo, ejemplificando: un estudio realizado por Wagenaar y cols.<sup>(92)</sup>. propone la encapsulación comparativa de piroxicam en copolímero de ácido láctico y glicólico y polímero de ácido láctico, observándose la liberación del fármaco a un medio receptor, siendo la encapsulación mediante ácido láctico donde se observa una liberación más retardada, pero en ambos casos el perfil de liberación es distinto a la fármaco sin intervenir.

## 1.2.2 Material encapsulante

Dentro de la gran variedad de materiales para la encapsulación de moléculas activas podemos mencionar: carbómeros, polimetacrilatos, derivados sintéticos de celulosa, policaprolactona, poloxámeros, hialuronanos, el copolímero del ácido láctico y glicólico (PLGA), quitosano, proteínas y lípidos. De todos los encapsulantes mencionados, el PLGA es uno de los polímeros más estudiados en la encapsulación de moléculas de pequeño tamaño para liberación controlada <sup>(92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100)</sup>  
(101).

### 1.2.2.1 Polímero del ácido láctico-co-glicólico

El PLGA es un polímero en bloque (una sección hecha exclusivamente de una cadena de ácido láctico unida a otra de ácido glicólico enlazadas covalentemente para darle lugar) de longitud variable ampliamente utilizado en encapsulación de diversas moléculas con actividad biológica. Entre sus características químicas, este polímero es soluble en solventes halogenados (diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono), acetona, acetato de etilo y tetrahydrofurano, siendo insoluble en agua. Tiene un peso molecular variable según el largo de las cadenas que lo componen y se presenta en un estado amorfo o cristalino según la proporción de sus cadenas <sup>(102)</sup>. Es una sustancia biocompatible y biodegradable a mediano-largo plazo (aprox 90 días), que posee grandes ventajas a la hora de generar sistemas de liberación controlada, tales como:

- La degradación lenta del polímero permite generar depósitos de distintas moléculas y ser liberadas en tiempos extendidos <sup>(103)</sup>.
- No genera reacciones inmunes debido a que ambas moléculas que le componen son endógenas y sus productos finales de degradación son CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O <sup>(102)</sup>.
- Posee un amplio estudio de todas sus propiedades, donde ha sido caracterizado en casi todos sus aspectos, siendo reconocido por la FDA como seguro <sup>(103)</sup>.
- Puede modificarse para modular aún más la liberación de algún principio activo, ya sea agregando grupos funcionales en sus puntos terminales, o variando la longitud y proporción de las cadenas de ácido glicólico o láctico <sup>(104)</sup>.
- Versátil, ya que se pueden preparar sistemas particulados mediante variados métodos como emulsión-evaporación del solvente, secado por atomización, evaporación de fluidos supercríticos, coacervación y extrusión <sup>(102)</sup>.

Para efectos de liberación controlada, las siguientes características del polímero son posibles de modificar para obtener un determinado perfil de liberación:

- Fracción láctico/glicólico: esta característica adquiere relevancia debido a que la degradación de las partículas en agua puede ser modificada variando la fracción láctico/glicólico. Si existe una mayor proporción de ácido láctico la hidrólisis del polímero será más lenta. Esto es atribuible a la hidrofobicidad del ácido láctico que hace más difícil su degradación. También, se ha estudiado que la forma 50/50 del PLGA es la de degradación más rápida en comparación a otros similares de peso molecular parecido, pero con otra proporción <sup>(103)</sup>.
- Peso molecular del polímero: está en directa relación con la viscosidad de este; mayores pesos moleculares se asocian a cambios en la temperatura de

transición vítrea (Tg), grado de cristalinidad y resistencia mecánica <sup>(102)</sup>. La Tg adquiere una relevancia especial, ya que al superarla puede alterar los perfiles de liberación del fármaco encapsulado, llevando a liberaciones muy rápidas o erráticas <sup>(104)</sup> <sup>(105)</sup>.

- Terminaciones: en ambos extremos de la cadena polimérica se encuentran grupos terminales que pueden tener distinta naturaleza según el proveedor. Destacan terminaciones: éster, ácidas e hidroxilo. Estas terminaciones impactan significativamente en el proceso de degradación del PLGA, donde un polímero con terminación éster puede degradarse entre 4 a 6 semanas, en cambio un polímero con terminación ácida tendría una degradación más rápida en condiciones equivalentes (PM y fracción lactico/glicolico). Asimismo, la adición de grupos -hidroxi al polímero hacen la molécula más hidrofílica, exhibiendo una velocidad de degradación más alta <sup>(106)</sup> <sup>(107)</sup>.

En el área farmacéutica, este polímero ha sido ampliamente utilizado como: protector de moléculas <sup>(108)</sup>, encapsulación de moléculas volátiles <sup>(109)</sup>, formulaciones de depósito <sup>(110)</sup>, nanopartículas <sup>(111)</sup>, etc...

### 1.2.3 Caracterización de micropartículas

La caracterización de las micropartículas abarca varias pruebas practicadas al producto obtenido, destacándose: eficacia de encapsulación, rendimiento de producción, tamaño y distribución de tamaño de partícula, cinética de liberación, potencial zeta, morfología e interacciones moleculares.

#### 1.2.3.1 Eficacia de encapsulación y carga

La eficacia de encapsulación se describe como el porcentaje de fármaco que efectivamente fue encapsulado dentro de las micropartículas con respecto a lo que fue pesado inicialmente (%EE). La carga se define como el porcentaje de fármaco que existe dentro del total de sólidos pesados <sup>(65)</sup>.

#### 1.2.3.2 Tamaño y morfología

Se les considera importantes en el desarrollo de estas formulaciones porque, en primer lugar, la forma afecta la liberación del fármaco desde la partícula; una forma esférica y regular posee una menor superficie de contacto, lo que permite una liberación más controlada y predecible del principio activo sumado a una menor degradación del material encapsulante en el tiempo. Asimismo las partículas de forma irregular (no esféricas) tendrán mayor superficie específica, por lo cual la liberación del fármaco será más rápida. En términos de tamaño, este influye directamente en la cantidad de

fármaco que las micropartículas puedan llevar en su estructura. Por otro lado, las partículas de pequeño tamaño pueden ser reconocidas por el sistema inmune y fagocitadas disminuyendo la efectividad de la formulación <sup>(112)</sup>. Otra consideración importante es la superficie de estas, si son lisas o porosas; el no encontrar poros en las partículas le confiere más ventajas ya que dificulta la entrada de líquidos a la partícula impidiendo la difusión del principio activo al medio, haciendo prevalecer un mecanismo de erosión más que difusivo. Estos detalles observados pueden ser relacionados con el comportamiento que pueden presentar en la cinética de liberación del fármaco en un medio receptor donde la velocidad de cesión en términos de tamaño y morfología influyen directamente en el comportamiento de estas al ceder el fármaco <sup>(113)</sup>. La exploración física de las partículas se lleva a cabo mediante microscopía óptica o electrónica para determinar el tamaño promedio de la muestra y obtener imágenes representativas del lote de partículas preparado. Para medir solo tamaño de partícula existen equipos basados en difracción laser que permite obtener el tamaño de partícula promedio y su distribución estadística <sup>(114)</sup>.

### **1.2.3.3 Potencial zeta**

El potencial zeta tiene una gran aplicación en el área de tecnología farmacéutica como medida de estabilidad de algunos tipos de formulaciones farmacéuticas (dispersiones principalmente). Este se define como la carga eléctrica que posee la partícula en un sistema coloidal definida por la interacción entre la capa del fluido que envuelve a la partícula con el medio dispersante de la misma (fenómeno de la doble

capa eléctrica), siendo esta expresada comúnmente en milivolts (mV). Esta medida logra una gran importancia en nanopartículas y micropartículas definiendo algunos procesos como: mucoadhesión, reconocimiento por el sistema inmune, vectorización, farmacocinética y su estabilidad. Para este caso particular, el potencial Z definiría gran parte de la estabilidad de las micropartículas en un sistema disperso, donde lo óptimo sería una carga de aproximadamente  $\pm 30$  mV ya que potenciales muy marcados o cercanos a cero podrían generar aglomeraciones de partículas dificultando mucho la dosificación del principio activo entre inyecciones. El potencial zeta se mide por lo general mediante la técnica de migración electroforética que se usa de rutina en micropartículas y nanopartículas. El método está basado en la migración de las partículas al polo opuesto de su carga de la celda que las contiene, el equipo mide la dispersión de luz generada a medida que se desplazan, asociándolo a un modelo matemático no lineal que contrasta el estado inicial con respecto al fenómeno migratorio inducido <sup>(115)</sup> <sup>(116)</sup>.

#### **1.2.3.4 Interacciones moleculares**

Los estudios de interacciones químicas entre el agente encapsulante y el principio activo se realizan para investigar si el fármaco sufrió algún cambio provocado por el proceso de microencapsulación, tales como degradación o formación de enlaces covalentes entre la molécula de fármaco y los excipientes, por último, también informa sobre el estado amorfo o cristalino del principio activo en la partícula. Los componentes se evalúan por separado (fármaco, polímero y otros excipientes) para luego compararse

contra mezclas de componentes, partículas blanco y las partículas cargadas. Normalmente, se pueden distinguir disminuciones o desapariciones de señales producto del apantallamiento molecular que se da por las interacciones polímero-fármaco, pérdida de cristalinidad de la muestra, o la aparición de nuevas señales producto de alguna reacción entre ellos (117). Existen distintas metodologías utilizadas de rutina en la evaluación de estas interacciones tales como: calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y espectroscopia infrarroja.

#### **1.2.3.4.1 Difracción de rayos X (DRX)**

La *difracción de rayos X (DRX)* entrega información sobre el estado cristalino o amorfo de las moléculas. Se pueden observar estructuras amorfas con difractogramas no muy bien definidos, mientras que en las moléculas cristalinas se ven picos agudos y estrechos. Las partículas analizadas pueden mostrar un comportamiento mixto expresando características de los 2 tipos de difractogramas, que pueden reflejar la interacción entre el polímero y el fármaco o cambios estructurales que experimentan los componentes en el proceso de fabricación (ej: alteraciones de cristalinidad, re-cristalizaciones de principio activo). El principio de este análisis se basa en la “Ley de Bragg”, donde la incidencia de los rayos X a un ángulo definido ( $2\theta$ ) en una muestra, se puede variar de forma controlada para obtener interferencias constructivas y destructivas a medida que estos ángulos cambian. Se grafica la intensidad de la señal emitida producto de las interferencias constructivas y destructivas, apareciendo señales

altamente definidas y características para compuestos de estado cristalino, mientras que en estado amorfo se observan de manera más difusa <sup>(117)</sup>.

#### **1.2.3.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El análisis por *calorimetría diferencial de barrido (DSC)*, identifica interacciones fármaco-polímero, estados cristalinos, polimorfismos, contenido de agua y puntos de fusión de la muestra analizada. Se trabaja con los componentes activos puros, mezclas físicas y las partículas obtenidas en búsqueda de interacciones mediante la aplicación de calor entre un blanco y la muestra, obteniéndose termogramas con picos endo- o exotérmicos que pueden evidenciar la presencia de estas interacciones <sup>(118)</sup>.

#### **1.2.3.4.3 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)**

La *espectroscopía infrarroja (FT-IR)* permite investigar interacciones entre componentes de la formulación, tales como formación de enlaces covalentes o reacciones inesperadas (ej: óxido-reducción), que se pueden dar por el proceso tecnológico de fabricación. En el espectro infrarrojo se pueden observar disminuciones de las señales obtenidas al analizar las moléculas de forma individual debido a la superposición entre ellas. La espectroscopía infrarroja se basa en la detección de vibraciones moleculares a ciertas frecuencias lo que genera una absorción de energía si esta coincide con algún fenómeno que presente esta molécula (dobles enlaces, triples enlaces o grupos funcionales) <sup>(119) (120)</sup>.

### 1.2.3.5 Evaluación de cinética de liberación

Los estudios cinéticos son llevados a cabo con el objetivo de conocer el perfil de liberación del fármaco en un entorno controlado frente a un medio receptor. El estudio puede durar desde días a semanas o meses dependiendo de la formulación desarrollada. Es deseable que la liberación sea constante en el tiempo para entregar una dosis uniforme y controlada <sup>(121)</sup>. En la realidad, gran parte de los sistemas particulados poseen cinéticas de doble comportamiento (bifásicas) que en un principio se acompañan de un efecto “burst” o liberación rápida del fármaco que se encuentra en la parte más externa de la partícula, para luego dar paso a una cinética más lenta y controlada que puede mantenerse días, semanas o meses, y que es gobernada principalmente por mecanismos de difusión y erosión. Este fenómeno es deseable en micropartículas para uso como depósito, considerando el efecto burst como dosis de carga y la segunda fase de liberación como una liberación controlada <sup>(122) (123)</sup>. Estos estudios se llevan a cabo poniendo las micropartículas en un ambiente líquido predefinido considerando los siguientes parámetros:

- El pH de un entorno fisiológico es 7,4 <sup>(124)</sup>.
- El medio de cesión es un tampón isotónico <sup>(125)</sup>.
- La temperatura promedio del cuerpo humano es de 37°C <sup>(124)</sup>.
- Condiciones *sink* (el volumen final debe ser por lo menos 5-10 veces la solubilidad máxima del fármaco en el volumen total) <sup>(126)</sup>.

- Límites de cuantificación del fármaco, que junto a las condiciones *sink* determinan el volumen final y la cantidad de micropartículas a utilizar.

#### **1.2.3.5.1 Adaptación a modelo matemático existente**

El uso de modelos matemáticos en los estudios de cesión, ayudan a elucidar mecanismos de liberación del fármaco que pueden estar dados por procesos de difusión, erosión o mixtos. Estos tienen base teórica en los postulados de la ley de difusión de Fick, donde su primer postulado explica la difusión de una molécula desde una zona donde está altamente concentrada a una que no lo está. El segundo postulado hace alusión a los cambios en gradientes de concentración a tiempos determinados. Sin embargo, estos postulados solamente sustentan el fenómeno de difusión que ocurre desde las formulaciones microparticuladas, pero no el perfil de liberación que poseen <sup>(127)</sup>. Para este fin se han desarrollado modelos de liberación como el de orden cero, primer orden y modificaciones de estos que han aparecido con los años de investigación que proveen de un mejor ajuste. Estos modelos buscan como fin último, tener conocimiento sobre el comportamiento del sistema y asegurar que estas liberen su contenido de una manera predecible evitando comportamientos anómalos.

En vista de esta problemática, se desarrollaron modelos derivados sobre todo desde la cinética de primer orden:

- Orden cero

Este comportamiento se puede observar en sistemas de liberación muy lenta, donde la formulación no se disgrega con facilidad, o el fármaco no es hidrosoluble <sup>(128)</sup>. Se representa según la ecuación 1:

$$Q_t = Q_0 + K_0t$$

*Ecuación 1: Cinética de orden cero. Donde  $Q_t$ : Es la cantidad liberada a tiempo  $t$ ;  $Q_0$ : Cantidad total administrada a tiempo cero;  $K_0$ : Constante de eliminación de orden cero;  $t$ : tiempo. Adaptada desde: Acta Pol Pharm.;2010;67(3);217-223.*

- Primer orden

Este tipo de comportamiento se ve en sistemas matriciales porosos, y fármacos hidrosolubles, en farmacocinética se observa este comportamiento en la absorción y eliminación de muchas moléculas activas <sup>(128)</sup>. Se representa por la ecuación 2:

$$\log C = \log C_0 - \frac{Kt}{2,303}$$

*Ecuación 2: Cinética de primer orden. Donde:  $C$ : concentración a tiempo  $t$ ;  $C_0$ : concentración a tiempo cero;  $K$ : constante de eliminación de primer orden;  $t$ : tiempo. Adaptada desde: Acta Pol Pharm.;2010;67(3);217-223.*

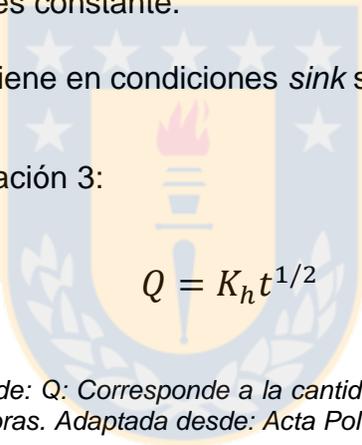
Estas ecuaciones por si solas no encuentran nicho en la liberación de sistemas microparticulados por lo que se desarrollaron otros modelos que permitieron un mejor ajuste y predicción de la liberación por parte de un sistema particulado. *Higuchi* en 1961

postuló su modelo que describe la liberación del fármaco bajo una serie de supuestos

(128) (129):

- La concentración inicial de fármaco en la matriz es mucho más alta que la solubilidad máxima que del mismo.
- La difusión del fármaco toma lugar en una sola dimensión.
- Las partículas de fármaco son mucho más pequeñas que el espesor del sistema que la contiene.
- La disolución e hinchamiento de la matriz es despreciable.
- La difusión del fármaco es constante.
- Por último, este se mantiene en condiciones *sink* siempre.

Se representa mediante la ecuación 3:


$$Q = K_h t^{1/2}$$

*Ecuación 3: Modelo de Higuchi. Donde: Q: Corresponde a la cantidad de fármaco librada al tiempo t; K<sub>h</sub>: Constante de Higuchi; t: tiempo en horas. Adaptada desde: Acta Pol Pharm.;2010;67(3);217-223.*

Al estar el tiempo elevado a 0,5, se grafica Q vs la raíz cuadrada del tiempo entregando una línea recta.

Otro modelo es el postulado por *Korsmeyer-Peppas* en 1983, donde se encuentra otra explicación para las cinéticas de liberación de sistemas matriciales (129). Su representación está dada por la ecuación 4:

$$F = k_{K-P}t^n$$

*Ecuación 4: Modelo de Korsmeyer-Peppas. Donde: F: Fracción de fármaco liberado al medio al tiempo t; n: Exponente de liberación del modelo propiamente tal; k<sub>K-P</sub>: Constante de Korsmeyer-Peppas (asociada a geometría y estructura del sistema particulado). Adaptada desde: Acta Pol Pharm.;2010;67(3);217-223.*

Para este apartado existe un especial interés en el valor “n” obtenido, ya que este valor define el tipo de difusión que posee el modelo <sup>(128)</sup> (tabla 1).

*Tabla 1: Tipos de liberación predicha según la constante “n” calculada. Adaptada desde: Acta Pol Pharm.;2010;67(3);217-223.*

Exponente de liberación	Mecanismo de transporte	En función del tiempo
0,5 o menor	Difusión fickiana	$t^{-0,5}$
0,5 < n < 1	Difusión no-fickiana (anómala)	$t^{n-1}$
1	Transporte caso 2	Lib. orden cero
Mayor a 1	Transporte súper caso 2	$t^{n-1}$

Para el uso de este modelo se deben considerar los siguientes supuestos:

- La ecuación es aplicable para pequeños intervalos de tiempo, y la porción de la curva donde F es menor al 60 % de la liberación es la utilizada para calcular n.
- La liberación del fármaco es solamente en una dimensión.
- La relación longitud/espesor del sistema debe ser de por lo menos 10.

Para determinar el ajuste matemático a un modelo dado, existen programas computacionales o complementos para programas utilizados de rutina que pueden simplificar este modelamiento, como el complemento de Microsoft Excel® “DDSolver”. Este presenta las ecuaciones mencionadas anteriormente, versiones modificadas y otros modelos de mayor complejidad <sup>(130)</sup>.

### 1.3 Desarrollo de formulaciones mediante diseños experimentales

El diseño experimental es una herramienta altamente utilizada en el mejoramiento de procesos industriales. Estudia el efecto de cambios sistemáticos y controlados en las variables de entrada sobre una variable de salida o resultado en un proceso. El objetivo es encontrar las combinaciones óptimas de variables de entrada. Entre las ventajas que se encuentran en el uso de esta técnica podemos mencionar:

- Mejor aprovechamiento de recursos y tiempo a la hora de trabajar en el laboratorio, ya que es posible optimizar un proceso empleando un número reducido de experimentos.
- Permite estimar de manera eficiente la implicancia que tienen los parámetros involucrados en el proceso a estudiar.
- Existe un sustento matemático a la hora de estudiar las causas que generan cambios en las distintas respuestas.

Después de realizar los ensayos preliminares, se procedió al planteamiento de un diseño experimental, con el fin de seleccionar la formulación que presente las mejores características de liberación del principio activo.

Para el desarrollo de este trabajo experimental se utilizó un diseño central compuesto centrado en las caras y rotable, que está definido por la ecuación 5:

$$(2 * k) + 2^k + n_0$$

*Ecuación 5: Diseño central compuesto. Donde: k = número de factores estudiados en el diseño experimental; n<sub>0</sub> = puntos centrales del diseño experimental. Adaptada desde: Análisis y diseño de experimentos; Gutierrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill; 418.*

Asimismo, se crea un punto central de coordenadas 0,0 que hace de eje para el diseño experimental (Figura 5).

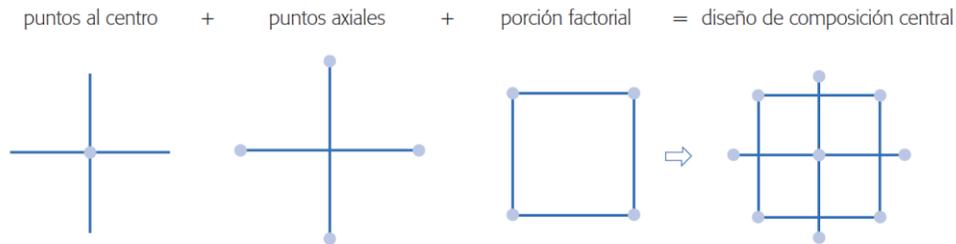


Figura 5: Esquema de distribución de experimentos para diseño central compuesto centrado en las caras rotatable. Adaptada desde: *Análisis y diseño de experimentos; Gutierrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill; 418.*

En la figura 5 se observa la formación de un cuadrado al conectar los experimentos principales (esqueleto factorial), el punto central entre ambos factores de coordenadas 0,0 ( $n_0$ ) y puntos fuera del cuadrado dibujado (denominados puntos estrella) que corresponden a una distancia previamente calculada según la ecuación 6:

$$\alpha = \sqrt[4]{R}, \text{ donde:}$$

*Ecuación 6: Cálculo de puntos estrella. Donde:  $\alpha$ : distancia desde el punto central donde se ubica un nuevo experimento;  $R$ : cantidad de experimentos realizados si este fuese un diseño factorial. Adaptada desde: *Análisis y diseño de experimentos; Gutierrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill; 418.**

Al final, *alpha* queda definido multiplicando el valor del parámetro en el punto 0,0 por este factor, obteniéndose el bloque experimental. Si siguiéramos ejemplificando con los datos anteriores, el bloque experimental quedaría como indica la tabla 2:

Tabla 2: Esquema de bloque experimental generado para el diseño central compuesto utilizado. Fuente: elaboración propia.

Factor X	Factor Y
+1	+1
+1	-1
-1	+1
-1	-1
0	0
0	0
+1,41	0
-1,41	0
0	+1,41
0	-1,41

Este bloque se puede desglosar en 3 secciones, los primeros 4 experimentos corresponden a la fracción factorial, los 2 siguientes a los puntos centrales y por último los 4 puntos finales son los puntos de estrella que son los que le otorgan la rotabilidad al diseño. Esta última, se considera importante porque homogeniza la varianza para todos los puntos del diseño, haciendo que todos los puntos se encuentren a la misma distancia entre ellos, esto cobra importancia debido a que la mayoría de las veces no se sabe el lugar o sector donde se encuentra el punto óptimo.

Por último, se ejecuta el análisis de los datos luego de obtener toda la información recabada durante el experimento, pudiéndose medir una gran gama de respuestas mediante pruebas estadísticas que denotan el tipo de influencia de un parámetro en las respuestas obtenidas durante los experimentos. La representación gráfica más común es el diagrama de Pareto, que representa la intensidad con la que afecta cada parámetro o combinaciones de estos de manera positiva o negativa a las respuestas medidas.

El diagrama de Pareto presentado en la figura 6 muestra la influencia de los parámetros según su orden de intensidad y presenta colores evidenciando si este efecto es una proporción directa o inversa del mismo (gris: prop. directa, azul: prop. inversa). También considera la interacción entre factores (AB, AC, BC) o el efecto cuadrático de un factor determinado (AA, BB, CC).

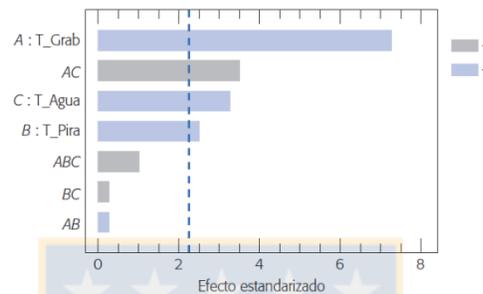


Figura 6: Esquema de diagrama de Pareto, medición de respuesta estandarizada. Adaptada desde: Análisis y diseño de experimentos; Gutiérrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill;188.

La gráfica de efectos principales (figura 7), es otra representación altamente utilizada en el estudio de la influencia de ciertos parámetros a una respuesta dada, según el número de experimentos puede generar una función matemática que sea representada como una línea recta o una curva, definiendo el comportamiento de la respuesta frente a variaciones de otro parámetro (como valores continuos o discretos). Estas pueden predecir un límite donde el aumentar o disminuir un parámetro pueden tener efectos perjudiciales sobre la respuesta a optimizar, ayudando de buena manera a encontrar el punto óptimo de trabajo.

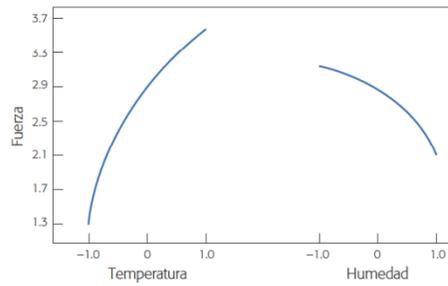


Figura 7: Gráfica de efectos principales. Se observa un aumento de la respuesta medida, esto permite buscar los máximos para cada parámetro estudiado. Adaptada desde: *Análisis y diseño de experimentos*; Gutiérrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill;245.

Otro análisis estadístico realizado es el gráfico de interacciones, que determina la interacción entre 2 o más factores estudiados. En la figura 8 se observan 2 efectos, en caso de haber interacciones, estas líneas se deberían estar con intersecciones entre ellas. Y en el gráfico de Pareto el efecto estandarizado debe superar la línea azul notificando que existe una interacción entre los factores para que sea congruente.

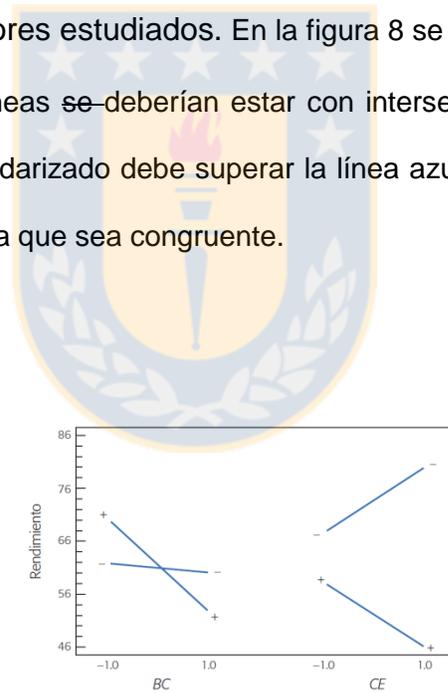


Figura 8: Gráfica de interacciones. Se puede ver un cruce entre las líneas lo que indica la influencia de un parámetro sobre el otro. Adaptada desde: *Análisis y diseño de experimentos*; Gutiérrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill;213.

Por último, se encuentra la representación de superficie de respuesta, que luego de terminar el análisis estadístico de cada parámetro y sus respuestas, los datos se

grafican en una representación tridimensional que muestra el comportamiento de cada parámetro según se cambian las condiciones experimentales (figura 9).

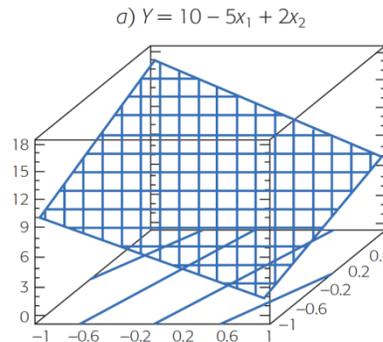


Figura 9: Gráfico de superficie de respuesta. Se observa la evaluación de 2 respuestas y la ecuación que la gobierna. Adaptada desde: *Análisis y diseño de experimentos*; Gutierrez H., De la Vara R.;2008;Segunda edición;The McGraw-Hill;393.

Se genera un gráfico en 3D, donde se representan los distintos factores involucrados y la “deseabilidad” (medida estadística de que tan buena es la combinación de factores utilizada) de los resultados, en esta fase se le puede solicitar al software que optimice el proceso para apuntar a un valor de respuesta fijo, maximizarla o disminuirla. Se pueden usar las combinaciones que se estimen convenientes, pero el valor de deseabilidad no siempre será el óptimo. Por último, el software puede mostrar una lista de combinaciones secundarias en caso de que los parámetros sean físicamente imposibles o económicamente difíciles de sustentar (131).

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar micropartículas biodegradables de PLGA para de liberación controlada de PMX mediante secado por atomización. El sistema microparticulado fue caracterizado exhaustivamente, siendo su fin último obtener una liberación constante y predecible del principio activo en el tiempo

que pueda tener aplicación en humanos para el tratamiento de la EP. Esto, con el objetivo de cumplir el postulado de obtener una estimulación constante de los receptores de dopamina para evitar complicaciones de la EP a largo plazo.



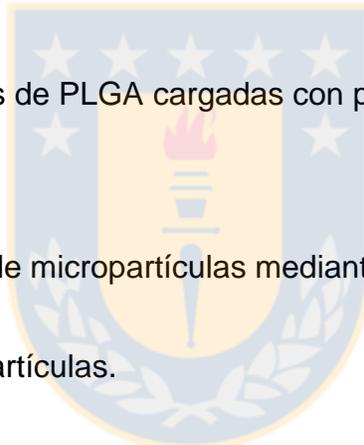
## 2 Objetivos

### Objetivo General

Desarrollar y caracterizar micropartículas de PLGA conteniendo pramipexol mediante secado por atomización.

### Objetivos Específicos

1. Elaborar micropartículas de PLGA cargadas con pramipexol mediante secado por atomización.
2. Optimizar la obtención de micropartículas mediante un diseño experimental.
3. Caracterizar las micropartículas.
4. Evaluación *in vitro* de las micropartículas mediante cinética de liberación de pramipexol y su adecuación a modelos cinéticos conocidos.
5. Desarrollar y validar metodología analítica HPLC para la cuantificación de pramipexol en matriz biológica.



### 3 Hipótesis

Micropartículas biodegradables de pramipexol obtenidas por la técnica de secado por atomización, tienen una liberación controlada y predecible del principio activo por un periodo prolongado.



## 4 Metodología

### 4.1 Materiales y reactivos

- Diclorhidrato de pramipexol 97%. Pure Scientific Inc.; USA.
- Diclorhidrato de pramipexol, estándar primario 99,8%. USP; USA.
- Pramipexol base 95%. Pure Scientific Inc.; USA.
- PLGA 50/50, Resomer 502®. Evonik; Germany.
- Poli-vinil-alcohol PM 30.000-70.000. Sigma-Aldrich; USA.
- Clorhidrato de lidocaína. Donada por el laboratorio de tecnología farmacéutica, UdeC.
- Cloruro de sodio, EMSURE®. Merck; Germany.
- Cloruro de potasio, EMSURE®. Merck; Germany.
- Fosfato monohidrogenado disódico, EMSURE®. Merck; Germany.
- Fosfato dihidrogenado potásico, EMSURE®. Merck; Germany.
- Ácido clorhídrico 0,1 M Tritrisol®. Merck; Germany.
- Hidróxido de sodio 0,1 M Tritrisol®. Merck; Germany.
- Ácido fórmico, EMSURE®. Merck; Germany.
- Acetonitrilo puro, LiChrosolv®. Merck; Germany.
- Metanol puro, LiChrosolv®. Merck; Germany.
- Cartuchos de extracción en fase sólida "OASIS HLB" 1 mL. Waters; USA.
- Micropipetas 10-100 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL. Gilson; France.
- Filtros de membrana de 0,42 µm PVDF. Millipore; USA.
- Filtros jet jeringa 0,42 µm PVDF. RePhile; USA.
- Jeringa de 1, 3, 5 y 10 mL. Nipro; USA.
- Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL "Falcon®". Corning; USA.

- Columna cromatográfica Purospher® STAR RP-8e. 125-4, 5 µm. Merck; Germany.
- Columna cromatográfica LiChrospher® 100 RP-18. 250-4, 5 µm. Merck; Germany.
- Columna cromatográfica LiChrospher® 100 CN. 125-4, 5 µm. Merck; Germany.
- Columna cromatográfica Kromasil 100-5 SIL. 250-4,6, 5 µm. AkzoNobel; Sweden.
- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-Phenyl. 150-4,6, 5 µm. Agilent Technologies; USA.
- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-CN. 150-4,6. Agilent Technologies; USA.
- Columna cromatográfica Supelcosil™ ABZ+Plus. 250-10, 5 µm. Supelco; USA.
- Columna cromatográfica MultoHigh 100 RP18. 150-4,6. CS-Chromatographie; Germany.
- Cámara de vacío para extracción en fase sólida.
- Bomba de vacío.
- Agua Nanopura.



## 4.2 Equipos

- Mini spray dryer Buchi “B-290”. Buchi; Switzerland.
- Espectrofotómetro Cary® 50-Conc. Varian; USA.
- Cromatógrafo HPLC-UV Shimadzu “Prominence”. Shimadzu Corp.; Japón.
- Cromatógrafo HPLC-MS Shimadzu “Nexera X2”. Shimadzu Corp.; Japón.
- Calorímetro diferencial de Barrido “DSC 131 evo”. Setaram; Caluire, Francia.
- Espectrofotómetro infrarrojo “Interspec 200-X”. Interspectrum; Estonia.
- Celda ATR “MIRacle ATR accesory”. Pike Technologies; USA.
- Difractómetro de rayos X “D8 Endeavor”. Bruker; USA.
- Baño termostatzado “Wisebath® WSB-18”. DAIHAN Scientific; Korea.
- Purificador de agua MilliQ “Purelab® Classic”. ELGA; USA.
- Centrífuga “Centrifuge 5702”; Eppendorf; Germany.
- Homogeneizador de alta velocidad “Ultraturrax® T-25 digital. IKA; USA.
- Agitador magnético “Mr. Hei-Standard”. Heidolph; Germany.
- Microscopio óptico “Zeiss Primostar”. Carl Zeiss, Germany.
- Cámara fotográfica “EOS Rebel T3”. Canon; Japón.
- Microscopio electrónico de barrido “JEOL JSM-6610LV”. JEOL; USA.
- Equipo de difracción laser “Microtrac® S3500”. Microtrac; USA.
- Equipo de difracción laser “Zetasizer Nano ZS90”. Malvern; UK.

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Elaboración micropartículas de PLGA mediante secado por atomización

En este trabajo se prepararon micropartículas mediante secado por atomización en un equipo Büchi mini spray dryer “B-290”. Se realizaron pruebas preliminares considerando como punto de partida tres formulaciones: emulsión, solución y suspensión (Figura 10). Se consideró el rendimiento de producción (RP) como criterio inicial para evaluar las formulaciones ensayadas.



Figura 10: Esquema resumido para la obtención de micropartículas mediante secado por atomización. Fuente: elaboración propia.

A continuación, se detalla la preparación de cada una de las formulaciones de partida. El polvo final obtenido fue recuperado desde el equipo y pesado para calcular su RP y luego almacenado en un desecador bajo refrigeración.

## **1. Emulsión**

### **a. Emulsión doble (W/O/W)**

Se intentó adaptar el método desarrollado por Fuentes y cols. (2014) <sup>(132)</sup>, utilizando un esquema estándar de atomizado, pero variando las cantidades de los componentes del producto a atomizar. La primera emulsión se formó mezclando 1 mL de diclorometano (DCM) con el polímero disuelto en 100 µL de agua que contenía 20 mg de diclorhidrato de PMX (DPMX) que fue emulsionado a 14.000 RPM durante 2 minutos con un “Ultraturrax® T18 digital”. La emulsión W/O resultante fue transferida a un vaso de precipitado que contenía una solución de poli-vinil-alcohol (PVA) a concentración variable para estabilizar la segunda emulsión. Esta mezcla se homogenizó a 8000 RPM y luego fue secada por atomización.

### **b. Emulsión O/W**

Se disolvieron 400 mg de PLGA en 1 mL de DCM mediante un vortex, luego se disolvieron 40 mg de pramipexol base (BPMX) en la solución polimérica con la ayuda de un vortex y luego con ultrasonido. Dicha solución fue adicionada sobre 10 mL de solución de PVA (concentración variable) y emulsionada mediante Ultraturrax® a 5.800 rpm durante 1 min. Se obtuvo una emulsión O/W que luego fue secada por atomización.

### **c. Emulsión W/O**

20 mg de DPMX fueron disueltos en 1 mL de una solución de PVA al 0,5 %. Esta solución fue emulsionada mediante Ultraturax® a 8.000 rpm durante 2 minutos en 20 mL de una solución de PLGA (5 % p/v). Se obtuvo una emulsión W/O que luego fue secada por atomización.

## **2. Suspensión**

Se disolvieron 1000 mg de PLGA en 20 mL de DCM mediante un vortex, luego se dispersaron 20 mg de DPMX en la solución polimérica mediante agitación en vortex. Se obtuvo una suspensión que luego fue secada por atomización.

## **3. Solución**

Se disolvió el PLGA (1500 mg - 400 mg) en DCM (10 mL – 25 mL), posteriormente se disolvió el BPMX en la solución polimérica con la ayuda de un agitador vortex. Se obtuvo una solución que luego fue secada por atomización.

### 4.3.2 Optimización de la obtención de micropartículas mediante un diseño experimental

Una vez que se fijaron los parámetros de formulación y de proceso en los ensayos previos, se procedió al planteamiento del diseño experimental, que consideró 2 variables de proceso: temperatura de entrada y velocidad de alimentación. Se mantuvieron fijas las siguientes variables:

- Flujo de aire: en los ensayos previos, a medida que este disminuye, se generaron agregados compactos de polímero fuertemente adheridos a la superficie del ciclón del equipo, lo que llevó a una fuerte disminución del RP. Este quedó ajustado al valor 601 L/h y se vigiló que se mantuviera constante durante todos los experimentos.
- Aspiración: se observó que disminuyéndola se producían agregados compactos de polímero en el ciclón y el RP disminuía de manera drástica. La aspiración se ajustó al 100% en todo el desarrollo del diseño experimental.

A cada variable se le asignaron 5 niveles de variación. En la tabla 3 se recogen los niveles codificados y reales de las variables utilizadas en el diseño experimental.

Tabla 3: Niveles codificados y reales de las variables del diseño para la optimización de micropartículas de BPMX. Fuente: elaboración propia.

Niveles de variación	Temperatura de entrada (° C)	Velocidad de alimentación (%)
-1,414	45	5
-1	48	7
0	55	13
1	62	18
1,414	65	20

Los diferentes niveles de variación en sus distintas combinaciones dieron lugar a un bloque de 10 experimentos que fueron realizados por duplicado. Las formulaciones fueron preparadas de acuerdo a la metodología descrita en los ensayos previos.

Preliminarmente, se evaluó la morfología y tamaño de las micropartículas de las diferentes formulaciones del diseño mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, las formulaciones fueron sometidas a un ensayo de cesión, para evaluar su comportamiento como sistemas de liberación controlada.

En cuanto a las respuestas medidas se seleccionó: tamaño promedio de partícula ( $\mu\text{m}$ ) ( $Y_1$ ), eficacia de encapsulación (%) ( $Y_2$ ) y el rendimiento del proceso (%) ( $Y_3$ ).

Al terminar los experimentos, las formulaciones obtenidas fueron analizadas obteniéndose información de las 3 respuestas medidas. Para esto se utilizó el software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.05, donde se obtuvo el comportamiento para cada factor y las interacciones entre ellos que dieron lugar al gráfico de superficie de respuesta mostrado en los resultados. Además, se realizaron diagramas de Pareto, gráficos de interacciones y gráficos de efectos principales, con el fin de determinar qué factor o factores influyen significativamente en cada respuesta.

### 4.3.3 Caracterización de las micropartículas.

#### 4.3.3.1 Eficacia de encapsulación (%EE) y carga

La carga y la %EE se calcularon utilizando las siguientes relaciones (ecuaciones 7 y 8):

$$Carga = \frac{PMX \text{ pesado (mg)}}{PLGA \text{ pesado (mg)} + PMX \text{ pesado (mg)}}$$

*Ecuación 7: cálculo de la carga de BPMX en micropartículas de PLGA (también se puede representar de forma porcentual multiplicando el valor por 100). Adaptada desde: WJPPS;2016;5(3);543-566.*


$$\%EE = \frac{Carga \text{ encontrada}}{Carga \text{ teórica}} * 100$$

*Ecuación 8: cálculo del %EE de PMX en micropartículas de PLGA. Adaptada desde: WJPPS;2016;5(3);543-566.*

Para determinar la cantidad de fármaco encapsulado, este fue extraído desde las micropartículas y luego cuantificado por espectrofotometría UV.

La cuantificación del fármaco desde las micropartículas fue realizado mediante un método previamente validado por Fuentes y cols. (2014) <sup>(132)</sup>. Brevemente, se pesaron aproximadamente 20 mg de micropartículas que fueron depositadas en un tubo falcon de 15 mL, a continuación, se agregaron 3 mL de DCM para romper las micropartículas. El tubo fue agitado en un vortex por 3 minutos. Luego, se agregaron 3 mL de ácido fórmico al 0,1 % v/v y se agitó nuevamente en vortex durante 3 minutos. Se extrajo el sobrenadante (se reemplazó en el tubo con 3 mL de ácido fórmico al 0,1 % v/v) y se adicionó a un matraz aforado de 50 mL. Este procedimiento se repitió dos veces más. Con los tres volúmenes extraídos de sobrenadante se aforó el matraz con

ácido fórmico al 0,1 % v/v. También se preparó un blanco con micropartículas blanco (sin fármaco), con las que se ajustó a cero la línea base del equipo antes de leer las muestras en un espectrofotómetro “Cary® 50” a 262 nm. Las muestras se leyeron 3 veces anotando las absorbancias obtenidas en la lectura y calculando por interpolación en la curva de calibración los resultados obtenidos.

### **4.3.3.2 Tamaño y morfología**

Este apartado se ve en conjunto ya que la observación al microscopio de las partículas permite definir la morfología y analizar el tamaño de estas.

#### **4.3.3.2.1 Microscopía óptica**

En primera instancia, el tamaño de partícula fue medido mediante microscopía óptica, con el objetivo de tener una visión general del tamaño y aspecto de las micropartículas. Se utilizó un microscopio óptico “Zeiss Primostar” acoplado a una cámara fotográfica “EOS Rebel T3” que permite capturar imágenes. Esta prueba se llevó a cabo en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. En un portaobjeto se depositó una pequeña cantidad de micropartículas que fueron cubiertas con un cubreobjetos para luego ser visualizadas en el microscopio óptico, se llevaron a un aumento que permitiera observar de buena manera las partículas de forma individual y se capturaron varias imágenes. Mediante el uso del software AxioVision®, se midió un mínimo de 100 partículas por muestra a las

que se les calculó el promedio y su desviación estándar. Los datos fueron ingresados luego al software estadístico Statgraphics® para su procesamiento posterior.

#### **4.3.3.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La exploración mediante SEM ayuda a la evaluación de la forma física de las micropartículas mediante la revisión de la superficie, forma, tamaño y estado de agregación entre los distintos lotes revisados, siendo deseable encontrar partículas lisas, esféricas, de tamaño similar, individualizadas y poco agregadas entre ellas. Se utilizó un microscopio electrónico “JEOL JSM-6610LV” ubicado en el Centro de Biomateriales y Nanotecnología (CBN) de la Universidad del Bio-Bio. Las micropartículas fueron fijadas al porta-muestra del microscopio, para luego realizar el metalizado de estas con oro durante 20 segundos. Posteriormente, las muestras fueron debidamente rotuladas e ingresadas al equipo para comenzar la exploración. Se revisaron las siguientes muestras:

- Micropartículas blancas
- Formulaciones obtenidas desde el diseño experimental: DDE 2, DDE 4, DDE 5, DDE 7, DDE 8 y DDE 10.
- Optimizadas

Se revisó: la superficie de las partículas, su forma, estado de agregación y el tamaño con respecto a las que le rodean.

#### **4.3.3.2.3 Difracción láser**

Otra determinación de tamaño fue realizada mediante la técnica de difracción láser en un equipo modelo “Microtrac® S3500”, que puede entregar datos estadísticos según el tipo de tamaño que se mida. Este análisis se realizó en el Laboratorio ASIF, Facultad de Ingeniería en la Universidad de Concepción. Una pequeña cantidad de muestra fue depositada en un tubo eppendorf y posteriormente dispersada en agua destilada. Para mejorar la dispersión de las micropartículas en agua, se utilizó una sonda de ultrasonidos durante 5 min. Luego de esto, el equipo analizó la muestra por quintuplicado y entregó los datos solicitados mediante el software “Microtrac Flex”. El índice de refracción utilizado fue de 1,51 para todas las muestras analizadas, el software entregó histogramas y frecuencias acumuladas para cada tipo de diámetro medido que fueron 3: volumen, número y área. Se midieron:

- Micropartículas blancas en condiciones optimizadas.
- Diseño experimental completo (1 a 20).
- Formulación optimizada.

#### **4.3.3.3 Potencial zeta**

El potencial zeta de las muestras fue medido en un “Zetasizer Nano ZS90” en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Una muestra de micropartículas fue dispersada con agua nanopura y traspasada a una celda capilar DTS1070. La muestra se dejó equilibrar durante 2 min,

para luego realizar la medida. Se obtuvo una medida promedio de la muestra y su gráfico de distribución de potenciales. Fueron analizadas las siguientes muestras:

- Formulación optimizada 1.
- Formulación optimizada 2.
- Formulación optimizada 3.

### **4.3.3.4 Interacciones moleculares**

#### **4.3.3.4.1 Difracción de rayos X**

El análisis de las muestras se realizó en un difractómetro de rayos X “D8 Endeavor” en el Instituto de Geología Económica Aplicada (GEA) de la Universidad de Concepción. La muestra en polvo se depositó en un contenedor acrílico con una hendidura de 10 mm, donde el polvo se distribuyó homogéneamente en todo el espacio disponible del contenedor que luego fue insertado en el equipo de difracción de rayos X. El análisis quedó fijado entre 5 y 20  $2\theta$  a una velocidad de  $1^\circ/\text{min}$ . Se midieron las siguientes muestras:

- BPMX.
- PLGA.
- Mezcla física BPMX/PLGA 50/50.
- Mezcla física BPMX/PLGA carga teórica.
- Micropartículas blancas.

- Formulación optimizada.

Luego del análisis la información fue colectada y graficada en Microsoft Excel, donde se generó una representación de intensidad vs  $2\theta$  para luego hacer una comparación entre los gráficos obtenidos, en la búsqueda de similitudes y discrepancias entre ellos.

#### **4.3.3.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El análisis fue llevado a cabo en un calorímetro DSC 131 evo en el Laboratorio del Dr. Javier Morales Montecinos, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Se pesó aproximadamente 5 mg de muestra seca, que fue acondicionada en cápsulas de aluminio para su análisis en el equipo DSC. Se analizaron las siguientes muestras:

- BPMX.
- PLGA.
- Mezcla física BPMX/PLGA 50/50.
- Mezcla física BPMX/PLGA carga teórica.
- Mezcla física BPMX/PLGA carga práctica.
- Micropartículas blancas.
- Formulaciones obtenidas desde el diseño experimental: DDE7 y DDE10.
- Formulación optimizada.

Los barridos se hicieron desde temperatura ambiente 25-30 °C hasta 200 °C con una velocidad de 10 °C/min y luego un periodo de enfriamiento del equipo antes de analizar la siguiente muestra. Se obtuvieron los gráficos de flujo de calor vs temperatura que fueron contrastados entre ellos.

#### **4.3.3.4.3 Espectroscopía infrarroja (FTIR)**

Este estudio se realizó en un espectrofotómetro infrarrojo Interspec 200-X con una celda de atenuancia total reflejada “MIRacle ATR accesory”, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Una cantidad adecuada de muestra seca fue puesta en la celda ATR y luego sellada. La lectura se hizo mediante un barrido espectral entre 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ , repetido 16 veces. Luego del barrido, se graficó un interferograma en el PC colector de datos y este se transformó a transmitancia para ser interpretado más fácilmente. Se utilizó como blanco la celda vacía y se restó a los espectros obtenidos. Se analizaron las siguientes muestras:

- BPMX.
- PLGA.
- Micropartículas blancas.
- Formulación optimizada.

#### **4.3.4 Evaluación *in vitro* de las micropartículas mediante cinética de liberación y su adecuación a modelos cinéticos conocidos**

##### **4.3.4.1 Evaluación de cinética de liberación.**

Se pesaron aproximadamente 30 mg de micropartículas por muestra y se transfirieron a tubos falcon de 15 mL, a los que se les agregó 15 mL de buffer fosfato isotónico pH 7,4. Los tubos se dejaron en un baño de agua termostatizado “Wisebath® WSB-18” a 37 °C bajo agitación de 100 RPM por todo el tiempo que duró la cinética de liberación. Luego de transcurrido el tiempo estipulado para la toma de muestra, los tubos se sacaron y se centrifugaron por 5 minutos a 4.400 RPM, luego se extrajo una alícuota de 5 ml que fue depositada en un matraz aforado de 10 mL para finalmente llevarlo a su volumen final con buffer fosfato. Luego de esto, se repuso el volumen tomado con buffer fosfato y los tubos fueron devueltos al baño termostatizado hasta la próxima toma. Este procedimiento se realizó a los siguientes tiempos: 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 18 días, 21 días, 25 días y 30 días. Las muestras fueron filtradas con filtros de PVDF 0,45 µm directamente a la cubeta y luego leídas por espectrofotometría a 262 nm. Los datos fueron tabulados y procesados en Excel. En la tabla 4 Se indica la composición del buffer fosfato utilizado para los experimentos de liberación:

Tabla 4: Composición de buffer fosfato isotónico pH 7,4. Adaptado desde *Meth Mol Biol*;2017;1586;83-126.

Componente	Cantidad g/L
NaCl	8,0
KCl	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,42
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,24

#### 4.3.4.2 Adaptación a modelo matemático existente

Los datos obtenidos de las cinéticas de liberación de fármaco desde la formulación optimizada fueron introducidos al software DDSolver para realizar un análisis de ajuste, probando distintos modelos de liberación para cada gráfico obtenido y uno que englobe el promedio de las formulaciones testeadas y sus duplicados (n=6). Se obtuvieron datos de ajustes representados por el valor  $r^2$  que fue el mayor discriminante entre modelos. Se probó el ajuste a modelo cinético de: orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hopfenberg, Hixson-Crowell, Baker-Londsdale y Peppas-Sahlin, con el objetivo de encontrar el mejor ajuste. El software entregó gráficas individuales y promediadas de los distintos modelos probados, su coeficiente de correlación y las constantes de la ecuación que representan al modelo. Para efectos de resultados solo se presentará el modelo que tuvo mejor correlación de todos los probados.

## 4.4 Desarrollo y validación de metodología analítica HPLC para la cuantificación de pramipexol en matriz biológica

### 4.4.1 Trabajo preliminar

Como primer paso, se llevó a cabo un trabajo preliminar en un cromatógrafo HPLC Shimadzu Prominence, para luego trasladarlo a un equipo de similares características asociado a un detector de masas y realizar la validación del método analítico.

Se probaron diversas columnas para llegar al método que se validó en las secciones posteriores, para este cometido se probaron columnas cromatográficas de diversas terminaciones químicas a la búsqueda de la mejor (tabla 6).

Tabla 5: Columnas probadas para determinar PMX en fluidos biológicos. Fuente: elaboración propia.

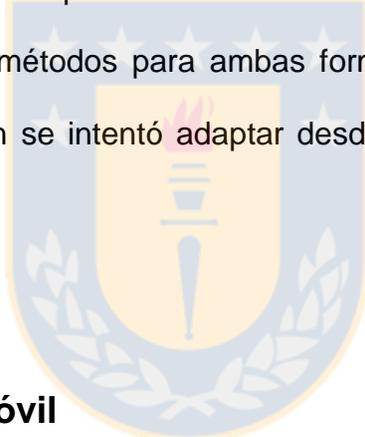
<b>C8</b>	Purospher® STAR RP-8e. 125-4, 5 µm.
<b>C18</b>	LiChrospher® 100 RP-18. 250-4, 5 µm y MultoHigh 100 RP18. 150-4,6.
<b>Ciano</b>	LiChrospher® 100 CN. 125-4, 5 µm y Zorbax Eclipse XDB-CN. 150-4,6.
<b>Silica</b>	Kromasil 100-5 SIL. 250-4.6, 5 µm.
<b>Fenil</b>	Zorbax Eclipse XDB-Phenyl. 150-4,6, 5 µm.
<b>Alquilamida</b>	Supelcosil™ ABZ+Plus. 250-10, 5 µm.

Las fases móviles probadas contenían en su mayoría mezclas de agua con un modificador orgánico como metanol o acetonitrilo, y con ajuste de pH.

En bibliografía se describen diversos métodos HPLC para la cuantificación de PMX en plasma <sup>(133) (134) (135) (136) (137) (138)</sup>. Las bajas dosis en que se utiliza el fármaco requieren de una detección altamente sensible que se alcanza mediante detección por espectrometría de masas (HPLC-MS) y electroquímica <sup>(139)</sup>. También, se reportan

métodos para otras matrices biológicas tales como orina y tejidos biológicos, utilizando detección ultravioleta (UV) y HPLC-MS respectivamente <sup>(139) (140)</sup>.

Otro punto importante fue desarrollar una metodología extractiva para el PMX y el IS que se encuentra en la matriz. En investigaciones ya realizadas, el fármaco y el estándar interno se recuperan mediante extracción líquido-líquido desde la fase acuosa a un solvente orgánico para luego evaporarlo y reconstituirlo en la fase móvil de trabajo <sup>(133) (134) (135) (136) (137) (139)</sup>. Otra alternativa es la extracción en fase sólida (SPE), donde se utilizan columnas de pequeño volumen (1mL) y la molécula de interés queda retenida en la columna hasta que se recupere con un solvente adecuado <sup>(138) (141)</sup>. En otras investigaciones se describen métodos para ambas formas de extracción con buenos resultados, por lo que también se intentó adaptar desde bibliografía algún método de los 2 expuestos.



#### **4.4.2 Elección de fase móvil**

Para la cromatografía en fase reversa se trabaja normalmente con solventes de alta polaridad como el metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano (este último posee el menor uso de los 3 por su toxicidad) sumada al agua que dan lugar a una gran variedad de fases móviles <sup>(142)</sup>. Otro recurso importante es la modulación de pH que, a pesar de no ser obligatoria, puede tener una incidencia importante en el análisis <sup>(142)</sup>.

La fase móvil de trabajo se eligió probando diversas mezclas acuosas de dos solventes orgánicos: metanol y acetonitrilo. El pH de la fase móvil fue ajustado con

modificadores de pH, como: acetato de sodio, acetato de amonio, formiato de amonio, ácido acético y ácido fórmico. Finalmente, la composición de la fase móvil fue de metanol:ácido fórmico 0,1 % v/v en proporción 35:65 % v/v. La fase móvil fue filtrada al vacío a través de filtros de membrana de 0,42  $\mu\text{m}$  PVDF, y desgasificada mediante ultrasonido por 20 min antes de su uso.

#### 4.4.3 Elección de estándar interno

El estándar interno (IS) se define como una molécula similar a la molécula de trabajo, donde esta se carga junto al analito en cantidades constantes y atraviesa el procesamiento de muestra hasta ser leída en el equipo. La ventaja de poseer un IS radica en la corrección de errores sistemáticos y aleatorios que se podrían dar en el proceso, mejorando la cuantificación de la muestra y entregando una mayor correlación de datos en la mayoría de los casos <sup>(143)</sup>. Para efectos de cuantificación, en el eje Y se representa el cociente del analito y el IS. La elección del IS se hizo teniendo en cuenta los siguientes requisitos:

- Ser soluble en el medio de trabajo (fase móvil, o solvente de trabajo).
- Propiedades fisicoquímicas similares al analito: peso molecular, pKa, logP y solubilidad (parámetro útil a la hora de extraer el IS).
- Eluir con completa resolución respecto al PMX

En bibliografía se han utilizado estándares internos como quetiapina, tamsulosina, BHT-920, entre otros <sup>(133)</sup> <sup>(136)</sup> <sup>(138)</sup>. La no disponibilidad de estas moléculas obligó a revisar las propiedades fisicoquímicas de los estándares en existencia y así elegir uno mediante comparación de estos con las propiedades del PMX.

#### **4.4.4 Elección de un método de Extracción**

Después de evaluar diferentes métodos de extracción, sin obtener buenos resultados, se plantea usar la técnica de extracción en fase sólida (SPE), de acuerdo a una metodología obtenida desde literatura <sup>(138)</sup>. La técnica de SPE ofrece una serie de ventajas respecto a otras técnicas de extracción, como: mayor poder de selectividad al eluir la muestra, esta eluye con menos interferentes desde el cartucho, y mayor rapidez para obtener resultados en comparación a la extracción líquido-líquido <sup>(138)</sup>.

Este trabajo se llevó a cabo utilizando un esquema normalizado (figura 12). En primer lugar, se mezclaron 250  $\mu$ L de suero de rata con 250  $\mu$ L de amoniaco al 25 % para llevar al PMX a un estado no ionizado, luego se agregaron 250  $\mu$ L de solución SI 800 ng/mL y 250  $\mu$ L de agua nanopura. La muestra fue mezclada en vortex durante 1 min. De esta mezcla se tomaron 500  $\mu$ L y se agregaron a una columna de SPE Oasis® de 1 mL, que previamente había sido acondicionada con 1 mL de metanol y luego con 1 mL de agua nanopura. Tanto el fármaco como el SI, luego de ser retenidos en la columna, fueron eluidos mediante 1 mL de fase móvil, que luego fue filtrada e inyectada al HPLC <sup>(137)</sup>. El esquema final se detallará en los resultados obtenidos. Indicar el detalle de la técnica y la columna usada.

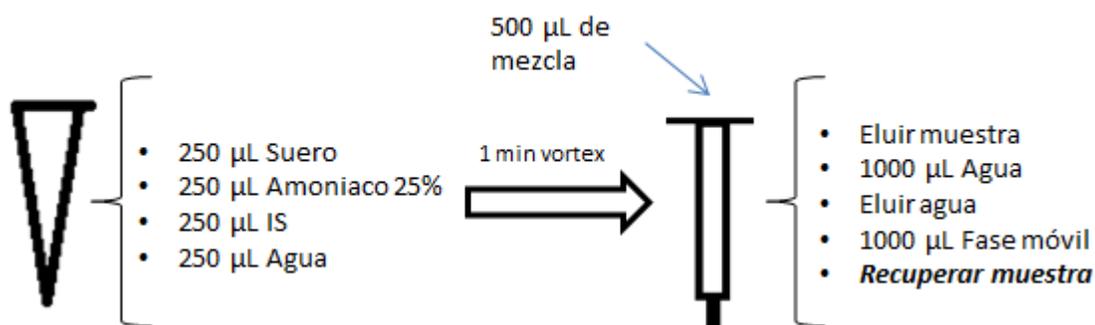


Figura 11: Esquema de SPE para PMX + IS. Fuente: elaboración propia.

#### 4.4.5 Validación del método analítico

La validación e implementación del método fue llevada a cabo en el Laboratorio de Estudios Avanzados en Fármacos y Alimentos (LEAFA), Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Se utilizó un HPLC “Nexera X2” detallado en la tabla 6:

Tabla 6: Configuración HPLC-MS usado en la validación del método desarrollado. Fuente: elaboración propia.

Parte	Modelo
Bomba	LC-30AD
Autosampler	SIL-30AC
Horno	CTO-20AC
Detector UV	SPD-M20A
Detector MS	LCMS-8030
Interfaz	CBM-20A

El software utilizado para el manejo y procesamiento de datos fue LabSolutions®. La configuración del espectrómetro de masas se hizo por ionización positiva mediante monitoreo de reacciones múltiples (multiple reaction monitoring; MRM) que permite una mayor selectividad para el analito y el IS, pero a su vez

disminuye la sensibilidad del método. Se descartó la configuración de una sola fragmentación molecular (selected ion-monitoring; SIM), ya que se encontraban interferentes en la elución del analito. Según revisión bibliográfica se encontraron las 2 fragmentaciones más abundantes para PMX e IS, que son  $m/z$  212- $\rightarrow$ 153 y 234- $\rightarrow$ 86, respectivamente. Estas se programaron en los tiempos de elución de cada analito <sup>(133)</sup> <sup>(144)</sup>. Se trabajó con la interfase de ionización mediante electrospray (electrospray ionization; ESI) y un analizador de triple cuádrupolo que separa los iones, los vuelve a fragmentar y separa finalmente, obteniendo la fragmentación objetivo, siendo altamente selectivo y útil en matrices complejas <sup>(145)</sup>.

También se obtuvieron datos en tiempo real de las condiciones de trabajo, lo que ayudó a verificar el buen comportamiento del equipo durante el trabajo experimental (tabla 7):

*Tabla 7: Condiciones del HPLC-MS obtenidas en tiempo real mediante el software de operación. Fuente: elaboración propia.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Interfase	ESI
Flujo de gas nebulizante	3 L/min
Flujo de gas de secado	15 L/min
Voltaje de interfase	4,5 kV
Corriente de interfase	0,1 $\mu$ A
DL T°	250 °C
T° bloque de calor	400 °C
Voltaje de conversión de dinodo	6 kV
Voltaje de detector	1,84 kV
Vacío IG	1,9 e-004 Pa
Vacío PG	9,5 e+0,01 Pa
CID Gas	240kPa.

Como gas nebulizante se utilizó nitrógeno proveniente desde un generador independiente del cromatógrafo. Como gas de colisión para las fragmentaciones del modo MRM se utilizó argón.

La validación fue llevada a cabo según las directrices de validación emitidas por la ICH (International Conference of Harmonisation) para metodologías bioanalíticas. Los criterios de aceptación se encuentran descritos en cada parámetro por separado <sup>(146)</sup>.

#### **4.4.5.1 Evaluación del “efecto matriz” sobre PMX e IS**

La primera fase de la validación se llevó a cabo evaluando el efecto matriz que puede ejercer el suero sobre las muestras. En espectrometría de masas se evalúa por un fenómeno específico llamado “*ion suppression*”, donde el analito compite contra las demás moléculas presentes en la matriz por ionizarse, lo que puede reducir la señal de la muestra y/o alterar los demás parámetros analíticos como la precisión y exactitud del método <sup>(147)</sup>. El efecto matriz se evalúa construyendo curvas de calibración en matriz y solución analítica para luego evaluarlos mediante un test estadístico discriminativo <sup>(148)</sup>. Es importante considerar que al preparar el analito en su matriz, esta debe estar presente en la mayor cantidad posible del volumen final para que se pueda apreciar su influencia en la muestra y se deben usar los mismos estándares para la curva analítica y en matriz.

Se prepararon 2 curvas de calibración (sol. analítica y matriz) con 3 puntos: nivel de concentración bajo, medio y alto, que fueron inyectadas por duplicado ( $n = 2$ ) y

medidas sus áreas para luego construir las curvas de calibración. A continuación, se detalla la preparación de las muestras en matriz (tabla 8):

Tabla 8: Preparación de muestras en matriz de trabajo para evaluar “efecto matriz”. Fuente: elaboración propia.

	<b>X<sub>0</sub></b> ( 0 ng/mL)	<b>X<sub>1</sub></b> (25 ng/mL)	<b>X<sub>2</sub></b> (250 ng/mL)	<b>X<sub>3</sub></b> (500 ng/mL)
<b>PMX*</b> (μL)	0	25	25	50
<b>IS**</b> (μL)	25	25	25	25
<b>FM</b> (μL)	125	100	100	75
<b>Matriz</b> (μL)	850	850	850	850
<b>Total</b> (μL)	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

\*Para PMX se prepararon 2 soluciones, una de 1 μg/mL (X<sub>1</sub>) y otra de 10 μg/mL (X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub>)

\*\*El IS fue una solución 10 μg/mL en todas las muestras.

Se puede observar que el 85 % de la composición de las soluciones corresponde a la matriz, por lo que cumple con el requerimiento solicitado. Luego de prepararse y agitarse mediante vortex por un pequeño periodo de tiempo, estas fueron pasadas por filtros de membrana 0,42 μm y depositadas en un vial de cromatografía para finalmente inyectarlas al equipo. La preparación de las muestras en fase móvil se detalla en la tabla 9:

Tabla 9: Preparación de muestras analíticas para comparar contra muestras en matriz. Fuente: elaboración propia.

	<b>X<sub>0</sub></b> (0 ng/mL)	<b>X<sub>1</sub></b> (25 ng/mL)	<b>X<sub>2</sub></b> (250 ng/mL)	<b>X<sub>3</sub></b> (500 ng/mL)
<b>PMX</b> (μl)	0	25	25	50
<b>IS</b> (μl)	25	25	25	25
<b>FM</b> (μl)	975	950	950	925
<b>Total</b> (μl)	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Las muestras fueron preparadas en fase móvil, ya que esta se utiliza para recoger el producto desde la SPE y evita problemas de elución de la misma

(deformaciones de picos cromatográficos, o alteraciones de tiempo de retención). Los resultados obtenidos fueron graficados en área PMX/IS vs concentración del analito para obtener la ecuación de la recta y su  $R^2$ . Estos datos fueron observados a la búsqueda de diferencias entre las curvas de calibración obtenidas.

#### **4.4.5.2 Linealidad**

La linealidad se encuentra definida por la relación que existe entre las señales analíticas medidas (área, alturas, conteos, etc...) de un lote de muestras de concentración conocida, buscando establecer una relación matemática entre todas las concentraciones medidas, que en análisis instrumental suele ser una relación directa (recta). Por lo tanto, esta relación permitiría estimar la concentración de una muestra desconocida con seguridad siempre y cuando esta no escape del intervalo de la recta establecida <sup>(149)</sup>.

La linealidad fue evaluada preparando una curva de calibración de 5 puntos (Tabla 11) por triplicado (n= 15) e inyectados 3 veces. Los datos fueron graficados en función de: área PMX/IS vs concentración del analito obteniéndose la ecuación de la recta y su  $R^2$ . Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución madre haciendo las diluciones respectivas detallada en la tabla 10.

Tabla 10: Preparación de soluciones para curva de calibración de 5 puntos. Fuente: elaboración propia.

Alicuota ( $\mu\text{L}$ )	Solución madre ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Final ( $\text{ng/mL}$ )
250	10	25
500	10	50
1000	10	100
2000	10	200
2500	10	250

A todas las soluciones estándar se les agregó el IS de modo que quedara la concentración de este en 100 ng/mL. Estas soluciones estándar fueron preparadas en matraces aforados de 10 mL, para luego ser filtradas con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y depositadas en un vial de cromatografía. La linealidad fue verificada mediante un análisis estadístico ANOVA, obteniéndose la curva de regresión lineal, coeficiente  $R^2$  y mínimos cuadrados.

#### 4.4.5.3 Precisión instrumental

Este parámetro se caracteriza por hacerse dentro del mismo día, con la misma solución y por el mismo analista evidenciando que el método es reproducible en intervalos cortos de tiempo. La precisión instrumental fue evaluada inyectando una muestra preparada en matriz repetidas veces ( $n= 6$ , mínimo) y observando las variaciones de esta entre inyecciones <sup>(149)</sup>. Se preparó una solución en matriz según el esquema mencionado anteriormente, que corresponde al punto medio de la curva de calibración y se calculó la variación porcentual (% C.V) de esta con una tolerancia máxima del 15 % de variación porcentual entre las 6 inyecciones realizadas. Esta relación se calculó según la ecuación 9.

$$\frac{S.D \text{ Muestras}}{\bar{X} \text{ Muestras}} \times 100 = \% C.V$$

*Ecuación 9: Cálculo de coeficiente de variación porcentual. Dónde: S.D: desviación estándar de las muestras; X: promedio de las muestras leídas. Adaptada desde: Int. Res. J. Pharm.;2013;4(4);39-46.*

#### **4.4.5.4 Repetibilidad y precisión intermedia**

La precisión de un método analítico refiere a la dispersión de los datos de una muestra y la concordancia que hay entre ellos, esto se evalúa mediante la desviación estándar de las muestras analizadas, donde una baja dispersión se asocia a un bajo error aleatorio al momento de procesar la muestra. En la práctica se puede evaluar analizando un lote de muestras de la misma concentración dentro de un mismo día en diferentes niveles, obteniéndose la desviación estándar global para esa concentración que debe respetar los márgenes de tolerancia descritos para este parámetro (precisión)

(149).

Se analizaron muestras preparadas en matriz para 3 niveles de concentración: bajo, medio y alto. Estas fueron preparadas e inyectadas al sistema cromatográfico con el fin de ver la variación de los datos en función del tiempo y la dispersión de los mismos. Las muestras fueron almacenadas de un día para otro en viales eppendorf y refrigeradas para prevenir escapes de solvente evitando variaciones, estas muestras fueron inyectadas en 3 días distintos. Como criterio de aceptación, la % C.V entre muestras debe ser < 15 % en el mismo día y el mismo valor entre los 3 días que se hizo la prueba.

#### 4.4.5.5 Exactitud

La exactitud del método corresponde a la recuperación del analito desde la matriz previo al análisis. Esta representa la cercanía del valor analítico con el “valor nominal” al que se le asocia, siendo ideal recuperar el 100 % de la muestra. Valores pequeños normalmente refieren a una pobre recuperación del analito y valores sobre el 100 %, pueden reflejar que la matriz contiene interferentes que dificultan la cuantificación o que la extracción está mal ejecutada. Los límites de tolerancia en cuanto a recuperación están dados según el orden de concentración a la que se trabaja por lo que esto puede ser variable dependiendo de las necesidades de análisis <sup>(149)</sup>.

Luego de haber generado un protocolo de extracción, este se llevó a la práctica trabajando en 3 niveles (bajo, medio y alto) por triplicado de la curva de calibración. Se evaluó la recuperación inyectando 3 veces cada muestra y se tabularon los resultados obtenidos en función del porcentaje recuperado del analito y el IS. La tolerancia máxima es de un 15% de % C.V entre las 3 muestras del mismo nivel de concentración. También se tomaron los porcentajes de recuperación de los 3 niveles y se calculó el coeficiente de variación general para evaluar la homogeneidad de la extracción a distintos niveles.

#### 4.4.5.6 Límites

Los límites de detección del analito (LOD) y de cuantificación (LOQ) son el punto mínimo al que puede llegar el método siendo esta información confiable. El LOD

específicamente se define como una señal proveniente del equipo que pueda ser distinguida del ruido acusando la presencia del analito en una muestra a diferencia de un blanco que no debería presentar señal, esta no puede ser cuantificada siendo un parámetro puramente cualitativo. Por otro lado, el LOQ es la concentración más baja de analito que se puede detectar con exactitud y seguridad, siendo cualquier otro dato bajo este límite reportado como “traza” <sup>(149)</sup>. Mediante evaluación visual de los cromatogramas blancos y distintas inyecciones de estándares diluidos bajo el punto inferior de la curva, se tantearon los límites de cuantificación y de detección del analito. Cromatogramas de distintas concentraciones de analito fueron impresos para luego medir con regla graduada en centímetros el alto del ruido del equipo y el pico del analito a distintas concentraciones en la búsqueda de las relaciones señal/ruido que cumplieran los criterios anteriormente mencionados. Por medio de proporcionalidad directa, se infirieron las concentraciones a inyectar en el equipo para luego analizarlas y discernir entre los límites. Como aceptación en LOD se requiere que la señal analítica sea aproximadamente 3 veces el tamaño del ruido encontrado en el equipo y en LOQ 10 veces la misma <sup>(146)</sup>.

#### **4.4.5.7 Selectividad**

La selectividad está dada por la respuesta del instrumento al analito, por lo que cualquier señal ajena que apareciese en el momento de la elución del PMX o el IS genera problemas en la cuantificación. Afortunadamente, el trabajo en HPLC-MS

entrega una mayor selectividad que otras técnicas, donde una configuración adecuada del equipo permite niveles altísimos de selectividad <sup>(150)</sup>.

Se ensayaron 2 modos de ionización: SIM y MRM. Se trabajó ejecutando pruebas con ambos métodos y se seleccionó uno para la validación de la metodología analítica usando como criterio el que entregue mayor especificidad ya que este tipo de matrices pueden generar errores de cuantificación. Se utilizó suero de rata como blanco. Como criterio de aceptación no deberían manifestarse señales analíticas en el tiempo de elución del PMX. Esto se comprobó con muestras en modo SIM y MRM.

#### **4.4.6 Utilidad del método**

El método desarrollado y validado fue utilizado para determinar PMX en suero de rata administrado mediante una inyección bolus en una sola oportunidad, con el objetivo de generar un perfil farmacocinético del fármaco.

Este estudio fue llevado en conformidad a la normativa 2010/63/UE de la unión europea, la ley chilena 20.380 en relación a la protección de animales, y la aprobación del comité de bioética de la Universidad de Concepción, siguiendo también el principio propuesto por Russel y Burch de “las 3 R” <sup>(151)</sup> <sup>(152)</sup>.

El estudio farmacocinético fue llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley machos de 8-9 semanas (300-350 g), consistiendo en una inyección subcutánea de DPMX disuelto en suero fisiológico. La dosis utilizada fue de 1mg/kg. Las muestras de sangre fueron extraídas mediante punción cardiaca a: 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas por triplicado (21

ratas en total) para luego ser sacrificadas de inmediato. Las muestras fueron procesadas según la metodología desarrollada. También se utilizó un control de calidad cada 5 inyecciones (100 ng/mL) para corroborar el buen funcionamiento del cromatógrafo. Los datos fueron graficados en concentración (Cp) v/s tiempo (t) y normalizados logarítmicamente para obtener una recta.

Luego de obtener los perfiles cinéticos a través de las muestras se calcularon parámetros farmacocinéticos importantes como: concentración inicial (C<sub>0</sub>), semivida plasmática (t<sub>1/2</sub>), constante de eliminación (K<sub>e</sub>) y área bajo la curva (AUC) <sup>(153)</sup>. Estos parámetros fueron calculados asumiendo una eliminación de primer orden (ecuaciones 10, 11, 12,13 y 14):

Cp<sub>0</sub> (Asumiendo Cp = 0 ng/mL):


$$\text{Log}(Cp) = \text{Log}(Cp_0) - \frac{K_e}{2.303} * t$$

*Ecuación 10: Cálculo de concentración plasmática a tiempo cero. Adaptada desde: Pharmacology: Principles and Practice; Hacker M., Bachmann S., Messer W.; 2009;Academic Press;223.*

K<sub>e</sub> (calculando desde la pendiente):

$$\text{Pendiente} = - \frac{K_e}{2.303}$$

*Ecuación 11: Cálculo de constante de eliminación. Adaptada desde: Pharmacology: Principles and Practice; Hacker M., Bachmann S., Messer W.; 2009;Academic Press;223.*

$t_{1/2}$  (después de obtener  $K_e$ ):

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_e}$$

*Ecuación 12: Cálculo de semivida biológica. Adaptada desde: Pharmacology: Principles and Practice; Hacker M., Bachmann S., Messer W.; 2009;Academic Press;223.*

AUC:

$$AUC = \frac{Cp_0}{K_e}$$

*Ecuación 13: Cálculo de área bajo la curva. Adaptada desde: Pharmacology: Principles and Practice; Hacker M., Bachmann S., Messer W.; 2009;Academic Press;225.*



## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Formulaciones preliminares.

Los resultados conseguidos se abordarán según el orden cronológico de obtención hasta llegar a la formulación que fue optimizada. La figura 12 muestra el esquema con la procedencia de cada formulación, las cuales fueron codificadas con una letra para cada método de preparación, C: emulsión simple W/O; B: emulsión simple O/W; ED: emulsión doble W/O/W; S: suspensión; A y AB: solución, primera y segunda etapa respectivamente. Asimismo se les asignó un número que acompaña a la letra que denota su orden de obtención.

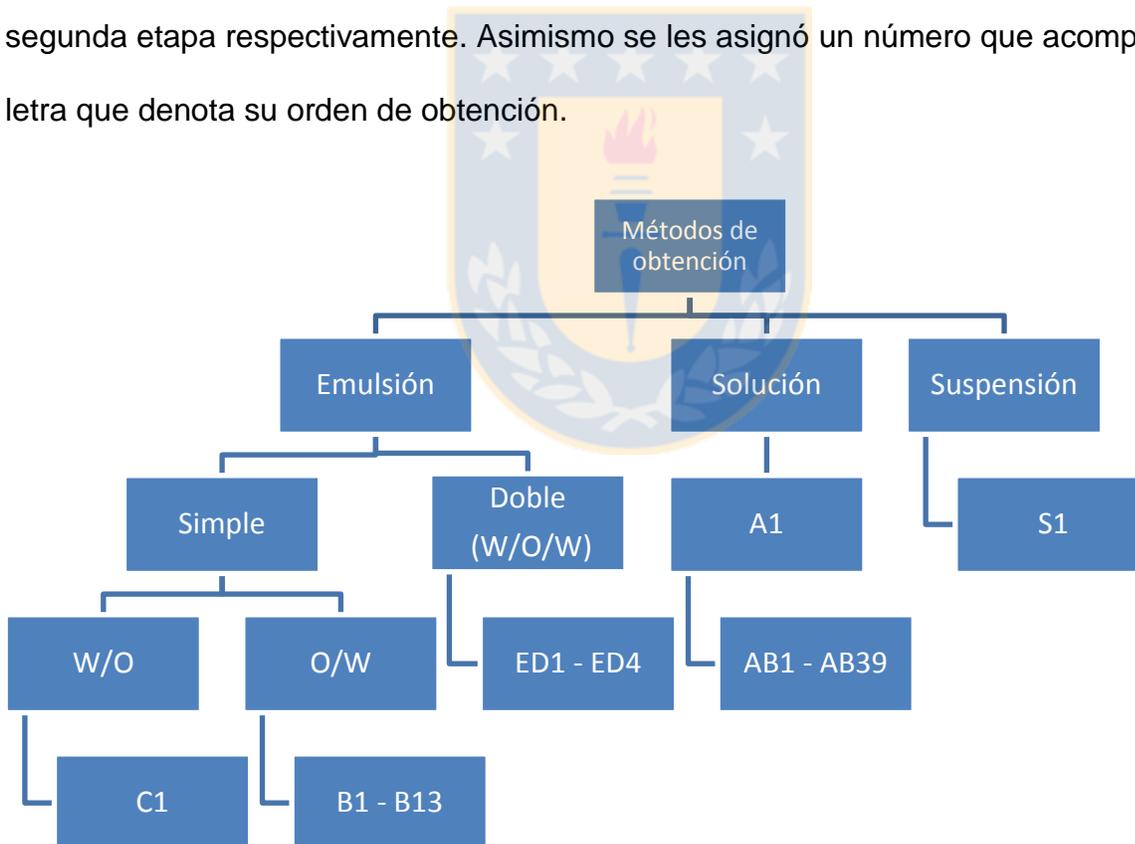


Figura 12: Esquema de producción de micropartículas. Se utilizaron distintos métodos de preparación antes de atomizar en el equipo, generándose una amplia variedad de muestras agrupadas según su obtención. Fuente: elaboración propia.

### 5.1.1 Emulsión W/O/W

Como primer intento se prepararon micropartículas según una metodología de emulsión doble bajo las siguientes condiciones de proceso detalladas en la tabla 11:

Tabla 11: Condiciones iniciales para micropartículas preparadas por emulsión doble W/O/W. Fuente: elaboración propia.

Condición	Valor
Flujo de aire (L/h)	473
Aspiración (%)	85
Alimentación (%)	15
Boquilla (mm)	0,7
Temperatura entrada (°C)	110

La formulación ED1 está adaptada desde el trabajo realizado por Fuentes y cols. (132). A partir de esta se realizaron diferentes modificaciones (tabla 12) con el fin de lograr un alto rendimiento de producción (RP). En la formulación ED2 se duplica la concentración de sólidos totales para optimizar el secado reduciendo la cantidad de fase continua a la mitad. Sin embargo, no se observa un aumento significativo en el RP. Si hay un incremento de la eficacia de encapsulación (EE), que se puede explicar por el aumento en el tamaño de partícula. Debido al pobre resultado anterior respecto al RP, en la formulación ED3 se aumenta tres veces la concentración de sólidos respecto a ED1, obteniéndose un pequeño incremento en el RP y EE. En cuanto al PVA, se adicionó una cantidad fija entre los experimentos ED1-ED3 (100 mg) como parte del protocolo de utilizar las mismas cantidades en los experimentos, salvo el solvente. Finalmente, en la formulación ED4 se aumenta nuevamente el porcentaje de sólidos 6 veces respecto a ED1 y 2,5 veces la concentración de PVA.

Tabla 12: formulaciones de micropartículas obtenidas a partir de una emulsión doble W/O/W. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Fase W <sub>1</sub> *	Fase O**	Fase W <sub>2</sub> ***	Sólidos totales (%)	RP (%)	EE (%)	Tamaño (µm)
ED1	100 µL sol. DPMX 200 mg/mL	200 mg PLGA 1 mL DCM	100 mL sol. PVA 0,1%	0,32	9,2	28,9	5,36 ± 3,72
ED2	100 µL sol. DPMX 200 mg/mL	200 mg PLGA 1 mL DCM	50 mL sol. PVA 0,2%	0,64	9,6	64,0	20,58 ± 10,86
ED3	100 µL sol. DPMX 200 mg/mL	200 mg PLGA 1 mL DCM	30 mL sol. PVA 0,33%	1,00	13,6	79,7	8,53 ± 4,29
ED4	100 µL sol. DPMX 200 mg/mL	800 mg PLGA 1 mL DCM	50 mL sol. PVA 0,25%	1,89	16,7	97,6	8,57 ± 5,88

\* Fase interna acuosa; \*\* Fase oleosa; \*\*\* Fase externa acuosa

Se evaluó la cinética de liberación de la formulación ED4, que fue la que presentó los mejores resultados de EE y RP. Los resultados de ensayo de liberación del fármaco desde las micropartículas se observa en la figura 13.

Como comentario final de las demás formulaciones, se buscó aumentar la concentración de sólidos a atomizar ya que este parámetro en teoría mejora el RP en spray drying, sin embargo el aumentar desde 0,3% a casi un 2% no genera mayor ventaja en la preparación de las micropartículas. En teoría una mayor concentración de sólidos significaría una menor cantidad de solvente que evaporar desde la gota atomizada, también significaría un aumento del tamaño de partícula ya que hay una mayor cantidad de ellas en cada gota teniendo como consecuencia una mejor separación en el ciclón, maximizando el rendimiento (74). Los experimentos ED1 a ED4

muestran tendencias donde el aumento de la cantidad de sólidos genera una mejora en la EE y RP.

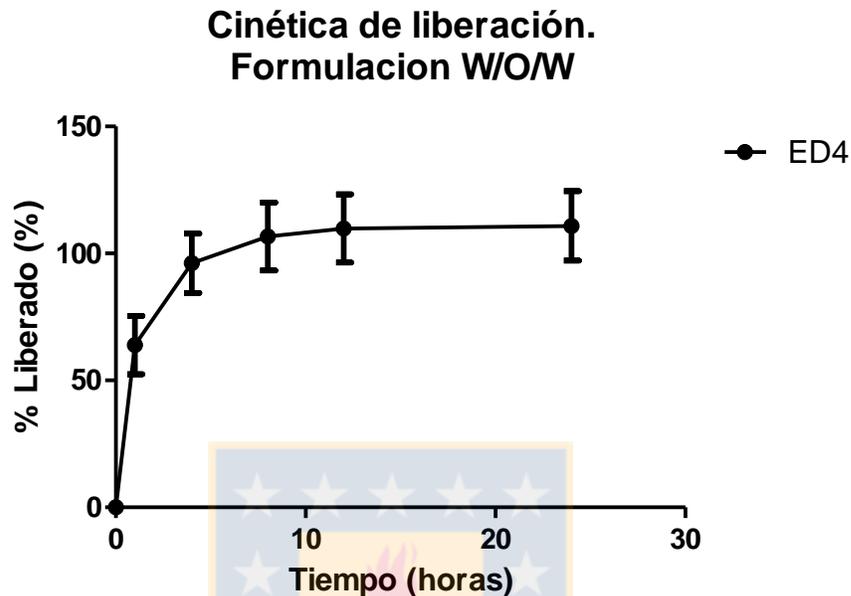
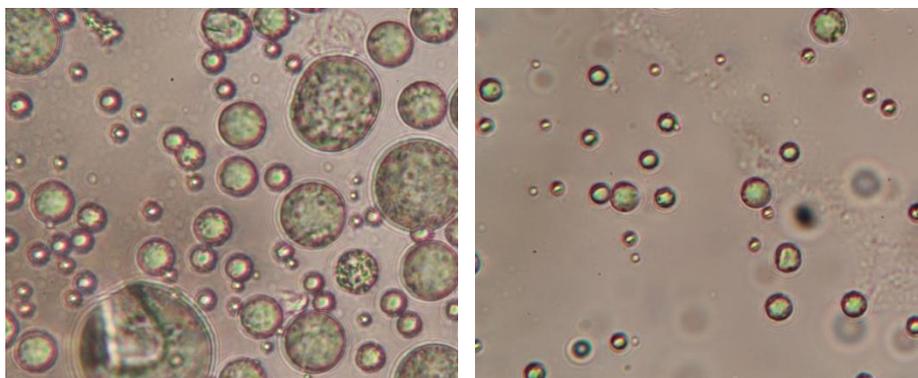


Figura 13: Gráfica de cinéticas de liberación para formulación ED4 en 3 lotes distintos (n=2). Fuente: elaboración propia.

El gráfico muestra una liberación desde las micropartículas casi inmediata, habiéndose liberado prácticamente el 100% del fármaco antes de 15 horas desde el inicio del estudio. El análisis por microscopía óptica (figura 14 y 15) muestra en algunas imágenes lo que podrían ser poros en la superficie de las micropartículas, y que pueden aparecer por el escape violento de agua desde la matriz polimérica, esto debido a la alta temperatura de entrada que se requiere para evaporarla. Este comportamiento estaría alejado del objetivo de la formulación, por lo que se descartó como método de obtención de micropartículas.



Figuras 14 y 15: Imágenes de microscopía óptica obtenidas desde las muestras E4. Fuente: elaboración propia.

### 5.1.2 Emulsión W/O y suspensión

Debido a que no se obtuvieron buenos resultados en RP, EE y liberación *in vitro* en 6.1.1, se plantean dos nuevas formulaciones de partida: una emulsión W/O (C1) y una suspensión (S1). Tanto en la emulsión como en la suspensión, se utilizó DCM como fase externa, por lo cual se bajó la temperatura de entrada a 45 °C para poder evaporar el DCM (T° evaporación: 40 °C) <sup>(78)</sup> (tabla 13).

Tabla 13: Condiciones de proceso para emulsión W/O y suspensión. Fuente: elaboración propia.

Condición	Valor
Flujo de aire (L/h)	473
Aspiración (%)	85
Alimentación (%)	15
Boquilla (mm)	0,7
Temperatura entrada (°C)	45

En ambas formulaciones se aumentó a un 5 % la concentración de sólidos totales, ya que se observó en los experimentos anteriores que al aumentar este parámetro mejora el RP, esto es concordante con la información obtenida desde

bibliografía (74). Por otro lado, la concentración de sólidos es un parámetro que influye en forma importante en el tamaño de partícula contribuyendo a un mayor tamaño de las mismas (74). En la tabla 14 se presenta el detalle de las formulaciones y los resultados obtenidos.

*Tabla 14: Formulaciones de micropartículas obtenidas a partir de una emulsión W/O y a partir de una suspensión. Fuente: elaboración propia.*

Exp.	Fase acuosa	Fase oleosa	Sólidos totales (%)	RP (%)	EE (%)	Carga (%)	Tamaño (µm)
<b>C1</b>	1 mL sol.acuosa PVA 0,5% 20 mg de DPMX	1000 mg PLGA 20 mL DCM	5	59,1	67,7	1,92	2,80 ± 1,2
<b>S1</b>	---	1000 mg PLGA 20 mL DCM 20 mg DPMX	5	61,0	49,1	1,95	2,30 ± 1,0

En ambos casos, se aprecia una disminución en el tamaño de partícula respecto a las formulaciones del apartado anterior, esto debido al cambio de solvente utilizado, donde su menor tensión superficial permite la formación de gotas más pequeñas (154). Se obtuvieron buenos RP, sin embargo las EE fueron relativamente bajas. Esta vía podría tener potencial de mejora modificando parámetros de proceso, sin embargo no se siguió adelante con más experimentos ya que se quiso intentar nuevamente la obtención de micropartículas utilizando como solvente el agua; esto porque el agua presenta ventajas importantes desde el punto de vista económico y de seguridad frente al uso de solventes orgánicos (155).

### 5.1.3 Emulsión O/W

En este apartado se plantea una emulsión O/W como formulación de partida (B1). Dicha formulación mantuvo el % de sólidos totales entre 4,5-4,9 %, y se aumentó la carga de fármaco de las micropartículas a aproximadamente 9,1 % (Tabla 15). Esto último tiene mucha importancia desde el punto de la aplicabilidad de la formulación, es decir, al ser esta una formulación inyectable sería muy deseable que las micropartículas contuvieran una alta carga de fármaco para inyectar la menor cantidad posible de estas. Se prepararon micropartículas en condiciones de secado similares a las empleadas en el apartado anterior, sin embargo al ser agua la fase externa de la emulsión, se aumentó la temperatura de entrada del equipo a 110 °C para asegurar la evaporación del componente acuoso y se ajustó el flujo de aire en 357 L/min, con el fin de aumentar el tamaño de partícula ya que una menor salida de aire aumentaría el tamaño de gota a secar y por ende la cantidad de sólidos en ella <sup>(74)</sup>. En la primera formulación, B1, se obtuvo un RP bastante bajo, por lo cual se plantean dos experimentos: B2 y B3, en ambos casos se disminuye la concentración de PVA de la fase acuosa externa a 0,1 %, con el fin de disminuir la viscosidad de la fase externa acuosa y mejorar la eficiencia del secado <sup>(155)</sup>. Además, en B2, también con la finalidad de mejorar el proceso de secado se aumentó la temperatura de entrada a 130 °C. En ambos casos se obtuvieron RP muy bajos, probablemente porque con la concentración de 0,1 % de PVA no se logró una emulsión del todo estable, por lo cual se decide mantener fija en 0,5 % la concentración de PVA en la fase externa acuosa. Luego, se realizan otros dos experimentos, donde se fija la temperatura de entrada en 130 °C y se trabaja a dos flujos de aire distintos: 357 L/min (B4) y 473 L/min (B5). Se obtienen nuevamente RP

muy bajos, especialmente en B3, donde se aumentó el flujo de aire con el fin de mejorar el secado. Luego de esto, se hicieron 2 bloques de 4 experimentos en la búsqueda de los factores de mayor incidencia (B6-B9 y B10-B13) en el RP. El bloque B6-B9 mantuvo el flujo de aire en 357 L/h y la aspiración fija en 85 %, la alimentación fue estudiada como factor ya que esta puede tener incidencia en el tamaño de partícula y el secado de la misma, el otro factor estudiado fue la temperatura de entrada del equipo que influye también en ella (130-140 °C). El experimento B6 muestra el RP más bajo del bloque (5,57 %) seguido por B7 (7,17 %) donde el exceso de temperatura puede generar una pérdida de producto ya sea: quedando adherido a las paredes de la cámara de secado o generando un polvo fino que puede ser eliminado del equipo, también, en este caso una menor alimentación tiene una leve incidencia en la recuperación del producto. Los experimentos B8 y B9 fueron realizados a 130 °C variando la alimentación, donde se obtuvieron mejores resultados de RP, donde una mayor alimentación del equipo permitió generar gotas más grandes que lograron una mejor deposición para ser recuperadas, generando diferencias individuales ya que la alimentación al 10 % incidió mayormente en la RP que esta al 7 %. En el último bloque revisado (B10-B13) se mantuvo la alimentación constante, modificándose la entrada de aire comprimido entre 357-473 L/h y disminuyendo la temperatura de entrada (100-120 °C) en función del resultado anterior donde una temperatura más baja mejoraba el RP. El experimento B10 fue el que tuvo la mejor recuperación del bloque (7,43 %) seguido de B12 (6,53 %) donde el aire comprimido estaba a 357 L/h, lo que demostró la influencia del parámetro en el RP ya que una menor entrada de aire disminuye menos la temperatura de salida y permite el mejor secado de las mismas <sup>(74)</sup>. Los experimentos B11 y B13 con una mayor cantidad de aire (473 L/h) obtuvieron una baja RP en

contraste con los resultados anteriores (entre 2 y 7 veces menos recuperación). Para estos experimentos la temperatura tuvo una baja influencia en el RP de todos los experimentos realizados, recuperándose un producto seco y sin humedad aparente. Sin embargo, todos los RP para este método fueron inferiores al 10 % por lo que se descartó definitivamente y se buscó una nueva vía para obtener micropartículas.

*Tabla 15: Condiciones de secado de micropartículas preparadas por emulsión simple O/W y rendimiento de proceso. Fuente: elaboración propia.*

<b>Exp.</b>	<b>Flujo aire (L/h)</b>	<b>Aspiración (%)</b>	<b>Alimentación (%)</b>	<b>T° entrada (°C)</b>	<b>% Solidos (%)</b>	<b>Carga (%)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>RP (%)</b>
<b>B1</b>	357	85	15	110	4,90	9,11	0,50	6,44
<b>B2</b>	357	85	15	130	4,50	9,06	0,10	0
<b>B3</b>	357	85	15	110	4,50	9,10	0,10	1,49
<b>B4</b>	357	85	15	130	4,90	9,08	0,50	7,00
<b>B5</b>	473	85	15	130	4,90	9,18	0,50	1,29
<b>B6</b>	357	85	10	140	4,90	9,09	0,50	5,57
<b>B7</b>	357	85	7	140	4,90	9,11	0,50	7,17
<b>B8</b>	357	85	10	130	4,90	9,17	0,50	9,72
<b>B9</b>	357	85	7	130	4,90	9,10	0,50	8,17
<b>B10</b>	357	90	10	100	4,90	9,17	0,50	7,43
<b>B11</b>	473	90	10	100	4,90	9,14	0,50	1,02
<b>B12</b>	357	90	10	120	4,90	9,21	0,50	6,53
<b>B13</b>	473	90	10	120	4,90	9,09	0,50	3,20

#### 5.1.4 Solución

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, y luego de una revisión bibliográfica se considera utilizar como formulación de partida una solución, disolviendo el PLGA y BPMX en DCM. Para esta vía se disminuye la temperatura de entrada a 60°C (tabla 16). Además de la temperatura de ebullición del DCM, se tomó en consideración la temperatura de transición vítrea (Tg) del PLGA que está entre 45-50°C <sup>(111)</sup>. Esto toma importancia ya que al trabajar cerca de la Tg el proceso tecnológico hace que el polímero pase del estado “gomoso” (sobre la Tg) hacia un estado “vidrioso” (bajo la Tg) de una manera súbita, acumulando energía estructural en el proceso que no puede ser liberada apropiadamente ya que el proceso de vitrificación es muy corto, en la práctica se ve que este exceso energético se refleja en la relajación estructural del polímero lleva a un efecto burst variable que al ser almacenadas en el tiempo este va disminuyendo, convirtiéndose en una variable indeseada de la formulación. Por otro lado la preparación de las mismas por evaporación de solvente posee un efecto burst más estable en el tiempo ya que la eliminación del solvente orgánico puede tardar horas y no minutos. Otra implicancia importante que tiene el no utilizar temperaturas muy altas se refiere a la formación de la partícula misma donde un secado muy rápido generaría una deposición del fármaco en la superficie de la partícula por un fenómeno convectivo asociado a la eliminación del solvente aumentando el efecto burst consecuentemente <sup>(157)</sup>.

Tabla 16: Condiciones iniciales para micropartículas preparadas a partir de una solución. Fuente: elaboración propia.

Condición	Valor
Flujo de aire (L/h)	473
Aspiración (%)	90
Alimentación (%)	15
Boquilla (mm)	0,7
Temperatura entrada (°C)	60

En la tabla 17 se detalla la formulación ensayada. Los experimentos anteriores permitieron establecer que se debe fijar la concentración de sólidos en no menos de un 4-5%. En bibliografía también se encuentran descritos métodos de obtención de micropartículas a partir de soluciones 2,5% p/v de PLGA <sup>(158)</sup>. Una menor concentración podría llevar a la formación parcial de micropartículas o a la no formación de estas.

Tabla 17: formulación de micropartículas obtenida a partir de una solución. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Fase oleosa	Sólidos totales (%)	RP (%)	EE (%)	Carga (%)
A1	1250 mg PLGA 25 ml DCM	5	45,32	Blancas	Blancas

Luego de preparar y atomizar la formulación A1, se obtuvo el resultado presentado en la tabla 17 con una recuperación cercana al 45 % y la formación efectiva de las micropartículas. Esto fue confirmado por microscopía óptica mediante un análisis morfológico básico. Estas micropartículas tenían forma esférica (figura 16).

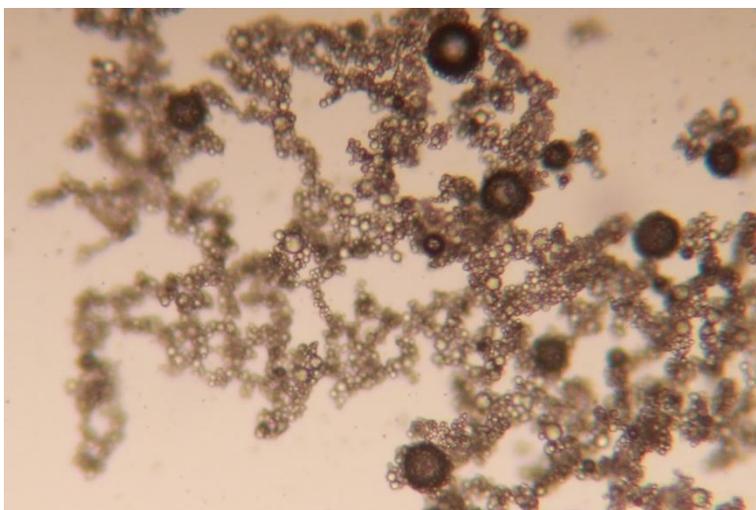


Figura 16: Fotografía de la muestra A1. Se aprecia la formación de una estructura esférica que corresponde a las micropartículas formadas. Fuente: elaboración propia.

Luego de obtener micropartículas con la metodología probada anteriormente, se procedió a modificar los parámetros de proceso en orden de mejorar el RP, en esta oportunidad agregándoles una carga de fármaco para verificar la EE y realizar estudios cinéticos preliminares de las formulaciones. Se comenzó con 3 formulaciones donde se modificaron parámetros de atomización detalladas en la tabla 18. En las formulaciones AB1 y AB2 utilizó 1250 mg y en AB3 se utilizó 1000 mg de PLGA. En todas las formulaciones se les agregó 20 mg de BPMX y fueron disueltas en 25 mL de DCM.

Tabla 18: Micropartículas por solución trabajadas entre el 4-5 % de sólidos totales, parámetros de operación y resultados. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Aire (L/h)	Asp. (%)	Alim. (%)	T° (°C)	% Sólidos (%)	% Carga (%)	RP (%)	%EE (%)	Tamaño (µm)
AB1	357	80	15	60	5,00	1,55	14,35	88,38	2,19 ± 1,39
AB2	357	80	15	45	5,00	1,61	29,66	83,10	1,79 ± 1,00
AB3	473	90	15	45	4,00	2,04	43,04	80,04	1,70 ± 1,07

En el primer experimento (AB1) se disminuyó el flujo de aire comprimido a 357 L/h y la potencia de aspiración al 80 % con el fin de aumentar el tamaño de partícula y el RP respectivamente. Sin embargo, el resultado mostro una reducción del RP a un tercio de lo obtenido en un principio, esto es atribuible a la formación de un agregado compacto adherido al extremo inferior del ciclón (pesando más de la mitad de los sólidos agregados), siendo relacionado a un secado ineficiente de la muestra donde un exceso de temperatura podría haber influido en la aparición de este agregado. El experimento AB2 fue llevado a cabo disminuyendo la temperatura de entrada a 45 °C, suficiente para evaporar el DCM de la muestra y evitando el exceso de secado para evitar la aparición del agregado. El RP se duplicó en este caso llegando casi al 30% lo que confirma la incidencia de la temperatura en la formación del agregado donde este también disminuyo su peso a la mitad. Luego, un último experimento fue llevado a cabo (AB3) donde se mantuvo la temperatura en 45 °C , se aumentó la aspiración al 90 %, el aire fue aumentado a 473 L/h y la cantidad de sólidos fue disminuida al 4 % con el fin de mejorar aún más la RP del proceso productivo ya que una mayor aspiración generaría una mejor separación de las partículas obtenidas y una mayor cantidad de aire generaría gotas más pequeñas que requieren una menor cantidad de energía para secarse sumado a la disminución del polímero que también disminuye el tamaño de la gota. El resultado final fue un rendimiento parecido a A1 utilizando una menor temperatura de entrada, menos cantidad de polímero y resultando en la eliminación casi total del agregado observado anteriormente. En términos de tamaño, la medición mediante microscopía óptica arrojó tamaños similares, fueron partículas de pequeño tamaño de poca variabilidad entre ellas. Se observaron agregadas entre ellas. La

eficiencia de encapsulación mostro diferencias de un 8 % entre el valor más alto y el más bajo obtenido, siendo valores esperables en secado por atomización (74).

Se obtuvieron resultados aceptables, sobre todo en la formulación A3. Estas 3 formulaciones fueron llevadas a cinéticas de liberación, para evaluar su comportamiento como formulación de liberación controlada (n=2). Este estudio se realizó durante 14 días, los resultados se muestran a continuación en la figura 17.

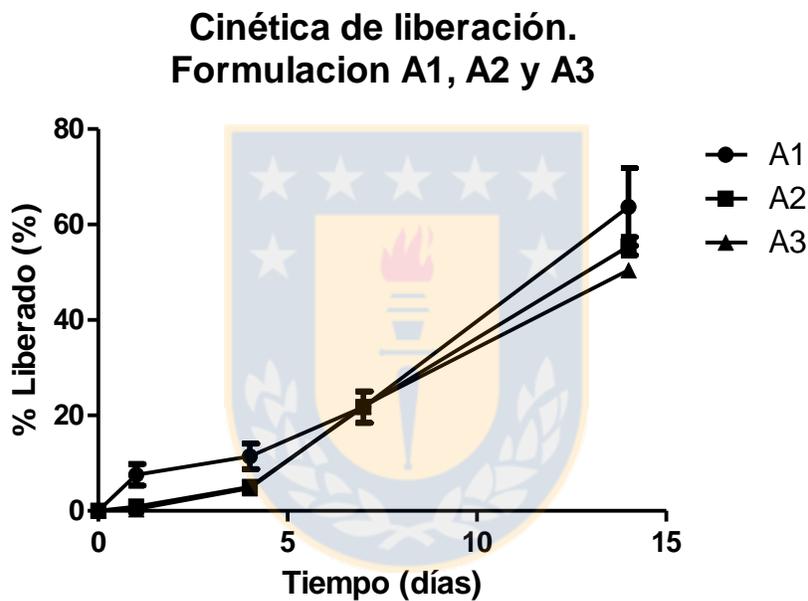


Figura 17: Gráfica de cinéticas de liberación para formulación A1, A2 y A3 (n=2). Fuente: elaboración propia.

Los datos obtenidos desde las cinéticas fueron tabulados en porcentaje liberado total para observar las diferencias entre formulaciones, la tabla 19 muestra la información obtenida.

Tabla 19: Liberación acumulada cinéticas AB1 AB2 Y AB3. Fuente: elaboración propia.

Tiempo (días)	% Liberado (%)		
	AB1	AB2	AB3
1	7,58	0,89	0,35
4	11,45	5,03	4,80
7	21,74	21,75	22,03
14	63,70	55,46	56,80

Las cinéticas mostraron un comportamiento bifásico, que es esperable en estos casos. Sin embargo, es llamativo el bajo efecto burst que se presenta en los primeros días, que podría ser un buen indicativo de que el PMX pudo haber quedado atrapado dentro de la matriz polimérica con muy poco de el en la superficie de las micropartículas <sup>(157)</sup>. Luego de un par de días comienza la liberación modulada del PMX al medio receptor. A los 7 días, todas las curvas de liberación se cruzan en el mismo punto y luego comienza el comportamiento diferenciado de estas mostrando una pendiente que las diferencia, esto se debe principalmente a la erosión de las partículas ya que PLGA comienza a degradarse a mayor velocidad <sup>(160)</sup>. Esto se vuelve más evidente cerca de los 14 días de someterlo al medio receptor, donde ya hay más de un 50 % de fármaco liberado.

Estas partículas si bien poseen una liberación bastante aceptable, siguen teniendo una carga muy baja para trabajar con ellas, requiriendo un mayor volumen de inyección, por lo que se aumentó la proporción de fármaco en la formulación. Se decidió preparar más lotes experimentales con una carga mayor de principio activo, desde ahora se pesaría en función del polímero pesado correspondiendo al 10 % del polímero (ej: si se pesan 400 mg de PLGA, se pesarían 40 mg de BPMX), esto fue variado

durante los experimentos para obtener una mayor carga y mejorar más las partículas obtenidas. La tabla 20 muestra el segundo bloque de formulaciones obtenidas.

Tabla 20: Condiciones de atomización de micropartículas preparadas por solución (segundo bloque).  
Fuente: elaboración propia.

Exp.	Aire (L/h)	Asp. (%)	Alim. (%)	T° (°C)	% Sólidos (%)	% Carga (%)	RP (%)
AB4	357	90	10	45	5,50	9,11	0,30
AB5	473	90	5	45	5,50	9,13	8,63
AB6	473	80	5	45	5,50	9,14	13,98
AB7	473	85	5	45	4,40	9,10	13,03
AB8	473	85	2	45	4,40	9,21	7,09
AB9	473	85	2	45	4,40	9,09	4,41
AB10	473	85	5	45	4,40	8,98	8,59
AB11	473	80	5	45	4,40	9,05	18,14
AB12	601	80	5	50	4,40	9,39	36,20
AB13	601	80	5	55	4,40	8,95	23,22
AB14	601	90	5	50	4,40	9,01	31,79

El segundo bloque se caracterizó por buscar una formulación de micropartículas que posean una mayor carga de fármaco y un RP cercano o superior al obtenido en experimentos anteriores. Se comenzó con AB4 como formulación de partida manteniendo el aire a 357 L/h disminuyendo la alimentación al 10 % pero aumentando la concentración de sólidos al 5,5 % en un intento por equilibrar la disminución de alimentación, este cambio tuvo efectos indeseables para la formulación obtenida, donde volvió a aparecer el agregado compacto en el ciclón de separación llegando casi al 50 % de los sólidos pesados y el RP disminuyó a menos del 1 %. En el experimento AB5

se disminuyó aún más la alimentación (5 %) y se aumentó el aire comprimido a 473 L/h a fin de generar una gota de menor tamaño y con menos sólidos que secan recuperándose una mayor cantidad que en un principio. El experimento AB6 mantuvo el valor de aire y alimentación, pero se disminuyó la aspiración para evitar una eliminación excesiva de partículas hacia el exterior del equipo mejorando la recuperación casi al 14 % del total atomizado. El experimento AB7 disminuyó la cantidad de sólidos a 4,4 % y aumentó el aspirado al 85 % sin modificar las demás condiciones, obteniéndose un rendimiento similar al anterior para luego en AB8 y AB9 (duplicado) disminuir la alimentación al 2 % con el fin de generar gotas más pequeñas y que se puedan secar apropiadamente, sin embargo, se obtuvieron niveles bajos de RP en ambas réplicas.

Se llevó a cabo el experimento AB10 teniendo una configuración idéntica a AB7 con el fin de descartar una variabilidad del equipo de trabajo obteniéndose un 8,59 % de RP que en contraste con el 13 % obtenido en AB7 acusa una variabilidad normal de proceso para esta técnica, lo que llevó al experimento AB11 donde se disminuyó la aspiración al 80 % en orden de depositar una mayor cantidad de partículas en el ciclón del equipo mejorando el RP a un 18 %, a pesar de recuperar rendimiento este no es suficiente por lo que se decide aumentar el flujo de aire a 601 L/h y la temperatura a 50 °C (AB12) en función de propiciar un mejor secado de la muestra con la disminución de la gota y una mayor temperatura, el RP obtenido fue de un 36,2 % siendo aceptable en este caso, luego se dio lugar a 2 experimentos (AB13 y AB14) más modificando la aspiración y temperatura del equipo. El experimento AB13 se llevó a cabo aumentando la temperatura de entrada a 55 °C en función de secar de mejor manera las gotas producidas, sin embargo se disminuyó el rendimiento a un 23,22 % lo que fue

perjudicial, otra vía tomada fue mantener la temperatura en 50 °C y aumentar la potencia de aspiración para optimizar la separación de las partículas manteniendo las demás condiciones fijas (AB14), este experimento resulto en un RP de casi el 32 % recuperado, cercano al mejor experimento del bloque (AB12). A pesar de los resultados obtenidos se siguió trabajando para mejorar el RP, dándose lugar al tercer y último bloque donde se trabajó con menos volumen a atomizar ya que esto permitiría utilizar menos recursos, los resultados se encuentran en la tabla 21.

*Tabla 21: Condiciones de atomización de micropartículas preparadas por solución (último bloque) y su rendimiento de proceso. Fuente: elaboración propia.*

Exp.	Flujo aire (L/h)	Asp. (%)	Alim. (%)	T° entrada(°C)	Solidos (%)	Carga (%)	RP (%)
AB15	473	85	15	45	4,50	11,31	9,68
AB16	473	85	7	50	4,40	11,41	11,07
AB17	473	85	15	45	4,20	3,87	20,82
AB18	473	85	7	45	3,80	10,88	13,88
AB19	473	85	15	50	3,80	11,07	14,98
AB20	601	85	7	45	4,40	9,01	12,88
AB21	601	85	7	40	4,40	8,85	4,13
AB22	601	85	15	55	4,40	9,12	9,12
AB23	601	85	15	60	4,40	9,20	2,62
AB24	601	100	15	45	4,40	9,39	35,37
AB25	601	100	10	45	4,40	9,58	22,16
AB26	473	100	10	45	4,40	8,98	8,93
AB27	601	100	15	45	4,40	9,37	25,05
AB28	601	100	15	45	6,00	9,09	22,14
AB29	601	100	15	45	8,00	9,12	11,98
AB30	601	100	15	45	4,80	16,86	21,34
AB31	601	100	15	45	5,00	20,33	17,54
AB32	601	100	15	45	4,20	4,94	9,64
AB33	601	100	15	45	4,40	9,22	11,55
AB34	601	100	15	45	4,40	9,14	19,08
AB35	601	100	15	45	4,40	9,00	18,98
AB36	601	100	15	50	4,40	9,22	36,59
AB37	601	100	15	50	4,40	8,99	35,79

El último bloque se comenzó (AB15) aumentando la concentración de sólidos a 4,5 %, disminuyendo la temperatura a 45 °C, aumentando a un 15 % la alimentación del equipo y disminuyendo el valor de aspiración al 85 %, en orden de maximizar el rendimiento de proceso. El resultado llevo a un 9,68 % de RP siendo una tercera parte de lo recuperado anteriormente y la reaparición del agregado compacto que correspondía a la mitad de los sólidos pesados. Se volvieron a modificar los parámetros disminuyendo la alimentación a la mitad y aumentando la temperatura de entrada, también se disminuyó la cantidad de sólidos a 4,4 % con el objetivo de reducir el agregado compacto lo más posible dando lugar al experimento AB16 que presentó un RP cercano al anterior con un 11,07 % con presencia del agregado compacto visto anteriormente, pesando menos que antes. Luego de este experimento se comenzó a sospechar que la cantidad de sólidos podría tener una influencia en la formación del agregado por lo que se disminuyeron al 4,2 % y la carga de fármaco también (AB17), la temperatura fue modificada a 45 °C en orden de prevenir el secado excesivo de la muestra y la alimentación al 15 % con el objetivo de que exista una suficiente cantidad de sólidos para formar la partícula. El experimento resultó en un aumento del RP cercano al 21 % pero con una carga teórica de fármaco baja y un agregado compacto del orden del 35 % de los sólidos totales. El siguiente experimento fue planificado aumentando la carga al 11 % y disminuyendo la cantidad de polímero utilizado calculándose al 3,8 % (A18). Se mantuvo la temperatura de entrada en 45 °C y la alimentación fue disminuida al 7 % en orden de disminuir el peso del agregado, como resultado el RP fue cercano al 14 % y el agregado pesaba un 25 % de los sólidos totales siendo un avance esta disminución. El experimento AB19 se planteó subiendo la temperatura de entrada a 50 °C y un 15 % de alimentación manteniendo los sólidos

totales con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de atomizado en esta oportunidad, obteniéndose un 15 % de RP que se asemeja al resultado anterior, esto significó tener que explorar otros cambios los parámetros de proceso en orden de eliminar el agregado compacto y mejorar el RP.

Se realizó otra serie de experimentos ajustando la entrada de aire a 601 L/h comenzando con el experimento AB20, los sólidos totales se ajustaron a 4,4 % la alimentación al 7 % y la aspiración al 85 %. El RP fue de un 13 % aproximadamente siendo similar a lo encontrado anteriormente y encontrándose un agregado compacto de magnitud similar al RP. En AB21 se disminuyó la temperatura a 40 °C con el fin de eliminar el agregado compacto manteniendo los demás parámetros fijos, sin embargo pese a la desaparición del agregado el RP cayó bajo el 5 % significando un retroceso en lo ya obtenido, debiéndose plantear una modificación. Se sugirió aumento de temperatura de atomización y un aumento de alimentación en orden de mejorar el RP (AB22), este se ajustó a un 15 % de alimentación y 55 °C de temperatura de entrada, el rendimiento se duplicó a un 9,12 %, esta influencia positiva de la temperatura se intentó aprovechar elevándola a 60 °C manteniendo los parámetros sin modificar (AB23), sin embargo el rendimiento cayó bajo el 3 % acusando que un exceso de temperatura genera pérdidas elevadas de rendimiento.

Luego de estas pruebas y sus bajos RP, se decidió manipular la potencia de aspiración llevándola 100 % de su capacidad a la búsqueda de mejores resultados con la premisa de generar una mejor separación del producto en el ciclón del equipo. El experimento AB24 fue realizado a 601 L/h, alimentación del 15 % y temperatura de 45 °C manteniendo los sólidos en 4,4 %. Esta configuración resultó en un 35,37 % de RP

que se le consideró bastante bueno en comparación a lo recuperado en los bloques anteriores por lo que se fijó este parámetro y se modificó la alimentación disminuyéndola al 10 % (AB25) en función de observar el cambio de RP que disminuyó en un 13 % aproximadamente. Luego de este experimento se manipuló la entrada de aire disminuyéndola a 473 L/h (AB26) donde el bajo RP obtenido (8,93 %) reveló la importancia de mantener este parámetro en 601 L/h por el resto de los experimentos. Se realizó una prueba utilizando un ciclón de separación de mayor tamaño (AB27) para la recuperación del producto con el esquema probado en AB25 que mostro un RP similar (25 %), demostrando la reproducibilidad del proceso, a pesar de obtener el mismo rendimiento la dificultad presentada a la hora de rescatar el polvo obligó a seguir utilizando el ciclón de trabajo regular. Se plantearon más experimentos aumentando la concentración de sólidos con el esquema anterior al 6 y 8 % (AB28 y AB29 respectivamente) manteniendo los parámetros de proceso fijos ya que el rendimiento que se logró anteriormente es correcto. Los resultados mostraron un RP de 22,14 % y 11,98 % respectivamente, pero el hecho de utilizar 1,5 y 2 veces la cantidad de polímero representa un gasto alto de materiales haciendo poco óptimo el proceso de obtención de ellas, sumado a la presencia del agregado compacto en el ciclón lo que llevo a descartar el seguir aumentando la concentración de sólidos.

Otra variante que se probó fue el aumento de la carga teórica de fármaco en la solución a atomizar aumentando a casi un 17 % y el contenido de sólidos al 4,8 %, manteniendo los parámetros de obtención fijos nuevamente (AB30), el RP fue de un 21,34 % siendo similar a los rendimientos obtenidos anteriormente (AB25, AB27 y AB28), a pesar de esto se insistió en aumentar más la cantidad de fármaco presente,

llegando a un 5 % de sólidos totales y un 20,33 % de carga de fármaco (AB31), pero el RP comenzó a disminuir bajando al 17,54 %, implicando que la carga podría tener influencia en la cantidad recuperada de micropartículas. También se probó disminuyendo la carga a un 5 % a la búsqueda de mejores RP (AB32) manteniendo fijas las variables de proceso, resultando en un RP menor al 10 %.

La disminución de RP en el proceso anterior llevo a la realización de 2 experimentos (AB33, AB34 y AB35) utilizando el esquema de mejor RP hasta el momento (AB24) con el fin de observar comportamiento del propio equipo en el tiempo, se realizaron los 3 experimentos obteniéndose RP de 11,55 %, 19,08 % y 18,98 % respectivamente, acusando una desviación estándar del 10 % por parte del equipo que podría ser considerada normal ya que algunos casos de literatura presentan variabilidades de esta magnitud o cercana. Sin embargo, debido al costo del polímero se debe maximizar su RP con variaciones mínimas entre muestras. En los últimos 2 experimentos realizados (AB36 y AB37) se aumentó la temperatura del esquema anterior a 50 °C sin variar los demás parámetros, ni la composición de la solución a atomizar, el resultado fue casi idéntico a lo obtenido en AB24 con un RP 36,59 % en el primero y un 35,79 % en su réplica. Luego de estos bloques de experimentación se concluyó en utilizar A36 como formulación a optimizar mediante diseño experimental ya que fue el candidato con el mejor RP obtenido durante los bloques experimentales realizados recientemente.

## 5.2 Optimización de la obtención de micropartículas, ajustando los parámetros de proceso.

De acuerdo a los resultados de los estudios preliminares, se pudo determinar una formulación con buenas características, y se procedió a la optimización del proceso de obtención de estas mediante un diseño experimental.

### 5.2.1 Morfología y tamaño

El análisis morfológico de las formulaciones del diseño experimental realizado mediante SEM reveló aglomeración de partículas, en diferentes grados, en las diferentes formulaciones. Las micropartículas fueron lisas y esféricas, sin presencia de cristales de fármaco o restos de polímero en la superficie de estas. No obstante, señalar que se observaron invaginaciones en algunas partículas, debido a que se encontraban muy juntas unas con otras. Las imágenes de referencia fueron tomadas de la muestra DDE2 y DDE10 (figuras 18 y 19).

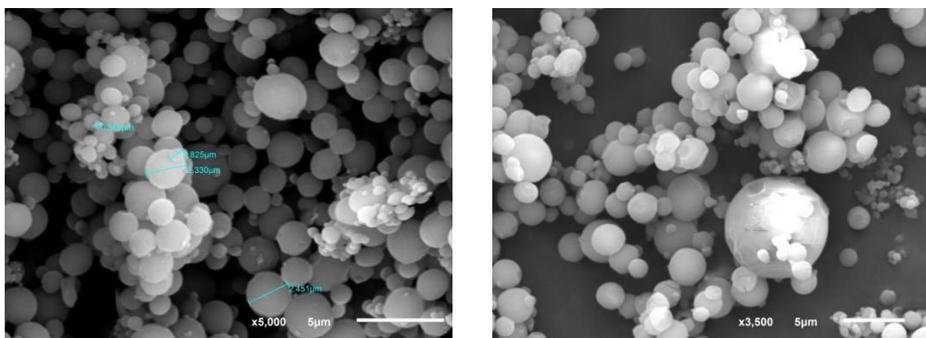


Figura 18 y 19: Fotografías SEM de formulaciones (derecha) DDE2 (aumento: 5000x), (izquierda) DD10 (aumento 3500x). Fuente: elaboración propia.

Respecto del tamaño de partícula, las muestras también fueron medidas mediante difracción láser y por microscopía óptica, para tener una comparación entre dos métodos. Los datos se observan en la tabla 23 que agrupan todas las medidas obtenidas.

Tabla 22: Datos de tamaño obtenidos para micropartículas desde el diseño experimental, se adjunta: diámetro óptico y datos de difracción laser por 3 tipos de medidas distintas. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Diámetro óptico (µm)	Diámetro Volumétrico (µm)	Diámetro Número (µm)	Diámetro Área (µm)
DDE1	1,34 ± 0,48	18,11 ± 11,83	5,18 ± 1,66	11,26 ± 7,25
DDE2	1,73 ± 0,75	14,92 ± 9,14	4,75 ± 1,47	9,48 ± 5,79
DDE3	1,61 ± 0,70	21,21 ± 15,55	5,38 ± 1,64	12,16 ± 7,78
DDE4	1,66 ± 0,60	19,42 ± 13,21	5,46 ± 1,83	11,84 ± 7,36
DDE5	1,55 ± 0,47	12,26 ± 8,63	4,67 ± 1,29	8,03 ± 3,97
DDE6	3,15 ± 1,56	33,50 ± 22,73	5,63 ± 1,93	17,58 ± 15,11
DDE7	2,21 ± 1,65	14,63 ± 11,28	4,43 ± 1,26	8,46 ± 4,55
DDE8	2,05 ± 0,79	19,15 ± 12,57	5,54 ± 1,86	12,02 ± 7,60
DDE9	1,84 ± 0,80	21,03 ± 16,49	5,08 ± 1,21	11,57 ± 6,86
DDE10	1,92 ± 0,82	19,32 ± 15,61	4,75 ± 1,17	10,15 ± 5,79
DDE11	1,55 ± 0,69	22,03 ± 15,17	4,63 ± 1,29	10,03 ± 5,98
DDE12	1,44 ± 0,63	21,63 ± 9,94	4,27 ± 1,25	8,39 ± 4,95
DDE13	2,56 ± 1,18	26,09 ± 18,77	5,54 ± 1,81	14,20 ± 9,69
DDE14	1,75 ± 0,70	18,93 ± 14,84	5,20 ± 1,31	10,88 ± 6,22
DDE15	2,57 ± 0,95	23,28 ± 16,28	5,68 ± 1,95	13,44 ± 8,96
DDE16	2,60 ± 0,96	20,38 ± 13,49	5,64 ± 2,01	12,50 ± 7,88
DDE17	1,58 ± 0,60	12,7 ± 8,90	4,55 ± 1,24	8,26 ± 4,52
DDE18	2,74 ± 0,98	18,63 ± 13,81	5,18 ± 1,61	11,00 ± 6,54
DDE19	3,09 ± 1,30	30,45 ± 22,21	5,60 ± 1,93	15,51 ± 11,14
DDE20	2,91 ± 0,97	30,89 ± 21,86	5,75 ± 1,93	16,18 ± 12,28

Las medidas obtenidas entre ambas técnicas mostraron discrepancias en todos los set de datos obtenidos, esto se debe a la aglomeración de las partículas que, no obstante, fueron sometidas a ultrasonido antes de analizarlas por difracción láser, al parecer no se logró separarlas completamente. El diámetro más cercano al óptico es el diámetro por número obtenido, luego seguido del diámetro de área y por último el de volumen. Para este caso el tamaño obtenido por difracción láser puede ser

correlacionado al tamaño de los aglomerados, que al no poderse dispersar totalmente en agua serían medidos como partículas. Dado este suceso, se consideró el diámetro óptico la medida real de las micropartículas.

### **5.2.2 Resultados diseño experimental**

Luego de comprobar las características morfológicas y de aspecto de las micropartículas obtenidas a partir de las diferentes formulaciones del diseño experimental, se evaluaron las respuestas obtenidas a partir de las variables seleccionadas para la optimización de la formulación. Los resultados del diseño experimental se detallan en la tabla 23:

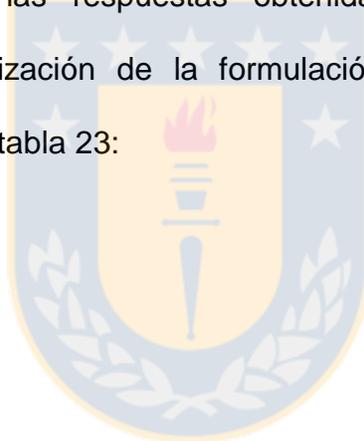


Tabla 23: Variables y respuestas medidas en el diseño experimental. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Variables		Respuestas medidas		
	Temperatura (°C)	Alimentación (%)	Tamaño (µm)	%EE (%)	RP (%)
DDE1	48	7	1,34	81,20	44,00
DDE2	45	13	1,73	83,40	21,40
DDE3	55	5	1,61	88,40	34,40
DDE4	55	13	1,66	91,70	38,70
DDE5	55	20	1,55	92,50	38,70
DDE6	65	13	3,15	90,10	25,80
DDE7	48	18	2,21	89,00	16,30
DDE8	55	13	2,05	91,60	40,30
DDE9	62	7	1,84	88,20	43,00
DDE10	62	18	1,92	91,60	43,30
DDE11	48	7	1,55	87,30	27,00
DDE12	45	13	1,44	80,60	8,60
DDE13	55	5	2,56	89,40	28,00
DDE14	55	13	1,75	91,20	36,00
DDE15	55	20	2,57	91,80	35,80
DDE16	65	13	2,60	91,70	28,20
DDE17	48	18	1,58	85,70	18,10
DDE18	55	13	2,74	93,80	45,60
DDE19	62	7	3,09	92,90	24,50
DDE20	62	18	2,91	93,00	31,90

### 5.2.2.1 Tamaño de partícula

Los tamaños medios de las micropartículas oscilaron entre  $1,34 \mu\text{m} \pm 0,48 \mu\text{m}$  y  $3,15 \mu\text{m} \pm 1,56 \mu\text{m}$ , siendo DDE6 y DDE19 las formulaciones que presentaron mayores tamaños. Sin embargo, esta diferencia es bastante baja contra las demás obtenidas, por lo que se pueden considerar todas similares ya que no hay órdenes de magnitud de diferencia entre ellas.

La representación de Pareto (figura 20) para el tamaño de partícula muestra una influencia marcada de la temperatura, donde el aumento de esta tiene una influencia directa en el tamaño de partícula aumentándolo, mientras que el cuadrado de la

temperatura tiene poca incidencia sobre este. La gráfica de efectos principales (figura 21) también muestra esta relación que es marcada más para la temperatura que la alimentación. Por último, el cruce de las líneas de la gráfica de interacciones (figura 21), evidencia una dependencia del tamaño de partículas entre las variables. Sin embargo, el gráfico de Pareto no la considera muy significativa, aunque esta existe.

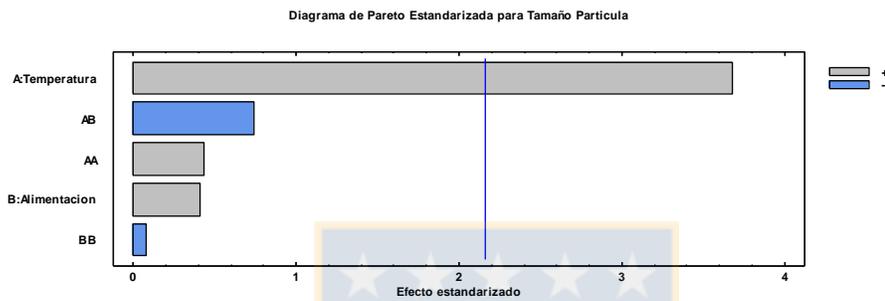


Figura 20: Diagrama de Pareto obtenido para tamaño de partícula. Fuente: elaboración propia.

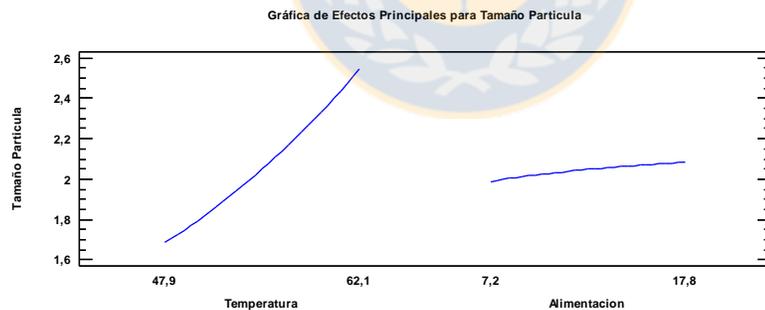


Figura 21: Gráfica de efectos principales obtenida para tamaño de partícula. Fuente: elaboración propia.

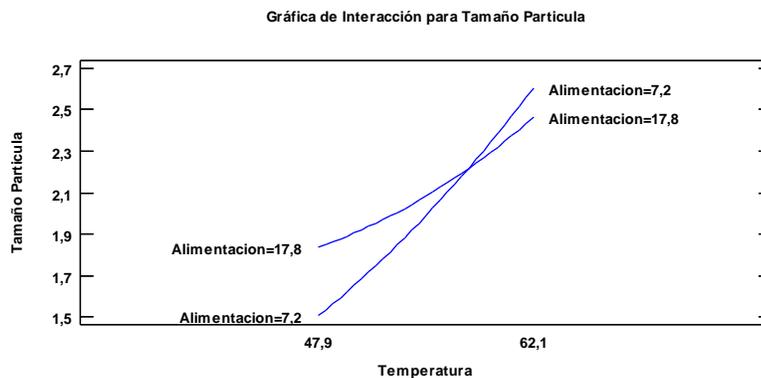


Figura 22: Gráfica de interacciones obtenida para tamaño de partícula. Fuente: elaboración propia.

### 5.2.2.2 Eficacia de encapsulación

Todas las EE estuvieron sobre el 80 %, oscilando entre 80,6 %  $\pm$  9,5 % y 93,8 %  $\pm$  0,6 %. La mayor EE fue para la formulación DDE18, lo que acusa una buena EE del proceso *per se*.

Para este apartado el gráfico de Pareto (figura 23) señala tres interacciones significativas: la alimentación y la temperatura, poseen una incidencia directa sobre la EE y el cuadrado de la temperatura que tiene una incidencia indirecta (temperaturas muy altas disminuyen la EE), siendo el efecto más intenso el de la temperatura. La gráfica de efectos principales (figura 24) muestra la parábola que se debería ver por el efecto de la temperatura sobre la EE, evidenciando su mayor influencia y a la vez mostrando la caída de la misma si se aumenta mucho. Por último, no se observan interacciones (figura 25) entre ambos factores debido a que las curvas están separadas una de la otra y son prácticamente iguales.

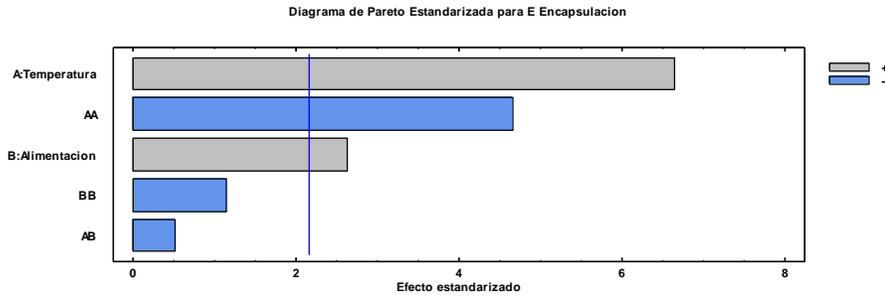


Figura 23: Diagrama de Pareto obtenido para EE. Fuente: elaboración propia.

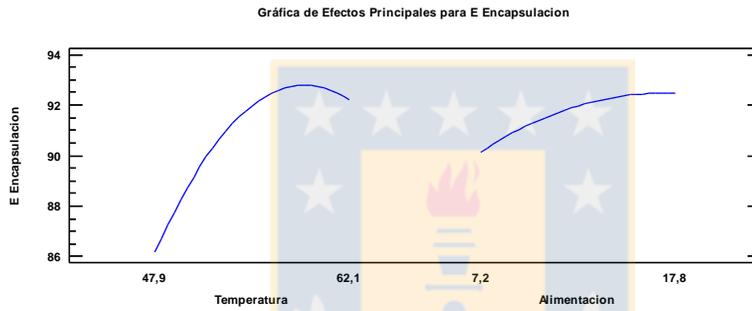


Figura 24: Gráfica de efectos principales obtenida para EE. Fuente: elaboración propia.

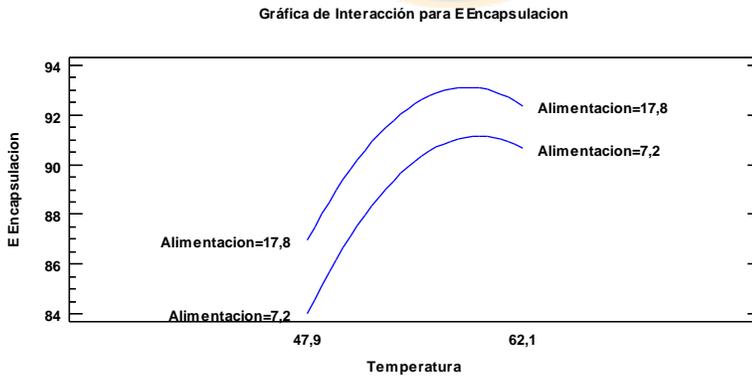


Figura 25: Gráfica de interacciones obtenida para EE. Fuente: elaboración propia.

### 5.2.2.3 Rendimiento de proceso (RP)

Por último, el RP fue el que tuvo mayores oscilaciones de todas las respuestas medidas, siendo la más baja para el ensayo DDE12 solo con un 8,6 % y la más alta para DDE1 con un 44 %, le siguieron DDE9 junto a DDE10 con un 43 %, aproximadamente.

El gráfico de Pareto (figura 26) para el RP entregó una mayor influencia al cuadrado de la temperatura, donde se observa una dependencia indirecta de esta sobre la cantidad recuperada. La temperatura y la combinación de ambos factores presentan un efecto menos intenso, pero con significancia estadística. La gráfica de efectos principales (figura 27) muestra una parábola al igual que en la EE, mostrando un comportamiento casi igual. La gráfica de interacciones (figura 28) evidencia lo encontrado en el gráfico de Pareto con el cruce de ambas curvas mostrando la interacción entre los factores.

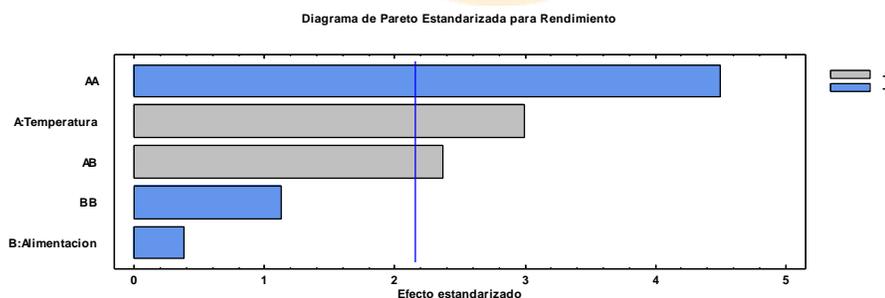


Figura 26: Diagrama de Pareto obtenido para rendimiento de proceso. Fuente: elaboración propia.

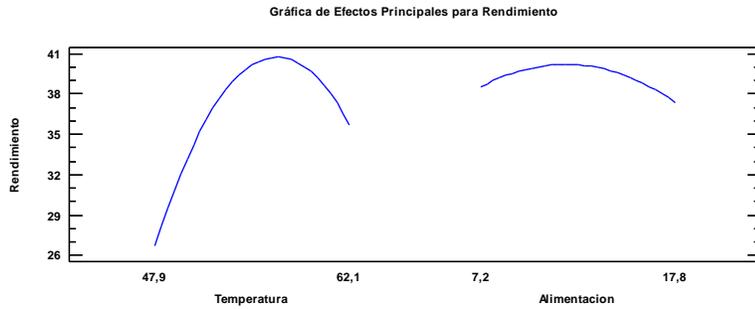


Figura 27 : Gráfica de efectos principales obtenida para rendimiento de proceso. Fuente: elaboración propia.

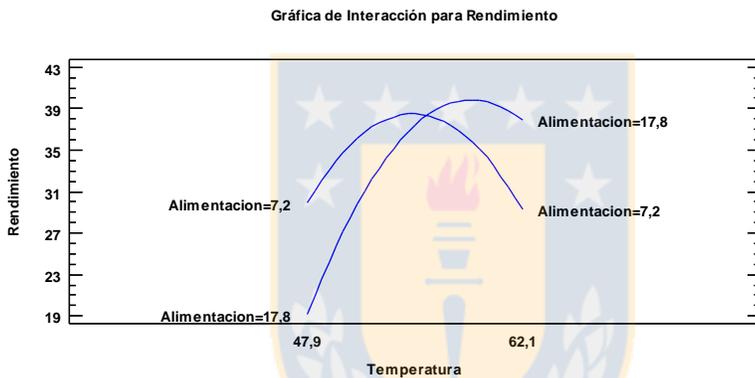
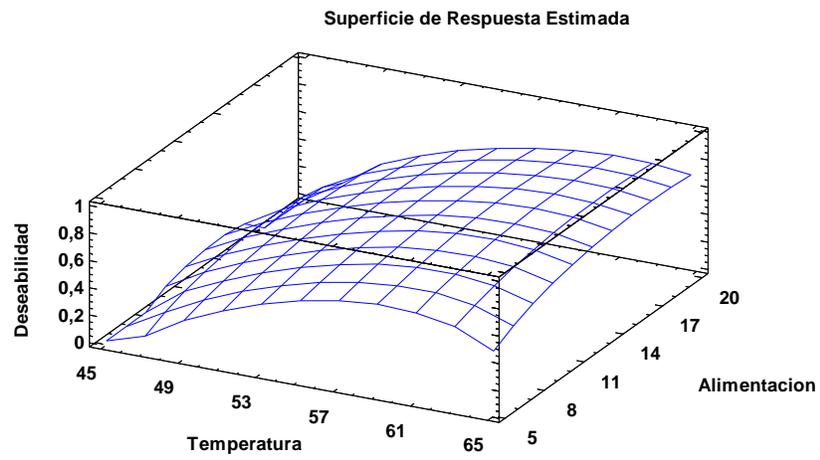


Figura 28 : Gráfica de interacciones obtenida para rendimiento de proceso. Fuente: elaboración propia.

### 5.2.2.4 Gráfica de superficie de respuesta

Luego del análisis estadístico individual se procedió a crear el gráfico de superficie de respuesta y la optimización final del método. Al software se le pidió entregar datos sobre el mejor experimento realizado y la combinación de factores optimizada indicándole una optimización maximizada para las 3 respuestas medidas, obteniéndose el siguiente el gráfico (figura 29) y datos finales (tabla 24):



*Figura 29: Gráfica de superficie de respuesta obtenida para optimización de 2 parámetros: temperatura y alimentación. Fuente: elaboración propia.*



Tabla 24: Resumen de deseabilidades obtenidas según las respuestas obtenidas en el diseño experimental. En rojo, la mejor deseabilidad obtenida para ambos bloques experimentales. Fuente: elaboración propia.

Exp.	Tamaño (µm)	%EE (%)	RP (%)	Deseabilidad	
				Prevista	Observada
DDE1	1,34	81,2	44,0	0	0
DDE2	1,73	83,4	21,4	0,097646	0,250992
DDE3	1,61	88,4	34,4	0,491545	0,394646
DDE4	1,66	91,7	38,7	0,607957	0,494533
DDE5	1,55	92,5	38,7	0,59276	0,439838
DDE6	3,15	90,1	25,8	0,686496	0,694212
DDE7	2,21	89,0	16,3	0,307331	0,399281
DDE8	2,05	91,6	40,3	0,607957	0,654262
DDE9	1,84	88,2	43,0	0,647392	0,528805
DDE10	1,92	91,6	43,3	0,725237	0,630326
DDE11	1,55	87,3	27,0	0,307832	0,308238
DDE12	1,44	80,6	8,6	0,162134	0
DDE13	2,56	89,4	28,0	0,586472	0,617632
DDE14	1,75	91,2	36,0	0,702894	0,51262
DDE15	2,57	91,8	35,8	0,670468	0,751183
DDE16	2,60	91,7	28,2	0,703877	0,676859
DDE17	1,58	85,7	18,1	0,345939	0,236057
DDE18	2,74	93,8	45,6	0,702894	0,917945
DDE19	3,09	92,9	24,5	0,671689	0,728834
DDE20	2,91	93,0	31,9	0,780989	0,800585

El análisis arrojó que el mejor experimento previsto fue DDE20 y el mejor observado fue DD18 teniendo buenas deseabilidades. Cabe destacar la buena correlación que existe para DDE20 entre el previsto y observado y que acusa una buena aproximación desde el software estadístico. Los resultados de optimización de la preparación de las micropartículas, se presentan en la tabla 25:

Tabla 25: Optimización final de las respuestas obtenidas mediante software. Fuente: elaboración propia.

Parámetro	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura (°C)	45	65	61,10
Alimentación (%)	5	20	15,20

Con esta información se prepararon 3 lotes de la formulación de micropartículas optimizada y se midieron las mismas respuestas con el fin de revisar la cercanía entre los datos teóricos y los datos obtenidos experimentalmente (tabla 26):

Tabla 26: Datos experimentales obtenidos desde la formulación optimizada de micropartículas y su comparación con los datos entregados. Fuente: elaboración propia.

Respuesta	Óptimo	Observado
Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	2,4	$2,1 \pm 0,9$
EE (%)	92,8	$93,7 \pm 0,5$
RP (%)	38,6	$32,9 \pm 1,9$

La tabla 27 muestra una correlación cercana entre lo esperable y lo obtenido, sin ninguna clase de aberración (2 o 3 veces la amplificación de un dato) o desviaciones importantes. Por lo que se consideran correctos los resultados.

### 5.2.2.5 Evaluación de cinética de liberación

Todas las formulaciones del diseño experimental fueron llevadas a estudios de liberación *in vitro*, con el fin de evaluar el comportamiento de las micropartículas de BPMX como sistemas de liberación controlada. Se compararon ambos bloques experimentales con el fin de observar la reproducibilidad del método de obtención de las micropartículas. Se calculó el porcentaje acumulado de fármaco liberado desde las micropartículas al medio receptor en diferentes tiempos de ensayo. La figura 30 muestra los perfiles de liberación de PMX desde las micropartículas en las diferentes formulaciones del diseño experimental.

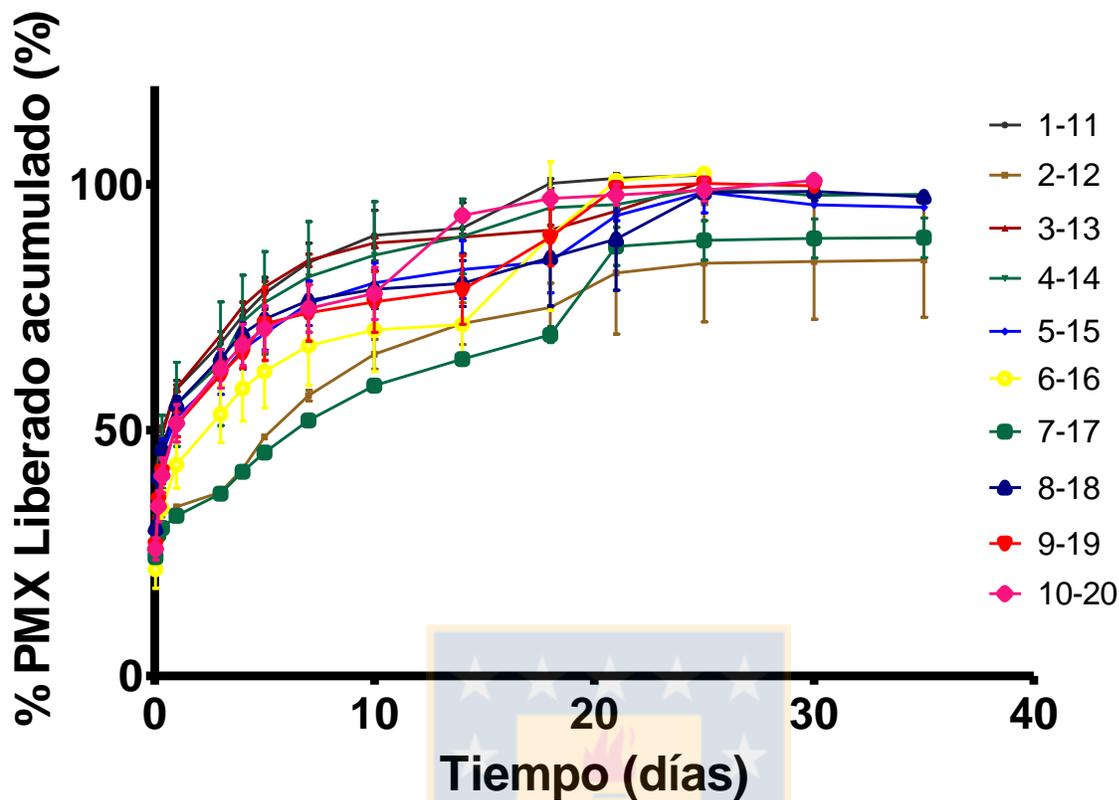


Figura 30: Gráfica de cinéticas de liberación desde el diseño experimental. Estas están graficadas según el promedio de los experimentos y su símil del segundo bloque. Fuente: elaboración propia.

El efecto burst en todos los casos fue alto, llegando al 60 % en algunos casos, desde ese punto comienza la liberación controlada del fármaco (cinética bifásica). Debido al pequeño tamaño (< a 3,5  $\mu\text{m}$ ) que presentan las micropartículas, el fármaco difunde rápidamente desde la matriz al medio receptor.

A los 30 días de estudio se ha liberado entre un 76-100 % de fármaco desde las micropartículas. Los 20 set de datos juntos fueron analizados mediante “DDSolver” adaptándolo al modelo de *Korsmeyer-Peppas* (el de mejor ajuste en la formulación optimizada), obteniéndose un  $R^2$  entre 0,8093-0,9924 mostrando distintos niveles de

correlación al modelo de liberación. La liberación en general se mantuvo constante hasta aproximadamente los 20 días, donde algunas formulaciones comenzaron a tener una liberación mucho más lenta y otras tuvieron un comportamiento errático donde liberaron mucho fármaco en un corto intervalo.

### 5.3 Caracterización de las micropartículas optimizadas

#### 5.3.1 Microscopía electrónica de barrido

Se analizó la morfología de las micropartículas optimizadas mediante SEM (Figuras 31, 32 y 33):

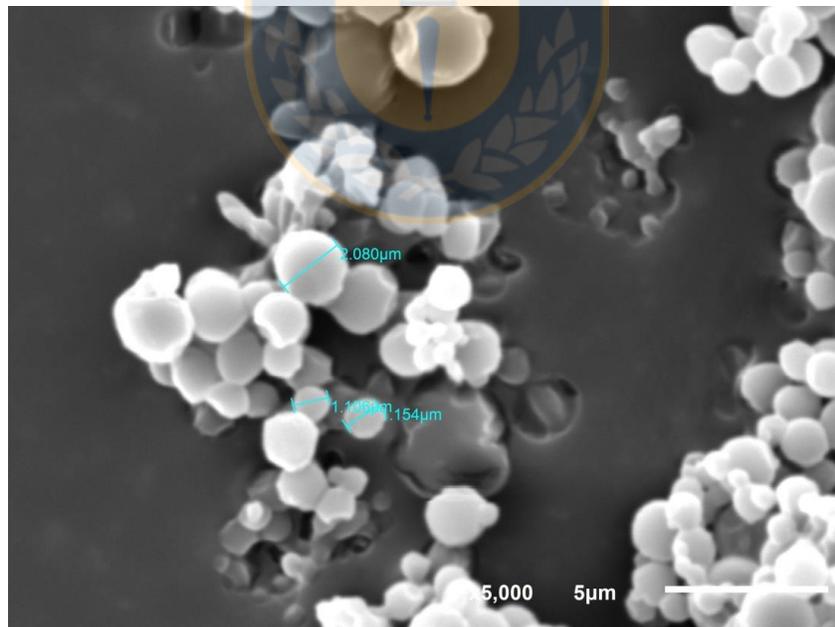


Figura 31: Fotografía de muestra optimizada a 5000x de aumento. Fuente: elaboración propia.

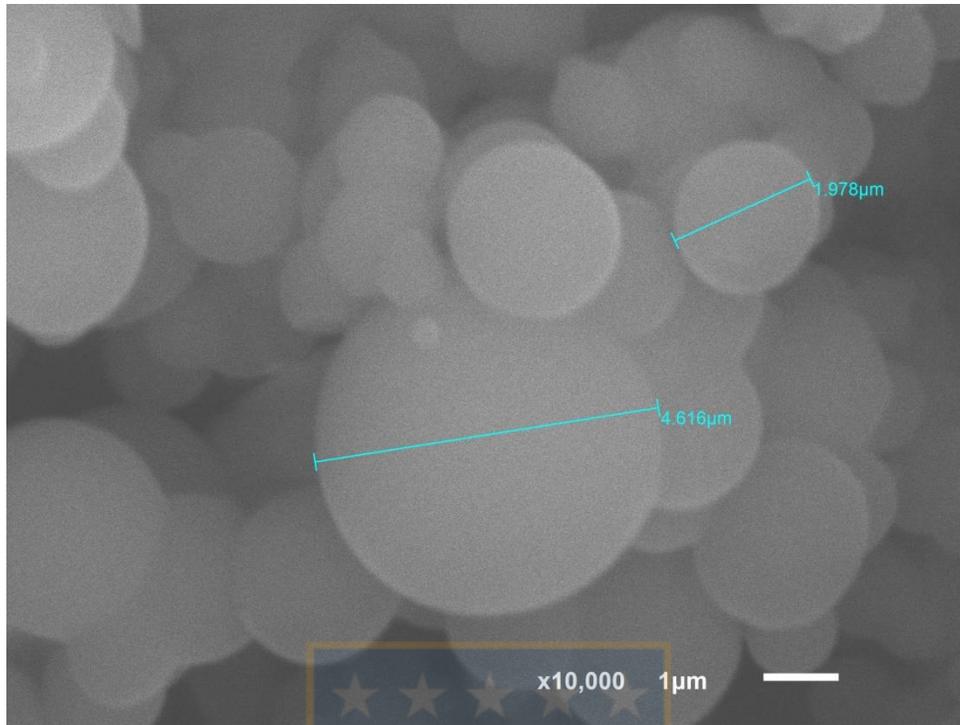


Figura 32: Fotografía de muestra optimizada a 10000x de aumento. Fuente: elaboración propia.

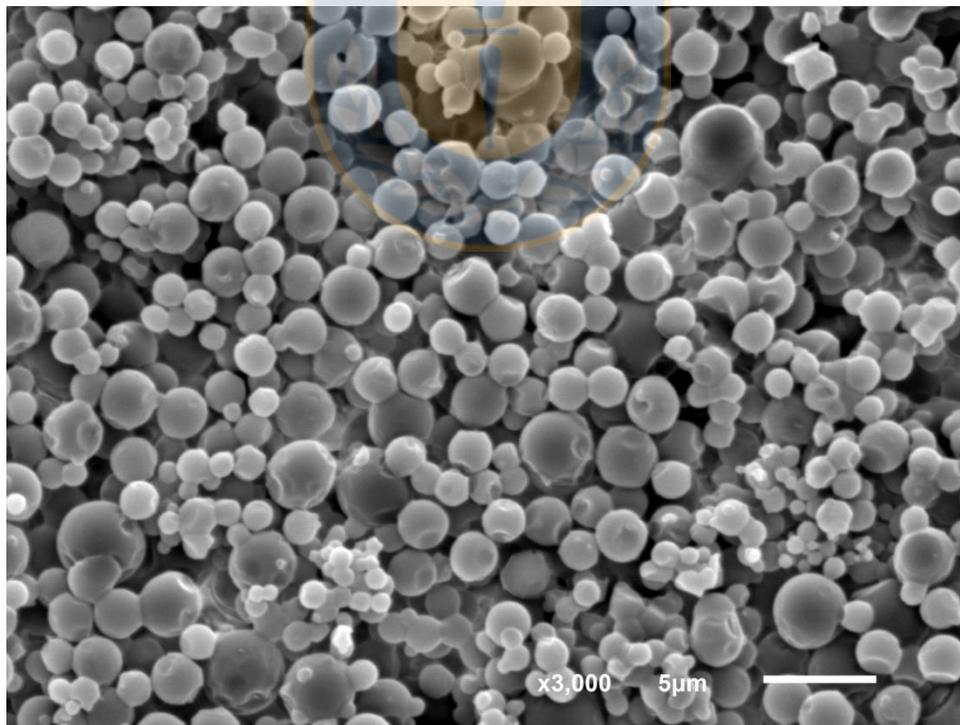


Figura 33: Fotografía de muestra optimizada a 3000x de aumento. Fuente: elaboración propia.

Las micropartículas presentan forma esférica y superficie lisa, relativamente homogéneas. También se observan aglomerados de partículas. Las deformaciones o invaginaciones observadas en las microfotografías corresponden solamente al efecto de la aglomeración de las mismas debido a que se encontraban pegadas unas con otras. En las micropartículas no se observaron cristales de fármaco en la superficie, tampoco restos de polímeros ni poros en la estructura externa de las micropartículas, por último la morfología interna no pudo ser revisada, por lo que no se puede aseverar si se obtuvieron microesferas o microcápsulas. Para las formulaciones de depósito se considera óptimo una superficie lisa, sin poros y esférica, ya que estos atributos permiten a las partículas liberar su contenido de una forma más predecible y constante en el tiempo <sup>(112)</sup> <sup>(113)</sup>.



### 5.3.2 Distribución de tamaño de partículas

Los datos obtenidos para la formulación optimizada están representados en la tabla 27 y los la figura 34 donde se revisa la distribución en número que es la más cercana al valor real de tamaño y un histograma del mismo.

Tabla 27: Comparativa de tamaños entre micropartículas medidas por microscopia óptica y mediante difracción láser (n=3). Fuente: elaboración propia.

Exp.	Diámetro óptico (µm)	Diámetro Volumétrico (µm)	Diámetro Número (µm)	Diámetro Área (µm)
Optimizadas	1,76 ± 0,69	26,20 ± 2,79	6,27 ± 0,18	15,79 ± 1,95
Blancas	2,05 ± 0,54	13,62 ± 8,99	0,82 ± 0,10	6,91 ± 5,88

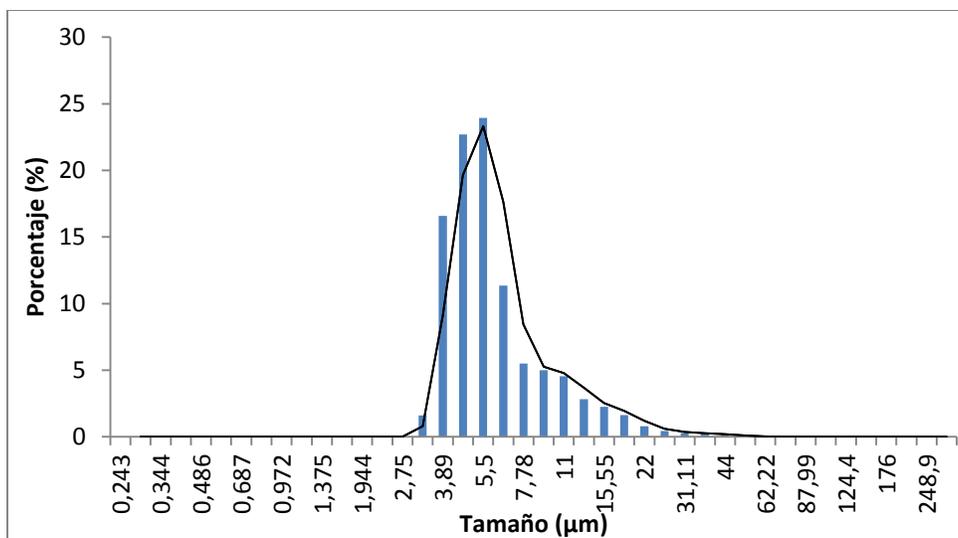


Figura 34: Histograma obtenido en número para la formulación optimizada. Fuente: elaboración propia.

Es deseable para las micropartículas maximizar el tamaño lo más posible, esto debido a que se convierten en mejores depósitos para el fármaco encapsulado y estas cederían por más tiempo, haciendo su liberación más sostenida en un intervalo mayor de tiempo <sup>(112)</sup>. Se observa una distribución monomodal muy parecida a lo que sería una distribución normal. También se calculó el índice de polidispersión (índice Span) de las partículas mediante la ecuación 14:

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

Ecuación 14: Cálculo de índice Span. D representa el diámetro de partícula al 10%, 50% y 90% de la distribución estadística de las mismas. Adaptada desde: Nueva formulación de pramipexol para el tratamiento del Parkinson; Fuentes C; 2014; UdeC;26.

El resultado indica que un valor mayor a 1 representa una distribución heterogénea, mientras que un valor menor a 1 acusa una distribución homogénea de

tamaño. Esta formulación presentó un índice Span de 1,53 siendo cercano a la unidad, pero acusando una distribución heterogénea de las partículas. Este cálculo adquiere importancia en estos sistemas de liberación controlada debido a que requieren un tamaño homogéneo que permita una liberación constante del fármaco en el tiempo <sup>(132)</sup>.

### 5.3.3 Potencial Z

Los datos de potencial Z en las micropartículas optimizadas se indica en la tabla

28:

Tabla 28: Datos de potencial Z promedio obtenidos desde el equipo Zetasizer®. Fuente: elaboración propia.

Muestra	Potencial Z (mV)
OP1	-55,5 ± 34,3
OP2	-23,2 ± 13,5
OP3	-38,8 ± 11,3

Las distribuciones estadísticas de potencial Z entregaron datos altamente dispersos, esto se observa mejor en la desviación estándar de los potenciales obtenidos, el hecho de estar cerca de un potencial neutro también generaría aglomeración de las partículas contribuyendo a su inestabilidad. El potencial Z óptimo deseado para este tipo de formulaciones es de aproximadamente  $\pm 30$  mV que les permitiría mantenerse separadas entre ellas, potenciales entre -10 y +10 mV se consideran neutros, por lo que tenderían a la aglomeración y desestabilización de las mismas <sup>(115)</sup> <sup>(116)</sup>. Para este caso la alta movilidad de potenciales podría poner en

evidencia un estado de inestabilidad que se observa en la agregación observada en SEM.

## **5.3.4 Interacciones moleculares**

### **5.3.4.1 Difracción de rayos X**

Se obtuvieron los distintos difractogramas (figura 35) para las muestras analizadas por DRX presentando los picos característicos para BPMX, ya que al ser una sustancia de naturaleza cristalina presenta difracción efectiva de rayos X. El PLGA no muestra ninguna clase de pico debido a su naturaleza amorfa <sup>(103)</sup>. Los difractogramas de las mezclas físicas de BPMX:PLGA (50:50 y carga teórica) presentan señales disminuidas provenientes del PMX debido a la concentración a la que este se encuentra en las mezclas. No se observan los picos correspondientes a los cristales de BPMX analizados en estado puro, esto podría deberse a que el fármaco se encuentra a la forma de una dispersión molecular sólida con el polímero, evitando la cristalización de este. Se ha encontrado bibliografía de un suceso similar ocurrido en nanopartículas de dexametasona con PLGA donde estas fueron fabricadas con polímeros de peso moléculas mayor a 12.000 Da. Presentan el mismo comportamiento debido a la formación de una dispersión molecular PLGA-fármaco. Sin embargo estas fueron preparadas por emulsión-evaporación de solvente, pero podrían explicar de cierta manera el suceso ocurrido, también el someterlas al proceso tecnológico puede haber contribuido al apantallamiento de señales, ya que en las mezclas físicas (teórica y 50-

50) el fármaco da señales de que se encuentra presente <sup>(161)</sup>. Se requerirían más experimentos para determinar la génesis de este suceso y encontrar el principal factor involucrado en la desaparición de las señales.

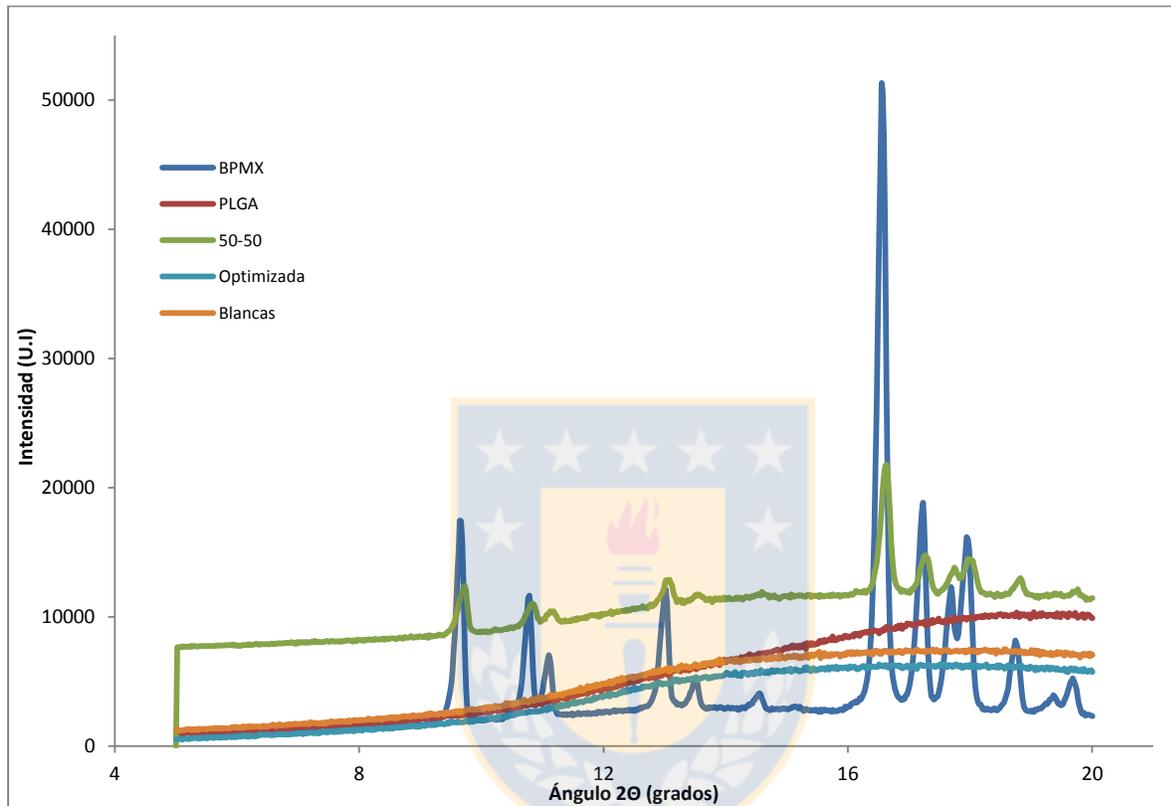


Figura 35: Diffractogramas de rayos X para: BPMX; PLGA; Mezcla 50-50; Micropartículas blancas; Formulación optimizada. Fuente: elaboración propia.

### 5.3.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Las curvas de DSC (figura 36) obtenidas mostraron el comportamiento normal que tienen los componentes por separado y que coinciden con lo revisado bibliográficamente. En el caso del BPMX, se observa un pico endotérmico especialmente intenso a los 130 °C; la información bibliográfica indica la presencia de este pico como producto de la deshidratación de la molécula y otro pico sobre los 200

°C que refleja su punto de fusión y temperatura de descomposición que se observan juntos <sup>(162)</sup>. El pico encontrado a 130 °C se utilizó como confirmación de que el fármaco se encuentra presente tanto en las mezclas físicas como las micropartículas analizadas, ya que el PLGA no presenta un pico de esta naturaleza en los análisis DSC haciéndolo característico del BPMX. El PLGA presentó su temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) característica a los 50 °C aproximadamente, que se ve ligeramente desplazada en las micropartículas blanco (45 °C), y en las micropartículas cargadas con BPMX (50 °C), lo que indicaría que el proceso tecnológico no provocaría cambios en el copolímero.

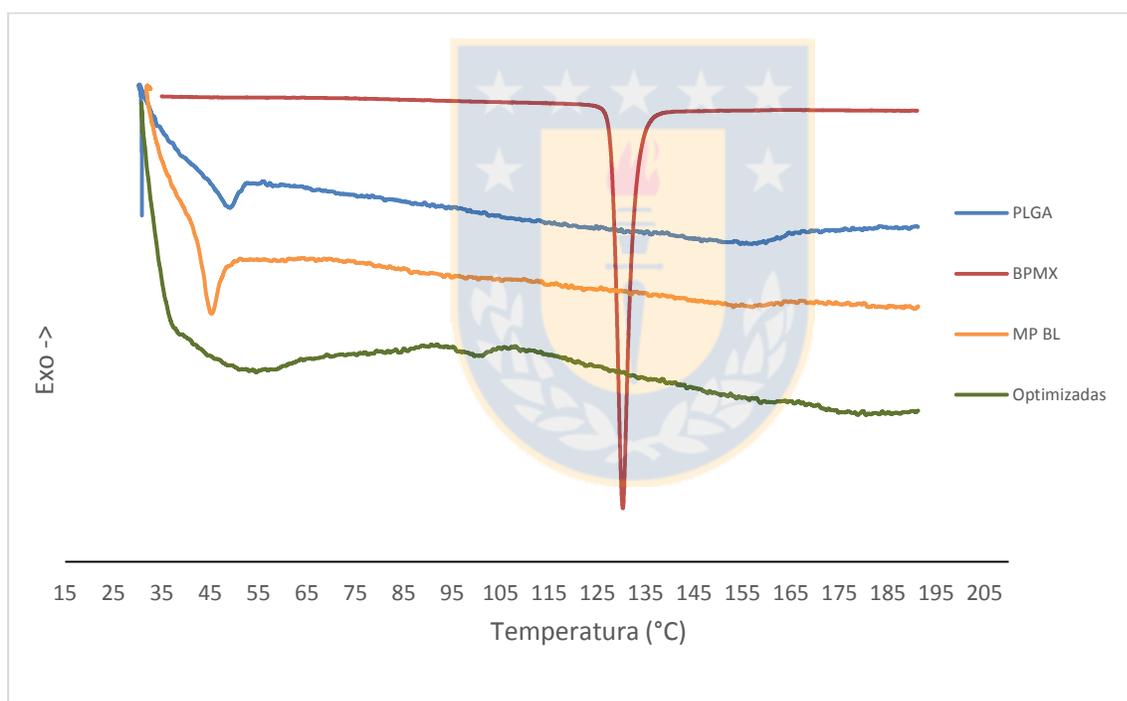


Figura 36: Termogramas para: PLGA; BPMX; Micropartículas blancas; micropartículas optimizadas. Fuente: elaboración propia.

El termograma de las micropartículas cargadas con BPMX muestra que se produce un desplazamiento del pico endotérmico del BPMX a 100 °C, una temperatura

menor a la del fármaco solo, este fenómeno se produciría por el contacto íntimo que se suscita entre fármaco y polímero, debido a que el BPMX se encontraría mayoritariamente disuelto en la matriz polimérica.



### 5.3.4.3 Espectroscopía infrarroja

Los resultados de espectroscopía infrarroja (figura 37) mostraron información congruente entre todas las muestras revisadas. Los análisis del PLGA y BPMX mostraron un espectro casi idéntico a los analizados anteriormente por Fuentes y cols. Esta información se complementa con lo obtenido en DSC y difracción de rayos X para asegurar la no aparición de nuevas especies moleculares producto de la propia interacción entre materiales o reacciones gatilladas por el proceso de preparación.

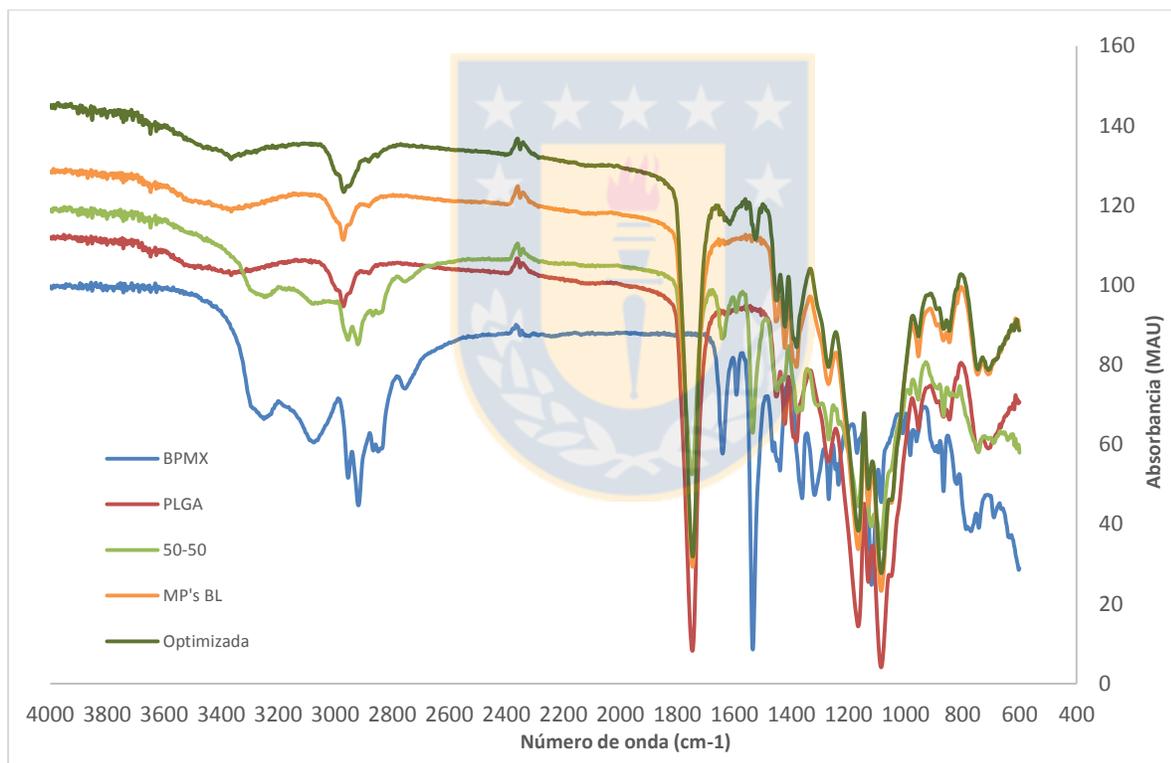


Figura 37: Gráficos de FT-IR para: BPMX; PLGA; Mezcla 50-50, Micropartículas blancas; Micropartículas optimizadas. Fuente: elaboración propia.

Las muestras analizadas mostraron las bandas específicas pertenecientes a sus grupos químicos más característicos. Para el caso del PLGA se observa una banda de

absorción entre los 2800  $\text{cm}^{-1}$  a los 3000  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los grupos  $-\text{CH}=\text{}$ ,  $-\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_3$  de la molécula de PLGA, otra banda muy profunda corresponde al estiramiento del grupo carbonilo a los 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$ , otras bandas presentes entre 1500 y 1250  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a deformaciones de grupos  $-\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_3$ , bandas de alteo entre 1350 y 1150  $\text{cm}^{-1}$ , y por último el estiramiento del éster láctico-glicólico entre 1300 y 1150  $\text{cm}^{-1}$  superpuesto entre las últimas bandas mencionadas <sup>(163)</sup>.

El BPMX presenta las bandas esperables a su estructura química, donde a los 3300  $\text{cm}^{-1}$  y 3150  $\text{cm}^{-1}$  se observa el estiramiento de la amina primaria de la molécula. A los 2900  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda perteneciente al grupo aromático de la molécula y un pico a los 1650  $\text{cm}^{-1}$  que correspondería a la flexión de la amina primaria, otro grupo se encuentra a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  que correspondería con enlaces dobles carbono-carbono y a los 1450  $\text{cm}^{-1}$  otra banda de flexión de grupos  $-\text{CH}_2-$ .

La revisión comparativa de los espectros de manera simultánea, no acusa la aparición de eventos significativos (formación de enlaces o degradaciones moleculares). Sin embargo, se observa la disminución de la señal para el BPMX que se encontraría a la décima parte de lo que se observaría en su espectro puro, llegando a casi eliminar algunos picos de menor intensidad, esto se refleja en el pico a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  y en los picos que aparecen entre 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$ , donde hay una disminución de la intensidad.

A modo de resumen, los estudios de interacciones moleculares entregaron la información de que no hay mayores cambios químicos implicados al someter los

componentes de la formulación al proceso tecnológico de secado por atomización, donde FT-IR no reportó la aparición de nuevos enlaces, DSC no entregó mayor información sobre cambios de cristalinidad o estado amorfo y solamente el examen de DRX entregó una pequeña discrepancia que se puede asociar a que el fármaco se encuentra en una dispersión sólida evitando la cristalización del mismo anulando la señal de este.



## 5.4 Evaluación *in vitro* de las micropartículas mediante cinética de liberación y su adecuación a modelos cinéticos conocidos

Los resultados del estudio de liberación *in vitro* se muestran en la figura 38:

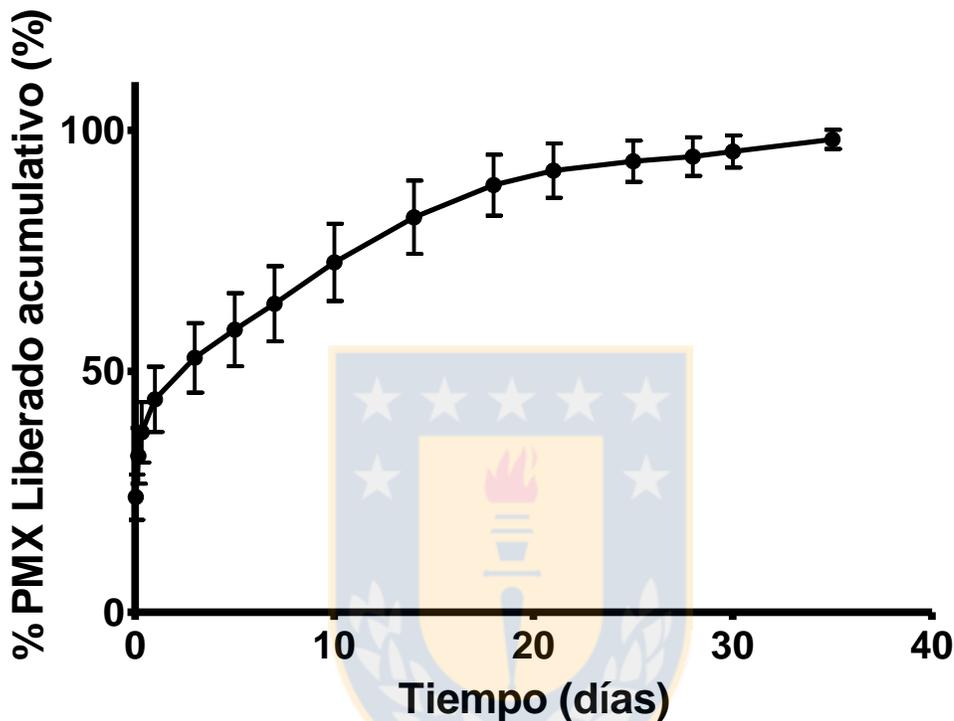


Figura 38: Cinética de liberación para formulación optimizada realizada a 3 lotes ( $n=2$ ). Fuente: elaboración propia.

Se observa una liberación rápida (efecto burst) de aproximadamente del 44% en las primeras 24 horas del experimento, seguido de una liberación constante en el tiempo desde las 72 horas hasta los 18 días, donde se observa una tendencia casi lineal de comportamiento que disminuye su velocidad y que finaliza a los 35 días. La liberación presenta una baja desviación en todas las muestras analizadas.

Los datos analizados mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas fueron graficados como un promedio de todas las curvas (figura 39) y sus constantes experimentales obtenidas individualmente junto a sus promedios. Los coeficientes de ajuste ( $R^2$ ) están presentados en la tabla 29. Todo este análisis y revisión estadística fue realizada mediante el complemento "DSSolver" para Microsoft Excel.

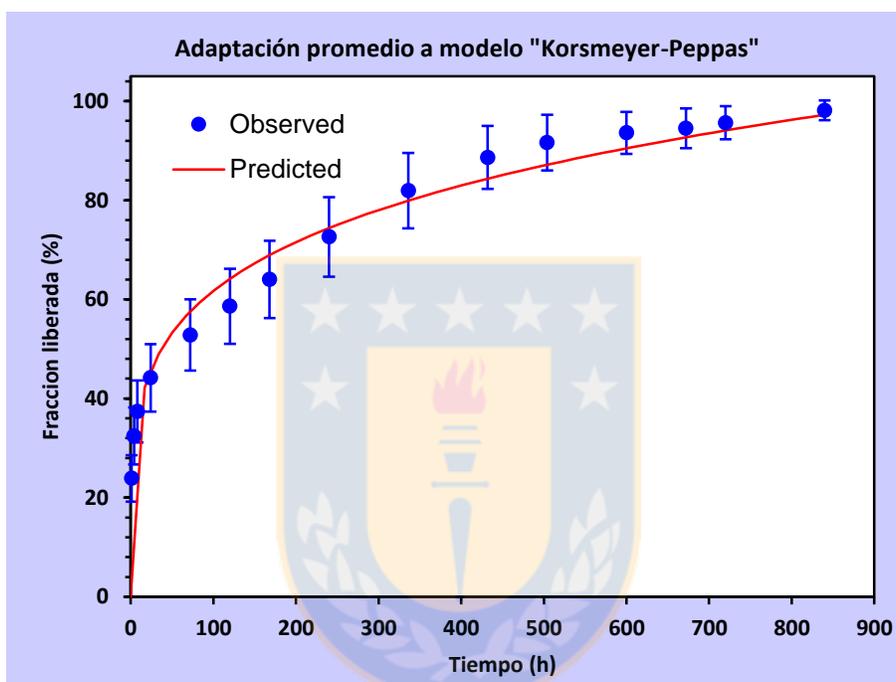


Figura 39: Gráfica de adaptación estadística a modelo de Korsmeyer-Peppas. Se analizaron los 6 set de datos juntos ( $n=6$ ; 3 lotes por duplicado). Fuente: elaboración propia.

Tabla 29: Datos obtenidos desde el análisis estadístico adaptado al modelo Korsmeyer-Peppas ( $n=6$ ; 3 lotes por duplicado). Fuente: elaboración propia.

Parámetro	OP1	OP2	OP3	OP4	OP5	OP6	Promedio
<b>kKP</b>	27,54	25,64	26,25	26,80	16,50	17,12	23,31 ± 5,08
<b>n</b>	0,19	0,21	0,19	0,19	0,26	0,25	0,22 ± 0,03
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9871	0,9885	0,9819	0,9759	0,9744	0,9720	
<b>R<sup>2</sup> ajust.</b>	0,9861	0,9876	0,9805	0,9740	0,9725	0,9698	

El modelo Korsmeyer-Peppas fue el mejor adaptado entre todos los modelos revisados con el software (orden cero, primer orden, Higuchi, Hixson-Crowell, Hopfenberg, Baker-Lonsdale y Peppas-Sahlin), otros modelos mostraron coeficientes más bajos que este. La tabla 31 pone en evidencia la adaptación de los demás modelos probados y comprueba que el mejor ajuste se obtiene mediante Korsmeyer-Peppas. Asimismo, según las aseveraciones del modelo, el coeficiente “n” obtenido acusaría una difusión Fickiana del principio activo al medio receptor, lo que significa que se ve influenciado directamente por la gradiente de concentración del fármaco de un espacio a otro.

Tabla 30: Ajuste de otros modelos probados. Se adjunta el mejor valor obtenido de las 6 muestras analizadas. Fuente: elaboración propia.

<b>Modelo</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R2 Ajustado</b>
<b>Orden cero</b>	0,2130	0,2130
<b>Primer Orden</b>	0,7387	0,7387
<b>Higuchi</b>	0,8440	0,8440
<b>Hixson-Crowell</b>	0,6970	0,6970
<b>Hopfenberg</b>	0,7213	0,6999
<b>Baker-Lonsdale</b>	N.D	N.D
<b>Peppas-Sahlin</b>	0,9508	0,9427

Los demás modelos probados son altamente utilizados en liberación de fármacos desde distintas matrices por lo que su selección fue apropiada, a pesar de que estos tengan un ajuste menor al utilizado tienen amplio nicho en la investigación farmacéutica lo que justificaba su aplicación.

## **5.5 Desarrollo y validación de metodología analítica HPLC para la cuantificación de pramipexol en matriz biológica**

### **5.5.1 Pruebas preliminares**

Luego de trabajar con las columnas ya mencionadas (punto 4.4.1), finalmente se seleccionó la columna de silica, esto debido a un efecto “carry-over” que se produjo en todas las demás columnas probadas. También se tomó en cuenta el tiempo de retención que debía ser lo más corto posible y que se pudiera separar bien del estándar interno utilizado.

#### **5.5.1.1 Elección de un estándar interno**

Los estándares internos probados junto al PMX, fueron: ranitidina, famotidina, lidocaina, memantina, clorpromazina, carbamazepina.

Estos fueron los que mostraron mejores propiedades de elución tales como el tiempo de retención, simetría del pico (ancho y alto), y su resolución frente al PMX, teniendo en cuenta otro factor importante que es la extracción del fármaco, que debe ser siempre constante y reproducible en el tiempo. Finalmente, se optó por la lidocaína como estándar interno ya que presentó un pico simétrico, y bien resuelto frente al PMX, sumado a su recuperación constante desde la matriz.

### 5.5.1.2 Elección de la fase móvil

Se ensayaron diferentes fases móviles compuestas por mezclas acuosas de solventes orgánicos como metanol y acetonitrilo. La fase móvil de trabajo se seleccionó bajo el criterio de que esta debe eluir rápido el analito, ya que el cromatógrafo a utilizar solo acepta un flujo máximo de 0,4 mL/min y si se utilizaba un flujo mayor, esta debía circular por un “splitter” que redirige el exceso de flujo a un desagüe, perdiéndose muestra y sensibilidad en el proceso. Al final, se seleccionó una fase móvil que contenía metanol con ácido fórmico en agua al 0,1 % (pH  $2,15 \pm 0,05$ ) en proporción 35:65 % v/v a 35 °C (temperatura de horno). Esta eluyó bien el PMX y el estándar interno separándolos totalmente con buena resolución, un tiempo de corrida de 12 min con picos simétricos.

Otros métodos fueron descartados por el alto tiempo de retención de ambas moléculas que alargaba excesivamente el tiempo de corrida, también el hecho de que se trabajaba a un flujo bajo lo hizo un criterio a tomar en consideración.

Con las condiciones indicadas anteriormente, PMX y SI presentaron tiempos de retención de 8,5 min y 9,8 min, respectivamente. La resolución entre ambos picos fue de  $> 2$  y los factores de cola fueron 1,506 y 1,498 para PMX y SI, respectivamente siendo calculados automáticamente por el software del equipo.

### 5.5.1.3 Elección de un método de extracción

En la elección de un método de extracción es fundamental que este proporcione resultados reproducibles, con una elevada recuperación del analito y con baja o nula presencia de interferentes. El método también debe ser simple y fácil de ejecutar por el analista.

En primer lugar se probó inyectando directamente el plasma al sistema cromatográfico. Previo a esto, el plasma fue centrifugado e inyectado directamente al equipo, pero fue descartado debido a la gran cantidad de interferentes presentes en la muestra y que se traducían en una gran cantidad de picos en el cromatograma. Por otro lado, se podría producir un mayor desgaste de la columna cromatográfica en el tiempo haciéndolo poco viable para implementarlo de rutina.

Buscando obtener una alta recuperación de los analitos y con la menor presencia de interferente posibles se ensayó con un método de extracción líquido-líquido con solventes orgánicos puros y mezclas de estos, en diferentes proporciones. En investigaciones previas, el fármaco y el estándar interno se recuperaron mediante extracción líquido-liquido desde la fase acuosa a un solvente orgánico para luego evaporarlo y reconstituirlo en la fase móvil de trabajo <sup>(133)</sup> <sup>(134)</sup> <sup>(135)</sup> <sup>(136)</sup> <sup>(137)</sup> <sup>(139)</sup>. En este trabajo, en todos los casos se obtuvieron recuperaciones de analito y SI menores a 75 % y con una elevada variabilidad. Por estos resultados se descartó esta forma de recuperar el fármaco desde el suero de rata.

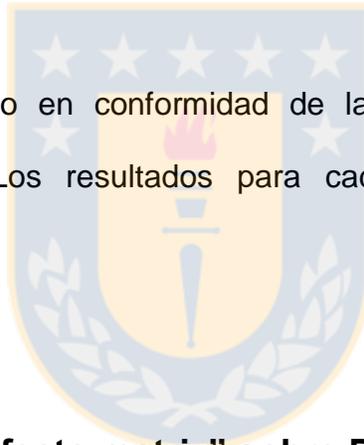
Finalmente, se utilizaron columnas de extracción en fase solida (SPE) Oasis®HLB (30 mg), que contienen un relleno polimérico con características hidrófilas y

lipófilas, donde el analito es retenido para posteriormente ser recuperado con un solvente adecuado <sup>(138)</sup> <sup>(141)</sup>. En vista a los resultados obtenidos con los procedimientos anteriores, se optó por la técnica de SPE. Se adaptó un método reportado en literatura con algunas modificaciones <sup>(137)</sup>.

Con la técnica de SPE se obtuvieron recuperaciones de 87 % para PMX y 67 % para SI, sin arrastrar sustancias indeseables que pudieran provocar picos interferentes.

### **5.5.2 Validación del método**

El método fue validado en conformidad de las directrices de la ICH para metodologías bioanalíticas. Los resultados para cada apartado se enumeran a continuación.



#### **5.5.2.1 Evaluación del “efecto matriz” sobre PMX e IS**

El efecto matriz fue evaluado mediante la comparación de 2 curvas (analítica y en matriz) de 3 puntos (25, 250 y 500 ng/mL) e inyectadas al equipo. Los datos se pueden observar en la figura 40. Los resultados arrojaron diferencias cada vez más importantes entre las concentraciones a medida que estas aumentan. Por lo tanto, se infiere que existe un efecto matriz que puede afectar los resultados finales. La gráfica obtenida sugiere hacer todo el proceso de validación en matriz.

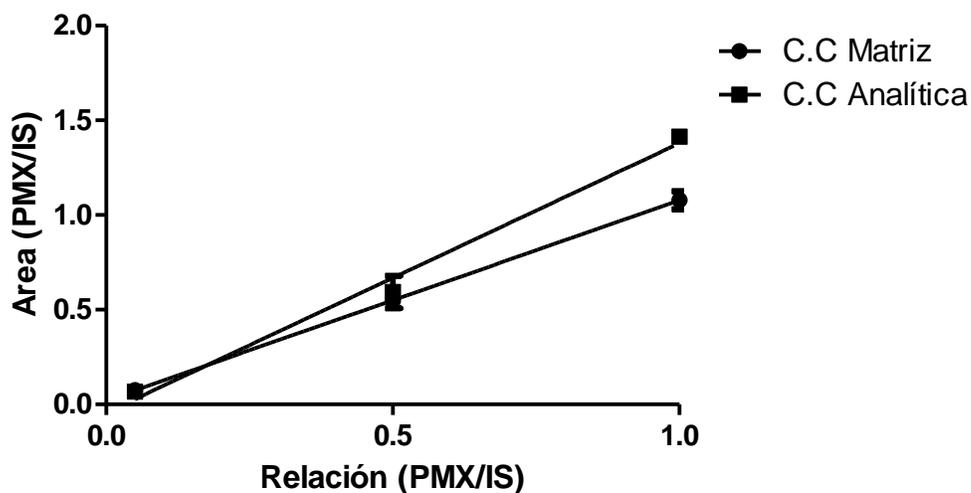


Figura 40: Gráfica de curvas de calibración para revisión de efecto matriz. Se inyectó 2 veces cada punto por cada concentración. Fuente: elaboración propia.

### 5.5.2.2 Linealidad

Luego de la revisión del efecto matriz, se acotó el rango de la curva de calibración a 250 ng/mL como máximo, y también se redujo la concentración del IS a 100 ng/mL. Se realizó este cambio ya que se visualizó que difícilmente las concentraciones de PMX podrían llegar más alto que este límite debido a la depuración que podría tener el fármaco. También se disminuyó la concentración del IS para afectar de menor manera las proporciones entre las áreas con el fármaco (figura 41).

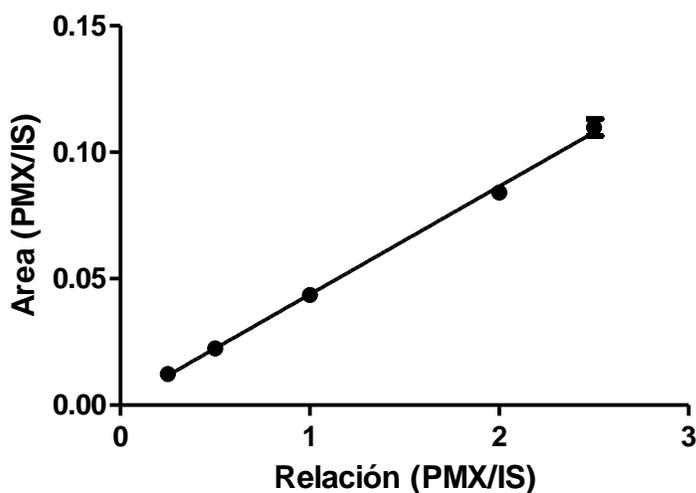


Figura 41: Gráfica de curva de calibración obtenida, comprendida entre 25-250 ng/mL. Fuente: elaboración propia.

El análisis de regresión lineal y el ANOVA de una vía se realizaron para corroborar la correlación de los datos (tablas 31 y 32):

Tabla 31: Análisis de regresión lineal para la curva de calibración obtenida. Fuente: elaboración propia.

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico-t	Valor-P
Intercepto	0,001053	0,00112696	0,634373	0,3671
Pendiente	0,0127249	0,000074183	57,652	0,0000

Tabla 32: Análisis por ANOVA a la curva de calibración obtenida. Fuente: elaboración propia.

Parámetro	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor-p
Regresión	0,020536	1	0,020536	3323,75	0,0000
Residual	0,0000803211	13	0,00000617855		
Total	0,0206163	14			
Coefficiente de correlación	0,99805				
R <sup>2</sup>	0,996104				
R <sup>2</sup> Ajustado	0,995804				
Error estándar	0,00248567				

La ecuación de relación entre la concentración de PMX/IS (eje X) y el área PMX/IS (eje Y) fue:  $Y = 0,0427x + 0,0011$ . El error estándar fue de 0,00249 y la curva fue lineal con un  $p < 0,005$ .

El análisis de varianza muestra una distribución aleatoria para todas las muestras revisadas entrega una relación fuerte entre las variables. El valor p al ser menor que 0,05 muestra una relación estadísticamente significativa entre la relación de áreas y la relación de las concentraciones de la curva en el rango efectivo.

### **5.5.2.3 Precisión**

La precisión fue expresada en términos de coeficiente de variación (CV).

#### **5.5.2.3.1 Precisión instrumental**

La muestra de 100 ng/mL fue inyectada 6 veces y se obtuvo un C.V. de 4,5 % en las 6 medidas, lo que se considera aceptable según los criterios de validación empleados.

### 5.5.2.3.2 Repetibilidad y precisión intermedia

Los valores de CV para la repetibilidad entre 0,22 - 9,28 % y la precisión inter-día entre 3,84 - 12,81 % (tabla 34). Los resultados son acordes a los criterios de aceptación utilizados, por lo que se considera correcto este punto.

Tabla 33: CV % Intra- and Inter-día para PMX/IS. Fuente: elaboración propia.

	Día 1 (CV %)	Día 2 (CV %)	Día 3 (CV %)	Inter-Día (CV %)
25 ng/mL	0,26	1,80	0,24	3,84
100 ng/mL	1,19	9,28	0,22	12,81
250 ng/mL	0,26	0,67	2,53	6,36

### 5.5.2.4 Exactitud

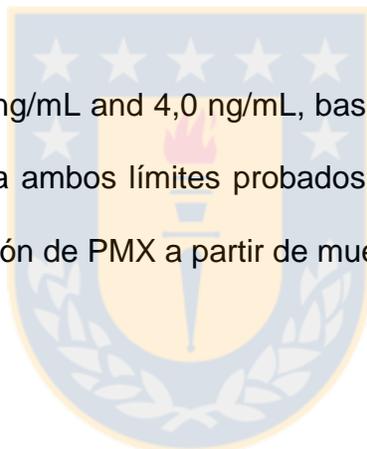
La exactitud se expresó como % de recuperación del analito (tabla 35). Los resultados obtenidos en este estudio dieron lugar a % de recuperación de PMX entre 72,73 – 101,02 %, con un coeficiente de variación total del 12,06 % (CV de todos los niveles). Estos resultados demuestran la exactitud del método planteado. El promedio de recuperación fue del 87 % entre los 3 niveles de concentración que fue aplicado a los resultados finales.

Tabla 34: Datos de recuperación para PMX y su IS. Los datos fueron mostrados como % de recuperación de la concentración nominal. Fuente: elaboración propia.

Concentración (µg/mL)		Recuperación (%)	CV% (%) (n=3)
Agregado	Recuperado		
25	19,13	76,50	7,88
25	21,17	84,69	
25	20,88	83,49	
100	79,78	79,78	11,45
100	72,73	72,73	
100	91,03	91,03	
250	252,55	101,02	2,42
250	244,87	97,95	
250	239,38	92,69	

### 5.5.2.5 LOQ y LOD

LOD y LOQ fueron 0,4 ng/mL and 4,0 ng/mL, basados en la relación señal-ruido, este es el valor más bajo para ambos límites probados. Estos valores son adecuados para la detección y cuantificación de PMX a partir de muestras de suero de rata.



### 5.5.2.6 Especificidad

Se inyectaron muestras de suero de rata con y sin fármaco, y se sometieron a los dos modos de ionización del equipo: SIM y MRM. En el modo SIM se analizó una muestra de suero blanco + PMX e IS (figura 42), y se observaron picos justo en el tiempo de elución del IS, por lo que se descartó este modo de ionización, cabe destacar que el pico era móvil por lo que su ubicación era aleatoria y correspondía a una especie de m/z 212. En modo MRM no se presentaron picos en el cromatograma de la muestra de suero blanco (figura 43).

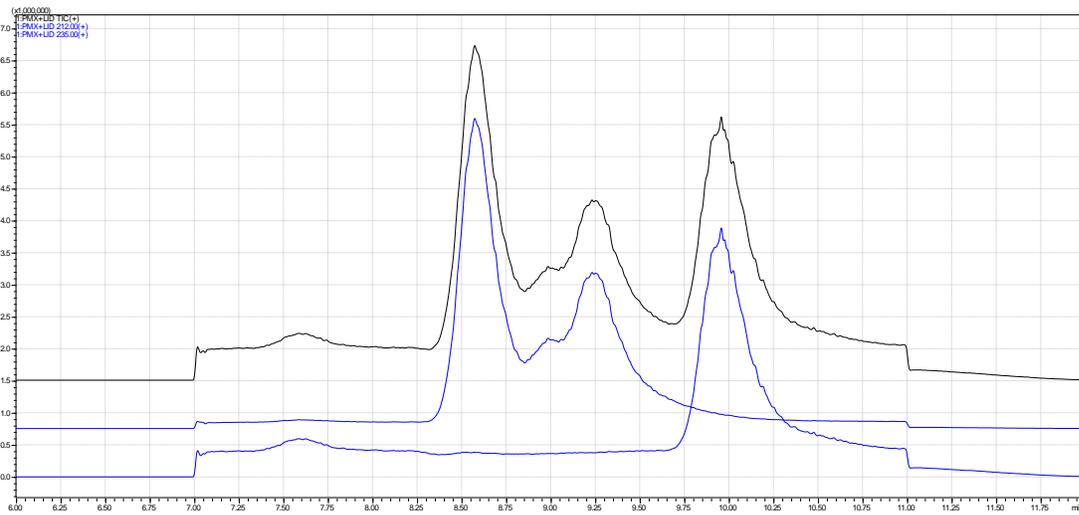


Figura 42: Cromatograma SIM de suero blanco + PMX e IS a 250 ng/mL. Cromatograma superior: Vista general; Cromatograma medio: especies m/z 212; Cromatograma inferior: especies m/z 235. Fuente: elaboración propia.

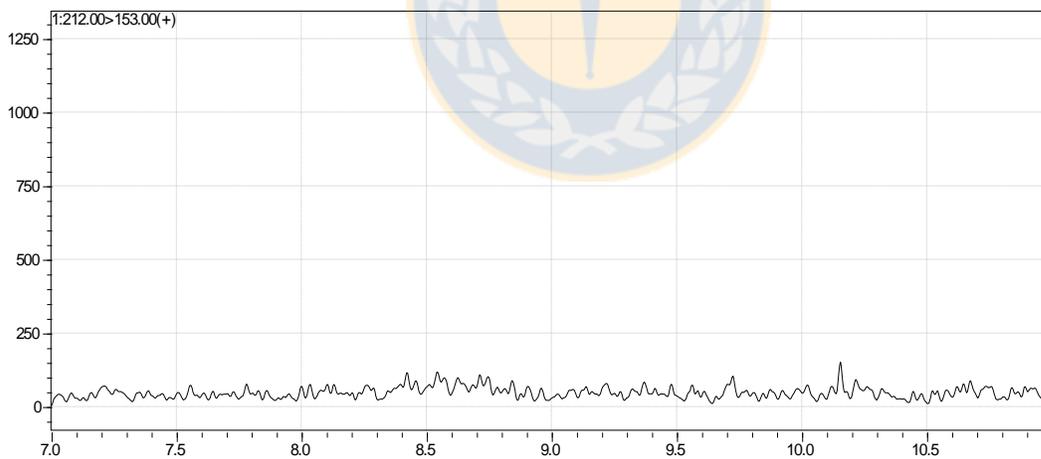


Figura 43: Cromatograma MRM de suero blanco. Fuente: elaboración propia.

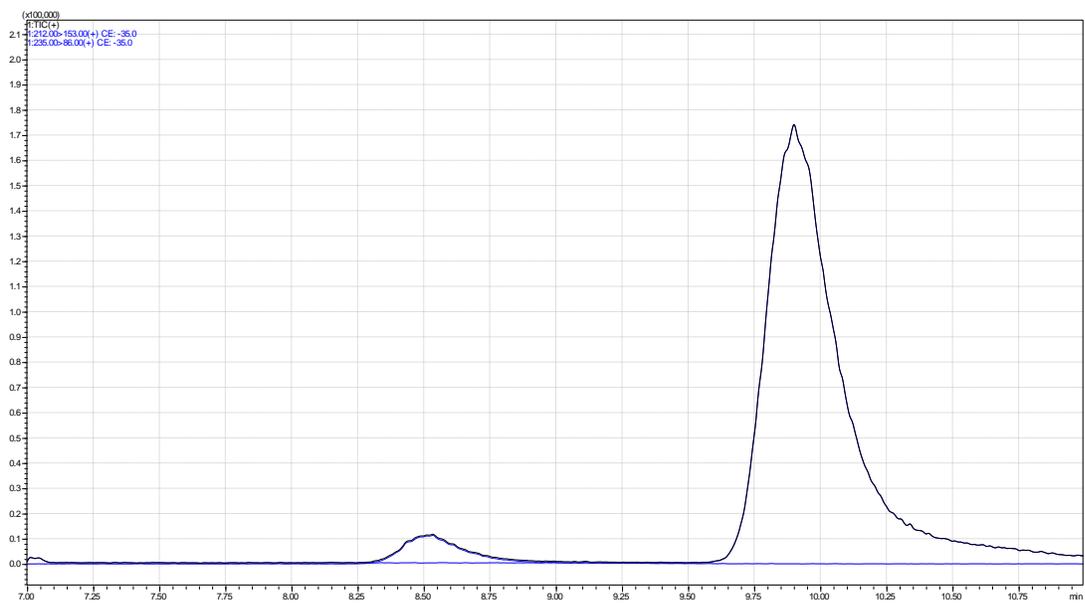


Figura 44: Cromatograma MRM de suero blanco + PMX 100 ng/mL + IS. A los 8,5 min se observa el PMX e IS aparece a los 9,8 min. Fuente: elaboración propia.

Como se muestra en la figura 44, PMX y IS eluyen a 8,5 min y 9,8 min respectivamente, con una resolución  $> 2$ , lo que es aceptable. En los cromatogramas mostrados no eluye ningún interferente en los tiempos de elución de los analitos, por lo que este criterio de validación se considera aprobado.

Luego de cumplir con todo este conjunto de parámetros a cabalidad, el método se considera validado y apto para la cuantificación de PMX en suero de rata.

### 5.5.3 Utilidad del método

El método HPLC-MS desarrollado y validado ha sido utilizado para la cuantificación de PMX en muestras de plasma de rata obtenidas después de la administración subcutánea de una dosis única de 1mg/kg. Estos datos se usaron para la determinación de parámetros farmacocinéticos importantes:  $C_0$ ,  $t_{1/2}$ ,  $K_0$  y AUC.

Las muestras fueron extraídas según el método descrito en el punto 4.4.4. Debido a que se administró una dosis muy baja de fármaco en los animales, que es el equivalente a la dosis usada en humanos, se obtuvieron concentraciones de fármaco muy bajas en las muestras de suero, por lo cual sólo fue posible cuantificar hasta la tercera muestra del estudio farmacocinético, es decir hasta las 4 horas. Se obtuvo la representación gráfica para las muestras a continuación (figuras 45 y 46):

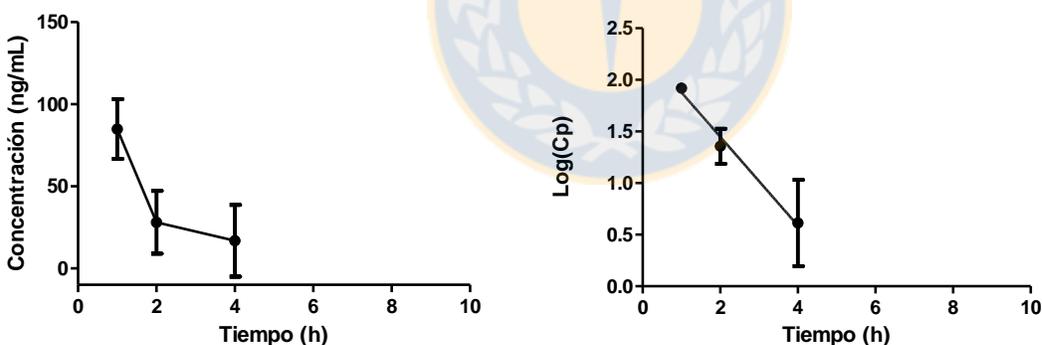


Figura 45 y 46: Perfil farmacocinético de muestras analizadas. Se detallan las gráficas de concentración vs tiempo y Log(Cp) vs tiempo. Fuente: elaboración propia.

Se calculó la ecuación de la recta para el gráfico obtenido  $\text{Log}(C_p)$  vs tiempo arrojando los siguientes valores (Tabla 35).

Tabla 35: Valores de la ecuación de la recta para la curva obtenida. Fuente: elaboración propia.

Ecuación de la recta	Muestras
<b>mx</b>	-0,2163
<b>b</b>	2,040

Luego de obtener la ecuación de la recta se procedió a calcular las constantes farmacocinéticas mostradas en la tabla 36.

Tabla 36: Constantes farmacocinéticas obtenidas desde el gráfico 46. Fuente: elaboración propia.

	Muestras
<b>Cp<sub>0</sub> (ng/mL)</b>	109,65
<b>K<sub>e</sub> (1/h)</b>	0,498
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	1,39
<b>AUC</b>	220,18

A pesar de tener solamente 3 puntos el fármaco mostró una tendencia esperable para lo que es una administración mediante una inyección bolus, correspondiendo a una eliminación de primer orden del fármaco. Esto se ha observado en otras publicaciones relacionadas al tema, teniendo como diferencia principal que otras técnicas desarrolladas han podido medir hasta pg/mL. El PMX es eliminado completamente a las 8 horas de haber sido inyectado, esto es concordante con la información obtenida en humanos donde la vida media del fármaco es de 8-12 horas, evidenciando una mayor eliminación en ratas.

Asimismo se debe insistir en que este estudio es meramente tendencial y apunta al comportamiento del PMX en ratas. Para obtener resultados más robustos, se requeriría un estudio de mayor envergadura con un mayor número de animales.

Por último, el contar con contra-muestras permitió hacer un arreglo adicional a la metodología implementando una fase de concentración en un concentrador de vacío por 200 minutos a 80 °C después de la extracción con el fin de poder cuantificar a mayores intervalos de tiempo. El nuevo paso agregado dejaría el esquema de extracción de esta manera (figura 47):

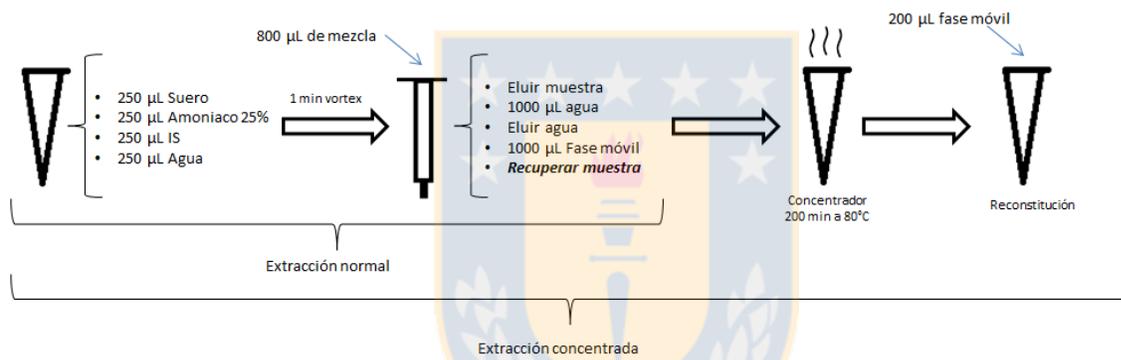


Figura 47: Esquema de SPE para PMX + IS con concentración de muestra. Fuente: elaboración propia.

Los perfiles farmacocinéticos obtenidos a partir de las muestras concentradas se muestran en los gráficos 48 y 49:

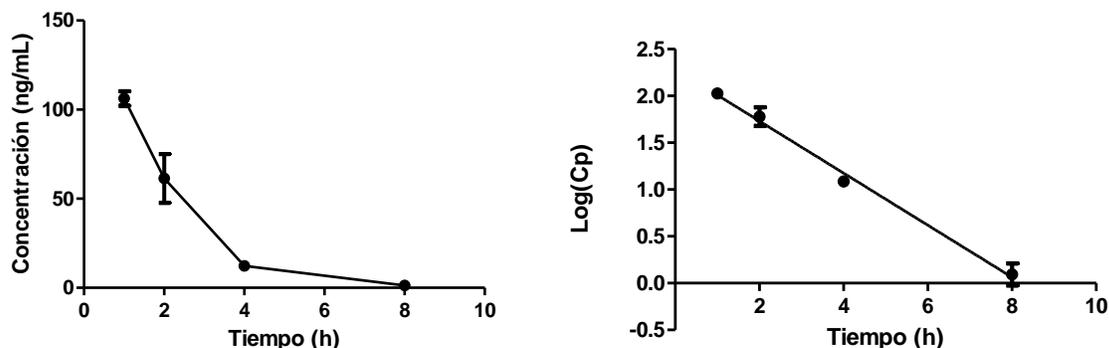


Figura 48 y 49: Perfil farmacocinético de muestras concentradas. Se detallan las gráficas de concentración vs tiempo y Log(Cp) vs tiempo. Fuente: elaboración propia.

Procediéndose de igual manera que con las muestras anteriores se calculó la ecuación de la recta a partir del gráfico logarítmico (Tabla 37) y en base a esta se calcularon las constantes farmacocinéticas (tabla 38).

Tabla 37: Valores de la ecuación de la recta para las muestras concentradas. Fuente: elaboración propia.

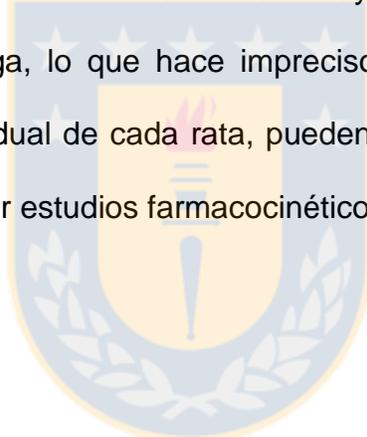
Ecuación de la recta	Muestras
<b>mx</b>	-0,2774
<b>b</b>	2,293

Tabla 38: Constantes farmacocinéticas obtenidas desde las muestras concentradas. Fuente: elaboración propia.

	Muestras conc.
<b>Cp<sub>0</sub> (ng/mL)</b>	196,33
<b>K<sub>e</sub> (1/h)</b>	0,1204
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	5,76
<b>AUC</b>	1630,45

Se puede observar una diferencia entre las constantes farmacocinéticas de las muestras procesadas y las muestras concentradas, el paso de concentración aplicado al segundo grupo de muestras pudo entregar un punto más para las curvas farmacocinéticas teniendo una mejor representación estadística, sin embargo, este se debería someter a un proceso de validación para corroborar la veracidad de los datos obtenidos antes de utilizarse de rutina.

La extracción de las muestras se hizo correctamente mediante este procedimiento, las variaciones que surgieron en las concentraciones graficadas pueden deberse a la inyección de fármaco realizada a las ratas ya que esta se hace midiendo la cantidad a inyectar con jeringa, lo que hace impreciso el cálculo de dosis exacta y sumado al metabolismo individual de cada rata, pueden ser una fuente de variabilidad considerable a la hora de hacer estudios farmacocinéticos.



## 6 Conclusiones

Se lograron elaborar micropartículas biodegradables de PLGA conteniendo pramipexol base, mediante la técnica de secado por atomización, utilizando una solución de polímero junto al fármaco disueltos en diclorometano. Se probaron diferentes formulaciones de partida, tales como: soluciones, emulsiones simples O/W y W/O, emulsiones dobles W/O/W y suspensiones de fármaco en el solvente. Asimismo, se trabajó con el fármaco en su forma diclorhidrato y su forma base. Finalmente, se obtuvieron los mejores resultados cuando se utilizó como formulación de partida una solución, compuesta por PLGA al 4 % y PMX base 0,4 % (carga teórica 9 %). Las condiciones de proceso fueron: T° entrada 50 °C, flujo de aire de atomización 601 L/h, aspiración 100 % y flujo de alimentación 15 %. Bajo estas condiciones de formulación y de proceso se obtuvo un RP de 36,6 %.

La optimización del proceso de microencapsulación fue llevada a cabo mediante un diseño experimental central compuesto rotatable, donde se mantuvieron fijas la aspiración (100 %) y el flujo de aire de atomización (601 L/h), permitió establecer como condiciones óptimas: T° entrada 61 °C y flujo de alimentación 15 %. Para estas condiciones de proceso se obtuvieron partículas esféricas y lisas con un diámetro medio de  $2,1 \mu\text{m} \pm 0,9 \mu\text{m}$ , un RP de  $32,9 \% \pm 1,9 \%$  y una EE de  $93,7 \% \pm 0,5 \%$ .

La formulación obtenida presentó una liberación constante del fármaco durante los primeros 18 días de estudio, ajustándose su cinética de liberación al modelo Korsmeyer-Peppas ( $R^2 = 0,98$ ).

Se desarrolló y validó un método HPLC con detección de masas para cuantificar PMX desde muestras de suero de rata. El tratamiento de las muestras mediante extracción en fase sólida con columnas Oasis® HLB (30 mg), permitió obtener recuperaciones de fármaco y estándar interno (lidocaína) del 87 y 90 % respectivamente, sin presencia de interferentes en la muestra. El método resultó ser lineal (rango de concentraciones 25 a 250 ng/mL), exacto, preciso, sensible y selectivo para las condiciones indicadas en el presente trabajo.

Como conclusión final se puede mencionar que la formulación desarrollada presentó buenas características de composición y tamaño para su administración parenteral, comportándose como un sistema de liberación controlada de fármaco.



## 7 Asistencia a congresos

- VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA). 02 de noviembre de 2015 - 06 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina. Modalidad poster.
- 32° Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ). 19 de enero de 2016 – 22 de enero de 2016. Concepción, Chile. Modalidad poster.



## 8 Publicaciones

- Felipe Beltrán ,Mario Aranda , Constanza Fuentes , Carlos von Plessing , Marcos Fernández; VALIDATION AND DETERMINATION OF PRAMIPEXOLE DIHYDROCHLORIDE ON RAT SERUM BY SOLID PHASE EXTRACTION AND HPLC-MS; *“Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis”*. Enviado.



## 9 Bibliografía

- 1- Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Bousquet, M., Lévesque, D., Rouillard, C., & Cicchetti, F. (2009). Differences between subacute and chronic MPTP mice models: Investigation of dopaminergic neuronal degeneration and  $\alpha$ -synuclein inclusions. *Journal of Neurochemistry*, *109*(5), 1469–1482.
- 2- González-Hernández, T., Cruz-Muros, I., Alfonso-Oramas, D., Salas-Hernandez, J., & Castro-Hernandez, J. (2010). Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, *4*, 1–14.
- 3- Chaná C., P., Jiménez C., M., Díaz T., V., & Juri, C. (2013). Mortalidad por enfermedad de Parkinson en Chile. *Revista Médica de Chile*, *141*(3), 327–31.
- 4- Hedrich, K., Djarmati, a, Schäfer, N., Hering, R., Wellenbrock, C., Weiss, P. H., ... Klein, C. (2004). DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology*, *62*(3), 389–394. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000113022.51739.88>
- 5- Diamond, S. G., Markham, C. H., Hoehn, M. M., McDowell, F. H., & Muenter, M. D. (1990). An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease. *Neurology*, *40*(5), 763–766. <https://doi.org/10.1038/2091178c0>
- 6- Farouk Aallam, M., Serrano Del Castillo, A., & Fernández-Crehuen Navajas, R. (2005). Parkinson 's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurological Research*, *27*, 206–208.
- 7- Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., & Priyadarshi, S. S. (2001). Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis. *Environmental Research*, *86*(2), 122–127. <https://doi.org/10.1006/enrs.2001.4264>
- 8- Gavett, B. E., Stern, R. A., Cantu, R. C., Nowinski, C. J., & McKee, A. C. (2010). Mild traumatic brain injury: a risk factor for neurodegeneration. *Alzheimer's Research & Therapy*, *1*(18), 1–3. <https://doi.org/10.1186/alzrt42>
- 9- Tan, E.-K., Tan, C., Fook-Chong, S. M. C., Lum, S. Y., Chai, A., Chung, H., Wong, M. C. (2003). Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease: a study in ethnic Chinese. *Journal of the*

- Neurological Sciences*, 216(1), 163–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.07.006>
- 10-Chen, H., Zhang, S., Hernán, M., Schwarzchild, M., Waillet, W., Colditz, G., Ascherio, A. (2003). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and the Risk of Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, 60, 1059–1064.
- 11-Parkinson, J. (2017). An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences*, 14(2), 223–236.
- 12-Hurtado, F., Cardenas, M. A. N., Cardenas, F., & León, L. A. (2016). La enfermedad de Parkinson: Etiología, tratamientos y factores preventivos. *Universitas Psychologica*, 15(5), 1–26.  
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.upsy15-5.epet>
- 13-FEARNLEY, J. M., & LEES, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's Disease: Substantia Nigra Regional Selectivity. *Brain*, 114(5), 2283–2301.  
<https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- 14-Magrinelli, F., Picelli, A., Tocco, P., & Federico, A. (2016). Pathophysiology of motor dysfunction in Parkinson's disease as the rationale for drug treatment and rehabilitation. *Parkinson's Disease*, 2016, 1–18. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/pd/2016/9832839/abs/>
- 15-Wu, T., Chan, P., & Hallett, M. (2010). Effective connectivity of neural networks in automatic movements in Parkinson's disease. *NeuroImage*, 49(3), 2581–2587.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.051>
- 16-Aarsland, D., Bronnick, K., Williams-Gray, C., Weintraub, D., Marder, K., Kulisevsky, J., Emre, M. (2010). Mild cognitive impairment in Parkinson disease: A multicenter pooled analysis. *Neurology*, 75(12), 1062–1069.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f39d0e>
- 17-Gerardin, E., Lehericy, S., Pochon, J. B., Du Montcel, S. T., Mangin, J. F., Poupon, F., Marsault, C. (2003). Foot, hand, face and eye representation in the human striatum. *Cerebral Cortex*, 13(2), 162–169.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/13.2.162>
- 18-Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)

- 19-Dawson, T. M., & Dawson, V. (2003). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science*, 302(819), 819–822. <https://doi.org/10.1126/science.1087753>
- 20-Politis, M., Wu, K., Molloy, S., Bain, P. G., Chaudhuri, K. R., & Piccini, P. (2010). Parkinson's disease symptoms: The patient's perspective. *Movement Disorders*, 25(11), 1646–1651. <https://doi.org/10.1002/mds.23135>
- 21-Chen, J. J., & Marsh, L. (2014). Anxiety in Parkinson's disease: identification and management. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 7(1), 52–59. <https://doi.org/10.1177/1756285613495723>
- 22-Olanow, C. W., & Tatton, W. G. (1999). Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 123–144. <https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- 23-Tufekci, K. U., Meuwissen, R., Genc, S., & Genc, K. (2012). Chapter Four - Inflammation in Parkinson's Disease. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 88, 69–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398314-5.00004-0>
- 24-Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>
- 25-Chase, T. N., Oh, J. D., & Blanchet, P. J. (1998). Neostriatal mechanisms in Parkinson's disease. *Neurology*, 51(2), 30–35.
- 26-Gallagher, D., & Schrag, A. (2008). Impact of newer pharmacological treatments on quality of life in patients with parkinson's disease. *CNS Drugs*, 22(7), 563–586. <https://doi.org/10.2165/00023210-200822070-00003>
- 27-Rinne, U. K., Larsen, J. P., Siden, a, & Worm-Petersen, J. (1998). Entacapone enhances the response to levodopa in parkinsonian patients with motor fluctuations. Nomecomt Study Group. *Neurology*, 51(5), 1309–1314. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.5.1309>
- 28-Rinne, U. K., & Molsa, P. (1979). Levodopa with benserazide or carbidopa in Parkinson disease. *Neurology*, 29, 1584–1589.

- 29-Parkinson Study Group. (2000). Pramipexole vs Levodopa as Initial Treatment for Parkinson Disease. *Journal of American Medical Association*, 284(15), 1931–1938. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.7.1044>
- 30-Adler, C. H., Sethi, K. D., Hauser, R. A., Davis, T. L., Hammerstad, J. P., Bertoni, J., O'Brien, C. F. (1997). Ropinirole for the treatment of early Parkinson's disease. *Neurology*, 49(2), 393–399. <https://doi.org/10.1212/WNL.49.2.393>
- 31-Parkinson Study Group. (2003). A Controlled Trial of Rotigotine Monotherapy in Early Parkinson's Disease. *Archives of Neurology*, 60(12), 1721–1728. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.12.1721>
- 32-Boyle, A., & Ondo, W. (2015). Role of apomorphine in the treatment of Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 29(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s40263-014-0221-z>
- 33-Lieberman, A., Mark, K., Eli, E., & Menek, G. (1976). Treatment of Parkinson's Disease with Bromocriptine. *The New England Journal of Medicine*, 295, 1400–1404. <https://doi.org/10.1056/NEJM197612162952504>
- 34-Oertel, W. H., Wolters, E., Sampaio, C., Gimenez-Roldan, S., Bergamasco, B., Dujardin, M., Schwarz, J. (2006). Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Movement Disorders*, 21(3), 343–353. <https://doi.org/10.1002/mds.20724>
- 35-Rinne, U. K., Bracco, F., Chouza, C., Dupont, E., Gersanik, O., Marti Masso, J. F., Marsden, C. D. (1998). Early Treatment of Parkinson's Disease with Cabergoline Delays the Onset of Results of Motor Complications. Results of a Double-Blind Levodopa Controlled Trial. *Drugs*, 55(1), 23–30.
- 36-Teravainen, H. (1990). Selegiline in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 81, 333–336.
- 37-Parkinson Study Group. (2004). A Controlled, Randomized, Delayed-Start Study of Rasagiline in Early Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, 61(4), 561–66. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.4.561>
- 38-Borghain, R., Szasz, J., Stanzione, P., Meshram, C., Bhatt, M., Chirilineau, D., Quatralè, R. (2014). Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in

- Parkinson's disease with motor fluctuations. *Movement Disorders*, 29(2), 229–237. <https://doi.org/10.1002/mds.25751>
- 39-Brooks, D. J., Sagar, H., & UK-Irish Entacapone Study Group. (2003). Entacapone is beneficial in both fluctuating and non-fluctuating patients with Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled, double blind, six month study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(8), 1071–1079. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.8.1071>
- 40-Waters, C. H., Kurth, M., Bailey, P., Shulman, L. M., LeWitt, P., Dorflinger, E., Pedder, S. (1997). Tolcapone in stable Parkinson's disease: Efficacy and safety of long-term treatment. *Neurology*, 49, 665–671. [https://doi.org/10.1212/WNL.50.5\\_Suppl\\_5.S39](https://doi.org/10.1212/WNL.50.5_Suppl_5.S39)
- 41-Ferreira, J. J., Lees, A., Rocha, J. F., Poewe, W., Rascol, O., & Soares-da-Silva, P. (2015). Opicapone as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and end-of-dose motor fluctuations: A randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet Neurology*, 15(2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00336-1)
- 42-Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., & Lees, A. (2002). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), 1–20. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003735>
- 43-Nutt, J. G., & Wooten, G. F. (2005). Diagnosis and Initial Management of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 353(10), 1021–1027. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp043908>
- 44-Metman, L. V., Del Dotto, P., van den Munckhof, P., Fang, J., Mouradian, M. M., & Chase, T. N. (1998). Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*, 50(5), 1323–1326. <https://doi.org/10.1212/WNL.50.5.1323>
- 45-Zarranz, J. J. (2013). *Neurología* (Quinta Edición). Barcelona, España.: Elsevier.
- 46-Ropper, A., & Robert, B. (2007). *Principios de Neurología. De Adams y Victor*. (Octava Edición). Mexico D.F: Mc Graw Hill Interamericana.

- 47-Chase, T. N. (1998). The significance of continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs*, 55(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0222>
- 48-Biagio, N., & Bernardi, G. (2005). The “magic” of L-dopa: Why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(7), 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.05.002>
- 49-Rascol, O., David, B., Amos, K., & Peter, D. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropirinole or levodopa. *The New England Journal of Medicine*, 342(20), 1484–1491.
- 50-Brooks, D. J. (2000). Dopamine agonists : their role in the treatment of Parkinson ' s disease. *Journal of Neurosurgery and Psychiatry*, 68, 685–690. <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.6.685>
- 51-Zou, L., Jankovic, J., Rowe, D. B., Xie, W., & Appel, S. H. (1999). Neuroprotection by pramipexole against dopamine -and levodopa- induced cytotoxicity. *Life Sciences*, 64(15), 1275–1285.
- 52-Piercey, M. F., Hoffmann, W. E., Smith, M. W., & Hyslop, D. K. (1996). Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3receptor-preferring agonist: Comparison to other dopamine receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, 312(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00454-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00454-2)
- 53-Ferrari-Toninelli, G., Maccarinelli, G., Uberti, D., Buerger, E., & Memo, M. (2010). Mitochondria-targeted antioxidant effects of S(-) and R(+) pramipexole. *BMC Pharmacol*, 10(2), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-10-2>
- 54-Anthony, M., David, O., & Brian, W. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (Cuarta Edi). London, England: Pharmaceutical Press. [https://doi.org/10.1300/J123v27n02\\_07](https://doi.org/10.1300/J123v27n02_07)
- 55-Lau, Y. Y., Hanson, G. D., & Ichhpurani, N. (1996). Determination of pramipexole (U-98,528) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications.*, 683(2), 217–223.
- 56-Eupen, J., & Picha, F. (2008). *US 7,365,086 B2*. United States.

- 57-Antonini, A., & Calandrella, D. (2011). Once-daily pramipexole for the treatment of early and advanced idiopathic Parkinson's disease: Implications for patients. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 7(1), 297–302. <https://doi.org/10.2147/NDT.S10097>
- 58-Joyce, J. N., Woolsey, C., Ryoo, H., Borwege, S., & Hagner, D. (2004). Low dose pramipexole is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter via the D3 receptor. *BMC Biology*, 2(22), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-2-22>
- 59-de Farias, C. C., Bonifácio, K. L., Matsumoto, A. K., Higachi, L., Casagrande, R., Moreira, E. G., & Barbosa, D. S. (2014). Comparison of the antioxidant potential of antiparkinsonian drugs in different in vitro models. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 819–826. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400017>
- 60-Putri, R. S. I., Setiawati, E., Aziswan, S. A., Ong, F., Tjandrawinata, R. R., & Susanto, L. W. (2016). A comparative pharmacokinetics study of the anti-parkinsonian drug pramipexole. *Scientia Pharmaceutica*, 84(4), 715–723. <https://doi.org/10.3390/scipharm84040715>
- 61-Bennett Jr., J. P., & Piercey, M. F. (1999). Pramipexole - a new dopamine agonist for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 163(1), 25–31.
- 62-Yun, J. Y., Kim, Y. E., Yang, H. J., Kim, H. J., & Jeon, B. (2017). Twice-Daily versus Once-Daily Pramipexole Extended Release Dosage Regimens in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/8518929>
- 63-Lee, E., Kim, S., Seong, K., Park, H., Seo, H., Khang, G., & Lee, D. (2011). A biodegradable and biocompatible drug-delivery system based on polyoxalate microparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(13), 1683–1694. <https://doi.org/10.1163/092050610X519480>
- 64-Teekamp, N., Duque, L. F., Frijlink, H. W., Hinrichs, W. L., & Olinga, P. (2015). Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. *Expert*

*Opinion on Drug Delivery*, 12(8), 1–21.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1003807>

- 65-Kumari, S., Nagpal, M., Aggarwal, G., Jain, U. K., & Pankaj, S. (2016). Microparticles drug delivery system: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 543–566.
- 66-Madhav, S., & Shivani, K. (2011). Review on Microparticulate Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research*, 3(3), 1242–1254.
- 67-Patel, H. K., Patel, P. R., Brahmabhatt, T. J., Satvik, S., Suthar, M. H., & Patel, A. (2011). Sustained Release Microparticles: a Review. *American Journal of Pharmtech Research*, 1(4), 108–126.
- 68-Parida, K. R., Panda, S. K., Ravanan, P., Roy, H., & Talwar, P. (2013). Microparticles Based Drug Delivery Systems: Preparation and Application in Cancer Therapeutics. *International Archive of Applied Sciences and Technology*, 4(3), 68–75.
- 69-E, Z. E. E., Ghorab, M. M., Gad, S., & Yassin, H. A. (2015). Design and Characterization of Diclofenac Sodium Microspheres Prepared by Ionotropic Gelation Technique for Oral Controlled Drug Delivery. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 4(2), 321–329.
- 70-Déat-Lainé, E., Hoffart, V., Cardot, J. M., Subirade, M., & Beyssac, E. (2012). Development and in vitro characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 439(1–2), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.003>
- 71-O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). Preparation of caprolactone microcapsules by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28, 25–42.
- 72-Giovagnoli, S., Blasi, P., Schoubben, A., Rossi, C., & Ricci, M. (2007). Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 333(1–2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.005>

- 73-Jaitely, V., Sakthivel, T., Magee, G., & Florence, A. T. (2004). Formulation of oil in oil emulsions: Potential drug reservoirs for slow release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14(2), 113–117. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(04\)50022-9](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(04)50022-9)
- 74-Aundhia, C. J., Raval, J., Patel, M. ., Shah, N. ., Chauhan, S. ., Sailor, G. ., & Javia, A. . (2011). Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 125–138.
- 75-Vehring, R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*, 25(5), 999–1022. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9475-1>
- 76-Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M., & Bjorn, B. (1999). Spray-drying of trypsin— surface characterisation and activity preservation. *International Journal of Pharmaceutics*, 188, 243–253.
- 77-Mishra, M., & Mishra, B. (2012). Mucoadhesive microparticles as potential carriers in inhalation delivery of doxycycline hyclate: a comparative study. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.05.001>
- 78-Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- 79-Paudel, A., & Van Den Mooter, G. (2012). Influence of solvent composition on the miscibility and physical stability of naproxen/PVP K 25 solid dispersions prepared by cosolvent spray-drying. *Pharmaceutical Research*, 29(1), 251–270. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0539-x>
- 80-Manu, J., Ganesh, L., Manoj, B., Randhir, C., Shashikant, B., & Chirag, S. (2012). Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review, 4(4), 74–79. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/253243897\\_Spray\\_Drying\\_in\\_Pharmaceutical\\_Industry\\_A\\_Review](http://www.researchgate.net/publication/253243897_Spray_Drying_in_Pharmaceutical_Industry_A_Review)

- 81-Saß, A., & Lee, G. (2014). Evaluation of some water-miscible organic solvents for spray-drying enzymes and carbohydrates. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(6), 749–757. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.782554>
- 82-Gander, B., Wehrli, E., Alder, R., & Merkle, H. P. (1995). Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *Journal of Microencapsulation*, 12(1), 83–97. <https://doi.org/10.3109/02652049509051129>
- 83-Ré, M.-I. (2006). Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technology*, 24(4), 433–446. <https://doi.org/10.1080/07373930600611877>
- 84-Cal, K., & Sollohub, K. (2010). Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), 575–586. <https://doi.org/10.1002/jps.21886>
- 85-Ståhl, K., Claesson, M., Lilliehorn, P., Lindén, H., & Bäckström, K. (2002). The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *International Journal of Pharmaceutics*, 233(1–2), 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00945-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00945-0)
- 86-Oster, C. G., & Kissel, T. (2005). Comparative study of DNA encapsulation into PLGA microparticles using modified double emulsion methods and spray drying techniques. *Journal of Microencapsulation*, 22(3), 235–244. <https://doi.org/10.1080/02652040500100295>
- 87-Jensen, D. M. K., Cun, D., Maltesen, M. J., Frokjaer, S., Nielsen, H. M., & Foged, C. (2010). Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release*, 142(1), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.010>
- 88-De Jesus, S. S., & Maciel Filho, R. (2014). Drying of  $\alpha$ -amylase by spray drying and freeze-drying - A comparative study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 625–631. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002642>
- 89-Seville, P. C., Learoyd, T. P., Li, H. Y., Williamson, I. J., & Birchall, J. C. (2007). Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation

- properties for pulmonary drug delivery. *Powder Technology*, 178(1), 40–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.03.046>
- 90-Gikanga, B., Turok, R., Hui, A., Bowen, M., Stauch, O. B., & Maa, Y.-F. (2015). Manufacturing of High-Concentration mAb Formulations via Spray Drying - the Road to Manufacturing Scale. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 69(1), 59–73. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2015.01003>
- 91-Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 1029–1036.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12293>
- 92-Wagenaar, B. W., & Müller, B. W. (1994). Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials*, 15(1), 49–54.  
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90196-1)
- 93-Patel, J. K., & Chavda, J. R. (2009). Formulation and evaluation of stomach-specific amoxicillin-loaded carbopol-934P mucoadhesive microspheres for anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Journal of Microencapsulation*, 26(4), 365–376.  
<https://doi.org/10.1080/02652040802373012>
- 94-Kim, B. K., Hwang, S. J., Park, J. B., & Park, H. J. (2002). Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*, 19(6), 811–822.  
<https://doi.org/10.1080/0265204021000022770>
- 95-Akbuğa, J. (1991). Furosemide-loaded ethyl cellulose microspheres prepared by spherical crystallization technique: Morphology and release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 76(3), 193–198.  
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90271-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90271-O)
- 96-Chang, R.-K., Price, J. C., & Withworth, C. W. (1986). Dissolution Characteristics of Polycaprolactone-Poly lactide Microspheres of Chlorpromazine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12(14), 2355–2380.  
<https://doi.org/10.3109/03639048609063187>
- 97-Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Monti, D., Burgalassi, S., Chetoni, P., & Rodriguez, L. (2010). Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug

- delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 399(1–2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.004>
- 98-Lim, S. T., Martin, G. P., Berry, D. J., & Brown, M. B. (2000). Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *Journal of Controlled Release*, 66, 281–292. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00285-0)
- 99-He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 187(1), 53–65. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00125-8)
- 100- Katti, D., & Kirshnamurti, N. (1999). Preparation of albumin in microspheres by an improved process. *Journal of Microencapsulation*, 16(2), 231–242.
- 101- Mizushima, Y., Yanagawa, A., & Hoshi, K. (1983). Prostaglandin E1 is more effective, when incorporated in lipid microspheres, for treatment of peripheral vascular diseases in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 35(10), 666–667. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1983.tb02862.x>
- 102- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3, 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- 103- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- 104- Lappe, S., Mulac, D., & Langer, K. (2017). Polymeric nanoparticles – Influence of the glass transition temperature on drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 517(1–2), 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.025>
- 105- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195–1236. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/07373939808917460>

- 106- Wischke, C., & Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 298–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>
- 107- Lanao, R. P. F., Jonker, A. M., Wolke, J. G. C., Jansen, J. A., van Hest, J. C. M., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2013). Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(4), 380–390. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0443>
- 108- Carvalho, S. P. R. C., Carvalho Cruz, R., Nunes Melo, C., Bomfim Rodrigues, L., & Campi Santos, P. (2017). Evaluation of polymeric PLGA nanoparticles conjugated to curcumin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(2), 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000216043>
- 109- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
- 110- Gaignaux, A., Réeff, J., Siepmann, F., Siepmann, J., De Vriese, C., Goole, J., & Amighi, K. (2012). Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.006>
- 111- Mu, L., & Feng, S. S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol((R))): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, 86, 33–48. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00320-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00320-6)
- 112- Champion, J. A., Katare, Y. K., & Mitragotri, S. (2007). Particle Shape: A New Design Parameter for Micro- and Nanoscale Drug Delivery Carriers. *Journal of Controlled Release*, 121, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.022.Particle>

- 113- Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>
- 114- Padalkar, A. N., Shahi, S. R., & Thube, M. W. (2011). Microparticles: An Approach for Betterment of Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 3, 99–115.
- 115- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutic AI Research*, 12(2), 265–273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- 116- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutic AI Research*, 12(2), 255–264. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- 117- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289–299. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- 118- Prenner, E., & Chiu, M. (2011). Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 39–60. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76463>
- 119- Kalinkova, G. N. (1999). Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vibrational Spectroscopy*, 19, 307–320. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(99\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(99)00017-X)
- 120- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1109–1143. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.020>
- 121- Kim, K. K., & Pack, D. W. (2006). *Microspheres for Drug Delivery*. (Springer, Ed.), *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. Boston: Springer. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-25842-3\\_2](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-25842-3_2)
- 122- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanism of burst release in matrix controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73, 121–136.

- 123- Varde, N. K., & Pack, D. W. (2004). Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(1), 35–51. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.1.35>
- 124- Wohl, R. C., Summaria, L., & Robbins, K. C. (1980). Kinetics of Activation of Human Plasminogen by Different Activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(5), 2005–2013. Retrieved from <http://www.jbc.org/cgi/content/short/255/5/2005>
- 125- Britton, J., Smith, J., & Raston, C. (2017). *Heterologous Gene Expression in E.coli. Methods & Protocols*. (N. A. Burgess-Brown, Ed.), *Methods in Molecular Biology* (First Edit, Vol. 1586). New York: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9>
- 126- Washington, C. (1990). Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, 58, 1–12.
- 127- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>
- 128- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- 129- Ramteke, K. ., Dighe, P. ., Kharat, A. ., & Patil, S. . (2014). Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 3(5), 388–396. Retrieved from [www.saspublisher.com](http://www.saspublisher.com)
- 130- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>
- 131- Gutierrez Pulido, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (Mc Graw Hill, Ed.) (Segunda ed). México D.F.: Mc Graw Hill Interamericana.
- 132- Fuentes, C. (2014). *Nueva formulación de pramipexol para el tratamiento del Parkinson*. Universidad de Concepción.

- 133- Lau, Y. Y., Selenka, J. M., Hanson, G. D., Talaat, R., & Ichhpurani, N. (1996). Determination of pramipexole (U-98,528) in human plasma by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B*, 683, 209–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891917>
- 134- Mohamed, S., Riva, R., & Contin, M. (2016). Validated UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of pramipexole and ropinirole in plasma of patients with Parkinson's disease. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1017, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.041>
- 135- Yadav, M., Rao, R., Kurani, H., Rathod, J., Patel, R., Singhal, P., & Shrivastav, P. S. (2010). Validated ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of pramipexole in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 811–818. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21044411>
- 136- Nirogi, R., Kandikere, V., Shrivastava, W., Koteswara, M., Maurya, S., & Ajjala, D. (2007). Quantification of pramipexole in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry using tamsulosin as internal standard Ramakrishna. *Biomedical Chromatography*, 21, 1151–1158. <https://doi.org/10.1002/bmc.864>
- 137- Lavudu, P., Rani, A. P., & Sekharan, C. B. (2013). Development and Validation of Rapid LC-MS with Electrospray Ionization for the Quantification of Pramipexole in Human Plasma. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 37, 1–15. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILCPA.37.1>
- 138- Uma, G., Manimala, M., Vasudevan, M., & Karpagam, S. (2012). Development and Validation of LCMS Method for the Estimation of Pramipexole in Human Plasma. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters*, 2(1), 10–11.
- 139- Lau, Y. Y., Hanson, G. D., & Ichhpurani, N. (1996). Determination of pramipexole (U-98,528) in human plasma and urine by high-performance liquid

- chromatography with electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications.*, 683(2), 217–223.
- 140- Guo, W., Li, G., Yang, Y., Yang, C., Si, L., & Huang, J. (2015). LC-MS/MS analysis of pramipexole in mouse plasma and tissues: Elimination of lipid matrix effects using weak cation exchange mode based solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 988, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.032>
- 141- Bharathi, V., Kumar Hotha, K., Vidya Sagar, P., Sirish Kumar, S., Naidu, A., & Mullangi, R. (2009). Development and validation of a sensitive LC- MS/MS method with electrospray ionization for quantitation of pramipexole in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 23, 212–218.
- 142- Bhardwaj, S. K., Dwivedi, K., & Agarwal, D. D. (2015). A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4), 76–81.
- 143- Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*, 55, 107–107. <https://doi.org/10.1007/BF02493365>
- 144- Said, R., Kamel, M., El-Beqqali, A., & Abdel-Rehim, M. (2010). Microextraction by packed sorbent for LC-MS/MS determination of drugs in whole blood samples. *Bioanalysis*, 2(2), 197–205. <https://doi.org/10.4155/bio.09.187>
- 145- Patel, R. S., Roy, M., & Dutta, G. K. (2012). Mass spectrometry- a review. *Veterinary World*, 5(3), 185–192. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.185-192>
- 146- Harmonisation, I. C. of. (1996). Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology, (November 1996), 9. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7574.873-a>
- 147- Annesley, T. (2003). Ion Suppression in Lc-Api-Ms. *Clinical Chemistry*, 49(7), 1041–1044.
- 148- Guidi, L. R., Tette, P. A. S., Evangelista, W. P., Fernandes, C., & Glória, M. B. A. (2015). Matrix effect on the analysis of amphenicols in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Physics: Conference Series*, 575, 1–5. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/575/1/012036>

- 149- Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2013). Hplc Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407>
- 150- Tiwari, G., & Tiwari, R. (2010). Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical Methods*, 1(1), 25–38. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.72226>
- 151- European Union. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 33–79. <https://doi.org/32010L0063>
- 152- Chile, Congreso Nacional (2009). Ley 20380.
- 153- Hacker, M., Bachmann, K., & Messer, W. (2009). *Pharmacology: Principles and Practice*. (Elsevier, Ed.). San Diego: Elsevier Inc.
- 154- Patel, B. B., Patel, J. K., Chakraborty, S., & Shukla, D. (2015). Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), 352–365. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.013>
- 155- Bain, D. F., Munday, D. L., & Smith, A. (1999). Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 16(4), 453–474. <https://doi.org/10.1080/026520499288915>
- 156- Wisniewski, R. (2015). Spray Drying Technology Review. *45th International Conference on Environmental Systems*, 1–46. Retrieved from <https://ttu-ir.tdl.org/ttu-ir/handle/2346/64598>
- 157- Allison, D. (2008). Effect of Structural Relaxation on the Preparation and Drug Release Behavior of Poly(lactic-co-glycolic) acid Microparticle Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(6), 2022–2035.
- 158- Fu, Y. J., Shyu, S. S., Su, F. H., & Yu, P. C. (2002). Development of biodegradable co-poly(D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25(4), 269–279. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00205-3)

- 159- Murillo, M., Gamazo, C., Goñi, M. M., Irache, J. M., & Blanco-Príeto, M. J. (2002). Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), 341–344. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00212-0)
- 160- Engineer, C., Parikh, J., & Raval, A. (2010). Hydrolytic Degradation Behavior of 50 / 50 Poly Lactide-co-Glycolide from Drug Eluting Stents. *Trends Biomaterial Artificial Organs*, 24(3), 131–138.
- 161- Panyam, J., William, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., & Labhasetwar, V. (2004). Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(7), 1804–1814. <https://doi.org/10.1002/jps.20094>
- 162- Łaszcz, M., Trzcińska, K., Kubiszewski, M., Kosmacińska, B., & Glice, M. (2010). Stability studies and structural characterization of pramipexole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(4), 1033–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.018>
- 163- Fuentes, C. (2017). *Diseño y evaluación de un nuevo sistema de liberación controlada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson*. Universidad de Concepción.