



ECyT
UNSAM

PROYECTO FINAL INTEGRADOR - INGENIERÍA BIOMÉDICA

EVALUACIÓN DE POLÍMERO BIODEGRADABLE PARA SU POTENCIAL USO EN LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

ESTUDIANTE: Melina Dominguez

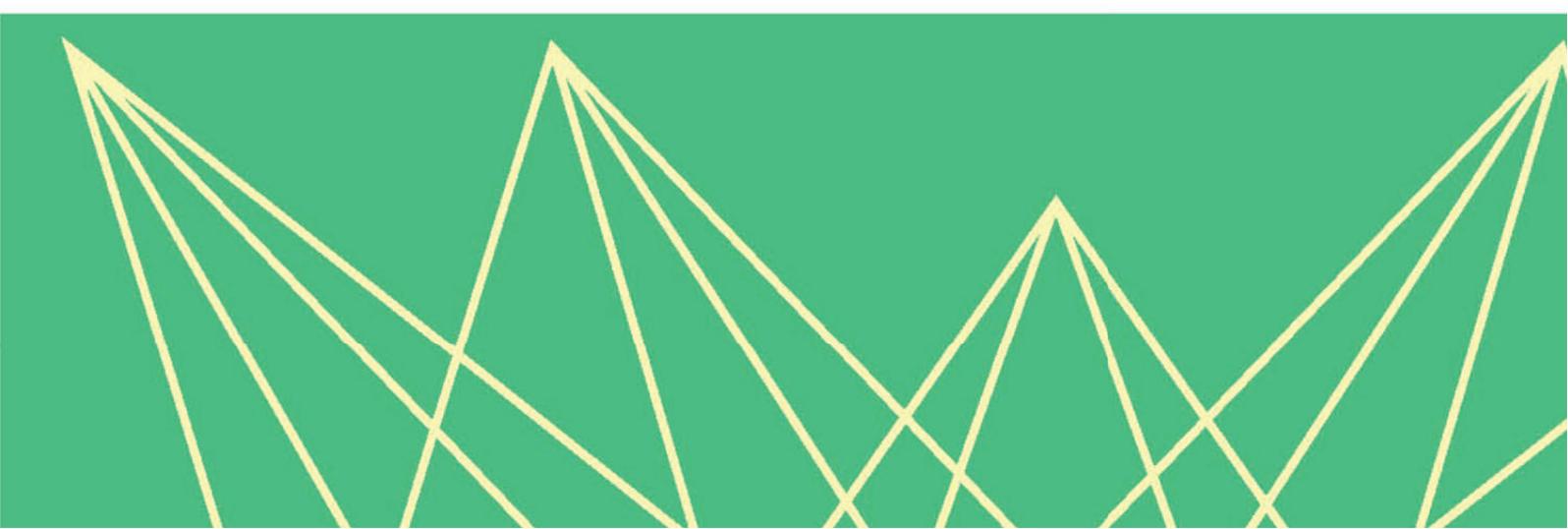
LEGAJO: CYT-6543

SUPERVISORA: Dra. Élide B. Hermida

CO-SUPERVISORA: Dra. Mercedes Perullini

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Biomateriales, Biomecánica y
Bioinstrumentación - Lab3Bio

FECHA: 12 de diciembre de 2022



Agradecimientos

A la Universidad Nacional de San Martín, universidad pública que me abrió sus puertas y me brindó numerosas oportunidades de aprendizaje y formación. A cada ciudadano de este país que permite que ella exista y funcione con la excelencia que lo hace. A todos sus profesores y profesoras.

A mis directoras de proyecto, Dras. Elida Hermida y Mercedes Perullini, y a la coordinadora de la materia *Proyecto Final Integrador*, Dra. Ing. Agustina Portu, por su invaluable soporte profesional y humano en la realización de este trabajo.

A los investigadores y becarios del *Lab3Bio*, y en especial a las Dras. Beatriz Araoz, Daiana Nygaard y Mercedes Perez Recalde, por su acompañamiento y apoyo técnico.

A las personas que amo y son el pilar de mi vida. A mi familia de siempre: mi mamá Silvia y mi papá Claudio, y mis hermanos Martín, Agustín y Lucia. A mi nueva familia: Alejandro. A mis amigas.

Al Dr. Ignacio Barreira, por su gran ayuda para lograr esta meta.

Y a cada compañero y compañera que se cruzó durante mi carrera y aportó en mi formación y, sin dudas, en mi camino.

Resumen

La ciencia farmacológica encamina muchas de sus investigaciones hacia el alcance de un modelo ideal de sistema de transporte de drogas, con el objetivo de que su administración sea más específica, más eficiente y menos tóxica, y así mitigar los efectos adversos y las desventajas que presentan los métodos actuales y tradicionales. El objetivo general del proyecto consistió en evaluar algunas aptitudes técnicas de micropartículas de PHBV – poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) – para su potencial aplicación en liberación controlada de fármacos. Para tal fin, en el presente trabajo se realizó un procedimiento experimental que consistió en la fabricación de estas micropartículas mediante la técnica de *doble emulsión con evaporación de solvente*, dentro de las cuales se encapsuló un agente modelo (colorante azul de toluidina).

Se realizaron 18 variantes de la técnica elegida, con distintas cantidades y tipos de surfactante estabilizadores de la segunda emulsión, y se analizó su impacto en el tamaño final de las partículas formadas. En el informe se detallan el protocolo experimental, materiales, métodos, limitaciones, resultados y análisis de los datos obtenidos.

En este trabajo también se realizó un análisis del marco regulatorio actual del uso de partículas poliméricas para liberación controlada de medicamentos, y se diseñó un ensayo para medir la cinética de liberación del colorante encapsulado.

Finalmente, se incluye una discusión de posibles aplicaciones de este material para el diseño de dispositivos de liberación controlada de fármacos.

Resumen	3
Presentación preliminar.....	6
Contexto.....	6
Motivación	6
Objetivo.....	7
Capítulo 1 – Marco teórico	8
Sistemas de liberación controlada de fármacos.....	8
Biomateriales.....	10
Generalidades de biomateriales.....	10
Degradación de materiales.....	12
Polímeros.....	13
Partículas poliméricas para liberación controlada de fármacos	15
Micro y nano partículas poliméricas.....	16
Métodos de elaboración de partículas poliméricas para liberación controlada de fármacos	17
Mecanismos clásicos de liberación.....	19
Modelos matemáticos de liberación de fármacos.....	20
Capítulo 2 – Antecedentes y marco regulatorio en Argentina.....	24
Capítulo 3 – Elaboración y caracterización de partículas encapsulando un agente modelo.....	28
Introducción	28
Técnica de elaboración de partículas poliméricas por doble emulsión y evaporación de solvente.....	28
Materiales	32
Polímero: PHBV.....	32
Surfactantes estabilizadores de las emulsiones	33
Agente encapsulado: Azul de Toluidina	34
Métodos	34
Elaboración de partículas	34
Caracterización de partículas obtenidas	36

Medición de eficacia de encapsulamiento y ensayo de liberación.....	38
Limitaciones.....	41
Resultados	42
Discusión	43
Sugerencias y trabajos futuros	44
Capítulo 4 – Posibles aplicaciones de partículas de PHBV	46
Anexo I - Decreto Nº150/1992	49
Anexo II – Circular ANMAT MED-NAN 001-00	57
Anexo III – Curva de calibración de espectrofotómetro	64
Anexo IV – Resultados completos del experimento.....	67
Referencias.....	68

Presentación preliminar

Contexto

El proyecto se desarrolló en el marco de una de las líneas de investigación del Laboratorio de Biomecánica, Biomateriales y Bioinstrumentación – Lab3Bio - de la Universidad Nacional de San Martín, titulada *Elaboración de partículas poliméricas reabsorbibles con aplicación a liberación controlada de fármacos*, dirigida por la Dra. Élida Hermida.

El laboratorio tiene como propósitos incorporar tecnología biomédica a la plataforma de investigación, contribuir al desarrollo e innovación del campus Miguelete de la Universidad, así como también brindar equipamiento y profesionales altamente especializados para interactuar con quienes requieran asistencia tecnológica.

Este espacio ha brindado las bases para ejecutar el presente proyecto final integrador, proporcionando los materiales, instrumentos, calidad profesional y conocimiento técnico previo en el material y en su manipulación para el capítulo experimental.

La co-dirección del presente trabajo ha sido llevada a cabo por la Dra. Mercedes Perullini del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía – INQUIMAE – de la Universidad de Buenos Aires, quien cuenta con experiencia en funcionalización de superficies y encapsulamiento de agentes.

Motivación

La ciencia farmacológica encamina muchas de sus investigaciones hacia el alcance de un modelo ideal de sistema de transporte de drogas, con el objetivo de que su administración sea más específica, más eficiente y menos tóxica, y así mitigar los efectos adversos y las desventajas que presentan los métodos actuales y tradicionales.

Uno de los principales desafíos que se presentan es el control de la dosis del fármaco en el torrente sanguíneo o en el sitio de acción, la cual debe mantenerse en una zona efectiva durante un tiempo determinado y evitar alcanzar niveles tóxicos en sitios no deseados.

El uso de partículas poliméricas está demostrando ser una alternativa que permite una liberación localizada y controlada del fármaco durante un cierto período de tiempo a partir de mecanismos de difusión a través de las barreras biológicas. Entre las ventajas que esta aplicación puede proporcionar se encuentran la posibilidad

de proteger el principio activo, el control de la tasa de liberación del fármaco y la alta penetración que pueden alcanzar las partículas de tamaño nanométrico, especialmente en el campo de la oncología donde los tumores crean microsistemas de vasos sanguíneos.

El proceso de diseño de un producto de estas características puede llegar a ser muy complejo e interdisciplinario, y existe un nicho muy interesante para los ingenieros biomédicos que quieran aportar sus conocimientos en biomateriales, modelos matemáticos y computacionales, análisis de procesos, escalado y aplicaciones industriales, control de calidad, etc.

Objetivo

El proyecto tuvo como objetivo general el estudio de un polímero biodegradable que actualmente no se utiliza en la industria médica y farmacológica, pero que su alta biocompatibilidad y su tasa de biodegradabilidad resultarían ser apropiadas para varias aplicaciones, siendo la fabricación de sistemas de liberación controlada de fármacos una de ellas. Siguiendo una metodología científica, en este trabajo se analizó una de las técnicas de elaboración de micro y nano partículas y encapsulamiento de agentes, y se hizo una revisión del marco regulatorio y del estado del arte de esta potencial aplicación, con el objetivo de que la línea de investigación siga un próspero curso.

Capítulo 1 – Marco teórico

Sistemas de liberación controlada de fármacos

Para un manejo eficiente de las enfermedades, es de suma importancia un enfoque terapéutico exitoso. Un sistema de administración de fármacos tiene como objetivo localizar al agente farmacológico administrado en un sitio específico del cuerpo a un ritmo controlado, con efectos secundarios reducidos que pueden surgir del tratamiento sistémico.

Puntualmente, en un sistema de administración de fármacos de liberación controlada lo que se busca es controlar la concentración plasmática del fármaco en un lapso determinado de tiempo. Las concentraciones del fármaco por debajo de una concentración mínima eficaz resultan en ausencia de efecto terapéutico; las concentraciones por encima de la concentración efectiva máxima, en un tratamiento tóxico. Una cinética de liberación ideal sería aquella que garantiza una concentración plasmática constante del fármaco dentro del rango terapéutico (figura 1.1) (Kamaly, 2016). También se investigan sistemas que respondan a estímulos como el pH, la fuerza iónica y el campo eléctrico (Fasiku, 2019), y que posean otros tipos de cinética de liberación, como por ejemplo un sistema de administración pulsátil o cíclica, que libere el fármaco de acuerdo con el ritmo circadiano del cuerpo, como un pulso después de un cierto lapso.

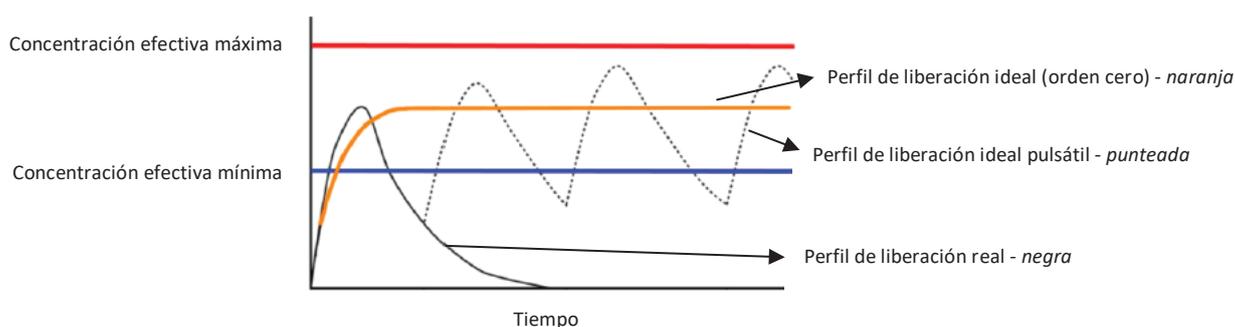


Figura 1.1: perfiles de liberación de fármaco entre concentraciones efectivas (Kamaly, 2016)

Desde el descubrimiento de las medicinas, casi tan antiguas como la humanidad, se sabe que estas no siempre pueden usarse de forma directa. Las primeras civilizaciones encontraron modos de dosificar las mismas, mezclándolas con otros componentes como grasas para prolongar su permanencia en el sitio de acción, o realizando una preparación sólida para permitir su deglución. Es así, que junto al fármaco – el principio

farmacéutico activo – deben incorporarse otras sustancias denominadas **excipientes** para facilitar su administración y mantener su estabilidad. Hasta el siglo XIX, esta tarea requería mucho tiempo, pero la revolución industrial supuso un hito para producir formas farmacéuticas a gran escala y para ampliar el acceso de la población a los medicamentos. Los avances en farmacología y fisiología, el nacimiento de la biofarmacia y el desarrollo evolutivo de la farmacocinética, a mediados del siglo XX, hizo que los farmacéuticos y los médicos notaran que la tasa de liberación del fármaco de las formas de dosificación es una característica clave para lograr beneficios terapéuticos con efectos colaterales menores (Alvarez-Lorenzo, 2013).

La primera generación de sistemas de liberación controlada se materializó en la década de 1970, con el desarrollo de novedosos excipientes que en su mayoría provinieron de la evolución de la ciencia de los polímeros, regulando la liberación por mecanismos de disolución, difusión, erosión u osmóticos. Esta primera generación permitió el mantenimiento de los niveles del fármaco en un rango terapéuticamente deseable con dosis más bajas por día, y logró mejorar el tratamiento de enfermedades con fármacos de vida media corta y el cumplimiento por parte de los pacientes, y disminuyó la incidencia de efectos adversos (Alvarez-Lorenzo, 2013).

La segunda generación apareció con los sistemas de liberación de fármacos modulada por activación, con la necesidad de proteger a ciertas drogas de los entornos hostiles del organismo y de prevenir los efectos secundarios en las regiones en las que la sustancia no está destinada a actuar o ser absorbida. Estos sistemas comprenden a los dispositivos capaces de liberar el fármaco en regiones específicas del cuerpo y momentos específicos, activándose por algunos procesos físicos, químicos o bioquímicos (Alvarez-Lorenzo, 2013).

Tanto la primera como la segunda generación de sistemas de liberación controlada ya están bien establecidas en las terapias actuales, como por ejemplo las tabletas de administración oral TIMERx® o los sistemas Pulsincap®, cuya velocidad de liberación se controla con la tasa de penetración de agua en los comprimidos (Rathbone, 2002). Los sistemas de liberación controlada de tercera generación son los regulados por retroalimentación, y suponen un cambio de paradigma en el cual los excipientes pasan a ser sistemas activos. Se espera que estos dispositivos sean capaces de entregar el fármaco en las mejores condiciones posibles al sitio de destino, modulando la absorción, distribución y eliminación, y con la capacidad de liberar el fármaco regulado por retroalimentación: ajustándose a condiciones fisiológicas/patológicas del cuerpo, relacionadas con la progresión de la enfermedad. El auge de la nanotecnología y la funcionalización de superficies está siendo un pilar en el desarrollo de estos novedosos sistemas (Alvarez-Lorenzo, 2013).

Biomateriales

Generalidades de biomateriales

Un biomaterial es una sustancia o combinación de sustancias (excluyendo medicamentos) de origen natural o sintético que se puede usar por un determinado periodo de tiempo para tratar, mejorar o reemplazar un tejido o función del cuerpo (Kulinets, 2015). Esta definición es la que se utiliza actualmente, pero los biomateriales no siempre han sido vistos de la misma manera a lo largo de su historia en la medicina. La primera definición fue en 1986, y se los consideraba materiales no vivos utilizados para interactuar con sistemas biológicos (Williams, 1988). En ese momento los biomateriales se usaban en gran medida en dispositivos médicos para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo sin causar ninguna reacción adversa a tejidos vivos. Luego, surgieron materiales con aplicación a otras áreas, como la administración de fármacos, los agentes de contraste de imágenes y las construcciones de ingeniería de tejidos.

Actualmente la definición de biomaterial hace hincapié únicamente en que la o las sustancias entran en contacto con los sistemas biológicos de humanos u otros animales para un determinado fin. El propósito principal es la aplicación médica, y el contacto con los sistemas biológicos puede ser directo o indirecto. Es así que se consideran biomateriales a los dispositivos y medios para cultivar células y analizar proteínas en sangre, a los cultivos para procesar biomoléculas en biotecnología, a las matrices de genes de diagnóstico e incluso a los materiales de empaque primario para productos médicos. Todas estas aplicaciones tienen una característica común: la interacción directa e indirecta entre los sistemas biológicos y los materiales que se utilizan en productos médicos o en contacto con el cuerpo (Kulinets, 2015).

La evolución que ha sufrido el concepto y la definición de los biomateriales utilizados en medicina nos dejó la clasificación de éstos en generaciones (Reyes-Blas, 2019):

- Los biomateriales de **primera generación** son aquellos dispositivos inertes que reemplazan a un tejido dañado, con una respuesta tóxica mínima (por ejemplo, implantes metálicos o implantes dentales cerámicos).
- Los de **segunda generación** son los biomateriales bioactivos y biodegradables, que interactúan con el cuerpo para mejorar la respuesta de ellos, degradándose a medida que el nuevo tejido se regenera.
- Los biomateriales de **tercera generación** son aquellos capaces de estimular una respuesta a nivel molecular o celular.
- La **cuarta generación** de biomateriales es la más reciente y ha surgido a partir de los avances en el conocimiento del comportamiento electrofisiológico de las células y los tejidos. En este grupo se

ubican los biomateriales que podrían estimular a células específicas para que el cuerpo se cure a sí mismo.

En general, existen muchas otras maneras de clasificar a los materiales. Para la ciencia e ingeniería de los materiales – disciplina que combina la búsqueda de conocimientos básicos de materiales y su aplicación en productos útiles para la sociedad – se dividen en cinco grupos, dependiendo de su estructura y propiedades: metálicos, cerámicos, polímeros, semiconductores y compuestos (Kulinets, 2015).

Los materiales **metálicos** son sustancias inorgánicas, compuestos de uno o más elementos metálicos – pudiendo contener también otros tipos de elementos – y enlazados por enlaces metálicos. Tienen una estructura cristalina, y generalmente tienen buena conductividad térmica y eléctrica. En aplicaciones de biomateriales se utilizan principalmente para aplicaciones de carga, como implantes ortopédicos (alambres, placas, tornillos, reemplazos articulares totales o parciales) y aplicaciones dentales.

Los materiales **cerámicos** son inorgánicos y están constituidos por elementos metálicos y no metálicos. Pueden ser cristalinos, no cristalinos o mezcla de ambos. Estos materiales suelen tener bajo peso, elevada dureza y resistencia a altas temperaturas, aunque tienden a ser frágiles. Estas características permiten que, en aplicaciones biomédicas, se utilicen para soporte de carga y compresión. Las biocerámicas pueden ser *bioinertes*, con las que tradicionalmente se realizan restauraciones dentales y ciertas aplicaciones ortopédicas (por ejemplo, como parte de articulaciones artificiales), y/o *bioactivas*, que se vinculan con el tejido vivo y tienen la capacidad de estimularlo (como, por ejemplo, el biovidrio o la hidroxiapatita).

Los **polímeros** son materiales formados generalmente por largas cadenas o redes de moléculas orgánicas, de uniones covalentes. Suelen tener bajas densidades, ser malos conductores de la electricidad, y descomponerse o ablandarse a relativas bajas temperaturas. A mediados de siglo XX existió una revolución en la ciencia de los materiales, que trajo una amplia variedad de polímeros aptos para gran cantidad de aplicaciones. En medicina, los polímeros se utilizan principalmente para aplicaciones que no soportan carga, como prótesis vasculares, catéteres, administración de fármacos, prótesis faciales, piel/cartílago, prótesis intraoculares y también combinados con metales en ortopedia y odontología.

Los materiales **semiconductores** son los materiales utilizados en microelectrónica, y a pesar de no estar altamente representados, son importantes por su avanzada tecnología. El más destacable es el silicio puro, al que se puede modificar de distintos modos para cambiar sus características eléctricas.

Los **compuestos** son materiales sólidos que contienen dos o más componentes, unidos para combinar las propiedades y beneficios que poseen por separado. Los biomateriales de este tipo suelen estar formados por una fase continua, llamada matriz, y por una discontinua, llamada carga. Se diseñan para un uso específico,

por lo que sus propiedades dependen del tipo de dispositivo que se desee fabricar. Un ejemplo de dispositivo fabricado con este tipo de biomateriales es el implante de rodilla de polietileno de alta densidad con incrustaciones de fibras de carbono.

Parámetros importantes de un biomaterial: biocompatibilidad y toxicidad

La biocompatibilidad de un biomaterial es un factor muy importante en el desarrollo de un producto médico, ya que define su capacidad para inducir una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica y para interactuar con los sistemas vivos sin tener ningún riesgo de lesión, toxicidad o rechazo por parte del sistema inmunológico ni efectos locales o sistémicos indeseables o inapropiados.

En general, un biomaterial no debe ser tóxico a nivel local o sistémico. La toxicidad de un biomaterial puede ser causada por sustancias que el material libera en el sistema biológico para afectar las células, los órganos o el organismo completo. La liberación no intencional de sustancias fuera del material colocado en un sistema biológico ocurre principalmente en polímeros (Kulinets, 2015).

Degradación de materiales

Se conoce como *degradación* a los procesos inducidos por luz solar, calor u otros agentes externos, conocidos como *mecanismos de degradación*, que conducen a una modificación de la estructura del material. Esta modificación estructural a su vez se relaciona con cambios químicos (rotura de enlaces, cambios en sustituyentes laterales, reacciones de entrecruzamiento, etc.) y con cambios físicos en el material (decoloración, pérdida de brillo superficial, formación de grietas, erosión superficial, pérdida de propiedades mecánicas).

Existen diversos agentes externos, y cada uno de ellos puede dar lugar a diferentes mecanismos de degradación. En la tabla 1.1 se mencionan diferentes tipos de agentes y el tipo de degradación que provocan en el material.

Tabla 1.1: tipos de degradación según el agente externo

Agente externo	Tipo de degradación
Luz solar	Fotodegradación
Calor	Degradación térmica

Agentes atmosféricos	Degradación oxidativa
Humedad	Degradación hidrolítica
Hongos y microorganismos	Biodegradación
Luz + oxígeno	Fotodegradación oxidativa
Calor + oxígeno	Degradación termoxidativa
Luz + humedad	Degradación fotohidrolítica

La relación entre la *tasa de degradación* y el *tiempo/escala de la aplicación* es la que determina que un material sea reconocido como degradable o no degradable.

Polímeros

Como en este proyecto se trabajó con un polímero particular, se profundizará en algunos aspectos de este tipo de materiales.

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión covalente de pequeñas unidades moleculares conocidas como monómeros. Si están formadas por un único tipo de monómero se los conoce como *homopolímeros*, y si están formados por varios tipos de monómeros se los conoce como *copolímeros*.

Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser *sintéticos* o *naturales*. Los polímeros naturales, conocidos como biopolímeros, se forman durante ciclos de crecimiento y vida de organismos. Los polímeros sintéticos se comenzaron a obtener a principios del siglo pasado, y tienen la ventaja de que su fabricación es controlable y modificable con el objetivo de alcanzar características deseadas.

La principal ventaja de los materiales poliméricos en general es que suelen poder adquirir diversas formas y propiedades, lo que los hace muy versátiles y útiles para muchas áreas tecnológicas.

Degradación de polímeros

Para describir el fenómeno de degradación de polímeros se debe introducir también el concepto de *erosión*, que se refiere a la pérdida de material debida a oligómeros y monómeros que se desprenden del polímero (Göpferich, 1996).

Todos los polímeros degradables comparten la propiedad de erosionarse con la degradación. Tanto la degradación como la erosión son parámetros decisivos para caracterizar el material. Cabe destacar la

diferencia entre erosión *superficial o heterogénea*, y erosión *volumétrica u homogénea* (figura 1.2). La erosión superficial implica la pérdida de material únicamente en la superficie. El material se hace cada vez más pequeño, pero conserva su forma geométrica. En cambio, en la erosión volumétrica, la pérdida de material no se da solo en la superficie. El tamaño del material permanece constante durante un cierto tiempo. La ventaja de la erosión polimérica superficial es que el proceso es más previsible (Göpferich, 1996).

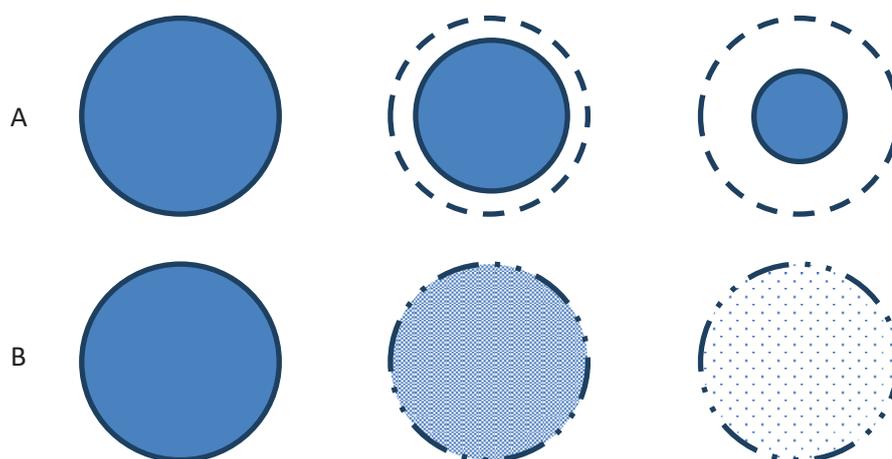


Figura 1.2: erosión superficial (figura 1.2.A) vs. erosión volumétrica (figura 1.2.B)

Para el caso de polímeros para uso como biomateriales, el mecanismo de degradación predominante es el químico generado por hidrólisis; también puede manifestarse la biodegradación, llevada a cabo por enzimas. La *degradación hidrolítica* se da cuando el material entra en contacto con un medio acuoso y el agua penetra en la matriz, provocando hinchamiento, ruptura de puentes hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y, finalmente, hidrólisis de los enlaces. La ruptura por hidrólisis puede ocurrir tanto en grupos de la cadena principal como en los laterales. En lo que respecta a *degradación enzimática*, es un proceso que varía con el sitio de implantación, según la disponibilidad y concentración local de enzimas.

En el caso particular de biomateriales biodegradables, su compatibilidad debe demostrarse a lo largo del tiempo de aplicación. Las propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas del material variarán en el tiempo, y los productos de degradación pueden poseer un nivel de biocompatibilidad diferente en comparación con el material primario.

La tasa de degradación del polímero depende de factores relacionados con su naturaleza, como su estructura química, la sensibilidad a la hidrólisis de los grupos funcionales, la permeabilidad al agua o la morfología del material (las estructuras amorfas son más permeables que las cristalinas). Pero también influyen factores

físico-químicos del entorno, como el pH del medio, o el proceso de esterilización al que se somete el material (Nair, 2007).

Partículas poliméricas para liberación controlada de fármacos

Polímeros biodegradables en liberación controlada de fármacos

En la aplicación de polímeros para liberación controlada de fármacos, todos los factores que afectan la tasa de degradación también pueden influir en la tasa de liberación del principio activo. A continuación, se mencionan cuatro factores del polímero que tienen alta influencia en esta aplicación (Kamaly, 2016).

Cristalinidad del polímero

La cristalinidad describe el grado de regiones cristalinas dentro de una muestra en relación con las regiones amorfas. En polímeros este concepto es particular: sólo cuando la cadena de polímeros tiene una estructura regular y el peso molecular es alto pueden organizarse en forma cristalina. Además, nunca alcanzan el 100% de cristalinidad, sino que los dominios cristalinos están separados por regiones amorfas. En liberación de fármacos, la cristalinidad es importante ya que el agua solo puede difundir a través de las regiones amorfas. Además, la resistencia mecánica del polímero, capacidad de hinchazón, la hidrofiliidad y la tasa de biodegradación también son dependientes del grado de cristalinidad, que a su vez está regido por la naturaleza del monómero.

Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea es una temperatura característica de estos materiales, ya que por debajo de ella el polímero se encuentra en estado vítreo, es decir, tiene movilidad limitada y bajas velocidades de difusión. Por encima de esta temperatura se encuentra en un estado gomoso, facilitando la tasa de transferencia de masa de agua y moléculas del fármaco.

Solubilidad

Cuando el polímero es de naturaleza hidrófoba, la liberación del fármaco se controla mediante la erosión de la superficie; en cambio, cuando existe un equilibrio entre la hidrofobicidad e hidrofiliidad en el esqueleto del polímero, la degradación puede ocurrir también en el interior de la matriz del sistema polimérico. Es importante destacar que, en la nanoescala, como la relación superficie-volumen es muy alta, los sistemas poliméricos coloidales se vuelven estables en condiciones acuosas, permitiendo la utilización de polímeros hidrófobos para esta aplicación.

Peso molecular

El peso molecular tiene un impacto significativo en la cinética de liberación del fármaco y puede influir en las propiedades biológicas del sistema de administración, como la eliminación, fagocitosis y la actividad biológica. Propiedades como la temperatura de transición vítrea, solubilidad, viscosidad, cristalinidad y resistencia mecánica están relacionadas con el peso molecular del polímero.

La velocidad de liberación está correlacionada con las propiedades mecánicas del polímero: los polímeros de alto peso molecular tienen un alto módulo de elasticidad, produciendo una matriz más rígida, con un número de canales y poros limitados; los de bajo peso molecular, por el contrario, tienen un módulo elástico menor permitiendo que los poros se expandan como resultado de la presión osmótica, favoreciendo la liberación del fármaco.

Micro y nano partículas poliméricas

Múltiples polímeros biodegradables de origen natural y artificial se estudian como materiales para fabricar partículas de tamaño micrométrico y nanométrico, con la intención de ser usadas como encapsuladores de agentes.

Existen diversos métodos de fabricación de partículas poliméricas, y de la técnica usada dependerá el tipo de partícula que se estime generar (figura 1.3). Cuando el tamaño de la partícula se encuentra entre 1 μm y 100 μm , generalmente se las llama micropartículas, y a las de diámetro menor a 1 μm se las considera nanopartículas (Campos, 2013).

También existen categorías según la morfología y la distribución del compuesto activo: esferas y cápsulas. Por micro o nano esferas se entienden partículas compuestas por una mezcla homogénea de fármaco y polímero (matriz). Las micro o nano cápsulas son aquellas que poseen un caparazón polimérico y uno o varios núcleos (que pueden ser sólidos, líquidos o incluso gaseosos) donde se encuentra dispersa la droga (figura 1.3) (Campos, 2013).

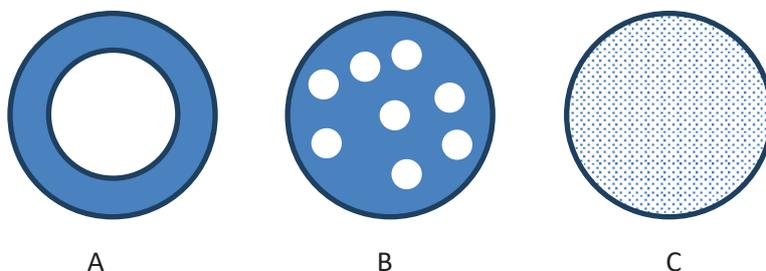


Figura 1.3: tipos de partículas que se pueden formar: 1.3.A: cápsula con un núcleo. 1.3.B: cápsula con varios núcleos. 1.3.C: esfera

Los sistemas de liberación de fármacos se introducen al organismo por diferentes vías: oral, parenteral, rectal, vaginal, inhalatoria, tópica, ocular, ótica o nasal. En principio, la vía de administración más ventajosa para estos sistemas poliméricos nano y/o micro encapsulados y biodegradables es la parenteral, es decir, mediante inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular (Sáez, 2004). Sin embargo, la necesidad de conseguir una acción localizada de algunas drogas y evitar su distribución sistémica ha llevado a la ciencia a explorar otras vías de administración de estas partículas y desafiar las limitaciones de cada caso. Por ejemplo, la vía nasal permite el acceso directo de los fármacos al cerebro para tratar trastornos en el sistema nervioso central, evitando la barrera hematoencefálica, el metabolismo gastrointestinal y la eliminación hepática, pero la mucosa nasal posee una escasa hidrofiliidad y una alta tasa de eliminación que desafían la eficacia del fármaco (Di, 2021). En el caso de la administración tópica se requiere el tratamiento del polímero utilizado para lograr que las partículas se adhieran a la superficie deseada y así obtener una administración sostenida del fármaco, que, por ejemplo, lo han logrado con el fármaco betaxolol encapsulado en partículas poliméricas suspendidas en un colirio para el tratamiento de glaucoma (Leon, 2015), o con el encapsulamiento de anti-fungicidas para uso tópico por vía vaginal (Johal, 2016).

Métodos de elaboración de partículas poliméricas para liberación controlada de fármacos

A continuación, se describen algunos de los métodos de elaboración de micro y nano partículas que se pueden encontrar en la bibliografía (Ye, 2010):

Emulsificación y evaporación/extracción de solvente: se basan en aprovechar la separación de fases de estos sistemas y la creación de gotas dispersas, para generar plantillas micro o nanométricas, que al evaporar el solvente donde está diluido el polímero dan lugar a la formación de las partículas en cuya matriz o núcleo se encuentra el agente a encapsular (Ye, 2010).

Secado por pulverización o congelación: consiste en crear una solución o emulsión con el agente a encapsular, y pulverizar en aire a elevada temperatura para evaporar el solvente. Los parámetros de operación del sistema permiten controlar las propiedades de las partículas. Una variante para evitar las altas temperaturas es agregar un paso previo de congelación y el uso de boquilla ultrasónica para pulverizar (Ye, 2010) (Gharsallaoui, 2007).

Atomización ultrasónica: consiste en una combinación de una boquilla y aguja. Mediante energía ultrasónica se genera un flujo, y a la salida de la boquilla se obtienen gotas micrométricas que se recolectan en un baño, formando una emulsión (Ye, 2010) (Rajan, 2001).

Electrospray: este método consiste en un sistema que contiene una bomba de líquido, una aguja a alto potencial eléctrico y un electrodo a tierra, colocado a una pequeña distancia de la aguja. La aplicación de alta tensión permite controlar el tamaño de las gotas formadas en la punta de la aguja (Ye, 2010) (Almería, 2011)

Microfluidica: se trata de sistemas de microcanales, con tratamientos internos que aportan hidrofiliidad o hidrofobicidad. El diámetro del canal, el tratamiento interno, la secuencia de fluidos acuosos y orgánicos, y el flujo permiten controlar las características de las gotas formadas al final del canal (Ye, 2010) (Dendukuri, 2009)

Microfabricación: consiste en la creación de partículas mediante el uso de microplantillas impermeables (Ye, 2010)

En muchas aplicaciones resulta crucial controlar el tamaño de las partículas (tamaño medio y distribución) no sólo para poder determinar el medio de administración, sino también para controlar la cinética de degradación ya que puede depender de este factor. En la tabla 1.2 se resumen las principales características de estos métodos de fabricación de partículas y encapsulamiento de fármacos.

Tabla 1.2: Revisión de métodos de encapsulamiento en micro y nano partículas poliméricas

Método	Características principales
Emulsiones	Simple, condiciones del proceso fácilmente controlables. Económico.
Secado por pulverización o congelación	Parámetros fácilmente controlables, temperatura de operación alta, mucha pérdida de producto.
Atomización ultrasónica	Un solo paso operativo, proceso aséptico, producción continua, precisión, tamaño controlable mediante diámetro de aguja.
Electrospray	Creación de partículas monodispersas, apropiado para macromoléculas biológicas. La repulsión eléctrica evita coalescencia de partículas.
Microfluídica	Posibilidad de controlar morfología interna de las partículas, complejidad en la aplicación.
Micro fabricación	Necesidad de pasos complejos según los agentes utilizados, alta repetibilidad, precisión y exactitud en control de tamaños.

La técnica elegida en este proyecto fue la de elaboración de micro y nano partículas a partir de emulsiones, por ser la más económica y accesible en el laboratorio *Lab3Bio*. Las variables del proceso son muchas (pueden ser más de 25 si se realiza una emulsión doble), pero fácilmente controlables.

Mecanismos clásicos de liberación

El proceso de liberación del fármaco a través de la estructura polimérica está afectado por una gran cantidad de fenómenos que ocurren, muchas veces, en simultáneo (Kamaly, 2016).

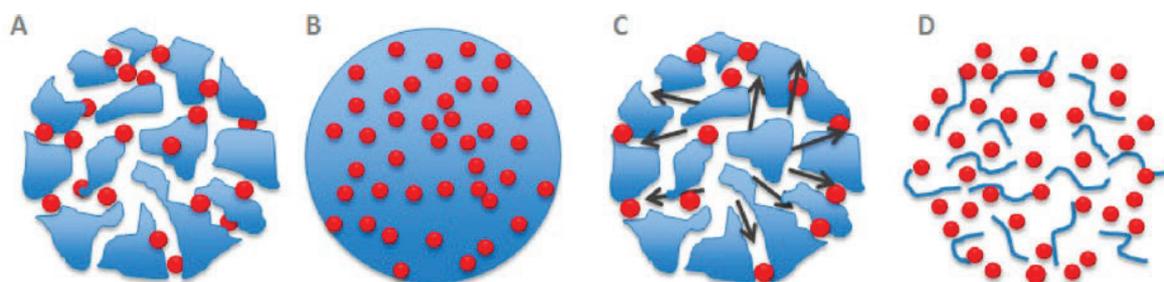


Figura 1.4: mecanismos de difusión del fármaco a través de la partícula polimérica. 1.4.A: difusión a través de poros. 1.4.B: difusión a través de la matriz. 1.4.C: difusión por bombeo osmótico. 1.4.D: difusión durante el proceso de erosión (Kamaly, 2016)

La difusión de las moléculas del fármaco desde el interior de la partícula hacia el medio externo no es constante ya que depende de condiciones que van cambiando con el tiempo, como por ejemplo el ingreso de agua dentro de la partícula, la disolución de la droga, la degradación del polímero, la creación de nuevos poros acuosos, la difusión de iones hidrógeno y cambios en el pH, o la difusión del fármaco y del polímero y sus efectos osmóticos (Kamaly, 2016).

Difusión del fármaco a través de poros llenos de agua

Tanto las partículas en forma de esfera como las cápsulas poseen cierta porosidad que permite el paso de las moléculas de fármaco a través de ella, impulsado por un gradiente de potencial químico que se aproxima al gradiente de concentración. Las partículas absorben agua de manera inmediata y ésta ocupa la matriz polimérica, llevando a que los poros se ensanchen y se facilite la difusión del agente (figura 1.4.A).

Difusión del fármaco a través de la matriz polimérica (esferas)

Difusión simple del fármaco a través de la matriz de la micro o nano esfera a una velocidad constante, gobernada por propiedades de la membrana polimérica como su permeabilidad y su espesor (figura 1.4.B).

Difusión del fármaco por bombeo osmótico

Cuando las partículas actúan en un medio acuoso, refiere a la difusión del fármaco originada por la fuerza del agua ingresando y saliendo de la matriz; flujo originado por la presión osmótica del sistema (figura 1.4.C)

Erosión de la superficie de la partícula

Proceso que ocurre cuando el polímero comienza a degradarse desde la superficie, desde el exterior hacia el interior. Ocurre cuando la tasa de erosión es mayor a la tasa de penetración del agua, y es el efecto más deseable ya que la cinética de erosión (y, por lo tanto, la cinética de liberación) es controlable, reproducible y el fármaco en el interior se encuentra protegido contra el efecto del agua (figura 1.4.D)

Erosión volumétrica de la partícula: ocurre cuando el agua penetra en la partícula a una velocidad mayor que la velocidad de degradación del polímero, lo que provoca que el material se hidrolice y se degrade internamente. Este proceso es menos predecible y no protege al fármaco encapsulado (figura 1.4.D).

Modelos matemáticos de liberación de fármacos

La cinética de liberación de un fármaco típicamente refiere a la descripción de cómo es el mecanismo por el cual las moléculas de la droga se trasladan de una posición inicial (por ejemplo, dentro de un núcleo de una microcápsula polimérica) hacia el exterior o medio de acción (Kamaly, 2016).

El estudio *in vitro* de esta cinética de liberación de un fármaco que se encuentra encapsulado es de considerable relevancia en el diseño y desarrollo, ya que brinda información útil para predecir el potencial mecanismo de funcionamiento.

Una cinética de liberación con un perfil de orden cero es aquel que garantiza una concentración plasmática constante del fármaco dentro del rango terapéutico (figura 1.5). Este modelo es un caso ideal, que no ocurre en la práctica.

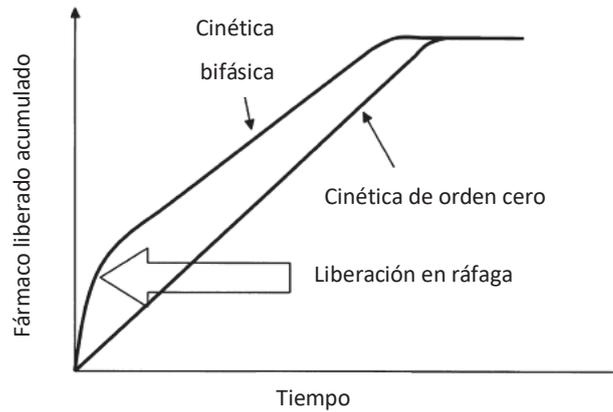


Figura 1.5: cinética de liberación bifásica con ráfaga vs cinética de liberación de orden cero

El perfil de liberación más común de los sistemas poliméricos de administración de fármacos es de tipo trifásico, y se observa normalmente en sistemas macromoleculares con un comportamiento de degradación heterogéneo (perfiles indicados con círculos y diamantes en figura 1.6). Cuando las partículas tienden a ser más pequeñas, el perfil se vuelve bifásico (perfiles indicados con cuadrados, cruces y líneas en figura 1.6)

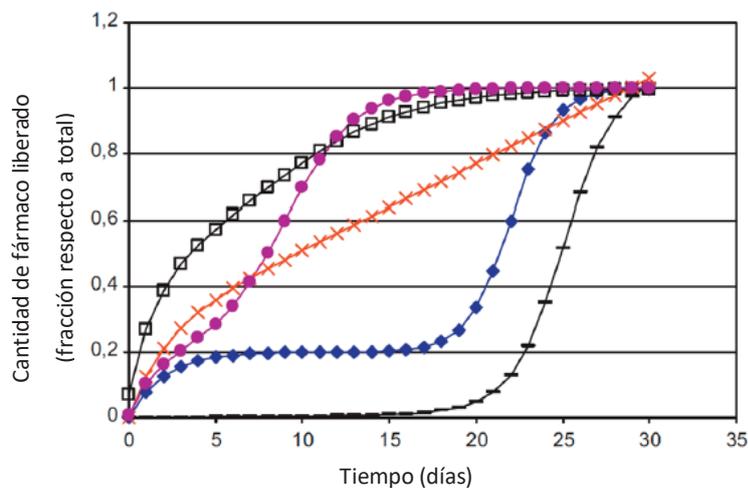


Figura 1.6: comparación de diferentes perfiles de liberación obtenida partir de la observación de trabajos de encapsulamiento de agentes y liberación en partículas de PLGA - poliácido láctico-co-glicólico. Referencias de las curvas: cuadrados: perfil bifásico con ráfaga y fase II rápida; círculos: perfil trifásico con fase II corta; cruces: perfil bifásico con ráfaga y fase II constante; diamantes: perfil trifásico; líneas: perfil bifásico sin fase de ráfaga (Fredenberg, 2011)

La fase I de un perfil de liberación trifásica se denomina efecto de liberación en ráfaga y es la liberación rápida de moléculas de fármaco que están cerca de la superficie. Este efecto se observa en la mayoría de los trabajos en los cuales se ha logrado encapsular agentes en micro y nano partículas poliméricas (Khoee, 2009) (Monnier, 2016) (Sansdrap, 1993). El fenómeno también está influenciado por el ingreso de agua en los poros de la partícula, lo que aumenta la probabilidad de que estos se ensanchan y favorezcan el movimiento de moléculas a través de ellos. Este efecto de ráfaga se acrecienta cuando la superficie de la partícula comienza a hacerse mayor con relación al espacio interior, y se observa que podría disminuirse al aumentar la diversidad de tamaño las partículas (es decir, con una distribución de tamaños más extensa) (Freiberg, 2004).

La fase II del perfil de liberación trifásico es una fase de liberación más constante, gobernada por la difusión lenta del fármaco a través de la matriz polimérica y los poros. Este comportamiento es simultáneo con la hidrólisis y degradación del polímero.

La fase III puede ser una fase de liberación más rápida, y comienza con la erosión masiva de la partícula polimérica.

En su trabajo de revisión, Freiberg destaca que los factores que principalmente afectan el perfil cinético y la duración y comienzo de las fases son (Freiberg, 2004):

- La porosidad de las partículas
- La distribución de tamaños
- La morfología de las partículas y la distribución del fármaco
- La cristalinidad del polímero
- El peso molecular del polímero

Kamaly, por su parte, destaca que la naturaleza química del fármaco es uno de los factores más relevantes: las drogas hidrofóbicas producen una tasa de liberación que se acerca a un perfil de orden cero, mientras que las drogas hidrofílicas muestran un patrón trifásico (Kamaly, 2016). Ambos autores coinciden en que los fenómenos no son obvios ya que dependen de muchos parámetros.

Los modelos matemáticos de cinética de liberación permiten predecir los comportamientos de estos sistemas farmacéuticos, y de esta manera disminuir costos y tiempos de desarrollo (Kamaly, 2016). Poder representar con ecuaciones matemáticas estas fases de liberación permite realizar sistemas computacionales.

El modelo de difusión más simple que existe es el que cumple con la Ley de Fick, que describe el caso de difusión gobernado únicamente por el gradiente de concentraciones. Para sistemas donde el gradiente de concentraciones cambia con el tiempo, la segunda Ley de Fick describe el comportamiento como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde $\frac{M_t}{M_\infty}$ es la fracción de soluto que se ha liberado a un tiempo t , y K es la constante de velocidad de liberación, que depende de la constante de difusión y el espesor del sistema.

Pero en casos donde el agente está encapsulado, el proceso de liberación puede volverse más complejo ya que puede verse afectado por otros factores. En el caso de encapsulamiento en materiales biodegradables, además, estos otros factores van cambiando con el tiempo ya que la difusión del fármaco depende de la degradación del material y de cómo se vayan modificando los poros por los cuales se difunden las moléculas de la droga. Por consiguiente, es necesario agregar al modelo estos efectos. Higuchi en 1963, y luego Korsmeyer en 1983, complejizaron el modelo de Fick al considerar que la fracción de fármaco liberado es una función exponencial del tiempo (Higuchi, 1963) (Korsmeyer, 1983):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Ecuación 1.2}$$

donde $\frac{M_t}{M_\infty}$ es la fracción de soluto que se ha liberado a un tiempo t , K es la constante de velocidad de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo de liberación del modelo. Si $n = 0.5$, el modelo se ajusta a la Ley de Fick.

En 1989, Peppas y Sahlin propusieron una expresión semiempírica para el mecanismo de liberación de fármacos en la cual se pueden representar las contribuciones de la difusión del agente y también de la degradación del polímero en una ecuación bi-exponencial (Peppas, 1989):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^n + K_2 t^{2n} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

donde $\frac{M_t}{M_\infty}$ es la fracción de soluto que se ha liberado a un tiempo t , K_1 es la constante que representa la contribución de difusión por ley de Fick, K_2 la constante que representa la contribución del mecanismo de degradación que sufre la matriz del polímero, y n es el exponente que indica el mecanismo de liberación del modelo.

Capítulo 2 – Antecedentes y marco regulatorio en Argentina

El éxito de una potencial aplicación, como la que se evalúa en este trabajo, está críticamente ligado a la existencia de un marco regulatorio apropiado. Siguiendo con el espíritu del laboratorio, del equipo de investigadores y de la línea de investigación, en este capítulo se analizan antecedentes de productos comerciales similares aprobados en Argentina y se estudia el marco regulatorio vigente.

A la fecha de este informe, se detectan numerosos trabajos científicos en los que se han encapsulado distintos principios activos en partículas de PHBV (Sendil, 1999) (Bazzo, 2012) (Yang C. P., 2009) (Masood F. , 2016), pero no se encontraron productos comerciales aprobados utilizando este material en algún país del mundo. Uno de los principales impedimentos, por el momento, parecería ser su alto costo y la baja productividad de los actuales procesos de producción del polímero (Policastro, 2021).

Sin embargo, se encontraron otros productos comerciales aprobados por la ANMAT que consisten en partículas o esferas poliméricas (tabla 2.1) y pueden servir de antecedente.

Tabla 2.1: productos comerciales aprobados en Argentina

Producto comercial	Principio activo	Polímero	Indicación de uso	Administración	Laboratorio y origen
Lupron Depot	Acetato de Leuprolida	PLGA - poliácido láctico-co-glicólico	Inhibidor de secreción de gonadotrofinas (cáncer de próstata, endometriosis, cáncer de mama, fibromas uterinos).	Inyección intramuscular o subcutánea mensual	Abbot (Japón)
Lectrum	Acetato de Leuprolida	PLGA - poliácido láctico-co-glicólico	Tratamiento de anemia causada por hemorragias por tumores uterinos, pubertad precoz, cáncer de próstata,	Inyección intramuscular cada 4 semanas	Eriochem (Argentina)

			cáncer de mama, endometriosis		
Sandostatin LAR	Octreotida	PLGA - poliácido láctico-co- glicólico	Tratamiento de la acromegalia	Inyección intraglútea cada 4 semanas	Novartis (Alemania)
Zoladex LA	Goserelin	PLGA - poliácido láctico-co- glicólico	Tratamiento de cáncer de próstata	Inyección subcutánea cada 12 semanas	Astrazeneca (Inglaterra)

En Argentina, el camino regulatorio que debe seguir la aprobación de una especialidad medicinal que consista en micropartículas poliméricas que encapsulan un fármaco en su interior para uso en liberación controlada o prolongada, está regido principalmente por el vigente decreto del Ministerio de Salud **Nº150/1992: Normas para el registro, elaboración, fraccionamiento, prescripción, expendio, comercialización, exportación e importación de medicamentos. Ámbito de aplicación. Disposiciones generales.** Este decreto establece que todas las especialidades medicinales que se comercialicen en el país deben estar inscriptas en un registro, que deben elaborarse en plantas habilitadas, y también determina la información que se debe adjuntar en la solicitud de registro. El proceso parece ser más simple para el caso de productos que se importen de los países listados en el Anexo II del decreto o que sean similares a productos ya aprobados en los países listados en el Anexo I (ver *Anexo I – Decreto N°150/1992*) (Decreto Nº150/1992, 1992).

Pero en el caso que se quiera inscribir un producto novedoso tanto para la Argentina como para el resto del mundo (o, al menos, de los países listados en los anexos) se solicita que además se adjunte **documentación que acredite la eficacia y la inocuidad del producto para el uso propuesto.**

Suponiendo que lo que se inscribiese fuera una especialidad medicinal que consiste en un fármaco encapsulado en micropartículas de PHBV, que es el polímero que se decidió utilizar en este trabajo (ver *Capítulo 3 - Elaboración y caracterización de partículas encapsulando un agente modelo*), tendríamos dos escenarios:

- El principio activo es nuevo y no está aprobado en nuestro país
- El principio activo ya existe y el encapsulamiento en partículas de PHBV proporciona una mejora respecto al tratamiento convencional

Para optimizar este proceso de validación del producto y generación de documentación se creó en 1990 el *Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano* (o **ICH**, por sus siglas en inglés). Las guías técnicas generada por este Consejo, y disponibles de

manera gratuita en su sitio web, pueden ser muy útiles ya que detallan todas las pruebas a seguir para generar el legajo de documentación solicitado por ANMAT (ICH, 2022).

Pero el enfoque cambia cuando se desea trabajar con partículas poliméricas de tamaño **nanométrico** - o cualquier otra nanoestructura - ya que seguir el esquema regulatorio genérico puede no ser apropiado (Bianco, 2018). La aplicación de nanotecnología en el campo farmacéutico permite crear estructuras capaces de vehicular principios activos y optimizar el proceso de distribución; pero como los nanoformulados son estructuras cuya reactividad es muy sensible a la relación superficie/volumen, la traslación de estos diseños a la clínica depende en gran medida de la evaluación de su eficacia y su seguridad. La calidad del producto final es altamente dependiente del control del proceso de producción, ya que un pequeño cambio en el proceso puede provocar interacciones radicalmente diferentes a las deseadas.

En febrero de 2018, la ANMAT emitió una circular para comenzar a enmarcar el desarrollo de nanotecnologías en el campo médico (ver *Anexo II - Circular ANMAT MED-NAN 001-00*). Este documento visibiliza las investigaciones realizadas en los últimos años y deja definidos varios conceptos como **nanomaterial**, y **producto y medicamento nanotecnológicos**. Si bien no tiene carácter de disposición y no tiene detalles aplicativos, establece que aquellos medicamentos que sean en escala nanométrica y aporten una mejora a una especialidad medicinal que ya existe en el mercado y esté aprobada, solo se agrega un nuevo requisito a lo que ya establece el decreto N°150/1992: la realización de ensayos de comparabilidad. Según el anexo III de esta circular, estos ensayos deben permitir caracterizar los siguientes puntos:

- Características fisicoquímicas:
 - o Composición (descripción, origen, manufactura, impurezas, isómeros) y excipientes (calidad, pureza, estabilidad).
 - o Morfología
 - o Impurezas dependientes del material, de los procesos, del producto y su degradación
 - o Relación principio activo / moléculas lipídicas
 - o Eficiencia de carga del principio activo (relación entre principio activo libre y principio activo encapsulado)
 - o Distribución de tamaños de partículas
 - o De corresponder, distribución y estado físico del principio activo dentro del liposoma. De lo contrario justificar
 - o Identificación y caracterización de los grupos funcionales involucrados en la interacción principio activo -plataforma
 - o Carga superficial
 - o pH interno

- En caso de conjugación con PEG (calidad, pureza, uniones químicas, peso molecular. estabilidad de PEG similares a aquellos utilizados por el referente)
- Estabilidad:
 - Estabilidad de producto terminado según las condiciones de almacenamiento y de uso descritas en el prospecto.
 - Estabilidad de producto reconstituido/diluido con cada uno de los solventes descritos en el prospecto a fin de asegurar los tiempos y las condiciones de almacenamiento del producto reconstituido hasta su total administración al paciente.
- Estudios farmacéuticos:
 - Ensayos comparativos con el producto referente para determinar la liberación del principio activo en las diferentes condiciones de pH por la que atraviesa el producto para llegar a su blanco tisular y determinar su integridad a las diferentes temperaturas.
 - Ensayos a diferentes pH: 7,3, 6,6 y 5.5 en buffer por 24 horas.
 - Ensayos a diferentes temperaturas 45°C, 47°C, 52°C y 57°C durante 12 hs en buffer pH 6.5.
- Validación del proceso de manufactura:
 - Descripción de la formulación (cuali-cuantitativa), indicando la función de cada uno de los componentes
 - Descripción general de cada uno de los pasos individuales del proceso de manufactura.
 - Descripción de los materiales críticos y parámetros sensibles a las variaciones que permitan una adecuada caracterización del producto (incluir detalle de materiales utilizados durante el proceso de manufactura: mangueras, filtros, etc).
- Estudios no clínicos:
 - Farmacocinéticos: Estudios cinéticos y toxicinéticos a distintas dosis en animales de experimentación, determinando en sangre, plasma o suero el principio activo libre y el principio activo asociado / encapsulado, utilizando técnicas analíticas validadas
 - Farmacodinamia: Determinación de eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo*.
 - Toxicología: Estudios toxicológicos agudos y sub-agudos a dosis repetidas.
- Estudios clínicos: De los resultados de los ensayos de comparabilidad de los estudios físico-químicos, farmacéuticos y no-clínicos dependerá la profundidad y amplitud de los requerimientos clínicos.

Capítulo 3 – Elaboración y caracterización de partículas encapsulando un agente modelo

Introducción

En este capítulo se aborda un ensayo experimental, en el cual se realizaron micropartículas poliméricas – de material PHBV – con un colorante encapsulado en su interior. Se utilizó una de las técnicas de elaboración más difundidas y sencillas: la **técnica de doble emulsión con evaporación del solvente**, que se basa en la fisicoquímica de emulsiones y que se explicará a continuación. Durante este método, el fármaco o agente modelo queda atrapado en la partícula durante el proceso de formación.

Entender cuáles son las variables de la técnica de fabricación que inciden en el tamaño y morfología de partículas formadas es esencial para tener un control en la tasa de liberación. En este trabajo se seleccionaron dos variables del método elegido y se analizó si tenían incidencia en el tamaño final de las partículas; además, se observó un punto intermedio en el proceso de formación para analizar si puede servir como un punto de control para predecir los tamaños de las micro y nano partículas que se formen.

Técnica de elaboración de partículas poliméricas por doble emulsión y evaporación de solvente

Emulsiones

La base de esta técnica de elaboración son las **emulsiones**. Una emulsión es un tipo de sistema disperso, constituido por la homogeneización macroscópica de dos o más fluidos no miscibles entre sí. Generalmente, estos dos fluidos suelen ser uno de tipo acuoso y otro de tipo orgánico u oleoso. En este sistema, una de las dos fases se encuentra dispersa en gotas (fase dispersa) y la otra en forma continua. La fase continua es aquella a través de la cual se puede acceder desde cualquier punto a otro sin abandonarla; mientras que, para ir de un punto de la fase dispersa a otro, es necesario atravesar porciones de la fase continua (figura 3.1) (Fernandez Arteaga, 2006).

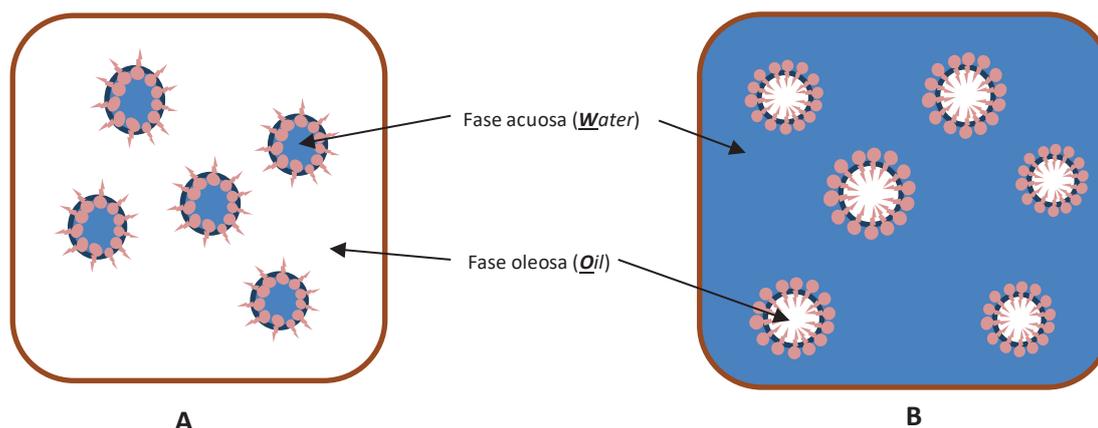


Figura 3.1: en la figura 3.1.A se muestra una emulsión W/O *water-in-oil* donde la fase dispersa es acuosa y la fase continua es oleosa. En la figura 3.1.B se muestra una emulsión O/W *oil-in-water*, donde la fase dispersa es oleosa y la fase continua es acuosa. En ambas imágenes se representa también la acción de las moléculas surfactantes (en naranja)

La interfaz entre las dos fases inmiscibles requiere el aporte de energía; para una misma relación de volumen entre las fases, cuanto menor sea el tamaño de las gotas mayor será la energía que se debe aportar para generar la interfaz. La presencia de uno o varios aditivos que migran hacia las interfaces, llamados **surfactantes**, permite disminuir la energía superficial y mejorar la estabilidad del sistema (figura 3.1) (Fernandez Arteaga, 2006).

Las emulsiones son sistemas meta-estables; es decir, tienen una relativa estabilidad cinética pero siempre tienden a la completa separación de las fases iniciales. Además, como se mencionó en el párrafo anterior, no se forman espontáneamente, sino que es necesario incorporar energía.

Las emulsiones pueden ser de dos tipos, que se explican a continuación y cuya notación se utilizará en el resto del informe:

- Emulsiones **W/O**, del inglés *water-in-oil*: son las emulsiones en las cuales la fase dispersa es de tipo acuosa, y la fase continua es de tipo oleosa o es un solvente orgánico o apolar.
- Emulsiones **O/W**, del inglés *oil-in-water*: son las emulsiones en las que la fase dispersa es oleosa u orgánica, y la continua es un solvente acuoso.

En la técnica de doble emulsión con evaporación del solvente, la droga se disuelve en una fase acuosa y se adiciona a una fase orgánica que contiene el polímero, formando entonces una emulsión agua en aceite o

wáter in oil (W/O) (figura 3.2). A continuación, una fracción de esta emulsión se adiciona a una segunda fase acuosa que contiene un surfactante con el fin de estabilizar las partículas que se forman. Esta emulsión doble sirve de plantilla para limitar el tamaño de las partículas que se formarán. Por último, el proceso de evaporación del solvente orgánico provoca la precipitación de las partículas poliméricas (Maia, 2004).

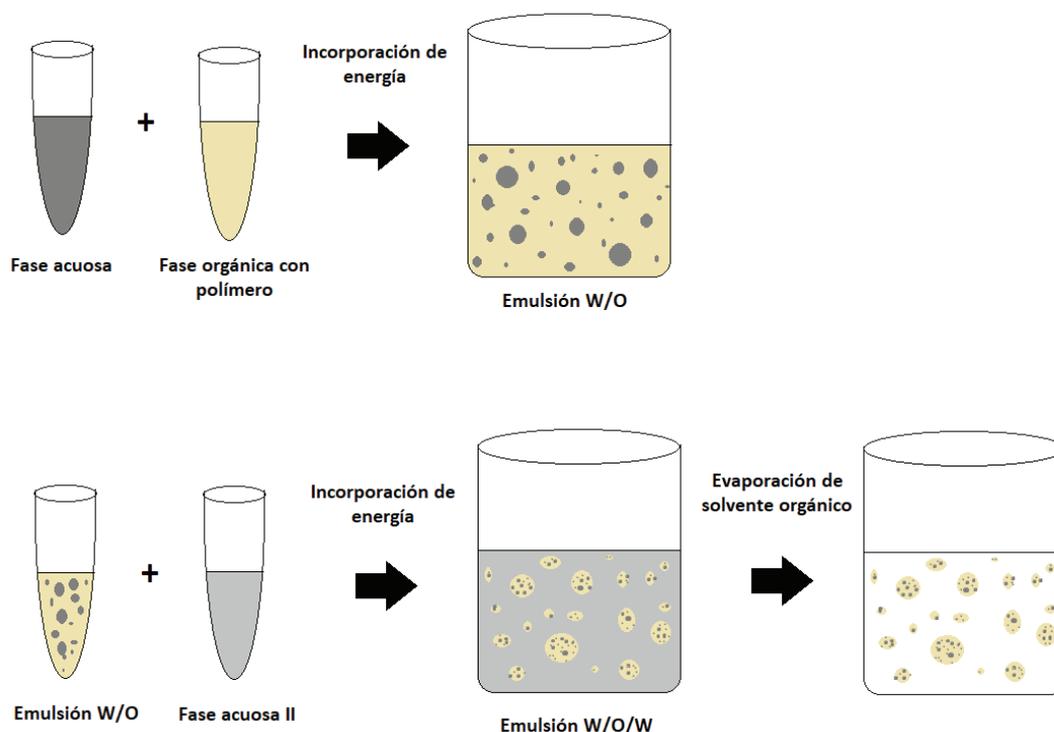


Figura 3.2: esquema de técnica de doble emulsión con evaporación de solvente

Surfactantes

Un surfactante es un agente tensioactivo. Los materiales tensioactivos se caracterizan por ser sustancias anfifílicas: su estructura molecular posee una zona polar hidrofílica, y otra zona apolar hidrófoba o lipofílica (figura 3.3). Se los define como agentes tensioactivos porque muestran una tendencia a migrar hacia las interfases, ya que su grupo polar se orienta a fases acuosas y su grupo no polar se orienta a fases oleosas (Khoee, 2009) (ICI Americas Inc., 1984).

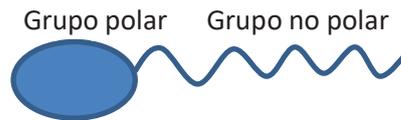


Figura 3.3: representación de estructura básica de un tensioactivo: grupo polar hidrofílico y grupo no polar hidrófobo

Todos los agentes tensioactivos son sustancias anfifílicas, pero no todas las sustancias anfifílicas son tensioactivos. Para que un compuesto tenga esta característica es necesario que la molécula posea propiedades relativamente equilibradas (es decir, que el balance entre el largo de la cadena no polar y el grupo polar sea adecuado).

Balance hidrofílico-lipofílico

En 1913, un investigador llamado Bancroft llegó a la conclusión de que la estructura de una emulsión depende en gran medida de la naturaleza del surfactante: empíricamente demostró que el líquido en el cual el agente tensioactivo se disuelve actúa luego como fase continua de la emulsión (Fernandez Arteaga, 2006).

Siguiendo esta regla de Bancroft, en 1949, Griffin analizó una gran cantidad de agentes tensioactivos y llegó a la misma conclusión (Fernandez Arteaga, 2006). A los surfactantes observados los agrupó en liposolubles – formadores de emulsiones *wáter-in-oil* – e hidrosolubles – formadores de emulsiones *oil-in-water*. En base a este trabajo estableció una escala continua de solubilidad en la que a cada emulsificador se le asigna un valor numérico entre 0 y 20, que es una expresión de su balance hidrofílico-lipofílico (de acá en adelante, llamado *HLB*), es decir, una cuantificación del balance entre los tamaños y longitudes de sus porciones hidrofílicas y lipofílicas (ICI Americas Inc., 1984). Este parámetro también está asociado con la solubilidad de la sustancia: un emulsificador que tiene bajo HLB tiende a ser más soluble en un medio oleoso u orgánico, y uno con mayor HLB, en un medio acuoso. Si bien el concepto teórico es mucho más complejo y pueden existir excepciones, a nivel práctico este sistema proporciona una guía útil para elegir un estabilizador según el uso y los ingredientes que se combinen en una emulsión (tabla 3.1).

Tabla 3.1: rangos de HLB y sus usos típicos (ICI Americas Inc., 1984)

Rango HLB	Uso
4 a 6	Emulsificadores de W/O
7 a 9	Humectantes
8 a 18	Emulsificadores de O/W
13 a 15	Detergentes
10 a 18	Solubilizadores

Materiales

Polímero: PHBV

En este trabajo se fabricaron partículas de un polímero llamado poli(3-hidroxi butirato- co -3-hidroxi valerato) - conocido por sus siglas **PHBV** - a través del método de doble emulsión con evaporación del solvente. Esta técnica ya venía siendo utilizada en el laboratorio donde se llevó a cabo este proyecto (Cazado, 2016).

El PHBV es un polímero de origen natural, perteneciente a la familia de los polihidroxi alcanoatos (figura 3.4). Estos polímeros son poliésteres lineales, producidos por la acción de bacterias como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía. Se conocen más de 90 géneros de bacterias productoras de polihidroxi alcanoatos en condiciones aeróbicas y también anaeróbicas. Si el grupo R es un radical metilo CH₃, el monómero es hidroxi butirato (HB), mientras que si R=C₂H₅, se lo denomina valerato (HV) (Raza, 2018) (Liu, 2014). Entonces el PHBV es un copolímero formado mayoritariamente por monómeros de HB con un porcentaje (en masa o peso molecular) de monómeros de HV.

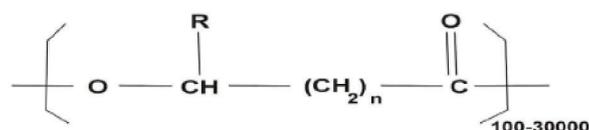


Figura 3.4: estructura general de un PHA (Raza, 2018)

Se estudia la aplicación de polihidroxi alcanoatos como materiales encapsuladores de fármacos para su uso en liberación controlada ya que son biocompatibles y biodegradables: se degradan en metabolitos no tóxicos para el ser humano. Su principal mecanismo de degradación es la biodegradación, la cual se debe principalmente a enzimas específicas conocidas como *depolimerasas de PHA*, secretadas por los mismos microorganismos productores para hidrolizar el polímero y volverlo soluble en agua para poder utilizarlo. Pero, aparte de la actividad de estas enzimas, factores ambientales como la temperatura, la humedad y la población

bacteriana, provocan degradación hidrolítica, térmica y biodegradación (Ong, 2017). Además, cabe destacar que otras condiciones propias del material como su área superficial, largo de la cadena polimérica, composición o cristalinidad influyen significativamente en la tasa de degradación. Para el caso del PHBV, cuanto mayor es la presencia del copolímero (hidroxivalerato), mayor es la tasa de degradación (Liu, 2014).

En este trabajo se utilizó PHBV (grado ENMAT Y100; 2%mol HV) fabricado por la empresa TianAn.

Surfactantes estabilizadores de las emulsiones

Para estabilizar las emulsiones se utilizaron tres surfactantes comerciales con distintos balances hidrofílico-lipofílicos (HLB):

- Span 80, marca Parafarm
- Tween 80, marca Biopack
- Tween 20, marca Biopack

En la primera emulsión W/O se utilizó Span 80, con un HLB de 4 que resulta buen estabilizador de emulsiones ya que es soluble en medios orgánicos (ICI Americas Inc., 1984).

En la segunda emulsión, de tipo O/W, se optó por utilizar mezclas de surfactantes y así evaluar si el valor de HLB del estabilizador utilizado y su concentración pueden impactar en los tamaños de las partículas formadas. En este tipo de emulsiones O/W, los surfactantes con valores de HLB entre 8 y 16 resultan buenos estabilizadores (ICI Americas Inc., 1984), por lo que se probaron mezclas cuyo valor de HLB resultante se encontrase dentro de este rango. Para obtener surfactantes con valores en este rango se mezclaron Span 80 (HLB = 4,3) y Tween 80 (HLB = 12,0), siguiendo las ecuaciones 3.1 y 3.2 para calcular las concentraciones de cada uno de ellos (ICI Americas Inc., 1984).

$$\%(A) = \frac{100 (X - HLB_B)}{HLB_A - HLB_B} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\%(B) = 100 - \%(A) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Las proporciones utilizadas y los HLB obtenidos de estas mezclas de surfactante se exponen en la tabla 3.2.

Las muestras con surfactante de valor de HLB 16,8 se lograron usando únicamente Tween 20 (ICI Americas Inc., 1984).

Tabla 3.2: la mezcla de los surfactantes Span 80 y Tween 80, en las proporciones mostradas en la tabla, da como resultado un surfactante con un valor de HLB entre 8 y 15 (Maia, 2004)

Proporción SPAN 80 (%)	Proporción TWEEN 80 (%)	Valor de HLB de la mezcla
65	35	8,0
60	40	8,5
55	45	9,1
50	50	9,6
45	55	10,2
40	60	10,7
35	65	11,2
30	70	11,8
25	75	12,3
20	80	12,8
15	85	13,4
10	90	13,9
5	95	14,4
0	100	15,0

Agente encapsulado: Azul de Toluidina

En las partículas elaboradas se encapsuló azul de toluidina. El colorante azul de toluidina utilizado fue el de la marca Sigma Aldrich, con una masa molar de 305,83 g/mol. La selección de este colorante en particular se debió a su disponibilidad inmediata en el laboratorio y su buena solubilidad en agua.

Las moléculas de este colorante son muy propensas a agregarse por ser planas, fenómeno que modifica su coeficiente de absorbanza y, por lo tanto, el tono de azul que se observa. Esta consideración es de vital importancia para medir su concentración mediante espectrofotometría (ver Anexo III – Curva de calibración de espectrofotómetro).

Métodos

Elaboración de partículas

El esquema del procedimiento llevado a cabo se observa en la figura 3.5, de acuerdo con protocolos modificados de Cazado, Chatuverdi y Alp (Cazado, 2016) (Chaturvedi, 2011) (Alp, 2017). En la primera fase acuosa el solvente fue agua destilada y el soluto fue el colorante azul de toluidina al $1,500 \pm 0,003$ % m/v.

El solvente de la fase oleosa fue cloroformo, el soluto fue PHBV a una concentración del $5,00 \pm 0,05\%$ m/v, y el surfactante Span 80 a una concentración del $3,00 \pm 0,04\%$ m/v.

La primera emulsión estuvo compuesta por una proporción 1:5 de la fase acuosa y la fase oleosa. El método de emulsificación fue por agitado manual y el uso de un lavador ultrasónico (marca Testlab, potencia 160 W) durante 7 minutos. Como resultado se obtuvo una emulsión *water-in-oil*, referenciada como W_1 / O .

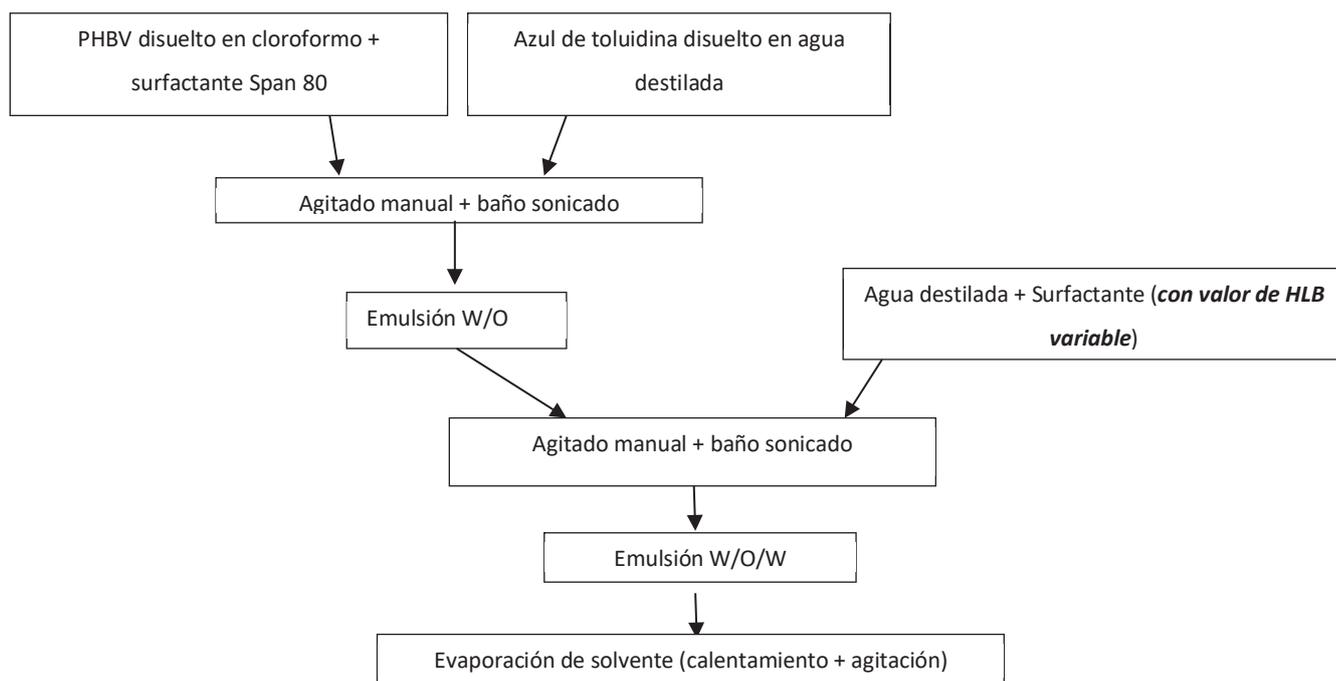


Figura 3.5: flujo del procedimiento

Para la segunda emulsión, la primera emulsión W_1/O actuó como fase orgánica, ya que la fase continua es cloroformo. La fase acuosa, denominada W_2 , se compuso de agua destilada y surfactante, que en este experimento fue uno de los factores variables a observar, de acuerdo con lo observado en los trabajos de Maia, Khoe y Sandrap, sobre su potencial influencia en el tamaño de las partículas formadas (Maia, 2004) (Khoe, 2009) (Sandrap, 1993). Se probaron 6 tipos de surfactantes con distinto balance hidrofílico-lipofílico (HLB) con 3 concentraciones diferentes, generando un experimento de tipo bloque cruzado (tabla 3.3)

Tabla 3.3: diseño del experimento tipo bloque cruzado

<i>Condiciones del surfactante</i>		<i>Valor de HLB del surfactante</i>						
		<i>de la fase W₂</i>						
<i>Concentración del surfactante (%)</i>		1	8,0	9,6	11,8	13,9	15,0	16,8
		3	W _{2,1}	W _{2,4}	W _{2,7}	W _{2,10}	W _{2,13}	W _{2,16}
		5	W _{2,2}	W _{2,5}	W _{2,8}	W _{2,11}	W _{2,14}	W _{2,17}
			W _{2,3}	W _{2,6}	W _{2,9}	W _{2,12}	W _{2,15}	W _{2,18}

La segunda emulsión se logró colocando una proporción 1:5 de la fase acuosa (variable) y la fase oleosa. El método de emulsificación también fue por agitado manual y el uso de un lavador ultrasónico (marca Testlab, potencia 160 W) durante 7 minutos.

Finalmente, la evaporación del solvente se logró agitando la emulsión a 1400 rpm durante 4 horas a una temperatura de 30°C.

Caracterización de partículas obtenidas

En las 18 muestras se observaron los tamaños de las gotas de emulsión antes de la evaporación del solvente, y los tamaños de las partículas formadas luego de la evaporación del cloroformo con el objetivo de analizar tamaño medio, dispersión de tamaño, y discutir si los tamaños de las gotas podría ser un punto de control de calidad intermedio en el proceso de elaboración. Estas tareas fueron realizadas empleando un microscopio óptico con un lente objetivo de 100X, siendo una técnica apropiada para determinar tamaños de partículas del orden del micrón (figura 3.6.A) (Cazado, 2016).

Para obtener los datos experimentales se acudió a un procesamiento digital de las imágenes captadas por el microscopio utilizando el software FIJI® (figura 3.6.B). El procesamiento consistió en un acondicionamiento de cada imagen para luego poder aplicar exitosamente el algoritmo de detección de círculos “*Analizar partículas*” ofrecido por el programa (figura 3.7). La rutina *Analizar partículas* de FIJI® requiere que la imagen sea binaria: es decir, que los círculos o partículas a analizar sean negros y el fondo blanco, o viceversa.

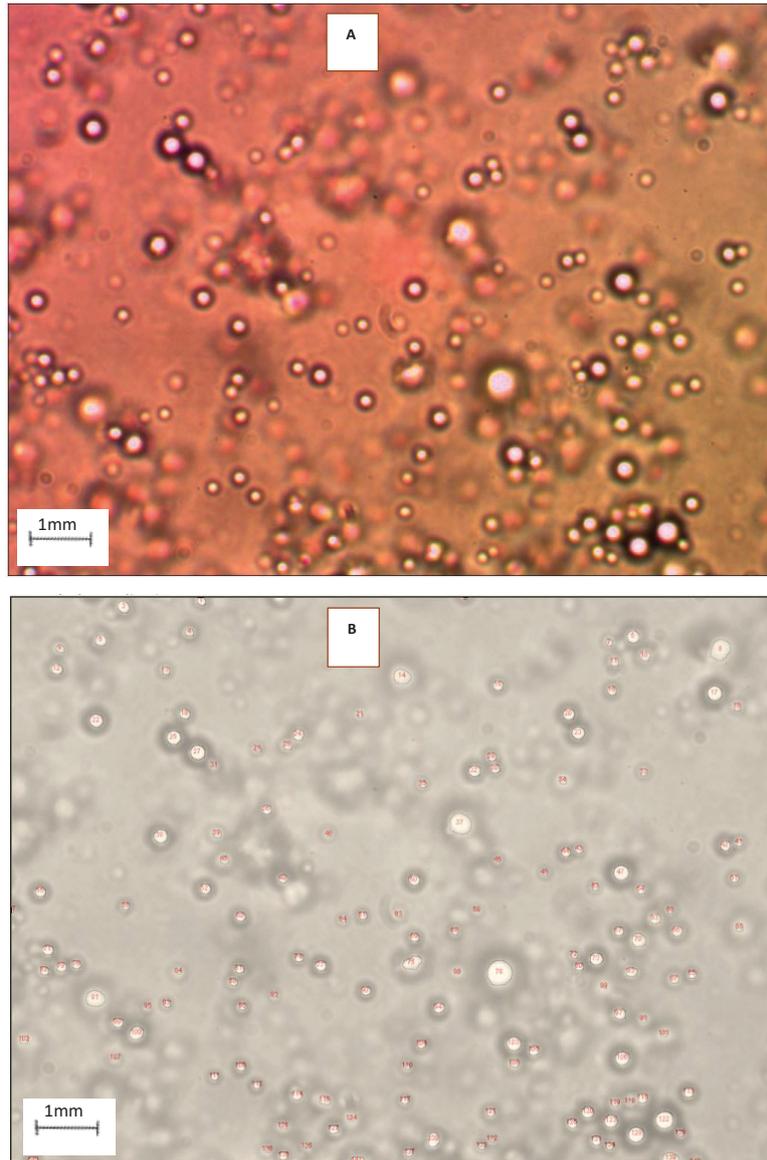


Figura 3.6: figura 3.6.A: captura de las partículas observadas a través de un microscopio con una magnificación de 100X. Figura 3.6.B: superposición de la captura en microscopio y los círculos detectados

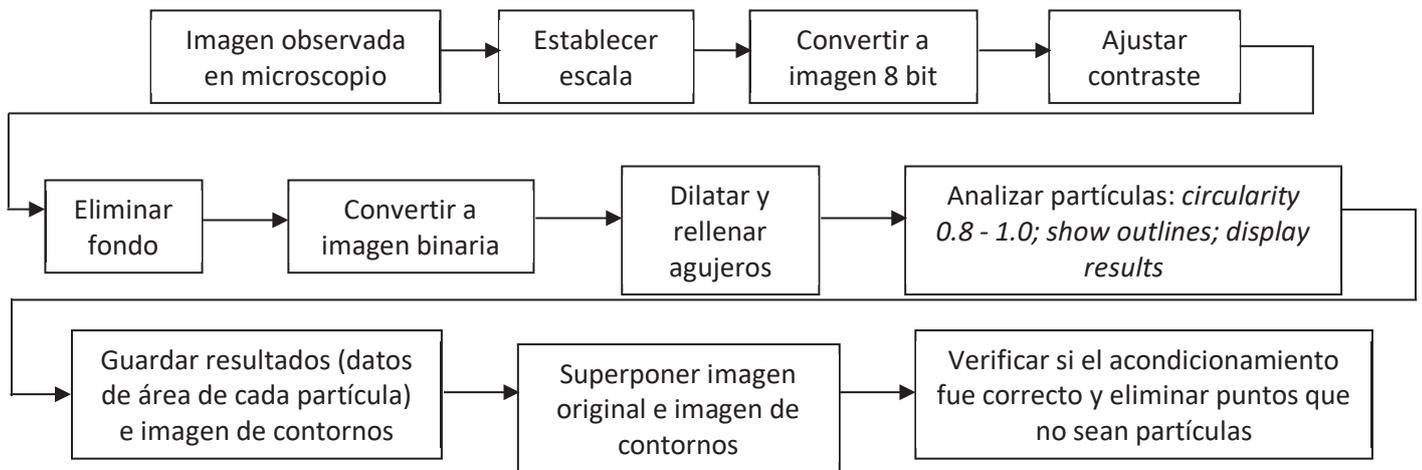


Figura 3.7: secuencia del acondicionamiento de imágenes

El análisis de los diámetros de las gotas y las partículas se realizó a partir del diseño de bloque cruzado. Los parámetros analizados para describir la dispersión de tamaño de cada muestra fueron:

Diámetro medio: promedio de diámetros de las gotas y de las partículas de cada muestra. El diámetro se calculó a partir del área de los círculos detectados por el algoritmo.

Desviación estándar: medida de dispersión de los valores respecto al valor medio.

Error estándar del diámetro medio de una muestra: este error se definió como el cociente de la desviación estándar y la raíz cuadrada de la cantidad de partículas detectadas en esa muestra(datos).

Percentil 10% y percentil 90%: el percentil X% de una población es la función acumulada de probabilidad, y son parámetros útiles para evaluar la distribución de tamaño de la muestra, ya que manifiesta qué porcentaje de partículas poseen un diámetro menor a estos valores. En este caso, se observaron los percentiles 10% y 90% a fin de establecer un indicador de la dispersión de tamaños lograda en cada proceso.

Medición de eficacia de encapsulamiento y ensayo de liberación

Un sistema de liberación controlada que se convierta en un producto comercial debe tener una precisa caracterización de su perfil farmacocinético, y debe demostrar que su perfil de liberación aporta una mejora

respecto al tratamiento convencional y que es seguro y eficaz. Por este motivo, es imperativo diseñar e implementar un correcto método para medir la liberación del agente encapsulado (Holowka, 2014).

Como es posible que se produzca el efecto ráfaga en el ensayo de liberación, resulta indispensable poder monitorear los primeros minutos del proceso, por lo que el método de observación debe ser accesible e inmediato.

Las herramientas utilizadas en la bibliografía consultada para medir eficacia de encapsulamiento y liberación del agente incluyen técnicas de absorción ultravioleta y espectrofotometría (Sendil, 1999) (Riekens, 2011) (Yang C. P., 2009) (Freiberg, 2004) (Khoee, 2009) (Monnier, 2016). Calibrando correctamente estos instrumentos se puede obtener la concentración en el medio de liberación del agente deseado, y así poder analizar su variación en un determinado lapso.

Espectrofotometría

Un espectrofotómetro es un equipo que hace pasar un haz de luz monocromático sobre la muestra y calcula su absorbancia, es decir, la cantidad de luz absorbida por ella (ecuación 3.3)

$$A = -\log \frac{I_t}{I_o} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde A es la absorbancia, I_o es la intensidad del haz de longitud de onda emitido, e I_t es la intensidad del haz de longitud de onda transmitido a través de la muestra.

La ley de Beer-Lambert relaciona la absorbancia medida y la concentración del soluto en cuestión (ecuación 3.4):

$$A = -\log \frac{I_t}{I_o} = L \epsilon C \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde L es la longitud del camino óptico (longitud de la cubeta donde está colocada la muestra, en centímetros), ϵ es el coeficiente de absorbancia del soluto en el medio analizado, y C es la concentración molar del soluto en la solución. Esta ecuación nos permite saber la concentración de un soluto conocido, luego de obtener el valor de absorbancia en el espectrofotómetro.

La principal limitación de este método es que el valor de absorbancia que mide el espectrofotómetro no siempre puede considerarse un resultado válido, y es necesario realizar previamente una curva de calibración. El objetivo de este procedimiento no solo es relacionar y predecir la respuesta del espectrofotómetro respecto a la concentración del analito, sino también definir el intervalo de trabajo en el cual los resultados tienen una precisión y exactitud conocidas y documentadas.

En primer lugar, para elaborar la curva de calibración, es una buena práctica considerar los valores de absorbancia entre 0,05 y 0,9 y así descartar los límites de detección del equipo para obtener una curva aceptable (ver Anexo III – Curva de calibración de espectrofotómetro).

A partir de la curva de calibración obtenida, que debe realizarse luego de encender el equipo y comenzar a medir, se obtiene una ecuación que relaciona el valor de absorbancia con la concentración de analito. En el caso particular de este trabajo, azul de toluidina, se debe diluir controladamente cada muestra a analizar para entrar en el rango válido de medición (ver Anexo III – Curva de calibración de espectrofotómetro).

Medición de eficacia de encapsulamiento y liberación del colorante

La eficacia de encapsulamiento (EE) indica la cantidad de agente que fue cargado dentro de las partículas, en relación con la cantidad inicial. Para el caso del experimento realizado en este trabajo, resultaría a partir de la siguiente relación (ecuación 3.5):

$$EE = \frac{\text{cantidad de azul de toluidina encapsulada}}{\text{cantidad de azul de toluidina total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.5}$$

La *cantidad de azul de toluidina total* se calcula a partir de la concentración inicial que posee la fase acuosa de la primera emulsión: $1,500 \pm 0,003$ % m/v.

Para llevar a cabo la medición de la eficacia de encapsulamiento y de la liberación del colorante *in vitro* es necesario preparar las partículas y llevar a cabo un protocolo para el ensayo. Se toman los protocolos utilizados por Farago y Bazzo para estas caracterizaciones como referencia (Bazzo, 2012) (Farago, 2008). Luego de la evaporación del solvente, se lavan las partículas con agua destilada y se centrifugan a 5000 rpm durante 10 minutos para poder recolectarlas. Las partículas recolectadas se pesan y se disuelven en cloroformo para extraer el polímero y proceder a medir la cantidad de colorante final.

Para realizar la medición de liberación de colorante se propone seguir la técnica de diálisis estudiada por D'Souza, utilizando un sistema comercial *Float-A-Lyzer*[®] con un tamaño de poro que permita únicamente la difusión de las moléculas de azul de toluidina (D'Souza, 2005).

En la figura 3.8 se ilustra como debe montarse el sistema dializador en un vaso de vidrio transparente. El medio de liberación donde se suspenden las partículas y hacia donde migra el colorante por fuera del dializador debe ser una solución buffer con un valor de pH de 6,8, y siempre se debe asegurar una temperatura de 37 ± 1 °C. El agitador magnético tiene como objetivo homogenizar el medio (Bazzo, 2012).

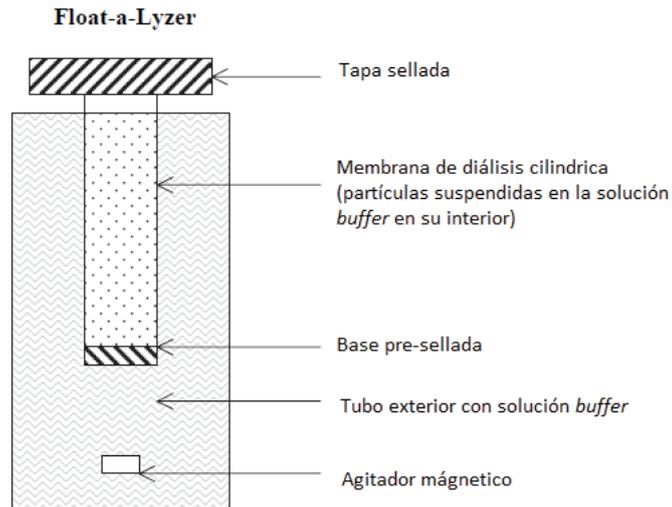


Figura 3.8: ilustración del sistema a montar para realizar el ensayo de liberación (D'Souza, 2005)

La prueba empieza cuando el dializador conteniendo las partículas con colorante se sumerge en el vaso. En ese momento inmediato, se inicia la agitación y el control del tiempo transcurrido.

El esquema de intervalos de medición que se propone en este trabajo es: una muestra cada 30 minutos durante las primeras 5 horas; luego una medición a las 8 horas, y a continuación un esquema de mediciones cada 24 horas durante una semana (Bazzo, 2012).

El procedimiento para tomar las muestras es el siguiente:

- 1) Cuando se cumpla el tiempo especificado, se debe retirar con una jeringa una alícuota de una zona a una distancia media entre la superficie y la parte superior del canastillo, y a no menos de 10mm de la pared del vaso.
- 2) Reemplazar el volumen retirado para el análisis por un volumen igual del medio a 37,0°C.
- 3) Medir la concentración de colorante en la alícuota tomada con espectrofotómetro

Al finalizar el experimento se contará con 18 mediciones que permitirán analizar el perfil de liberación del colorante.

Limitaciones

En cuanto al análisis de tamaño de las gotas de emulsión y partículas, por el método de caracterización propuesto y el protocolo de procesamiento de imágenes utilizado, no fue posible detectar partículas menores a 3,60 μm . Considerando que a partir de este método de elaboración se han conseguido partículas de tamaño

nanométrico (Freiberg, 2004), y que en algunos histogramas – que se muestran en la sección Resultados de este informe – la curva normal de diámetros se ve truncada y tendiendo hacia valores menores a 3,60 μm , se recalca que esta limitación es una fuente de error para el cálculo del valor medio y distribución.

Al momento de realización del experimento planteado no se contaba con un espectrofotómetro u otro equipamiento para medir concentración de un analito en solución. En el año 2022, el laboratorio adquirió un espectrofotómetro (modelo DLab SP-UV 1000), pero ya no se contaban con las partículas para poder medir la eficacia de encapsulamiento del colorante ni realizar el ensayo de liberación propuesto; por tal motivo, queda como trabajo futuro profundizar los métodos y protocolos propuestos en la sección *Medición de eficacia de encapsulamiento y liberación del colorante*, y no se muestran los resultados de estos ensayos.

Resultados

Se pudieron obtener datos de gotas de emulsión y partículas de las 18 muestras propuestas (ver *Anexo IV – Resultados completos del experimento*). Los valores medios de diámetro de las partículas formadas se encuentran entre **20,5 \pm 0,6 μm** y **35,0 \pm 1,1 μm** , y se presentan en la tabla 3.4 junto con los valores medios de las gotas de emulsión antes de la evaporación del solvente.

Tabla 3.4: resultados de valores medios de las gotas de emulsión y de los diámetros de las partículas obtenidas

Valores medios (μm)		Valor de HLB del surfactante											
		8,0		9,6		11,8		13,9		15,0		16,8	
		Gotas emulsión	Partículas	Gotas emulsión	Partículas	Gotas emulsión	Partículas	Gotas emulsión	Partículas	Gotas emulsión	Partículas	Gotas emulsión	Partículas
Concentración del surfactante (%)	1	44,0 \pm 0,2	27,9 \pm 0,1	38,9 \pm 0,1	35,0 \pm 1,1	26,7 \pm 0,2	21,0 \pm 0,8	51,6 \pm 0,2	30,9 \pm 1,3	22,4 \pm 0,1	26,7 \pm 0,4	31,5 \pm 0,1	26,7 \pm 0,4
	3	33,6 \pm 0,1	26,1 \pm 0,4	32,2 \pm 0,1	27,1 \pm 0,5	21,8 \pm 0,1	23,1 \pm 0,6	32,8 \pm 0,2	33,7 \pm 1,4	34,7 \pm 0,2	24,3 \pm 0,5	39,9 \pm 0,2	24,3 \pm 0,5
	5	29,3 \pm 0,1	27,1 \pm 0,4	27,3 \pm 0,1	20,5 \pm 0,6	22,9 \pm 0,1	25,4 \pm 0,4	59,8 \pm 0,2	25,0 \pm 0,6	30,3 \pm 0,1	26,5 \pm 0,5	31,4 \pm 0,1	26,5 \pm 0,5

En la figura 3.9 se expone una comparación de los histogramas de diámetro de las gotas de emulsión W/O/W₂ y los diámetros de partículas de cada muestra.

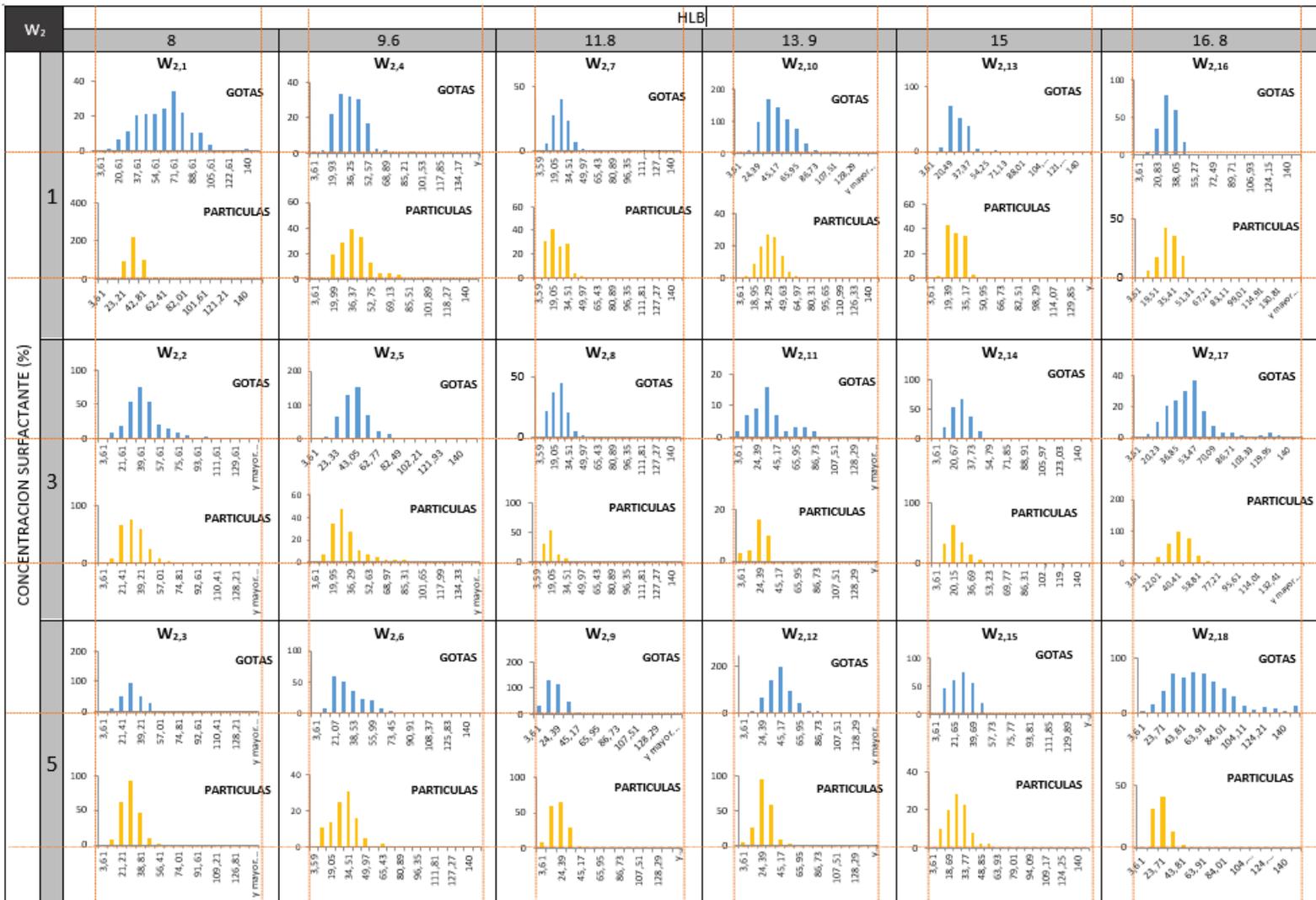


Figura 3.9: Histogramas comparativos de distribución de tamaños de gotas de emulsión –histogramas azules– y de partículas formadas para cada muestra –histogramas naranjas–.

Discusión

El diseño tipo bloque cruzado es una herramienta sencilla para analizar el impacto de dos variables en los resultados de un experimento. En este caso, se decidió analizar el impacto del HLB del surfactante y su concentración en el tamaño medio de las partículas y en la dispersión de tamaños, con las siguientes hipótesis:

- 1) El aumento de la concentración del surfactante puede provocar una disminución del tamaño medio de las partículas formadas, ya que tiene la capacidad de evitar la coalescencia entre las gotas de la emulsión (tabla 3.4). Sin embargo, aumentar la concentración de surfactante también genera un aumento en la viscosidad,

por lo que debería existir un punto crítico en el cual aumentar la cantidad de surfactante por encima de ese valor comienza a dificultar el proceso de formación (Khoee, 2009).

2) Una mayor presencia de Tween en el surfactante de la segunda emulsión (mayor valor de HLB) puede provocar que se formen partículas con un diámetro mayor, debido a que su grupo hidrofóbico es de menor tamaño respecto a Span: si el extremo hidrofóbico es más pequeño respecto a la cabeza hidrofílica, la repulsión entre los extremos de la molécula anfifílica se hace menor, y el agente pierde potencial para formar micelas o gotas cada vez más pequeñas (Mitchell D. J., 1981).

Sin embargo, ninguna de estas hipótesis pudo verificarse a partir de los resultados obtenidos del ensayo. La única muestra que presenta una tendencia en línea con la hipótesis número 1 es la muestra de **HLB = 9,6**, en la que se observa que el diámetro medio de las partículas disminuye conforme se aumenta la concentración de surfactante, siendo la concentración crítica del mismo probablemente mayor al máximo valor observado (5%). Además, esta muestra también presenta esta correlación entre el valor medio de las gotas de la emulsión y las partículas formadas, y se podría deducir también que, al evaporar el solvente, el tamaño medio de las partículas disminuye conforme se aumenta la concentración del surfactante.

La comparación gráfica de los histogramas (figura 3.9) permite observar cualitativamente que, en todos los casos, las curvas de dispersión se contraen al evaporar el solvente (diferencia entre las curvas de dispersión de tamaño de gotas y dispersión de tamaño de partículas); pero para las muestras con mayor concentración de surfactante, la contracción de estos histogramas parece ser menor.

Según la técnica empleada en este trabajo, el surfactante con valor HLB = 9,6 (Span 80 al 50% + Tween 80 al 50%) puede ser un buen agente para utilizar ya que permite:

- Observar los tamaños de las gotas de la emulsión antes de la evaporación del solvente, esto es, considerar un punto de control durante el proceso de elaboración, para predecir el tamaño final de las partículas;
- Controlar el tamaño medio de las partículas mediante la concentración de surfactante utilizado.

Sugerencias y trabajos futuros

Como se expuso en la sección Limitaciones, se dejan asentadas en este informe una serie de consideraciones técnicas para realizar la medición de la eficacia de encapsulamiento y realizar un ensayo de liberación del colorante modelo (azul de toluidina), y evaluar cómo impacta el surfactante elegido para estabilizar la segunda

emulsión también en estos aspectos. Además, queda pendiente evaluar si la liberación del agente encapsulado en este tipo de partículas poliméricas se adapta a algún modelo teórico típico.

Según la experiencia de este informe, se sugiere orientar los esfuerzos de investigación en lograr encapsular fármacos (para los cuales se requiera un mecanismo de liberación controlada prolongada en el tiempo) y evaluar aspectos de las partículas que influyan en el perfil de liberación, con énfasis en la polidispersión de tamaño de las partículas y en el porcentaje de copolímero HV – hidroxivalerato – del polímero PHBV utilizado (Gursel, 1999).

Capítulo 4 – Posibles aplicaciones de partículas de PHBV

Un estudio de la OMS del año 2003 había revelado una cifra alarmante: en el tratamiento de enfermedades crónicas, la adherencia de los pacientes a la medicación prescrita era muy baja: aproximadamente un 50% de adherencia en los países desarrollados, y un peor panorama en países de menor desarrollo. Los problemas de adherencia provocan que no se alcancen los beneficios que estos medicamentos pueden aportar a la salud, y se encontró que existía en todas las situaciones que dependen de la autoadministración (World Health Organization, 2003).

Aunque la adherencia de los pacientes al tratamiento depende de muchos factores - y es muy complejo de analizar - en este contexto, minimizar la frecuencia de administración de los fármacos mediante la fabricación de medicamentos de liberación controlada y prolongada, podría aportar enormes beneficios al tratamiento de enfermedades crónicas como asma, hipertensión, depresión, diabetes, VIH, tuberculosis, osteoporosis, fibrilación auricular, trasplantes de riñón, y dependencia del tabaco u otras sustancias, entre otros (Losi, 2021).

Para tratamientos analgésicos o antiinflamatorios se observa que es posible retardar la liberación de, por ejemplo, ibuprofeno encapsulándolo en partículas poliméricas. Esto podría ser útil para pacientes que sufren artritis reumatoide: una afección que se complica por la mañana, cuando el cuerpo deja de liberar sustancias químicas antiinflamatorias provocando rigidez y dolor articular en este momento del día en particular. En este escenario, resulta interesante poder fabricar antiinflamatorios que puedan administrarse la noche anterior pero que el nivel máximo se alcance por la mañana, cuando el paciente se despierta (Bazzo, 2012).

El Instituto Nacional del Cáncer estima que en el año 2022 habrá 1.918.030 nuevos casos y 609.360 personas perderán la vida a causa de esta enfermedad, liderando la lista los casos de mama, próstata y pulmón (National Cancer Institute, 2022). En la batalla contra este padecimiento, que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, los medicamentos pueden resultar muy efectivos para atacar las células cancerígenas, pero su aplicación exitosa es un gran desafío. En este campo, resulta útil el diseño de medicamentos en escala nanométrica y sistemas dirigidos hacia el sitio de acción, y las nanopartículas poliméricas pueden aplicarse con estos objetivos (Masood F. , 2016).

La elipticina, un compuesto obtenido de una planta muestra una actividad anticancerígena significativa contra el tumor cerebral y el cáncer de pulmón. Su escasa solubilidad en agua complica su aplicación clínica, pero existe evidencia científica de que es posible encapsularlo en nanopartículas poliméricas de PHBV con una

eficacia de aproximadamente el 40% y aumentando la inhibición de las células cancerígenas gracias a la vehiculización en tamaño nanométrico (Masood F. C., 2013) (Perveen, 2020).

Otro caso encontrado es el del 5-fluorouracilo (5-FU), un medicamento contra los cánceres de colon más populares, pero con una vida media de 10 a 20 minutos y con altos efectos secundarios en el tracto gastrointestinal y en la medula ósea. Se observa que este fármaco puede encapsularse en nanopartículas de PHBV (de aproximadamente 135nm de diámetro), disolviéndose en la fase orgánica de la emulsión, con una eficacia de encapsulamiento de 43.86%. Se observa que la encapsulación de 5-FU en nanopartículas es posible, y que esto podría disminuir los efectos secundarios del fármaco y reducir la dosis necesaria (Handali, 2020).

Para el tratamiento de la osteoporosis, que la padecen más del 30% de las mujeres mayores de 65 años, existe una gran necesidad de desarrollar tratamientos más efectivos: la terapia hormonal que reduce los síntomas conlleva varios riesgos, como aumentar la incidencia de cáncer de mama u ovario, o el desencadenamiento de accidentes cerebrovasculares (Scheithauer, 2015). La daidzeina, presente en diferentes plantas y especialmente en la soja, tiene la capacidad de suprimir la actividad de los osteoclastos, y por lo tanto tratar la osteoporosis al igual que lo hace el estrógeno, pero sin sus efectos adversos. Encapsular este compuesto en microesferas de PHBV es posible, y permitiría sostener su liberación durante un período de aproximadamente 3 días (Scheithauer, 2015).

Se observa que otra aplicación de las partículas de PHBV puede ser el tratamiento localizado a través de la administración transdérmica de medicamentos. El tratamiento transdérmico requiere la absorción del fármaco a través de las tres capas: el estrato córneo, que es la capa más externa de la epidermis, la dermis, que es quien da la estructura mecánica, y la capa subcutánea, que es la responsable de amortiguar y conservar el calor. Uno de los mayores desafíos en el desarrollo de un sistema eficaz es la transferencia del fármaco a través del estrato córneo fuertemente estructurado cuando la piel no está comprometida. La encapsulación de un fármaco en un vehículo permite que el fármaco se difunda en la piel y se libere en las capas más profundas, utilizando los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas como canales de acceso. Las partículas de PHBV de menos de 450 nm de diámetro parecen ser herramientas terapéuticas prometedoras para el tratamiento dérmico localizado de enfermedades como, por ejemplo, la psoriasis (Eke, 2014). Ejemplos de esta aplicación pueden ser el encapsulamiento de ácido fusídico en microesferas de PHBV, un agente antibacteriano utilizado para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por bacterias de la familia de estafilococos o estreptococos (Yang C. P., 2009), o de rifampicina y estreptomina, antibióticos para tratar infecciones graves en la piel como la úlcera de Buruli, para los que se requiere su administración sistémica diaria durante al menos 8 semanas (Mendes, 2022).

En tratamiento tópico para tratar el ojo seco causado por el síndrome de Sjögren, se observa que se ha logrado encapsular Rapamicina en micropartículas de PHBV de diámetros entre 20 y 50 μm que volverían mas efectivo su efecto (Wang, 2019). Pero otros tantos tratamientos oftalmológicos tienen la contrapartida de ser muy invasivos ya que se requieren inyecciones intraoculares periódicas, que aparte de ser dolorosas pueden conducir a infecciones (Turbert, 2022). El Bevacizumab, por ejemplo, es un fármaco efectivo para tratar la degeneración macular húmeda relacionada con la edad, la enfermedad ocular diabética y otros problemas de la retina, pero que posee varias limitaciones como su corta vida media, su susceptibilidad a factores ambientales, su hidrofiliidad y su alto peso molecular (De Negri, 2022). Su encapsulamiento en partículas poliméricas podría ayudar a mitigar estas limitaciones, además de conseguir un tratamiento más amable para el paciente, que requiera una menor cantidad de inyecciones intraoculares (De Negri, 2022).

La lista de potenciales aplicaciones de este tipo de partículas podría seguir, ya que desde principios de la década de 1990 que se estudia a esta familia de polímeros en esta área (Shrivastav, 2013). Sin embargo, el desafío más importante que aún debe superarse es su alto costo de producción, que hace que su precio no sea competitivo frente a otros polímeros de origen sintético (Elmowafy, 2019).

Anexo I - Decreto N°150/1992

Normas para el registro, elaboración, fraccionamiento, prescripción, expendio, comercialización, exportación e importación de medicamentos. Ámbito de aplicación. Disposiciones generales

Bs. As., 20/1/92

VISTO: La Ley N° 16.463 y los Decretos N° 9763 del 2 de diciembre de 1964 y 2284 del 31 de octubre de 1991,
y

CONSIDERANDO: Que es necesario adecuar la reglamentación de las normas legales referidas al registro, elaboración, prescripción, expendio, comercialización, exportación e importación, con el objeto de compatibilizar dichas actividades con las reformas estructurales que se están produciendo a nivel económico y social.

Que en este marco y dadas las particulares características del mercado de medicamentos, es necesario lograr una mayor transparencia y competencia del mismo.

Que el presente decreto se dicta en uso de las facultades que son propias del poder ejecutivo nacional reglamentando normas legales sancionadas en ejercicio del poder de policía propio del estado entendido este en su más pura expresión.

Que la salud de la población debe ser tutelada por el estado, a cuyo fin debe dictar las normas necesarias para cumplir con dicho cometido tendiendo a la custodia de tan alto interés social.

Que por lo tanto es conveniente que la población pueda, una vez prescripto el medicamento por el profesional en salud, optar libremente por las distintas especialidades medicinales o farmacéuticas existentes en el mercado.

Que el ejercicio de tal libertad es el principal instrumento que impediría la formación de monopolio y carteles que distorsionan el mercado y el acceso del pueblo a la salud.

Que la política de desregulación iniciada por el gobierno nacional hace necesario determinar el alcance de las normas contenidas en el Decreto N°2284/91 En relación con las actividades de producción, elaboración, comercialización, comercio exterior y afines de medicamentos y especialidades medicinales o farmacéuticas.

Que el presente se dicta en uso de las atribuciones conferidas en el artículo 86, inciso 2º de la Constitución Nacional.

EL PRESIDENTE DE LA NACIÓN ARGENTINA DECRETA:

CAPITULO I: ÁMBITO DE APLICACIÓN

Artículo 1º — El presente Decreto se aplicará el registro, elaboración, fraccionamiento, prescripción, expendio, comercialización, exportación e importación de medicamentos. A los fines del presente Decreto se adoptan las siguientes definiciones: a) Medicamentos: Toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra. b) Principio activo o droga farmacéutica: Toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana. c) Nombre genérico: Denominación de un principio activo o droga farmacéutica o, cuando corresponda, de una asociación o combinación de principios activos a dosis fijas, adoptada por la autoridad sanitaria nacional o, en su defecto, la denominación común internacional de un principio activo recomendada por la organización mundial de la salud. d) Especialidad medicinal o farmacéutica: Todo medicamento, designado por un nombre convencional, sea o no una marca de fábrica o comercial, o por el nombre genérico que corresponda a su composición y expendio, de composición cuantitativa definida declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y de acción terapéutica comprobable.

CAPITULO II: REGISTRO DE MEDICAMENTOS AUTORIZADOS

Art. 2º — La comercialización de especialidades medicinales o farmacéuticas en el mercado local estaría sujeta a la autorización previa de la autoridad sanitaria nacional. Las especialidades medicinales o farmacéuticas autorizadas para su expendio en el mercado nacional serían las inscriptas en un registro especial en el MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, de acuerdo a las disposiciones del presente decreto y su reglamentación. Prohíbese en todo el territorio nacional la comercialización o entrega a título gratuito de especialidades medicinales o farmacéuticas no registradas ante la autoridad sanitaria, salvo las excepciones que de acuerdo a la reglamentación disponga la autoridad sanitaria.

Art. 3º — Las solicitudes de inscripción al Registro de Especialidades medicinales o farmacéuticas autorizadas, deberán incluir la siguiente información con carácter de declaración jurada: a) del producto: nombre propuesto para el mismo; fórmula (definida y verificable); forma o formas farmacéuticas en que se presentará; clasificación farmacológica, haciendo referencia al número de código —si existiere— de la clasificación internacional de medicamentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS); condición de expendio; b) información técnica: método de control; período de vida útil; método de elaboración en conformidad con las

prácticas adecuadas de fabricación vigentes; datos sobre la biodisponibilidad del producto; c) proyectos de rótulos y etiquetas que deberán contener las siguientes inscripciones: nombre del laboratorio, dirección del mismo, nombre del Director Técnico, nombre del producto y nombre genérico en igual tamaño y realce, fórmula por unidad de forma farmacéutica o porcentual, contenido por unidad de venta; fecha de vencimiento, forma de conservación y condición de venta, número de partida y serie de fabricación; y leyenda "MEDICAMENTO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL, CERTIFICADO N°; d) proyectos de prospectos que reproducirán: las inscripciones no variables de los rótulos y etiquetas; la acción o acciones farmacológicas y terapéuticas que se atribuyen al producto con indicaciones clínicas precisas y con advertencias, precauciones y, cuando corresponda, de antagonismos, antidotismos e interacciones medicamentosas y de los efectos adversos que puedan llegar a desencadenar, posología habitual y dosis máximas y mínimas, forma de administración, presentaciones; e) en el caso de especialidades medicinales o farmacéuticas importadas de los Países incluidos en el Anexo II que forma parte integrante del presente, además de la información requerida en los incisos precedentes, deberá acompañarse un certificado de la autoridad sanitaria del país de origen, emitido de conformidad a la resolución W.H.A.41.18.1988 de la Asamblea Mundial de la Salud, o la que la sustituya. Asimismo, la elaboración de dichas especialidades medicinales o farmacéuticas deberán ser realizadas en laboratorios farmacéuticos cuyas plantas resulten aprobadas por Entidades Gubernamentales de Países consignados en el Anexo I del Decreto N°150/92 o por la SECRETARÍA DE SALUD del MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL y que cumplan los requisitos de normas de elaboración y control de calidad, exigidos por la autoridad sanitaria nacional. La verificación de las plantas elaboradoras será efectuada por la SECRETARÍA DE SALUD del MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL dentro de los SESENTA (60) días de presentada la solicitud de inscripción respectiva. Los medicamentos a importarse desde Países incluidos en el Anexo II al presente deberán estar autorizados y comercializándose en los países de origen, en forma previa a su solicitud de registro o importación ante la autoridad sanitaria nacional. La integración de los Países en la nómina de dicho Anexo, no habilitará a terceros países a solicitar su inclusión dentro del mismo, en virtud de cláusulas de Nación más favorecida, instituida por convenios internacionales suscriptos por nuestro país. (Expresión "...Los gastos que insuman las inspecciones de las plantas serán sufragados en su totalidad por la citada Secretaría con el fondo correspondiente a los aranceles del Registro de Especialidades Medicinales...", derogada por art. 1° del Decreto N°1528/2004 B.O. 3/11/2004). A partir de la presentación de la solicitud de inscripción de la especialidad medicinal, el MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL tendrá un plazo de CIENTO VEINTE (120) días corridos para expedirse, con excepción de los casos encuadrados en los regímenes de los artículos 4º y 5º del presente decreto. En el caso de solicitudes de Registro de importación de especialidades medicinales elaboradas en los Países incluidos en el Anexo II al presente, dicho plazo será considerado a partir de la verificación de la planta elaboradora. El régimen del presente artículo será comprensivo para: I) las solicitudes de registro de especialidades medicinales a

elaborarse en nuestro país y aquellas a importarse de Países incluidos en el Anexo II que resulten similares a otras ya inscritas en el Registro; y II) las solicitudes de registro de especialidades medicinales a elaborarse en nuestro país, autorizadas para su consumo público en al menos uno de los países que integran el Anexo I del Decreto N°150/92 aun cuando se tratara de una novedad dentro del registro de la autoridad sanitaria. El plazo de vigencia de la autorización de acuerdo al artículo 7º de la Ley N°16.463, podrá ser prorrogado a su término, cuando se otorgará la reinscripción del producto, mediando solicitud del interesado a tal efecto. (Artículo sustituido por art. 1º del Decreto N°177/1993 B.O. 17/02/1993)

Art. 4º — Las especialidades medicinales autorizadas para su consumo público en el mercado interno en al menos uno de los países que se indican en el Anexo I del presente decreto, podrán inscribirse para su importación en el Registro de la autoridad sanitaria nacional. Dicha inscripción tendrá carácter automático, debiendo el interesado presentar la certificación oficial vigente de dicha autorización, la documentación indicada en los incisos c) y d) del artículo precedente, los datos referidos a la biodisponibilidad. Los registros efectuados bajo el régimen de este artículo, se otorgarán solo para la importación y comercialización en el país, de dichas especialidades medicinales. El registro de las especialidades medicinales similares o bioequivalentes a las que se importen por el presente artículo y que quieran elaborarse localmente y comercializarse en el país, deberá efectuarse conforme al régimen establecido en el ARTÍCULO 3º del presente decreto. (Artículo sustituido por art. 2º del Decreto N°1890/1992 B.O. 20/10/1992)

Art. 5º — Tratándose de solicitudes de inscripción de especialidades medicinales que se presenten al Registro, para: a) elaborarse por la industria local y que fueran una novedad en nuestro país, salvo la excepción prevista en el artículo 3º para aquellas especialidades autorizadas en algún/os de los Países del Decreto N°150/92; b) importarse de un País del Anexo II al presente y cuando la especialidad, si bien autorizada y consumida en el país de origen, no tuviera similares inscritos en el Registro de la autoridad sanitaria nacional; c) importarse siendo productos manufacturados en países no incluidos en el Anexo I del Decreto N°150/92 ni en el Anexo II del presente y no estuviesen autorizados para ser consumidos en alguno de los países del Anexo I del Decreto N°150/92; Deberán acompañar para su tramitación la información requerida por el Artículo 3º y la documentación que acredite la eficacia y la inocuidad del producto para el uso propuesto. (Artículo sustituido por art. 2º del Decreto N°177/1993 B.O. 17/02/1993)

Art. 6º — El Ministerio de Salud y Acción Social, establecerá y publicará: a) El listado de medicamentos genéricos autorizados, clasificados farmacológicamente, con indicación de sus formas farmacéuticas, contenido y composición dentro de los CUARENTA Y CINCO (45) días de la publicación del presente Decreto. b) El listado de especialidades medicinales, registradas, agrupadas según el listado de genéricos autorizados, dentro de los SESENTA (60) días de la publicación del presente. En el caso de medicamentos que sean una asociación o combinación de diversos componentes o drogas, el MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL

determinaría las correspondencias con la o las denominaciones por nombre genérico. CAPITULO III:
PRODUCCIÓN, ELABORACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE DROGAS Y MEDICAMENTOS

Art. 7º — Los establecimientos dedicados a la producción o fraccionamiento de medicamentos y de drogas destinadas a ser utilizadas en la preparación de medicamentos deberán: a) funcionar bajo la dirección técnica de profesionales universitarios farmacéuticos o químicos u otros profesionales con títulos habilitantes, según la naturaleza de los productos. b) disponer de locales e instalaciones adecuados a la naturaleza de los productos a fabricar o fraccionar. c) disponer de equipos y elementos de prueba normalizados para el ensayo, control y conservación de los productos. e) asegurar condiciones higiénico-sanitarias de acuerdo con las necesidades y requisitos de los procesos de elaboración o fraccionamiento. f) respecto a las drogas que determine la reglamentación del presente, llevar los libros de fabricación, control y egreso y protocolos por partida, conservando la documentación, y suministrar al Ministerio de Salud y Acción Social información sobre existencias y egresos. g) entregar únicamente drogas o medicamentos a personas físicas ideales habilitadas para su utilización, tenencia, o expendio al público, tomando en todos los casos los recaudos necesarios que justifiquen su destino asegurado.

Art. 8º — El o los titulares de los establecimientos y el director técnico serán igual y solidariamente responsables del cumplimiento de los requisitos establecidos en el artículo precedente.

Art. 9º — El director técnico de los establecimientos indicados en el presente capítulo deberá: a) practicar los ensayos y comprobaciones para determinar la pureza de los productos y continentes que se utilicen en los procesos de elaboración o fraccionamiento, siendo responsables de su calidad y adecuación, debiendo proveer a la eliminación de los que reúnan las cualidades exigibles. b) ensayar los productos elaborados, siendo responsable de que los mismos se ajusten a las especificaciones de los productos autorizados. c) proveer a la adecuada conservación de las drogas y de los productos elaborados o fraccionados.

CAPITULO IV: PRESCRIPCIÓN Y EXPENDIO DE MEDICAMENTOS

Art. 10. — Declárase obligatorio el uso de los nombres genéricos: a) en todos los textos normativos, inclusive registros y autorizaciones relativas a la elaboración, fraccionamiento, comercialización o importación de medicamentos; b) en rótulos, prospectos o cualquier documento utilizado por la industria farmacéutica para información médica o promoción de las especialidades medicinales; c) en las adquisiciones que sean realizadas por o para la Administración Pública Nacional. Los profesionales autorizados a prescribir medicamentos, podrán optar libremente por hacerlo por el nombre genérico o la marca comercial del producto. (Artículo sustituido por art. 3º del Decreto N° 177/1993 B.O. 17/02/1993) (Nota: Por art. 6º del Decreto N°177/1993 B.O. 17/02/1993, se establece que lo dispuesto en los incisos a), b) y c) del presente artículo regirá a partir del 15 de marzo de 1993".)

Art. 11. — Los centros de expendio de medicamentos deberán ofrecer al público las especialidades medicinales que correspondan a cada nombre genérico prescripto, según el listado indicado en el inciso b) del Artículo 6º, el que deberá estar a disposición del público indicando los precios de venta, en lugar visible.

Art. 12. — En los rótulos de los medicamentos registrados ante el MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL se deberá, dentro del plazo de CIENTO OCHENTA (180) días corridos de la publicación del presente, incorporar, cuando se comercialicen con el nombre de fábrica o comerciales, los nombres genéricos en igual tamaño y realce.

Art. 13. — Autorízase la venta de medicamentos a granel y en envase de tipo hospitalario a las farmacias que cuenten con laboratorio acreditado ante la autoridad sanitaria, y el fraccionamiento por parte de estas para su expendio comercial.

CAPITULO V: COMERCIO EXTERIOR

Art. 14. — Autorízase a laboratorios, droguerías, farmacias, obras sociales con farmacias propias y a organismos públicos de salud que los soliciten, a importar aquellas especialidades medicinales o farmacéuticas inscriptas en el registro de la autoridad sanitaria nacional. El importador deberá contar laboratorios de control de calidad propios debidamente equipados y con un Director Técnico universitario, farmacéutico con título habilitante, quien asegurará las condiciones higiénico-sanitarias, de calidad y acondicionamiento, eliminando los productos que no reúnan las cualidades exigibles por la autoridad sanitaria. El importador y el Director Técnico serán igual y solidariamente responsables. La importación de especialidades medicinales sólo podrá efectuarse a través de la delegación de la Capital Federal de la ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE ADUANAS. La SECRETARÍA DE SALUD del MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL podrá autorizar, a tal efecto, a otras delegaciones del referido Organismo. (Artículo sustituido por art. 4º del Decreto Nº 177/1993 B.O. 17/02/1993)

Art. 15. — Los importadores podrán reenvasar productos a granel para su expendio y venta siempre que la unidad mínima de reempaque respete la hermeticidad del continente de origen. El fraccionamiento deberá realizarse en laboratorios con arreglo a las normas vigentes.

Art. 16. — La importación de medicamentos clasificados como psicotrópicos o estupefacientes en la modalidad de acondicionados para su venta al público deberá cumplir con las Disposición Nº 38 del 8 de noviembre de 1990 de la ex SUBSECRETARÍA DE ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS Y PROGRAMAS DE SALUD y la Resolución Nº3329/91 del MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL.

Art. 17. — Liberase la exportación de especialidades medicinales y otros productos de la industria farmacéutica. Derógase el Decreto Nº32.128/44.

DISPOSICIONES GENERALES

Art. 18. — Las infracciones al presente decreto y a las normas que se dicten en su consecuencia, serán sancionadas conforme lo previsto en la Ley N°16.463.

Art. 19. — Deróganse el decreto N°908/91 y los artículos 3º, 9º, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36 y 40 del decreto N°9763/64.

Art. 20. — La SECRETARÍA DE SALUD del MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL, será la autoridad de aplicación del presente Decreto. En materia de registro, importación, exportación y comercialización, ejercerá dicha facultad conjuntamente con la SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y COMERCIO del MINISTERIO DE ECONOMIA Y OBRAS Y SERVICIOS PÚBLICOS, sin perjuicio de las atribuciones propias de la SECRETARÍA DE SALUD en materia del control y fiscalización sanitaria comprendidas en dichas actividades. (Artículo sustituido por art. 5º del Decreto N°1890/1992 B.O. 20/10/1992)

Art. 21. — El cumplimiento de los requisitos exigidos por el presente Decreto sería condición suficiente para realizar las actividades mencionadas en el Artículo 1º de la Ley N° 16.463.

Art. 22. — El presente decreto entrará en vigencia a los TREINTA días (30) corridos de su publicación en el Boletín Oficial. Durante este período las autoridades de aplicación deberán proceder a la reglamentación de sus aspectos más relevantes para el resguardo de la salud de la población y el normal funcionamiento del mercado.

Art. 23. — Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese. — MENEM. — Julio C. Aráoz. — Domingo F. Cavallo. (Nota: Por art. 1º del Decreto N°968/1992 B.O. 19/06/1992, se dispone que los plazos contenidos en el presente Decreto "se contarán a partir de la fecha de la publicación en el Boletín Oficial de la reglamentación realizada por la Resolución Conjunta N°470/1992 y N° 268/1992 de los MINISTERIOS DE ECONOMÍA Y OBRAS Y SERVICIOS PÚBLICOS y de SALUD Y ACCIÓN SOCIAL, respectivamente". La fecha de entrada en vigencia del presente, por su parte, se mantiene a todos sus efectos. Dicha Resolución Conjunta fue publicada en el Boletín Oficial del 20/04/1992.)

ANEXO I

ESTADOS UNIDOS, JAPON, SUECIA, CONFEDERACIÓN HELVÉTICA, ISRAEL, CANADÁ, AUSTRIA, ALEMANIA, FRANCIA, REINO UNIDO, PAÍSES BAJOS, BÉLGICA, DINAMARCA, ESPAÑA, ITALIA.

ANEXO II (Anexo sustituido por Res. Conj. N° 452/2014 y N° 1227/2014 del Ministerio de Economía y Finanzas Públicas y del Ministerio de Salud, B.O 13/08/2014)

COMMONWEALTH DE AUSTRALIA, ESTADOS UNIDOS DE MÉXICO, REPÚBLICA FEDERATIVA DE BRASIL, REPÚBLICA DE CUBA, REPÚBLICA DE CHILE, REPÚBLICA DE FINLANDIA, REPÚBLICA DE HUNGRÍA, IRLANDA, REPÚBLICA POPULAR CHINA, GRAN DUCADO DE LUXEMBURGO, REINO DE NORUEGA, NUEVA ZELANDIA, REPÚBLICA DE LA INDIA.

Anexo II – Circular ANMAT MED-NAN 001-00

ANMAT-MED-NAN

001-00

1
2
3 VISTO la Ley Nº 6 16.463, sus Decretos Reglamentarios Nº 9763/64, 150/92
4 (texto ordenado 1993), 1490/92, la Disposición ANMAT Nº 5755/96, sus
5 complementarias y modificatorias correspondientes; y

6
7
8 CONSIDERANDO:

9
10 Que la aplicación de nanotecnología en áreas de la salud se proyecta como un
11 tema de gran impacto.

12
13 Que el uso de instrumentos de diseño nanotecnológico para el diagnóstico,
14 tratamiento y prevención de enfermedades abarca varias áreas de aplicación en salud:
15 liberación de droga, terapéutica, imagen, diagnóstico, biomateriales e implantes.

16
17 Que entre las categorías de productos nanotecnológicos con abordaje
18 terapéutico se encuentran: los liposomas, nanocristales, polímeros, nanoemulsiones y
19 nanopartículas entre otros.

20
21 Que, el desarrollo de instrumentos nanotecnológicos aplicados a la terapéutica
22 son usados para mejorar: la solubilidad del IFA (p. ej.: micelas y nanopartículas), para
23 guiar el IFA a la localización deseada de acción incrementando su precisión (p. ej.:
24 liposomas), para controlar la liberación del IFA (p. ej.: nanopartículas y liposomas) y
25 para incrementar el transporte del IFA a través de las membranas biológicas (p. ej.:
26 micelas y nanopartículas).

27
28 Que la nanomedicina comprende a los materiales diseñados en escala
29 nanométrica cuya estructura le confiere propiedades terapéuticas particulares. Las
30 nanomedicinas incluyen nanofarmacéuticos (plataforma de liberación de drogas),
31 nanodiagnósticos (usados para imagen y diagnóstico), nanoteranósticos (combinación
32 de uso terapéutico y diagnóstico) y los nanobiomateriales (usados en los implantes
33 médicos).

34
35 Que los nanofarmacéuticos son sistemas específicamente diseñados a escala
36 nanométrica para liberar una molécula terapéuticamente activa, que incluye sistemas de
37 liberación de droga basados en nanopartículas (liposomas, micelas, lípidos
38 nanoparticulados, nanopartículas proteicas, nanopartículas poliméricas), conjugados con
39 polietilenglicol o nanocristales

40
41 Que, entre las nanomedicinas, los nanofarmacéuticos son predominantes y
42 representan el 75% de medicamento aprobados con esa tecnología.

43
44 Que el principal objetivo de las plataformas de liberación de IFA mencionadas
45 anteriormente es mejorar la farmacocinética, la eficacia y seguridad del IFA para
46 optimizar el tratamiento de enfermedades que corrientemente no pueden ser alcanzadas
47 con formulaciones convencionales.

48
49 Que para los químicos y formulaciones convencionales existe un amplio
50 conocimiento y sólido entendimiento de la interacción de las clases moleculares.

51
52 Que la demostración de equivalencia entre especialidades medicinales de
53 diseño convencional resulta adecuado dado que su estructura molecular, su síntesis
54 química y su procedimiento de fabricación se encuentran bien definidos y
55 caracterizados.

56
57 Que, por el contrario, los sistemas de liberación de IFA de diseño nanométrico
58 requieren de procesos de elaboración finamente ajustados de los cuales dependen sus
59 cualidades distintivas como son el tamaño y la forma y por consiguiente su eficacia y
60 seguridad

61
62 Que variaciones en el proceso de manufactura y en la formulación puede
63 resultar en un producto con diferentes propiedades físico químicas como por ejemplo
64 cambios en el tamaño, distribución del tamaño, propiedades de la superficie, carga de la
65 droga y perfiles de liberación, agregación y estabilidad.

66
67 Que las modificaciones mencionadas pueden traducirse en diferencias en la
68 relación droga libre/droga asociada, efectos farmacológicos, especificidad en la
69 interacción producto/célula, biodistribución, llegada al órgano blanco, inmunogenicidad
70 y toxicidad.

71
72 Que existen diferencias sustanciales entre el material diseñado a escala
73 nanométrica y aquel diseñado a escala convencional tanto desde su conocimiento como
74 desde el aspecto del análisis y evaluación lo que genera incertidumbre en cuanto a
75 seguridad y eficacia

76
77 Que, en el proceso de aprobación de los productos medicinales de diseño
78 nanotecnológico como soportes de liberación del IFA, las agencias regulatorias como
79 FDA y EMA han aplicado los marcos regulatorios tradicionales de ensayos pre-clínicos
80 y clínicos usando principios establecidos de análisis riesgo/beneficio, más que sólo
81 sobre aspectos tecnológicos.

82
83 Que cualquier categoría de los productos medicinales regulados por la
84 ANMAT podrían incorporar nanotecnología en su proceso de manufactura.

85
86 Que la complejidad estructural de estos sistemas de liberación de diseño
87 nanométrico hace la existencia de normativas establecidas para las especialidades
88 medicinales convencionales insuficiente en cuanto a describir sus caracterizaciones
89 moleculares, microscópicas y físico-químicas.

90
91 Que los procesos de evaluación para los productos nanosimilares incluyen un
92 ejercicio de comparabilidad gradual de la calidad, seguridad y eficacia entre un
93 producto comparador de referencia y el producto que se pretende registrar.

94
95 Que se hace necesario especificar los requisitos científicos y técnicos
96 requeridos para demostrar en forma fehaciente la eficacia y seguridad de productos
97 medicinales con plataforma de liberación en escala nanométrica.

98
99
100 Por ello,

101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA
DISPONE:

Art.1º: Adóptense las definiciones sobre especialidades medicinales diseñadas con tecnología nanométrica las que figuran en el Anexo I de la presente disposición y es parte integrante de la misma.

Art. 2º: Apruébanse los requisitos y lineamientos para el registro de especialidades medicinales diseñadas a escala nanométrica cuya composición cualicuantativa, plataforma de liberación, indicación terapéutica y vía de administración propuesta tienen antecedentes en otras especialidades medicinales diseñadas a escala nanométrica ante esta Administración u otras Agencias Sanitarias Reguladoras perteneciente a alguno de los países del Anexo I del Decreto 150/92, de las que existe evidencia de comercialización efectiva y suficiente caracterización de su perfil riesgo/beneficio.

Art. 3º: Establécese que a fin de dar cumplimiento a lo dispuesto en el artículo 2º de la presente, el solicitante deberá presentar toda la documentación requerida en el artículo 3º del Decreto 150/92, con carácter de declaración jurada, conjuntamente con los resultados de los ensayos que se enumeran en la Anexo III de la presente disposición, que permitan juzgar comportamientos similares entre el producto a registrar y el producto tomado como referente en cuanto a su seguridad y eficacia.

Art. 4º: A los fines de la presente disposición adóptese como definición de producto comparador de referencia y producto nanosimilar las que figuran en el Anexo II de la presente disposición y es parte integrante de la misma.

Art. 5º: El ejercicio de comparabilidad deberá estar diseñado de forma tal que permita demostrar que el medicamento que se pretende registrar tiene atributos de calidad, físico-químicos y actividad biológica similar al medicamento comparador de referencia. Los componentes de la plataforma de liberación, como la vía de administración de la especialidad medicinal cuya autorización se solicita deben ser las mismas que la del producto utilizado como referencia. En todos los casos, las comparaciones entre los productos deberán ser realizadas en igualdad de condiciones, utilizándose siempre el mismo producto comparador de referencia.

Art. 6º: La presente norma no aplica a productos cuyos soportes de diseño a escala nanométrica y/o el IFA asociado difieren respecto del considerado como producto comparador de referencia.

Art. 7º: Esta Administración requerirá, si así lo considerase, la ampliación de datos técnicos (insumos, elaboración, control, datos pre-clínicos y clínicos) que estimase oportuno y que brinden apoyo a la solicitud de autorización de registro si se observaran diferencias significativas entre las especialidades medicinales comparadas. En el caso que luego de ampliado los datos aún persistieran las diferencias podrá denegarse la autorización de registro del medicamento.

ANEXO I

151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

DEFINICIONES

- **NANOMATERIAL:** Refiere a materiales en el rango de escala nanométrica y a ciertos materiales que exhiben propiedades o fenómenos de dimensiones dependientes
- **NANOTECNOLOGÍA:** Producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño de los materiales a escala nanométrica. Dicha definición abarca:
 - a) materiales o productos terminados diseñados para tener al menos una dimensión exterior, o una estructura interna o superficie en el rango de nanoescala (aproximadamente 1 nm a 100 nm);
 - b) Materiales o productos terminados diseñados para exhibir propiedades o fenómenos, incluyendo las propiedades físicas o químicas o efectos biológicos, que son atribuibles a su(s) dimensión(es) asociados a la aplicación de la nanotecnología, aunque estas dimensiones estén fuera del rango de escala nanométrica, hasta un micrómetro (1.000 nm).
- **PRODUCTOS NANOTECNOLÓGICOS:** Productos que contienen o están fabricados utilizando nanomateriales
- **NANOMEDICINA:** Aplicación de la nanotecnología al ámbito medicinal con finalidad diagnóstica, preventiva o terapéutica, que aprovecha los beneficios físico-químicos y biológicos de los materiales a escala nanométrica.
- **PRODUCTOS NANOMEDICINALES:** Productos utilizados en medicina humana empleados con fines diagnósticos, preventivos y terapéuticos.
- **MEDICAMENTOS NANOTECNOLÓGICOS:** Medicamentos en los cuales el ingrediente farmacéutico activo es o está contenido en algún material cuyas propiedades físicas, químicas y/o biológicas dependen de su dimensión y forma (hasta 1 micrómetro en algún sentido del espacio).
- **ESPECIALIDAD MEDICINAL NANOTECNOLÓGICA:** todo medicamento nanotecnológico designado por su nombre convencional, marca o nombre genérico, preparado y envasado uniformemente para su distribución y expendio, de composición cuantitativa definida, declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y de acción terapéutica comprobable.

201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250

ANEXO II

Producto Comparador de Referencia

El producto de referencia con el que se requiere comparar al producto similar para registro debe poseer las siguientes características: estar autorizado originalmente en función de la evaluación de un expediente de registro completo de calidad, no-clínico y clínico y que tenga un tiempo y volumen adecuado de comercialización y uso.

Producto Similar (Nanosimilar)

El producto similar respecto al producto de referencia deberá cumplir con los siguientes ítems de identidad:

1. Ingrediente farmacéutico activo (IFA);
2. Vía de administración;
3. Plataforma de liberación

Podrán diferir en el buffer, conservantes y antioxidantes, siempre que los empleados cumplan la misma función que los utilizados en el producto de referencia.

Plataforma de liberación

Soporte de diseño nanotecnológico de origen sintético o biológico asociado al IFA

251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297

ANEXO III

Ensayos de Comparabilidad:

Físico – Químicos:

Determinación de los siguientes ítems:

- Composición (descripción, origen, manufactura, impurezas, isómeros) y excipientes (calidad, pureza, estabilidad).
- Morfología: estado de agregación. Número de capas lipídicas en caso de corresponder.
- Impurezas dependientes del material, de los procesos, del producto y su degradación
- Relación IFA / moléculas lipídicas
- Eficiencia de carga de IFA (relación IFA libre / IFA encapsulado)
- Distribución del tamaño de partícula.
- De corresponder, distribución y estado físico del IFA dentro del liposoma. De lo contrario, justificar.
- Identificación y caracterización de los grupos funcionales involucrados en la interacción IFA-plataforma.
- Carga superficial (p. ej.: potencial zeta)
- pH interno
- En caso de conjugación con PEG (calidad, pureza, uniones químicas, peso molecular. estabilidad de PEG similares a aquellos utilizados por el referente).

Estabilidad:

- Estabilidad de producto terminado según las condiciones de almacenamiento y de uso descriptas en el prospecto.
- Estabilidad de producto reconstituido/diluido con cada uno de los solventes descriptos en el prospecto a fin de asegurar los tiempos y las condiciones de almacenamiento del producto reconstituido hasta su total administración al paciente.

Estudios farmacéuticos:

- Ensayos comparativos con el producto referente para determinar la liberación del IFA en las diferentes condiciones de pH por la que atraviesa el producto para llegar a su blanco tisular y determinar su integridad a las diferentes temperaturas. Ensayos a diferentes pH: 7.3, 6.6 y 5.5 en buffer por 24 horas. Ensayos a diferentes temperaturas 45°C, 47°C, 52°C y 57°C durante 12 hs en buffer pH 6.5.

Manufactura:

- Descripción de la formulación (cuali-cuantitativa), indicando la función de cada uno de los componentes.
- Descripción general de cada uno de los pasos individuales del proceso de manufactura.

- 298 • Descripción de los materiales críticos y parámetros sensibles a las variaciones
299 que permitan una adecuada caracterización del producto (*incluir detalle de*
300 *materiales utilizados durante el proceso de manufactura: mangueras, filtros,*
301 *etc*).
302

303 Estudios No-Clinicos:

- 304 • Farmacocinéticos: Estudios cinéticos y toxicinéticos a distintas dosis en
305 animales de experimentación, determinando en sangre, plasma o suero el IFA
306 libre y el IFA asociado / encapsulado, utilizando técnicas analíticas validadas.
307 • Farmacodinamia: Determinación de eficacia en modelos in vitro e in vivo.
308 • Toxicología: Estudios toxicológicos agudos y sub-agudos a dosis repetidas.
309

310 Estudios Clínicos:

311 De los resultados de los ensayos de comparabilidad de los estudios fisico-químicos,
312 farmacéuticos y no-clínicos dependerá la profundidad y amplitud de los requerimientos
313 clínicos.
314

315 En cuanto a los métodos propuestos para cada uno de los ensayos mencionados con
316 anterioridad, estos deberán estar validados según lo establecido en la edición vigente de
317 la Farmacopea Argentina.
318

Anexo III – Curva de calibración de espectrofotómetro

En este anexo se detalla la realización de una curva de calibración de colorante azul de toluidina para medir este soluto en el espectrofotómetro, para evidenciar todas las consideraciones necesarias que se deben tener.

El coeficiente de absorbanza ϵ es característico del soluto, del medio en el que está disuelto y de la longitud de onda del haz. Para el caso de azul de toluidina disuelta en agua – que es el solvente en el cual quedan luego de la evaporación del cloroformo – según bibliografía, la absorción máxima se da a una **longitud de onda de 633nm** (Saha, 2018).

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de este colorante seleccionado son muy propensas a agregarse por ser planas, lo que modifica el valor del coeficiente de absorbanza ϵ . Por lo tanto, el valor de ϵ considerado anteriormente es válido para las concentraciones en las cuales las moléculas de azul de toluidina suelen encontrarse libres: según bibliografía, sería en concentraciones inferiores a $7,02 \times 10^{-6}$ M (D'Ilario, 2006). Por encima de estas concentraciones de analito, las moléculas se agregan y el valor del coeficiente ϵ cambia, por lo que la Ley de Beer Lambert ya no se cumple. Con una longitud de onda de 633nm y aplicando la ecuación 3.5 (la cubeta de espectrofotometría mide 1cm), se puede deducir que podemos obtener una curva de calibración lineal con valores de absorbanza entre 0,05 y 0,2 aproximadamente.

Por este motivo, la estrategia elegida para realizar una curva de calibración de este analito fue realizar una solución madre que esta concentración límite ($7,02 \times 10^{-6}$ M), y luego realizar diluciones para contar con al menos cinco puntos en la curva, siguiendo la fórmula de proporcionalidad (ecuación 3.1.1):

$$V_i C_i = V_f C_f \quad \text{Ecuación 3.1.1}$$

donde V_i representa el volumen de la solución inicial o madre y C_i es la concentración de esta solución; V_f es el volumen de la solución final y C_f la concentración de esta solución final.

Se diluyeron $0,0011 \pm 0,0001$ g de colorante Azul de Toluidina (peso molar 305,83 g/mol) en $500,00 \pm 0,25$ mL de agua destilada, para obtener una solución con una concentración inicial de $7,2 \times 10^{-6} \pm 6 \times 10^{-7}$ M.

Se realizaron 8 diluciones, tomando siempre como solución inicial un volumen de la solución madre (tabla 3.1.1).

Tabla 3.1.1: diluciones a partir de solución madre de azul de toluidina (AT) al $7,2 \times 10^{-6}$ M y mediciones de absorbancia. Se identifican los números de matraz, que se muestran en la figura 3.1.1.

# matraz	Gramos AT	mL agua	Cf (M)	Abs
0	0,0011	500	$7,2E-06 \pm 6E-07$	No aplica

# matraz	Vi (ml)	Vf (ml)	Cf (M)	Abs
6	8,00	10,00	$5,7E-06 \pm 6E-05$	No aplica
5	7,00	10,00	$5,0E-06 \pm 5E-05$	0,324
4	6,00	10,00	$4,3E-06 \pm 5E-05$	0,288
3	5,00	10,00	$3,6E-06 \pm 4E-05$	0,237
2	4,00	10,00	$2,9E-06 \pm 3E-05$	0,196
1	2,50	10,00	$1,8E-06 \pm 2E-05$	0,114
No aplica	2,00	10,00	$1,4E-06 \pm 1E-05$	0,082
No aplica	1,50	10,00	$1,1E-06 \pm 1E-05$	0,065

A simple vista, se observa que tanto la solución madre como la primera dilución (# 6: de concentración $5,7 \times 10^{-6}$ M), tienen un color más violáceo e intenso que el resto de las diluciones (figura 3.1.1). Probablemente, y considerando el error de las diluciones realizadas, las moléculas de colorante ya se están agregando a estas concentraciones, y, por lo tanto, tendrían distinto coeficiente de absorbancia, por lo que fueron descartadas (tabla 3.1.2).

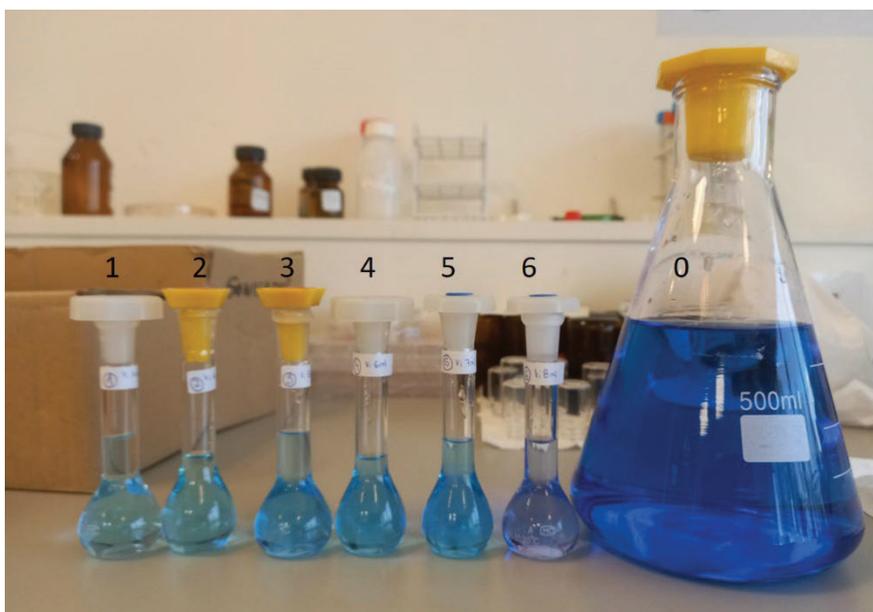


Figura 3.1.1: solución madre (matraz 0) y diluciones obtenidas (1 a 6).

La curva de calibración obtenida a partir de las mediciones posee un coeficiente de correlación lineal cercano a 1 ($R = 0,9963$), y proporcionan un coeficiente de absorbanza de 67540/M (figura 3.1.2).

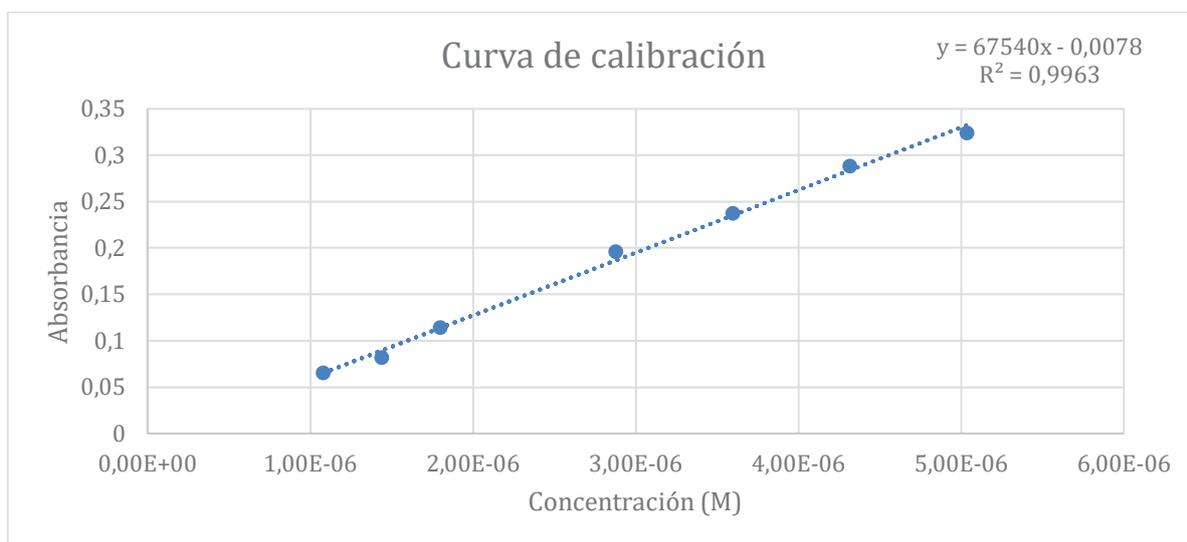


Figura 3.1.2: Curva de calibración obtenida.

El objetivo principal de esta sección fue dejar asentada la técnica para realizar una curva de calibración precisa para realizar las mediciones pendientes de eficacia de encapsulamiento y liberación, pero debe considerarse que el error de la solución madre propuesta – que se arrastró a todas las diluciones – es significativamente alto (del orden del 10%).

Para minimizarlo, se recomienda realizar una solución madre que sea más concentrada y luego diluir, como por ejemplo:

- 1) Diluir $0,0100 \pm 0,0001$ g de colorante Azul de Toluidina (peso molar 305,83 g/mol) en $1000 \pm 0,5$ mL de agua destilada, para obtener una solución de una concentración $3,27 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-7}$ M.
- 2) Tomar $2,2000 \pm 0,0001$ mL con una pipeta, y diluir en un matraz de $10,000 \pm 0,0025$ mL, para obtener una solución madre con una concentración inicial de $7,2 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}$ M. Esto conduciría a una solución madre con un error de aproximadamente 2%.

Anexo IV – Resultados completos del experimento

		HLB del surfactante																					
		8,0										9,6											
		Gotas emulsión					Partículas					Gotas emulsión					Partículas						
		#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%		
CONCENTRACION SURFACTANTE (%)	1	2	751	44,02	4,73	17,82	74,11	745	27,97	3,23	15,28	40,28	1	480	38,99	3,38	24,66	53,67	154	35,01	3,67	18,81	53,54
	3	3	874	33,61	3,86	16,51	53,23	469	26,07	3,06	14,41	38,99	2	1495	32,22	3,56	16,98	48,11	547	27,10	3,31	13,46	40,25
	5	2	854	29,29	3,06	18,16	41,57	327	27,13	2,85	16,89	37,13	2	687	27,30	3,55	12,40	43,98	422	20,47	3,55	5,18	37,51

		HLB del surfactante																					
		11,8										13,9											
		Gotas emulsión					Partículas					Gotas emulsión					Partículas						
		#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%		
CONCENTRACION SURFACTANTE (%)	1	1	287	26,67	3,16	12,83	39,23	187	21,05	3,14	9,50	35,02	1	322	51,57	4,07	29,16	72,94	54	30,90	3,11	19,18	41,05
	3	1	755	21,80	3,04	10,15	32,81	198	23,09	2,93	12,58	34,07	2	338	32,84	3,59	17,29	49,84	107	33,67	3,77	16,79	54,08
	5	3	1308	22,93	3,05	12,46	34,33	502	25,45	3,05	14,39	36,96	2	1547	59,76	9,26	25,23	68,25	364	25,04	3,34	12,16	38,92

		HLB del surfactante																					
		15,0										16,8											
		Gotas emulsión					Partículas					Gotas emulsión					Partículas						
		#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%	#datos	V medio	Desv Std	Per10%	Per90%		
CONCENTRACION SURFACTANTE (%)	1	1	882	22,36	2,84	12,70	33,39	594	26,68	3,16	14,34	40,19	2	2166	31,53	3,89	15,10	51,59	753	24,23	3,02	12,69	36,06
	3	1	675	34,72	4,87	14,65	54,19	475	24,33	3,23	12,69	35,88	1	713	39,91	4,34	21,97	59,34	951	28,30	3,44	14,65	43,01
	5	2	1286	30,35	3,43	16,17	45,29	577	26,54	3,44	13,70	40,18	2	1377	31,44	4,56	13,06	48,30	154	21,58	2,87	12,69	29,95

Referencias

- Almería, B. F. (2011). A multiplexed electrospray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery. *Journal of controlled release*, 154(2), 203-210.
- Alp, E. C. (2017). Targeted delivery of etoposide to osteosarcoma cells using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV) nanoparticles. *Turkish Journal of Biology*, 41(5), 719-733.
- Alvarez-Lorenzo, C. ,. (2013). From drug dosage forms to intelligent drug-delivery systems: a change of paradigm. In S. M. 1, Alvarez-Lorenzo, C. , Concheiro, A. (pp. 1-32). RSC Publishing.
- ANMAT. (2003). *Farmacopea Argentina 7° Ed. Vol. I*. Buenos Aires: NMAT.
- Bazzo, G. C. (2012). Microspheres prepared with biodegradable PHBV and PLA polymers as prolonged-release system for ibuprofen: in vitro drug release and in vivo evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 773-780.
- Bianco, I. C. (2018). La aplicación de la nanotecnología en medicamentos: oportunidades y desafíos,. *Revista Ciencia Reguladora de la ANMAT*, N°2, p. 2.
- Campos, E. B. (2013). Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal* 49(8), 2005-2021.
- Cazado, M. (2016). Elaboración de partículas poliméricas reabsorbibles con aplicación a liberación controlada de fármacos. *Trabajo de Seminario para optar al título de Ingeniero en Materiales*. Buenos Aires: Universidad Nacional de San Martín - Comisión Nacional de Energía Atómica.
- Chaturvedi, K. K. (2011). Blend microspheres of poly(3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate. *Industrial & engineering chemistry research*, 50(18), 10414-10423.
- De Negri, A. F. (2022). Bevacizumab-controlled delivery from polymeric microparticle systems as interesting tools for pathologic angiogenesis diseases. *Polymers (Basel)*, 14(13), 2593.
- Decreto N°150/1992. (1992, 01 20). Normas para el registro, elaboración, fraccionamiento, prescripción, expendio de medicamentos. Importación y exportación. Ámbito de aplicación. Disposiciones generales. Argentina: Poder Ejecutivo Nacional.

- Dendukuri, D. &. (2009). The synthesis and assembly of polymeric microparticles using microfluidics. *Advanced Materials*, 21(41), 4071-4086.
- Di, A. Z. (2021). Microfluidic spray dried and spray freeze dried uniform microparticles potentially for intranasal drug delivery and controlled release. *Powder Technology*, 379, 144-153.
- D'Ilario, L. &. (2006). Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 14(4), 581.
- D'Souza, S. D. (2005). Development of a dialysis in vitro release method for biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 6 (2), Article 42.
- Eke, G. K. (2014). In vitro and transdermal penetration of PHBV micro/nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(6), 1471-1481.
- Elmowafy, E. A.-H. (2019). Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices*, 16:6, 467-482.
- Farago, P. V. (2008). Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 1298-1305.
- Fasiku, V. O. (2019). Bionanopolymers for Drug Delivery. In *Green Biopolymers and their Nanocomposites* (pp. 191-220). Springer Nature Singapore.
- Fernandez Arteaga, A. (2006). Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones O/W. Granada, España: Doctoral dissertation, Universidad de Granada.
- Fredenberg, S. W. (2011). The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. *International journal of pharmaceutics*, 34-52.
- Freiberg, S. Z. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International journal of pharmaceutics*, 282(1-2), 1-18.
- Gharsallaoui, A. R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, 40(9), 1107-1121.
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17, 103-114.
- Gursel, I. B. (1999). Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release*, 207-217.

- Handali, S. M. (2020). PHBV/PLGA nanoparticles for enhanced delivery of 5-fluorouracil as promising treatment of colon cancer. *Pharmaceutical development and technology*, 25(2), 206-218.
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences*, 52(12), 1145-1149.
- Holowka, E. B. (2014). Controlled-release systems. *Drug Delivery*. Springer, New York, NY, 7-62.
- ICH. (2022). *ICH Official Website - Guidelines*. Retrieved from <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>
- ICI Americas Inc. (1984). *The HLB System, a Time Saving Guide to Emulsifier Selection*. Wilmington: ICI Americas Inc.
- Johal, H. S. (2016). Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug delivery*, 23(2), 550-563.
- Kamaly, N. Y. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chem. Rev.*, 2602-2663.
- Khoei, S. Y. (2009). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2392-2399.
- Korsmeyer, R. W. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceuticals*, 15(1), 25-35.
- Kulinets, I. (2015). Biomaterials and their applications in medicine. In *Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices*. Brookline, MA, USA: Elsevier.
- Leon, R. A. (2015). Microfluidic fabrication of multi-drug-loaded polymeric microparticles for topical glaucoma therapy. *Particle & Particle Systems Characterization*, 32(5), 567-572.
- Liu, Q. Z. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Structure, Property and Fiber. *International Journal of Polymer Science*, Vol. 2014, Article ID 374368.
- Losi, S. B. (2021). The role of patient preferences in adherence to treatment in chronic disease: a narrative review. *Drug Target Insights*, 15, 13.
- Maia, J. L. (2004). The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21, 01-12.

- Masood, F. (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 569-578.
- Masood, F. C. (2013). Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1054-1060.
- Mendes, A. R. (2022). Development of an antibiotics delivery system for topical treatment of the neglected tropical disease Buruli ulcer. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol 623, 121954.
- Mitchell D. J., N. B. (1981). Micelles, vesicles and microemulsions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 77(4), 601-629.
- Monnier, A. R.-O. (2016). Preparation and characterization of biodegradable polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate/polyethylene glycol-based microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 49-61.
- Nair, L. L. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 762-798.
- National Cancer Institute. (2022, 12 12). *SEER - Surveillance, Epidemiology and End Results 2014-2018*. Retrieved from <https://seer.cancer.gov/>
- Ong, S. C. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Journal of Siberian Federal University, Biology 2017 10(2)*, 211-225.
- Peppas, N. A. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International journal of pharmaceutics*, 57(2), 169-172.
- Perveen, K. M. (2020). Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 259-266.
- Policastro, G. P. (2021). Improving biological production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV) co-polymer: A critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), 479-513.
- Rajan, R. P. (2001). Correlations to predict droplet size in ultrasonic atomisation. *Ultrasonics*, 39(4), 235-255.
- Rathbone, M. J. (2002). *Modified-Release Drug Delivery Technology*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Raza, Z. A. (2018). Polyhydroxyalcanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* 126, 45-56.

- Reyes-Blas, H. O.-A.-E.-G. (2019). Use of functionalized biomaterials with bioactive molecules in biomedical engineering. *Revista mexicana de ingeniería biomédica, Vol. 40, N°3*.
- Riekes, M. K. (2011). Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. *Materials Science and Engineering: C, 31(5)*, 962-968.
- Sáez, V. H. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros, 5(2)*, 87-101.
- Saha, B. C. (2018). Comparative study of toluidine blue O and methylene blue binding to lysozyme and their inhibitory effects on protein aggregation. *ACS omega, 3(3)*, 2588-2601.
- Sansdrap, P. &. (1993). Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal Of Pharmaceutics, 98 (1-3)*, 157-164.
- Scheithauer, E. L. (2015). Preparation and characterization of electrosprayed daidzein-loaded. *Materials Letters, Volume 158,, 66-69*.
- Sendil, D. G. (1999). Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release, 59(2)*, 207-217.
- Shrivastav, A. K. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International, vol. 2013*, 581684.
- Turbert, D. (2022, 3 8). *American Academy of Ophthalmology*. Retrieved from <https://www.aao.org/salud-ocular/medicamentos/que-es-avastin>
- Wang, S. W. (2019). Effect of Rapamycin microspheres in Sjögren syndrome dry eye: preparation and outcomes. *Ocular Immunology and Inflammation, 27:8*, 1357-1364.
- Williams, D. F. (1988). Definitions in biomaterials. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, Vol. 26, Issue 9*, 414-414.
- World Health Organization. (2003). Poor adherence to long-term treatment of chronic diseases is a worldwide problem. *Rev Panam Salud Pública, 14*, 218-221.
- Yang, C. P. (2009). LGA and PHBV microsphere formulations and solid-state characterization: possible implications for local delivery of fusidic acid for the treatment and prevention of orthopaedic infections. *Pharm Res 26*, 1644–1656.

- Yang, C. P. (2009). PLGA and PHBV microsphere formulations and solid-state characterization: possible implications for local delivery of fusidic acid for the treatment and prevention of orthopaedic infections. *Pharmaceutical research*, 26(7), 1644-1656.
- Ye, M. K. (2010). Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release*, 146(2), 241-260.