٠	٠	•	•	٠	٠	٠	•	•	٠	٠	•	•	•	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	•	٠	•	٠	•	٠	•	•	٠	•
٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	٠	•	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	•	٠	•	٠	•	•
•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	•	•	٠	٠	٠	•	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠
٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	۰	٠	۰	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	•	•	٠	٠	٠	•	٠	٠	•	•	•	٠	٠	٠	•	٠	•	٠	•	٠	•	٠	•	٠	•	٠	٠	٠
٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	•	•	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

Desarrollo y caracterización de dispersiones sólidas y nanocristales de fenbendazol como prototipo de benzimidazoles antihelmínticos

María Elisa Melian Furest













Desarrollo y caracterización de dispersiones sólidas y nanocristales de fenbendazol como prototipo de benzimidazoles antihelmínticos

María Elisa Melian Furest

Programa de Posgrado en Química Facultad de Química Universidad de la República

> Montevideo – Uruguay Setiembre de 2022





Desarrollo y caracterización de dispersiones sólidas y nanocristales de fenbendazol como prototipo de benzimidazoles antihelmínticos

María Elisa Melian Furest

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Química.

Director: Dra. Profa. Laura Domínguez

Codirectores: Dr. Prof. Santiago Palma Dr. Prof. Ricardo Faccio

Director académico: Dra. Profa. Laura Domínguez

Montevideo – Uruguay Setiembre de 2022 Melian Furest, María Elisa

Desarrollo y caracterización de dispersiones sólidas y nanocristales de fenbendazol como prototipo de benzimidazoles antihelmínticos / María Elisa Melian Furest. - Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Química, 2022.

XX, 221 p.: il.; 29,7cm.

Director:

Laura Domínguez

Codirectores:

Santiago Palma

Ricardo Faccio

Director académico:

Laura Domínguez

Tesis de Doctorado – Universidad de la República, Programa en Química, 2022.

Referencias bibliográficas: p. 149 – 149.

 antihelmínticos poco solubles en agua, 2. dispersiones sólidas, 3. nanocristales redispersables, 4. velocidad de disolución *in vitro*, 5. biodisponibilidad oral.
 I. Domínguez, Laura, *et al.* II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Química. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Profa. Daniela Quinteros

Dra. Profa. Marta Vázquez

Dra. Profa. Helena Pardo

Montevideo – Uruguay Setiembre de 2022

Agradecimientos

Me es imposible barajar todas las casualidades con suerte que terminan haciéndome escribir estos agradecimientos. A pesar de eso, quiero, al menos, intentar agradecer a los que, a su vez, por las casualidades que sea, me encontré en el camino o lo hicieron posible.

En primer lugar, agradecer a la Facultad de Química de la Universidad de la República por abrirme las puertas para realizar este trabajo. También un especial agradecimiento a los docentes y funcionarios que hacen de ella el espacio que es.

A quienes financiaron de alguna forma este trabajo: la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República y la ANII por las becas de posgrado; a ANII, CSIC, INIA y AUGM por su apoyo económico a través de becas o proyectos; al PEDECIBA Química por el apoyo económico y a sus secretarias, Laura Segredo y Gabriela García, por su trabajo de gestión y, sobre todo, su excelente disposición a responder mil dudas.

También a todxs lxs egresadxs de la UdelaR, porque su aporte al Fondo de Solidaridad mueve las reglas del juego de las oportunidades para muchxs estudiantes, y a la educación pública (y gratuita) uruguaya en general, en cada uno de sus niveles, por razones que creo poder obviar pero que hacen posible hoy este agradecimiento.

A mis tutores: Laura, Ricardo y Santiago, gracias por acompañarme en todo momento y dedicar su tiempo a trabajar conmigo. Gracias porque lo que me formaron como investigadora está a la par de lo que aportaron a mi construcción como docente y humana.

A mis compas de Farmacología: Beatriz Munguía, Jenny Saldaña, Inés Carrera y Magdalena Nieves por acompañarme todos los días. A Bea, en particular, que me enseñó lo que era tener una hermana mayor, gracias por la paciencia sin fin; y Jenny e Ine, que son, por lejos, las más jóvenes del lab, gracias por la energía inagotable que comparten (¿será algo de las biólogas?). A quienes fueron un día compas y hoy son amigues: Ramiro Teixeira y Manuela Ferrer. A Rams por la cantidad de horas invertidas en intentar purificar sulfóxido y sulfona de feb y por los jueves de almuerzos metafísicos; y a Manu por estar 24/7 a unos caracteres de distancia.

A quienes colaboraron directamente con alguna arista de este trabajo. De nuestra casa de estudios: a Manuel Ibarra, a quien le debo mis conocimientos de farmacocinética poblacional; a Eduardo Manta, Maximiliano Colobbio y Juan Carlos Ramos, que hicieron posible tener cantidades impensables de val-feb en tiempo récord, en especial a Maxi por las horas de campana y HPLC compartidas tratando de oxidar el híbrido de febe; a Fernando Pignanelli por desarrollar los *scritpts* para procesar los datos de Raman; al grupo de BIOTE-FA del IPTP, que hacen que Pando parezca estar a dos cuadras, en particular a Antonio Malanga por abrirme las puertas del lab y a María Luisa Rodríguez por su amistad y los ratos compartidos.

A quienes compartieron tiempo y conocimiento conmigo fuera de Uru: lxs cordobeses de UNTEFA y la FCQ de la Universidad Nacional de Córdoba, por hacerme un espacio tan bello en sus mesadas, pero, sobre todo, por abrazarme tanto cada vez que nos vimos. A Alejandro Paredes, en particular, por guiarme en el mundo de los nanocristales y por el tiempo dedicado a pensar y revisar nuestro trabajo. A lxs tandilenses de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires que hicieron que mi tiempo por ahí pasara volando, en especial a Carlos Lanusse por recibirme en su grupo y a Luis Ignacio Álvarez por guiarme en la planificación y llevar adelante conmigo la farmacocinética en ovinos. También a Alejandro Ayala de la Universidad Federal do Ceará por el análisis térmico de las muestras.

A mis amigxs. A Joti, Tams y Mel, porque hubiera sido infinitamente más tedioso y largo ser Q.F. sin ellas, y porque no hubiéramos aprendido juntas que es mejor no formular emulsiones con detergente. A mis once Pos: gracias por saltar la guía de luces y que todo parezca muy (poco) normal siempre.

Agradecerle a mi familia. A mamá y papá por hacerme creer desde tan chiquita que podía con mucho. En especial a mamá por transmitirme su curiosidad por la química y a papá por adoctrinarme sobre lo absurdo de la mercantilizacion de la educación; confío en que este trabajo es un fiel reflejo de eso. A mis hermis: Ema, por enseñarnos otras vidas, y Ju y Emi por abrirme a la discusión de la ciencia como religión —nos quedaremos con ganas de saber cuál será el próximo paradigma en el que viva resguardada la humanidad—. Y a Seba, por lo que crecimos juntos y por aprender a acompañarnos desde nuevos lugares.

Agradecer a las feministas, desde la ilustración hasta esta marea que nos tocó vivir, pero en particular a las que, no hace tantos años, hicieron posible que accediéramos a la Universidad sin tener que disfrazarnos de hombre (no estoy segura de que el bigote me hubiera sentado muy bien).

Y por último, a quienes integran la reciente Asociación Uruguaya de Posgraduandas y Posgraduandos, especialmente a mis compas de comisiones, por enseñarme que las luchas se vuelven potentes y reales solo cuando logramos colectivizar nuestras experiencias individuales, las problematizamos y empezamos a militarlas.

RESUMEN

Las helmintiasis en rumiantes generan importantes pérdidas económicas en el sector productivo. Si bien el control de estas infecciones recae actualmente en el uso de quimioterapia, los compuestos disponibles son cada vez menos efectivos debido al rápido desarrollo de resistencia en numerosas especies de parásitos gastrointestinales. Recientemente, ha sido patentado un nuevo grupo de híbridos valerolactama-benzimidazol con potencial antihelmíntico, pero con limitada solubilidad acuosa, al igual que sus precursores benzimidazólicos. La baja hidrosolubilidad de fármacos está asociada, en la mayoría de los casos, a biodisponibilidades erráticas y reducidas, lo que puede causar subdosificaciones. Considerando que la subdosificación con antihelmínticos contribuye de forma significativa al desarrollo de resistencia, el objetivo de esta Tesis es diseñar sistemas de liberación aplicables a los fármacos patentados que maximicen su velocidad de disolución in vitro. Para lograrlo, se trabaja con un diseño comparativo desarrollando y caracterizando dispersiones sólidas y nanocristales autodispersables de fenbendazol, fármaco precursor de valero-fenbendazol, el híbrido con mayor actividad antihelmíntica del grupo. Una vez seleccionada la preparación con mejor desempeño in vitro, se estudia su farmacocinética en ovinos para evaluar su impacto en la biodisponibilidad del fenbendazol y, finalmente, se traslada la tecnología al compuesto híbrido de interés. Los resultados recogidos en este trabajo permiten concluir que la preparación de nanocristales de fenbendazol es la mejor estrategia para mejorar su velocidad de disolución en agua y que esta mejora impacta muy positivamente en su biodisponibilidad oral en rumiantes. Además, se concluye que es posible formular el valero-fenbendazol utilizando la metodología empleada para su precursor y obteniendo resultados de caracterización in vitro igual de alentadores.

Palabras claves:

antihelmínticos poco solubles en agua, dispersiones sólidas, nanocristales redispersables, velocidad de disolución *in vitro*, biodisponibilidad oral.

ABSTRACT

Helminthiasis in ruminants generate important economic losses to the livestock industry. Even though, the control of these infections is currently based on the use of chemotherapy, the marketed compounds are less and less effective due to the rapid development of resistance in numerous species of gastrointestinal parasites. Recently, a new group of valerolactam-benzimidazole hybrids with anthelmintic potential, but limited aqueous solubility, like their benzimidazole precursors, has been patented. The low water solubility of drugs is associated, in most cases, with erratic and reduced bioavailability, which can lead to underdosing. Taking into account that the underdosing of anthelmintics contributes significantly to the development of resistance, the aim of this thesis is to design delivery systems that allow efficient deliver of the patented drugs by maximizing their *in vitro* dissolution rate. For this purpose, we work with a comparative design, developing and characterizing solid dispersions and self-dispersible nanocrystals of fenbendazole, the precursor drug of valero-fendendazole, the hybrid with the highest in vitro anthelmintic activity. Once the preparation with the best in vitro performance is selected, its pharmacokinetics is studied in sheep to evaluate its impact on the bioavailability of fenbendazole and, finally, the technology is transferred to the hybrid compound of interest. The results collected in this work allow us to conclude that the preparation of fendendazole nanocrystals is the best strategy to improve its dissolution rate in water and that this improvement has a very positive impact on its oral bioavailability in ruminants. Furthermore, it is concluded that it is possible to formulate valero-fendendazole using the methodology employed for its precursor and to obtain equally encouraging in vitro results.

Keywords:

poorly water-soluble anthelmintics, solid dispersions, self-dispersible nanocrystals, dissolution rate, oral bioavailability.

Lista de figuras

2.1	Ciclo de vida genérico de los nematodos gastrointestinales trans-	
	mitidos por el suelo más comunes en pequeños rumiantes $\ . \ . \ .$	7
2.2	Estructuras genéricas de los derivados δ -valerolactámicos susti-	
	tuídos \ldots	13
2.3	Estructuras químicas de fenbendazol y valero-fenbendazol	14
2.4	Liberación del fármaco y eventos subsecuentes luego de la ad-	
	ministración oral de un medicamento	16
2.5	Sistema de clasificación biofarmacéutica	17
2.6	Árbol de decisión para la selección de la formulación	21
3.1	Clasificación de dispersiones sólidas	31
3.2	Diagrama de fases de una mezcla eutéctica binaria	33
3.3	Procesos empleados para la manufactura de dispersiones sólidas	34
3.4	Tendencia del número de publicaciones sobre dispersiones sólidas	39
3.5	Cálculo de la eficiencia de disolución $\hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \ldots \hfi$	43
3.6	Perfil de disolución de dispersiones sólidas de fenbendazol y po-	
	loxamer 188	48
3.7	Perfil de disolución de dispersiones sólidas de fenbendazol y po-	
	loxamer 407 \ldots	49
3.8	Estudios de espectroscopía FT-IR de poloxamer 407, fenbenda-	
	zol y su dispersión sólida conteniendo 75 $\%$ de poloxamer 407 $$.	52
3.9	Estudios de espectroscopía FT-IR de poloxamer 407, fenbenda-	
	zol y su dispersión sólida conteniendo 75 $\%$ de poloxamer 188 $$.	52
3.10	Estudio de difracción de rayos ${\bf x}$ de polvo con estándar interno $% {\bf x}$.	54
3.11	Termogramas de los experimentos de calorimetría diferencial de	
	barrido	55
3.12	Termogramas de los experimentos de análisis térmico	56
3.13	Espectros Raman de poloxamer 407 y fenbendazol	57

3.14	Imagen óptica e imágen Raman de una muestra de dispersión	
	sólida	57
3.15	Imágenes de microscopía Raman confocal normalizadas 	59
3.16	Microscopía electrónica de barrido de fenbedazol y poloxamer	
	188 puros	61
3.17	Microscopía electrónica de barrido de la muestra SD14 conte-	
	niendo partes iguales de fenbedazol y poloxamer 188	61
3.18	Microscopía electrónica de barrido de la muestra de mezcla física	
	MF14 conteniendo partes iguales de fenbedazol y poloxamer 188	62
4.1	Procedimientos empleados para la obtención de nanocristales	75
4.2	Esquema de un molino para molienda asistida por microesferas .	76
4.3	Representación esquemática de un secador por aspersión $\ . \ . \ .$	77
4.4	Esquema del proceso de obtención de nanocristales redispersables	84
4.5	Evolución del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad	
	de una suspensión de fenbendazol $\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$	90
4.6	Perfil de disolución de los nanocristales redispersables de fen-	
	bendazol y poloxamer 188	92
4.7	Perfil de disolución de los nanocristales redispersables de valero-	
	fenbendazol y su mezcla física \hdots	94
4.8	Espectros Raman de fenbendazol, valero-fenbendazol y poloxa-	
	mer 188	95
4.9	Imágenes de microscopía Raman confocal reconstruidas a partir	
	de filtros de señales \ldots	96
4.10	Imágenes de microscopía Raman confocal reconstruidas a partir	
	de cocientes de intensidad de señal para muestras conteniendo	
	fenbendazol	97
4.11	Imágenes de microscopía Raman confocal reconstruidas a partir	
	de cocientes de intensidad de señal para muestras conteniendo	
	valero-fenbendazol	98
4.12	Resultado del análisis de componentes principales de la mezcla	
	física de fenbendazol-poloxamer 188	99
4.13	Imagen generada a partir de la componente principal 1 del	
	análisis de componentes principales de la mezcla física de	
	fenbendazol-poloxamer 188	99

4.14	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de valero-
	fenbendazol puro \hdots
4.15	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de nanocristales
	de fenbendazol y valero- \ldots
4.16	Análisis térmico de las muestras conteniendo fenbendazol y po-
	loxamer 188
4.17	Espectros FT-IR de fenbendazol, poloxamer 188 y las prepara-
	ciones conteniendo ambos componentes
4.18	Difractogramas de rayos x de polvo de las muestras conteniendo
	fenbendazol y poloxamer 188
4.19	Análisis térmico de las preparaciones conteniendo valero-
	fenbendazol y poloxamer 188
4.20	Difractogramas de las preparaciones conteniendo valero-
	fenbendazol y poloxamer 188
4.21	Difractogramas de rayos x de polvo de valero-fen bendazol puro
	antes y después del tratamiento con agua $.$
4.22	Difractogramas de rayos x de polvo de valero-fenbendazol tra-
	tado con agua antes y luego del secado a vacío a diferentes tem-
	peraturas
4.23	Resultados de espectroscopía FT-IR de las diferentes muestras
	de valero-fenbendazol puro
4.24	Resultados de espectroscopía FT-IR de las muestras de valero-
	fenbendazol antes y después del tratamiento con agua \hdots 107
4.25	Comparación de los perfiles de disolución obtenidos para todas
	las preparaciones de fenbendazol
5.1	Metabolismo del fenbendazol y su profármaco febantel 121
5.2	Variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos . 125
5.3	Variabilidad residual en un modelo poblacional
5.4	Perfiles plasmáticos de fenbendazol, fenbendazol sulfóxido y fen-
	bendazol sulfona luego de la administración de nanocristales re-
	dispersables de fenbendazol o la mezcla física análoga 135
5.5	Gráficos de verificación predictiva visual (VPC) para el modelo
	de fenbendazol

Lista de tablas

2.1	Grupos de antihelmínticos más comunes empleados en medicina	
	veterinaria	9
2.2	Salida al mercado y primeros reportes de resistencia de algunos	
	antihelmínticos comerciales	11
2.3	Comparación de lipofilia y permeabilidad parasitaria entre fen-	
	bendazol y el híbrido valero-fenbendazol	15
2.4	Resumen de las estrategias empleadas para mejorar la solubli-	
	dad acuosa de fármacos	20
3.1	Métodos para la caracterización de dispersiones sólidas	38
3.2	Medicamentos aprobados que emplean la tecnología de disper-	
	sión sólida	40
3.3	Composición de las dispersiones sólidas y mezclas físicas de fen-	
	bendazol preparadas	41
3.4	Porcentajes de fenbendazol disuelto desde las dispersiones sólidas	49
3.5	Comparación de los perfiles de disolución entre todas las prepa-	
	raciones utilizando los factores de diferencia y similitud $\ .\ .\ .$	50
3.6	Eficiencia de disolución de las preparaciones a diferentes tiempos	
	del ensayo de disolución in vitro	51
3.7	Señales infrarrojas caracterísiticas de los componentes	53
3.8	Comparación de la fracción cristalina de los componentes de una	
	dispersión sólida y su mezcla física análoga	53
3.9	Indicadores de la reología de los polvos	60
4.1	Lista de formulaciones basadas en nanocristales actualmente co-	
	mercializadas o en etapa de estudios clínicos $\ . \ . \ . \ . \ .$	81
4.2	Composición de las nanosuspensiones y los nanocristales de fen-	
	bendazol preparados con el molino A $\ \ldots \ \ldots$	83

4.3	Composición de las nanosuspensiones y los nanocristales redis-	
	persables de fenbendazol y valero-fenbendazol preparados con	
	el molino B	83
4.4	Rendimientos de proceso, contenido de humedad y tamaño de	
	partícula de los nanocristales redispersables preparados	89
4.5	Estudios de solubilidad de fenbdendazol y valero-fenbendazol	
	según las diferentes formulaciones	91
4.6	Comparación de los perfiles de disolución de las preparaciones	
	conteniendo fenbendazol	93
4.7	Eficiencia de disolución de las preparaciones conteniendo fen-	
	bendazol y valero-fenbendazol	93
5.1	Métricas farmacocinéticas obtenidas para fenbendazol, fenben-	
	dazol sulfóxido y sulfona	136
5.2	Parámetros farmacocinéticos poblacionales de fenbendazol y	
	fenbendazol sulfóxido en ovinos	138

Lista de siglas

ABZ albendazol **AIC** Criterio de Información de Akaike BCS sistema de clasificación biofarmacéutica **BOV** variabilidad interocasión **BSV** variabilidad interindividual CL clearence DLS dispersión de luz dinámica **DS** dispersión sólida DSC calorimetría de barrido diferencial De densidad empaquetada Dg densidad a granel ED eficiencia de disolución **FBZ** fenbendazol FBZ-SO fenbendazol sulfóxido FBZ-SO2 fendendazol sulfona FT-IR espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier HME extrusión por fusión en caliente HPMC hidroxipropilmetilcelulosa IC índice de Carr o índice de compresibilidad IH índice de Hausner **IPd** índice de polidispersidad LOQ límite de cuantificación MAD máxima dosis absorbible **MF** mezclas físicas MRC microscopía Raman confocal

 ${\bf NC}$ nanocristales

NCR nanocristales redispersables

NMLE modelos no lineales de efectos mixtos

 \mathbf{NS} nanosuspensiones

P188 poloxamer 188

P407 poloxamer 407

PCA análisis de componentes principales

PVP polivinilpirrolidona

SEM microscopía de barrido electrónico

TGA análisis termogravimétrico

UdelaR Universidad de la República

 ${\bf VD}\,$ volumen de distribución

VPC verificación predictiva visual

XRPD difracción de rayos X de polvo

Tabla de contenidos

Li	sta d	e figur	as	х
Li	sta d	e tabla	as	XIII
Li	sta d	e sigla	S	XVI
1	Intr	oducci	ón	1
2	Esta	ado de	l conocimiento	5
	2.1	Las he	lmintiasis en salud humana y veterinaria	6
		2.1.1	Quimioterapia antihelmíntica y la problemática de resis-	
			tencia \ldots	9
		2.1.2	Nuevos híbridos valerolactama-benzimidazol con poten-	
			cial antihelmíntico $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	12
	2.2	Fárma	cos con baja solubilidad en agua	15
		2.2.1	Estrategias tecnológicas para mejorar la biodisponibili-	
			dad oral de fármacos	19
Re	efere	ncias b	vibliográficas	22
3	Disp	persion	nes sólidas de fenbendazol	29
	3.1	Disper	siones sólidas: aspectos teóricos y estado del arte \ldots .	30
		3.1.1	Clasificación de dispersiones sólidas	31
		3.1.2	Métodos de preparación de dispersiones sólidas	34
		3.1.3	Caracterización de dispersiones sólidas	37
		3.1.4	Impacto de la tecnología de dispersión sólida en la ma-	
			nufactura de medicamentos	38
	3.2	Metod	ología	41

	3.2.1	Preparación de dispersiones sólidas y mezclas físicas de
		fenbendazol y poloxamer
	3.2.2	Caracterización de las preparaciones 41
3.3	Result	$ados \ldots 48$
	3.3.1	Estudios de solubilidad y disolución in vitro 48
	3.3.2	Espectroscopía FT-IR y análisis de difracción de rayos x
		de polvo $\ldots \ldots 51$
	3.3.3	Análisis térmico
	3.3.4	Microscopía Raman confocal
	3.3.5	Caracterización reológica de los polvos
	3.3.6	Microscopía electrónica de barrido 60
3.4	Discus	ión \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 61
3.5	Conclu	usiones del capítulo

Referencias bibliográficas

68

4	Nar	nocrista	ales redispersables	$\mathbf{d}\mathbf{e}$	fenbendazol	У	de	
	vale	ero-fen	bendazol					71
	4.1	Nanoc	ristales: aspectos teóricos	y esta	do del arte			72
		4.1.1	Bases científicas					73
		4.1.2	Producción					74
		4.1.3	Caracterización					78
		4.1.4	Aplicaciones					80
	4.2	Metod	lología					82
		4.2.1	Preparación de nanocris	stales r	edispersables de	fenber	1-	
			dazol y de valero-fenben	dazol				82
		4.2.2	Caracterización de las p	reparac	ciones			85
	4.3	Result	ados					89
		4.3.1	Evaluación del rendimie	nto de	proceso y el tan	naño c	le	
			partícula					89
		4.3.2	Solubilidad y disolución	in vitr	o de las preparac	iones d	le	
			fenbendazol y valero-fen	bendaz	ol			91
		4.3.3	Microscopía Raman cont	focal .				94
		4.3.4	Microscopía electrónica	de barı	rido			97
		4.3.5	Espectroscopía infrarroj	a por t	ransformada de	Fourie	r,	
			análisis de rayos x de po	olvo y a	análisis térmico		•••	101

4.4	Discus	ión
	4.4.1	Estudios de solubilidad y disolución
	4.4.2	Caracterización fisicoquímica de las preparaciones 111
4.5	Conclu	usiones del capítulo

Referencias bibliográficas

1	1	4

5	Est	udio d	e biodisponibilidad relativa de nanocristales redis	5-
	pers	sables	de fenbendazol en ovinos	119
	5.1	Marco	teórico	. 120
		5.1.1	Farmacocinética de fármacos benzimidazólicos en ru-	
			miantes	. 120
		5.1.2	Conceptos básicos de farmacocinética poblacional	. 122
	5.2	Metod	lología	. 128
		5.2.1	Estudio de farmacocinética comparativa en ovinos de na-	
			nocristales y mezclas físicas de fenbendazol	. 128
		5.2.2	Estudio farmacocinético no compartimental y modelado	
			poblacional de los datos	. 130
	5.3	Result	ados	. 134
		5.3.1	Análisis no compartimental de los datos	. 134
		5.3.2	Análisis poblacional de los datos	. 134
	5.4	Discus	sión	. 137
	5.5	Concl	usiones del capítulo	. 142
D	fore	naina k	ibliográficos	149
ne	eiere	ncias i	bibliograficas	143
6	Con	clusio	nes generales y perspectivas de trabajo	147
A	pénd	ices		149
	Apé	ndice 1	Análisis de componentes principales de las dispersiones	
	sólida	as y me	zclas físicas	151
	Apé	ndice 2	Dissolution profiles of fendendazole from binary solid	
	dispe	rsions:	a mathematical approach	158
	Apé	ndice 3	The Impact of Solid Dispersion on Formulation, Using	
	Confe	ocal Mi	cro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of	
	Com	ponents	3	173

Apéndice 4 Análisis del efecto del polímero codisuelto en las medidas	
de tamaño por dispersión dinámica de la luz \hdots	185
Apéndice 5 Microscopías de barrido electrónico colectadas para	
otras muestras	193
Apéndice 6 Nanocrystals of Novel Valerolactam-Fenbendazole Hy-	
brid with Improved in vitro Dissolution Performance	195
Apéndice 7 Improving the in vitro dissolution rate and pharmaco-	
kinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals	
211	

Anexos

Capítulo 1

Introducción

La resistencia de diversas y numerosas especies de helmintos parásitos a los quimioterápicos antihelmínticos disponibles en el mercado es un fenómeno ampliamente descripto a nivel mundial, tanto en salud humana como animal. En países como Uruguay, cuya economía tiene una marcada dependencia con el sector agrícola-ganadero, estos fenómenos se establecen no solamente como una problemática sanitaria, sino que además impactan directamente en el sector productivo y la economía. Puntualmente, en Uruguay, se han descrito casos de resistencia a todas las clases de antihelmínticos empleadas en rumiantes en la actualidad, incluyendo a los últimos fármacos introducidos al mercado.

La necesidad de nuevos quimioterápicos con nuevos mecanismos de acción para hacer frente a esta problemática resulta clara, y en tal sentido, los grupos de Química Farmacéutica y Farmacología de Facultad de Química han desarrollado y patentado nuevas moléculas de interés con potencial antihelmíntico. Estos compuestos, derivados híbridos de benzimidazoles antihelmínticos y 2-Boc-amino- δ -valerolactama, tienen la limitante de ser altamente lipófilos y presentar una solubilidad acuosa extremadamente limitada.

Resulta entonces indispensable contar con una plataforma tecnológica que permita formular de forma racional y responsable los nuevos compuestos híbridos desarrollados, con el fin de maximizar su biodisponibilidad oral y preservar su eficacia, para retrasar el desarrollo de resistencia asociada a eventos de subdosificación. Por otra parte, en un escenario donde la aparición de nuevas clases químicas de antihelmínticos es escasa, es necesario destinar esfuerzos a maximizar la eficacia de los compuestos activos que actualmente están disponibles en el mercado. En este sentido, la reformulación de fármacos antihelmínticos con problemas de biodisponibilidad conocidos, como los benzimidazoles antihelmínticos, utilizando sistemas de administración innovadores resulta un enfoque interesante.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar y aplicar tecnología farmacéutica innovadora para la formulación de los nuevos compuestos híbridos valerolactamabenzimidazol obtenidos por el grupo, trabajando con un diseño comparativo entre el compuesto híbrido de mayor interés (valero-fenbendazol) y su precursor benzimidazólico comercial (fenbendazol). Este manuscrito recopila el trabajo de investigación realizado para alcanzar el objetivo propuesto y se organiza como se describe a continuación.

El capítulo 2 presenta brevemente la problemática general de las helmintiasis en salud humana y animal, y describe el fenómeno de resistencia a compuestos antihelmínticos, en particular, en animales de producción. Además, se resumen los antecedentes del grupo en la búsqueda de nuevas moléculas con potencial antihelmíntico que derivaron en la patente de invención de los híbridos valerolactama-benzimidazol, compuestos con solubilidad en agua extremadamente limitada. Por último, se describe el desafío que representa formular compuestos con baja solubilidad acuosa y se presenta un resumen de las estrategias desarrolladas a nivel académico e industrial para mejorar la biodisponibilidad de los compuestos con esta limitante.

El capítulo 3 profundiza en la estrategia tecnológica de dispersión sólida como una de las alternativas más estudiadas para la formulación de fármacos poco hidrosolubles, cubriendo aspectos teóricos, diferentes metodologías de fabricación y herramientas para su caracterización. Además, describe la metodología empleada en esta investigación para la preparación de dispersiones sólidas de fenbendazol mediante un proceso de fusión, estudiando dos polímeros diferentes: poloxamer 188 y poloxamer 407. Se detallan en este capítulo la caracterización químico-estructural de las preparaciones obtenidas, así como la evaluación de su desempeño mediante estudios de disolución *in vitro*.

En el capítulo 4 se introducen aspectos teóricos, tecnológicos y de caracterización de nanocristales de fármacos pocos solubles en agua como marco teórico que fundamenta la investigación desarrollada. Se describe el proceso de nanometrización de fenbendazol aplicado en este trabajo para producir nanocristales redispersables. Se investiga cómo afecta el uso de diferentes estabilizantes y su proporción final en el proceso de manufactura y se discute la caracterización químico-estructural realizada, incluyendo estudios de cristalinidad del principio activo y la evaluación de la disolución *in vitro* de los nanocristales obtenidos. Finalmente, se describe la transferencia de la metodología desarrollada para fenbendazol al compuesto híbrido de interés, valero-fenbendazole.

En el capítulo 5, por un lado, se destacan aspectos relevantes de la farmacocinética de los benzimidazoles antihelmínticos y, por otro, se introducen conceptos básicos de farmacocinética poblacional y modelos no lineales de efectos mixtos. Por último, se describe la investigación desarrollada para el estudio de la correlación entre la velocidad de disolución *in vitro* del fenbendazol nanometrizado y su biodisponibilidad en ovinos a través de un estudio de biodisponibilidad comparada entre los nanocristales y la mezcla simple de sus componentes (sin nanometrizar).

Las conclusiones generales de esta tesis se encuentran recogidas en el capítulo 6. Además, en el mismo capítulo, se mencionan las perspectivas de trabajo que se despreden de la investigación realizada.

Capítulo 2

Estado del conocimiento

Este capítulo presenta, en primer lugar, la problemática de las helmintiasis en salud humana y veterinaria junto con generalidades sobre las especies parasitarias de prevalencia con foco en animales de producción. Se presentan brevemente los principales grupos farmacológicos empleados en la quimioterapia de las helmintiasis y se realiza una breve introducción sobre el alarmante fenómeno de resistencia parasitaria a estos compuestos. En segundo lugar, se resumen los avances logrados en la búsqueda de nuevos compuestos de síntesis con actividad antihelmíntica, en el marco del Grupo interdisciplinario para la búsqueda de nuevos antihelmínticos del Área Farmacología y el grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad de la República (UdelaR). Se presentan las nuevas moléculas obtenidas en la trayectoria recorrida de ambos grupos, derivadas de benzimidazoles y valerolactamas, con prometedora actividad *in vitro* y el desafío de su baja solubilidad acuosa como un problema común a muchos otros fármacos de síntesis a la hora de lograr terapias eficaces. Por último, se reseñan los avances más promisorios en el abordaje de la formulación farmacéutica de compuestos con baja solubilidad acuosa, con énfasis en la mejora de su biodisponibilidad oral.

2.1. Las helmintiasis en salud humana y veterinaria

Las helmintiasis se definen como aquellas enfermedades que son producidas por gusanos parásitos, también llamados helmintos, que viven alojados en los tejidos o en el intestino de un organismo vertebrado. Los helmintos se clasifican como metazoos, lo que significa que conforman un grupo sin categoría taxonómica de animales pluricelulares constituidos por células diferenciadas y agrupadas en tejidos y órganos.

A su vez, el grupo de los gusanos parásitos incluye especies de dos grandes filos: nematoda y platelminto. Los nematodos, también conocidos como gusanos redondos, no son segmentados y presentan individuos con sexos separados. En cambio, los platelmintos son gusanos planos y hermafroditas (a excepción de *Schistosoma*) que pueden dividirse en dos clases: los cestodos, que son segmentados y hermafroditas; y los trematodos, no segmentados, con forma de hoja y hermafroditas o con sexos separados (Pumarola, 1987; Hotez, 2008)

Dentro del filo de los nematodos, se encuentran los principales parásitos gastrointestinales, también conocidos como *helmintos transmitidos por el suelo* —de donde deriva el término geohelmintiasis— (Hotez, 2008). Estas parasitosis son comunes tanto en salud humana como animal y son transmitidas a través de los huevos de los parásitos gastrointestinales, que se eliminan junto con las heces de los individuos infestados (el ciclo de vida se presenta en la figura 2.1).

Se estima que más de un cuarto de la población mundial está en riesgo de infectarse por helmintos transmitidos por el suelo como Ascaris lumbricoides, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Trichuris trichiura y Strongyloides stercoralis; especialmente quienes viven en regiones con dificultades de acceso a agua potable y saneamiento (Jourdan et al., 2018). Los últimos reportes indican que estas parasitosis afectan aproximadamente a casi dos mil millones de personas en todo el mundo (Pullan et al., 2014). La morbilidad que causan varía de acuerdo con el número de parásitos contenidos en el hospedero, por lo que pueden asociarse una gran variedad de morbilidades clínicas que incluyen dolor abdominal, anemia, desnutrición y, en casos de infección grave, puede incluso afectar el crecimiento o desarrollo cognitivo, principalmente en niños y adolescentes (Lo et al., 2020).

Además de impactar en la salud humana, las helmintiasis se encuentran entre las principales enfermedades a nivel mundial que afectan animales de pro-



Figura 2.1: Ciclo de vida genérico de los nematodos gastrointestinales transmitidos por el suelo más comunes en pequeños rumiantes. Las hembras adultas contenidas en el abomaso o los intestinos del hospedero producen huevos que son liberados a las pasturas en las heces del rumiante, donde tienen lugar la eclosión de los huevos y el desarrollo larvario. En la primera etapa, se forma una larva que vive dentro del huevo hasta su eclosión. Después de la eclosión, las larvas se alimentan de bacterias y pasan por dos mudas hasta alcanzar el estadio infectivo (L3). Las L3 salen de las heces y llegan a las pasturas donde son ingeridas por ovejas y cabras. En pequeños rumiantes, los nematodos gastrointestinales de mayor importancia son del orden *Strongylida* y la mayoría pertenecen a la superfamilia *Trichostrongyloidea*, todos ellos comparten ciclos de vida muy similares al representado en el esquema (Zajac, 2006). Imagen creada en BioRender.com.

ducción como ovinos, bovinos y equinos (Woodgate *et al.*, 2017). Los parásitos gastrointestinales de mayor prevalencia en rumiantes suelen ser nematodos; entre ellos, los siguientes destacan por su impacto a nivel productivo:

- En ovinos: Haemonchus contortus, Teladorsagia circumcinta, Trichostrongylus vitrinus y colubriformis, y Nematodirus battus
- En bovinos: Ostertagia ostertagi, Cooperia pectinata y punctata, y Haemonchus placei

Estos nematodos gastrointestinales comparten ciclos de vida directos¹ si-

 $^{^{1}}$ Los ciclos de vida directos o monoxenos son aquellos donde el parásito requiere de un

milares, que incluyen estadios larvarios y de huevo de vida libre, mientras que los estadios parasitantes inmaduros y los gusanos adultos viven dentro del hospedero definitivo. Además, el tercer estadio larvario (larva 3) suele ser quien tiene la capacidad de infectar al hospedero. Estos ciclos de vida directos y el acceso a través del pastoreo a los estadios infectivos de los parásitos, hacen que los rumiantes sean un blanco fácil para muchas de las especies mencionadas (Dyary, 2016).

En animales adultos sin otras patologías, el sistema inmune del hospedero puede mantener el número de helmintos bajo control, de modo que, en ciertas ocasiones, las helmintiasis transcurren sin que se presenten síntomas clínicos. Sin embargo, en animales jóvenes o enfermos, o en aquellos donde la carga parasitaria es muy alta, las helmintiasis tienen un gran impacto en el estatus sanitario del hospedero (European Medicines Agency, 2017). En estos casos, aspectos como la producción y el desempeño de los animales se ven enormemente comprometidos al generarse daño en los tejidos infectados —con disminución del rendimiento del órgano afectado—, un mayor gasto energético del animal —producto de la alteración de sus mecanismos inmunológicos—, y una disminución en el consumo de alimento (Dyary, 2016), lo cual puede incluso aumentar la mortalidad de las poblaciones infectadas.

En países donde el pastoreo extensivo es la práctica productiva de elección, ocurren anualmente pérdidas económicas millonarias asociadas tanto a la disminución de la productividad, por el estado sanitario de los animales, como a los costos que implican las medidas de control de las infecciones (Dyary, 2016; McKellar y Jackson, 2004). Si bien se considera que el gran impacto de las helmintiasis en el sector productivo podría reducirse a través de mejoras en el saneamiento y control de las pasturas, o a través de enfoques alternativos, aún en desarrollo, como vacunas (Hewitson y Maizels, 2014; Waller, 2006a, 2006b, 2003; Zhan *et al.*, 2014), hoy, el control de estas parasitosis sigue dependiendo principalmente de quimioterapia. Sin embargo, el abuso en el uso de los fármacos antihelmínticos disponibles, entre otros aspectos, ha desembocado en el rápido desarrollo del fenómeno de resistencia en todo el mundo (Jabbar *et al.*, 2006; Papadopoulos, 2008).

único hospedero para completar su ciclo de vida.

2.1.1. Quimioterapia antihelmíntica y la problemática de resistencia

Los principales grupos farmacológicos diseñados con el propósito de tratar las infecciones por parásitos helmintos en animales de producción son: los fármacos benzimidazólicos (McKellar, Scott *et al.*, 1990); el triclabendazol (Brennan *et al.*, 2007); los imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas (Martin y Robertson, 2007); las lactonas macrocíclicas (Vercruysse, Rew *et al.*, 2002); los derivados de aminoacetonitrilo (Kaminsky *et al.*, 2008); algunos compuestos organofosforados (Knowles y Casida, 1966); las salicilanilidas y fenoles sustituídos (Swan, 1999); y los espiroindoles (Woods *et al.*, 2012). La tabla 2.1 resume los mecanismos de acción de las familias mencionadas, algunos compuestos ejemplo y su fecha de aparición en el mercado.

 Tabla 2.1: Grupos de antihelmínticos más comunes empleados en medicina veterinaria. Ejemplo de fármacos, mecanismos de acción e ingreso al mercado.

Grupo	Fármaco		Ingreso
farmacológico	ejemplo	Mecanismo de acción	al mercado
Fenotiazinas	Fenotiazina	Antagonistas de receptores nicotínicos	40s
Piperazinas	Piperazina	Agonistas de receptores GABA	50s
Benzimidzoles	Albendazol	Inhibidores de la polimerización de tubulinas	60s
Organofosforados	Naftalofos	Inhibidores de acetilcolinesterasa	60s
Imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas	Levamisol	Agonistas de receptores nicotínicos	70s
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	Agonistas de canales de cloruro sensibles a glutamato	80s
Salicilanilidas y fenoles sustituídos	Closantel	Desacoplan la fosforilación oxidativa	80s
Pirazinaisoquinolinas	Praziquantel	Aumentan la permeabilidad a iones de calcio	80s
Ciclooptadepsipéptidos	Emodepside	Activa canales de potacio SLO-1	2000s
Derivados de aminoacetonitrilo	Monepantel	Agonista de receptores nicotínicos de nematodo	2009
Espiroindoles	Dercuantel	Antagonista de receptores nicotínicos	2010

Los mecanismos de acción farmacológicos suelen diferir entre los distintos grupos de antihelmínticos, abarcando, por ejemplo, desde la inhibición de la polimerización de tubulinas por fármacos benzimidazólicos hasta la interferencia en el correcto funcionamiento de los receptores nicotínicos de acetilcolina causada por los imidazotiazoles. Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencia parasitaria es un fenómeno común a los principales grupos terapéuticos comercializados e involucra diversas especies de helmintos (Charlier *et al.*, 2014, 2020; Kaplan y Vidyashankar, 2012).

Según Geary *et al.* (2012), la resistencia antihelmíntica puede definirse como la capacidad de los parásitos para sobrevivir a dosis de fármaco que normalmente serían suficientes para eliminar parásitos de la misma especie y en el mismo estadio. Los mecanismos por los cuales algunos individuos de una población de parásitos pueden adquirir la capacidad de resistir a los tratamientos farmacológicos son variados¹; sin embargo, el problema reside en que son heredables. Esto significa que, rápidamente, los cambios a nivel del material genético que confieren resistencia a unos pocos parásitos son transmitidos a su progenie y, a su vez, el uso de fármacos antihelmínticos selecciona las poblaciones resistentes al eliminar la competencia de las poblaciones susceptibles² (Dyary, 2016; Shalaby, 2013).

Desde los primeros reportes de resistencia parasitaria, el desarrollo de compuestos antihelmínticos con nuevos mecanismos de acción ha sido escaso e inmediatamente seguido de reportes de resistencia (Fleming *et al.*, 2006; Kaminsky *et al.*, 2011t), como puede verse en la tabla 2.2. Para ejemplificar, puede considerarse el caso del monepantel, introducido en el mercado en 2008

¹En líneas generales, los mecanismos de resistencia impiden la unión entre el fármaco y su blanco de acción, lo cual pude generase a partir de modificaciones en la estructura o en el nivel de expresión del blanco farmacológico (por ejemplo asociadas a variaciones en la secuencia de ADN que afectan una única base de un gen determinado) o mediante la disminución de la concentración intracelular del fármaco (por un aumento de su tasa de metabolización o de su expulsión al medio extracelular) (Teixeira, 2021). Por ejemplo, la resistencia de los nematodos parásitos a los benzimidazoles se relaciona con variaciones en la secuencia de ADN en el gen que codifica para el isotipo 1 de la β tubulina (su blanco farmacológico) lo que determina una pérdida de afinidad (Robertson et al., 2012), además, también se ha constatado un aumento de la metabolización de benzimidazoles en cepas resistentes de H. contortus, respecto a cepas susceptibles (Munguía, 2014). El estudio de distintos nematodos resistentes a levamisol muestra que en todos los casos ocurre una disminución en el número de receptores nicotínicos sensibles al fármaco (Robertson et al., 2012). Por útlimo, para el caso de la resistencia a las lactonas macrocíclicas, han sido detectadas diversas variaciones en la secuencia de ADN en los genes que codifican para los canales GluCl, que determinarían la expressión de receptores con menor afinidad por este grupo de fármacos (Beech et al., 2011).

²Shalaby (2013) resume que el consenso general es que la resistencia a los antihelmínticos parecería ser un fenómeno hereditario preadaptativo. Esto significa que las mutaciones, deleciones o amplificaciones de genes específicos que confieren la resistencia estarían presentes en la población de parásitos desde antes de que se utilice el fármaco por primera vez. Bajo estas circunstancias, al exponer a la población de gusanos a un antihelmíntico, se selecciona la población resistente eliminando a los individuos susceptibles, ya que los únicos gusanos que deberían sobrevivir serían los portadores de los genes que confieren resistencia. El autor explica que durante un período corto (hasta que el animal se vuelve a infectar con gusanos susceptibles), los sobrevivientes resistentes son los únicos gusanos que ponen huevos y, de esta manera, aumenta el acervo genético para la resistencia.

para el tratamiento de helmintiasis en animales de producción —luego de un período de casi 30 años sin registrarse nuevos compuestos—. Solamente cuatro años después de su lanzamiento al mercado se publicó el primer reporte de resistencia en Nueva Zelanda (Scott *et al.*, 2013), seguido luego de otros países como Uruguay (Mederos *et al.*, 2014), Australia (Sales y Love, 2016) y Brasil (Cintra *et al.*, 2016); e involucrando diferentes especies de nematodos como Haemonchus, Teladorsagia y Trichostrongylus.

Ejemplo de fármaco	Ingreso al mercado	Reporte de resistencia
Tiabendazol	1961	1964
Levamisol	1968	1979
Ivermectina	1981	1988
Monepantel	2009	2013
Derquantel	2010	2012

Tabla 2.2: Salida al mercado y primeros reportes de resistencia de algunos antihelmínticos comerciales.

Se propone que los principales factores que influyen en la tasa de desarrollo de resistencia farmacológica son la frecuencia excesiva de los tratamientos y la administración de dosis inadecuadas (generalmente subdosificaciones), además de otros como los tratamientos masivos y los tratamientos basados en un único fármaco (Shalaby, 2013). Según Woodgate et al. (2017), las subdosificaciones de fármaco se generan usualmente en sistemas de producción a gran escala debido a subestimaciones del peso del animal vivo al calcular las dosis, pero, además, el método de administración de fármaco también influve en el riesgo de desarrollar resistencia a antihelmínticos. Los autores explican que, en pequeños rumiantes, los tratamientos orales son los más comúnmente utilizados debido a que la evidencia señala que son más efectivos en comparación con formulaciones inyectables o tópicas, incluso a pesar de que se alcancen menores concentraciones plasmáticas en el huésped¹. Además, los autores mencionan numerosos reportes que señalan como otro potencial riesgo para el desarrollo de resistencia el uso de formulaciones de liberación lenta y sostenida de fármaco.

¹Lanusse *et al.* (2014) discuten sobre la relación entre la elección de la vía de administración del fármaco y el parásito que se desea atacar. Principalmente la localización del parásito en el tracto gastrointestinal podría explicar la aparente mejora en la eficacia de los tratamientos orales, para algunas especies.

En este escenario, resulta evidente no solo la urgencia de introducir al mercado fármacos con nuevos mecanismos de acción y formularlos de la forma más eficiente posible para disminuir el riesgo de subdosificación; si no, además, la necesidad de lograr un uso más eficiente de los compuestos actualmente comercializados, cuya mayoría cuenta con muy baja o nula solubilidad en agua. En este sentido, la reformulación de fármacos antihelmínticos poco solubles en agua mediante el uso de sistemas de administración innovadores es un enfoque que resulta interesante para maximizar la disolución de los fármacos comerciales y preservar su eficacia (Hennessy, 1997; Lanusse *et al.*, 2014). Optimizar la formulación del fármaco y, por lo tanto, su biodisponibilidad oral puede mejorar su eficacia contra ciertas cepas resistentes del parásito, ya que puede mejorar tanto la concentración del fármaco en el sitio donde se ubica el parásito como el tiempo de exposición (Álvarez *et al.*, 2012; Lanusse *et al.*, 2014).

2.1.2. Nuevos híbridos valerolactama-benzimidazol con potencial antihelmíntico

El Área de Farmacología y el grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la UdelaR han trabajado en la síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica para aportar soluciones a la problemática de resistencia farmacológica descrita anteriormente. En el marco de esta colaboración interdisciplinaria, se trabajó inicialmente en la simplificación molecular de la familia de las bengamidas, productos naturales de origen marino que se encuentran en esponjas del género *Jaspis*, con probada actividad antitumoral, antibacterial y antihelmíntica (Crews y Hunter, 1993; White *et al.*, 2017).

Esta búsqueda derivó en la obtención de una serie de derivados δ -valerolactámicos sustituidos (ver figura 2.2) que presentaron excelentes resultados de actividad antihelmíntica *in vitro* contra el nematodo *Nippostrongilus basiliensis* (Gordon, 1998). Sin embargo, estudios de actividad y farmacocinética en modelos murinos y ovinos demostraron que los compuestos carecían de actividad *in vivo* debido que se eliminaban muy rápidamente del hospedero (Mendina, 2009). Además, se demostró mediante estudios de difusión parasitaria *ex vivo* que estos compuestos presentaban una pobre capacidad de ingresar al parásito (Munguía *et al.*, 2015).

Con el fin de mejorar las propiedades fisicoquímicas de los nuevos compues-



Figura 2.2: Estructuras genéricas de los derivados δ -valerolactámicos sustituídos, obtenidos por Gordon (1998), que dieron lugar a la 2-Boc-amino- δ -valerolactama (Mendina, 2009), precursora de los los híbridos valerolactama-benzimidazol (Munguía, 2014) junto con los benzimidazoles antihelmínticos (estructura genérica).

tos se realizaron aproximaciones sintéticas de hibridación molecular¹ utilizando dos subunidades estructurales distintas, ambas con actividad antihelmíntica. Se realizó la hibridación del compuesto 2-Boc-amino- δ -valerolactama² con estructuras derivadas de diferentes fármacos benzimidazólicos (elegidos con el fin de aumentar la lipofilia de los derivados δ -valerolactámicos para mejorar sus perfiles de difusión intraparasitaria, ver figura 2.2). De este modo, se obtuvieron los nuevos compuestos híbridos valerolactama-benzimidazol (ver figura 2.2), patentados por el grupo (Munguía *et al.*, 2013; Mendina, 2014). Para estos compuestos, pudo comprobarse que la difusión intraparasitaria alcanzó magnitudes similares a las de sus precursores benzimidazólicos (Munguía *et al.*, 2015), a la vez que se constató que su actividad antihelmíntica *in vitro* contra el nematodo *N. brasiliensis* fue del orden de la presentada por sus precursores

¹La hibridación molecular consiste en la unión de las subunidades activas de dos o más fármacos para obtener una nueva estructura química que mantenga las propiedades de interés de sus precursores. Se busca, de este modo, mejorar aspectos estructurales de los fármacos precursores como, por ejemplo, aumentar la potencia, superar mecanismos de resistencia a la actividad, mejorar perfiles fisicoquímicos o farmacocinéticos, cambiar el perfil metabólico o disminuir toxicidad (Teixeira, 2021).

²Derivado δ -valerolactámico que presentara valores de actividad antihelmíntica *in vitro* significativamente superiores a patrones antihelmínticos comerciales utilizados como referencia (Gordon *et al.*, 1997).

 δ -valerolactámicos (Munguía, 2014).

Entre todos los compuestos sintetizados, el que presentó mejores valores de actividad antihelmíntica *in vitro* fue el híbrido valero-fenbendazol (VAL-FBZ), derivado de fenbendazol (FBZ) (Munguía *et al.*, 2013), cuyas estructuras químicas pueden verse en la figura 2.3. Además, el FBZ y el VAL-FBZ fueron los compuestos que alcanzaron mayores concentraciones intraparasitarias en los estudios de difusión *ex vivo* en el nematodo de interés *H. contortus*, indicando que son quienes mejor permean las barreras parasitarias (Munguía *et al.*, 2015). Por otra parte, se pudo constatar que el VAL-FBZ no sufre sulfoxidación por parte del metabolismo parasitario, en las condiciones evaluadas (Munguía *et al.*, 2015).



Figura 2.3: Estructuras químicas de fenbendazol y valero-fenbendazol.

Si bien el VAL-FBZ se presenta como un gran candidato a ser evaluado en estudios de eficacia antihelmíntica *in vivo* en rumiantes, al igual que su precursor, FBZ, y los demás fármacos del grupo de los benzimidazoles antihelmínticos, presenta una muy baja solubilidad en agua. Ha sido ampliamente estudiado que la limitante en la solubilidad de FBZ tiene un marcado impacto sobre su absorción oral (Campbell, 1990; Lanusse *et al.*, 2014), a pesar de su gran capacidad para atravesar membranas biológicas. Diferentes reportes demuestran que aumentar la velocidad de disolución de FBZ puede conducir a una mayor biodisponibilidad y, en consecuencia, a una mayor eficacia terapéutica (Álvarez *et al.*, 1999; Pensel *et al.*, 2015, 2018).

Si se comparan los valores de lipofilia estimados para FBZ y VAL-FBZ, y

los resultados de sus capacidades para permear barreras parasitarias (ver tabla 2.3), es de esperar que los compuestos híbridos valerolactama-benzimidazol y, en particular, VAL-FBZ, tengan un comportamiento farmacocinético muy similar a sus precursores benzimidazólicos. Esto significa que es en extremo probable que VAL-FBZ presente las mismas dificultades que FBZ para alcanzar concentraciones terapéuticas efectivas *in vivo*. En este sentido, los nuevos compuestos deberán ser convenientemente formulados, no solo para maximizar su disponibilidad y eficacia, sino también para retrasar al máximo la aparición de eventos de resistencia asociados a posibles subdosificaciones.

Tabla 2.3: Comparación de lipofilia y permeabilidad parasitaria entre fenbendazol y el híbrido valero-fenbendazol. Tabla adaptada de Munguía *et al.* (2014)

Compuesto	Concentración intraparasitaria (nmoles/100 mg de proteínas)(a)	Factor de lipofilia $arphi 0({ m b})$
Fenbendazol	6.15 ± 1.97	62.5
Valero-fenbendazol	4.36 ± 1.44	67.1

(a) Estudios realizados en el nemaotodo de interés productivo *H. contortus*. La concentración parasitaria se considera como una medida de la capacidad de los compuestos para atravesar las membranas del parásito. (b) La lipofilia fue determinada experimentalmente mediante la estimación del factor de capacidad $\varphi 0$ por HPLC en fase reversa.

2.2. Fármacos con baja solubilidad en agua

Cuando se administra un fármaco por vía oral, su disolución en el tracto gastrointestinal, su capacidad para permear membranas y su metabolización durante el proceso de absorción serán los factores que, en conjunto, determinarán la cantidad de fármaco incambiado que ingrese a la circulación sistémica, es decir, su biodisponibilidad. Los compuestos con baja solubilidad en agua están relacionados con mayores tasas de deserción durante el desarrollo de fármacos¹ y mayores costos durante el desarrollo de medicamentos, debido a que, en gran medida, la solubilidad del fármaco puede ser un factor condicionante para su formulación y también para la eficacia del tratamiento (Di *et al.*, 2012). Si el fármaco no logra disolverse en cantidad y permanecer disuelto durante un tiempo suficiente en su tránsito gastrointestinal, no podrá atravesar las membranas biológicas necesarias para ejercer su acción (figura 2.4).

¹Este factor refleja el nivel de pérdida de nuevos candidatos a fármacos durante el proceso de desarrollo preclínico a clínico y durante su desarrollo clínico.


Figura 2.4: Liberación del fármaco y eventos subsecuentes luego de la administración oral de un medicamento. Las etapas que limitan la absorción oral de fármacos son: la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica, la permanencia del fármaco disuelto en sitios claves para su absorción y la permeación de las moléculas a través de las membranas gastrointestinales hasta llegar a la circulación sistémica. Además, el metabolismo hepático y entérico también afectan la biodisponibilidad. Imagen adaptada de Dressman y Reppas (2000).

El sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) ideado por Amidon *et al.* (1995) provee un marco para la clasificación de las sustancias farmacológicas en función de su solubilidad en agua y su permeabilidad intestinal. Este sistema permite clasificar los fármacos en cuatro clases, como se muestra en la figura 2.5). La clase I comprende fármacos relativamente solubles en agua que se absorben bien en el tracto gastrointestinal, características ideales para una biodisponibilidad óptima que, en general, es superior al 90 %. La clase II contiene a los fármacos que son relativamente insolubles en agua², pero con buena permeabilidad gastrointestinal. La clase III consiste en fármacos solubles

²Según la FDA, un fármaco se considera *altamente soluble* cuando la dosis más alta es soluble en un máximo de 250 mL de medio acuoso, en un rango de pH de 1.0 a $6.8 \text{ a } 37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$. A efectos prácticos, varios autores consideran como *poco solubles en agua* aquellos compuestos que presentan solubilidades en agua menores a 0.1 mg/mL a 37 °C, en un rango de pH entre 1.0 y 8.0 (Chavda *et al.*, 2010; Hörter y Dressman, 2001). A su vez, la FDA considera un fármaco como *altamente permeable* cuando el grado de absorción de una dosis administrada en humanos (considerando los metabolitos) es mayor o igual a 85 %, según una determinación del balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa. La permeabilidad también se puede evaluar mediante métodos *in vitro* validados y estandarizados utilizando células Caco-2 (FDA, 2018; ICH, 2018)

en agua pero que no penetran fácilmente en las membranas mucosas y, por lo tanto, tienen una biodisponibilidad oral baja. Finalmente, la clase IV reúne a los compuestos insolubles en agua que no atraviesan fácilmente las membranas mucosas.



Figura 2.5: Sistema de clasificación biofarmacéutica.

En sus inicios, el BCS fue pensado y diseñado para que los organismos regulatorios de medicamentos pudieran otorgar exenciones para estudios de bioequivalencia *in vivo* para la aprobación de cambios en especialidades farmacéuticas previamente aprobadas o de nuevos medicamentos genéricos, a partir, únicamente, de la colección de datos *in vitro* (perfiles de disolución). Sin embargo, este sistema es reconocido como una herramienta de gran utilidad para tomar decisiones en etapas tempranas del desarrollo de nuevos compuestos activos, ya que, por ejemplo, permite detectar fármacos que deberán contar con estrategias de formulación apropiadas como requisito indispensable para ser estudiados en ensayos clínicos. En este sentido, los estudios de solubilidad, permeabilidad y estabilidad metabólica de los candidatos a fármacos han sido integrados por la mayoría de las compañías farmacéuticas como parte fundamental de los *screens* de alto rendimiento y en la optimización de líderes (Ku, 2008). Los datos indican que alrededor de un 40 % de los ingredientes activos farmacéuticos del mercado son poco solubles en agua (Loftsson y Brewster, 2010). Sin embargo, cuando el foco se pone en el desarrollo de nuevas moléculas, el número presenta un aumento claro: se estima que entre un 75 y un 90 % de los nuevos candidatos a fármacos pertenecen a las clases II y IV del BCS (Di *et al.*, 2012; Jermain *et al.*, 2018; Loftsson y Brewster, 2010; Mohammad *et al.*, 2019). En particular, por las propiedades ya mencionadas en el apartado anterior, el FBZ se clasifica como clase II (Vignaduzzo *et al.*, 2017), es decir que su solubilidad en el medio gastrointestinal es demasiado baja para que se produzca su absorción completa, a pesar de que presenta una alta permeabilidad de membranas. Considerando los datos de permeabilidad y lipofilia de VAL-FBZ aportados por (Munguía *et al.*, 2015) y la baja solubilidad estimada para este híbrido (ver apartado 4.3.2), es posible predecir que tendrá un comportamiento biofarmacéutico muy similar a FBZ y clasificarlo también dentro de la clase II del BCS.

Si bien los factores que afectan la absorción de fármacos son múltiples y complejos, Jermain *et al.* (2018) proponen que la ecuación de máxima dosis absorbible (MAD), ecuación 2.1, permite ilustrar el desafío que presentan los fármacos pocos solubles en agua durante su proceso de absorción:

$$MAD = K_a \cdot S_{pH} \cdot V_{SI} \cdot t \tag{2.1}$$

En esta ecuación, K_a representa la constante de velocidad de absorción intestinal (relacionada a la permeabilidad), S_{pH} es la solubilidad a pH intestinal, t es el tiempo de tránsito y V_{SI} es el volumen intestinal disponible durante el tránsito del fármaco a través del intestino delgado. Los autores explican que, según este modelo, el fármaco debe disolverse en el estómago y mantenerse disuelto a través de las transiciones de pH en su camino hacia el intestino, o bien disolverse rápidamente a pH intestinal para asegurar su absorción. Para fármacos con baja solubilidad, SpH es el factor limitante en la MAD, pero, si se logra aumentar de forma sustancial, el factor limitante pasa a ser la velocidad de absorción intestinal. Por este motivo, para los fármacos de clase II, el impacto de mejorar su velocidad de disolución y solubilidad en el tracto gastrointestinal es notable.

2.2.1. Estrategias tecnológicas para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos

Las formas farmacéuticas de administración oral constituyen la mayoría de las prescripciones médicas y veterinarias, sin embargo, para la industria farmacéutica, el desarrollo de nuevas formulaciones es uno de los mayores desafíos, principalmente cuando se desea alcanzar una adecuada biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua. Numerosas estrategias han sido desarrolladas con este fin, poniendo el foco en aumentar la velocidad de disolución o solubilidad de fármacos. La obtención de polimorfos o del estado amorfo del fármaco, su inclusión en complejos con ciclodextrinas, la disminución de su tamaño de partícula, la formación de sales, su inclusión en liposomas, o la preparación de dispersiones sólidas son solo algunos ejemplos de las aproximaciones disponibles (Leuner y Dressman, 2000). La tabla 2.4 resume las principales técnicas empleadas para mejorar la solubilidad o velocidad de disolución de fármacos poco solubles en agua.

El éxito de las aproximaciones mencionadas se explica por la modulación de uno o más de los eventos involucrados en la disolución de un soluto: la ruptura de sus enlaces intermoleculares; la separación de las moléculas del solvente para recibirlo y la formación de nuevas interacciones entre el solvente y el soluto (Ghumre et al., 2021). Además, como se describe más en profundidad en el capítulo 4 de esta Tesis (apartado 4.1.1), la velocidad de disolución de un sólido puede describirse como una función que depende del área superficial del fármaco, del grosor de la capa de difusión y de su solubilidad de saturación (Noyes y Whitney, 1897). A su vez, entre los factores que impactan en la solubilidad de saturación pueden contarse: la forma cristalina del fármaco (si es amorfo o si presenta polimorfismo), su lipofilia, su solubilidad acuosa y su pKa (además del perfil de pH gastrointestinal y la capacidad del fármaco de ser cosolubilizado por los surfactantes propios del medio gastrointestinal). Por otro lado, el área superficial del fármaco disponible para que tenga lugar el proceso de disolución es afectada por el tamaño de las partículas de soluto y por la presencia de agentes humectantes que le permitan entrar en contacto con el medio acuoso (Hörter y Dressman, 2001).

Una vez que se cuenta con un fármaco poco soluble en agua del que se conocen sus propiedades fisicoquímicas, podrán determinarse los posibles caminos a seguir para obtener formulaciones seguras y eficaces. El esquema de

Clasificación	Estrategia utilizada	Técnicas empleadas
	Reducción del tamaño de partícula	Micronización Nanometrización Sonocristalización Fluídos supercríticos
Modificaciones físicas	Dispersión en matrices	Método de fusión Método de solvente Secado por aspersión Irradación con microondas Liofilización
	Modificación de la forma cristalina	-
Modificaciones químicas	Complejación	Comolienda Método de amasado Neutralización Secado por aspersión Irradación con microondas Coprecipitación Liofilización
	Cambio de pH	-
	Síntesis de profármacos	-
	Formación de sales	-
	Uso de cosolventes	-
	Formación de cocristales Hidrotropía	-
Otros métodos	Solubilización con surfactantes Fluídos supercríticos Solubilización en miscelas	Microemulsiones Sistemas autoemulsificantes -

 Tabla 2.4: Resumen de las estrategias empleadas para mejorar la solublidad acuosa de fármacos.

la figura 2.6 muestra las diferentes aproximaciones que pueden seleccionarse para formular un compuesto según sus propiedades fisicoquímicas. A modo de ejemplo, si el compuesto que quiere formularse permite la formación de una sal o su solubilidad mejora con pequeñas variaciones de pH, estas serán las aproximaciones de elección; en caso de que estas opciones no sean viables, pero el compuesto presente cierta solubilidad en solventes orgánicos podrá optarse por el agregado de cosolventes o por vehiculizarlo en alguna clase de sistema lipídico. Finalmente, las estrategias que quedan disponibles para fármacos que deben administrarse a altas dosis, y presentan puntos de fusión y lipofilias altas, son cada vez más reducidas. Las alternativas serán formularlo como un complejo de inclusión, si el compuesto presenta una forma molecular que lo permita, o someterlo a un proceso de nanometrización.



Figura 2.6: Árbol de decisión para la selección de la formulación, adaptado de Rabinow (2004). Se contemplan las aproximaciones de aplicación más sencillas como primera opción.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., y Lanusse, C. (2012). Dosedependent systemic exposure of albendazole metabolites in lambs. *Jour*nal of veterinary pharmacology and therapeutics, 35(4), 365-372.
- Álvarez, L., Sánchez, S., y Lanusse, C. (1999). In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 22, 77-86.
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., y Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, 12(3), 413-420.
- Beech, R., Skuce, P., Bartley, D., Martin, R., Prichard, R., y Gilleard, J. (2011). Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology*, 138(2), 160-174.
- Brennan, G., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., et al., (2007). Understanding triclabendazole resistance. Experimental and molecular pathology, 82(2), 104-109.
- Campbell, W. (1990). Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitology Today*, 6(4), 130-133.
- Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H. W., Chartier, C., Vineer, H. R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Băcescu, B., Mickiewicz, M., et al., (2020). Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. Preventive Veterinary Medicine, 182, 105103.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., y Vercruysse, J. (2014). Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in parasitology*, 30(7), 361-367.

- Chavda, H., Patel, C., y Anand, I. (2010). Biopharmaceutics classification system. Systematic reviews in pharmacy, 1(1), 62.
- Cintra, M., Teixeira, V., Nascimento, L., y Sotomaior, C. (2016). Lack of efficacy of monepantel against Trichostrongylus colubriformis in sheep in Brazil. Veterinary parasitology, 216, 4-6.
- Crews, P., y Hunter, L. M. (1993). The search for antiparasitic agents from marine animals. En *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (pp. 343-389). Springer.
- Di, L., Fish, P. V., y Mano, T. (2012). Bridging solubility between drug discovery and development. Drug discovery today, 17(9-10), 486-495.
- Dressman, J. B., y Reppas, C. (2000). In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European journal of pharmaceuti*cal sciences, 11, S73-S80.
- Dyary, H. O. (2016). Veterinary anthelmintics and anthelmintic drug resistance. J Zankoy Sulaimani Part A, 18(1), 191-206.
- European Medicines Agency, E. (2017). Reflection paper on anthelmintic resistance. European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). https://www.ema.europa. eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-anthelminticresistance_en-1.pdf
- FDA, (2018). Dissolution Testing and Acceptance Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Form Drug Products Containing High Solubility Drug Substances Guidance for Industry (August). Center for Drug Evaluation, Research, U.S. Food y Drug Administration (FDA). https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidancedocuments/dissolution-testing-and-acceptance-criteria-immediate-releasesolid-oral-dosage-form-drug-products
- Fleming, S. A., Craig, T., Kaplan, R. M., Miller, J. E., Navarre, C., y Rings, M. (2006). Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(2), 435-444.
- Geary, T. G., Hosking, B. C., Skuce, P. J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W., y Vercruysse, J. (2012). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses.

- Ghumre, P. B., Bote, S. S., Kotgir, S. R., Korde, A. B., Bhosale, B. S., y Chaudhari, R. B. (2021). Solubility enhancement technique - A review.
- Gordon, S. (1998). Nuevos antihelmínticos derivados de la 2- amino- delta- valerolactama. Síntesis y evaluación biológica (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Udelar. FQ.
- Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., Mariezcurrena, R., y Suescun, L. (1997). Synthesis and in vitro anthelmintic activity against Nippostrongylus brasiliensis of new 2-amino-4hydroxy-delta-valerolactam derivatives. *Farmaco (Societa Chimica Italiana: 1989)*, 52(10), 603-608.
- Hennessy, D. (1997). Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72(3-4), 367-390.
- Hewitson, J. P., y Maizels, R. M. (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Expert review of vaccines*, 13(4), 473-487.
- Hörter, D., y Dressman, J. (2001). Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Advanced drug delivery reviews, 46(1-3), 75-87.
- Hotez, P. (2008). J., Brindley, PJ, Bethony JM, King, CH, Pearce, EJ and Jacobson. J. Helminth Infections: The Great Neglected Tropical Diseases— Clin Invest, 118(4), 1311-1321.
- ICH, (2018). Harmonised Guideline. Biopharmaceutics classification systembased biowaivers M9. International Council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH).
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. N., y Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life scien*ces, 79(26), 2413-2431.
- Jermain, S. V., Brough, C., y Williams III, R. O. (2018). Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery-an update. *International journal of pharmaceutics*, 535(1-2), 379-392.
- Jourdan, P. M., Lamberton, P. H., Fenwick, A., y Addiss, D. G. (2018). Soiltransmitted helminth infections. *The Lancet*, 391(10117), 252-265.
- Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P. A., Strehlau, G. A., Allan, B. A., Hosking, B. C., Rolfe, P. F., y Sager, H. (2011). Differences in efficacy of mone-

pantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. Parasitology Research, 109(1), 19-23.

- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., *et al.*, (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452(7184), 176-180.
- Kaplan, R. M., y Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. Veterinary parasitology, 186(1-2), 70-78.
- Knowles, C., y Casida, J. (1966). Mode of action of organophosphate anthelmintics. Cholinesterase inhibition in Ascaris lumbricoides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(6), 566-572.
- Ku, M. S. (2008). Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. The AAPS journal, 10(1), 208-212.
- Lanusse, C., Álvarez, L., y Lifschitz, A. (2014). Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary parasitology*, 204 (1-2), 18-33.
- Leuner, C., y Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50(1), 47-60.
- Lo, N. C., Gupta, R., Addiss, D. G., Bendavid, E., Heft-Neal, S., Mikhailov, A., Montresor, A., y Mbabazi, P. S. (2020). Comparison of World Health Organization and Demographic and Health Surveys data to estimate sub-national deworming coverage in pre-school aged children. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008551.
- Loftsson, T., y Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of pharmacy* and pharmacology, 62(11), 1607-1621.
- Martin, R., y Robertson, A. (2007). Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology*, 134(8), 1093-1104.
- McKellar, Q., Scott, E., et al., (1990). The benzimidazole anthelmintic agentsa review. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 13(3), 223-247.
- McKellar, Q., y Jackson, F. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. TRENDS in Parasitology, 20(10), 456-461.

- Mederos, A. E., Ramos, Z., y Banchero, G. E. (2014). First report of monepantel Haemonchus contortus resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-4.
- Mendina, P. (2009). Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Udelar. FQ.
- Mendina, P. (2014). Derivados de la 2-amino-delta-valerolactama y benzimidazoles que presentan actividad antiparasitaria y en particular antihelmíntica de amplio espectro [Patente DNPI 14424].
- Mohammad, I. S., Hu, H., Yin, L., y He, W. (2019). Drug nanocrystals: fabrication methods and promising therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 562, 187-202.
- Munguía, B. (2014). Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nuevos agentes antiparasitarios (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Udelar. FQ.
- Munguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., J Andina, M., Ures, X., López, A., Manta, E., y Domínguez, L. (2013). Synthesis and anthelmintic evaluation of novel valerolactam-benzimidazole hybrids. *Letters in Drug Design & Discovery*, 10(10), 1007-1014.
- Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., y Domínguez, L. (2015). Development of novel valerolactambenzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Experimental parasitology*, 153, 75-80.
- Noyes, A. A., y Whitney, W. R. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. Journal of the American Chemical Society, 19(12), 930-934.
- Papadopoulos, E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Ruminant Research, 76(1-2), 99-103.
- Pensel, P. E., Gamboa, G. U., Fabbri, J., Ceballos, L., Bruni, S. S., Álvarez, L. I., Allemandi, D., Benoit, J. P., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2015). Cystic echinococcosis therapy: albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta tropica, 152, 185-194.
- Pensel, P. E., Paredes, A., Albani, C. M., Allemandi, D., Bruni, S. S., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2018). Albendazole nanocrystals in experi-

mental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. *Veterinary parasitology*, 251, 78-84.

- Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R., y Brooker, S. J. (2014). Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-19.
- Pumarola, A. (1987). Microbiología y parasitología médica. Evolución histórica, concepto y contenido. Microbiología y parasitología médica. 2^a ed. Barcelona: Salvat, 1-10.
- Rabinow, B. E. (2004). Nanosuspensions in drug delivery. Nature reviews Drug discovery, 3(9), 785-796.
- Robertson, A. P., Buxton, S. K., Puttachary, S., Williamson, S. M., Wolstenholme, A. J., Neveu, C., Cabaret, J., Charvet, C. L., y Martin, R. J. (2012). Antinematodal drugs-modes of action and resistance: and worms will not come to thee (Shakespeare: Cymbeline: IV, ii). *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 233-249.
- Sales, N., y Love, S. (2016). Resistance of Haemonchus sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*, 228, 193-196.
- Scott, I., Pomroy, W., Kenyon, P., Smith, G., Adlington, B., y Moss, A. (2013). Lack of efficacy of monepantel against Teladorsagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 166-171.
- Shalaby, H. A. (2013). Anthelmintics resistance; how to overcome it? Iranian journal of parasitology, 8(1), 18.
- Swan, G. (1999). The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. Journal of the South African Veterinary Association, 70(2), 61-70.
- Teixeira, R. (2021). Diseños, síntesis y optimización de nuevos fármacos antihelmínticos. (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Vercruysse, J., Rew, R. S., et al., (2002). Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy. CABI Pub.
- Vignaduzzo, S. E., Operto, M. A., y Castellano, P. M. (2017). Development of a dissolution test for fenbendazole-praziquantel capsules using UV-PLS method. Journal of the Brazilian Chemical Society, 28, 1030-1037.

- Waller, P. J. (2003). Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. Animal Health Research Reviews, 4(1), 35-44.
- Waller, P. J. (2006a). From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary parasitology*, 139(1-3), 1-14.
- Waller, P. J. (2006b). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. Animal feed science and technology, 126(3-4), 277-289.
- White, K. N., Tenney, K., y Crews, P. (2017). The bengamides: a mini-review of natural sources, analogues, biological properties, biosynthetic origins, and future prospects. *Journal of natural products*, 80(3), 740-755.
- Woodgate, R., Cornell, A., y Sangster, N. (2017). Occurrence, measurement and clinical perspectives of drug resistance in important parasitic helminths of livestock. En Antimicrobial Drug Resistance (pp. 1305-1326). Springer.
- Woods, D. J., Maeder, S. J., Robertson, A. P., Martin, R. J., Geary, T. G., Thompson, D. P., Johnson, S. S., y Conder, G. A. (2012). Discovery, mode of action, and commercialization of derquantel. *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, 297-307.
- Zajac, A. M. (2006). Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 22(3), 529-541.
- Zhan, B., Beaumier, C. M., Briggs, N., Jones, K. M., Keegan, B. P., Bottazzi, M. E., y Hotez, P. J. (2014). Advancing a multivalent 'Pananthelmintic'vaccine against soil-transmitted nematode infections. *Expert review of vaccines*, 13(3), 321-331.

Capítulo 3

Dispersiones sólidas de fenbendazol

Este capítulo se articula de la siguiente forma. En primer lugar, sección 3.1, se describen los sistemas de dispersión sólida, así como el impacto de su aplicación en la formulación de compuestos activos poco solubles en agua, con el objetivo de mejorar su velocidad de disolución acuosa y biodisponibilidad oral. En segundo lugar, sección 3.2, se detalla la metodología empleada para la preparación y caracterización de dispersiones sólidas de fenbendazol —fármaco muy poco soluble en agua, perteneciente a la familia de los benzimidazoles antihelmínticos—, mediante un proceso de fusión, empleando dos matrices poliméricas diferentes —poloxamer 188 y 407— y variando sus proporciones. Se describe también la metodología aplicada para la caracterización químico-estructural y reológica de las preparaciones. En la tercera sección, 3.3, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las preparaciones, que posteriormente se discuten en la sección 3.4. La discusión mencionada se centra en las mejoras alcanzadas en la velocidad de disolución del principio activo y en los estudios de microscopía Raman confocal realizados, resaltando su utilidad para mapear cualitativamente la distribución de los componentes en las diferentes preparaciones. Finalmente, la sección 3.5. presenta las conclusiones de este capítulo.

3.1. Dispersiones sólidas: aspectos teóricos y estado del arte

El principal desafío al momento de mejorar la biodisponibilidad de los fármacos clasificados como clase II y IV en el BCS (ver sección 2.2 para una definición de este sistema de clasificación) es aumentar su velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal del organismo de interés. En tal sentido, la formulación de este tipo de compuestos como dispersión sólida (DS) ha sido una estrategia ampliamente explorada y desarrollada desde la primera mención de esta tecnología en el ámbito académico, en 1961. Las DS fueron descriptas por primera vez por Sekiguchi y Obi, quienes observaron que la preparación de mezclas eutécticas de fármacos poco solubles en agua con compuestos hidrofílicos mejoraba su velocidad de disolución y también su biodisponibilidad (Sekiguchi y Obi, 1961; Sekiguchi *et al.*, 1964). Algunos años después, Chiou y Riegelman (1971) definían por primera vez los sistemas de DS como la dispersión de uno o más ingredientes activos en un vehículo inerte o matriz en estado sólido, donde éstos pueden existir en estado cristalino, disueltos o en estado amorfo.

La tecnología de DS permite contar con procesos de disolución de fármacos energéticamente más favorables. Vasconcelos *et al.* (2007) resumen cuatro aspectos fundamentales a destacar que explican la mayor velocidad de disolución lograda con estos sistemas: 1) el tamaño de partícula de fármaco disminuido, que conlleva un aumento en el área superficial y el consiguiente aumento de velocidad de disolución¹; 2) la mojabilidad mejorada debido al uso de polímeros hidrofílicos como portadores que rodean las partículas de fármaco de forma individual; 3) los altos grados de porosidad detectados en los productos finales, que permiten un mejor ingreso de solvente a los sistemas; y 4) la constatación de la formación de soluciones sobresaturadas de fármaco cuando se exponen las DS en el medio acuoso ².

¹Sobre este punto se profundizará en el capítulo 4

 $^{^{2}}$ Respecto a la formación de soluciones sobresaturadas de fármaco, Huang y Dai (2014) explican que la ventaja de las DS radica en que los polímeros comúnmente empleados para su preparación logran inhibir la precipitación del ingrediente activo desde la solución sobresaturada, interfiriendo con el proceso de nucleación o crecimiento cristalino, como resultado de interacciones polímero-fármaco.

3.1.1. Clasificación de dispersiones sólidas

En la extensa bibliografía relativa a las DS se encuentran diferentes clasificaciones que ayudan a ordenar la gran variedad de preparaciones desarrolladas. Por un lado, respondiendo a la evolución de la tecnología a lo largo de los años, se ha agrupado a las DS en cuatro generaciones de acuerdo al tipo y complejidad de las matrices empleadas para su preparación (Vasconcelos *et al.*, 2007; Vo *et al.*, 2013): la primera generación incluye las DS preparadas a partir de matrices cristalinas como urea y diferentes azúcares —manitol, sorbitol, entre otros—; la segunda incluye las preparadas a partir de matrices amorfas, mayormente poliméricas —e.g. hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicol—; en la tercera se introducen como aditivos, además de la matriz, agentes con superficie activa o autoemulsionantes —e.g. poloxamers y gelucires—; y una cuarta generación, donde los materiales empleados como matriz —etilcelulosa, carboxivinil polímero, óxido de etileno, entre otros son compuestos insolubles en agua o con propiedades que los vuelven capaces de producir la liberación controlada del fármaco.



Figura 3.1: Clasificación de dispersiones sólidas. Adaptado de Vasconcelos *et al.* (2007) y actualizado.

Además, un reporte reciente de Modica et. al (2020) propone una quinta generación, a la que denomina *dispersiones sólidas multicomponente*. En el trabajo mencionado, los autores describen estos sistemas como dispersiones de uno o más fármacos en matrices complejas, formadas por al menos dos compuestos cuyas propiedades pueden alterar la permeabilidad del fármaco a través de membranas biológicas o aumentar su adhesividad a mucosas. En la figura 3.1 se resumen las diferentes generaciones detalladas.

Por otro lado, otra importante clasificación de las DS las ordena de acuerdo al tipo de arreglo molecular de sus componentes. Esta clasificación cuenta con cuatro categorías principales: *mezclas eutécticas, soluciones sólidas, suspensiones sólidas amorfas,* y *soluciones y suspensiones vidriosas,* que se describen brevemente a continuación.

3.1.1.1. Mezclas eutécticas

Las mezclas eutécticas consisten en mezclas de dos componentes cristalinos que son completamente miscibles en estado líquido, pero tienen limitada solubilidad en el estado sólido. El punto de fusión de los componentes en la composición eutéctica es menor al punto de fusión de los componentes individuales, por lo que, cuando la mezcla eutéctica líquida se enfría, ambos componentes cristalizan de forma simultánea, lo que resulta en una dispersión altamente homogénea del fármaco y matriz. La figura 3.2 ilustra el diagrama de fases típico de una mezcla eutéctica binaria.

3.1.1.2. Soluciones sólidas

En las soluciones sólidas se logra obtener el fármaco dispersado a nivel molecular en la matriz, por lo que el sistema sólido final consta de una única fase. Esto permite alcanzar mayores velocidades de disolución en estos sistemas respecto a la correspondiente composición eutéctica. Las soluciones sólidas se clasifican, a su vez, en cuatro categorías: continuas, discontinuas, cristalinas sustitutivas y cristalinas intersticiales.

Las soluciones sólidas continuas o discontinuas se distinguen de acuerdo al grado de miscibilidad de los componentes, clasificándose como continuas cuando los componentes son miscibles independientemente de su proporción, y como discontinuas cuando la solubilidad de cada componente en el otro es parcial, es decir que cada uno de los componentes es soluble en el otro solamente en ciertas proporciones.

Por otro lado, en las soluciones sólidas cristalinas sustitutivas las moléculas



Figura 3.2: Diagrama de fases de una *mezcla eutéctica binaria*. A temperaturas por debajo de la curva X-E o E-Z, ya sea el sólido A [fármaco] o el sólido B [portador] comienza a cristalizar a partir de la mezcla fundida antes que el otro componente. Sin embargo, en la composición eutéctica (E) tanto A como B solidifican simultáneamente como una mezcla de componentes cristalinos finamente divididos. Imagen adaptada de Tong *et al.* (2008).

de soluto sustituyen moléculas de la red cristalina del solvente sólido, en general debido a que comparten tamaños moleculares que difieren menos de un 15 %. Sin embargo, en las *soluciones sólidas cristalinas intersticiales* las moléculas de soluto ocupan los intersticios de la red cristalina del solvente (Leuner y Dressman, 2000).

3.1.1.3. Suspensiones sólidas amorfas

En este tipo de preparaciones, comúnmente más conocidas como dispersiones sólidas amorfas, el fármaco se encuentra precipitado en su forma amorfa en una matriz que suele ser cristalina. Estos sistemas presentan velocidades de disolución del fármaco superiores respecto al fármaco en estado cristalino, debido a que se minimiza la cantidad de energía necesaria para desorganizar la red cristalina del fármaco durante su disolución, lo que en, términos de entalpía, resulta en un proceso notablemente más favorable (Jermain *et al.*, 2018). Sin embargo, esta característica se vuelve también un riesgo para la estabilidad de los sistemas, ya que potencialmente los fármacos tenderán a convertirse a su forma cristalina, termodinámicamente más estable (Tong *et al.*, 2008).

3.1.1.4. Soluciones y suspensiones vidriosas

Las soluciones vidriosas consisten en fármacos disueltos en portadores con propiedades vidriosas (amorfos). Cuando se trata de suspensiones vidriosas las partículas de fármaco se encuentran suspendidas en el solvente sólido vidrioso. Estos sistemas suelen presentarse como transparentes y quebradizos por debajo de la temperatura de transición vítrea, y el proceso de fusión del portador no suele darse a una temperatura fija, sino que el material comienza a ablandarse a medida que aumenta la temperatura. La diferencia entre estos sistemas y las soluciones sólidas es que en estas últimas suele haber interacciones químicas relativamente fuertes, mientras que la energía reticular en las soluciones vidriosas se espera que sea mucho menor, debido a su similitud con la solución líquida (Chiou y Riegelman, 1971).

3.1.2. Métodos de preparación de dispersiones sólidas

Los métodos de preparación de DS pueden dividirse en dos categorías generales: *métodos por fusión* y *métodos por solvente*. Además, por combinación de ambos, se puede obtener DS a través de procesos denominados *fusión-solvente*. En la figura 3.3 se resumen las diferentes aproximaciones que pueden emplearse en la preparación de DS, agrupadas según esta clasificación.



Figura 3.3: Resumen de algunos de los procesos empleados para la manufactura de dispersiones sólidas. Se encuentran dos grandes tipos de procesos: *por fusión* y *por solvente*. Además, existen métodos que combinan ambas aproximaciones

3.1.2.1. Métodos por evaporación de solvente

A grandes rasgos, los métodos por evaporación de solvente (o métodos por solvente) consisten en la evaporación de un solvente común donde se encuentran disueltos el fármaco y la matriz. Estos procesos incluyen al menos dos etapas: la primera, donde el fármaco y el portador se disuelven en un solvente volátil, y la segunda, donde se evapora el solvente, preferentemente a bajas temperaturas, para minimizar la posibilidad de eventos de descomposición térmica de los componentes. La etapa de evaporación de solvente puede involucrar una amplia gama de procedimientos, entre los que se encuentra el secado por aspersión, la liofilización, la coprecipitación y la coevaporación (Vo et al., 2013). De los productos disponibles en el mercado internacional, producidos a través de métodos de solvente, la técnica de secado por aspersión es la más comúnmente empleada, debido a su gran versatilidad (Pandi et al., 2020).

Los métodos por solvente son aplicables a fármacos y matrices termolábiles, y permiten el uso de portadores con puntos de fusión altos, no deseables para los procedimientos por fusión. Adicionalmente, estas técnicas permiten convertir las soluciones de fármaco-portador en polvos secos en un único paso, por lo que presentan ventajas como la posibilidad de diseñar procesos de fabricación continua y la facilidad del escalado (Tambosi *et al.*, 2018). Sin embargo, estas metodologías presentan algunos inconvenientes, entre los que se destacan: la dificultad para seleccionar solventes capaces de solubilizar a la vez todos los componentes de la formulación, los costos elevados asociados a la necesidad de evaporar grandes cantidades de solvente y la generación de residuos que, la mayoría de las veces, son tóxicos.

3.1.2.2. Métodos por fusión

Los métodos por fusión involucran una primera etapa de calentamiento de la composición de fármaco y polímero por encima de la temperatura de fusión o transición vítrea de alguno de los componentes, para realizar la mezcla de ambos en el estado fundido; seguido de una etapa de solidificación por enfriamiento de la mezcla. Para el diseño de estas preparaciones, las tecnologías más estudiadas han sido la *extrusión por fusión en caliente* (HME) y la *granulación por fusión* (Tambosi *et al.*, 2018).

El proceso de aglomeración por fusión emplea equipamiento estándar como mezcladores de alto rendimiento o secadores de lecho fluido, donde la mezcla de fármaco y portador fundidos se añaden como líquido granulante a los excipientes sólidos de la formulación. En cambio, la HME se realiza en una extrusora que permite fundir y mezclar fármaco y portador a altas temperaturas, en condiciones controladas, y forzar la mezcla homogeneizada a través de una apertura pequeña. El producto obtenido es un material extruido que se solidifica al enfriarse una vez que se encuentra fuera del equipo.

Entre los métodos por fusión, la fusión a baja temperatura es la alternativa de elección cuando el fármaco o la matriz seleccionada son termosensibles (Vo et al., 2013). Este método consiste en suspender el fármaco en la matriz previamente fundida, en vez de calentar el fármaco y el portador al mismo tiempo. Esta metodología permite reducir tanto el tiempo de calentamiento como la temperatura final del proceso, por lo que resulta en procesos de fabricación sencillos, respetuosos con el medio ambiente —al no involucrar el uso de solventes—, rentables y fácilmente escalables con fines comerciales (Bhandari et al., 2007; Mehanna et al., 2010). En su última revisión, Cid et. al (2019) mencionan MeltDose(\mathbb{R}) de Lifecycle Pharma y Lidose(\mathbb{R}) del grupo SMB como tecnologías recientemente patentadas para la producción de DS mediante fusión a baja temperatura.

Como fuera mencionado, los *métodos por fusión* cuentan con limitaciones respecto al uso de altas temperaturas, lo que implica que los componentes tengan que ser termorresistentes a las temperaturas empleadas. Sin embargo, presentan la gran ventaja de que son procedimientos libres de solventes.

3.1.2.3. Métodos de fusión-solvente

Una tercera categoría incluye los *métodos de fusión-solvente* que, como su nombre lo indica, combinan los dos métodos descriptos anteriormente. Esta metodología consiste en calentar el portador hasta su fusión y disolver el fármaco en un solvente apropiado para incorporarlo con agitación al portador fundido.

Posteriormente se elimina el solvente y se enfría la mezcla para solidificarla y obtener así la DS. Como es de esperar, los métodos que combinan el uso de solventes con la fusión tienen aplicación muy limitada y existen pocos reportes en bibliografía, si bien cuentan con algunas ventajas como menores tiempos de calentamiento y mayor facilidad de mezclado respecto a los otros métodos (Tambosi *et al.*, 2018).

3.1.3. Caracterización de dispersiones sólidas

Para la caracterización de las propiedades del estado sólido de las DS, así como de los componentes puros que las integran, se emplean varias técnicas que se resumen en la tabla 3.1. De las técnicas mencionadas, las más relevantes para la caracterización de DS son la difracción de rayos X de polvo (XRPD), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), la medida de velocidad de liberación del fármaco y el análisis térmico (Leuner y Dressman, 2000).

Dado que el objetivo de la preparación de las DS es la mejora en la velocidad de disolución de fármacos poco solubles en agua, los ensayos de disolución *in vitro* del componente activo (estándares o en medios biorrelevantes) resultan fundamentales para la caracterización de los sistemas. El diseño de estos ensayos debería permitir dilucidar si el proceso de DS produce mejoras en la velocidad de disolución del activo, al compararlo con la disolución del activo sin formular y la mezcla simple de los componentes (en igual proporción).

Otro aspecto fundamental durante la caracterización de una DS es conocer el estado físico del fármaco (amorfo o cristalino), lo cual puede determinarse por técnicas como XRPD y análisis térmico. En tal sentido, estudios como la calorimetría de barrido diferencial (DSC) son potentes para dar información sobre la energía que requieren los distintos procesos en los que hay involucrados intercambios de energía —exotérmicos o endotérmicos, como las transiciones de fase de los componentes—. Comparando los termogramas obtenidos por DSC de muestras de DS con los de la mezcla simple de componentes, se puede, por ejemplo, detectar si el fármaco ha sufrido cambios en su cristalinidad (detección de distintos polimorfos o estado amorfo) e incluso cuantificar si coexisten diferentes fases.

Por otra parte, con la técnica de XRPD puede conocerse el patrón de difracción característico de un ingrediente activo cristalino o la matriz empleada, por lo que también es de utilidad para diferenciar el tipo de arreglo molecular de los componentes luego de que se los sometió al proceso de DS. Estudios espectroscópicos, como FT-IR o Raman, permiten conocer qué tipo de interacciones químicas se dan entre los diferentes componentes, ya sea si se produjeron nuevos compuestos por reacciones químicas o si se dan importantes interacciones débiles entre sus grupos funcionales (como enlace de hidrógeno).

Métodos	Característica estudiada				
Disolución intrínseca	Liberación del fármaco				
Solubilidad dinámica	Liberación del fármaco				
Disolución	Liberación del fármaco				
Disolución en medios biorrelevantes	Liberación del fármaco				
FT-IR	Interacción entre componentes				
RMN de estado sólido	Estructura física				
Sorción dinámica de vapor	Estructura física				
Microscopía de barrido electrónico	Estructura física				
Análisis de superficie	Estructura física				
	Contenido amorfo				
Calorimetría diferencial de harrido	Polimorfismo				
Calorimetria diferenciai de barrido	Estabilidad				
	Miscibilidad de los componentes				
Cromatografía de gases inversa	Estructura física				
	Contenido amorfo				
Termogravimetría	Estabilidad				
	Polimorfismo				
Microscopía de luz polarizada	Contenido amorfo				
	Contenido amorfo				
Difracción de rayos x de polvo	Polimorfismo				
	Miscibilidad de los componentes				
Microscopía de platina caliente	Miscibilidad de los componentes				
Estudios de humedad	Estabilidad				
Espectroscopía Raman	Interacción entre componentes				
	Liberación del fármaco				
Microscopía Raman confocal	Interacción entre componentes				
Microscopia Raman comocar	Homogeneidad de contenido				
	Contenido amorfo				
Estudios de solubilidad de saturación	Estabilidad				

Tabla 3.1: Métodos para la caracterización de dispersiones sólidas

3.1.4. Impacto de la tecnología de dispersión sólida en la manufactura de medicamentos

Debido a las ventajas mencionadas al comienzo de esta sección (apartado 3.1), la metodología de DS es considerada una de las más convenientes para mejorar la biodisponibilidad oral de compuestos poco solubles en agua (Saffoon *et al.*, 2011). Al día de hoy, miles de artículos científicos y numerosas patentes de invención relacionadas a esta tecnología han sido publicados demostrando su utilidad. En la figura 3.4 se muestra la tendencia creciente del número de publicaciones relativas a la temática (Zhang *et al.*, 2018).



Figura 3.4: Tendencia del número de publicaciones sobre dispersiones sólidas (columnas rojas). Incluye patentes y artículos científicos. La línea azul indica el porcentaje acumulado en el período desde 1980 a 2015. Se observa un aumento drástico del número de publicaciones a partir del año 2000, más del 70 % se publicaron de 2005 a 2015. Imagen extraída de Zhang *et al.* 2018 (copyright \bigcirc 2018 by the authors, licensee MDPI, Basel, Switzerland, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Por otra parte, existen en el mercado internacional aproximadamente 25 medicamentos que incorporan la tecnología de DS en su producción, que se recogen en la tabla 3.2 (Pandi *et al.*, 2020). En relación al relativamente bajo número de productos comercializados respecto al potencial de las DS demostrado en bibliografía, Cid *et al.* (2019) proponen que el número de DS en el mercado se ve limitado principalmente por diferentes problemas relacionados a la inestabilidad física durante las etapas de manufactura, almacenamiento y disolución. Asimismo, los autores sugieren que para potenciar el uso de las DS y aumentar el número de productos farmacéuticos en el mercado con esta tecnología es necesario diseñar métodos de manufactura más robustos, haciendo foco en la estabilidad física de las preparaciones y en lograr un mejor entendimiento de los procesos de escalado.

Ingreso al mercado	1975	1985	1992	1994	1997	1997	2002	2004	2005	2007	2007	2008	2009	2010	2010	2010	2011	2011	2012	2012	2013	2013	2014	T	T	I	I
Forma farmacéutica	Comprimidos	Cápsula	Comprimidos	$\operatorname{Comprimidos}$	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos	Cápsulas	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos	Comprimido	Comprimidos	Comprimidos	Comprimidos	Comprimido	Comprimidos	Cápsulas	Comprimidos	Comprimidos	Cápsula	Comprimidos	$\operatorname{Comprimidos}$	Comprimidos	$\operatorname{Comprimidos}$	Comprimidos
Método de preparación	HME	Evaporación por solvente	SPA	Mezclado y secado	HME	HME	SPA	NR	HME	Aglomeración controlada y SPA	HME	HME	Granulación	Coprecipitación	HME	HME	SPA	Microprecipitación	SPA	SPA	HME	Granulación húmeda	HME	NR	NR	SPA	SPA
Matriz polimérica	PEG	PVP	HPMC	HPMC	HPMC	HPC/HPMC	HPMC	HPMC AS	PVP	PEG6000	HPC	HPMC	NR	HPMC	HPMC	PVP	HPMC AS	HPMC AS	HPMCP	HPMC	HPMC	HPMC	HPMC AS	NR	HPMC	HPMC	HPMC
Clase según BCS	IV	II	II	II	II	II	II	II	IV	II	III	IV	IV	III	IV	IV	III	IV	IV	II IV	II	II	II	II	NR	NR	NR
Fármaco	Griseofluvina	Nabilona	Itraconazol	Tacrolimus	Troglitazona	Clorhidrato de verapamilo	Rovastatina	Duloxetina	Lopinavir/ritonavir	Fenofibrato	Vidagliptina	Etravirina	Tolvaptan	Everolimus	Itraconazole	Ritonavir	Telaprevir	Vemurafenib	Itraconazol	Ivacaflor	Posconazol	Tacrolimus	Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir	Nimesulida	Nivaldipina	Everolimus	Etravirina
Nombre comercial	Gris-peg	Cesamet®	Sporanox(R)	Progrf	Rezulin®	Isoptin SR ^(R)	Crestor	Cymbalta	Kaletra	Fenoglide	Eucreas	Intelence	Samsca	Certican	Onmel	Novir	Incivek	Zelboraf®	Lozanoc	Kalydeco	Noxafil	Advagraf	$Viekira^{TM}$	Mesulid fast	Nivadil	Zortress	Incelence

Tabla 3.2: Medicamentos aprobados que emplean la tecnología de dispersión sólida.

3.2. Metodología

3.2.1. Preparación de dispersiones sólidas y mezclas físicas de fenbendazol y poloxamer

Las DS se prepararon mediante un método de fusión a baja temperatura, fundiendo el polímero en baño de agua a temperatura constante de 65 °C y luego dispersando el fenbendazol (FBZ) con agitación continua en el polímero fundido. Posteriormente, las muestras se enfriaron y, una vez solidificadas, se molieron en mortero. El tamaño de partícula deseado fue obtenido por tamizado (malla número 70), de modo de seleccionar las partículas de tamaño menor a 212 μ m. Se prepararon un total de ocho lotes de 10 g de DS de FBZ, variando el tipo de polímero empleado, poloxamer 188 (P188) o poloxamer 407 (P407), y su proporción; la composición de las preparaciones se detalla en la tabla 3.3. Las DS obtenidas se almacenaron en viales con tapa de rosca a una temperatura de 4 °C.

Por otra parte, se prepararon mezclas físicas (MF) control para comparar las DS con la mezcla simple de sus componentes. Las MF se prepararon mezclando en mortero la cantidad apropiada de fármaco y polímero previamente pulverizado y tamizado a un tamaño de partícula máximo de 250 μ m (la composición de las preparaciones se detalla en la tabla 3.3).

Dispersión	Mezcla	FBZ	P188	Dispersión	Mezcla	FBZ	P407
sólida	Física	% (p/p)	% (p/p)	sólida	Física	% (p/p)	% (p/p)
DS11	MF11	5	95	DS21	MF21	5	95
DS12	MF12	10	90	DS22	MF22	10	90
DS13	MF13	25	75	DS23	MF23	25	75
DS14	MF14	50	50	DS24	MF24	50	50

 Tabla 3.3:
 Composición de las dispersiones sólidas y mezclas físicas de fenbendazol

 preparadas

DS: dispersión sólida; MF: mezcla física; FBZ: fenbendazol; P188: poloxamer 188; P407: poloxamer 407

3.2.2. Caracterización de las preparaciones

3.2.2.1. Estudio de solubilidad de fenbendazol

Para determinar la cantidad de FBZ a ensayar en los estudios de disolución, se determinó su solubilidad a la temperatura y pH en las cuales se estudiaría luego su disolución *in vitro*. Con este fin, se añadieron cantidades de fármaco en exceso a 5 mL de HCl 0.1 N en tubos herméticos, por triplicado, y se mantuvieron en baño termostatizado (Vicking Dubnoff, Argentina) a 37 °C. A las 48 h, se extrajo 1 mL de suspensión, se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 μ m y se cuantificó FBZ mediante espectrofotometría UV-visible (Thermo Evolution 300). Las mediciones se realizaron a 298.5 nm (máximo de absorción de FBZ), luego de constatar que los polímeros no absorben a dicha longitud de onda. La curva de calibración de FBZ siguió linealidad en el rango de concentración de 1.6 a 10.0 μ g/mL, con un R^2 de 0.995 y con límite de cuantificación (LOQ) para FBZ de 0.23 μ g/mL.

3.2.2.2. Ensayos de disolución *in vitro*: evaluación del desempeño de las preparaciones

Los estudios de disolución *in vitro* de FBZ sin formular, las DS y las MF se realizaron por triplicado, ensayando una cantidad de muestra equivalente a 5 mg de FBZ, para asegurar condiciones *sink*, en 900 mL de HCl 0.1 N, a 37.0 °C. Se empleó un aparato de disolución USP 2 (SR6 SR11-6-Flask Dissolution Test Station, Hanson Research), adaptado con filtros de 0.45 μ m para el muestreo, seteado a una velocidad de rotación de paleta de 50 rpm. Las muestras filtradas se recogieron a los 3, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos, y se ensayaron para determinar el contenido de FBZ mediante espectrofotometría UV-visible a 289.5 nm.

Para comparar estadísticamente los perfiles obtenidos de concentración en función del tiempo se estimaron los factores de diferencia (f1) y similitud (f2) de acuerdo a lo recomendado en la guía de Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata de la FDA (1997). Los factores mencionados se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 3.1 y 3.2, donde R_i y D_i son los porcentajes de fármaco disuelto de las muestras referencia y test, respectivamente, a tiempo i, y n es el número total de muestras experimentales tomadas durante el ensayo.

$$f_1 = \frac{\sum_{1}^{n} |R_i - D_i|}{\sum_{1}^{n} R_i} \times 100$$
(3.1)

$$f_2 = 50 \times \log\left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^{n} \left(R_i - D_i\right)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$
(3.2)

Además, se calculó la eficiencia de disolución (ED) de cada preparación a diferentes tiempos del ensayo de disolución (5, 30 y 60 minutos) según la ecuación 3.3 descrita por Khan (1975). Donde ABC_{disol} es el área bajo la curva del perfil de disolución del fármaco entre tiempo cero y el último punto del ensayo (t), y AR es el rectángulo de base t y altura 100 (ver figura 3.5). El ABC_{disol} se estimó por el método de trapecios. Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente mediante una prueba ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey, con 95 % de confianza (GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows, San Diego, California, EE. UU.).



$$DE(\%) = \frac{ABC_{\text{disol}}}{AR} \times 100 \tag{3.3}$$

Figura 3.5: Cálculo de la eficiencia de disolución. Figura adaptada de Khan (1975).

3.2.2.3. Análisis térmico

Se obtuvieron curvas de análisis termogravimétrico (TGA) y DSC de las muestras, utilizando un equipo de análisis térmico simultáneo Jupiter STA 449 (Netzch, Alemania). Se colocaron alrededor de 5 mg de muestra en crisoles de aluminio sellados con tapas perforadas. Las mediciones se realizaron desde 27 °C hasta 500 °C, con velocidad de calentamiento de 10 °C/min y flujo constante de nitrógeno de 70 mL/min. Estos estudios fueron realizados en la Universidad Federal do Ceará (Fortaleza, Brasil) a cargo del Prof. Dr. Alejandro Ayala.

3.2.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Las muestras se montaron en discos de KBr y se colectaron los espectros IR en el rango de 500 a 4000 cm^{-1} , a una resolución de 2 cm^{-1} , empleando un espectrómetro FT-IR Prestige 21 (Shimadzu, Japón).

3.2.2.5. Difracción de rayos x de polvo

Los estudios de XRPD se realizaron usando un difractómetro Rigaku Ultima IV, operando en geometría Bragg-Brentano, utilizando radiación de CuK α . Las muestras se midieron en el rango de 2-theta(0) = 4.00 - 60.00, en pasos de $0.02 \,^{o}$ y con un tiempo de integración de 10 segundos por paso. Además, con el fin de estimar cambios en la cristalinidad del fármaco y el portador, se llevaron a cabo estudios de XRPD con óxido de itrio (Y_2O_3) como estándar interno. Para ello, se procedió mezclando en mortero las diferentes muestras (FBZ puro, P407 puro, DS22 y MF22) con un 20 % en peso de Y_2O_3 y, posteriormente, se colectaron los difractogramas de XRPD correspondientes.

En los difractogramas de los estudios conteniendo Y_2O_3 , cada pico de difracción de FBZ y P407 fue normalizado en relación al estándar interno, dividiendo el área de cada señal entre el área de la señal de estándar. De este modo, se pudo comparar las señales principales de FBZ y P407 en la DS con las correspondientes en la MF y calcular la cristalinidad del fármaco y el polímero después del proceso de DS, considerando la cristalinidad de los componentes en la MF como el estado inicial (100 % cristalino).

3.2.2.6. Microscopía Raman confocal

Los experimentos de microscopía Raman confocal (MRC) se realizaron con un microscopio Raman confocal Alpha 300-RA (WITec Microscopy, Alemania). La longitud de onda del láser de excitación fue de 532 nm y la potencia se ajustó a 45 mW para evitar la descomposición de las muestras. El espectrómetro empleado opera con una red de difracción de 600 líneas/mm que permitió obtener una resolución de aproximadamente 4 cm^{-1} en el rango de 70 a 4000 cm^{-1} .

Se colectaron, por un lado, espectros Raman de los componentes puros de las preparaciones y, por otro, conjuntos de datos espectrales de las muestras de DS y MF para la reconstrucción de imágenes Raman hiperespectrales. Los datos espectrales para imágenes se colectaron en un área de 20 μ m x 20 μ m, divididas en un total de 22,500 pixeles, donde en cada uno se colectó el espectro Raman con un tiempo de integración de 0.053 segundos; de este modo, las imágenes se obtuvieron trabajando en el límite óptico de resolución de 300 nm.

Los conjuntos de datos para la construcción de las imágenes Raman fueron procesados de diferentes formas. En primer lugar, se obtuvieron imágenes Raman mediante el uso de filtros aplicados sobre las señales características y predominantes en cada componente (fármaco o polímero) a los cuales se les asignó un color. Este procesamiento permitió obtener imágenes Raman de las áreas estudiadas donde se identifica a cada componente con un color diferente. En segundo lugar, se procesaron los conjuntos de datos a través de *scripts* desarrollados por el grupo de investigación mediante dos aproximaciones diferentes: un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis por normalización de la relación de intensidad *pico a pico*, adaptado de Karavas *et al.* (2007).

El PCA permitió describir el conjunto de datos hiperespectrales en términos de nuevas variables (no correlacionadas) que explicaran la mayor cantidad de varianza entre los datos (denominadas *componentes principales*). A partir de las nuevas componentes resultantes del análisis, es posible construir imágenes Raman mediante software. La razón del uso de esta metodología es lograr marcar las diferencias más significativas en el conjunto de espectros, logrando así una asignación química más objetiva. De este modo, es posible identificar un determinado compuesto químico sin que su asignación se limite a la selección de un pequeño conjunto de señales características. Resulta, entonces, una herramienta estadística potente que permite agrupar diferencias presentes en los espectros, que incluye desde la presencia o ausencia de señales y su posición, así como también su intensidad; logrando así un análisis más objetivo del conjunto de datos.

El análisis por normalización de la relación de intensidad *pico a pico* se realiza seleccionando una señal de interés correspondiente al polímero y otra al fármaco, para luego proceder a realizar el cociente entre la intensidad de ambas señales en cada pixel (espectro) del área seleccionada. Este procesamiento permite construir imágenes donde se mapea la intensidad (a través de la asignación de colores) con la que se presenta cada uno de los componentes de la muestra en relación al otro. De esta forma se logra compensar la posible falta de planaridad en las muestras¹, evidenciadas gracias a la confocalidad de la técnica, y así normalizar las señales Raman correspondientes a zonas enfocadas y no enfocadas. De esta forma se logra dejar de lado el efecto de falta de planaridad, enfocando el estudio a la presencia y ausencia de señales de las fases de interés.

3.2.2.7. Propiedades mecánicas de los polvos: reología de polvos, compresibilidad y flujo

Para evaluar la compresibilidad de los polvos obtenidos, se estimó, por un lado, la densidad a granel (Dg) de las formulaciones, colocando la muestra pulverizada suavemente en el interior de una probeta para determinar el peso y el volumen que ocupara el polvo. De este modo, se calculó la Dg como el cociente entre el peso del polvo y el volumen ocupado. Por otra parte, se evaluó la densidad empaquetada (De), sometiendo la probeta con el polvo (de la medición de Dg) a una serie de golpes verticales suaves, hasta que el volumen final ocupado por el polvo no presentara variaciones. La De se calculó como el cociente entre el peso del polvo y el volumen ocupado después de los impactos.

A partir de los datos de densidad, obtenidos por triplicado, se determinó para cada muestra índice de Carr o índice de compresibilidad (IC) según la ecuación 3.4 y el índice de Hausner (IH) según la ecuación 3.5.

$$IC = \frac{(De - Dg)}{De} \times 100 \tag{3.4}$$

$$IH = \frac{De}{Dg} \tag{3.5}$$

Además, se estimó el ángulo de reposo estático de las muestras, definido como el ángulo máximo con que un montículo de material pulverulento se mantiene estable sin que se produzcan deslizamientos de material. Para estimar el ángulo de reposo, se deja caer una masa de polvo libremente, sobre una base de radio (r) conocido, a través del orificio de un embudo ubicado a una altura definida, y se calcula el ángulo de reposo según la ecuación 3.6. El valor obtenido del ángulo de reposo de las muestras corresponde al promedio de tres

¹Por planaridad de las muestras, se hace referencia a las diferencias en altura presentes en las superficies irregulares estudiadas. Para un mismo componente, las diferencias en la altura a la cual se colectan los espectros se traducen en diferencias en la intensidad de los espectros colectados, afectando por igual a todas las señales.

mediciones.

$$\theta = \arctan \tan h/R \tag{3.6}$$

3.2.2.8. Microscopía de barrido electrónico

Para evaluar la morfología, tamaño y forma de partícula de las muestras, se examinaron mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) con un equipo ZEISS (Sigma, Alemania). Las muestras se montaron en cinta adhesiva conductora y se metalizaron con Au antes del análisis. Este estudio fue realizado en el *Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por rayos* x perteneciente a la Facultad de Matemática, Astronomía y Física de la Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina).

3.3. Resultados

Se obtuvieron un total de cuatro DS de FBZ y P188, y cuatro de FBZ y P407, variando la cantidad de polímero empleado. Se prepararon además las respectivas MF, equivalentes en composición a cada una de las DS pero sin someterlas al proceso de dispersión por fusión.

El estudio de las preparaciones implicó una primera etapa de evaluación de la liberación del fármaco *in vitro*, seguida de la caracterización químicoestructural de las preparaciones. A continuación, se describen los resultados obtenidos de mayor relevancia para la discusión de este trabajo.

3.3.1. Estudios de solubilidad y disolución in vitro

La solubilidad de FBZ en HCl 0.1 N a 37 °C (condiciones de los estudios de disolución *in vitro*) fue de 31.3 mg/L a las 48 h de ensayo. A partir de este resultado, se definió emplear una cantidad de DS o MF equivalente a 5 mg de FBZ en los ensayos de disolución *in vitro*, para asegurar condiciones $sink^1$.



Figura 3.6: Perfil de disolución de las diferentes preparaciones conteniendo poloxamer 188. DS: dispersión sólida; MF: mezcla física; FBZ: fenbendazol

Los perfiles de disolución de FBZ puro y FBZ liberado de las DS y MF se muestran en las figuras 3.6 y 3.7, para las formulaciones conteniendo P188 y

¹Las condiciones sink se garantizan cuando el volumen del medio de disolución es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para obtener una solución saturada de fármaco.



Figura 3.7: Perfil de disolución de las diferentes preparaciones conteniendo poloxamer 407. DS: dispersión sólida; MF: mezcla física; FBZ: fenbendazol

P407, respectivamente. Todas las DS mostraron velocidades de disolución de FBZ mejoradas en comparación con las respectivas MF, alcanzándose mayores porcentajes de fármaco disuelto desde los sistemas de DS a todos los tiempos ensayados. A modo de ejemplo, la tabla 3.4 muestra los porcentajes de fármaco disuelto durante los primeros 15 minutos de ensayo, para todas las preparaciones estudiadas. La cantidad de fenbendazol disuelto a los 15 minutos de ensayo cuando se ensaya el activo sin formular no fue cuantificable.

Dispersión	% FBZ disuelto	Mezcla	% FBZ disuelto
sólida	$(media \pm SD)$	física	$(media \pm SD)$
DS11	74.8 ± 3.2	MF11	41.9 ± 1.4
DS12	68.4 ± 1.2	MF12	38.1 ± 3.1
DS13	72.4 ± 0.8	MF13	39.4 ± 1.5
DS14	71.9 ± 1.4	MF14	44.4 ± 1.4
DS21	78.4 ± 2.4	MF21	44.7 ± 1.4
DS22	69.7 ± 3.0	MF22	37.2 ± 1.2
DS23	70.5 ± 2.9	MF23	35.0 ± 0.5
DS24	73.9 ± 0.1	MF24	37.1 ± 3.2

Tabla 3.4: Porcentaje de fenbendazol disuelto durante los primeros 15 minutos del ensayo de disolución *in vitro*, expresado como media \pm desvío estándar.

Al comparar estadísticamente los perfiles de disolución de cada DS con su MF correspondiente, a través de la estimación de los factores f1 y f2, los resultados muestran que las curvas de DS y MF de igual composición no son similares —dos o más perfiles de disolución son similares cuando los valores de f1 son menores a 15 y los valores de f2 son mayores a 50—. En la tabla 3.5 se resumen los resultados obtenidos de los factores mencionados para cada preparación. Por otra parte, los perfiles de disolución de todas las DS fueron similares entre sí, a excepción del par DS14-DS24, lo que indica que los diferentes portadores y la proporción fármaco/portador no afecta de forma diferencial la liberación de FBZ.

Otro parámetro estimado para las preparaciones fue su ED a diferentes tiempos del ensayo. La tabla 3.6 resume los resultados obtenidos a 5, 30 y 60 minutos para todas las DS y MF, y para FBZ sin formular. Se observa que todas las DS presentan una ED significativamente superior a la de sus respectivas MF (p < 0.05).

Tabla 3.5: Comparación de los perfiles de disolución utilizando el factor de diferencia (f1) y el factor de similitud (f2).

Ref.	Test	f1	f2
DS11	MF11	39.05	26.48
DS12	MF12	36.78	29.7
DS13	MF13	37.68	27.8
DS14	MF14	34.11	35.36
DS21	MF21	37.73	26.56
DS22	MF22	39.84	27.2
DS23	MF23	42.55	25.96
DS24	MF24	43.04	24.66
DS11	DS21	7.89	60.43
DS12	DS22	7.02	58.73
DS13	DS23	5.19	69.71
DS14	DS24	10.73	49.05
DS11	DS12	10.36	56.16
DS12	DS13	3.79	72.04
DS13	DS14	6.32	58.92
DS21	DS22	9.23	56.9
DS22	DS23	3.76	72.16
DS23	DS24	7.62	56.36

Ref.: formulación considerada como referencia; Test: formulación considerada como test; f1: porcentaje de diferencia entre dos curvas; f2: porcentaje de similitud entre dos curvas. Valores de f1 entre 0-15 y de f2 entre 50-100 aseguran la similitud o equivalencia entre las curvas test y referencia. Los pares de muestras sombreados corresponden a pares de curvas que no pueden considerarse similares entre sí, según los indicadores calculados.

	Eficiencia de disolución (%)							
Muestra	60 min	\mathbf{SD}	30 min	\mathbf{SD}	5 min	\mathbf{SD}		
FBZ	0.6	0.4	0	0	0	0		
$\mathbf{DS11}$	77.9	2.9	66.6	3	28.1	2.4		
MF11	46.7	1.2	37.2	1.1	13.5	0.3		
DS12	70.4	1.5	59.7	1.1	22.7	1.1		
MF12	43.3	2.8	34.4	2.4	13.2	0.7		
DS13	75.6	2	65.4	1.1	31	2.5		
MF13	46.4	2.4	36.1	1.7	14.3	0.6		
DS14	73.3	1.4	61.5	1.5	18.7	8.5		
$\mathbf{MF14}$	51.5	3	39.4	1.6	11.5	1.5		
DS21	79.7	3.4	70.3	3.1	34.8	4.8		
MF21	49.3	1.1	39.9	1.1	16.3	0.8		
DS22	72.3	2.2	63.3	2.8	31.7	2.8		
MF22	41.8	0.7	34.8	0.8	18.9	0.3		
DS23	71.9	2.4	62.1	2.7	27.4	1.6		
MF23	40.2	1.3	32.3	0.9	14.8	0.9		
DS24	74.2	1.6	66.7	1.6	37	1		
MF24	42.2	2.3	34.1	2.1	17.4	5.8		

Tabla 3.6: Eficiencia de disolución de las preparaciones a diferentes tiempos del ensayo de disolución *in vitro*.

Valores expresados como media y desvío estándar (SD)

3.3.2. Espectroscopía FT-IR y análisis de difracción de rayos x de polvo

Las señales infrarrojas más relevantes correspondientes a FBZ (3336; 1630; 742; 685 cm^{-1}) y P188 o P407 (2881; 1281; 1117 cm^{-1}) se resumen en la tabla 3.7, junto con las señales más relavantes de una de las muestras de DS estudiadas (DS23). En las figuras 3.8 y 3.9, se observa que las señales espectrales más características de las sustancias puras permanecen inalteradas en las DS presentadas (DS13 y DS23, respectivamente). Asimismo, no se observan señales nuevas en los espectros IR de las dispersiones —que no pertenezcan a alguno de sus componentes puros—. Todo lo anterior sugiere que los componentes no reaccionan químicamente entre sí.

Por otra parte, los resultados de XRPD muestran que las señales asignadas a cada componente puro (FBZ: 2theta($^{\circ}$) = 6.68, 11.16, 13.36; P407: 2theta ($^{\circ}$) = 19.18, 23.36), tanto para la muestra seleccionada (SD22) como para la MF correspondiente, no sufren cambios respecto a los espectros colectados de las sustancias puras (ver figura 3.10). Estos resultados demuestran que el proceso de dispersión no altera la cristalinidad de FBZ cuando se lo incorpora a la


Figura 3.8: Estudios de espectroscopía FT-IR de poloxamer 407, fenbendazol y su dispersión sólida conteniendo 75 % de poloxamer 407 (DS23). Se observan en el espectro de la dispersión sólida las señales características de cada uno de los componentes puros, a la vez que no es posible detectar señales nuevas.



Figura 3.9: Estudios de espectroscopía FT-IR de poloxamer 188, fenbendazol y su dispersión sólida conteniendo 75 % de poloxamer 188 (DS13). Se observan en el espectro de la dispersión sólida las señales características de cada uno de los componentes puros, a la vez que no es posible detectar señales nuevas.

matriz de P407; sin embargo, se pudo detectar ligeros cambios en las señales

	Señales del espectro IR (cm)		
Grupo funcional	\mathbf{FBZ}	P407	DS23
-N-H amida	3336.12	-	3345.89
-C=O	1630.31	-	1635.48
Fenilo	742.28	-	732.09
Fenilo-S	685.11	-	689.83
-C-O	1268.24	1281.52	1276.24
-C-N	1443.55	-	1455.86
-CH3	-	2881.43	2886.71
-C-O-C	-	1117.75	1112.46

Tabla 3.7: Señales infrarrojas caracterísiticas de los componentes. Grupos funcionales asignados a sus respectivas señales del espectro IR de los componentes puros y la DS23

FBZ: fenbendazol; P407: poloxamer 407; DS23: dispersión sólida conteniendo 75 % p/p de poloxamer 407

correspondientes a la cristalinidad del polímero.

Para estimar las fracciones cristalinas del polímero y el fármaco en las diferentes preparaciones se realizaron estudios de XRPD con estándar interno $(Y_2O_3 \ 100\% \ cristalino, señales principales \ 2theta(^{o}) = 29.45; \ 34.05; \ 48.57)$. Con este fin, fueron seleccionadas las señales de difracción características de FBZ, polímero y estándar interno que no se superpusieran apreciablemente, como se observa en los difractogramas de la figura 3.10 (a). Los resultados, que pueden verse en la figura 3.10 (b), no muestran diferencias en la estructura ni en la fracción cristalina de FBZ cuando se incorporó en la DS22 o la MF22. Sin embargo, se comprobó una reducción de la cristalinidad de alrededor de un 30% para el P407 en la DS22, cuando se lo compara con la MF22 (ver tabla 3.8). Este resultado sugiere que el procedimiento de dispersión sólida afectó el orden cristalino del componente polimérico sin modificar el del fármaco.

 Tabla 3.8: Comparación de la fracción cristalina de los componentes de una dispersión sólida y su mezcla física análoga.

I	Fenbendazol	Poloxamer 407		
Señal (°)	Fracción cristalina ($\%$)	Señal (°)	Fracción cristalina ($\%$)	
6,60	117,0	19,30	68,3	
11,20	96,2	23,20	73,8	
$13,\!40$	94,9	_	-	
Media \pm SD	$102,7 \pm 11,2$	Media \pm SD	$71,0 \pm 3,7$	

Se compara el porcentaje de cristalinidad que presentan el activo y el polímero en la DS22 respecto a la MF22 (muestras conteniendo 90 % de P407). La cristalinidad de los componentes en la mezcla física se considera como 100 %



Figura 3.10: Estudio de difracción de rayos x de polvo con Y_2O_3 como estándar interno (a); ampliación de la zona de señales características de fenbendazol (b). FBZ: fenbendazol; DS22: dispersión sólida con 90 % p/p poloxamer 407; MF22: mezcla física con 90 % p/p de poloxamer 407; P407: poloxamer 407.

3.3.3. Análisis térmico

Las figuras 3.11 y 3.12 muestran los termogramas obtenidos de los estudios de DSC y TGA, respectivamente, para: FBZ, dos de las dispersiones estudiadas (75 y 95% p/p de P407) y las MF correspondientes. Los resultados indican

que el FBZ funde con descomposición a partir de los 210 °C, por lo que no es posible realizar observaciones en relación a las entalpías de fusión del activo.



Figura 3.11: Termogramas de los experimentos de calorimetría diferencial de barrido para fenbendazol puro (FBZ), poloxamer 407 puro (P407), DS22 y MF22 (dispersión sólida y mezcla física conteniendo 90 % p/p de poloxamer 407), y DS23 y MF23 (dispersión sólida y mezcla física conteniendo 75 % p/p de poloxamer 407).

En relación a la matriz empleada, los resultados de DSC confirman la reducción de la cristalinidad observada en los experimentos de XRPD para el P407 de la muestra de DS22. Estos ensayos permitieron estimar que la endoterma de fusión del polímero —con máximo aproximadamente a los 58.8 °C muestra una reducción de alrededor de un 10% en términos de entalpía de fusión (ΔH_{fus}) cuando se trata de la DS22 respecto a la MF22 (figura 3.11).



Figura 3.12: Termogramas de los experimentos de análisis térmico para fenbendazol puro (FBZ), poloxamer 407 puro (P407), DS22 y MF22 (dispersión sólida y mezcla física conteniendo 90 % p/p de poloxamer 407), y DS23 y MF23 (dispersión sólida y mezcla física conteniendo 75 % p/p de poloxamer 407).

3.3.4. Microscopía Raman confocal

En primer lugar, se identificó la presencia de señales características del fármaco y las matrices poliméricas, a través de la colección de los espectros Raman de los diferentes componentes puros (ver figura 3.13). En el espectro de FBZ se observa un grupo de señales características entre 1500 y 1750 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento del doble enlace carbono-oxígeno del carbonilo de la molécula y a diferentes modos vibracionales del fenilo y el anillo benzimidazol.

En cuanto a los polímeros, ambos presentan una señal de gran intensidad entre 2900 y 3100 (cm^{-1}) correspondiente a la superposición de distintas vibraciones de tipo estiramiento de los enlaces simples carbono-hidrógeno, abundantes en ambos poloxameres; si bien esta señal no es única de la matriz, su intensidad en el espectro de FBZ es notablemente menor. Adicionalmente, puede encontrarse, alrededor de 860 cm^{-1} , otro grupo de señales característico de los polímeros, correspondiente a vibraciones de tipo torsión en los segmentos propileno de la molécula.

El procedimiento de colección de datos para la obtención de imágenes Ra-

man se realizó en las muestras DS22 y MF22 (90 % p/p P407). La figura 3.14 muestra, como ejemplo, la imagen óptica de la muestra DS22 junto a la imagen Raman reconstruida a partir de los datos colectados. La reconstrucción de la imagen Raman mostrada se realizó mediante la aplicación de filtros a las señales características de los diferentes componentes, empleando el software Project FOUR© versión 4.1 (WITec GmbH, Alemania).



Figura 3.13: Espectros Raman de poloxamer 407 (P407) y fenbendazol (FBZ).



Figura 3.14: Imagen óptica e imágen Raman de una muestra de dispersión sólida. A la izquierda: imagen óptica de la muestra de SD22 (dispersión sólida conteniendo 90 % de P407); el recuadro rojo muestra el área donde se colectaron los espectros Raman para construir la imagen de la derecha. A la derecha: imagen obtenida mediante microscopía Raman confocal mediante la aplicación de filtros en las señales características de los diferentes componentes; se muestran en rojo las zonas donde predomina el espectro de fenbendazol y en verde el de poloxamer 407.

3.3.4.1. Normalización de los datos a través de cociente de intensidad de señales

Los datos adquiridos se procesaron calculando la relación de intensidad de señales características de cada compuesto (1591 cm^{-1} para FBZ y 866 cm^{-1} para P407) para cada uno de los espectros. De este modo, se calculó el cociente de intensidades I_{1591}/I_{866} en cada pixel de las muestras, obteniéndose un mapeo de la relación fármaco/polímero, donde el gradiente de colores corresponde a la magnitud del cociente (ver figura 3.15). Además, en esta figura se muestra en forma de histograma la distribución de la frecuencia con que aparecen los diferentes cocientes de intensidad calculados para relación de señales.

En la figura 3.15A se muestra la imagen obtenida por cociente de intensidades para la DS. Al comparar esta imagen con la obtenida de igual forma para la MF correspondiente (figura 3.15B) se observa que la DS presenta una distribución de FBZ más uniforme. Además, los histogramas correspondientes, que muestran la distribución y frecuencia de los cocientes calculados, se correlacionan con la información proporcionada por las imágenes. De hecho, el histograma correspondiente a la DS muestra una distribución menos discreta y más homogénea de los diferentes cocientes respecto a la observada para la MF, donde se observan solo algunas barras de cocientes y valores de densidad altos en comparación con la DS. Esta diferencia indica que la imagen de la DS está formada por píxeles con una amplia gama de combinaciones de cocientes FBZ/P407, a diferencia de la imagen de la MF, formada por píxeles donde predomina solo uno de los dos espectros.

3.3.4.2. Análisis de componentes principales

En PCA realizado confirma los resultados descriptos anteriormente: la DS presentó una mejor distribución del fármaco dentro de la matriz polimérica en comparación con la MF. El análisis realizado y las imágenes correspondientes se encuentran recogidas en el apéndice 1.



Figura 3.15: Imágenes de microscopía Raman confocal normalizadas. A) DS22; B) MF22. A la izquierda, imágenes obtenidas por normalización por intensidad de señales I1591 / I866; a la derecha, histogramas correspondientes con la distribución y frecuencia de los cocientes de intensidades.

3.3.5. Caracterización reológica de los polvos

Los resultados de las medidas de ángulo de reposo, y los índices de Carr y Hausner de las formulaciones se muestran en la tabla 3.9. En comparación con FBZ, todas las preparaciones mostraron propiedades reológicas mejoradas. Para el caso de las MF, el ángulo de reposo aumenta a medida que se incrementa la proporción de FBZ, no así para las DS.

Los resultados obtenidos se correlacionan con lo observado a través de MRC, ya que, al encontrarse rodeadas de polímero, las partículas de fármaco adquieren propiedades de flujo análogas al material polimérico. Además, las DS mostraron tener excelentes propiedades de flujo, de acuerdo a la clasificación de la farmacopea norteamericana (Pharmacopeia, 2022).

	ÍNDICE	DE CARR	ÍNDICE DE	HAUSNER	ÁNGUL	D DE REPOSO
	Media	\mathbf{SD}	Media	\mathbf{SD}	Media	\mathbf{SD}
P188	19.84	2.75	1.25	0.04	20.78	1.8
MF11	22.58	4.72	1.29	0.08	25.61	2.07
P407	29.81	2.68	1.43	0.05	19.48	2.7
DS11	27.7	0.37	1.38	0.01	27.36	1.19
DS24	26.8	1.53	1.37	0.03	22.05	1.47
DS12	31.17	3.76	1.46	0.08	24.67	0.97
DS13	31.36	2.97	1.46	0.06	26.41	1.72
DS14	26.96	6.55	1.38	0.12	25.83	0.64
DS21	27.69	1.53	1.38	0.03	22.72	2.6
MF21	25.93	0	1.35	0	21.19	3.48
DS22	28.36	0.79	1.4	0.02	22.26	4.12
MF12	29.66	1.32	1.42	0.03	32.96	1.33
MF22	29.95	1.28	1.43	0.03	31.53	4.05
DS23	32.21	0.48	1.48	0.01	33.62	4.34
MF13	36.27	8.72	1.59	0.22	43.83	1.04
MF23	42.12	6.38	1.74	0.2	35.11	8.01
MF14	32.39	6.61	1.49	0.15	48.76	1.78
MF24	46.4	4.42	1.87	0.15	46.57	2.04
\mathbf{FBZ}	48.8	3.14	1.96	0.12	47.4	1

Tabla 3.9: Indicadores de la reología de los polvos

Escala de colores según el tipo de flujo Sin color: excelente Bueno Razonable/pasable Pobre Muy pobre

Muy muy pobre

3.3.6. Microscopía electrónica de barrido

La imagen SEM de de FBZ sin formular muestra partículas de sólido con forma aplanadas y cristalinas, con una distribución de tamaño de entre 5 y 20 μ m y superficie rugosa (figura 3.16 a). Las micrografías electrónicas del polímero de partida muestran partículas esféricas de superficie lisa con tamaños entre los 200 y los 500 μ m (figura 3.16 b). En la (figura 3.17) puede verse la imagen SEM de la DS14, conteniendo iguales proporciones de fármaco y polímero, donde se observan paertículas de aspecto más redondeado y homogéneo, en comparación a las de su MF análoga en composición (MF14, figura 3.18). Las partículas de MF se presentaron con aspecto acicular y plano.



Figura 3.16: Microscopía electrónica de barrido de fenbedazol y poloxamer 188 puros. a. fenbendazol, 2.34KX; b. poloxamer 188, 24X.



Figura 3.17: Microscopía electrónica de barrido de la muestra SD14 conteniendo partes iguales de fenbedazol y poloxamer 188. Magnificaciones: a. 104X; b. 162X; c. 880X.

3.4. Discusión

En términos generales, los resultados obtenidos apuntan a que la estrategia de dispersar FBZ en P188 o P407 es válida para mejorar su velocidad de disolución *in vitro*. En condiciones *sink*, los resultados de FBZ liberado a los 15 minutos de ensayo desde las DS duplican las cantidades disueltas desde las



Figura 3.18: Microscopía electrónica de barrido de la muestra de mezcla física MF14 conteniendo partes iguales de fenbedazol y poloxamer 188. Magnificaciones: a. 258X; b. 745X.

MF correspondientes. Esta comparación permite descartar que la mejora en la velocidad de disolución de FBZ se deba solamente al efecto surfactante de los polímeros empleados. A su vez, comparando los resultados de disolución de FBZ puro contra el liberado desde las MF, es posible constatar el efecto de los polímeros disueltos en el medio de disolución. Los polímeros disueltos en el medio producen entornos fisicoquímicos que favorecen la velocidad de disolución del activo como, por ejemplo, una menor tensión superficial del medio acuoso.

Un resultado interesante a destacar es que, según los valores obtenidos de los indicadores f1 y f2, la mejora en la velocidad de disolución del FBZ incorporado en las DS es independiente de la proporción o del tipo de polímero empleados. Esta observación es de gran relevancia para la selección y diseño de una forma farmacéutica final, donde la relación fármaco/polímero juega un rol determinante. También, a raíz de esta observación, surge la interrogante de cuál es la cantidad mínima de poloxamer que permite mantener perfiles de disolución mejorados, iguales a los obtenidos con las proporciones estudiadas. Para responder esta cuestión sería necesaria la planificación de nuevos experimentos disminuyendo aún más la cantidad de polímero en las preparaciones.

Las velocidades de disolución mejoradas para el FBZ liberado desde las DS

se acompañan, además, de resultados de ED también mejores, con valores de entre un 20 y 30 % mayores respecto a las MF. La absorción de un fármaco es proporcional a la concentración y al tiempo que éste permanece disuelto en una región adecuada del tracto gastrointestinal, variables que son consideradas en el cálculo de la ED. En este sentido, Khan (1975) propone que la ED es un buen indicador de la biodisponibilidad oral de fármacos, por lo que los resultados obtenidos para las DS resultan muy promisorios. Teniendo en cuenta, además, que existen numerosos reportes que asocian una mejora de la biodisponibilidad de los benzimidazoles metilcarbamatos con un aumento de su eficacia (Pensel *et al.*, 2015; Pensel *et al.*, 2018), correspondería estudiar si la mejora obtenida *in vitro* se traduce, efectivamente, en una mejora en la absorción del fármaco in vivo, como sugieren los estimadores de ED, y si esto, además, conduce o no a una eficacia mejorada.

En una colaboración con investigadores de la Universidad Nacional de Salta (UNS, Salta, Argentina), los resultados de disolución del FBZ liberado desde las DS y las MF se modelaron matemáticamente (Melian *et al.*, 2021). El modelo utilizado, llamado modelo de Lumped, permitió comprender y predecir el comportamiento de las DS, y calcular parámetros de relevancia como la tasa de liberación inicial y el tiempo medio de disolución. La publicación que recoge la metodología y los resultados obtenidos para el modelado se encuentra anexada a este manuscrito en el apéndice 2. Las ecuaciones derivadas del modelo Lumped que se desarrollaron permitieron realizar una interpretación cuantitativa de los valores obtenidos en los ensayos de disolución, a través de la cual se confirmó que el principal factor que influye en la velocidad de liberación de FBZ es el tipo de formulación (DS o MF), independientemente del tipo de polímero utilizado y de la relación fármaco/polímero.

Existen reportes anteriores acerca del uso de poloxamer como vehículo para preparar formulaciones de albendazol (ABZ), otro fármaco perteneciente a la familia de los benzimidazoles antihelmínticos, basadas en la tecnología de DS. Puntualmente, Castro *et al.* (2010) obtienen preparaciones de ABZ y P188, para las que observan que la relación de los componentes (fármaco/vehículo) resulta un factor clave en la velocidad de disolución del fármaco. Sus estudios demuestran que las DS con menor porcentaje de P188 (50 y 75 % p/p) resultan más eficaces para aumentar la velocidad de disolución del principio activo que otras conteniendo mayores proporciones (90 y 90 % p/p).

Los autores proponen como explicación a este fenómeno que la capacidad

de los poloxameres de formar geles termorreversibles podría estar afectando la liberación del ABZ a las concentraciones más altas de polímero. Cuando las DS de poloxamer se dispersan en agua, el vehículo se hidrata muy rápidamente debido a su gran hidrofilia, lo que puede llegar a formar, en algunos casos, una capa de vehículo más concentrada, incluso gelificada, alrededor del fármaco. Sin embargo, como ya fuera mencionado, para las DS preparadas en esta Tesis, no se encontró que las proporciones de polímero exploradas afectaran de forma diferencial la liberación de FBZ.

Una posible explicación de esta diferencia de comportamiento entre ABZ y FBZ podría atribuirse a las diferencias en su solubilidad acuosa (0.01 mg/L para FBZ y 10 mg/L para abz, a 25 °C)¹. Cuando el fármaco es insoluble o muy poco soluble en la capa concentrada de polímero, será liberado de forma incambiada al medio y su perfil de disolución dependerá de sus propiedades físico-químicas (estado polimórfico, tamaño, solubilidad del fármaco) (Craig, 2002). Considerando los resultados obtenidos, es claro que la disolución de FBZ no depende de las propiedades del vehículo empleado, sino que probablemente su muy limitada solubilidad en agua sea el único factor que rige su proceso de disolución. En cambio, como ABZ presenta una mayor solubilidad en agua, su proceso de disolución desde las DS es regido por el propio proceso de disolución del vehículo en el medio, pudiendo verse retrasada la cinética de liberación del activo por las propiedades de los polímeros empleados.

En cuanto a la caracterización químico-estructural realizada, se demostró, por un lado, que no se dan reacciones químicas entre los componentes de las preparaciones que afecten su estructura química, para ninguna de las combinaciones fármaco/polímero estudiadas. Esta observación fue consistente a través de todos los análisis realizados, ya sea espectroscópicos (MRC y FT-IR) o térmicos (DSC y TGA). Por otro lado, como fuera mencionado en el apartado 3.1.1 de este capítulo, las DS pueden contener al fármaco en su forma cristalina, amorfa o disuelto (total o parcialmente) en el vehículo. Para el caso de FBZ, pudo demostrarse mediante XRPD que no existen cambios en su fracción cristalina luego del proceso de DS, por lo que las dispersiones preparadas consisten en fármaco en su estado cristalino disperso en la matriz polimérica, también cristalina. Esta observación es de gran relevancia, ya que nos indica que la mejora en la velocidad de disolución de FBZ no se debe a una disolución previa del fármaco en la matriz, ni a una transición de un estado cristalino a

¹Datos extraídos de Horvat *et al.* (2012)

uno amorfo, como ocurre en muchos casos durante este tipo de procesos.

Un aspecto positivo, relacionado a los resultados de los estudios de XRPD, es que demuestran que el FBZ se presenta en las DS en su forma cristalina más estable (único polimorfo reportado), por lo que la inestabilidad física no sería un problema a considerar para estas preparaciones. Una de las limitaciones más frecuentes durante el desarrollo de las DS se debe a la inestabilidad física de los sistemas (Leuner y Dressman, 2000), ya que las dispersiones donde el fármaco se encentra disuelto en el polímero o en su estado amorfo tienden a sufrir cambios estructurales hacia conformaciones energéticamente más estables durante el tiempo de almacenamiento.

La caracterización mediante MRC, demostró que en las muestras de DS se alcanza un grado de miscibilidad y homogeneidad de distribución de los componentes notablemente mayor a los encontrados en las MF. En las primeras, las partículas de FBZ se encuentran rodeadas de zonas donde coexisten tanto fármaco como polímero, mientras que las imágenes de las MF están compuestas por pixeles donde se encuentra únicamente uno de los dos componentes. La MRC permitió demostrar que el proceso de DS permite obtener un material particulado donde las partículas de FBZ se encuentran rodeadas de polímero, que al contacto con el medio de disolución se disuelve para dejar expuesto al fármaco. Esto le otorga al activo una mejor capacidad de humectación y, por ende, facilita el proceso de disolución.

En la extensa caracterización químico-estructural realizada, la MRC fue la única herramienta mediante la cual se pudo observar diferencias entre las DS y las MF preparadas que explicaran cómo el proceso de dispersión podría estar afectando la disolución del fármaco. En tal sentido, las diferencias en la distribución espacial de los componentes y la alta homogeneidad lograda en las dispersiones, evidenciadas por MRC, serían las razones por las cuales se afecta de forma diferencial el desempeño de disolución del activo para las DSy MF.

Por último, el estudio de reología de polvos permitió clasificar los sistemas obtenidos en términos de sus propiedades de flujo, de gran interés durante la producción de medicamentos, donde el transporte de polvos es una operación frecuente. El flujo es a menudo variable e impredecible, y las características cohesivas y adhesivas del material particulado son comúnmente causantes de dificultades (Taylor y Aulton, 2021). Estas propiedades a su vez, son influenciadas por características de la superficie de las partículas del material, como el tamaño de las partículas, su rugosidad, su forma, y la energía libre superficial (Taylor y Aulton, 2021). En este sentido, caracterizar el flujo de las DS preparadas, en una etapa temprana del desarrollo de las formulaciones, resulta fundamental para tomar decisiones durante el diseño del proceso de fabricación —por ejemplo, referidas al tipo de equipamiento a emplear—.

Debido a la importancia del flujo de polvos, se han desarrollado numerosas pruebas de laboratorio para ayudar a predecir cómo se comportará una mezcla de materiales durante la fabricación de la forma farmacéutica final. A tal efecto, fueron estimados los índices de Carr y Hausner, y el ángulo de reposo de los componentes puros y de los polvos obtenidos de DS y MF. El FBZ puro resultó ser un polvo altamente cohesivo, con propiedades de flujo que varían de *pobre* a *muy, muy pobre* según el índice evaluado. Por el contrario, el material particulado de los polímeros fue clasificado con flujo *excelente*, según los ángulos de reposo estimados, y con carácter de flujo *pasable* o *pobre* (P188 y P407, respectivamente), según los índices de Carr y Hausner. Como es de esperar, incorporar los polímeros al FBZ resulta en la mejora de sus propiedades de flujo, tanto si se trata de DS como de MF, pero existen notables diferencias entre los polvos que fueron sometidos al proceso de DS respecto a la mezcla simple de componentes.

Para las MF se observa que la disminución de la cantidad de polímero impacta en las propiedades de flujo del material particulado, tanto que las MF que contienen un 50 % de polímero se clasifican, al igual que el FBZ puro, como polvos cohesivos, con flujos entre *pobres* y *muy, muy pobres*. Sin embargo, no existen diferencias entre las categorías asignadas a las diferentes muestras de DS. Las DS con la mínima cantidad de polímero (50 % p/p) o aquellas con cantidades máximas (95 % p/p) fueron clasificadas de igual forma, independientemente también del polímero empleado (P188 o P407). Por ello, es posible afirmar que el proceso de DS colabora notablemente en la mejora de las propiedades reológicas del material, transformando los polvos de FBZ-poloxamer en mezclas menos cohesivas y con mejor flujo. Probablemente, la mejora del flujo lograda para las DS responda, al igual que la mejora en la disolución del fármaco, a su mejor homogeneidad de distribución en la matriz polimérica, evidenciada por la MRC.

3.5. Conclusiones del capítulo

Con el objetivo de mejorar la velocidad de disolución de FBZ, se prepararon diferentes DS binarias mediante el método de fusión, empleando dos tipos diferentes de poloxamer y variando su proporción. Los resultados de los ensayos de disolución *in vitro* mostraron una marcada mejora cuando el principio activo se incorporó en las DS, respecto a la mezcla de componentes sin someter al proceso de dispersión y también al activo sin formular.

Por otra parte, la caracterización de las preparaciones mediante análisis térmico, XRPD y espectroscopía FT-IR, permitió descartar que las mejoras en la velocidad de disolución del principio activo se debieran a transformaciones de su estado cristalino o cambios en la química de los componentes. Los estudios MRC, utilizada como una herramienta no destructiva para mapear cualitativamente la distribución de los componentes en las diferentes formulaciones, mostraron que las DS presentan una mayor homogeneidad en comparación a las respectivas MF.

Finalmente, todas las dispersiones preparadas presentaron propiedades de flujo mejoradas respecto al principio activo sin formular y a las mezclas simples de los componentes. Los indicadores obtenidos resultaron apropiados para realizar operaciones de manipulación de los polvos de estos sistemas a escalas mayores.

En resumen, los sistemas obtenidos permiten una adecuada liberación del principio activo, a la vez que se presentan como polvos fácilmente manipulables. Estas dos características, logradas a través del proceso de dispersión, resultan alentadoras para continuar hacia el diseño de una forma farmacéutica final que incluya las dispersiones sólidas preparadas, así como su evaluación *in vitro* e *in vivo*.

Parte de los resultados recogidos en este capítulo se encuentran publicados en el trabajo titulado *The Impact of Solid Dispersion on Formulation*, *Using Confocal Micro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of Components* (Melian *et al.*, 2018). Esta publicación puede encontrarse en el apéndice 3, al final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Bhandari, K. H., Newa, M., Kim, J. A., Yoo, B. K., Woo, J. S., Lyoo, W. S., Lim, H. T., Choi, H. G., y Yong, C. S. (2007). Preparation, characterization and evaluation of coenzyme Q10 binary solid dispersions for enhanced solubility and dissolution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 1171-1176.
- Castro, S. G., Bruni, S. S., Lanusse, C. E., Allemandi, D. A., y Palma, S. D. (2010). Improved albendazole dissolution rate in pluronic 188 solid dispersions. *Aaps Pharmscitech*, 11(4), 1518-1525.
- Chiou, W. L., y Riegelman, S. (1971). Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 60(9), 1281-1302.
- Cid, A. G., Simonazzi, A., Palma, S. D., y Bermúdez, J. M. (2019). Solid dispersion technology as a strategy to improve the bioavailability of poorly soluble drugs. *Therapeutic delivery*, 10(6), 363-382.
- Craig, D. Q. (2002). The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *International journal of pharmaceutics*, 231(2), 131-144.
- FDA, (1997). Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate-release solid oral dosage forms (August). Center for Drug Evaluation, Research, U.S. Food y Drug Administration (FDA). https://www.fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/dissolutiontesting-immediate-release-solid-oral-dosage-forms
- Huang, Y., y Dai, W.-G. (2014). Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. Acta Pharmaceutica Sinica B, 4(1), 18-25.
- Jermain, S. V., Brough, C., y Williams III, R. O. (2018). Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery-an update. *International journal of pharmaceutics*, 535(1-2), 379-392.

- Karavas, E., Georgarakis, M., Docoslis, A., y Bikiaris, D. (2007). Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. *International journal of* pharmaceutics, 340(1-2), 76-83.
- Khan, K. (1975). The concept of dissolution efficiency. *Journal of pharmacy* and pharmacology, 27(1), 48-49.
- Leuner, C., y Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50(1), 47-60.
- Mehanna, M. M., Motawaa, A. M., y Samaha, M. W. (2010). In sight into tadalafil–block copolymer binary solid dispersion: mechanistic investigation of dissolution enhancement. *International journal of pharmaceutics*, 402(1-2), 78-88.
- Melian, M. E., Briones Nieva, C. A., Domínguez, L., Gonzo, E. E., Palma, S., y Bermúdez, J. M. (2021). Dissolution profiles of fenbendazole from binary solid dispersions: a mathematical approach. *Therapeutic Delivery*, 12(8), 597-610.
- Melian, M. E., Munguía, A. B., Faccio, R., Palma, S., y Domínguez, L. (2018). The impact of solid dispersion on formulation, using confocal micro Raman spectroscopy as tool to probe distribution of components. *Journal* of Pharmaceutical Innovation, 13(1), 58-68.
- Modica De Mohac, L., Raimi-Abraham, B., Caruana, R., Gaetano, G., y Licciardi, M. (2020). Multicomponent solid dispersion a new generation of solid dispersion produced by spray-drying. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101750.
- Pandi, P., Bulusu, R., Kommineni, N., Khan, W., y Singh, M. (2020). Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products. *International journal of pharmaceutics*, 586, 119560.
- Pensel, P. E., Gamboa, G. U., Fabbri, J., Ceballos, L., Bruni, S. S., Álvarez, L. I., Allemandi, D., Benoit, J. P., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2015). Cystic echinococcosis therapy: albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta tropica, 152, 185-194.

- Pensel, P. E., Paredes, A., Albani, C. M., Allemandi, D., Bruni, S. S., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2018). Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. *Veterinary parasitology*, 251, 78-84.
- Saffoon, N., Uddin, R., Huda, N. H., y Sutradhar, K. B. (2011). Enhancement of oral bioavailability and solid dispersion: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (Issue), 13-20.
- Sekiguchi, K., y Obi, N. (1961). Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 9(11), 866-872.
- Sekiguchi, K., Obi, N., y Ueda, Y. (1964). Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 12(2), 134-144.
- Tambosi, G., Coelho, P. F., Luciano, S., Lenschow, I. C. S., Zétola, M., Stulzer, H. K., y Pezzini, B. R. (2018). Challenges to improve the biopharmacentical properties of poorly water-soluble drugs and the application of the solid dispersion technology. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23.
- Taylor, K. M., y Aulton, M. E. (2021). Aulton's Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines. Elsevier Health Sciences.
- Tong, W.-Q., Vasanthavada, M., y Serajuddin, A. (2008). Development of Solid Dispersion for Poorly Water-Soluble Drugs. En R. Liu (Ed.), Water-Insoluble Drug Formulation, Second Edition (pp. 499-529). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420009552.ch18
- Vasconcelos, T., Sarmento, B., y Costa, P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug* discovery today, 12(23-24), 1068-1075.
- Vo, C. L.-N., Park, C., y Lee, B.-J. (2013). Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 85(3), 799-813.
- Zhang, J., Han, R., Chen, W., Zhang, W., Li, Y., Ji, Y., Chen, L., Pan, H., Yang, X., Pan, W., et al., (2018). Analysis of the literature and patents on solid dispersions from 1980 to 2015. *Molecules*, 23(7), 1697.

Capítulo 4

Nanocristales redispersables de fenbendazol y de valero-fenbendazol

Este capítulo se organiza de la siguiente manera. En la sección 4.1 se presenta la producción de nanocristales como estrategia para mejorar el perfil de disolución de fármacos poco solubles en agua, se revisan los fundamentos teóricos de la temática y se recapitulan los avances científicos reportados al respecto. La sección 4.2 describe la preparación de diferentes nanocristales redispersables de fenbendazol mediante un proceso de molienda húmeda asistida por microesferas y detalla los métodos empleados para su caracterización. Además, describe la metodología seleccionada para preparar nanocristales redispersables de valero-fenbendazol —compuesto híbrido derivado de fenbendazol con potencial antihelmíntico—. En tercer lugar, sección 4.3, se presentan los resultados de la evaluación de diferentes excipientes poliméricos y su proporción en la redispersión de los nanocristales preparados, así como en el rendimiento del proceso. También en esta sección, se recogen los resultados de la caracterización de las preparaciones obtenidas con énfasis en la evaluación del tamaño de partícula alcanzado para el fármaco y su perfil de disolución in vitro. Los resultados presentados se discuten en la sección 4.4. Por último, en la sección 4.5, se presentan las conclusiones del capítulo.

4.1. Nanocristales: aspectos teóricos y estado del arte

Como fuera mencionado anteriormente, uno de los principales desafíos encontrados durante la formulación de fármacos está relacionado a la baja solubilidad acuosa de algunos compuestos y a la dificultad que esto conlleva para que se alcancen concentraciones terapéuticas en el sitio de acción, en virtud de la necesidad de disponer del fármaco disuelto para su permeación a través de las membranas biológicas. Dentro de las opciones más novedosas para enfrentar esta problemática —comentadas en el capítulo 2 de esta tesis—, el diseño de sistemas portadores de fármacos con tamaño nanométrico ha cobrado especial interés tanto a nivel académico como industrial.

Puntualmente, el auge de la nanotecnología en el ámbito farmacéutico ha dado lugar al desarrollo de diversos tipos de nanopartículas¹, entre los que se encuentran los nanocristales (NC)² (Müller *et al.*, 2011), las nanopartículas poliméricas (Begines *et al.*, 2020), las nanopartículas lipídicas (Bahari y Hamishehkar, 2016), las nanoemulsiones (Gurpreet y Singh, 2018) y los nanoliposomas (Demirci *et al.*, 2017). Entre los sistemas mencionados, los NC se presentan como una de las estrategias más prometedoras para la formulación de fármacos, especialmente cuando el desafío consiste en formular compuestos prácticamente insolubles, no solo en agua, sino también en solventes orgánicos³ (Rabinow, 2004).

En el ámbito farmacéutico, se define a los NC como partículas constituidas únicamente de fármaco cuyo tamaño se encuentra en el rango de 10 a 1000 nm (Müller *et al.*, 2011). Los NC se obtienen generalmente suspendidos en un medio acuoso en forma de nanosuspensiones (NS) que luego pueden o no someterse a un proceso de secado para producir polvos reconstituíbles (Paredes *et al.*, 2016). Adicionalmente, la formulación de NC puede incluir agentes

¹La primera definición de nanopartículas encontrada en bibliografía es de Brigger *et al.* (2002). En este trabajo los autores indican que las nanopartículas podrían ser definidas como sistemas coloidales submicrónicos (de tamaño menor a una micra), generalmente, pero no necesariamente, hechos de polímeros (biodegradables o no).

²También denominados nanopartículas cristalinas

³En general, en las nanopartículas basadas en portadores, el fármaco se encuentra disuelto total o parcialmente en el interior de una matriz o sistema de escala nanométrica. En el caso de los NC, el propio fármaco es quien posee un tamaño de partícula nanométrico. En este sentido, es posible formular como NC compuestos que son insolubles tanto en agua como en aceites ya que no es necesaria la disolución del fármaco en ningún medio durante la producción de la formulación (Rabinow, 2004).

surfactantes o estabilizantes estéricos de carácter polimérico, empleados con el fin de favorecer la reconstitución de las nanopartículas desde el estado sólido o, en el caso de las NS, mejorar su estabilidad.

4.1.1. Bases científicas

La disminución de tamaño de las partículas desde la escala micrométrica a la nanométrica produce cambios a nivel de las propiedades fisicoquímicas del material a granel. En este sentido, una de las propiedades características de los NC es su mayor velocidad de disolución, producto del área superficial aumentada. Considerando la ecuación de Noyes–Whitney 4.1, la velocidad de disolución de un sólido es función del área superficial, el grosor de la capa de difusión y su solubilidad de saturación.

$$\frac{dX}{dt} = \left(D \cdot \frac{A}{h}\right) \left(C_s - \frac{X}{V}\right) \tag{4.1}$$

Donde dX/dt es la velocidad de disolución (con unidades de $kg.m^2.s^{-1}$), X es la cantidad de sólido en solución ($kg \ o \ mol$), t es el tiempo (s), A es el área superficial efectiva (m^2), D es el coeficiente de difusión del sólido ($m.s^{-1}$), h es el grosor de la capa de difusión (m), Cs es la solubilidad de saturación del sólido ($kg.L^{-1} \ o \ mol.L^{-1}$) y V es el volumen del medio de disolución (L) (Noyes y Whitney, 1897). Al disminuir el tamaño de partícula del sólido se afectan dos parámetros fundamentales de la ecuación que rige su disolución: aumenta el área superficial total (por lo que aumenta A) y se disminuye la capa hidrodinámica que rodea las partículas (disminuyendo h) (Lu *et al.*, 2018).

Además, disminuir el tamaño de partícula de un sólido también mejora su solubilidad de saturación. Este fenómeno puede representarse a través de la ecuación de Ostwals-Freundlich (ecuación 4.2) que establece que la solubilidad de saturación de un sólido es inversamente proporcional a su radio. En esta ecuación, Cs es la solubilidad de saturación, C_{α} es la solubilidad de una partícula macrométrica, σ es la tensión interfacial, V es el volumen molar de NC $(m^3.mol^{-1})$, R es la constante de los gases, T es la temperatura (K), ρ es la densidad de la partícula $(g.m^3)$ y d_{np} es su diámetro (m) (Couillaud *et al.*, 2019). Este aumento de la solubilidad también contribuye al aumento de velocidad de disolución observado para los NC, ya que también es una de las variables que influye de forma directa en la ecuación 4.1.

$$\left(\frac{Cs}{C\alpha}\right) = \frac{4\sigma V}{2.303 \cdot RT \cdot \rho \cdot d_{np}} \tag{4.2}$$

Otra de las importantes propiedades que poseen los NC de fármacos es la fuerte adhesión a mucosas producto del área superficial aumentada y, por ende, el aumento de puntos de contacto disponibles para que tengan lugar atracciones de tipo Van der Waals con las barreras fisiológicas (Gupta, 2006; Müller *et al.*, 2011). Este fenómeno de mucoadhesión es pronunciado y reproducible, lo cual colabora también a explicar la reducción de la variabilidad interindividual e intraindividual observada tras la administración de NC por vía oral (Müller *et al.*, 2011).

En resumen, los NC de fármacos presentan al menos tres ventajas respecto a fármacos convencionales, producto de su tamaño de partícula reducido. Primero, el aumento exponencial del factor de área superficial que determina una mayor velocidad de disolución. En segundo lugar, el mayor número de moléculas disueltas disponibles para su absorción, producto del aumento de la solubilidad de saturación y, por último, una mayor adhesividad a barreras fisiológicas.

Para fármacos clasificados como clase II en el BCS — poco solubles en agua, pero con buena permeabilidad del epitelio gastrointestinal—, la disolución es el paso limitante para su absorción. En este sentido, los NC de fármaco aseguran un proceso de disolución más rápido en el tracto gastrointestinal que puede determinar una mejora de su biodisponibilidad oral. Por otra parte, el uso de polímeros tensoactivos como excipientes en las formulaciones de NC colabora con la humectación de la superficie de las nanopartículas cristalinas, contribuyendo también a aumentar su velocidad de disolución (Kesisoglou *et al.*, 2007).

4.1.2. Producción

Existen dos aproximaciones que engloban las diferentes técnicas mediante las cuales se obtienen NC de fármacos (ver figura 4.1). Por un lado, es posible producirlos mediante una precipitación controlada de las moléculas del fármaco en solución, lo que se conoce como procesos *bottom-up*. Por otro lado, es posible obtenerlos rompiendo partículas de fármaco de tamaño micrométrico mediante métodos mecánicos, que constituyen las metodologías denominadas como *topdown*.



Figura 4.1: Procedimientos empleados para la obtención de nanocristales. Las diferentes técnicas utilizadas pueden agruparse en dos grandes grupos: *top-down*, cuando implican procesos de reducción de tamaño de partícula, y *bottom-up*, cuando se parte de las moléculas en solución y se procede a crecer las estructuras cristalinas. Figura adaptada de Rawat (2015).

Existe, además, la posibilidad de combinar las tecnologías *bottom-up* y *topdown* durante la producción de este tipo de formulaciones. La combinación de tecnologías tiene, en general, las ventajas de acelerar los tiempos de procesamiento y permitir alcanzar menores tamaños de partícula finales (Salazar *et al.*, 2014; Shegokar y Müller, 2010).

4.1.2.1. Procedimientos top-down

Las técnicas de tipo top-down consisten en la aplicación de grandes cantidades de energía para disminuir el tamaño de las partículas a granel hasta la escala nanométrica a través de su desgaste mecánico. Actualmente, las preparaciones de NC disponibles en el mercado son producidas en su mayoría por molienda húmeda u homogeneización de alta presión, ambas consideradas como técnicas de este tipo (ver tabla 4.1) (J. Liu *et al.*, 2020; Mohammad *et al.*, 2019).

La molienda húmeda asistida por microesferas consiste en agitar en una cámara de molienda el fármaco y el estabilizante suspendidos en agua junto con un agente de molienda (esferas de circonio, vidrio o acero) a temperatura controlada. En la figura 4.2 se esquematiza el tipo de equipo empleado en esta tesis. El diseño básico de este tipo de molinos cuenta con una cámara de molienda, un rotor acoplado a un motor y una camisa para la circulación del refrigerante que evita el sobrecalentamiento de la muestra (Real *et al.*, 2022).



Figura 4.2: Esquema de un molino para molienda asistida por microesferas. En este tipo de molinos, la disminución de tamaño de las partículas de fármaco es producto de las fuerzas mecánicas que desgastan las partículas contenidas en la cámara.

Esta técnica presenta varias ventajas como la alta eficiencia de los procesos, su bajo costo y su flexibilidad para el escalado, por lo que actualmente es la técnica más empleada (Ghosh *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018). Sin embargo, puede resultar ineficiente para controlar el tamaño y la distribución de las partículas o presentar problemas de contaminación, derivados de los agentes de molienda (Chen *et al.*, 2020).

Es interesante notar que, luego de la etapa de reducción de tamaño, se obtiene una suspensión de NC que puede emplearse, por ejemplo, como una formulación líquida en forma de inyectable o suspensión oral, siempre que se la logre estabilizar correctamente. Otra de las opciones tecnológicas posibles, consiste en el secado de esta NS obtenida para su conversión a un polvo redispersable, siendo la técnica de secado por aspersión una de las más utilizadas con este propósito (Junyaprasert y Morakul, 2015; Paredes *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014).

El secado por aspersión (o *spray-drying*) es un procedimiento que permite la obtención de polvos a partir de muestras líquidas. Consiste en la evaporación rápida del solvente de una solución mediante su aspersión en forma de gotículas en condiciones controladas. Las gotículas formadas al asperjar la solución entran en contacto con una corriente de aire caliente que permite una evaporación rápida del solvente dando paso a la formación de una partícula sólida (Patel *et al.*, 2018). El proceso de secado por aspersión aplicado al secado de las NS se esquematiza en la figura 4.3.



Figura 4.3: Representación esquemática de un secador por aspersión. Los procesos que están involucrados en el secado de las suspensiones son: (1) atomización (formación de las gotículas), (2) secado (conversión de gota a partícula) y (3) recolección de las partículas. Imagen adaptada de Santos *et al.* (2018)

4.1.2.2. Procedimientos bottom-up

La producción de NC a través de procesos *bottom-up* consiste en el crecimiento controlado de cristales desde una solución de fármaco. Generalmente, el proceso consta de dos etapas, comenzando con una fase de nucleación producida por el agregado de un antisolvente a la solución de fármaco, seguida de una fase de crecimiento controlado de los núcleos cristalinos generados. Mediante las técnicas *bottom-up* es posible producir NC de uniformidad y calidad superior a los obtenidos mediante procedimientos *top-down*, a la vez que se consume menos energía y tiempo (Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, como fuera mencionado anteriormente, los medicamentos disponibles en el mercado están en su mayoría fabricados a partir de técnicas *top-down*.

El escaso éxito de los procesos *bottom-up* responde principalmente a dos razones que limitan su transferencia tecnológica a escala industrial. En primer lugar, el fármaco del cual se quiere obtener NC debe poder disolverse al menos en un solvente, lo que muchas veces involucra una etapa de remoción de solventes orgánicos como parte del proceso de producción (Salazar *et al.*, 2014). En segundo lugar, los procesos *bottom-up* presentan el desafío de limitar el crecimiento de los cristales al rango nanométrico a la vez que debe controlarse la fase cristalina o amorfa deseada. Para ello, es necesario lograr una fase de nucleación rápida de las partículas cristalinas, seguida de una fase de crecimiento lenta. Si bien este control ha sido logrado a través del agregado de estabilizantes —como polímeros y surfactantes, que previenen la agregación de partículas— y a través de la manipulación de parámetros fisicoquímicos —como vacío, temperatura o el uso de ultrasonido—, la producción se limita a lotes pequeños y los procesos no son fácilmente escalables (Chen *et al.*, 2020; Choi *et al.*, 2005).

4.1.2.3. Combinación de tecnologías

Existe evidencia de que partir de un tamaño de partícula menor para la producción de NC por técnicas de tipo *top-down* permite alcanzar productos más homogéneos y de menor tamaño de partícula final. En este sentido, la modificación de la morfología de las partículas de partida, por ejemplo a través de un tratamiento previo de secado por aspersión, permite obtener tamaños de partícula de NC más pequeños, en comparación con el tamaño de partícula obtenido a partir del procesamiento de fármacos micrométricos no modificados (T. Liu *et al.*, 2019).

4.1.3. Caracterización

Además de los aspectos clásicos que determinan la calidad de un polvo o suspensión convencional, las nanopartículas presentan aspectos diferenciales que deben ser adecuadamente caracterizados. Es así que, cuando se quiere caracterizar un sistema nanoparticulado, deben estudiarse parámetros de sus partículas como el tamaño, la carga superficial, la morfología, la cristalinidad y la disolución; todos ellos potencialmente modificados respecto al material a granel y determinantes para el desempeño del sistema.

4.1.3.1. Tamaño de partícula y distribución de tamaño

El tamaño de partícula y su distribución son las características que definen al material nanoparticulado y tienen impacto directo en su desempeño por afectar tanto su solubilidad como su velocidad de disolución (ver apartado 4.1.1). La mayoría de las técnicas de medida de tamaño se basan en el concepto de *medición equivalente de esfera unidimensional*, en el cual el tamaño de partícula se define como el diámetro de la esfera que presentaría las mismas propiedades que la partícula real (como masa o volumen, por ejemplo) (Malvern Instruments Worldwide, 2012).

Si bien existen diversas técnicas para realizar este tipo de mediciones, la más utilizada es la dispersión de luz dinámica (DLS), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (Lu *et al.*, 2018). Esta técnica permite determinar el diámetro de partículas en suspensión iluminando las partículas con una fuente de luz monocromática. Las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada que se producen son dependientes del tamaño de partícula: las partículas más pequeñas se desplazan más y con mayor velocidad que las de mayor tamaño. El análisis de las fluctuaciones de intensidad registradas se correlaciona con el movimiento Browniano de las partículas y permite determinar su *diámetro hidrodinámico*¹ a través de la relación de Stokes-Einstein (Malvern Instruments Worldwide, 2012).

La distribución del tamaño de partícula se evalúa a través del índice de polidispersidad (IPd), estimado como el cuadrado del cociente entre la desviación estándar y el diámetro promedio de la muestra de partículas. Las poblaciones de partículas que presentan valores de IPd entre 0.10 y 0.25 son consideradas con distribución de tamaño estrecha u homogénea, mientras que valores mayores a 0.5 indican una distribución de tamaño heterogénea (Lu *et al.*, 2018).

4.1.3.2. Morfología y cristalinidad de las partículas

Los NC pueden presentar partículas con diferente forma: cilíndricas, cúbicas, esféricas, elipsoidales o aciculares. Medidas por DLS, dos poblaciones de partículas con distinta forma pueden presentar el mismo tamaño —debido a la *medición equivalente de esfera unidimensional* comentada anteriormente—, sin embargo, podrían presentar un área superficial muy diferente, lo cual repercute directamente en su disolución (Lu *et al.*, 2018). Herramientas microscópicas como la microscopía de fuerza atómica, la microscopía de transmisión electrónica o SEM son de utilidad para conocer la forma de las partículas cristalinas producidas.

¹La medida de *diámetro hidrodinámico* que se obtiene mediante DLS refiere al diámetro total de la nanopartícula (núcleo sólido) más las estructuras superficiales que se muevan junto a ella, lo que muchas veces corresponde a la capa de polímero o electrolitos que acompañan las primeras esferas de hidratación del núcleo.

Por otra parte, estudiar la fase cristalina de los NC, así como la presencia de hidratos, polimorfos o la formación de partículas amorfas durante los procesos, resulta de gran relevancia para conocer el sistema obtenido. Además, esta información es de utilidad para predecir la estabilidad de los sistemas. En general, estos estudios se realizan mediante análisis de XRPD, DSC y TGA.

4.1.4. Aplicaciones

Desde los primeros reportes científicos en la década del 90 acerca de la producción de NC, esta tecnología ha cobrado cada vez mayor importancia. Hasta el último relevamiento publicado en 2019, se conocen más de 20 productos introducidos al mercado basados en NC (Mohammad *et al.*, 2019). La tabla 4.1 recoge la mayoría de las formulaciones comercializadas y algunas de las que se encuentran en etapas de estudio clínico; allí, puede observarse que, en su mayoría, son formulaciones empleadas para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles en agua.

Si bien los NC han tenido un marcado impacto en lo que es la administración oral de fármacos poco solubles en agua, también han demostrado ser de gran utilidad en la administración de compuestos activos por vía parenteral (Shetab Boushehri *et al.*, 2020), pulmonar (Kumar *et al.*, 2020), ocular (Sharma *et al.*, 2016) y dérmica (Patel *et al.*, 2018), contándose incluso con algunos productos en el mercado (ver tabla 4.1). Además, varios autores mencionan una clara tendencia de crecimiento en la incorporación de esta tecnología en la producción de medicamentos y predicen que, con el tiempo, habrá cada vez más productos disponibles comercialmente (Chariou *et al.*, 2020; Meena *et al.*, 2018).

Particularmente, en el campo veterinario, la nanotecnología ha presentado notables avances en materia de diagnóstico, tratamiento, vacunación, producción animal, alimentación e higiene (El-Sayed y Kamel, 2020; Youssef *et al.*, 2019). Además, particularmente en relación al uso de formulaciones basadas en NC, se ha demostrado que es un enfoque eficaz para aumentar la biodisponibilidad y la respuesta terapéutica de fármacos antihelmínticos de la familia de los benzimidazoles (Paredes, Bruni *et al.*, 2018; Paredes *et al.*, 2020; Paredes, Litterio *et al.*, 2018; Pensel *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2022).

ЧЕ ТЛИ <i>ЕК М</i> ., (∠0.10), .	NUULIAILILIAU CU UU.	(2013) y min er an., (2020)	, y actualizada.				
Uso terapéutico	Nombre comercial	Fabricante	Método de preparación	Técnica	Vía de administración	Estado	Año de aprobación
Antifúngico	Gris-Peg(R)	Novartis	Coprecipitación	Botom-up	Oral	Comercializado	1982
Antiarrítmico	Verelan PM®	Schwarz Pharma	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	1998
Inmunosupresor	$\operatorname{Rapamune}(\mathbf{R})$	Wyeth	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2000
Antisicótico	Focalin $XR(\mathbb{R})$	Novartis	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2001
Analgésico	Avinza(R)	King Pharm	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2002
Antisicótico	Ritalin $LA(\mathbf{R})$	Novartis	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2002
Antihipertensivo	Herbesser	Mitsubishi Tanabe Pharma	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2002
Relajante muscular	$\operatorname{Zanaflex} \operatorname{Capsules}^{\mathbb{T}\mathbb{M}}$	Acorda	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2002
Antiemético	$\operatorname{Emend}_{\operatorname{I\!R}}$	Merck	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2003
Hipercolesterolemia	Tricor®	Abbott	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2004
Estimulante del apetito	Megace ^(R) ES	Par Pharm. Companies	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2005
Hipercolesterolemia	$\mathrm{Triglide}^{\mathbb{TM}}$	Skye Pharma	HAP	Top-down	Oral	Comercializado	2005
Antiinflamatorio	Naprelan®	Wyeth	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2006
Broncodilatador	Theodur®	Mitsubishi Tanabe Pharma	Molienda húmeda	Top-down	Oral	Comercializado	2008
Antidepresivo	Invega Sustenna®	Johnson & Johnson	Molienda húmeda	Top-down	Intramuscular	Comercializado	2009
Antidepresivo	Invega Sustenna (\mathbf{R})	Johnson	HAP	Top-down	$\operatorname{Intramuscular}$	Comercializado	2009
Antiinflamatorio ocular	llevro	Novartis	Molienda húmeda	Top-down	Ocular	Comercializado	2012
Antidepresivo	Invega Trinza®	Johnson	HAP	Top-down	Intramuscular	Comercializado	2015
Esquizofrenia	Aristada	Alkermes	HAP	Top-down	Intramuscular	Comercializado	2015
Quemaduras	NCT02108535	University of Sorocaba	NE	NE	NE	Fase IV	NA
Fotoprotección	NCT01552135	Oslo University Hospital	NE	NE	NE	Fase IV	NA
Antineoplásico	$\operatorname{Paxceed}(\mathbf{R})$	Angiotech Pharmaceuticals	NE	NE	Intravenoso	Fase III	NA
Antibacteriano	NCT00659204	Mandigan Army Med. Center	NE	NE	NE	Fase III	NA
Antineoplásico	NE	American Pharm. Partners	NE	NE	NE	Fase III	NA
Cáncer de ovario	Panzem NCD	EntreMed	Molienda húmeda	Top-down	Intravenoso	Fase II	NA
Inhibidor de TNF-alfa	$\operatorname{Semapimod}_{\operatorname{I\!R}}$	Cytokine Pharmasciences	NE	NE	NE	Fase II	NA
Antineoplásico	$Theralux(\mathbf{R})$	Celmed	Molienda húmeda	Top-down	NE	Fase II	NA
Sindrome menopáusico	NCT02467673	InBios International	NE	NE	NE	Fase II	NA
Apnea del sueño	NE	Solvay Pharmaceuticals	NE	NE	NE	Fase II	NA
Antineoplásico	NE	NewBiotics	NE	NE	Intravenoso	Fase I/II	NA
Antineoplásico	NE	Supergen	NE	NE	NE	Fase I	NA
Asma	NE	Sheffield Pharmaceuticals	NE	NE	NE	Fase I	NA
	HAP: hc	omogeneización a alta presión; NE	i: no especificado o de	sconocido, N_{I}	A: no aplica		

Tabla 4.1: Lista de formulaciones basadas en nanocristales actualmente comercializadas o en etapa de estudios clínicos. Tabla adaptada

4.2. Metodología

4.2.1. Preparación de nanocristales redispersables de fenbendazol y de valero-fenbendazol

En primer lugar, se mezclaron fármaco (FBZ o VAL-FBZ) y portador de forma manual en un mortero, agregando la cantidad necesaria de agua milliQ de forma gradual, de acuerdo a las tablas 4.2 y 4.3. Una vez que se obtuvo una suspensión homogénea, se la colocó en la cámara de molienda de un molino de bolas donde se sometió a un proceso de molienda húmeda asistida con microesferas.

Las condiciones de molienda dependieron del tipo de molino empleado¹: para el molino A, se operó a una velocidad de 500 rpm con esferas cerámicas de óxido de circonio (ZrO_2) de 0.5 mm de diámetro, y refrigerando la cámara por inmersión en un baño de agua-hielo; para el molino B, se operó a 1500 rpm, con esferas del mismo material, pero de 0.1 mm, y empleando un control de temperatura seteado a 15 °C.

El proceso de molienda fue de 2 horas durante las cuales se tomaron muestras cada 30 minutos para monitorear los cambios de tamaño de partícula del fármaco. Las tablas 4.2 y 4.3 resumen las composiciones estudiadas, las cantidades de agua milliQ agregadas y el molino empleado en cada caso.

El producto obtenido luego de la molienda consiste en la NS del fármaco en una solución de agua y portador. El agua de las NS se eliminó mediante un proceso de secado por aspersión, empleando un equipo a escala de laboratorio Mini Spray-dryer, Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Suiza) equipado con un módulo deshumidificador Büchi B-296 (Büchi Labortechnik AG, Suiza). Se empleó una tobera de doble fluido con un orificio de 1.5 mm de diámetro y

¹Ambos dispositivos usados permiten obtener nanosuspensiones a escala de laboratorio a través de un proceso de molienda húmeda asistida por microesferas. Los dos equipos utilizados en esta tesis consisten en una cámara de acero inoxidable sellada, conteniendo un eje acoplado a un motor que permite mover una cama de esferas de circonio que, por estar en contacto con el fármaco en suspensión, disminuye su tamaño por efecto abrasivo. Sin embargo, los equipos utilizados presentan algunas diferencias. El primer molino empleado (molino A) utiliza esferas de circonio de 0.5 mm de diámetro y alcanza una velocidad de rotación máxima de su eje de 500 rpm. Además, la cámara de molienda del molino A se refrigera por inmersión en un baño de agua-hielo. El segundo molino utilizado (molino B), denominado NanoDisp® (NanoDisp, Córdoba, Argentina), puede operar con esferas de circonio de 0.1 mm de diámetro, permite rotaciones de su eje de hasta 1500 rpm y su cámara de molienda se encuentra rodeada de una camisa refrigerante, que permite el control digital de la temperatura.

 Tabla 4.2: Composición de las nanosuspensiones y los nanocristales de fenbendazol

 preparados con el molino A

NS	NCR	FBZ (g)	HPMC (g)	P407 (g)	PVP-k30 (g)	Lactosa (g)	Manitol (g)	P188 (g)
NS1	NCR1	5	5	-	-	-	-	-
NS2	NCR2	5	-	5	-	-	-	-
NS3	NCR3	5	-	-	5	-	-	-
NS4	NCR4	5	-	-	-	2.5	-	2.5
NS5	NCR5	5	-	-	-	-	2.5	2.5
NS6	NCR6	5	-	-	-	-	-	5
NS7	NCR7	5	-	-	-	-	-	2.5
NS8	NCR8	5	-	-	-	-	-	1.2
NS9	NCR9	5	-	-	-	-	-	0.5

Estas suspensiones se prepararon agregando 200 mL de agua milliQ y utilizando un tamaño de esferas de circonio de 0.5 mm. NS: nanosuspensión; NCR: nanocristales redispersables; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; P407: poloxamer 407; P188; poloxamer 188; PVP-k30: polivinilpirrolidona; FBZ: fenbendazol; VAL-FBZ: valero-fenbendazol.

Tabla 4.3: Composición de las nanosuspensiones y los nanocristales redispersables de fenbendazol y valero-fenbendazol preparados con el molino B

\mathbf{NS}	NCR	FBZ (g)	VAL-FBZ (g)	P188 (g)
NS10	NCR10	2.5	-	2.5
NS11	NCR11	-	2.5	2.5

Estas suspensiones se prepararon agregando 90 mL de agua milliQ y utilizando un tamaño de esferas de circonio de 0.1 mm. NS: nanosuspensión; NCR: nanocristales redispersables; P188: poloxamer 188; FBZ: fenbendazol; VAL-FBZ: valero-fenbendazol.

las condiciones de operación fueron: aire de atomización 50 mmHg (819 L/h); aspiración 75 % (30 m^3/h); temperatura de entrada 45 °C; y bomba 5 % (2 mL/min). El proceso de secado permite obtener un sólido particulado conformado por el portador conteniendo los nanocristales redispersables (NCR) de fármaco; el proceso de preparación global se esquematiza en la figura 4.4.

Con el fin de optimizar el método de producción de NCR, el trabajo se organizó en diferentes etapas que permitieron evaluar el impacto de distintas variables en el rendimiento del proceso. Además, se prepararon MF control de cada composición, de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.2.1 de esta tesis, con el propósito de comparar el desempeño de los NCR obtenidos contra la mezcla simple de sus componentes. A continuación, se describen las diferentes preparaciones estudiadas.

4.2.1.1. Evaluación del efecto de diferentes portadores en la producción de nanocristales

En esta etapa se procedió a variar el tipo de portador, preparándose cinco composiciones distintas (NS1-NS6, ver tabla 4.2 con la descripción de las



Figura 4.4: Esquema del proceso de obtención de NCR de FBZ y poloxamer 188: luego de la pesada de materias primas, se prepara en mortero una suspensión de los componentes a través del agregado de agua milliQ; una vez que se cuenta con una suspensión homogénea, se procede a colocarla en el molino junto con las esferas de circonio, y moler durante 2 h a 1200 rpm; completada la etapa de molienda, la suspensión es inmediatamente secada en un secador por aspersión, obteniéndose el polvo que contiene los NCR.

preparaciones estudiadas), utilizando una relación de masas fija de fármaco y portadores (relación 1:1). Los portadores evaluados fueron: P188, P407, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (METHOCEL[™] E15 Premium LV), polivinilpirrolidona (PVP) (PVP-k30), lactosa y manitol. El molino utilizado fue el molino A.

4.2.1.2. Evaluación del efecto de la concentración de portador en la producción de nanocristales

Una vez seleccionado el portador que permitiera el mejor rendimiento de proceso, se estudió el efecto de la reducción de su porcentaje, tanto en el rendimiento de proceso como en la redispersión de los NCR. Para ello, se prepararon mezclas de partida con porcentajes de 9, 19, 33 y 50 % p/p de P188 (preparaciones NS6-NS9 de la tabla 4.2). En esta etapa también se utilizó el molino A.

4.2.1.3. Evaluación del efecto del dispositivo de molienda en la producción de nanocristales

Una vez seleccionada la preparación con mejor rendimiento de proceso y tamaño de partícula óptimo, se prepararon los mismos NCR variando el dispositivo de molienda. Así se obtuvo la preparación NS10 de la tabla 4.3, conteniendo FBZ y P188 (50 % p/p) pero empleando el molino B.

4.2.1.4. Traslado de tecnología de fenbendazol al híbrido valerofenbendazol

Para evaluar la potencialidad de la tecnología de producción de NCR de ser trasladada a otros fármacos, una vez seleccionada la mejor metodología de producción de NCR para FBZ, esta se empleó para la obtención de NCR del híbrido VAL-FBZ (NS11) de la tabla 4.3. De este modo, se prepararon nanocristales de VAL-FBZ y P188 (50 % p/p) empleando el molino B.

4.2.2. Caracterización de las preparaciones

4.2.2.1. Determinación del rendimiento de proceso y el rendimiento de secado

El rendimiento global del proceso fue determinado como el cociente entre la masa del polvo de NCR (pesados después de la etapa de secado por aspersión) y la masa del material de partida, multiplicado por 100. Estas estimaciones de rendimiento global del proceso ayudan a evaluar la pérdida de masa global producida durante la manufactura (por ejemplo, separación del producto del lecho de molienda, transferencias entre contenedores y pérdidas durante la etapa de secado).

Se estimó además el rendimiento asociado solamente a la etapa de secado de las muestras. Para ello, se pesó la suspensión de materias primas antes del secado por aspersión para estimar la masa de fármaco y portador —a partir de su composición conocida—. El rendimiento de secado se estimó como el cociente entre la masa de NCR (después del secado) y la masa teórica de sólidos en suspensión (previo al secado), multiplicado por 100.

4.2.2.2. Medidas de tamaño de partícula e índice de polidispersidad

El tamaño de partícula y el IPd de las NS de fármaco y los NC resuspendidos en agua (aproximadamente 0.5 mg de NCR en 5 mL de agua milliQ) se determinaron mediante DLS empleando un equipo Zetasizer Nano-Zs® (Malvern Instruments, Reino Unido). Para tomar las medidas, las muestras de NS se diluyeron adecuadamente con agua milliQ para estandarizar la concentración de nanocristales. Adicionalmente, se realizó un estudio de la pertinencia del uso de la técnica de DLS para la evaluación del tamaño de partícula de los NC obtenidos y un análisis del efecto del polímero codisuelto en el tamaño de las muestras. La metodología empleada y los resultados obtenidos se encuentran en el apéndice 4 de esta tesis.

4.2.2.3. Contenido de humedad

El contenido de humedad del polvo se estudió para todas las muestras inmediatamente después del paso de secado. Para ello se empleó un analizador de humedad con calefacción halógena (OHAUS M45VR).

4.2.2.4. Ensayo de disolución de fenbendazol y valero-fenbendazol

Los estudios de disolución *in vitro* de FBZ sin formular, los NCR de FBZ y las MF se realizaron por triplicado, ensayando una cantidad de muestra equivalente a 5 mg de FBZ, para asegurar condiciones *sink*, en 900 mL de HCl 0.1 N a 37.0 ° C. Además, se estudió la disolución de una suspensión convencional de FBZ disponible en el mercado. Para ello, se empleó un aparato de disolución USP tipo 2 (SR6 SR11-6-Flask Dissolution Test Station, Hanson Research) adaptado con filtros de 0.45 μ m para el muestreo y seteado a una velocidad de rotación de paleta de 50 rpm. Las muestras filtradas se recogieron a los 3, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos de ensayo, y se volvieron a filtrar inmediatamente luego de ser tomadas del vaso, pero empleando filtros de 0.22 μ m.

También se realizaron estudios de disolución *in vitro* de VAL-FBZ, los NCR11 y la MF correspondiente siguiendo la misma metodología que para FBZ, pero empleando cantidades de muestra equivalentes a 8 mg de fármaco (cantidad equimolar a la ensayada para FBZ). Las muestras tomadas durante los estudios de disolución se ensayaron para determinar el contenido de FBZ y VAL-FBZ mediante espectrofotometría UV-visible a 289.5 nm y 296.0 nm,

respectivamente. Para VAL-FBZ, la curva de calibración en el medio de disolución abarcó el rango de 0.85 a 50.00 μ M y presentó una buena linealidad (R^2 de 0.998) y un límite de cuantificación de 0.63 μ M. La cuantificación de FBZ se realizó de acuerdo a lo descrito en el subapartado 3.2.2.2

Los perfiles de disolución obtenidos se compararon estadísticamente a través de los factores f1 y f2, y se estimó la ED de las muestras estudiadas de acuerdo a lo descrito anteriormente para las DS (subapartado 3.2.2.2). Las comparaciones estadísticas de ED y las curvas de calibración se realizaron mediante GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

4.2.2.5. Experimentos de solubilidad de fenbendazol y valerofenbendazol en condiciones de saturación

Para estudiar la solubilidad de saturación de los fármacos puros y en las diferentes preparaciones, se agregó un exceso de los NCR conteniendo 50 % p/p de P188, las MF correspondientes o fármaco puro en 5 ml de HCl 0.1 N (seis réplicas). Los tubos fueron agitados a 37 °C durante 72 horas utilizando una incubadora con agitación (MRC-LM 570, MRC Ltda). Se analizaron las soluciones de muestra filtradas (0.22 μ m) usando un espectrofotómetro UV-visible a 289.5 o 296.0 nm, dependiendo del fármaco, después de realizar una dilución apropiada.

4.2.2.6. Difracción de rayos x de polvo

Los estudios de XRPD se realizaron usando un difractómetro Rigaku Ultima IV, operando en geometría Bragg-Brentano, utilizando radiación de CuK α . Las muestras se midieron en el rango de 2-theta(°) = 4.00 - 60.00, en pasos de 0.02° y con un tiempo de integración de 10 segundos por paso. Las preparaciones estudiadas fueron NCR6, NCR10, NCR11, los componentes puros y las MF correspondientes.

Adicionalmente, se realizaron estudios de XRPD de muestras de VAL-FBZ puro activadas con agua de forma manual en un mortero y secadas a vacío a 100, 150, 170 y 200 °C por un período de 6 h. Además, se estudió una muestra de VAL-FBZ puro molida con nitrógeno líquido en mortero, sin agregado de agua¹.

¹Estos experimentos fueron realizados debido a la constatación de diferencias en los
4.2.2.7. Otros estudios realizados

Se analizaron por MRC las preparaciones NCR10, NCR11 y las MF correspondientes en ubicaciones aleatorias en áreas de 10 x 10 μ m, con una cuadrícula de 60 x 60 definiendo el mapa de bits de la imagen. Tanto la colección de datos hiperespectrales como su análisis se realizó de acuerdo a lo descrito para las DS en el subapartado 3.2.2.6 de esta tesis.

Además, se realizaron estudios de SEM, FT-IR, TGA y DSC siguiendo la metodología detallada para las DS en el apartado 3.2.2 de esta tesis. Las imágenes de SEM se colectaron para las muestras NCR2, NCR3, NCR6, NCR10, NCR11, los fármacos y polímeros puros y las mezclas físicas correspondientes. Los estudios de FT-IR, TGA y DSC se realizaron para las muestras NCR6, NCR10, NCR10, NCR11, los componentes puros y las MF correspondientes.

patrones de difracción de rayos x de polvo de la muestra de NCR11 y la MF correspondiente. Las diferencias observadas sugerían un cambio en la estructura cristalina del VAL-FBZ luego de ser sometido al proceso de molienda húmeda, por lo que se decidió comprobar si las diferencias se debian a la energía entregada durante el proceso (muestras molidas con nitrógeno) o al agregado de agua (muestras activadas con agua).

4.3. Resultados

4.3.1. Evaluación del rendimiento de proceso y el tamaño de partícula

En la tabla 4.4 se resumen los rendimientos de proceso y de la etapa de secado, el contenido de humedad de los NCR, y el tamaño de partícula del fármaco antes y después del secado por atomización para todas las preparaciones estudiadas. En esta tabla se puede observar que para el conjunto de NCR de FBZ preparados con 50 % p/p de portador y usando el molino A (NCR1 a NCR6) la preparación con P188 (NS6) mostró el mejor rendimiento de secado (74 %). Por otra parte, los NCR conteniendo HPMC, P407 y PVP-k30 presentaron rendimientos de secado aceptables de 61, 60 y 56 %, (NCR1 a NCR3) respectivamente. Sin embargo, se observó que las mezclas de lactosa-P188 o manitol-P188, en la relación 1:1 no son buenas como excipientes para el secado por aspersión a las concentraciones empleadas, ya que los rendimientos de secado obtenidos fueron de apenas de 1 y 39 %, (NCR4 a NCR5) respectivamente.

Muestra	Rendimiento (%)		$\begin{array}{c} \text{Humedad} \\ (\%) \end{array}$	Tamaño de la NS(a)		Tamaño luego de redispersado (b)	
	Global	Secado		Diámetro (nm)	IPd	Diámetro (nm)	IPd
NCR1	39	61	2.50	783.8	0.2	693.4	0.2
NCR2	44	60	0.79	511.5	0.3	307.0	0.2
NCR3	41	56	5.76	432.7	0.2	757.2	0.5
NCR4	1	1	nd	521.1	0.3	612.3	0.3
NCR5	33	39	0.89	411.5	0.2	363.9	0.2
NCR6	53	74	1.08	466.8	0.3	415.6	0.3
NCR7	34	44	0.33	537.5	0.1	791.0	0.5
NCR8	18	20	0.59	580.7	0.3	1258.3	0.3
NCR9	15	21	1.18	540.0	0.2	2033.3	0.3
NCR10*	60	73	1.35	265.9	0.2	258.1	0.2
NCP11*	63	79	2.08	215 4	0.2	217.0	0.2

Tabla 4.4: Rendimientos de proceso, contenido de humedad y tamaño de partículade los nanocristales redispersables preparados.

(a) indica las medidas de tamaño de las partículas realizadas a la nanosuspensión luego de terminar la etapa de molienda (antes del secado); (b) indica las medidas de tamaño de los nanocristales redispersables, una vez secados y redispersados en agua. Los asteriscos indican las preparaciones obtenidas con el molino B (menor tamaño de esferas de circonio).NS: nanosuspensión; IPd: índice de polidispersidad.

Considerando que los mejores resultados de rendimiento de proceso se obtuvieron empleando P188, se seleccionó este portador para evaluar el impacto de su reducción en el proceso de producción y las propiedades del producto final. Para ello, se prepararon NS de FBZ conteniendo 33, 19 y 9 % p/p de P188 (nombradas como NS7, NS8 y NS9, respectivamente), cuyos resultados también se recogen en la tabla 4.3. Los resultados de este experimento mostraron que reducir la concentración de P188 disminuye de forma notoria el rendimiento de secado de las preparaciones, por lo que emplear 50 % p/p de P188 resultó la mejor opción para mantener buenos rendimientos de proceso.

En relación al tamaño de partícula del fármaco y el IPd de todas las NS preparadas con el molino A (NS1–NS9), se logró obtener partículas con diámetros en el rango de 400 a 800 nm y con valores de IPd de 0.1 a 0.3. En la figura 4.5 puede observarse un gráfico ejemplo de cómo evolucionan estos parámetros durante las 2 horas de molienda para una de las preparaciones estudiadas.



Figura 4.5: Evolución del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (IPd) de una suspensión de fenbendazol durante su molienda (muestras tomadas del molino A los 30, 60, 90 y 120 minutos). Se muestra también el tamaño e IPd de los nanocristales luego del secado de la nanosuspensión y su redispersión en agua (R). Gráfico ejemplo para el preparado NCR6, conteniendo fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1, obtenido con el molino A.

Una vez finalizada la etapa de secado de las NS y obtenidos los NCR se evaluó su redispersión en agua. Los resultados, también contenidos en la tabla 4.3, muestran que las muestras que aumentan su tamaño de partícula luego del secado son las de PVP-k30 (NCR3), lactosa-P188 (NCR4) y las que contienen menos de 50 % de portador (NCR7–NCR9). Respecto a estas últimas, se observa cómo aumenta el tamaño de las partículas de FBZ redispersadas desde los NCR al emplear concentraciones de P188 cada vez menores —aunque los tamaños de partícula de FBZ antes del secado fueron similares para las tres NS de partida—.

En cuanto al uso del molino B, se observó que permite alcanzar menores tamaños de partícula y menores valores de IPd que el molino A —que opera a una velocidad tres veces menor y emplea esferas de ZrO_2 de mayor tamaño—. En este sentido, los NCR10, preparados con el molino B, presentaron un tamaño de redispersión de 258.1 nm de diámetro (NCR10) contra 415.6 nm para la redispersión de la muestra NCR6, de igual composición pero preparada con el molino A. Además, los NCR11, también obtenidos con el molino B pero conteniendo VAL-FBZ, presentaron un tamaño de partícula similar al alcanzado para FBZ con el mismo molino (217.0 nm).

4.3.2. Solubilidad y disolución *in vitro* de las preparaciones de fenbendazol y valero-fenbendazol

En la tabla 4.5 se resumen los resultados de solubilidad en condiciones de saturación para los fármacos puros, sus NCR conteniendo 50 % de P188 y las MF correspondientes. Allí se observa que los NCR de ambos fármacos tienen una solubilidad —en HCl 0.1 N, a 37 °C— significativamente mayor respecto a los fármacos sin nanometrizar, ya sean puros o codisueltos con P188 (en las MF).

Tabla 4.5: Estudios de solubilidad de fendedazol y valero-fendedazol según las diferentes formulaciones. Medida en HCl 0.1 N a 37 °C para ambos compuestos puros y en forma de mezclas físicas y nanocristales redispersables conteniendo 50 % p/p de P188 (NCR10 y NCR11)

	Puros	\mathbf{MF}	NCR	
FBZ (mg.L-1)	36.5 ± 1.9	33.2 ± 2.5	45.3 ± 1.1	
VAL-FBZ $(mg.L-1)$	173.5 ± 19.9	201.5 ± 27.1	325.9 ± 48.2	
FBZ: fenbendazol; VAL-FBZ: valero-fen	ibendazol; MF: m	ezcla física; NCR:	nanocristales redispersab	les

Para el caso de FBZ, este aumento puede atribuirse solamente al tamaño de partícula disminuido, ya que, al comparar la MF con el FBZ puro, la presencia de P188 parece incluso afectar negativamente la solubilidad del fármaco. Para el caso de VAL-FBZ, se observa que tanto el polímero codisuelto como la disminución del tamaño de partícula del fármaco tienen un efecto sobre su solubilidad. Sin embargo, se comprueba que el efecto de la nanometrización del fármaco en su solubilidad es notablemente mayor que el simple agregado de P188 en el medio de disolución.

Los perfiles obtenidos a partir de los estudios de disolución *in vitro* realizados para FBZ sin formular, los NCR10, la MF correspondiente y la suspensión convencional de FBZ se presentan en la figura 4.6 En esta figura se observa que, durante los primeros 15 minutos del ensayo, la cantidad de FBZ sin formular disuelto se mantuvo por debajo del límite de cuantificación del método, mientras que el FBZ disuelto desde los NCR10 alcanzó cerca del 85 % de la cantidad ensayada de fármaco. En el mismo período de 15 minutos, el fármaco disuelto, tanto desde la MF como desde la suspensión convencional, alcanzó un 40 % del total ensayado, es decir, apenas la mitad del FBZ liberado desde la preparación de nanocristales. Además, la cantidad de fármaco disuelta desde los NCR fue significativamente mayor que la cantidad disuelta desde la MF y la suspensión convencional durante todo el ensayo.



Figura 4.6: Perfil de disolución de los nanocristales redispersables de fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1 y preparados con el molino B (NCR10), la mezcla física análoga en composición, fenbendazol puro y una suspensión convencional de fenbendazol. Para la muestra de fármaco puro, el fenbendazol no fue cuantificable antes de los 60 minutos de ensayo.

Los perfiles de disolución de estas preparaciones (NCR10, MF y la suspen-

sión comercial), fueron comparados entre sí a través del cálculo de los parámetros f1 y f2. Los resultados de la estimación de estos parámetros demuestran que las preparaciones de FBZ ensayadas presentan perfiles de disolución estadísticamente diferentes entre sí (ver tabla 4.6).

 Tabla 4.6:
 Comparación de los perfiles de disolución de las preparaciones conteniendo fenbendazol

Test	Referencia	f1	f2
NCR10	\mathbf{MF}	48.86841	78.81451
\mathbf{SC}	\mathbf{MF}	39.97945	95.7126
NCR10	\mathbf{SC}	63.47207	74.21422

NCR10: preparación conteniendo fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1, preparada con el molino B; MF: mezcla física análoga en composición a NCR10; sc: suspensión convencional de FBZ (10 % p/v).

Por último, los valores de ED de cada preparación, calculados para diferentes tiempos del ensayo (5, 30 y 60 minutos), se resumen en la tabla 4.7. Los resultados muestran que la ED de FBZ es significativamente superior para los NCR10 respecto al resto de las preparaciones, para todos los tiempos evaluados. Para los NCR, la ED se estimó en 61 % durante los primeros 5 minutos del ensayo de disolución y 92 % a los 60 minutos, mientras que, a los mismos tiempos, la MF presentó valores de 14 y 47 %, respectivamente.

 Tabla 4.7: Eficiencia de disolución de las preparaciones conteniendo fenbendazol y valero-fenbendazol

	Eficiencia de disolución			
	$5 \min$	$30 \min$	$60 \min$	
Fenbendazol	-	-	0.6 ± 0.4	
Suspensión convencional	3.7 ± 2.1	35.7 ± 3.7	53.9 ± 5.8	
NCR10	60.6 ± 1.1	89.7 ± 1.4	92.1 ± 2.9	
MF análoga a NCR10	13.5 ± 0.3	37.2 ± 1.1	46.7 ± 1.2	
VAL-FBZ	-	-	-	
NCR11	50.7 ± 1.5	79.4 ± 2.2	85.4 ± 3.9	
MF análoga a NCR11	2.6 ± 0.8	13.9 ± 0.9	21.0 ± 1.0	

Eficiencia de disolución expresada como media \pm desviación estándar. NCR10: preparación conteniendo fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1, preparada con el molino B; NCR11: preparación conteniendo valero-fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1, preparada con el molino B; MF: mezcla física.

En cuanto al perfil de disolución obtenido para VAL-FBZ puro, los NCR11 y la MF correspondiente, el comportamiento observado es análogo al de FBZ. La figura 4.7 muestra los perfiles obtenidos, a excepción del perfil de VAL-FBZ puro, ya que no fue cuantificable durante todo el ensayo.

Se observa que, si bien VAL-FBZ posee una solubilidad en condiciones de saturación mayor a la de FBZ, su cinética de disolución es más lenta, ya que



Figura 4.7: Perfil de disolución de los nanocristales redispersables de valerofenbendazol y la respectiva mezcla física. El valero-fenbendazol no fue cuantificable durante el ensayo del fármaco puro.

el fármaco puro no pudo ser cuantificado en 60 minutos de ensayo. Además, la MF conteniendo 50 % p/p de P188 alcanzó un porcentaje de disolución alrededor de 10 % menor al registrado para la preparación análoga conteniendo FBZ. Sin embargo, estas diferencias no se presentan cuando se comparan las preparaciones de NCR de ambos fármacos.

4.3.3. Microscopía Raman confocal

En la figura 4.8 se comparan los espectros Raman colectados de FBZ, VAL-FBZ y P188 puros. A través de estos espectros se identificó un grupo de señales específicas del VAL-FBZ (alrededor de 1550 cm^{-1}) que coinciden con las seleccionadas para FBZ en el apartado 3.3.4 de esta tesis, donde se comentan los resultados de MRC de las DS. La señal elegida de P188 (alrededor de 841 cm^{-1}) coincide, a su vez, con la seleccionada para P407, también discutido en el apartado mencionado.

Las imágenes de MRC obtenidas para las preparaciones NCR10, NCR11 y las MF correspondientes se muestran en la figura 4.9. Estas imágenes, obtenidas a través de un procesamiento por filtros en las señales características de cada componente, muestran la alta homogeneidad lograda en ambas muestras de NCR, en comparación con las respectivas MF.

Las imágenes normalizadas en términos de cociente de intensidad máxima de señales, generadas a través del procesamiento de los datos espectrales



Figura 4.8: Espectros Raman de poloxamer 188 (P188), fenbendazol (FBZ) y valero-fenbendazol (VAL-FBZ). Se marcan las señales empleadas para el procesamiento de datos por cociente de intensidad de señales: en azul, la señal que es relativamente más característica del polímero respecto a ambos fármacos; en rojo, las señales correspondientes a FBZ y VAL-FBZ.

—tal cual fuera descrito para las DS en apartado 3.2.2.6—, se muestran en las figuras 4.10 y 4.11 para las preparaciones conteniendo FBZ y VAL-FBZ, respectivamente. Las señales seleccionadas para obtener las imágenes normalizadas fueron 1591 cm^{-1} para ambos fármacos y 841 cm^{-1} para P188, y la relación se calculó como I_{1591}/I_{841} . En ambas figuras se observa que para los NCR la homogeneidad de la muestra es tal que todos los pixeles de la imagen contienen ambos componentes, es decir, que trabajando al límite de resolución del equipo utilizado (300 nm), no es posible distinguir zonas de las muestras donde predomine uno de los componentes. En las MF, sin embargo, se observan amplias zonas enriquecidas en polímero o fármaco.

Por otra parte, las imágenes obtenidas a través del PCA de los datos permitieron identificar en las MF áreas conteniendo principalmente FBZ o P188 y pequeñas zonas donde se colocalizan fármaco y polímero. En la figura 4.12 se muestra el resultado del análisis PCA correspondiente a la MF conteniendo FBZ-P188 en relación 1:1, mientras que la figura 4.13 muestra la imagen Raman construida a partir de la componente 1 de este análisis. Para el caso de las preparaciones de NCR, aunque los PCA realizados detectan algo de diferencia en las imágenes, los espectros promedio calculados en las zonas detectadas co-



Figura 4.9: Imágenes de microscopía Raman confocal reconstruidas a partir de filtros de señales: a. NCR11 (VAL-FBZ:P188 1:1, molino B); b. mezcla física de VAL-FBZ:P188 1:1; c) NCR10 (FBZ:P188 1:1, molino B); d) mezcla física de FBZ:P188. Se muestran en rojo las zonas donde predominan los compuestos activos, en azul las regiones donde predomina el portador (P188), y en fucsia la superposición de ambos componentes.

mo "distintas" son idénticos y corresponden a la combinación de los espectros de fármaco y polímero, lo que indica que la muestra es altamente homogénea.



Nanocristales redispersables de FBZ y P188 1:1 (NCR₁₀)

Figura 4.10: Imágenes de microscopía Raman confocal en dos dimensiones (x,y) de los nanocristales redispersables NCR10 de fenbendazol (FBZ, 50 % p/p de poloxamer 188), y la mezcla física correspondiente obtenidas a través del mapeo del cociente fármaco/polímero. Los histogramas de la distribución de los cocientes se muestran a la derecha de cada imagen. La escala de colores indica la intensidad del cociente I_{1591}/I_{841} . Ambas imágenes incluyen el número de puntos de la cuadrícula en los ejes x e y.

4.3.4. Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes SEM de VAL-FBZ puro se muestran en la figura 4.14. El fármaco antes de la molienda presentó una forma acicular regular, con una distribución de tamaño entre 2 y 20 μ m y superficie lisa. Por otra parte, las micrografías del polímero mostraron partículas esféricas de entre 200 y 500 μ m, idénticas a las descritas en el apartado 3.3.6. En cuanto a los NCR11, se observa que consisten en partículas esféricas con diámetros en el rango de 2 a 5 μ m, muy similares a las obtenidas para los NCR10 (figura 4.15. Las imágenes colectadas de otros NCR analizados, como NCR2 (50 % p/p de P407) y NCR3



Nanocristales redispersables de VAL-FBZ y P188 1:1 (NCR_n)

Figura 4.11: Imágenes de microscopía Raman confocal en dos dimensiones (x,y) de los nanocristales redispersables NCR11 de valero-fenbendazol (VAL-FBZ, 50 % p/p de poloxamer 188) y la mezcla física correspondiente obtenidas a través del mapeo del cociente fármaco/polímero. Los histogramas de la distribución de los cocientes se muestran a la derecha de cada imagen. La escala de colores indica la intensidad del cociente I_{1591}/I_{841} . Ambas imágenes incluyen el número de puntos de la cuadrícula en los ejes x e y.



Figura 4.12: Resultado del análisis de componentes principales de la mezcla física de fenbendazol-poloxamer 188 en relación 1:1. Se observa que los componentes 1 y 2 explican la mayor parte de la varianza del set de datos.



Figura 4.13: Imagen generada a partir de la componente principal 1 del análisis de componentes principales de la mezcla física de fenbendazol-poloxamer 188 en relación 1:1. Al promediar los espectros de las zonas coloreadas en rojo, se obtiene el espectro de poloxamer 188, mientras que al promediar las zonas coloreadas en azul el espectro obtenido corresponde al fármaco.

(50 % p/p de PVP-k30), se muestran en el apéndice 5.



Figura 4.14: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de valero-fenbendazol puro. Magnificaciones: **a**. 4.00KX y **b**. 1.00KX.



Figura 4.15: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de nanocristales de valero-fenbendazol y poloxamer 188 (NC11) **a**. 1.00KX y **b**. 15.00; nanocristales de fenbendazol y poloxamer 188 (NC10) **c**. 8.00KX y **d**. 50.00KX.

4.3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, análisis de rayos x de polvo y análisis térmico

4.3.5.1. Nanocristales redispersables de fenbendazol y poloxamer 188

Como fuera mencionado en el 3 de esta tesis, los resultados DSC y TGA de P188 y FBZ mostraron que el P188 funde a 50 °C, mientras que el FBZ funde con descomposición a partir de los 210 °C. Para ambas preparaciones de NCR conteniendo FBZ y P188 en relación 1:1 —los NCR6 y los NCR10, preparados con los molinos A y B respectivamente— no se observaron diferencias entre sus termogramas y los de la MF de igual composición, lo que sugiere que no existen interacciones químicas relevantes entre los componentes de la formulación luego del proceso de nanometrización. La figura 4.16 muestra los resultados de DSC y TGA para la preparación NCR6, la MF correspondiente y los componentes puros.



Figura 4.16: Análisis térmico de las muestras conteniendo fenbendazol y poloxamer 188. Análisis termogravimétrico (A) y calorimetría diferencial de barrido (B) de fenbendazol (FBZ), poloxamer 188 (P188) y las preparaciones conteniendo ambos componentes en relación 1:1 (NCR6 y su MF correspondiente).

De las señales infrarrojas más relevantes correspondientes a FBZ (3336; 1630; 742.; 685 cm^{-1}) y P188 (2881; 1282; 1118 cm^{-1}), aquellas que son señales exclusivas de cada componente permanecieron inalteradas en el espectro colectado de NCR respecto al de la MF. Este resultado confirma que los distintos componentes se encuentran químicamente incambiados (ver figura 4.17). Los difractogramas de las muestras de NCR y MF, obtenidos mediante XRPD, muestran también incambiadas las señales asignadas a cada componente puro (FBZ: $2\theta(^{\circ}) = 6.68$, 11.16, 13.36; P188: 2theta($^{\circ}$) = 19.18, 23.36), lo cual también es evidencia de la ausencia de reacciones químicas y/o transformaciones polimórficas entre/en los componentes (ver figura 4.18).



Figura 4.17: Espectros FT-IR de fenbendazol, poloxamer 188 y las preparaciones conteniendo ambos componentes en relación 1:1 (NCR6 y su MF correspondiente).



Figura 4.18: Difractogramas de rayos x de polvo de las muestras conteniendo fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1 (NCR10 y su MF correspondiente) y de sus componentes puros.

4.3.5.2. Nanocristales redispersables de valero-fenbendazol y poloxamer 188

La caracterización térmica de la formulación NCR11 conteniendo VAL-FBZ y P188 en relación 1:1 resultó análoga a la descrita anteriormente para la preparación NCR6. En la figura 4.19 puede verse la comparación de los termogramas colectados.

En cuanto a los estudios de XRPD, se observaron cambios en la intensidad relativa y la posición de algunas de las señales correspondientes al VAL-FBZ en el difractograma de los NCR11 respecto al compuesto puro. Estas diferencias sugieren la posibilidad de que hubieran ocurrido cambios a nivel de la estructura cristalina del VAL-FBZ durante la obtención de los NC (ver figura 4.20). Al detectar estos cambios, se decidió estudiar si los cambios respondían a la incorporación de agua en la estructura cristalina (muestras activadas con agua) o a la cantidad de energía entregada durante la reducción de tamaño de los cristales (muestra molida con nitrógeno).

Por un lado, el estudio de la muestra de VAL-FBZ de partida molido con



Figura 4.19: Análisis térmico de las preparaciones conteniendo valero-fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1 (NCR11 y MF correspondiente) y sus componentes puros. A) Análisis termogravimétrico B) Calorimetría de barrido diferencial.



Figura 4.20: Difractogramas de las preparaciones conteniendo valero-fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1 (NCR11 y MF correspondiente) y de sus componentes puros.

nitrógeno líquido en mortero, sin agregado de agua, dio como resultado el difractograma original de VAL-FBZ. Por otro lado, al humeder el VAL-FBZ (sin procesarlo) se obtuvieron señales del activo idénticas a las encontradas en los NCR11. Estos resultados sugieren que al humectar el fármaco se producen

cambios a nivel de su estructura cristalina de forma muy reproducible (ver figura 4.21). Las señales correspondientes a VAL-FBZ de partida (sin tratamiento previo con agua) son: $2\theta(^{\circ}) = 4.31$, 8.71, 8.84, 10.79, 12.45, 15.51; mientras que las señales correspondientes a VAL-FBZ puro luego de ser procesado con agua son: $2\theta(^{\circ}) = 4.35$, 4.64, 8.72, 9.30, 11.50, 12.43, 13.56, 15.41, 16.25.



Figura 4.21: Difractogramas de rayos X de polvo de valero-fenbendazol puro antes y después del tratamiento con agua.

Al observarse que los cambios se producían únicamente por el agregado de agua al fármaco se decidió estudiar si la nueva estructura cristalina incorporaba moléculas de agua que pudieran luego perderse en condiciones extremas de calor y vacío. Para ellos, se prepararon muestras conteniendo agua que fueron secadas en estufa a vacío a diferentes temperaturas; sin embargo en ninguno de los casos fue posible volver a obtener la estructura de VAL-FBZ original (figura 4.22).

En relación a los estudios de FT-IR, se observó que la señal presente alrededor de 3300 cm^{-1} correspondiente a VAL-FBZ sufre un corrimiento hacia un menor número de onda luego del proceso de nanomolienda (ver figura 4.23), respecto a su posición en el espectro de VAL-FBZ puro y en la MF de VAL-FBZ y P188 (en relación 1:1). Se colectó, además, el espectro FT-IR de la



Figura 4.22: Difractogramas de rayos x de polvo de valero-fenbendazol tratado con agua antes y luego del secado a vacío a diferentes temperaturas. Una vez que el valero-fenbendazol entra en contacto con agua, cambia su estructura cristalina y no es posible, mediante secado a alta temperatura y vacío, volver a obtener la estructura original.

muestra procesada con agua, como fuera realizado para XRPD, el cual mostró el mismo cambio observado para la muestra de NCR11 (ver figura 4.24).

Por último, las señales correspondientes a P188 no presentaron cambios en el patrón de difracción de rayos x de polvo de los NCR11 ni en su espectro FT-IR, respecto a los obtenidos para P188 de partida. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que no se producen reacciones químicas entre el polímero y el fármaco, sino que los cambios observados para VAL-FBZ se dan a nivel de su estructura cristalina. Esta observación también se corrobora mediante los resultados de espectroscopía Raman, donde no se observaron diferencias relevantes entre las muestras de VAL-FBZ puro y NCR11.



Figura 4.23: Resultados de espectroscopía FT-IR de las muestras de VAL-FBZ puro, en los NCR11, en la MF correspondiente y P188 puro.



Figura 4.24: Resultados de espectroscopía FT-IR de las muestras de valero-fenbendazol tratado con agua, puro y en los NCR11.

4.4. Discusión

En términos generales, el proceso de molienda empleado para la preparación de los NC resultó exitoso, ya que todas las NS obtenidas presentaron un tamaño de partícula por debajo del rango submicrométrico, independientemente del tipo de portador empleado o su cantidad. Además, como era de esperar, las preparaciones obtenidas utilizando una velocidad de rotación mayor y un menor tamaño de esferas de molienda (molino B) alcanzaron tamaños de partícula de fármaco menores. Esto se explica porque tanto al emplear un tamaño de esferas menor como al aumentar la velocidad del rotor se logra una mayor velocidad de las esferas de molienda, lo que aumenta su capacidad para erosionar la superficie de las partículas de fármaco o romperlas (Romero *et al.*, 2016).

Por otra parte, considerando los resultados de rendimiento presentados en la tabla 4.4, se desprende que el tipo de portador desempeña un rol importante como estabilizante durante la etapa de secado para las condiciones operacionales empleadas¹. De los excipientes evaluados en este trabajo en proporción 1:1, se observa que P188 es quien permite obtener un mejor rendimiento de secado y un mejor rendimiento global. En cuanto a la influencia del tipo de portador en la redispersión de los nc, no se observaron grandes diferencias entre los excipientes utilizados en relación al tamaño de los NC antes y después del secado cuando se emplean en proporción 1:1 (fármaco:portador).

Si bien el tipo de excipiente parece no tener influencia sobre la redispersión de los NC preparados, la cantidad de excipiente empleada sí resultó ser una variable relevante. Por un lado, se observó que disminuir la cantidad de P188 desde un 50 % p/p a un 10 % p/p afecta notoriamente el proceso de secado, por lo que termina afectando el rendimiento del proceso global. Esta observación puede explicarse considerando el funcionamiento del equipo de secado por aspersión, descrito en el apartado 4.1.2 de este capítulo. Las preparaciones con diferentes proporciones de portador preparadas fueron secadas bajo las mismas condiciones de trabajo, por lo que las gotículas de NS atomizadas tienen el mismo volumen, pero diferentes densidades, conteniendo más cantidad de sólidos disueltos aquellas que contienen más P188. Como las partículas, una vez secas,

¹Las condiciones de secado empleadas fueron seleccionadas de acuerdo a experiencias previas del grupo de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Paredes *et al.*, 2016), en las que se demostró que las condiciones de secado eran cruciales para obtener rendimientos de proceso altos.

son separadas de la corriente de aire del ciclón por gravedad, las partículas más densas o de mayor tamaño son separadas de forma más eficiente, explicando los mayores rendimientos observados (Ameri y Maa, 2006).

Por otro lado, los resultados muestran que emplear menores cantidades de portador afecta directamente el proceso de redispersión de los nanocristales, volviéndolo más ineficiente. Este fenómeno podría tener al menos dos explicaciones. Por un lado, el uso de P188 como estabilizante no es trivial, ya que puede mejorar la velocidad de disolución de los fármacos modificando su entorno hidrodinámico, como fuera demostrado en el capítulo anterior de esta tesis, y reportado por diversos autores (Sharma *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013). En este sentido, el P188 actuaría formando puentes solubles entre las partículas de fármaco, colaborando con su rápida redispersión de los NC cuando el sistema entra en contacto con agua. Por otro lado, cantidades mayores de estabilizante pueden actuar como mejor interfaz durante el proceso de secado protegiendo a las partículas de fármaco de su agregación irreversible, causada debido a la alta energía cinética y las grandes fuerzas de corte que tienen lugar durante esta etapa (Freitas y Müller, 1998).

Estas observaciones coinciden con lo reportado por otros autores, que han elucidado cómo los estabilizantes pueden impactar en la estabilidad de los nanocristales y mejorar el desempeño de las etapas de secado o su redispersión. De este modo, se resalta la importancia de optimizar la cantidad de este tipo de excipientes, que actúan como agentes protectores de los nanocristales durante el secado por aspersión, recubriéndolos e impidiendo que se aglomeren y colaborando luego con su redispersión cuando entran en contacto con un medio acuoso.

4.4.1. Estudios de solubilidad y disolución

La solubilidad en condiciones de saturación tanto de FBZ como de VAL-FBZ preparados como NCR fue significativamente mayor a la de los fármacos puros y a la de sus MF análogas en composición. Esta relación entre una mayor solubilidad en condiciones de saturación producto de un menor tamaño de partícula fue explicada en el apartado 4.1.1 de este capítulo y reportada anteriormente por Keck y Müller (2006) para compuestos con tamaño de partícula menor a 1 mm. En este trabajo los autores explican, en términos, de la ecuación de Noyes-Whitney que menores tamaños de partícula conllevan un aumento en la solubilidad en condiciones de saturación y esto determina una mejor velocidad de disolución.

En términos de desempeño de disolución, las preparaciones de nanocristales estudiadas duplican las cantidades de fármaco que pueden liberarse desde las MF control. En este sentido, los NC de fármaco preparados con P188 presentan al menos dos ventajas que podrían contribuir al efecto observado. Por una parte, el área superficial del fármaco aumentada, producto de la disminución del tamaño de partícula, que explicaría no solo las mejoras en la velocidad de disolución sino también el aumento de la solubilidad del fármaco en condiciones de saturación, como fuera expuesto en el mencionado apartado 4.1.1. Por otra parte, la dispersión altamente homogénea de las nanopartículas de FBZ en la matriz de P188, que resulta en una mejor mojabilidad del fármaco, colaboraría también en el aumento de su velocidad de disolución *in vitro* (ver capítulo 3 de esta tesis). En la figura 4.25 se evidencian las diferencias en los perfiles de disolución de los NCR10, la mezcla física correspondiente, la DS análoga en composición (presentada en el capítulo 3), el FBZ puro y la suspensión convencional de FBZ, también presentada anteriormente.



Figura 4.25: Perfil de disolución de los nanocristales redispersables de fenbendazol y poloxamer 188 en relación 1:1 y preparados con el molino B (NCR10), la mezcla física correspondiente, la dispersión sólida análoga en composición, fenbendazol puro y una suspensión convencional de fenbendazol. Para la muestra de fármaco puro, el fenbendazol no fue cuantificable antes de los 60 minutos de ensayo.

Las bases débiles, como el FBZ y los demás fármacos de la familia de los benzimidazoles antihelmínticos, dependen fuertemente de su disolución en el medio ácido estomacal para asegurar su absorción en la primera fracción del duodeno (Lanusse y Prichard, 1993; McKellar, Scott *et al.*, 1990). La velocidad de disolución *in vitro* de un fármaco es un parámetro que teóricamente se relaciona con su desempeño *in vivo*, ya que su absorción dependerá tanto de la concentración alcanzada en el sitio de absorción a nivel del tracto gastrointestinal, así como del tiempo que permanezca disuelto, ambas variables contempladas en el cálculo de ED. En tal sentido, los valores mayores de ED logrados con los NCR resultaron muy alentadores para probar estas preparaciones *in vivo*, debido a que, como ya fuera mencionado, una biodisponibilidad mayor de estos fármacos estaría estrechamente ligada con una mejora de su eficacia (Pensel *et al.*, 2015, 2018).

Finalmente, considerando las definiciones de DS revisadas en la sección 3.1 del capítulo anterior, se puede afirmar que el caso de los NCR preparados con P188 en esta tesis es una combinación de las tecnologías de DS y nanometrización. El producto final, como fuera demostrado por MRC, consiste en una dispersión altamente homogénea del fármaco en una matriz anfifílica pero que, además, cuenta con la ventaja de tener un tamaño de partícula submicrométrico. En tal sentido los NCR pueden ser clasificados como una DS de tercera generación donde el P188 es la matriz con superficie activa, obtenida por un método por evaporación de solvente —el secado por aspersión—.

4.4.2. Caracterización fisicoquímica de las preparaciones

Las diferentes herramientas aplicadas a la caracterización de los NCR6 y NCR10 permitieron descartar la presencia de interacciones entre FBZ y P188 o etapas del proceso de producción que modificasen la química de los compuestos utilizados. Tanto los resultados de espectroscopía FT-IR y Raman como del análisis térmico y la XRPD mostraron que no existen diferencias físico-químicas o estructurales entre las muestras de NCR6, NCR10 y la MF correspondiente.

Para el caso de la preparación NCR11, conteniendo VAL-FBZ, se descartaron modificaciones a nivel de la química de los compuestos utilizados, pero se evidenciaron cambios en la estructura cristalina del activo a través de los estudios de XRPD y FT-IR. Las hipótesis que podrían explicar estos resultados son un cambio del polimorfo de VAL-FBZ —debido a la gran cantidad de energía entregada durante la molienda— o la incorporación de moléculas de agua a la red cristalina del fármaco. Para comprobarlo se realizaron, por un lado, experimentos de molienda del material de partida sin la incorporación de agua y, por otro, la incorporación de moléculas de agua en la estructura cristalina del VAL-FBZ original. Los resultados mostraron que los cambios observados se producen una vez que el activo entra en contacto con agua y que no es posible retornar a la fase cristalina anterior por un procedimiento de secado —ni siquiera en condiciones extremas de vacío y temperaturas próximas a la de fusión del activo—.

La hipótesis de la incorporación de moléculas de agua en la estructura cristalina del fármaco también es coherente con lo observado en los espectros FT-IR. En este sentido, se encontró que el tipo de corrimiento observado en la señal asignada a las vibraciones N-H en el espectro FT-IR del VAL-FBZ —activado con agua o en forma de NCR— podría responder a la presencia de enlaces de hidrógeno en la nueva red cristalina. Ha sido reportado que este tipo de interacciones da como resultado cambios en los espectros de vibración de las moléculas involucradas, donde la banda de absorción del modo de estiramiento del grupo donante X-H (siendo X un átomo electronegativo, en este caso N) sufre corrimientos hacia menores números de onda y, en la mayoría de los casos, un ensanchamiento de las señales involucradas (Nibbering *et al.*, 2007). Sin embargo, sería esperable que las moléculas de agua incorporadas en la nueva red cristalina se perdieran en condiciones de vacío y temperatura elevadas, lo cual no ocurre.

Los estudios realizados fueron complementados con un análisis elemental de las muestras de VAL-FBZ original y VAL-FBZ procesado con agua, sin embargo, no pudo evidenciarse la presencia de moléculas de agua incorporadas en las muestras tratadas (no se muestran los resultados). Con los experimentos realizados hasta el momento solamente es posible concluir con certeza que los cambios estructurales ocurren una vez que el activo se encuentra en presencia de agua, pero no es posible determinar si la nueva estructura cristalina es o no termodinámicamente más estable que la alcanzada durante la síntesis de VAL-FBZ o cuál es el fenómeno que tiene lugar. Actualmente se están llevando a cabo más experimentos para definir y caracterizar las fases cristalinas que están presentes en cada una de las etapas de purificación del VAL-FBZ, posteriores a su síntesis química.

4.5. Conclusiones del capítulo

Se lograron obtener NCR de FBZ y VAL-FBZ con una marcada mejora en el perfil de disolución de ambos fármacos a través de un proceso de molienda húmeda asistida por microesferas y secado por aspersión. Se evaluaron diferentes excipientes como portadores de los NCR y se seleccionó al P188 como el excipiente que permitió obtener mejor rendimiento de proceso y una buena redispersión de los NC. Además, los resultados constatan la importancia del tamaño de las esferas del material de molienda para alcanzar diferentes tamaños de partícula, lo cual, a su vez, no parecería estar determinado, en este caso, por el tipo de estabilizante empleado ni por su proporción en la formulación.

Por otra parte, la caracterización por MRC demostró que las muestras de NCR consisten en dispersiones altamente homogéneas del fármaco en una matriz polimérica. Esto indica que los NCR preparados con P188 en esta tesis combinan las ventajas de las tecnologías de DS y nanometrización, colaborando con los excelentes desempeños de disolución *in vitro* obtenidos.

Por último, se pudo constatar un cambio en la fase cristalina del VAL-FBZ una vez que el producto de síntesis entra en contacto con agua, durante la producción de los NCR. Si bien se manejan algunas hipótesis, aún restan experimentos por realizar que permitan determinar la naturaleza de los cambios observados.

Parte de los resultados recogidos en este capítulo se encuentran publicados en el trabajo titulado *Nanocrystals of Novel Valerolactam-Fenbendazole Hybrid* with Improved in vitro Dissolution Performance (Melian et al., 2020). Esta publicación puede encontrarse en el apéndice 6, al final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Ameri, M., y Maa, Y.-F. (2006). Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying technology*, 24(6), 763-768.
- Bahari, L. A. S., y Hamishehkar, H. (2016). The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; a comparative literature review. Advanced pharmaceutical bulletin, 6(2), 143.
- Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., y Alcudia, A. (2020). Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403.
- Brigger, I., Dubernet, C., y Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis [Polymer Conjugates for Cancer Therapy]. Advanced Drug Delivery Reviews, 54(5), 631-651. https://doi.org/https: //doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00044-3
- Chariou, P. L., Ortega-Rivera, O. A., y Steinmetz, N. F. (2020). Nanocarriers for the delivery of medical, veterinary, and agricultural active ingredients. ACS nano, 14(3), 2678-2701.
- Chen, Z., Wu, W., y Lu, Y. (2020). What is the future for nanocrystal-based drug-delivery systems?
- Choi, J.-Y., Yoo, J. Y., Kwak, H.-S., Nam, B. U., y Lee, J. (2005). Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. *Current applied physics*, 5(5), 472-474.
- Couillaud, B. M., Espeau, P., Mignet, N., y Corvis, Y. (2019). State of the art of pharmaceutical solid forms: from crystal property issues to nanocrystals formulation. *ChemMedChem*, 14(1), 8-23.
- Demirci, M., Caglar, M. Y., Cakir, B., y Gülseren, İ. (2017). Encapsulation by nanoliposomes. Nanoencapsulation technologies for the food and nutracentical industries, 74-113.

- El-Sayed, A., y Kamel, M. (2020). Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19073-19086.
- Freitas, C., y Müller, R. H. (1998). Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 46(2), 145-151.
- Ghosh, I., Schenck, D., Bose, S., y Ruegger, C. (2012). Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: effect of vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. *European journal of pharmaceutical* sciences, 47(4), 718-728.
- Gupta, R. B. (2006). Fundamentals of drug nanoparticles. En Nanoparticle Technology for Drug Delivery (pp. 25-44). CRC Press.
- Gurpreet, K., y Singh, S. (2018). Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5), 781-789.
- Junyaprasert, V. B., y Morakul, B. (2015). Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. Asian journal of pharmaceutical sciences, 10(1), 13-23.
- Keck, C. M., y Müller, R. H. (2006). Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *European journal of* pharmaceutics and biopharmaceutics, 62(1), 3-16.
- Kesisoglou, F., Panmai, S., y Wu, Y. (2007). Nanosizing—oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. Advanced drug delivery reviews, 59(7), 631-644.
- Kumar, M., Jha, A., Dr, M., y Mishra, B. (2020). Targeted drug nanocrystals for pulmonary delivery: A potential strategy for lung cancer therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 17(10), 1459-1472.
- Lanusse, C., y Prichard, R. K. (1993). Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug metabolism* reviews, 25(3), 235-279.
- Li, M., Azad, M., Davé, R., y Bilgili, E. (2016). Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process perspective. *Pharmaceutics*, 8(2), 17.

- Liu, J., Tu, L., Cheng, M., Feng, J., y Jin, Y. (2020). Mechanisms for oral absorption enhancement of drugs by nanocrystals. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101607.
- Liu, T., Yu, X., Yin, H., y Möschwitzer, J. P. (2019). Advanced modification of drug nanocrystals by using novel fabrication and downstream approaches for tailor-made drug delivery. Drug delivery, 26(1), 1092-1103.
- Lu, Y., Wu, W., y Li, T. (2018). Crystalline nanoparticles. *Pharmaceutical Crystals: Science And Engineering*, 463-502.
- Malvern Instruments Worldwide. (2012). A basic guide to particle characterization. MRK1806-01. https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/ knowledge-center/whitepapers/WP120620BasicGuidePartChar
- McKellar, Q., Scott, E., et al., (1990). The benzimidazole anthelmintic agentsa review. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 13(3), 223-247.
- Meena, N., Sahni, Y., Thakur, D., y Singh, R. (2018). Applications of nanotechnology in veterinary. Vet World, 3(10), 477-480.
- Melian, M. E., Paredes, A., Munguía, B., Colobbio, M., Ramos, J. C., Teixeira, R., Manta, E., Palma, S., Faccio, R., y Domínguez, L. (2020). Nanocrystals of novel valerolactam-fenbendazole hybrid with improved in vitro dissolution performance. AAPS PharmSciTech, 21(7), 1-15.
- Mohammad, I. S., Hu, H., Yin, L., y He, W. (2019). Drug nanocrystals: fabrication methods and promising therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 562, 187-202.
- Müller, R. H., Gohla, S., y Keck, C. M. (2011). State of the art of nanocrystals– special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 78(1), 1-9.
- Nibbering, E. T., Dreyer, J., Kühn, O., Bredenbeck, J., Hamm, P., y Elsaesser, T. (2007). Vibrational dynamics of hydrogen bonds. En Analysis and control of ultrafast photoinduced reactions (pp. 619-687). Springer.
- Noyes, A. A., y Whitney, W. R. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. Journal of the American Chemical Society, 19(12), 930-934.
- Paredes, A. J., Bruni, S. S., Allemandi, D., Lanusse, C., y Palma, S. D. (2018). Albendazole nanocrystals with improved pharmacokinetic performance in mice. *Therapeutic Delivery*, 9(2), 89-97.

- Paredes, A. J., Camacho, N. M., Schofs, L., Dib, A., del Pilar Zarazaga, M., Litterio, N., Allemandi, D. A., Bruni, S. S., Lanusse, C., y Palma, S. D. (2020). Ricobendazole nanocrystals obtained by media milling and spray drying: pharmacokinetic comparison with the micronized form of the drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 585, 119501.
- Paredes, A. J., Litterio, N., Dib, A., Allemandi, D. A., Lanusse, C., Bruni, S. S., y Palma, S. D. (2018). A nanocrystal-based formulation improves the pharmacokinetic performance and therapeutic response of albendazole in dogs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 51-58.
- Paredes, A. J., Llabot, J. M., Sanchez Bruni, S., Allemandi, D., y Palma, S. D. (2016). Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by high pressure homogenization and spray-drying. *Drug development and industrial pharmacy*, 42(10), 1564-1570.
- Patel, V., Sharma, O. P., y Mehta, T. (2018). Nanocrystal: a novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert* opinion on drug delivery, 15(4), 351-368.
- Pensel, P. E., Gamboa, G. U., Fabbri, J., Ceballos, L., Bruni, S. S., Álvarez, L. I., Allemandi, D., Benoit, J. P., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2015). Cystic echinococcosis therapy: albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta tropica, 152, 185-194.
- Pensel, P. E., Paredes, A., Albani, C. M., Allemandi, D., Bruni, S. S., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2018). Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. *Veterinary parasitology*, 251, 78-84.
- Rabinow, B. E. (2004). Nanosuspensions in drug delivery. Nature reviews Drug discovery, 3(9), 785-796.
- Rawat, R. (2015). Dense plasma focus-from alternative fusion source to versatile high energy density plasma source for plasma nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series*, 591(1), 012021.
- Real, D., Formica, M. L., Picchio, M. L., y Paredes, A. J. (2022). Manufacturing Techniques for Nanoparticles in Drug Delivery. En Drug Delivery Using Nanomaterials (pp. 23-48). CRC Press.
- Romero, A. I., Bermudez, J. M., Villegas, M., Dib Ashur, M. F., Parentis,M. L., y Gonzo, E. E. (2016). Modeling of progesterone release from poly

(3-Hydroxybutyrate)(PHB) membranes. *AAPS PharmSciTech*, 17(4), 898-906.

- Salazar, J., Müller, R. H., y Möschwitzer, J. P. (2014). Combinative particle size reduction technologies for the production of drug nanocrystals. *Journal of pharmaceutics*, 2014.
- Santos, D., Maurício, A. C., Sencadas, V., Santos, J. D., Fernandes, M. H., y Gomes, P. S. (2018). Spray drying: an overview. *Biomaterials-Physics* and Chemistry-New Edition, 9-35.
- Sharma, O. P., Patel, V., y Mehta, T. (2016). Design of experiment approach in development of febuxostat nanocrystal: application of Soluplus® as stabilizer. *Powder technology*, 302, 396-405.
- Shegokar, R., y Müller, R. H. (2010). Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Interna*tional journal of pharmaceutics, 399(1-2), 129-139.
- Shetab Boushehri, M. A., Dietrich, D., y Lamprecht, A. (2020). Nanotechnology as a platform for the development of injectable parenteral formulations: A comprehensive review of the know-hows and state of the art. *Pharmaceutics*, 12(6), 510.
- Sun, Y., Chen, D., Zhao, Y., Zhou, K., Zhang, B., Wang, H., y Xie, S. (2022). Exploitation of nanocrystal suspension as an effective oral formulation for oxfendazole. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(5), 1219-1229.
- Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., y Zhang, D. (2013). Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of controlled release*, 172(3), 1126-1141.
- Yang, H., Teng, F., Wang, P., Tian, B., Lin, X., Hu, X., Zhang, L., Zhang, K., Zhang, Y., y Tang, X. (2014). Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2), 88-95.
- Yao, J., Cui, B., Zhao, X., Wang, Y., Zeng, Z., Sun, C., Yang, D., Liu, G., Gao, J., y Cui, H. (2018). Preparation, characterization, and evaluation of azoxystrobin nanosuspension produced by wet media milling. *Applied Nanoscience*, 8(3), 297-307.
- Youssef, F. S., El-Banna, H. A., Elzorba, H. Y., y Galal, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *International journal of veterinary science and medicine*, 7(1), 78-93.

Capítulo 5

Estudio de biodisponibilidad relativa de nanocristales redispersables de fenbendazol en ovinos

Este capítulo se organiza como sigue. La sección 5.1 introduce aspectos relevantes sobre la farmacocinética de los antihelmínticos benzimidazólicos y los principios básicos del análisis de farmacocinética poblacional. Además, se describen los modelos no lineales de efectos mixtos, una de las aproximaciones con mayor potencial en el análisis poblacional de datos farmacocinéticos. La sección 5.2 detalla el diseño metodológico empleado en el estudio de biodisponibilidad comparada entre nanocristales redispersables de fenbendazol y la mezcla física análoga en ovinos. En la misma sección, se describe el desarrollo de un modelo de farmacocinética poblacional para caracterizar de forma conjunta la absorción y disposición del fármaco y su principal metabolito sulfoxidado (fenbendazol sulfóxido). La siguiente sección, 5.3, resume los principales resultados obtenidos tras un primer análisis no compartimental de los datos colectados, además de presentar los parámetros poblacionales estimados por el modelo poblacional desarrollado. La discusión de este capítulo, sección 5.4, se enfoca en el análisis del efecto producido por los nanocristales en la exposición sistémica a fenbendazol. Además, se discute el impacto que esta tecnología podría tener para la formulación de otros fármacos benzimidazólicos. Finalmente, en la sección 5.5 se presentan las conclusiones del capítulo.

5.1. Marco teórico

5.1.1. Farmacocinética de fármacos benzimidazólicos en rumiantes

El descubrimiento del tiabendazol en la década del 60 y el posterior desarrollo de la familia de los fármacos benzimidazoles antihelmínticos han significado un hito en el tratamiento de las parasitosis tanto en medicina humana como veterinaria. Estos fármacos cuentan con interesantes ventajas sobre otros compuestos, por ejemplo, en relación a su espectro de acción, su eficacia contra diferentes estadíos larvarios, su margen de seguridad y su bajo costo (Lanusse et al., 2013).

El comportamiento farmacocinético y los patrones de metabolización de los fármacos benzimidazólicos antihelmínticos determinarán su capacidad para alcanzar concentraciones adecuadas y sostenidas en el sitio de localización de los parásitos en el organismo hospedero, lo que, a su vez, impactará directamente en su eficacia (Lanusse *et al.*, 1995). Como ya fuera mencionado, su baja solubilidad acuosa suele limitar fuertemente su absorción desde el tracto gastrointestinal y, así, su biodisponibilidad oral. En este sentido, varios autores reportan que es posible mejorar la eficacia terapéutica de algunos benzimidazoles a través del aumento de su solubilidad acuosa y su biodisponibilidad oral (Lanusse y Prichard, 1993; Paredes *et al.*, 2018, Pensel *et al.*, 2018).

La farmacocinética de FBZ en ovinos y otros rumiantes ha sido ampliamente explorada (Düwel, 1977; Hennessy *et al.*, 1993; Knox y Steel, 1997; Lakritz *et al.*, 2015; Lanusse y Prichard, 1993; Lanusse *et al.*, 1995; Lanusse *et al.*, 2014; Marriner y Bogan, 1981; McKellar *et al.*, 2002; Virkel *et al.*, 2004). A modo de resumen, tras su administración oral en bovinos y ovinos, entre el 36 y el 50 % de la dosis se excreta incambiada a través de las heces (Düwel, 1977; Hennessy *et al.*, 1993). Sin embargo, el FBZ, así como el ABZ y otros tioéteres benzimidazólicos comercializados, sufre, también, sulfoxidación microsomal hepática como una de sus principales vías de metabolización en mamíferos.

Estas transformaciones metabólicas se dan en dos etapas de oxidación secuenciales, mediadas por los sistemas enzimáticos flavina-monooxigenasa y citocromo P450 (Capece *et al.*, 2009). En una primera etapa rápida y reversible, el FBZ es convertido a fenbendazol sulfóxido (FBZ-SO), si bien el equilibrio con el tioeter respectivo se desplaza mayormente hacia el compuesto sulfoxidado. A su vez, el FBZ-SO, producto de esta primera etapa, es metabolizado a fenbendazol sulfona (FBZ-SO2), en una etapa más lenta y en menor medida (ver figura 5.1) (Hennessy *et al.*, 1993). Por otra parte, el producto de parahidroxilación del fenilo (FBZ-OH) es el principal metabolito de FBZ encontrado en bilis, heces y orina; pero no es detectado en plasma (ver la figura 5.1).



Figura 5.1: Rutas de metabolización de fenbendazol y su profármaco febantel. Imágen extraída y adaptada de https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/ v29je03.htm.

El FBZ y sus dos metabolitos sulfoxidados, FBZ-SO y FBZ-SO2, son los principales encontrados en plasma tras la administración del compuesto padre a rumiantes. Además, cuando se administra FBZ-SO por vías enterales este puede sufrir sulforeducción a FBZ debido al carácter reductivo del rumen o su reconversión a nivel hepático (Bogan y Marriner, 1983), por lo que también es posible encontrar en plasma los tres compuestos. En relación a su potencia antihelmíntica, los reportes indican que la metabolización de FBZ a FBZ-SO y posteriormente FBZ-SO2 conlleva a una sucesiva disminución en su capacidad para inhibir la polimerización de tubulinas *in vitro*; tanto que el FBZ-SO2 se reporta como inactivo (Lacey *et al.*, 1987). Sin embargo, para dosis de 4.5 mg/kg de FBZ-SO se alcanzan valores de eficacia de los tratamientos similares

a los alcanzados para las dosis estándares de FBZ (5 mg/kg) (Lanusse *et al.*, 2013). Este fenómeno, también observado para ABZ y su principal metabolito, albendazol sulfóxido, puede explicarse por la mejor absorción de los compuesto sulfoxidados desde el tracto gastrointestinal —producto de una mayor solubilidad acuosa respecto a los compuestos padres— lo que compensaría la menor afinidad que presentan los compuestos sulfoxidados por las tubulinas (Lanusse *et al.*, 2013).

En pequeños animales monogástricos y en humanos, una dosis única de estos fármacos suele ser menos efectiva que en oganismos rumiantes. Esta diferencia se debe, por un lado, al menor volumen de líquidos del tracto gastrointestinal y al menor tiempo de recorrido del fármaco (tubos digestivos más cortos) en individuos monogástricos (Lanusse y Prichard, 1993); pero, además, cuando una suspensión o gránulos de benzimidazoles son administrados en rumiantes, las partículas sólidas se distribuyen en el gran volumen del contenido ruminal mezclándose con el alimento, lo que aumenta el tiempo que estos fármacos permanecen en el rumen y retrasa su pasaje al tracto gastrointestinal posterior. En estos casos, el rumen actúa como un reservorio que prolonga el proceso de absorción en comparación con los individuos monogástricos (Lanusse y Prichard, 1993).

Las dos estrategias desarrolladas con mayor éxito para compensar la baja biodisponibilidad de FBZ han sido: la obtención de profármacos más solubles como el febantel (Wollweber *et al.*, 1978; ver figra 5.1) y la administración de formulaciones de FBZ-SO (Marriner y Bogan, 1981), metabolito con mejor solublidad acuosa. Existen también algunos estudios que buscan mejorar la biodisponibilidad de FBZ a través de la aplicación de tecnología farmacéutica (Esfahani *et al.*, 2021; Koohi Moftakhari Esfahani *et al.*, 2022; Varlamova *et al.*, 2020; por citar algunos ejemplos). Sin embargo, el foco de estos trabajos está puesto en el potencial antineoplásico de FBZ, por lo que las preparaciones exploradas suelen ser complejas, con estabilidades delicadas y costos de producción elevados, lo que difícilmente podría tener aplicación a nivel productivo ganadero.

5.1.2. Conceptos básicos de farmacocinética poblacional

Cuando se administra un medicamento a un organismo, este es sometido a diferentes procesos que determinan el perfil de concentraciones que alcanzará el fármaco en los fluidos biológicos, lo que se conoce como respuesta farmacocinética. Estos procesos involucran la absorción y distribución del fármaco, en general a través de vasos del sistema circulatorio y el linfático, su metabolismo y, finalmente, su excreción, a través de orina y heces (Buxton, 2018). Entender los procesos que ocurren y su interrelación, y poder emplear herramientas y principios farmacocinéticos en la terapéutica, aumenta la probabilidad de éxito y, además, puede colaborar en reducir la aparición de efectos adversos.

La farmacocinética clásica describe el comportamiento de un fármaco en una población de individuos a la que se administra una dosis conocida, a través de la determinación de su concentración o la de sus metabolitos a lo largo del tiempo. Para ello, se aplican modelos matemáticos que permiten relacionar la dosis administrada, el tiempo y la concentración medida. La interacción entre medicamento y organismo se ve afectada por numerosos componentes de variabilidad. Por un lado, entre los asociados al medicamento, encontramos variables como la dosis de fármaco, los excipientes empleados, la forma farmacéutica o la tecnología de fabricación. Por otro lado, con relación al organismo, los factores que aportan a la variabilidad farmacocinética comprenden aspectos demográficos (como el género, la edad, la etnia o el peso corporal), ambientales (dieta, consumo de tabaco o xantinas, comedicación), fisiológicosfisiopatológicos (ciclo menstrual, embarazo, menopausia, ritmos circadianos o estados patológicos, entre otros) y también genéticos (polimorfismo enzimático, transportadores de membrana, otros) (Ibarra, 2014).

Si los individuos de una población fueran idénticos, la misma dosis de fármaco contenida en un determinado medicamento, produciría el mismo perfil de concentraciones plasmáticas; sin embargo, debido a los factores de variabilidad mencionados, esto no ocurre. La farmacocinética poblacional, además de estimar los parámetros farmacocinéticos típicos del fármaco en una población definida, lo que se conoce como *efectos fijos*, busca aportar información sobre la variabilidad asociada a estos parámetros. La variabilidad que no puede ser explicada por los *efectos fijos* se caracteriza con parámetros denominados *efectos aleatorios*. Estos incluyen la variabilidad interindividual e interocasión del sistema medicamento-organismo, así como la variabilidad que no puede ser explicada por el modelo farmacocinético, lo que se conoce como *variabilidad residual* (cuantifica la diferencia entre las predicciones del modelo y las observaciones).

Este tipo de análisis permite entonces reconocer y cuantificar, como parte
de los *efectos fijos*, aquellos factores que afectan de forma significativa la variabilidad poblacional de un parámetro (edad, peso, género, entre otros), lo que disminuye la magnitud de los *efectos aleatorios* y se conoce como *explicar la variabilidad*. Esta información puede brindar estrategias para seleccionar la dosis inicial de tratamiento, definir el régimen posológico para una subpoblación determinada o planificar estudios clínicos, entre otros (FDA, 2022). En suma, reducir la variabilidad no explicada de un sistema medicamento-organismo puede impactar directamente en el éxito terapéutico del tratamiento.

La aproximación tradicional para realizar esta caracterización consiste en estimar métricas de exposición, como concentración máxima o área bajo la curva, sin ajustar las observaciones a una función dada por la suposición de un determinado modelo farmacocinético. Esto se conoce como análisis no compartimental. Luego parámetros como el aclaramiento y el volumen de distribución pueden ser calculados a partir de dichas métricas. Este análisis implica la estimación de características farmacocinéticas de cada individuo por separado, para luego estimar los parámetros del grupo de individuos en estudio a través del cálculo de la media y la varianza (Cendrós Carreras, 2007). El análisis no compartimental exige una elevada cantidad de observaciones por individuo para asegurar que los parámetros individuales son estimados con adecuada incertidumbre. Asimismo, individuos con comportamiento atípico pueden sesgar la estimación poblacional en muestras pequeñas.

5.1.2.1. Introducción a los modelos no lineales de efectos mixtos

Para estimar los parámetros farmacocinéticos de una población, los métodos matemáticos más empleados, según Barranco *et al.* (2011), son: el *método en dos fases* y los *modelos no lineales de efectos mixtos* (NMLE). Si bien ambos están constituidos a partir de un modelo farmacocinético y un modelo de regresión, en el *método en dos fases* primero se realiza un ajuste por separado de la cinética de cada individuo al modelo cinético seleccionado, mediante regresión no lineal, y en una segunda fase se analiza estadísticamente el conjunto de parámetros individuales.

Sin embargo, en los modelos NLME se realiza un análisis simultáneo de todos los datos de todos los individuos en una única etapa, sin perder la individualidad de cada sujeto. Esto permite estimar los parámetros farmacocinéticos medios de la población y la forma en que distintos factores afectan o no las concentraciones del fármaco (los llamados *efectos fijos*), así como los *efectos aleatorios* que tienen mayor probabilidad de producirse (variabilidad interindividual, intraindividual y residual). De allí que estos modelos reciben el nombre de *efectos mixtos*; además, se los denomina *no lineales* debido a que las funciones que describen la variable dependiente (concentración) son de naturaleza no lineal.

En el modelado NLME, los efectos aleatorios interindividuales e interocasión describen la distribución de los valores de los parámetros individuales con respecto al valor medio poblacional. Generalmente se asume una distribución log-normal para la discrepancia (η) entre el parámetro individual y el poblacional, con media igual a cero y varianza ω^2 , como se ilustra en la figura 5.2 Por otro lado, las diferencias entre las concentraciones observadas y la predicción del modelo se define como ϵ y representa el error residual, cuya distribución para todas las concentraciones en todos los individuos de la población puede asumirse como normal con media cero y varianza σ^2 (figura 5.3).



Figura 5.2: Variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos. Imagen extraída de Barranco *et. al*, (2011). η : Diferencia entre el parámetro para un individuo y el valor medio de este parámetro en la población; ω : varianza de la distribución.

Una vez obtenidos los estimadores de máxima verosimilitud para los parámetros típicos y los parámetros de variabilidad, es posible estudiar qué covariables son capaces de explicar parte de la variabilidad de determinado



Figura 5.3: Variabilidad residual en un modelo poblacional. Imagen extraída de Barranco et. al, (2011). ϵ : Diferencia entre las concentraciones observadas y las predichas; σ : varianza de la distribución.

parámetro. Esto implica seleccionar covariables que estén relacionadas con los parámetros estudiados, incluirlas en el modelo y analizar cómo afectan la variabilidad aleatoria, es decir, si la variabiliad interindividual o residual son menores.

El modelo final se elige luego de un proceso de optimización utilizando variados indicadores, entre los que resalta la llamada *función objetivo*, derivada de la función de máxima verosimilitud, que en síntesis estima la distancia (residual) entre predicciones y observaciones para todos los sujetos. En este sentido, el modelo final elegido será el que incluya la combinación de parámetros farmacocinéticos y las covariables que expliquen en mayor medida la variabilidad en sus distintos niveles, lo que se logra cuando la *función objetivo* alcanza su mínimo valor. En general, cuanto mayor sea el número de covariables consideradas, menor será el valor de la *función objetivo*. Sin embargo, complejizar el modelo en exceso con mínimo impacto sobre la reducción de variabilidad residual, carece de sentido y compromete el modelo en términos estadísticos. En este sentido, se busca el modelo que mejor prediga los resultados pero incluyendo el menor número de covariables, lo que se conoce como aplicar el *principio de parsimonia*. Para esto se suele penalizar la *función objetivo* con el número de parámetros del modelo, estimando indicadores como el Criterio de Información de Akaike (AIC), que permiten comparar en iguales condiciones modelos conteniendo diferente cantidad de parámetros.

La ventaja de los modelos NLME sobre un análisis no compartimental o un método en dos fases (compartimental) es que posibilita el análisis de datos muy diversos y datos escasos (pocas observaciones por individuo). Cendrós (2007) resume que, en este tipo de análisis, es posible incluir datos de administraciones intravenosas y extravasales, estudiar a la vez varios niveles de dosis o ajustar perfiles farmacocinéticos de individuos sobre los que se realizaron escasas observaciones, entre otras bondades. Además, el autor destaca el potencial de estos modelos para realizar simulaciones cuando se conocen los parámetros medios de una población, tanto para obtener parámetros individuales de nuevos individuos de la población no incluídos en el análisis como para realizar simulaciones de nuevas dosis y regímenes posológicos.

5.2. Metodología

5.2.1. Estudio de farmacocinética comparativa en ovinos de nanocristales y mezclas físicas de fenbendazol

5.2.1.1. Animales de experimentación

El estudio se realizó utilizando seis ovinos Corridale machos, libres de parásitos con una media de peso de 21.0 ± 2.3 kg. Durante el experimento y los 20 días anteriores, los animales se mantuvieron estabulados en interiores, fueron alimentados con ración concentrada equilibrada comercial y se les suministró agua ad libitum. Los procedimientos y protocolos de manejo animal fueron aprobados por el Comité de Ética de acuerdo con la Política de Bienestar Animal (acta 087/02) de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina (www.vet.unicen.edu.ar). Estos experimentos se realizaron bajo la supervisión del Dr. Luis Ignacio Álvarez en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Tandil, Argentina).

5.2.1.2. Diseño experimental

El experimento se realizó siguiendo un diseño cruzado de dos fases, con un período de *wash-out* de 13 días entre ellas. Cada fase contó con dos grupos de tres ovinos que fueron tratados por vía intraruminal con una dosis de 5 mg/kg de FBZ en forma de NCR10 o MF análoga en composición (50 % p/p de P188, ver apartado 4.2.1 de esta Tesis). A los 13 días posteriores a la administración de la primera dosis, se volvió a tratar los grupos intercambiando los tratamientos (n = 6 para cada tratamiento).

5.2.1.3. Preparaciones administradas

Las preparaciones fueron administradas en forma de suspensiones de FBZ al 2 % p/v, preparadas inmediatamente antes de la administración a partir de los polvos de NCR10 o la MF análoga en composición (50 % de FBZ). Para ello, se pesó exactamente la cantidad de formulación a administrar según el peso de cada ovino y se agregó la cantidad necesaria de agua destilada a la formulación sólida previamente pesada, agitando vigorosamente durante 5 minutos.

5.2.1.4. Obtención de plasma y procesamiento de muestras

La toma de muestras de sangre se realizó antes del tratamiento (tiempo 0) y a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 28, 32, 48, 60 y 72 horas después de la administración de las preparaciones en tubos heparinizados. Inmediatamente después de la recolección de sangre, se separó el plasma por centrifugación durante 15 minutos a 3000 x g. Las muestras de plasma se colocaron en viales de plástico y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

El procesamiento de las muestras de plasma colectadas de los animales se realizó como sigue. Alícuotas de 1 mL de plasma se enriquecieron con 20 μ L de flubendazol (solución stock 26 μ g/mL), empleado como estándar interno. Los analitos se extrajeron mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos desechables Strata C18-T (Phenomenex, CA, EE.UU.), previamente acondicionados con 1 mL de metanol y 1 mL de agua ultrapura. Las muestras se incorporaron en los cartuchos, se lavaron con 1 ml de agua ultrapura y se eluyeron con 2 mL de metanol calidad HPLC. El eluato se evaporó hasta sequedad a 40 °C bajo flujo de nitrógeno empleando un evaporador TurboVap LV (Zymark, Warrington, UK), finalmente, se reconstituyó con 250 μ l de metanol calidad HPLC y se analizó por HPLC.

5.2.1.5. Análisis por HPLC de las muestras

El análisis de las muestras procesadas se realizó empleando un sistema HPLC LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japón) con loop de inyección de 50 μ L, muestreador automático SIL-10AF (Schimadzu, Kyoto, Japón) y detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu, Kioto, Japón). Se utilizó una columna de separación de fase reversa C18 Zorbax Eclipse XBD (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m, Agilent, California, EE.UU.) y los cromatogramas se analizaron utilizando el software Class LC10 SPD-10A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido acético (0.5 % v/v) y acetonitrilo en relación 80:20 al inicio de la corrida (condiciones iniciales), y se empleó un flujo constante de 1 mL/min a 35 °C.

El gradiente empleado fue el siguiente: 1) se mantuvo el sistema en con-

diciones iniciales durante 3 minutos; 2) se incrementó el componente orgánico hasta alcanzar a los 7 minutos una composición 30:70; 3) se volvió en 2 minutos a condiciones iniciales; 4) se mantuvo el sistema en condiciones iniciales durante 3 minutos. Los tiempos de retención de los analitos utilizando este gradiente fueron: 8.9, 10.9, 11.7 y 12.9 minutos para FBZ-SO, FBZ-SO2, flubendazol (estándar interno) y FBZ, respectivamente. Las medidas se realizaron midiendo a 289 nm.

5.2.1.6. Validación de la técnica analítica

Para este análisis, se realizó previamente una curva de calibración empleando muestras de plasma blanco¹ enriquecido con concentraciones conocidas de estándares puros de FBZ y los metabolitos esperados². El rango de las curvas de calibración fue de 0.05 a 1.00 μ g/mL, donde se comprobó linealidad con coeficientes de correlación superiores a 0.999. La recuperación absoluta de los tres analitos en estudio se estimó mediante la comparación de las áreas de las señales de plasma enriquecido (procesadas igual que las muestras problema) contra el área de inyecciones directas de los estándares disueltos en metanol y osciló entre 77.3 y 91.8 %, con coeficientes de variación menores a 10.3 %. El límite de cuantificación se definió como la mínima concentración medida de la curva de calibración con un coeficiente de variación menor a 20.0 %, precisión de \pm 20 % y recuperación absoluta mayor a 70 %. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EE.UU.).

5.2.2. Estudio farmacocinético no compartimental y modelado poblacional de los datos

5.2.2.1. Análisis no compartimental

Se aplicaron criterios estadísticos para el análisis de las curvas de concentración plasmática en función del tiempo, con el fin de obtener métricas representativas sin considerar el concepto farmacocinético de compartimento.

 $^{^1\}mathrm{Plasma}$ extraído de ovinos que no recibieron tratamiento con FBZ ni otros benzimidazoles antihelmínticos.

 $^{^2 \}rm Los patrones de trabajo de los derivados oxidados de FBZ (FBZ-SO y FBZ-SO2) fueron obtenidos mediante síntesis química y purificados en colaboración con el M.Sc. Ramiro Teixeira bajo la supervisión del Dr. Eduardo Manta.$

El análisis se realizó de forma de obtener las métricas farmacocinéticas de cada individuo para cada uno de los tratamientos (NCR y MF) y cada uno de los analitos. Posteriormente se calcularon las medias y varianzas de cada métrica para cada analito en los dos grupos estudiados (NCR y MF).

Las métricas farmacocinéticas se calcularon empleando el software PK SolutionsTM versión 2.0.2 (Summit Research Services, Ashland, Ohio, EE.UU.) y fueron: concentración máxima (C_{max} , $\mu g/mL$); tiempo de concentración máxima (t_{max} , h); área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el tiempo final de muestreo ($AUC_{o-t} \mu g.h/mL$); y la semivida de eliminación ($t_{1/2el}$, h). Las medias se compararon mediante una prueba t de Student, pareada, con nivel de confianza de 95 %, para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos, utilizando GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.)

5.2.2.2. Modelado de farmacocinética poblacional

Se desarrolló un modelo NLME para caracterizar la farmacocinética de FBZ y FBZ-SO con un enfoque poblacional y evaluar el efecto del tipo de preparación sobre la biodisponibilidad y la disposición del fármaco. La estimación de parámetros se realizó en el software MonolixSuite® 2019 R2 (Lixoft, SimulationsPlus), utilizando el algoritmo de Maximización de Expectativas de Aproximación Estocástica (SAEM, por sus siglas en inglés) (Savic *et al.*, 2011). Para construir el modelo base se realizó un ajuste simultáneo de los compuestos padre (FBZ) y metabolito (FBZ-SO), dado que se contaba con un conjunto de datos importante para ambos compuestos¹.

El desarrollo del modelo fue guiado tanto por métricas como por diagnósticos gráficos. Se utilizó el AIC como métrica principal para evaluar el peso de la complejidad del modelo en el ajuste general, siguiendo el principio de parsimonia. Además, también se consideraron, para guiar el análisis, la incertidumbre en la estimación de parámetros y la plausibilidad de los resultados cuantitativos. En relación con los diagnósticos gráficos empleados, se evaluaron gráficos de bondad de ajuste basados en estimaciones de parámetros. Entre ellos: gráficos de la distribución de los residuales individuales ponderados (IWRES) y los residuales poblacionales ponderados (PWRES), gráficos de IWRES y PWRES en función de la concentración y el tiempo, gráficos de observaciones versus

 $^{^1\}mathrm{El}$ metabolito FBZ-SO2 no se consideró en este análisis debido a su nula contribución al resultado farmacocinético.

predicciones individuales y poblacionales, y gráficos de correlación de efectos aleatorios. Por último, se empleó la verificación predictiva visual (VPC) como un diagrama de diagnóstico clave basado en simulación (Karlsson y Savic, 2007).

Se evaluaron modelos farmacocinéticos monocompartimentales y bicompartimentales para describir la disposición de FBZ y FBZ-SO. Se consideró que todos los procesos de transferencia de fármaco seguían una cinética de primer orden. Para asegurar la identificabilidad de los parámetros, se asumió que la fracción de FBZ metabolizada que conduce a FBZ-SO es 1. Los diferentes modelos evaluados para caracterizar la absorción oral de FBZ fueron: absorción inmediata de orden cero; absorción inmediata de primer orden; absorción de primer orden con tiempo de latencia; y modelo de absorción con compartimiento de tránsito. La variabilidad interindividual (BSV) (variabilidad entre sujetos) y la variabilidad interocasión (BOV) (variabilidad entre ocasiones) se evaluaron para todos los parámetros farmacocinéticos asumiendo una distribución lognormal en los efectos aleatorios (es decir, las discrepancias entre el individuo y la población estimada), como se describe a continuación (ecuación 5.1):

$$\theta_i = \theta pop \cdot e^{\eta_i} \tag{5.1}$$

Donde θ_i es el parámetro estimado para el i-ésimo sujeto, θ_{pop} el valor típico para la población y η_i la discrepancia entre θ_i y θ_{pop} , para la cual se asume una distribución normal con media cero y varianza ω^2 . BSV y BOV se expresaron como coeficiente de variación (CV), estimado a partir de la varianza respectiva como (ecuación 5.2):

$$CV = 100\sqrt{e^{\omega^2 - 1}}$$
 (5.2)

El efecto del peso corporal sobre los parámetros de disposición farmacocinética se incluyó al inicio del análisis según el modelo alométrico. Por lo tanto, las estimaciones de población (θ_{pop}) para el *clearence* (CL) y el volumen de distribución (VD) de FBZ y FBZ-SO se parametrizan de la siguiente manera (ecuación 5.3):

$$\theta_{pop} = \theta_{pop_{20}} \cdot \left(\frac{WT_i}{20}\right)^{\mathrm{b}} \tag{5.3}$$

siendo $\theta_{pop_{20}}$ la estimación típica para un animal de 20 kg, WT_i el peso corporal individual y b el parámetro de escala alométrico, que se fijó en 0.75 y 1 para CL y VD, respectivamente.

La variabilidad residual se describió para ambos compuestos utilizando un modelo de error combinado (ecuación 5.4):

$$Y_{ij} = C_{ij} \left(1 + e, \operatorname{prop}_{ij} \right) + e, add_{ij}$$
(5.4)

Donde Y_{ij} representa la concentración observada y C_{ij} denota la concentración predicha para el i-ésimo sujeto en el momento j. El error residual para cada observación tiene, por lo tanto, un componente aditivo C_{ij} y un componente proporcional $e, prop_{ij}$ que se distribuyen normalmente con media de 0 y varianzas σ_{add}^2 y σ_{prop}^2 , respectivamente.

Una vez definido el modelo base, se evaluó el efecto de la formulación sobre los parámetros farmacocinéticos poblacionales mediante la siguiente parametrización (ecuación 5.5):

$$\theta_{SDNC} = \theta_{PM} \cdot e^{\beta_{SDNC}} \tag{5.5}$$

Siendo θ_{NCR} y θ_{MF} las estimaciones de los parámetros para las formulaciones NCR de FBZ y su MF, respectivamente, y β_{NCR} el efecto de formulación vinculado a la formulación NCR (fijado a 1 para la formulación MF). Para evaluar la significación estadística de un efecto de formulación sobre un parámetro dado, analizamos la mejora de ajuste medida con el valor de la función objetivo (OFV) proporcionado por Monolix. Esta métrica corresponde al logaritmo dos veces negativo de la función logarítmica de verosimilitud. Suponiendo una distribución de chi-cuadrado para la diferencia en el OFV, un único efecto de covariable se consideró significativo (p < 0.05) cuando el OFV se redujo en al menos 3.84 unidades (prueba de razón logarítmica de verosimilitud).

Además, se evaluó la importancia de la magnitud de cada efecto covariable β_{NCR} mediante una prueba de Wald. Se mantuvieron e incluyeron aquellas relaciones significativas entre parámetros y covariables en el modelo completo. Posteriormente, se evaluaron estos efectos nuevamente eliminándolos del modelo, confirmando la importancia de cada relación preparación-parámetro, cuando se observó un aumento en el OFV de al menos 10.9 unidades (p < 0.01) después de su eliminación del modelo completo. El modelo final se reevaluó mediante gráficos de bondad de ajuste y otras métricas relevantes, como

se mencionó anteriormente.

5.3. Resultados

Los perfiles medios de concentración plasmática de FBZ, FBZ-SO y FBZ-SO2 en función del tiempo obtenidos tras la administración de FBZ intraruminal en forma de NCR10 o su MF análoga se muestran en la figura 5.4. Los resultados muestran que el fármaco administrado fue ampliamente metabolizado en ambos grupos experimentales, siendo FBZ-SO el analito recuperado en mayor cantidad, seguido por FBZ y FBZ-SO2, respectivamente. En estos gráficos también se observa que las concentraciones plasmáticas alcanzadas para los tres analitos son mayores cuando el fármaco se administra como nc, en comparación con la administración de fármaco como MF.

5.3.1. Análisis no compartimental de los datos

Las métricas farmacocinéticas medias obtenidas a través del análisis no compartimental de los datos se resumen en la tabla 5.1. De esta tabla se desprende que tanto el AUC como la C_{max} calculadas fueron significativamente mayores (p < 0.05) para los tres analitos luego de la administración de FBZ como NCR en comparación con la administración de la MF. En relación con las demás métricas calculadas, si bien se observa una tendencia para FBZ y FBZ-SO a alcanzar antes en el tiempo sus respectivas C_{max} tras la administración de los NCR (menores t_{max} que para las MF), las diferencias no son significativas (p < 0.05). Asimismo, tampoco se observan diferencias significativas en cuanto a la semivida de eliminación de los analitos (p < 0.05).

5.3.2. Análisis poblacional de los datos

El mejor ajuste de los datos de concentración plasmática de FBZ y FBZ-SO en función del tiempo se obtuvo a través de un modelo monocompartimental, caracterizado a través de los siguientes parámetros: volumen de distribución aparente (VD), clearence (CL), absorción de FBZ con cinética de primer orden (k_a) y tiempo de latencia (t_{lag}) . Las estimaciones de estos parámetros obtenidas a través del modelo final se detallan en la tabla 5.2. También en la tabla 5.2, se presentan los valores estimados de BSV del VD y el CL para el



Figura 5.4: Perfiles plasmáticos de fenbendazol (FBZ, a), fenbendazol sulfóxido (FBZ-SO, b) y fenbendazol sulfona (FBZ-SO2, c), luego de la administración de una dosis intraruminal de 5 mg/kg de FBZ como nanocristales redispersables (NCR10, línea continua) o la mezcla física análoga en composición (línea punteada).

fármaco padre y los valores estimados de BOV (es decir, la variabilidad para un mismo individuo en las diferentes *ocasiones*) fueron significativos para los tres

Tabla 5.1: Análisis no compartimental de los resultados: métricas farmacocinéticas (media \pm SD) para fenbendazol, fenbendazol sulfóxido y sulfona en plasma ovino, obtenidas luego de la administración intraruminal de fenbendazol (5 mg/kg, n=6) preparado como nanocristales redispersables o mezcla física

	FBZ		FBZ-SO		FBZ-SO2	
	NCR10	\mathbf{MF}	NCR10	\mathbf{MF}	NCR10	\mathbf{MF}
C_{max} ($\mu g/mL$)	$0.35 \pm 0.15(a)$	$0.1~6\pm 0.03(a)$	$0.64 \pm 0.19(b)$	$0.32 \pm 0.05(b)$	$0.14{\pm}0.04(c)$	$0.08{\pm}0.01(\mathrm{c})$
t_{max} (h)	8.3 ± 2.3	17.0 ± 9.4	20.3 ± 7.8	27.7 ± 10.5	46.7 ± 10.3	46.7 ± 10.3
AUC_{o-t} (µg.h/mL)	$10.1 \pm 2.2(d)$	$5.1\pm0.5(\mathrm{d})$	$25.9 \pm 6.1(e)$	$13.1 \pm 1.2(e)$	$7.3 \pm 2.1(f)$	$3.6{\pm}0.7({\rm f})$
$t_{1/2el}$ (h)	14.0 ± 8.2	13.1 ± 6.4	18.2 ± 6.4	17.1 ± 4.1	41.0 ± 30.6	$38.0{\pm}25.2$

Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre métricas farmacocinéticas (p < 0.05). FBZ: fenbendazol; FBZ-SO: fenbendazol sulfóxido; FBZ-SO2: fenbendazol sulfona; NCR10: nanocristales redispersables de fenbendazol con 50 % p/p de P188; MF: mezcla física análoga en composición a los NCR11; C_{max} : concentración plasmática máxima; t_{max} : tiempo de concentración máxima; AUC_{o-t} : área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo desde cero hasta el tiempo final de cuantificación; $t_{1/2el}$: semivida de eliminación.

parámetros de absorción: k_a , t_{lag} y la biodisponibilidad (F) de FBZ. Todos los parámetros fueron estimados con precisión aceptable. En la figura 5.5, el VPC estratificado por preparación muestra la bondad de ajuste del modelo, donde se observa cómo las simulaciones obtenidas con el modelo propuesto reproducen las tendencias centrales de los datos experimentales y su variabilidad.

A través del modelo propuesto, se encontró que el tipo de preparación (NCR o MF) afectó significativamente tanto la F como el t_{lag} . De hecho, se encontró que la F estimada para los NCR fue 1.92 veces mayor que la obtenida tras administrar la MF, y el t_{lag} fue significativamente menor (0.54 horas en los NCR frente a 3.3 horas en la MF). Estos datos corroboran la absorción mejorada descrita a través del análisis no compartimental para el FBZ después de su administración como NCR. Por otra parte, los parámetros de disposición de FBZ y FBZ-SO no se vieron afectados por el tipo de preparación. El modelado poblacional de los resultados permitió estimar la semivida de absorción¹ de FBZ en 18.6 horas y las semividas de eliminación² de FBZ en 2.8 horas y FBZ-SO en 4.3 horas. Estos datos sugieren la presencia del fenómeno de *flip-flop*, donde la absorción del compuesto es un proceso más lento que su eliminación.

¹Calculada como $\ln 2/k_a$

 $^{^{2}}$ Calculada como (ln2*VD)/CL



Figura 5.5: Gráficos de verificación predictiva visual (VPC) para fenbendazol, estratificados por tipo de preparación. Se representan: la mediana de las simulaciones del modelo propuesto (línea roja punteada); la mediana de los datos experimentales colectados (línea negra continua); el intervalo de predicción del modelo para el percentil 50 (sombra azul); y las observaciones experimentales (puntos negros).

5.4. Discusión

Como ya fuera mencionado, el cálculo de la eficiencia de disolución (ED) incluye dos variables estrechamente relacionadas con la absorción de fármacos desde el tracto gastrointestinal: la concentración de fármaco disuelto y la ventana de tiempo en la que permanece en solución (Khan, 1975). En este sentido, los resultados de la biodisponibilidad mejorada de FBZ obtenidos cuando se administra la preparación de NC confirman lo esperado según los altos valores ED calculados a partir de los resultados de disolución *in vitro* (ver apartado 4.3.2 de esta Tesis).

Por otra parte, los resultados de los parámetros estimados mediante el análisis farmacocinético poblacional indican que el proceso de eliminación de FBZ es más rápido que su proceso de absorción, lo que indicaría la presencia de una cinética de tipo *flip-flop* cuando se administra FBZ por vía oral en ovinos. Este fenómeno fue anteriormente reportado en estudios que evaluaron la exposición a FBZ en cerdos y alpacas luego de su administración oral e intravenosa

Parámetro (unidades)	Estimado final $(RSE\%)$
k_a (h-1)	0.0373(9.6)
t_{lag} (h)	3.3(29.2)
VD (L)	75.0(22.3)
CL (L.h-1)	18.5(8.7)
VD_m (L)	43.0(9.7)
CL_m (L.h-1)	6.97(7.9)
β NCR- t_{lag}	-1.800(25.4)
β NCR-F	0.66(16.7)
BSV VD $(\%)$	48.66(33.5)
BSV CL ($\%$)	7.77(42.7)
BOV k_a (%)	31.33(22.7)
BOV t_{lag} (%)	80.81 (23.7)
BOV F (%)	18.24(22.5)
a1 $(\mu g/mL)$	0.0094(21.3)
b1	0.1290(10.8)
$a2 (\mu g/mL)$	0.0103(8.9)
b2	0.1180(2.0)

 Tabla 5.2: Parámetros farmacocinéticos poblacionales de fenbendazol y fenbendazol sulfóxido en ovinos

Los parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados para FBZ y FBZ-SO y los efectos medidos del tipo de preparación en t_{lag} (β NCR- t_{lag}) y en la biodisponibilidad (β NCR-F) se informan como la media y su RSE % (entre paréntesis). El RSE % representa la estimación de la incertidumbre. La variabilidad interindividual (BSV) y la variabilidad interocasión (BOV) se reportan como coeficientes de variación. al y b1: estimadores de los parámetros aditivos y proporcionales del modelo de error residual para FBZ, respectivamente; a2 and b2: estimadores de los parámetros aditivos y proporcionales del modelo de error residual para FBZ, respectivamente; a5, respectivamente; FBZ: fenbendazol; FBZ-SO: fenbendazol sulfóxido; k_a : constante de absorción de FBZ primer orden; CL: clearence de FBZ para un ovino de 20 kg; CL_m : clearence de FBZ-SO para un ovino de 20 kg; VD_m : volumen de distribución aparente de FBZ-SO para un ovino de 20 kg; VD_m : volumen de distribución aparente de FBZ-SO para un ovino de 20 kg; VD_m : volumen de FBZ; F: biodisponibilidad de FBZ.

(Lakritz *et al.*, 2015; Petersen y Friis, 2000). Ambos reportes informan un aumento en la semivida de eliminación de FBZ luego de su administración oral respecto a la vía parenteral: 2.59 a 8.38 horas en cerdos; y de 5.9 a 23.0 horas en alpacas. De acuerdo con estas observaciones, la disminución de las concentraciones de FBZ y FBZ-SO en la fase terminal de la curva de concentración en función del tiempo en ovinos estarían principalmente regidas, o limitadas, por la velocidad de absorción del fármaco padre, al igual que ocurre en el caso presentado en este trabajo.

Este comportamiento donde la absorción es un proceso más lento que la eliminación de fármaco, podría explicarse por la velocidad de disolución limitada del fármaco en el medio gastrointestinal. Sin embargo, de ser esa la única razón, se esperarían diferencias en la constante de absorción estimada según el tipo de preparación, lo cual no se evidenció (la magnitud de la semivida de absorción estimada fue de 18.6 horas para ambas preparaciones). Este resultado sugiere que, además, podrían estar ocurriendo otros procesos a nivel presistémico como, por ejemplo, recirculación enterohepática. Este proceso ha sido reportado por Hennessy *et al.* (1993), quienes demostraron que tanto FBZ como FBZ-SO sufren recirculación enterohepática cuando son administrados de forma intraruminal en ovinos.

En conjunto, la velocidad de disolución limitada del fármaco y su recirculación enterohepática, podrían conducir a un ingreso sostenido de FBZ a la circulación sistémica. Estos fenómenos podrían estar enmascarando posibles diferencias en la velocidad de ingreso o eliminación de FBZ relacionadas con el tipo de preparación administrada. Si bien no es posible aportar evidencia en este sentido, el perfil de disolución *in vivo* más eficiente para los NCR se traduce *in vitro* tanto en el menor tiempo de latencia estimado para esta preparación respecto a la MF como por la mayor extensión de fármaco absorbido cuando se administran los NCR. Algunos autores reportan que las velocidades de absorción lentas y los reciclajes enterales prolongados de algunos benzimidazoles se relacionan con mejores eficacias (Hennessy *et al.*, 1989; McKellar, Scott *et al.*, 1990), por lo que el nulo impacto del tipo de preparación en la velocidad de absorción podría resultar incluso positivo.

El comportamiento farmacocinético de FBZ y FBZ-SO cuantificado en plasma se describió mejor mediante modelos de disposición de un solo compartimento parametrizados con el volumen de distribución aparente (VD) y el clearence (CL). La absorción de FBZ se caracterizó como una cinética de primer orden (k_a) con tiempo de latencia (t_{lag}) . A través del estudio poblacional, se pudo determinar que la variabilidad interocasión (BOV) fue significativa en los parámetros de absorción k_a , t_{lag} y el grado de FBZ absorbido (F), además, todos los parámetros se pudieron estimar con una precisión aceptable.

Como se mencionó anteriormente, los benzimidazoles como FBZ son potentes moléculas antihelmínticas con muy baja solubilidad en agua. Esta limitación afecta directamente su proceso de disolución y absorción tanto en organismos monogástricos como en rumiantes y, en consecuencia, restringe su biodisponibilidad sistémica y eficacia clínica, contribuyendo al desarrollo de fenómenos de resistencia (Lanusse y Prichard, 1993). Aunque se han descrito varios enfoques tecnológicos para aumentar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua en organismos monogástricos a través de la mejora de la solubilidad acuosa del fármaco y la disolución *in vitro*, muchos de ellos no garantizan, necesariamente, una mayor biodisponibilidad del fármaco en rumiantes. Por ejemplo, el uso de ciclodextrinas que resulta exitoso para aumentar la biodisponibilidad de benzimidazoles en organismos monogástricos como ratones, resulta no ser una formulación óptima para rumiantes debido a la degradación ruminal de la ciclodextrina (Ceballos *et al.*, 2012).

Sin embargo, a pesar de la complejidad del sistema digestivo de los rumiantes en comparación con el de individuos monogástricos y los desafíos particulares que trae aparejados, los procesos que conducen a la absorción del fármaco luego de que se administra una formulación sólida (por ejemplo, un bolo) no difieren notablemente de lo que ocurre en humanos: la formulación debe desintegrarse para dar paso a la disolución del fármaco y su consecuente absorción. Si la velocidad de disolución o absorción del fármaco son lentas, las probabilidades de no alcanzar concentraciones sanguíneas efectivas del fármaco son elevadas, incluso si la extensión de la absorción llega a ser completa (Koritz, 1983). Para la preparación de NCR10, fue posible constatar que la mejora de la disolución se correlaciona con una mayor exposición al fármaco en plasma en el rumiante de interés, lo que confirma el potencial de las aplicaciones de la nanotecnología en la administración racional de compuestos terapéuticos con limitaciones de solubilidad acuosa en rumiantes.

Aunque se ha trabajado para buscar estrategias farmacéuticas alternativas para mejorar la disponibilidad sistémica de antihelmínticos poco solubles en agua para uso en especies productivas, generalmente estos compuestos están disponibles comercialmente para uso veterinario como suspensiones para administración oral. Si bien la suspensión comercial de FBZ no se probó *in vivo* en este trabajo, su perfil de disolución y la ED calculadas y presentadas en el capítulo anterior fueron muy similares a los obtenidos para la MF. Esto sugiere que el rendimiento *in vivo* de la formulación de NCR probablemente sea significativamente superior en comparación con la suspensión comercializada.

Por último, Barrère *et al.* (2012) han estudiado la frecuencia de la correlación entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen del isotipo 1 de β -tubulina en *H. contortus* (GRU-1)¹, que confieren resistencia a benzi-

¹Se pueden utilizar tres mutaciones como marcadores para la detección de resistencia en *H. contortus*: en las posiciones 200 y 167 (ambos TTC a TAC, es decir Phe por Tyr), los cuales son estudiados en el trabajo de Barrère *et al.* (2012) o en la posición 198 (GAA a GCA). En este trabajo todos parásitos genotipados fueron GAA en el codón 198 (es decir, no resistentes en este codon).

midazoles antihelmínticos, y la eficacia de tratamientos con dosis crecientes de ABZ (5, 15 y 45 mg/kg). Los autores demuestran que emplear una dosis de hasta nueves veces la recomendada para el tratamiento de ovinos infectados con *H. contortus* (45 mg/kg), no es efectiva para eliminar la polación de parásitos homocigotas resistentes en la posición 200, y detectan una fuerte relación entre las dosis de ABZ crecientes y un aumento en la frecuencia del SNP en esta posición. Por otra parte, también demuestran que son necesarias dosis de hasta tres veces la recomendada (15 mg/kg) para disminuir las poblaciones de parásitos heterocigotas resistentes en ambos codones a la vez (200 y 167).

Estos hallazgos sugieren que un aumento en la biodisponibilidad de FBZ logrado con la formulación de NCR podría ser prometedor para el tratamiento de ciertas poblaciones de *H. contortus* (por ejemplo, heterocigotas resistentes a benzimidazoles en un único codón, 200 o 167, o incluso heterocigotas en ambos codones a la vez). Sin embargo, se presentará el inconveniente de seleccionar los nematodos homocigotas resistentes en la posición 200 (los cuales sobrevivirían y podrían empeorar el cuadro en siguientes infecciones). Sin embargo, la formulación de nuevos fármacos (para los cuales no se haya generado resistencia) mediante este tipo de sistemas de liberación colaborarían en disminuir los eventos de subdosificación y la variabilidad de los tratamientos. En este sentido, podrían colaborar en el retraso de la aparición de resistencia en poblaciones aún susceptibles.

5.5. Conclusiones del capítulo

En conclusión, fue posible lograr una mejora significativa de la biodisponibilidad de FBZ en ovinos, correlacionada con una mejora en la eficiencia del proceso de disolución *in vitro*. Además, por primera vez, se estimaron parámetros farmacocinéticos poblacionales de fenbendazol y su sulfóxido en ovinos. De hecho, el proceso de eliminación relativamente más corto de fenbendazol, en contraste con su absorción, sugiere una cinética de *flip-flop* para este fármaco en el organismo estudiado, por lo que la capacidad de la formulación para lograr una exposición sistémica mayor y más prolongada del fármaco podría ser esencial para lograr un efecto mayor.

Los resultados resumidos y discutidos en este capítulo, utilizando FBZ como modelo de fármaco, muestran la preparación de nanocristales redispersables como una opción prometedora para reformular otros antihelmínticos de uso veterinario ya disponibles en el mercado. Además, resultan alentadores para continuar hacia el estudio *in vivo* de los NCR de VAL-FBZ preparados y presentados en el capítulo 4.

Parte de los resultados y la discusión presentados en este capítulo, se encuentran recogidos en el trabajo titulado *Improving the in vitro dissolution* rate and pharmacokinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals (Melian et al., 2022). Esta publicación puede encontrarse en el apéndice 7, al final del manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Barranco Garduño, L. M., Neri Salvador, J. C., Molina, H. L., Carrasco Portugal, M. d. C., Flores Murrieta, F. J., y Patiño Camacho, S. I. (2011). La farmacocinética poblacional y su importancia en la terapéutica. Medicina Interna de México, 27(4).
- Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., y Prichard, R. K. (2012). Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β-tubulin isotype 1 encoding gene in Haemonchus contortus. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 344-349.
- Bogan, J., y Marriner, S. (1983). Pharmacokinetics of albendazole, fenbendazole and oxfendazole. En Veterinary Pharmacology and Toxicology (pp. 235-240). Springer.
- Buxton. (2018). Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism and Elimination. En L. Brunton, B. Knollmann y R. Hilal-Dandan (Eds.).
- Capece, B. P., Virkel, G. L., y Lanusse, C. E. (2009). Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: pharmacological implications. *The Veterinary Journal*, 181(3), 241-250.
- Ceballos, L., Moreno, L., Torrado, J. J., Lanusse, C., y Alvarez, L. (2012). Exploring flubendazole formulations for use in sheep. Pharmacokinetic evaluation of a cyclodextrin-based solution. *BMC veterinary research*, 8(1), 1-10.
- Cendrós Carreras, J. M. (2007). Estudio farmacocinético de análogos de la somatostatina (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona. http://www. tesisenred.net/handle/10803/1612
- Düwel, D. (1977). Fenbendazole. II. Biological properties and activity. Pesticide Science, 8(5), 550-555.

- Esfahani, M. K. M., Alavi, S. E., Cabot, P. J., Islam, N., y Izake, E. L. (2021). PEGylated Mesoporous Silica Nanoparticles (MCM-41): A promising carrier for the targeted delivery of fenbendazole into prostrate cancer cells. *Pharmaceutics*, 13(10), 1605.
- FDA, (2022). Population Pharmacokinetics: guidance for industry (August). Center for Drug Evaluation, Research, U.S. Food y Drug Administration (FDA). https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fdaguidance-documents/population-pharmacokinetics
- Hennessy, D., Steel, J., Lacey, E., Eagleson, G., y Prichard, R. (1989). The disposition of albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology* and Therapeutics, 12(4), 421-429.
- Hennessy, D., Steel, J., y Prichard, R. (1993). Biliary secretion and enterohepatic recycling of fenbendazole metabolites in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 16(2), 132-140.
- Ibarra, M. (2014). Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de los medicamentos (Tesis doctoral). Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Karlsson, M., y Savic, R. (2007). Diagnosing model diagnostics. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 82(1), 17-20.
- Khan, K. (1975). The concept of dissolution efficiency. *Journal of pharmacy* and pharmacology, 27(1), 48-49.
- Knox, M., y Steel, J. (1997). Effects of diet and species on the pharmacokinetics of fenbendazole in cattle. Veterinary Research Communications, 21(1), 37-43.
- Koohi Moftakhari Esfahani, M., Alavi, S. E., Cabot, P. J., Islam, N., y Izake, E. L. (2022). β-Lactoglobulin-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles: A Promising Carrier for the Targeted Delivery of Fenbendazole into Prostate Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 14(4), 884.
- Koritz, G. (1983). Influence of ruminant gastrointestinal physiology on the pharmacokinetics of drugs in dosage forms administered orally. En Veterinary pharmacology and toxicology (pp. 151-163). Springer.
- Lacey, E., Brady, R., Prichard, R., y Watson, T. (1987). Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Veterinary parasitology*, 23(1-2), 105-119.

- Lakritz, J., Linden, D., Anderson, D. E., y Specht, T. A. (2015). Plasma concentrations of fenbendazole (FBZ) and oxfendazole in alpacas (Lama pacos) after single intravenous and oral dosing of FBZ. Veterinary Medicine: Research and Reports, 6, 71.
- Lanusse, C., Álvarez, L., y Lifschitz, A. (2014). Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary parasitology*, 204 (1-2), 18-33.
- Lanusse, C., Álvarez, L., Lifschitz, A., y Suárez, G. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. En C. A. Fiel y A. Nari (Eds.), Bases farmacológicas de la terapéutica antihelmíntica (pp. 223-254). Hemisferio Sur.
- Lanusse, C., Gascon, L., y Prichard, R. (1995). Comparative plasma disposition kinetics of albendazole, fenbendazole, oxfendazole and their metabolites in adult sheep. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 18(3), 196-203.
- Lanusse, C., y Prichard, R. K. (1993). Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug metabolism reviews*, 25(3), 235-279.
- Marriner, S., y Bogan, J. (1981). Pharmacokinetics of oxfendazole in sheep. American journal of veterinary research, 42(7), 1143-1145.
- McKellar, Q., Gokbulut, C., Muzandu, K., y Benchaoui, H. (2002). Fenbendazole pharmacokinetics, metabolism, and potentiation in horses. Drug Metabolism and Disposition, 30(11), 1230-1239.
- McKellar, Q., Scott, E., et al., (1990). The benzimidazole anthelmintic agentsa review. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 13(3), 223-247.
- Melian, M. E., Ibarra, M., Ceballos, L., Paredes, A. J., Munguía, B., Faccio, R., Palma, S., Álvarez, L. I., y Domínguez, L. (2022). Improving the in vitro dissolution rate and pharmacokinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals. *Research in Veterinary Science*, 142, 110-116.
- Paredes, A. J., Litterio, N., Dib, A., Allemandi, D. A., Lanusse, C., Bruni, S. S., y Palma, S. D. (2018). A nanocrystal-based formulation improves the pharmacokinetic performance and therapeutic response of albendazole in dogs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 51-58.

- Pensel, P. E., Paredes, A., Albani, C. M., Allemandi, D., Bruni, S. S., Palma, S. D., y Elissondo, M. C. (2018). Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. *Veterinary parasitology*, 251, 78-84.
- Petersen, M. B., y Friis, C. (2000). Pharmacokinetics of fenbendazole following intravenous and oral administration to pigs. American journal of veterinary research, 61(5), 573-576.
- Savic, R. M., Mentré, F., y Lavielle, M. (2011). Implementation and evaluation of the SAEM algorithm for longitudinal ordered categorical data with an illustration in pharmacokinetics-pharmacodynamics. *The AAPS Journal*, 13(1), 44-53.
- Varlamova, A., Movsesyan, S., Arkhipov, I., Khalikov, S., Arisov, M., Kochetkov, P., Abramov, V., Il'in, M., y Lokshin, B. (2020). Biological activity and pharmacokinetic behavior of fenbendazole integrated into a supramolecular delivery system with licorice extract and sodium dioctyl sulfosuccinate. *Biology Bulletin*, 47(6), 549-558.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Pis, A., y Lanusse, C. (2004). Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(5), 536-544.
- Wollweber, H., Kölling, H., Widdig, A., Thomas, H., Schulz, H., y Mürmann, P. (1978). Febantel, a new broad-spectrum anthelminthic. Arzneimittelforschung, 28(12), 2193-2195.

Capítulo 6

Conclusiones generales y perspectivas de trabajo

Este trabajo permitió obtener dos tipos diferentes de preparaciones de fenbendazol a través de las cuales se logró mejorar notablemente su velocidad de disolución en agua: las dispersiones sólidas y los nanocristales redispersables. Se adaptó y completó una extensa caracterización de las preparaciones que permitió concluir que las mejoras en la velocidad de disolución de los activos se debió a la presencia de la matriz polimérica homogeneamente distribuída, tanto en el caso de las dispersiones sólidas como los nanocristales; sumado a la reducción del tamaño de partícula, en estos últimos.

De la caracterización, se concluye que la microscopía Raman confocal es una herramienta poderosa y no destructiva que permite una comprensión cualitativa de la distribución de los componentes en las preparaciones. Para este trabajo, resultó una técnica indispensable para comprender las mejoras de desempeño observadas entre las diferentes preparaciones.

El fenbendazol fue utilizado como prototipo de otros compuestos antihelmínticos benzimidazólicos y de los compuestos híbridos valerolactamabenzimidazol sintetizados por el grupo de investigación. Por esta razón, una vez seleccionada la preparación con mejor desempeño de liberación del activo y mejores rendimientos de proceso (los nanocristales redispersables conteniendo como estabilizante poloxamer 188), se procedió a trasladar con éxito la tecnología desarrollada al valero-fenbendazol, compuesto híbrido de interés por su potencial antihelmíntico, cumpliendo con el objetivo central de este trabajo.

Por otra parte, el estudio de biodisponibilidad comparada en ovinos entre

los nanocristales de fenbendazol y la mezcla simple de los componentes (sin procesar) permitió determinar que las mejoras observadas en la velocidad de disolución *in vitro* del activo preparado como nanocristales se correlaciona con una mejora de su absorción en rumiantes. Este estudio además, acompañado de un modelado poblacional de los datos colectados, permitió reportar, por primera vez, interesantes parámetros farmacocinéticos poblacionales de fenb-dendazol y su metabolito sulfoxidado en ovinos, así como sugerir la presencia del fenómeno de *flip-flop*.

En conclusión, se cuenta con una plataforma para la preparación de compuestos poco solubles en agua, particularmente compuestos de tipo benzimidazol carbamato o híbridos valerolactama-benzimidazol, con potencial de mejorar su velocidad de disolución *in vitro* y biodisponibilidad oral en rumiantes. Además, se cuenta con metodología desarrollada y seleccionada para una caracterización completa de las preparaciones.

Como perspectivas para continuar este trabajo, se deprenden diferentes aristas. En primer lugar, surge la necesidad de dar una forma farmacéutica final a las preparaciones obtenidas, con foco en medicina veterinaria e intentando respetar las mejoras obtenidas a este nivel. Para fenbdendazol, además, el siguiente paso será determinar los parámetros farmacocinéticos poblacionales cuando se administra por vía oral, para compararlos con los obtenidos por la vía intraruminal y determinar la adecuabiliad de la vía para la administración de los sistemas de nanocoristales. Además, el último paso, una vez que se cuente con la formulación final, será evaluar la eficacia de las nuevas preparaciones en estudios con animales infectados con los parásitos de interés.

Para el caso de valero-fenbendazol, deben realizarse estudios que comprueben que su mejora de disolución *in vitro* se correlaciona con una mejora del desempeño *in vivo*. Posteriormente se podrá continuar hacia los mismos estudios sugeridos para fenbdendazol. Además, en relación a este híbrido, deben completarse experimentos que permitan determinar la naturaleza de los cambios observados en su cristalinidad, cuando entra en contacto con agua.

APÉNDICES

Apéndice 1

Análisis de componentes principales de las dispersiones sólidas y mezclas físicas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del PCA de la DS conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada DS22). La figura 1.1 muestra las primeras componentes que explican la varianza de los resultados. La 1.2 muestra la imagen obtenida luego de mapear la intensidad de la componente N° 1 en cada pixel del set de datos analizado; mientras que la figura 1.3 muestra el resultado de promediar los espectros de los pixeles donde predomina la componente N° 1. La figura 1.4 muestra el resultado de promediar los espectros en los pixeles donde no predomina la componente N° 1. La figura 1.5 muestra la imagen obtenida luego de mapear la intensidad de la componente N° 2 en cada pixel del set de datos analizado; mientras que la figura 1.6 muestra el resultado de promediar los espectros de los pixeles donde predomina la componente N° 2.

Por otra parte, se muestran los resultados obtenidos del PCA de la MF conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada MF22). La figura 1.7 muestra las primeras componentes que explican la varianza de los resultados. La figura 1.8 muestra la imagen obtenida luego de mapear la intensidad de la componente N° 1 en cada pixel del set de datos analizado; mientras que la figura 1.9 muestra el resultado de promediar los espectros de los pixeles donde predomina la componente N° 1. La figura 1.10 muestra la imagen obtenida luego de mapear la intensidad de la componen-



Figura 1.1: Resultado del análisis de componentes principales de la muestra de dispersión sólida conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada DS22). Se observa que las dos primeras componentes explican la mayor parte de la varianza de los datos ya que acumulan entre ambas más del 90 % de la varianza (figura de la izquierda).



Figura 1.2: Imágen generada a partir de la componente N° 1 del análisis de componentes principales de la muestra de dispersión sólida conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada DS22). Se observa que la imagen es similar a la obtenida a partir del uso de filtros de señales (3.14). Los colores indican la intensidad de la componente seleccionada en cada pixel.

te N° 2 en cada pixel del set de datos analizado; mientras que la figura 1.11 muestra el resultado de promediar los espectros de los pixeles donde predomina la componente N° 1. El PCA de la MF mostró muy pocos pixeles donde se



Figura 1.3: Obtención del espectro promedio de las zonas con mayor presencia de la componente N° 1. Las zonas seleccionadas para obtener el espectro promedio se observan en color marrón (imagen arriba a la derecha) y corresponden a las zonas coloreadas en rojo en la imagen de la izquierda. El espectro obtenido se corresponde con el espectro del polímero (ver figura 3.13).



Figura 1.4: Obtención del espectro promedio de las zonas con menor presencia de la componente N° 1 (zonas azules). Las zonas seleccionadas para obtener el espectro promedio se observan en color marrón (imagen arriba a la derecha) y corresponden a las zonas coloreadas en azul en la imagen de la izquierda. En el espectro promedio obtenido se observa tanto la presencia de fenbendazol como de polímero (ver figura 3.13).



Figura 1.5: Imágen generada a partir de la componente N° 2 del análisis de componentes principales de la muestra de dispersión sólida conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada DS22). Los colores indican la intensidad de la componente seleccionada en cada pixel.



Figura 1.6: Obtención del espectro promedio de las zonas con mayor presencia de la componente N° 2. Las zonas seleccionadas para obtener el espectro promedio se observan en color marrón (imagen arriba a la derecha) y corresponden a las zonas coloreadas en rojo en la imagen de la izquierda. El espectro obtenido se corresponde con el espectro de fenbendazol (ver figura 3.13).

encontraran los espectros de ambos componentes a la vez, indicando que las muestras se componen mayormente de FBZ o P407 puros.



Figura 1.7: Resultado del análisis de componentes principales de la muestra de mezcla física conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada MF22). Se observa que las dos primeras componentes explican la mayor parte de la varianza de los datos ya que acumulan entre ambas más del 90 % de la varianza (figura de la izquierda).



Figura 1.8: Imágen generada a partir de la componente N° 1 del análisis de componentes principales de la muestra de mezcla física conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada MF22). Se observa que la imagen es similar a la obtenida a partir de los cocientes de intensidad de señales (3.15). Los colores indican la intensidad de la componente seleccionada en cada pixel.



Figura 1.9: Obtención del espectro promedio de las zonas con mayor presencia de la componente N° 1. Las zonas seleccionadas para obtener el espectro promedio se observan en color marrón (imagen arriba a la derecha) y corresponden a las zonas coloreadas en rojo en la imagen de la izquierda. El espectro obtenido se corresponde con el espectro de fenbendazol (ver figura 3.13).



Figura 1.10: Imágen generada a partir de la componente N° 2 del análisis de componentes principales de la muestra de mezcla física conteniendo 10 % p/p de fenbendazol y 90 % poloxamer 407 (denominada MF22). Los colores indican la intensidad de la componente seleccionada en cada pixel.



Figura 1.11: Obtención del espectro promedio de las zonas con mayor presencia de la componente N° 2. Las zonas seleccionadas para obtener el espectro promedio se observan en color marrón (imagen arriba a la derecha) y corresponden a las zonas coloreadas en principalmente en celeste en la imagen de la izquierda. El espectro obtenido se corresponde con el espectro de polímero (ver figura 3.13).

Apéndice 2

Dissolution profiles of fenbendazole from binary solid dispersions: a mathematical approach

Melian, M. E., Briones Nieva, C. A., Domínguez, L., Gonzo, E. E., Palma, S., Bermúdez, J. M. (2021). *Dissolution profiles of fenbendazole from binary solid dispersions: a mathematical approach*. Therapeutic Delivery, 12(8), 597-610.

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Therapeutic Delivery

Dissolution profiles of fenbendazole from binary solid dispersions: a mathematical approach

María Elisa Melian^{1,2}, Cintia Alejandra Briones Nieva³, Laura Domínguez¹, Elio Emilio Gonzo³, Santiago Palma^{*,‡,4}, & José María Bermúdez^{*,‡,3}, ¹ ¹Área de Farmacología, CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay ²Programa de Posgrados de la Facultad de Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay ³Instituto de Investigaciones para la Industria Química, Universidad Nacional de Salta – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Salta, 4400, Argentina

⁴Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET & Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 5016, Argentina *Author for correspondence: Tel.: +54 351 535 3865; Ext.: 53363; sdpalma@fcq.unc.edu.ar

**Author for correspondence: Tel.: +54 387 425 5410; +54 387 522 3472; josemariabermudez@gmail.com [‡]Authors contributed equally

Aim: Understanding a drug dissolution process from solid dispersions (SD) to develop formulations with predictable *in vivo* performance. **Materials & methods:** Dissolution data of fenbendazole released from the SDs and the control physical mixtures were analyzed using the Lumped mathematical model to estimate the parameters of pharmaceutical relevance. **Results:** The fit data obtained by Lumped model showed that all SDs have a unique dissolution profile with an error of $\pm 4.1\%$ and an initial release rate 500-times higher than the pure drug, without incidence of drug/polymer ratio or polymer type. **Conclusion:** The Lumped model helped to understand that the main factor influencing the fenbendazole release was the type formulation (SD or physical mixture), regardless of the type or amount of polymer used.

First draft submitted: 4 March 2021; Accepted for publication: 16 June 2021; Published online: 21 July 2021

Keywords: dissolution efficiency • drug release • fenbendazole • initial release rate • lumped model • mathematical model • poloxamer • solid dispersions

In recent years, the number of drug candidates associated with low water solubility has increased dramatically [1–6], posing a significant challenge for the pharmaceutical industry. These types of compounds, categorized as class II by the biopharmaceutical classification system [7], have adequate membrane permeability, so the dissolution process becomes the rate-limiting step during oral absorption. That is why research groups have designed new technologies to overcome the problems associated with low bioavailability and erratic absorption [8], having a direct impact on both the rate and extent of absorption in the gastrointestinal tract [9–12].

For many years, the strategy of formulating active pharmaceutical ingredients using solid dispersions (SD) has been widely studied and has reached great interest due to its ability to modify the physicochemical properties of poorly water soluble compounds. This allows better drug dissolution rates and oral bioavailability, besides its use as a drug-repositioning strategy [13–15]. It has been deeply discussed how SD technology collaborates to improve drug dissolution rate and extent: from altering solid-state properties of the materials such as porosity and wettability to reducing particle size, even up to a molecular level, including the possibility of converting drug crystalline particles into an amorphous state [16,17]. When a SD is orally administered, the above mentioned advantages of this technology contribute to the formation of a saturated or supersaturated solution at the site of absorption, leading to the immediate dissolution of a fraction of the drug and its rapid absorption.

When the drug is part of a SD, its dissolution may be carrier mediated that forms a polymer-rich diffusion layer between the SD and the dissolution medium. The drug must permeate through this layer to reach the dissolution medium. In those cases, in which the permeability of the membrane is not a limitation of the absorption of the



10.4155/tde-2021-0014 © 2021 Newlands Press Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

ISSN 2041-5990
Research Article Melian, Briones Nieva, Domínguez, Gonzo, Palma & Bermúdez

drug, the extension and maintenance of the state of supersaturation of the drug that can be achieved by the SD will be decisive for its bioavailability. In this sense, information on the incidence of formulation and process parameters on the *in vivo* performance of a SD can be obtained from thoughtfully designed dissolution tests at each stage of development [18].

The key factors in the development of SDs are driven by two considerations: biopharmaceutical relevance (in terms of greater solubility and dissolution) and commercial viability (in terms of scaling and shelf-life stability) [19]. This has led to evolution since the 1960s, when SDs were first reported [20], with four generations already described to the present [21] and numerous methods available for their preparation. However, there are still <30 commercialized formulations prepared by this technology [17]. In this context, research must continue to gain a deeper understanding of these systems and their drug release mechanisms, which will directly impact their practical use, helping to make more precise decisions during the formulation steps [22].

Mathematical models are a valuable tool to evaluate the processes involved in the dissolution of drugs, and in general, to devise and optimize the design of new systems. Knowing how to use the equations generated in mathematical modeling will allow us to understand the different factors that affect the dissolution kinetic process and how the stages of this phenomenon can vary and influence the efficacy or dosage of the drug. Therefore, the mathematical evaluation of the dissolution kinetics of the drug is an added value, which guarantees an optimal design of the drug delivery systems, as well as the knowledge of the mechanisms that operate in the dissolution process through experimental verification [23–25].

The mathematical models applied in the area of pharmaceutical science and reported in the scientific literature are diverse. Mathematical models can be of two different types: empirical or theoretical. An empirical model is nothing more than a mathematical equation capable of describing the experimental trend of a quantity of interest (e.g., drug concentration in blood against time) adopting appropriate values for its parameters. As this model is not a real mathematical metaphor for all the phenomena that concur with the experimental evidence, its parameters have no physical significance. For this reason, an empirical model does not imply an improvement in the theoretical knowledge of the physical phenomenon under study but allows a more objective comparison between the different sets of experimental data on based on variations in the model parameters. In this sense, Ritger and Peppas described a simple and empirical equation, suitable for adjusting the values corresponding to the first 60% of the release curve of a drug, which makes it possible to elucidate the drug release mechanism according to the value of the diffusional exponent that comes from statistical mathematics [26,27]. Another empirical equation that is widely used in reliability, statistics and survival analysis, is the Weibull model [28,29]. The Weibull parameter aw defines the time scale of the process and bw characterizes the shape of the profile. Values of bw >1 characterize sigmoid-shaped curves, while values of bw <1 fit concave profiles. The Weibull model fits the release data of different systems very well, but the parameters of the equation have not a physical meaning.

On the contrary, a theoretical model represents a possible mathematical schematization of all the concurrent phenomena to the experimental evidence to be studied. Consequently, as its parameters have physical meaning (e.g., the diffusion coefficient of the drug in a membrane), by configuring them appropriately, the model can be used to predict the experimental trend corresponding to the different conditions. The Higuchi model, which was initially conceived for plane geometries, but later extended to different geometries and porous systems [30], is one of the most successful theories that predict drug release from a stable monolithic system where only the diffusion step within the matrix is considered; with constant diffusion coefficient and slab geometry. Nevertheless, this model is far from solving the complex system found in more real systems.

However, due to the complexity of reality, it is sometimes impossible to have a theoretical model and the constitution of mixed theoretical-empirical models called semi-empirical is necessary. The so-called power law or Korsmeyer–Peppas equation describes the release of drugs from polymeric systems. Another model, which takes into account the coupled effect of Fick-type diffusion and the contribution of polymer relaxation, is the one proposed by Peppas–Sahlin [31]. Based on this, the Lumped model derived from a second-order kinetic expression [32,33], groups the main stages involved in the drug release or dissolution processes. This new model allows fitting all the experimental data from t = 0 to t $\rightarrow \infty$. The proposed mathematical model satisfactorily describes the processes in which the phenomena of diffusion and transfer to the dissolution medium occur, or when there is only an external transfer to a fluid medium in which the concentration of the drug is constantly increasing.

In our previous work, we reported the preparation of fenbendazole (FBZ) and poloxamer SDs together with the extensive characterization performed [34]. This work aims to analyze the dissolution data of FBZ to achieve a deep understanding of the *in vitro* dissolution properties. This is a decisive factor that allows selection between alternative

10.4155/tde-2021-0014

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg

Table 1.	Solid dispersions ar	nd physical mix	tures of fenben	idazole and	d poloxamer 188 ar	nd poloxamer 4	07 compositio	
SD	PM	FBZ (w/w%)	P188 (w/w%)	SD	PM	FBZ (w/w%)	P407	
SD11	PM11	5	95	SD21	PM21	5	95	
SD12	PM12	10	90	SD22	PM22	10	90	
SD13	PM13	25	75	SD23	PM23	25	75	
SD14	PM14	50	50	SD24	PM24	50	50	

FBZ: Fenbendazole; P188: Poloxamer 188; P407: Poloxamer 407; PM: Physical mixture; SD: Solid dispersion

dosage forms for better formulation development. In this context, the Lumped mathematical model [29–32] was used that allowed us to understand and predict the behavior of SDs and calculate the parameters of pharmaceutical relevance such as the initial release rate (RR_0), the dissolution efficiency (DE) and the mean dissolution time (MDT) [35].

Materials & methods

Materials

FBZ (pharmaceutical grade) was kindly donated by Laboratorio Uruguay S.A. (LUSA, Montevideo, Uruguay). Poloxamer 188 (P188) and Poloxamer 407 (P407) were provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). All other reagents were of analytical grade.

Preparation of SDs & dissolution tests

The preparation of FBZ SDs and physical mixtures (PM) were described in our previous work in conjunction with the dissolution tests of FBZ performed [34]. Briefly, FBZ SDs were prepared by dispersing the drug in the melted poloxamer at 65°C, using different proportions of P188 or P407. After dispersing the drug, the mixtures were rapidly cooled and pulverized. For the PMs, the appropriate amount of FBZ and poloxamer were mixed manually. Table 1 shows the different compositions of SDs and PMs analyzed in this work.

Data analysis

The data obtained from the dissolution tests were analyzed using the Lumped mathematical model [22–26]. To compare the different dissolution profiles, the RR_0 , DE, dissolution time, sampling time and MDT were calculated. Likewise, the profiles were statistically compared using an independent model approach by calculating the difference factor (f_2) between the profiles.

Results & discussion

Dissolution data analysis

An integral part of pharmaceutical development is drug dissolution testing, which enables a batch quality assessment to ensure product safety, efficacy and reproducibility. During the formulation development process, drug dissolution testing guides the design, optimization and selection of the leading formulation to be used for subsequent clinical studies. On the other hand, it is one of the indicator tests that are carried out in the stability studies to evaluate the useful life of the drug during the product development phase.

The dissolution of the drug is a relevant property of a pharmacotherapeutic system, being a prerequisite for the absorption of the active agent, playing a preponderant role in the rate and degree of bioavailability in the body.

To establish specific predetermined dissolution profiles, it is necessary to understand in depth the mass transport mechanisms involved in the drug dissolution process and to quantitatively predict the dissolution kinetics of the drug.

It is feasible, in some cases, to develop a mathematical expression that adequately describes the dependence of dissolution as a function of time. The application of this tool is very useful to predict the dissolution kinetics of systems before their actual development. This analytical solution can lead to several models that can be used in the design stage of simple and complex drug delivery devices, in addition to predicting the general behavior of the dissolution process.

In this sense, the Lumped model makes it possible to find a simple relationship between the released/dissolved mass and the release/dissolution rate as a function of time over the entire range of values obtained from a release/dissolution profile, as well as to calculate different parameters of pharmaceutical relevance. This model

Research Article Melian, Briones Nieva, Domínguez, Gonzo, Palma & Bermúdez

makes it possible to adequately adjust the experimental data of immediate, sustained or extended-release dosage forms to predict the *in vitro* dissolution properties as well as comparisons between different formulations or design variables.

Under this framework, the *in vitro* dissolution of FBZ samples containing P188 and P407 were modeled using the Lumped model [33,36,37] recently developed and validated [32,38]. This semi-empirical model is based on second-order kinetics (Equation 1) where the driving force is the difference between the maximum amount of drug that the sample can release $(M_{\infty})(t \to \infty)$ and the amount release at time t (M_t) .

The pseudo-second-order kinetic expression for the drug-release rate is Equation 1.

$$\frac{dM_t}{dt} = k(M_\infty - M_t)^2 \tag{Eq. 1}$$

where the kinetic constant k considers all the steps involved in the release process.

The model is obtained considering the initial condition $M_t = 0$ at t = 0 and allows to calculate M_{∞} (Equation 2).

$$M_t = \frac{kM_\infty^2 t}{1 + kM_\infty t} \tag{Eq. 2}$$

The Lumped model is represented in Equation 3, and expresses the percentage of drug release as a function of time. Considering that k and M_{∞} are constant

$$M_t \% = \frac{at}{1+bt}$$
(Eq. 3)

where M_t % is referred to M_{∞} according to Equation 4.

$$M_t \% = \frac{M_t 100}{M_\infty} \tag{Eq. 4}$$

From Equation 3 it follows that the parameters a and b have no physical meaning and they are expressed by Equations 5 & 6, respectively.

$$a = k M_{\infty}^2 \tag{Eq. 5}$$

$$b = kM_{\infty} \tag{Eq. 6}$$

Furthermore, from Equation 3 it is possible to calculate the release rate (*RR%*) which is given by Equation 7:

$$2R\% = \frac{dM_t\%}{dt} = \frac{a}{(1+bt)^2}$$
(Eq. 7)

Therefore, the initial release rate $(RR_0\%)$ is given by Equation 8.

$$RR_0\% = \frac{dM_t\%}{dt}|_{t=0} = a$$
 (Eq. 8)

The Lumped model parameters in percent amount of drug release, under this condition (Equation 3), must obey the Equation 9,

$$\frac{a}{b} = 100 \tag{Eq. 9}$$

which is an interesting internal consistency test. Table 2 shows the model parameters *a* and *b*, M_{∞} , correlation coefficient (R^2), and standard deviation (*s%*) calculated for the SD and PM samples studied, with P188 and P407, respectively. The *s%* is defined by Equation 10,

$$s = \sqrt{\frac{(SSD)}{(n-1)}}$$
(Eq. 10)

where SSD is the sum of the square of the difference between the experimental value and that calculated by the model, and n is the number of samples taken in an experimental run.

We use an s% because it is calculated on values in percentages.

As shown in Table 3, the SD and PM samples with P188 represented the same release process, as well as the samples containing P407. Therefore, the release profile for the SD and PM samples in each poloxamer could be

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg

Table 2. Parar	neters of the kine	tic model.				
Carrier polymer	Sample			Lumped model pa	arameter	
		a (%/min)	<i>b</i> (min ⁻¹)	M_∞ (mg)	R ²	s%
	SD11	20.344	0.2034	5.00	0.9981	1.43
	SD12	17.238	0.1724	4.68	0.9964	1.96
	SD13	25.089	0.2509	4.79	0.9993	0.84
	SD14	22.324	0.2232	5.54	0.9968	1.80
P188	Average profile	21.249	0.2125	-	-	-
	PM11	10.011	0.1001	3.60	0.9972	1.70
	PM12	9.940	0.0994	3.37	0.9960	2.04
	PM13	8.933	0.0893	3.78	0.9929	2.69
	PM14	6.979	0.0698	5.46	0.9944	2.43
	Average profile	8.966	0.0897	-	-	-
	SD21	28.939	0.2894	4.87	0.9990	0.9
	SD22	29.129	0.2903	4.44	0.9979	1.48
	SD23	21.068	0.2107	4.59	0.9995	0.68
	SD24	32.435	0.3844	4.54	0.9931	2.63
P407	Average profile	29.393	0.2939	-	-	-
	PM21	12.020	0.1202	3.62	0.9954	2.19
	PM22	10.004	0.1012	3.15	0.9966	1.86
	PM23	10.002	0.1000	3.08	0.9914	2.94
	PM24	8.061	0.0806	3.53	0.9902	3.12
	Average profile	10.022	0.1005	_	_	-

Dissolution of fenbendazole from solid dispersions Research Article

a and b: Lumped model parameters; M_{∞} : Maximum amount of drug that the sample can release; P188: Poloxamer 188; P407: Poloxamer 407; PM: Physical mixture; R^2 : Correlation coefficient; s%: Standard deviation; SD: Solid dispersion.

Table 3. Difference and simila	arity factor of solid dispersion	and physical mixture samples l	based on the poloxamer 188	
and poloxamer 407 as carrier	vehicles.			
Carrier polymer	Sample	Factor		
		f ₁	f ₂	
	SD11	1.030	87.82	
	SD12	4.295	70.06	
	SD13	3.094	78.02	
P188	SD14	1.140	93.12	
	PM11	3.050	83.47	
	PM12	2.596	85.62	
	PM13	1.352	86.06	
	PM14	7.079	74.05	
	SD21	0.258	95.84	
	SD22	0.146	99.79	
	SD23	5.705	63.19	
P407	SD24	4.104	69.26	
	PM21	5.008	72.63	
	PM22	0.728	96.86	
	PM23	0.182	99.75	
	PM24	5.211	69.71	
f - Difference fester f - Cimilarity fester D10	0. Delevener 100. D407. Delevener 407. DM.	Developed anisations, CDs Califed alignmention		

f1: Difference factor; f2: Similarity factor; P188: Poloxamer 188; P407: Poloxamer 407; PM: Physical mixture; SD: Solid dispersion.

represented by the Lumped model with the average parameters depicted in Table 2. Note that the percentage of FBZ in the SD and PM samples is 5, 10, 25 and 50% w/w for both poloxamers. That is, the FBZ concentration in the samples varies almost tenfold, nevertheless, all samples, according to

That is, the FBZ concentration in the samples varies almost tenfold, nevertheless, all samples, according to US FDA and European Medicines Agency criteria, presented the same dissolution profile. In addition, when

Research Article Melian, Briones Nieva, Domínguez, Gonzo, Palma & Bermúdez

Table 4. Comparison of poloxamer 188 and polo	^t the average release pro oxamer 407 and parame	ofile of solid dispersions a ters of the general mode	and physical mixtures be el equation.	tween samples with
Sample	Factor		Lumped model parameter	
	f ₁	f ₂	a _G (%/min)	<i>b</i> _G (min ⁻¹)
SD	5.550	63.75	25.321	0.2532
PM	2.787	83.14	9.494	0.0951

a_G and b_G: Parameters of the general model equation; f₁: Difference factor; f₂: Similarity factor; P188: Poloxamer 188; P407: Poloxamer 407; PM: Physical mixture; SD: Solid dispersion.

comparing the average profiles of the percentage amount released for the SD and PM samples in any of the poloxamers, the f_1 and f_2 shown in Table 4, were obtained.

Figures 1 & 2 depict the experimental data (symbols) and the Lumped model fit (solid line) of the SD and PM samples with P188 and P407, respectively. Figure 3 shows the goodness of fit of the model.

Furthermore, Figure 4 shows the ratio $(M_{\infty}/\text{total} \text{ amount loaded } [M_o])$ as a function of the compositions of the samples. As can be seen, the average maximum percentage amount of FBZ released $(M_{\infty} \ 100/M_o)$ by the SD and PM samples, referred to as the M_o , were 95.3 and 73% for the samples containing P188. While for the SD and PM samples prepared with P407, these values were 91.6 and 66.7%, respectively.

The fit was quite good with R^2 better than 0.99 and an *s*% of <2% for the SD samples and 3% for the PM samples. Furthermore, the results showed that the percentage amount released for the SD and the PM samples could be represented by a single curve (average). Although the amount of drug loaded to the system was 5 mg, the samples have 5, 10, 25 and 50% w/w of FBZ in poloxamer. That is, the FBZ concentration in the samples varies almost tenfold, but all the samples presented the same dissolution profile.

To consider that all profile corresponded to a single equation (average), the model-independent statistical analysis approaches were used to validate the significance of the difference and similarity between profiles by calculating the f_1 and f_2 using Equation 11 & 12, respectively.

$$f_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n} |R_i - D_i|}{\sum_{i=1}^{n} R_i} 100$$
 (Eq. 11)

Where R_i and D_i are the percentage of drug dissolved of the reference and test samples at the time *i* and *n* is the number of experimental samples taken during the entire release test.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^{n} (R_i - D_i)^2 \right]^{-0.5} 100 \right\}$$
(Eq. 12)

The Center for Drug Evaluation and Research of the FDA and the European Medicines Agency have established as criteria that two or more dissolution profiles are similar when the values of f_1 are <15 and the values of f_2 are >50. Table 3 shows the values of both factors taking as reference the data obtained with the value of the parameters of Table 2 for the average profile. According to the established criteria, it can be concluded that the profiles of the different SD and PM samples for each poloxamer studied were indeed similar and the differences were not significant. Therefore, both formulations could be represented by the average equation for each polymer.

However, comparing the average profile equations for the amount released by the SD samples in P188 and P407, and those corresponding to the PM samples in both poloxamers; the f_1 and f_2 values depicted in Table 4, were found.

According to the criteria established for f_1 and f_2 values, the FBZ release profiles of the SD samples with P188 and P407 were similar and the difference was not significant. Therefore, a general Lumped model equation was able to predict the FBZ% released by all SD samples, regardless of the drug/polymer ratio and poloxamer type. In the same way, a general Lumped model equation for the PM samples was obtained. The parameters of the general model equation for the SD and PM samples are depicted in Table 4.

These general Lumped model equations obtained to predict the FBZ release amount with an error of \pm 4.1% for SD samples and \pm 9% for PM samples.

Comparing the general release profile of the SD and PM samples, the values of f_1 and f_2 obtained were 19.678 and 38.47, respectively. Therefore, these profiles did not meet the criteria indicated above, and consequently, were considered not similar, representing two different release phenomena. Figure 5 shows the general profiles of the

10.4155/tde-2021-0014

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg



Figure 1. Fenbendazole release profiles from (A) solid dispersions and (B) physical mixtures, using polymer poloxamer 188 as a carrier. Error bars have been omitted for clarity purposes. FBZ: Fenbendazole.

Lumped model for the SD and PM samples. In Figure 5, the experimental data (points) of all the samples with P188 and P407, are indicated.

The experimental dissolution test with pure FBZ showed that the amount of drug released after 60 min was 2.9%. Up to 15 min, the presence of FBZ was detected but not is quantifiable. The results showed that the amount released at 60 min was increased 30-times by the SDs with poloxamer compared with pure FBZ, regardless of the drug/carrier ratio and the type of poloxamer. Making the same comparison, the PM samples increased the release of the drug by 20-times. It was also possible to compare the RR_0 . Considering a linear relationship of the amount released by the pure FBZ (zero-order kinetics mechanism), the RR_0 of the pure drug was 0.05%/min. Then, the





Figure 2. Fenbendazole release profiles from (A) solid dispersions and (B) physical mixtures, using polymer poloxamer 407 as a carrier. Error bars have been omitted for clarity purposes. FBZ: Fenbendazole.

 RR_0 of the SD samples was 500-times greater than that of the pure drug, while the RR_0 of the PM samples was 200-times faster than the RR_0 of the pure FBZ. Thus, poloxamer polymers facilitate the release of FBZ. All SD samples showed an improved release amount of FBZ, compared with the corresponding PM.

To compare the behavior of the SD and PM samples, the characteristic parameters of the samples such as the time point $t_{X\%}$ (min), the *DE* (%), the *MDT* (min) and the time sampling t_F (%) were calculated. The $t_{X\%}$ time point is the time required to reach X% drug release. In general, it is estimated at X% = 80%. The *DE* is defined as the surface area under the profile up to a given end time t_e divided by the total surface area of the rectangle 100 t_e . The *MDT* is the first moment of the profile up to the $T_{X\%}$ time point. Finally, the sampling time t_F is the percentage of drug released for each sample at a given time.

```
10.4155/tde-2021-0014
```

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg



Figure 3. Example of fenbendazole release data fit using the Lumped model applied to samples based on polymer (A) poloxamer 188 and (B) poloxamer 407. Error bars have been omitted for clarity purposes. FBZ: Fenbendazole.

According to the Lumped model, each of the characteristic parameters of the profile is calculated by Equations 13, 14 & 15.

$$t_{X\%} = \frac{X\%}{(a_G - b_G * X\%)}$$
(Eq. 13)

$$DE = \left(\frac{a_G}{b_G^2}\right) \frac{[b_G * t_e - \ln(1 + b_G * t_e)]}{t_e * 100} * 100$$
 (Eq. 14)

$$MDT = \frac{a_G}{b_G^2} \frac{[ln(1+b_G * t_{X\%}) - \frac{b_G * t_{X\%}}{(1+b_G * t_{X\%})}]}{M\%(t_{X\%})}$$
(Eq. 15)

While t_F is the value of M_t % of the corresponding average profile equation at the final time of the experiment run.

The values of the characteristic parameters obtained from the general profiles of the SDs and PMs are reported in Table 5.

fsg future science group

Research Article Melian, Briones Nieva, Domínguez, Gonzo, Palma & Bermúdez



Figure 4. The ratio (maximum amount of drug that the sample can release/sample dose of fenbendazole changes as a function of the compositions of the samples of polymer (A) poloxamer 188 and (B) poloxamer 407.FBZ: Fenbendazole; M_o : Total amount loaded; M_∞ : Maximum amount of drug that the sample can release.

10.4155/tde-2021-0014

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg

Dissolution of fenbendazole from solid dispersions Research Article



Figure 5. Fitting of the general Lumped model including all the points taken from the release profiles of the samples evaluated as solid dispersions and physical mixtures. FBZ: Fenbendazole; PM: Physical mixture; SD: Solid dispersion.

Table 5.	Characteristic parameters and	l initial release rat	e of solid dispersi	ons and physical mix	xtures.
Sample	t _{80%} (min)	DE (%)	MDT (min)	t ₁₂₀ (%)	<i>RR</i> ₀ (%/min)
SD	15.79	88.66	3.99	96.81	25.32
PM	42.40	77.80	10.69	91.80	9.49

DE: Dissolution efficiency at 120 min; M_∞: Maximum amount of drug that the sample can release; MDT: Mean dissolution time; PM: Physical mixture; RR₀: Initial release rate; SD: Solid dispersion; t_{80%}: Time point at 80%, referred to M_∞; t₁₂₀ (%): % Released at 120 min referred to M_∞.

When comparing RR_0 , the SD samples were 2.5-times faster than the PMs. No significant influence of the FBZ/poloxamer ratio on RR_0 was found.

As indicated above, the R^2 and s% values were indicative of the goodness of fit of the Lumped model.

The values of the f_1 and f_2 of the samples with P188 and those with P407 validated the consideration that the profiles were represented by a general profile equation for the SD or PM samples.

Note that the profiles, as well as the characteristic parameters, have taken M_{∞} as a reference, not the total drug loading in the sample. However, considering the maximum percentage of release referred to the total dose of the drug in the sample is not complicated, since it is easy to obtain through the value of the ratio (M_{∞}/M_o) . The general ratio (M_{∞}/M_o) for the SD and PM samples was 0.935 ± 0.034 and 0.698 ± 0.025 , respectively, regardless of the drug/polymer ratio and the type of poloxamer.

The internal consistency of the model can be verified using the relation (a/b) that must be equal to 100. Observing the values of *a* and *b* in Tables 2 & 4, the relation previously indicated was perfectly obeyed.

The main factor influencing the release rate of FBZ was the type of formulation (SD or PM). On the other hand, the type of poloxamer used (P188 or P407) and the drug/polymer ratio did not affect it significantly. Finally, Lumped's mathematical model could become an important tool for designing pharmaceutical formulations by evaluating the dissolution/release process of the drug *in vitro*, contributing to the optimal design of new systems. The Lumped model allowed the determination of important pharmaceutical parameters (e.g., *MDT*, *DE* and *RR*₀) with an excellent fit of the experimental drug release data.

Conclusion

In this work, we tried to elucidate the mechanisms involved in the dissolution process of FBZ, a drug with limited water solubility. This could help overcome the recognized problems of formulating this kind of drugs and its related

Research Article Melian, Briones Nieva, Domínguez, Gonzo, Palma & Bermúdez

issues as the poor bioavailability. This was verified under the experimental conditions in which the dissolution tests of the different formulations were carried out; determining that for a time of 90 min only approximately 6% of the pure drug was dissolved.

The equations derived from the Lumped model can help to understand the different factors that affect the dissolution rate, as well as the variations in dissolution behavior that could influence the efficiency or the therapeutic regimen of patients. The mathematical equations were developed to allow the quantitative interpretation of the values obtained from the FBZ dissolution test. The main factor influencing the release rate of the drug was the type of FBZ formulation (SD or PM), regardless of the type of poloxamer used (P188 or P407) and the drug/polymer ratio.

FBZ SDs using P188 or P407 as a carrier represent a promising alternative to confer an apparent advantage in solubility and dissolution rate. This would facilitate development at an early stage, to achieve a potentially scalable optimal formulation with adequate dissolution profiles suitable for the oral route.

Future perspective

In the coming years, *in vivo* studies of the formulations developed would be necessary to complement the information obtained in these studies. In this sense, future pharmacokinetic and efficacy studies would be decisive to choose the most suitable formulation for FBZ and other similar benzimidazole carbamates, and thus, to develop new commercially SD-based products. Additionally, the preparation of stable SDs using novel vehicles to avoid recrystallization, together with the design to obtain adequate drug dissolution kinetics will allow satisfying the pre-established requirements of the patient.

Summary points

- Solid dispersion (SD) technology statistically improved the dissolution rate of a biopharmaceutical classification system class II compound as fenbendazole (FBZ).
- The equations derived from the Lumped model helped to understand the different factors that affect the dissolution rate of the prepared formulations.
- The mathematical equations developed allowed the quantitative interpretation of the values obtained from the FBZ dissolution test.
- The obtained correlation coefficient and standard error values showed a good fitting with the Lumped model.
- The main factor influencing the release rate of FBZ was the type of formulation (SD or physical mixture).
- The type of poloxamer used (poloxamer 188 or poloxamer 407) and the drug/polymer ratio does not significantly affect FBZ release.
- The Lumped model allows the determination of important pharmaceutical parameters (e.g., mean dissolution time, dissolution efficiency and initial release rate) with an excellent fit of the experimental drug release data.
- A general Lumped model equation can predict the FBZ% released by SD or physical mixture samples, irrespective
 of the drug/polymer ratio and poloxamer type.

Acknowledgments

The authors especially thank DO Weitmann, business coordinator BCS in BASF Argentina S.A for the poloxamer samples and QF Antonio Malanga (BIOTEFA- Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay) for kindly providing access to the necessary equipment.

Financial & competing interests disclosure

This work was financially supported by grants from the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (project no. ANII-EQC-X-2012-1-14 IPTP), Uruguay; Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República (CSIC-Udelar), Uruguay; Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM); Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT) - FCQ UNC, Argentina; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (AN-PCyT), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (grant no. PICT 2017-4571), Argentina; Consejo de Investigación Universidad Nacional de Salta (CIUNSa) (grant no. 2471, 2522), Argentina; and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnicas (CONICET) (grant no. 11220170100759CO), Argentina. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

10.4155/tde-2021-0014

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

- 1. Lipinski C. Poor aqueous solubility: an industry wide problem in drug discovery. Am. Pharm. Rev. 5(3), 82-85 (2002).
- Ku MS, Dulin W. A biopharmaceutical classification-based Right-First-Time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from First-In-Human to clinical Proof-OF-Concept. *Pharm. Dev. Technol.* 17(3), 285–302 (2012).
- Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol. Pharm.* 3(6), 631–643 (2006).
- Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. AAPS J. 11(4), 740–746 (2009).
- Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. Int. J. Pharm. 420(1), 1–10 (2011).
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. J. Pharmacol. 62(11), 1607–1621 (2010).
- Yu LX, Amidon GL, Polli JE et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. Pharm. Res. 19(7), 921–925 (2002).
- 8. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. Int. Sch. Res. Notices 2012, 1–10 (2012).
- 9. Ku MS. Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. AAPS J. 10(1), 208-212 (2008).
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Del. Rev. 23(1–3), 3–25 (1997).
- Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29(3–4), 278–287 (2006).
- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* 12(3), 413–420 (1995).
- Cid AG, Simonazzi A, Palma SD, Bermúdez JM. Solid dispersion technology as a strategy to improve the bioavailability of poorly soluble drugs. *Ther. Deliv.* 10(6), 363–382 (2019).
- Castro SG, Bruni SS, Lanusse CE, Allemandi DA, Palma SD. Improved albendazole dissolution rate in pluronic 188 solid dispersions. *AAPS PharmSciTech* 11(4), 1518–1525 (2010).
- 15. Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1), 47-60 (2000).
- Vasconcelos T, Marques S, Das Neves J, Sarmento B. Amorphous solid dispersions: rational selection of a manufacturing process. Adv. Drug Del. Rev. 100, 85–101 (2016).
- Alshehri S, Imam SS, Hussain A et al. Potential of solid dispersions to enhance solubility, bioavailability, and therapeutic efficacy of poorly water-soluble drugs: newer formulation techniques, current marketed scenario and patents. Drug Deliv. 27(1), 1625–1643 (2020).
- Mehanna MM, Motawaa AM, Samaha MW. In sight into tadalafil block copolymer binary solid dispersion: mechanistic investigation of dissolution enhancement. Int. J. Pharm. 402(1), 78–88 (2010).
- Vasconcelos T, Sarmento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug Discov. Today 12(23), 1068–1075 (2007).
- Sekiguchi K, Obi N. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. *Chem. Pharm. Bull.* 9(11), 866–872 (1961).
- Vo CL-N, Park C, Lee B-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85(3, Part B), 799–813 (2013).
- 22. Craig DQ. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. Int. J. Pharm. 231(2), 131-144 (2002).
- Peppas NA, Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. J. Control. Rel. 190, 75–81 (2014).
- Cid AG, Sonvico F, Bettini R et al. Evaluation of the drug release kinetics in assembled modular systems based on the Dome Matrix technology. J. Pharm. Sci. 109(9), 2819–2826 (2020).
- Cid AG, Ramírez-Rigo MV, Palena MC, Gonzo EE, Jimenez-Kairuz AF, Bermúdez JM. Dual release model to evaluate dissolution profiles from swellable drug polyelectrolyte matrices. *Curr. Drug Del.* 17(6), 511–522 (2020).
- Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. J. Control. Rel. 5(1), 23–36 (1987).
- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. Int. J. Pharm. 15(1), 25–35 (1983).
- 28. Weibull W. A statistical distribution function of wide applicability. J. Appl. Mech. 18(3), 293-297 (1951).

fsg future science group

- Langenbucher F. Letters to the Editor: linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. J. Pharm. Pharmacol. 24(12), 979–981 (1972).
- 30. Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. J. Pharm. Sci. 50(10), 874-875 (1961).
- Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. Int. J. Pharm. 57(2), 169–172 (1989).
- Romero AI, Villegas M, Cid AG, Parentis ML, Gonzo EE, Bermúdez JM. Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes. Asian J. Pharm. Sci. 13(1), 54–62 (2018).
- 33. Fernández-Colino A, Bermudez JM, Arias FJ, Quinteros D, Gonzo E. Development of a mechanism and an accurate and simple mathematical model for the description of drug release: application to a relevant example of acetazolamide-controlled release from a bio-inspired elastin-based hydrogel. *Mat. Sci. Eng. C* 61, 286–292 (2016).
- •• In this work, a new, simple and precise mathematical model was described for the first time to fit drug dissolution data. This is the first report of the Lumped model, which was developed by our group and used to fit the dissolution profiles data.
- Melian ME, Munguía AB, Faccio R, Palma S, Domínguez L. The impact of solid dispersion on formulation, using confocal micro Raman spectroscopy as tool to probe distribution of components. J. Pharm. Innov. 13(1), 58–68 (2018).
- Describes the preparation and physicochemical characterization of the fenbendazole solid dispersion and physical mixture analyzed in this work.
- 35. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur. J. Pharm. Sci. 13(2), 123-133 (2001).
- •• In this complete review work, a description is made of the different mathematical models usually used to adjust the drug dissolution data. In addition, the different methods available to compare dissolution profiles are discussed. This publication defines most of the calculated pharmaceutical parameters, as well as the criteria to establish similarities and differences between the dissolution profiles.
- Villegas M, Cid AG, Briones CA et al. Films based on the biopolymer poly (3-hydroxybutyrate) as platforms for the controlled release of dexamethasone. Saudi Pharm. J. 27(5), 694–701 (2019).
- Simonazzi A, Davies C, Cid AG, Gonzo E, Parada L, Bermúdez JM. Preparation and characterization of poloxamer 407 solid dispersions as an alternative strategy to improve benznidazole bioperformance. J. Pharm. Sci. 107(11), 2829–2836 (2018).
- Romero AI, Bermudez JM, Villegas M, Dib Ashur MF, Parentis ML, Gonzo EE. Modeling of progesterone release from poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) membranes. AAPS PharmSciTech 17(4), 898–906 (2016).

10.4155/tde-2021-0014

Ther. Deliv. (Epub ahead of print)

future science group fsg

Apéndice 3

The Impact of Solid Dispersion on Formulation, Using Confocal Micro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of Components

Melian, M. E., Munguía, A. B., Faccio, R., Palma, S., Domínguez, L. (2018). The impact of solid dispersion on formulation, using confocal micro Raman spectroscopy as tool to probe distribution of components. Journal of Pharmaceutical Innovation, 13(1), 58-68. Journal of Pharmaceutical Innovation (2018) 13:58–68 https://doi.org/10.1007/s12247-017-9306-9

ORIGINAL ARTICLE



The Impact of Solid Dispersion on Formulation, Using Confocal Micro Raman Spectroscopy as Tool to Probe Distribution of Components

M. Elisa Melian¹ · A. Beatriz Munguía¹ · Ricardo Faccio² · Santiago Palma³ · Laura Domínguez¹

Published online: 16 December 2017

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract

Purpose Solid dispersions (SDs) of a poorly water-soluble drug were prepared, and their physicochemical properties were compared to those of control physical mixtures (PMs). Among the multiple techniques used to characterize the solid state of preparations, confocal micro Raman spectroscopy (CMRS) was used as a non-destructive tool to qualitatively probe content uniformity and distribution of drug and carrier.

Methods SDs and PMs of drug (fenbendazole, FBZ) were prepared containing two different carriers (poloxamer P188 or P407) with different drug polymer ratios. The preparations were characterized by powder X-ray diffractometry, Fourier transform infrared spectroscopy, thermal analysis, scanning electron microscopy, and in vitro dissolution assay. In addition, CMRS technique and principal component analysis (PCA) were used in order to statistically define the content uniformity and distribution of the drug within the polymeric matrix.

Results In vitro dissolution results exhibited a marked improvement when the drug was formulated as SD compared to control PM and to pure drug. The solid state of these preparations characterized by X-ray powder diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy showed no changes in the crystalline state of the drug and no chemical interactions between the components. Raman studies showed a better content uniformity of the drug within the polymeric matrix when subjected to SD process, correlating with the improved dissolution profile.

Conclusion This study provides evidence of the potential of the confocal Raman imaging technique, providing a fast and powerful method to characterize solid dispersions which could be incorporated towards the use of quality by design (QbD) approaches in pharmaceutical development.

Keywords Confocal micro Raman spectroscopy · Content uniformity · Solid dispersion · Dissolution rate

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s12247-017-9306-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Laura Domínguez ldoming@fq.edu.uy

- ¹ Área de Farmacología, Depto. CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), Av. General Flores 2124, Montevideo, Uruguay
- ² Centro NanoMat & Cryssmat-Lab, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), Av. General Flores 2124, Montevideo, Uruguay
- ³ Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica, UNITEFA (UNC-CONICET), Depto. de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

Introduction

The majority of failures in new drug development are associated with poor water solubility that can lead to low bioavailability, resulting in suboptimal drug delivery. This fact is critical to oral administration, the most economic and convenient route, in which the absorption of drugs in the gastrointestinal tract depends mainly on their solubility and permeability properties. From an estimated 40% of approved drugs, around 90% are poorly soluble molecules, therefore, advances in different insoluble drug delivery technologies are attractive alternatives, including for reformulate marketed drugs to improve efficacy (which may be of interest for the pharmaceutical industry as it provides clinical and economic benefits) [1]. Many techniques have been developed to improve drug solubility and dissolution rate of drugs with poor water solubility as polymorphs, the amorphous form of the drug, complexation, decreasing particle size of the drug by milling, salt formation, liposomes, solid dispersions, etc. [2]. In particular, solid dispersions (SDs) consist of mixtures of poorly water-soluble drugs in hydrophilic carriers which. depending on their properties, drive the drug release profile [3, 4]. Different processes for the manufacturing of SDs are described as solvent and fusion methods, spray drying, coprecipitation, co-evaporation, and freeze dying techniques. Among melting methods, low temperature fusion is an alternative when the API or carrier is not thermostable at high temperature [5]. This modified technique consists in suspending the API in a previously molten carrier, instead of heating both drug and carrier at the same time. This allows reducing heating time and process temperature [5]. This manufacturing process is a simple and environmentally friendly non-solvent technology which is costeffective and can be easily scaled up for commercial purposes [6, 7].

Dissolution enhancement of poorly water-soluble drugs in solid dispersions can be assessed by standard dissolution tests. In addition, other properties of SDs as physical state of the drug, the drug-carrier interaction, the content uniformity and distribution of components, among others must be studied to characterize pharmaceuticals [5]. What is more, the use of quality by design (QbD) approaches considers quality associated into a product than testing for acceptability after production, based on the processes understood thoroughly, a concept to be introduced in the pharmaceutical industry [8]. In this sense, many instrumental techniques are applied to measure these properties, as powder X-ray diffraction (PXRD) and differential scanning calorimetry (DSC) to determine the crystalline state of drug; Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy and thermal gravimetry analysis (TGA) to investigate chemical stability and molecular interaction; scanning electron microscopy or atomic force microscopy to qualitatively characterize the morphology of SDs, among others [9].

In this sense, the use of chemical imaging methods combining microscopy and spectroscopy allows us to know spatial properties of a particular compound into complex systems in a non-destructive way, not available otherwise. Particularly, Raman spectroscopy has been proved to be a useful tool for identification and characterization of solid state properties of pharmaceuticals, including SD studies [10–13]. It is a robust and reliable method with a low limit of detection and minimal sample preparation, with renewed interest of application in pharmaceutical development to characterize among others, content uniformity (composition, distribution, etc.) and chemical aspects as stability [14].

Additionally, the utilization of statistical tools, like PCA, implemented to the confocal Raman imaging technique provides a powerful and fast methodology for the data analysis and the conclusions than can be drawn [15].

Fenbendazole (FBZ) was used in this work, as a model drug belonging to the important class of broad-spectrum benzimidazole (BZ) anthelmintics, worldwide used for the prevention and treatment of parasitic diseases, in veterinary and human medicine, despite their low bioavailability that is hindered by its low aqueous solubility [16]. Nevertheless, the need for new anthelmintic drugs is a concern both for anthelmintic resistance against commercially available drugs for a variety of nematodes of veterinary importance and for several parasites of humans [17, 18]. In this sense, and as part of an ongoing research project to search for new anthelmintics, we have communicated a series of novel valerolactam-benzimidazole hybrids [19, 20] that showed low solubility, similar to their commercial benzimidazole precursors. Then, even when the need to develop new anthelmintic drugs is indisputable, they must be conveniently formulated in order to maximize their availability and efficacy. Similarly, we must also consider the enormous potential for improving existing drugs that are still efficacious by modification of their formulation/delivery, in order to use existing actives more effectively [21].

In this work, solid dispersions of a poorly soluble drug (FBZ) were prepared by a low-temperature fusion method, using two different types of oral safe carriers, poloxamers (polyoxyethylene-polypropylene block copolymer non-ionic surfactants) P407 and P188 [22–24]. The formulations were characterized in terms of solid state properties among others, and chemical imaging was explored as a fast, powerful, and non-destructive tool to characterize the content uniformity and distribution of components of solid dispersions (SDs).

Materials and Methods

Chemicals

Fenbendazole (FBZ, pharmaceutical grade) was kindly donated by Laboratorio Uruguay S.A. (LUSA, Montevideo, Uruguay). Poloxamer 188 (P188) and poloxamer 407 (P407) were provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). All other reagents were of analytical grade.

Preparation of Solid Dispersions

FBZ SDs were prepared by dispersing FBZ in melted P188 or P407 at different ratios (Table 1) in a water bath at 65 °C. The mixtures were homogenized by stirring. The resulting homogenous preparations were rapidly cooled and pulverized. The formulations were sieved to obtain a maximum particle size of 250 μ m and stored in screw-capped glass vials at 8 °C.

Control physical mixtures (PMs) of FBZ and poloxamer were prepared in order to compare the SDs against the simple mixture of its components. PMs were prepared by manually mixing the appropriate amount of FBZ and carrier previously
 Table 1
 Solid dispersions and physical mixtures composition

SD	PM	FBZ (wt.%)	P188 (wt.%)	SD	PM	FBZ (wt.%)	P407 (wt.%)
SD11	PM11	5	95	SD21	PM21	5	95
SD12	PM12	10	90	SD22	PM22	10	90
SD13	PM13	25	75	SD23	PM23	25	75
SD14	PM14	50	50	SD24	PM24	50	50

pulverized and sieved to a maximum particle size of 250 μ m (composition detailed in Table 1).

FBZ Solubility and Dissolution Assay

Excess amounts of pure FBZ were added to 5 mL of HCl 0.1 N in hermetic tubes (by triplicate) transferred to a thermostatic bath (Vicking Dubnoff, Argentina) at 37 °C. After 48 h, 1 mL of suspension was withdrawn and filtered through a Millipore 0.45- μ m membrane filter and quantified by UV-visible spectrophotometry (Thermo Evolution 300). Measurements were performed at 298.5 nm. The calibration curve of the drug follows linearity in the concentration range from 1.6 to 10.0 μ g/mL, with a correlation coefficient value of 0.995 and a limit of quantification (LOQ) for FBZ of 0.23 μ g/mL.

In vitro drug release studies of powered FBZ, SDs, and PMs (equivalent to 5 mg of FBZ, SINK conditions) were performed using USP dissolution apparatus 2 (SR6 SR11-6-Flask Dissolution Test Station, Hanson Research), adapted with 0.45-µm filters for sampling, at a paddle rotation speed of 50 rpm in 900 mL of HCl 0.1 N, at 37.0 °C. Filtered samples were collected at 3, 5, 10, 15, 30, and 60 min and assayed for fenbendazole content by UV-visible spectrophotometry at 289.5 nm. The profiles were statistically compared using a model independent approach by calculating the difference factor (F1) and

Fig. 1 Dissolution profiles of SDs and PMs containing P407, see the "FBZ solubility and dissolution assay" section for experimental details



🖄 Springer

similarity factor (F2) among the profiles as described in bibliography [25].

Physical-Mechanical Properties: Density, Compressibility, and Angle of Repose

The density of the samples was determined by gently pouring the powder into a 10 cm³ graduated cylinder. The bulk density (BD) was calculated as the ratio between weight (g) and volume (cm³). To determine the tap density (TD), the cylinder was tapped in vertical drop until no measurable change in volume was noticed. The Hausner ratio (HR) and the Carr's Index (CI) were calculated in order to evaluate the compressibility of the powder. The angle of repose (α) for each mixture of powders was determined by the funnel method [26].

Thermal Analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained using a Jupiter STA 449, Netzch simultaneous thermal analysis equipment. A sample of around 5 mg was placed in sealed aluminum crucibles with pierced lids. Measurements were made from 27 up to 500 °C using a heating rate of 10 °C/min. The sensors and the crucibles were under a constant flow of nitrogen (70 mL/min) during the experiment. The fusion and decomposition

temperatures were taken as the extrapolated onset temperature of the endothermic/exothermic peak.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed using FTIR spectrometer IR-Prestige 21 (Shimadzu, Japan). The formulations were characterized using KBr disks from 4000 to 500 cm⁻¹, at a resolution of 2 cm⁻¹.

X-ray Powder Diffraction

X-ray powder diffraction (XRPD) was performed using a Rigaku Ultima IV diffractometer operating in a Bragg-Brentano geometry, with CuK α radiation measuring the $2\theta = 4.00-60.00^{\circ}$ range using 2θ steps of 0.02° with a 10-s integration time per step. In order to estimate changes in the crystallinity of drug and carrier, XRPD studies with internal standard (IS) using Y₂O₃ (yttrium oxide) were carried out. For this purpose, we mixed a 20% weight to weight of Y₂O₃ with the SD and PM formulations. Every diffraction peak of FBZ and P407 was normalized by the corresponding areas, in reference to the internal standard peaks. Once normalized, the peak areas of FBZ and P407 in the SD were compared with the corresponding peaks in the PM. FBZ and poloxamer crystallinity after the SD procedure were calculated considering the PM components as the initial crystalline state (100%).

Confocal Raman Microscopy

Confocal Raman spectroscopy was performed using a WITec Alpha 300-RA confocal Raman spectrometer equipment. The excitation laser wavelength corresponds to λ =532 nm, and the power was adjusted to 45 mW to avoid sample decomposition. Raman spectra were obtained by averaging a set of 22.500 spectra with 0.053-s integration time for each spectrum. The spectrometer operating with a grating of 600 lines/mm allowed us to obtain a resolution of ~4 cm⁻¹ in the range of 70 to 4000 cm⁻¹. All the images were collected at the resolution optical limit of 300 nm.

Principal component analysis (PCA) and peak to peak intensity ratio normalization, adapted from Karavas et al. [10], were used for probing the spatial distribution of FBZ in the samples.

Scanning Electron Microscopy

Particle morphology, size, and shape characteristics of pure FBZ, pure P188, SDs, and PMs were examined using a scanning electron microscope (ZEISS, Sigma, Germany). Samples were attached to an adhesive conducting tape mounted on the SEM stubs and were coated with Au before examination.

 Table 2
 Percentage of FBZ dissolved for each formulation within 15 min of the dissolution assay expressed as mean and standard deviation. NQ indicates detected but not quantifiable

% FBZ dissolved (mean \pm SD)

SD	15 min	РМ	15 min
SD11	74.8±3.2	PM11	41.9 ± 1.4
SD12	68.4 ± 1.2	PM12	38.1 ± 3.1
SD13	72.4 ± 0.8	PM13	39.4 ± 1.5
SD14	71.9 ± 1.4	PM14	44.4 ± 1.4
SD21	78.4 ± 2.4	PM21	44.7 ± 1.4
SD22	69.7 ± 3.0	PM22	37.2 ± 1.2
SD23	70.5 ± 2.9	PM23	35.0 ± 0.5
SD24	73.9 ± 0.1	PM24	37.1 ± 3.2
FBZ	NQ		

Results and Discussion

Dissolution Assays

According to FBZ solubility assay (31.3 mg/L at 48 h, HCl 0.1 N, 37 °C), we determined the amount of FBZ to be used in the dissolution study following SINK conditions. FBZ dissolution profiles of pure FBZ, SDs, and PMs containing P407 are shown in Fig. 1. All SDs showed improved dissolution rate of FBZ, compared to the corresponding control PMs (Online Resource 1), demonstrating the utility of SD procedure. The approach used to compare the dissolution profile of each SD with its corresponding PM indicated that the curves of SDs and PMs of equal composition were not similar (Online Resource 2). In fact, within the first 15 min of the dissolution assay, the amounts of FBZ dissolved from SDs doubled those of the PMs (Table 2) both for P188 and for P407. Nevertheless, the dissolution profiles of all SDs were

Table 3 Physical-mechanical properties of formulations containing 95 and 50 wt.% of P407, pure FBZ, and pure P407

Physica	al-mecha	nical properties		
	P407 wt.%	Angle of repose $(\alpha^{\circ})^{*}$	Carr's Index (CI)*	Hausner ratio (HR)*
SD21	95	22.7	27.7	1.4
PM21	95	21.2	25.9	1.3
SD24	50	22.1	26.8	1.4
PM24	50	46.6	46.4	1.8
FEB	0	47.4	48.8	1.9
P407	100	19.5	29.8	1.4

*See the "Physical-Mechanical Properties" section for experimental details

🖄 Springer



62

Fig. 2 DSC and TGA thermograms of SD22, PM22, FBZ, and P407

similar according to de F1 and F2 calculated values, indicating that the different carriers and the drug/carrier ratio did not affect the release of the drug (Online Resource 2).

In previous works, we explored the use of poloxamer as a carrier for preparing solid dispersions of albendazole (ABZ) [27]. In that case, it was observed that the relative ratio of the components (drug/carrier) was a key factor. SDs with lower P188 percentage (50, 75 wt.%) seemed to be more effective in increasing ABZ dissolution rate. A possible explanation of these results could be that this type of polymers can form thermoreversible gels. However, no differences between the proportions explored were found in this study. This could be attributed to differences in drug solubility (FBZ 0.01 mg/L; ABZ 10 mg/L, H₂O, 25 °C) [28]. When DSs are dispersed in water, carriers often dissolve or disperse rapidly due to their hydrophilic property and form a concentrated layer or a gel layer in some cases. If the drug is insoluble or sparingly soluble in the concentrated layer, it can be released intact to contact with water and the dissolution



profile depends on the properties of the drug particles (polymorphic state, particle size, drug solubility) [29]. In this sense, we hypothesize that ABZ dissolution is governed by the carrier's properties, while for FBZ, the drug which plays a central role given its lower solubility could explain why there are no significant differences regarding the concentration of polymer used. In addition, the significantly increased dissolution rate of FBZ when poloxamers are used as carriers may be attributed to its wettability, emulsification, and solubilization effects.

Physical-Mechanical Properties

Flow and compressibility parameters were studied as important physical-mechanical properties for the preparations of oral dosage forms. The results of the measured angle of repose, Carr's Index, and Hausner ratio of SDs and PMs, particularly those containing 95 and 50 wt.% of FBZ, are shown in Table 3. Compared to FBZ, all preparations showed improved rheological properties



Fig. 3 FTIR spectrum of pure FBZ, pure P407, and SD23 containing both compounds

🖄 Springer



Fig. 4 a XRDP diffractograms with Y_2O_3 as internal standard. From bottom to top: FBZ, P407, PM22, SD22. b XRDP diffractograms with Y_2O_3 as internal standard, amplification of the FBZ peaks zone. From bottom to top: FBZ, P407, PM22, SD22

(Online Resource 3) and all SDs showed excellent flow properties [26], particularly compared with the PMs, which could be attributed to the more homogeneous distribution of FBZ within the SDs (see the "Confocal Raman Microscopy" section).

Physicochemical and Structural Characterization

Thermal Analysis

DSC and TGA results showed that FBZ melts with decomposition at 210 °C (Fig. 2). DSC results confirmed the reduction in crystallinity observed in XPRD experiments since poloxamer-normalized melting endotherm showed a 10% reduction in terms of enthalpy (Δ Hmel) when incorporated in SD22 as regards to the PM22.

FTIR and XRPD

From the more relevant infrared signals corresponding to pure FBZ (3336.12; 1630.31; 742.28; 685.11 cm⁻¹) and P188 or P407 (2881.43; 1281.52; 1117.75 cm⁻¹), those that were exclusive signals of each component remain clearly unaltered in the SDs and PMs collected spectra suggesting the absence of chemical interactions between the components in the different formulations (Fig. 3). This observation was confirmed by XRPD where the diffractograms of SDs and PMs showed the signals assigned to each pure component unchanged (FBZ 2theta(°) = 6.68, 11.16, 13.36; P407: 2theta(°) = 19.18, 23.36) (Fig. 4).

In fact, XRPD studies using Y2O3 as an internal standard (100% crystalline, main signals 2theta(°) = 29.45; 34.05; 48.57) were conducted to estimate crystalline fractions of carrier and drug in the different preparations. Previous experiments suggested that the SD process of manufacturing did not affect FBZ crystallinity, although a slight change was detected in poloxamer crystalline fraction. It is important to mention that we selected diffraction peaks of FBZ, P188/P407, and Y₂O₃, which do not appreciably overlap as observed from the diffractograms of the three pure components (Fig. 4a). The results confirmed that there were not any significant differences neither of the crystalline structure nor the crystalline fraction of the drug FBZ when it was formulated as SD or PM (Fig. 4b). Nevertheless, a crystallinity reduction of around 30% for P407 was observed in the SD22 in comparison to PM22 (Table 4), suggesting that the SD procedure affected the crystalline order of the carrier fraction with almost no change in the FBZ phase fraction.

SEM

SEM images of FBZ showed an irregular flat-shaped crystalline solid with a distribution size of $5-20 \mu m$ and a smooth surface (Fig. 5a), while the carrier micrographs showed a

 $\label{eq:Table 4} \begin{array}{ll} \mbox{Crystalline fraction comparison of SD components with respect to the PM} \end{array}$

FBZ		P407		
Peak position (degree)	SD crystalline fraction ^a	Peak position (degree)	SD crystalline fraction ^a	
6.60	117.0	19.30	68.3	
11.20	96.2	23.20	73.8	
13.40	94.9			
Mean \pm SD	102.7 ± 11.2	Mean \pm SD	71.0 ± 3.7	

^a Expressed as percentage (see the "X-ray powder diffraction" section for experimental details)

D Springer



Fig. 5 SEM micrographs of a FBZ 2.34KX, b P188 24X, c MF14 745X, d SD14 104X

smooth surface spherical particles of $200-500 \ \mu m$ (Fig. 5b). On the other hand, the solid dispersion (SD14) and physical mixture (PM14) (1:1 FBZ:P407) showed a clearly different appearance. In fact, while PM images showed acicular and flat particles (Fig. 5c), those of the SD were rounder and homogeneous (Fig. 5d).

Fig. 6 Raman spectra of FBZ (below) and P407 (above)

Confocal Raman Microscopy

Raman spectra of pure FBZ and P407 were collected (Fig. 6). The 2-dimensional (2D) confocal Raman microscopy images were obtained by getting single Raman spectra for every single pixel of the selected images. This procedure was performed on



 $\underline{\textcircled{O}}$ Springer

SD22 and PM22 samples (FBZ 10 wt.%) at random locations in areas of 15 × 15 μ m², with a grid of 85 × 85 points defining the bitmap image. The mapping results were normalized in terms of peak intensity ratios in order to avoid point-to-point variations produced by height differences on the sample surface [10]. The collected Raman spectra of crystalline FBZ and P407 are shown in Fig. 7. The selected signals were 1591 cm⁻¹ for FBZ and 866 cm⁻¹ for P407, and the ratio was calculated as I₁₅₉₁/I₈₆₆. These peaks were exclusive signals of each component and no interferences with other signals were detected at their wavelength (Fig. 6). We proceeded with scripts prepared in our group in order to obtain the histograms of the different intensity ratio distributions, and presented as complementary statistical information [30].

The SD mapping showed better content uniformity and distribution of FBZ in comparison to the PM, although a FBZ concentrated spot of $2-3 \mu m$ was detected (Fig. 7a).

The PM mapping showed four spots of concentrated FBZ, with a mean size of 4 μm without any other signal indicating FBZ distribution within the polymer matrix, demonstrating poor homogeneity and blending between the active and the matrix (Fig. 7b). Histograms showing the distribution of the calculated ratios and their density in the image are also shown in Fig. 7, on the right of their corresponding 2D mapping. These charts correlate very well with the information given by the images. In fact, the histogram corresponding to the SD shows a less discrete distribution than the distribution of PM and a more homogeneous density. On the other hand, the PM histogram shows just a few ratio bars, and high-density values compared to the SD. This difference would indicate an SD image formed by pixels including a wide range of combinations of FBZ/P407 ratios, as opposed to a PM image formed by pixels where either FBZ or P407 spectra domains presented signals.



Fig. 7 XY confocal Raman microscopy mapping of FBZ/P407 SD22 (a) and PM22 (b); their corresponding histograms are shown on the right. Scale bars indicate the intensity ratio I_{1591}/I_{866} . All the images include the number of the grid points in X and Y axis, and the corresponding bar length

Deringer



Fig. 8 PCA reconstructed image of SD22 considering. a PC1. b PC2. All the images include the number of the grid points in X and Y axis, and the corresponding bar length

The principal component analysis (PCA) images of the samples were obtained by processing the same spectral data used to calculate the normalized I_{1591}/I_{866} 2D confocal Raman mapping. In the analysis of SD22, the principal component 1 (PC1) explains almost 90% of the variance within the data set. PCA imaging allowed for the discrimination between two groups. The first group corresponds to a zone represented in blue, with a mean spectrum that corresponds to a mixture of FBZ and P407, and zones with higher score values with mainly P407 composition (Fig. 8a). When analyzing the mapping of the second principal component (PC2), which represents less than 5% of the explained variance, the image discriminates a few spots of FBZ composition at higher score values (Fig. 8b). On the other hand, in the reconstructed PM22



Fig. 9 PCA reconstructed image of PM22, considering PC1. The image includes the number of the grid points in X and Y axis, and the corresponding bar length

🖄 Springer

66

image, the PC1 represents also 90% of the explained variance but its reconstructed image (Fig. 9) discriminates between three groups: an extended zone in blue which corresponds to pure P407, a small transition zone in sky-blue where the mean spectra show the presence of both components, and a zone with higher score values that represents pure FBZ. On the other hand, in this case, PC2 did not provide different information from PC1.

These PCA results confirm what was previously observed with the normalized I_{1591}/I_{866} 2D mapping, which indicated that the distribution of FBZ is better within the polymeric matrix in the SD in comparison to that of the PM, which could allow us to assure a better content uniformity. Additionally, from the data analysis point of view, the utilization of PCA constitutes a powerful and fast technique that does not require further data reduction nor manipulation. This structural characterization clearly explains the remarkable differences between the dissolution curves obtained for DSs and PMs, indicating also that the crystalline fraction of P407/P188 is reduced when subjected to SD processes.

Conclusions

In this work, it was demonstrated the usefulness of Raman chemical imaging as a fast, powerful, and non-destructive method in pharmaceutical development.

In fact, with the aim to enhance aqueous solubility of fenbendazole, binary solid dispersions containing two different poloxamer carriers were prepared using a low-temperature fusion method. In vitro dissolution results exhibited a marked improvement when FBZ was formulated as SD. The solid state properties of these preparations were characterized by different techniques such as X-ray powder diffraction (XRPD), Raman confocal microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy, and SEM.

The most relevant contribution of structural characterization was to probe that the crystalline fraction of P407/P188 is reduced and FBZ is better distributed within the polymeric matrix in the SD.

We hope that this methodology can be used in the future to address similar materials contributing to the design of new drug delivery systems and could be incorporated towards the use of quality by design (QbD) approaches in pharmaceutical development.

Acknowledgments The authors especially thank Dario O. Weitmann, Business Coordinator BCS in BASF Argentina S.A for the Poloxamer samples, Q.F. Antonio Malanga (BIOTEFA—Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay) for kindly providing access to the necessary equipment, and Lourdes Martino, who edited this paper. The authors acknowledge Prof. Dr. Alejandro Ayala (Universidade Federal do Ceará, UFC, Brazil) for providing DSC and TG measurement, and Fernando Pignanelli (Facultad de Química, UdelaR, Uruguay) for the help in the implementation of PCA and the peak-to-peak computational scripts for the data analysis.

Funding Information This work was supported by grants from the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay), ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay), Project ANII-EQC-X-2012-1-14 IPTP, AUGM (Asociación de Universidades del Grupo Montevideo), SECyT-UNC, CONICET, ANPCyT (Argentina).

References

- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. J Pharm Pharmacol. 2010;62(11):1607–21. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010. 01030.x.
- Leuner C, Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. Eur J Pharm Biopharm. 2000;50(1):47–60. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00076-X.
- Vasconcelos T, Sarmento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug Discov Today. 2007;12(23):1068–75. https://doi.org/10.1016/j. drudis.2007.09.005.
- Brough C, Williams RO. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. Int J Pharm. 2013;453(1):157–66. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm. 2013.05.061.
- Vo CL-N, Park C, Lee B-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm. 2013;85(3):799–813. https://doi.org/10.1016/j. ejpb.2013.09.007.
- Mehanna MM, Motawaa AM, Samaha MW. In sight into tadalafilblock copolymer binary solid dispersion: mechanistic investigation of dissolution enhancement. Int J Pharm. 2010;402(1):78–88. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.024.
- Bhandari KH, Newa M, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Lyoo WS, et al. Preparation, characterization and evaluation of coenzyme Q10 binary solid dispersions for enhanced solubility and dissolution. Biol Pharm Bull. 2007;30(6):1171–6. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1171.

- U.S. Food and Drug Administration, Center for Drugs Evaluation Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) and Office of Regulatory Affairs (ORA). Guidance for Industry: PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development. 2004.https://www.fda.gov/downloads/Drugs/ GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ UCM070305.pdf. Accessed 11 Dec 2017.
- Vasanthavada M, Tong W-Q, Serajuddin A. Development of solid dispersions for poorly water-soluble drugs. In: Liu R, editor. Water insoluble-drug formulation. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 499–529.
- Karavas E, Georgarakis M, Docoslis A, Bikiaris D. Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. Int J Pharm. 2007;340(1):76–83. https://doi.org/ 10.1016/j.ijpharm.2007.03.037.
- Furuyama N, Hasegawa S, Hamaura T, Yada S, Nakagami H, Yonemochi E, et al. Evaluation of solid dispersions on a molecular level by the Raman mapping technique. Int J Pharm. 2008;361(1): 12–8. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.009.
- Punčochová K, Vukosavljevic B, Hanuš J, Beránek J, Windbergs M, Štěpánek F. Non-invasive insight into the release mechanisms of a poorly soluble drug from amorphous solid dispersions by confocal Raman microscopy. Eur J Pharm Biopharm. 2016;101:119–25. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.02.001.
- Schoenherr C, Haefele T, Paulus K, Francese G. Confocal Raman microscopy to probe content uniformity of a lipid based powder for inhalation: a quality by design approach. Eur J Pharm Sci. 2009;38(1):47–54. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.05.011.
- Haefele T, Paulus K. Confocal raman microscopy in pharmaceutical development. In: Dieing T, Hollricher O, Toporski J, editors. Confocal raman microscopy. Springer series in optical sciences. Heidelberg: Springer; 2010. p. 165–202.
- Choi DS, Zhang Y-E, Tian H, Shah N, Chokshi HP. Evaluation on the drug–polymer mixing status in amorphous solid dispersions at the early stage formulation and process development. J Pharm Innov. 2013;8(3):163–74.
- Campbell WC. Benzimidazoles: veterinary uses. Parasitol Today. 1990;6(4):130–3. https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90231-R.
- Saunders GI, Wasmuth JD, Beech R, Laing R, Hunt M, Naghra H, et al. Characterization and comparative analysis of the complete Haemonchus contortus β-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. Int J Parasitol. 2013;43(6):465–75. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.12.011.
- Longo M, Zanoncelli S, Messina M, Scandale I, Mackenzie C, Geary T, et al. In vivo preliminary investigations of the effects of the benzimidazole anthelmintic drug flubendazole on rat embryos and fetuses. Reprod Toxicol. 2014;49:33–42. https://doi.org/10. 1016/j.reprotox.2014.06.009.
- Munguía B, Michelena M, Melian E, Saldaña J, Ures X, Manta E, et al. Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. Exp Parasitol. 2015;153:75–80. https://doi. org/10.1016/j.exppara.2015.03.013.
- Munguía B, Mendina P, Espinosa R, Lanz A, Saldaña J, Andina MJ, et al. Synthesis and anthelmintic evaluation of novel valerolactambenzimidazole hybrids. Lett Drug Des Discovery. 2013;10(10): 1007–14. https://doi.org/10.2174/15701808113109990028.
- Hennessy DR. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. Vet Parasitol. 1997;72(3):367–90. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97) 00106-4.
- Vilhelmsen T, Eliasen H, Schæfer T. Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. Int J Pharm. 2005;303(1):132–42. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.012.

D Springer

- Zhai H, Li S, Andrews G, Jones D, Bell S, Walker G. Nucleation and growth in fluidised hot melt granulation. Powder Technol. 2009;189(2):230–7. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2008.04.021.
- Kibbe AH, American Pharmaceutical A. Handbook of pharmaceutical excipients. Washington, D.C.: American Pharmaceutical Association; 2000.
- Xie F, Ji S, Cheng Z. In vitro dissolution similarity factor (f2) and in vivo bioequivalence criteria, how and when do they match? Using a BCS class II drug as a simulation example. Eur J Pharm Sci. 2015;66:163–72. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.002.
- 26. Pharmacopeia U. USP 29–NF 24. Rockville: USP; 2005.
- 27. Castro SG, Bruni SS, Lanusse CE, Allemandi DA, Palma SD. Improved albendazole dissolution rate in Pluronic 188 solid

dispersions. AAPS PharmSciTech. 2010;11(4):1518-25. https://doi.org/10.1208/s12249-010-9517-6.

- Horvat AJ, Babić S, Pavlović D, Ašperger D, Pelko S, Kaštelan-Macan M, et al. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. TrAC Trends Anal Chem. 2012;31:61–84. https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.023.
- Craig DQM. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. Int J Pharm. 2002;231(2):131–44. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00891-2.
- Eaton JW, Bateman D, Hauberg S, Webbring R. A high-level interactive language for numerical computations. In GNU Octave version 4.2.1. Free Software Foundation. 2017. https://www.gnu.org/ software/octave/octave.pdf. Accessed 11 Dec 2017.

68

🖄 Springer

Apéndice 4

Análisis del efecto del polímero codisuelto en las medidas de tamaño por dispersión dinámica de la luz

Los siguientes estudios se realizaron en el marco del trabajo final del Curso de Nanoquímica para estudiantes del Programa PEDECIBA (edición 2019), en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias (UdelaR), a cargo del Dr. Prof. Eduardo Méndez.

Se propusieron los siguientes objetivos:

- Estudiar el tamaño de partícula del sistema en condiciones óptimas con el equipamiento de DLS disponible en el Laboratorio de Biomateriales y comparar los resultados obtenidos con las medidas realizadas previamente en las instalaciones de la UNC.
- Estudiar la influencia del tamaño de partícula del polímero (P188) en el tamaño de partícula medido para los nanocristales.

Se describe a continuación la metodología empleada para alcanzar los objetivos propuestos.

Metodología

Medida del tamaño de partícula de nanocristales de valero fenbendazol

Se toma una pequeña muestra de polvo de nanocristales y se dispersan en agua miliQ (libre de polvo). Se diluye la suspensión hasta una transparencia adecuada para poder medir en DLS. Se realizan medidas en las siguientes condiciones (siguiendo los lineamientos de la normativa ISO 22412:2017 *Particle size analysis - Dynamic light scattering*): 1) se acondiciona la celda de medida con al menos 3 lavados de agua libre de partículas; 2) las muestras son dispersadas en agua de calidad miliQ (libre de partículas) y en caso de ser posible se filtran por filtros de 0.22 µm una vez dispersas¹; 3) se dispersa una punta de espátula del sólido en 10 mL de agua libre de partículas que posteriormente se diluye 1/10 también en agua miliQ para obtener una solución límpida que permita medir en DLS. Las medidas de 2 minutos de duración se realizan empleando un láser de 659 nm (por quintuplicado) a una temperatura de 25 °C, empleando el algoritmo de CONTINN en un equipo *Zeta Potential Analizer* (ZetaPlus, Brookhaven).

Medida de la influencia del poloxamer 188 en el tamaño de los nanocristales de valero-fenbendazol

Se prepara una solución de P188 en agua miliQ (libre de polvo) que posteriormente se filtrar con filtro de jeringa con una membrana de 0.22 um de tamaño de poro para eliminar el polvo que pueda acompañar al polímero. Realizar las medidas en las mismas condiciones que para los nanocristales.

Discusión y resultados

Debido a que el perfil de disolución del fármaco estará directamente relacionado con su tamaño de partícula, es necesario disponer de una técnica rápida que permita conocerlo de forma reproducible para seguir el proceso de molienda, caracterizar el tamaño logrado luego del proceso de secado y poder realizar

¹No fue posible filtrar las nanopartículas dispersadas de las muestras de nanocristales, ya que se estima que su tamaño medio ronde los 300 nm, por lo que un filtro de 0.45 μ m podría eliminar parte de las partículas, modificando la medida de tamaño de la población.

seguimientos de la estabilidad de las partículas obtenidas a lo largo del tiempo (meses a años). Los nanocristales de VAL-FBZ se encuentran embebidos en la matriz polimérica de P188, esto hace difícil la aplicación de medidas de tamaño de partícula directas por imagen, como TEM, además de resultar poco prácticas para el tipo de controles necesarios durante el proceso. Dispersar en agua el polvo de nanocristales obtenido garantiza la disolución inmediata del polímero (muy hidrofílico) dejando expuestas las partículas de fármaco en el medio acuoso, que rápidamente es saturado por el fármaco lo que enlentece la erosión de las nanopartículas e impide su disolución (la solubilidad en agua a 25 °C de VAL-FBZ es menor a 0.05 mg/L).

Las medidas de radio hidrodinámico se realizaron con la limitación de no poder filtrar las muestras una vez redispersadas, como fuera mencionado en la metodología, con lo que no se puede garantizar que la muestra esté libre del polvo que acompañe al sólido. Todas las medidas de nanocristales fueron realizadas en las mismas condiciones, por lo que la presencia de polvo sería un error presente en todas las medidas y afectaría muy poco a efectos comparativos. Para evaluar si las medidas que se realizaron fueron hechas en condiciones que garantizaran medidas estables se observaron los gráficos de correlación e intensidad vs tiempo que proporciona el software en tiempo real. El gráfico de correlación obtenido para la serie de medidas de nanocristales mostró la caída exponencial característica de partículas que se comportan como un coloide y dispersan la luz (figura 4.1). Por otro lado, el gráfico de intensidad vs tiempo no mostró ningún comportamiento que pudiera indicar agregación o decantación de las partículas de la muestra, tampoco efectos de la temperatura (no se muestra), o presencia de partículas de polvo que difirieran notablemente del tamaño de la población, lo cual indica que las medidas se realizaron en las mejores condiciones posibles.

Las medidas de radio hidrodinámico de los nanocristales realizadas arrojaron un valor promedio de 384.61 nm con una desviación estándar de 6.73 nm (ver tabla de la figura 4.2 y la figura 4.3). El valor obtenido es muy similar al obtenido para la muestra en el equipamiento disponible en la UNC: 370.00 nm con una desviación estándar de 4.46 nm (medidas 7 meses antes de estos experimentos). Es probable que la diferencia que existe entre las medidas sea debido a un efecto de agregación con el tiempo de los nanocristales en la matriz sólida, que hemos ido corroborando desde su producción a finales de 2018, y no se deba a diferencias en la medición de los diferentes equipos, lo



Figura 4.1: Gráfico de correlación para las medidas de radio hidrodinámico de los nanocristales de valero-fenbendazol medido por dispersión dinámica de la luz.

ideal sería haber podido medir simultáneamente en el tiempo la misma muestra en los dos laboratorios. Estos valores sugieren que el uso de DLS como aproximación para la caracterización a efectos comparativos del tamaño de los nanocristales obtenidos redispersados en agua es una metodología acertada, si bien habría que continuar realizando estudios de reproducibilidad, intra e inter-laboratorio.

Туре	Start Date/Time	Sample ID	Eff. Diam. (nm)	Polydispersity	Baseline Index
DLS	11/8/2019 5:04:40 AM	FEBE Y POLIMERO DISUELTOS - 6	388.66	0.262	7.7
DLS	11/8/2019 5:04:40 AM	NC VAL FEB 1 - 5	388.66	0.262	7.7
DLS	11/8/2019 5:02:36 AM	NC VAL FEB 1 - 4	375.84	0.212	6.9
DLS	11/8/2019 5:00:32 AM	NC VAL FEB 1 - 3	387.68	0.259	2.6
DLS	11/8/2019 4:58:28 AM	NC VAL FEB 1 - 2	390.67	0.272	8.2
DLS	11/8/2019 4:56:24 AM	NC VAL FEB 1 - 1	376.18	0.233	0.0
		Mean:	384.61	0.250	5.5
		Std Err:	2.75	0.009	1.4
		Std Dev:	6.73	0.023	3.4

Figura 4.2: Medidas de radio hidrodinámico e índice de polidispersidad de las muestras de nanocristales de VAL-FBZ

Por otro lado, el índice de polidispersidad promedio obtenido fue de 0.250 con una desviación estándar de 0.023 (ver tabla de la figura 4.2) lo cual también tuvo una buena correlación los valores obtenidos en la UNC: 0.261 con un desvío de 0.015. Del análisis de los índices de polidispersidad obtenidos se desprende que la muestra es muy polidispersa, lo cual es esperable por el tipo de metodología empleada para su producción y además porque las muestras no fueron pasadas por ningún tipo de tamiz que controlara el tamaño, lo cual podría realizarse si se quisiera disponer de muestras con tamaño de partícula más controlado.

Las medidas de radio hidrodinámico en DLS fueron realizadas en presencia del polímero disuelto en el medio, por lo cual es de importancia saber si éste posee de por sí un tamaño que pueda influir en el tamaño observado para la población de partículas de fármaco. Con este fin, se realiza la medición de tamaño de una solución de polímero en una concentración aproximada a la que encontramos en la suspensión de nanocristales. El gráfico de correlación cuando se realiza la medida de la solución de polímero no muestra la curva sigmoidea característica si no que presenta valores aleatorios (ver la figura 4.4), sugiriendo que la muestra no dispersa la luz, no pudiendo asignársele un radio hidrodinámico medible diferente de cero. Las medidas de tamaño que proporciona el equipo (ver tabla de la figura 4.5) son de 0 nm, lo que comprueba que las moléculas de polímero forman una solución verdadera. El hecho de que el polímero no presente un radio hidrodinámico en solución no implica que no contribuya al radio hidrodinámico de las partículas de fármaco, que podrían rodearse de polímero cuando se encuentran dispersas en el medio, pero sí podemos descartar que se estén midiendo como partículas las moléculas de polímero en sí mismas.



Figura 4.3: Gráfico de intensidad. Distribución de tamaños del radio hidrodinámico medido por dispersión dinámica de la luz para las muestras de nanocristales de valero-fenbendazol.

Conclusiones

Fue posible comparar las medidas de tamaño de los nanocristales de VAL-FBZ realizadas en dos equipos de DLS diferentes (Córdoba y Montevideo,



Figura 4.4: Gráfico de correlación de la muestra de polímero en solución.

Туре	Start Date/Time	Sample ID	Eff. Diam. (nm)	Polydispersity	Baseline Index
DLS	12/20/2019 5:52:37 AM	Polimero P188 más concentrado - 5	0.00	0.000	7.3
DLS	12/20/2019 5:50:36 AM	Polimero P188 más concentrado - 4	0.00	0.000	0.0
DLS	12/20/2019 5:48:34 AM	Polimero P188 más concentrado - 3	0.00	0.000	9.0
DLS	12/20/2019 5:46:32 AM	Polimero P188 más concentrado - 2	0.00	0.000	9.6
DLS	12/20/2019 5:44:31 AM	Polimero P188 más concentrado - 1	0.00	0.000	7.6
-		Mean:	0.00	0.000	6.7
		Std Errs	0.00	0.000	1.7
		Std Dev:	0.00	0.000	3.9

Figura 4.5: Tabla de resultados de la medida de poloxamer 188 en solución.

en fechas cercanas) obteniendo un tamaño de la población con una media de diámetros entre los 370-380 nm, en ambos casos. Este resultado indica que a pesar de que el equipo de DLS no se encuentra optimizado para realizar este tipo de medias, es posible tener una idea aproximada del tamaño de partícula de la población con la que se trabaja y los resultados resultan concordantes, indicando que las medidas podrían ser reproducibles, aunque faltaría realizar más experimentos que lo comprueben.

Por otro lado, se comprobó que el polímero disuelto no tiene influencia sobre la medida de tamaño de la población de partículas de fármaco ya que por sí solo no presenta radio hidrodinámico, al no formar una solución coloidal. Sin embargo, no se puede descartar que el P188 se disponga de forma tal entorno a las partículas de polvo que colabore a aumentar el radio hidrodinámico de la población.

Apéndice 5

Microscopías de barrido electrónico colectadas para otras muestras

Las imágenes colectadas de NCR2 (50 % p/p de P407) y NCR3 (50 % p/p de PVP-k30) se muestran en la figura 5.1.



Figura 5.1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de **a**. nanocristales de PVP y fenbendazol en relación 1:1 5.63KX y **b**. nanocristales de P407 y fenbendazol en relación 1:1 22.84KX.

Apéndice 6

Nanocrystals of Novel Valerolactam-Fenbendazole Hybrid with Improved in vitro Dissolution Performance

Melian, M. E., Paredes, A., Munguía, B., Colobbio, M., Ramos, J. C., Teixeira, R., Manta, E., Palma., S, Faccio, R., Domínguez, L. (2020). Nanocrystals of novel valerolactam-fenbendazole hybrid with improved in vitro dissolution performance. AAPS PharmSciTech, 21(7), 1-15.
AAPS PharmSciTech (2020) 21:237 DOI: 10.1208/s12249-020-01777-y



Research Article

Nanocrystals of Novel Valerolactam-Fenbendazole Hybrid with Improved *in vitro* Dissolution Performance

Maria Elisa Melian,¹ Alejandro Paredes,² Beatriz Munguía,¹ Maximiliano Colobbio,³ Juan Carlos Ramos,³ Ramiro Teixeira,¹ Eduardo Manta,^{3,4} Santiago Palma,² Ricardo Faccio,⁵ and Laura Domínguez^{1,6}

Received 11 May 2020; accepted 27 July 2020

Valero-fenbendazole (VAL-FBZ) is a novel hybrid compound with in vitro Abstract. anthelmintic activity, designed and synthesized to address the global problem of resistance to anthelmintic compounds. This new molecule derives from fendendazole (FBZ), a wellknown commercially available benzimidazole used in veterinary medicine despite its poor water solubility. In this work, we report for the first time a strategy to solve the solubility problems of FBZ and VAL-FBZ by means of self-dispersible nanocrystals (SDNC). Nanocrystals were prepared by media milling followed by a spray-drying step, and a comprehensive and exhaustive structural and physicochemical characterization was carried out, in order to understand the systems and their behavior. The formulation poloxamer 188 (P188):FBZ 1:1 turned out with the best process yield (53%) and re-dispersability properties, particle size average of 258 nm, and polydispersity index of 0.2 after redispersion in water. The dissolution profile showed a markedly increased dissolution rate compared with the simple mixture of the components (80% FBZ dissolved in 15 min from the SDNC vs 14% from the control formulation). FTIR spectroscopy, thermal analysis, and X-Ray Powder Diffraction (XRPD) studies showed no chemical interactions between components and an extensive confocal Raman microscopy analysis of the formulations showed very homogeneous spatial distribution of components in the SDNC samples. This manufacturing process was then successfully transferred for preparing and characterizing VAL-FBZ:P188 (1:1) SDNC with similar results, suggesting the promising interest of a novel anthelmintic with improved biopharmaceutical behavior. In conclusion, new FBZ and VAL-FBZ SDNC with improved dissolution rate were successfully prepared and characterized.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1208/s12249-020-01777-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

- ¹ Área de Farmacología, CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), General Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay.
- ² Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET and Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- ³Laboratorio de Química Fina, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, By Pass de
- Rutas 8 y 101 s/n, CP 91000, Canelones, Pando, Uruguay. ⁴ Laboratorio de Química Farmacéutica, DOO, Facultad de Química,
- Universidad de la República (Udelar), Av. General Flores, 2124, Montevideo, Uruguay.
- ⁵ Área Física & Centro NanoMat, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), Av. General Flores, 2124, Montevideo, Uruguay.
- ⁶ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: ldoming@fq.edu.uy)

Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta Delta Pereberga Delta Delta

1530-9932/20/0000-0001/0 $\ensuremath{\mathbb{C}}$ 2020 American Association of Pharmaceutical Scientists

237 Page 2 of 15

KEY WORDS: fenbendazole; valerolactam-fenbendazole hybrid; self-dispersible nanocrystals; bead milling; spray-drying.

INTRODUCTION

The intensive use of anthelmintic products has led to global resistance to all commercially available drugs with severe consequences for livestock producing countries (1–5). This widespread resistance also includes Uruguay, where recent reports show an alarming tendency towards the expansion of anthelmintic resistance (6–8). As part of a project to search for new anthelmintic drugs, we have communicated a series of novel valerolactam-benzimidazole hybrid compounds, with interesting *in vitro* activity, but similarly to their benzimidazole precursors, they present extremely low water solubility (9,10).

Poor water solubility remains an important challenge for the development of new drugs, since it can lead to poor or erratic oral absorption and consequently to suboptimal therapeutic performance (11). Different processes have been designed to increase solubility, dissolution rate, and bioavailability of hydrophobic active pharmaceutical ingredients (APIs), with focus on those classified as classes II and IV in the biopharmaceutical classification system (BCS). Some classical formulation strategies that have been explored include liposomes (12), micelles (13), co-crystals (14), and cyclodextrins (15), among others.

More recently, novel nanoformulations such as nanoparticles (16), solid dispersions (17), nanoemulsions (18), and nanogels (19) have been also reported. Among all available strategies, nanocrystals (NCs) have made a major academic and industrial impact, since first reported (20-22). NCs are nanoparticles composed of 100% drug, usually surrounded by a stabilizer layer which acts as soluble link among the drug particles, enabling its redispersion after contact with an aqueous solvent (i.e., gastrointestinal fluids) (23-26). NCs' key features are based on their reduced particle size, which produces a sharp increase in the specific surface area, giving them mucoadhesive properties, while decreasing the diffusion laver thickness leading to an increase in the extent and rate of drug dissolution (24,27). Nanoparticles in solution are quite unstable because of the extra Gibbs free energy contribution related to reducing particle size and increasing surface energy (28). They tend to agglomerate to minimize their total energy when formulated as liquids, but this problem can be solved by the addition of a correct type and amount of stabilizer (29).

Nanocrystal production technologies can be classified as top-down or bottom-up. Bottom-up processes imply the growth of drug clusters from an atomic level (i.e., drug dissolution in a suitable medium, followed by precipitation or drying). Top-down approaches refer to the reduction of the particle size of the bulk drug in order to get nanosized particles using a mechanical method (i.e., media milling or high-pressure homogenization) (17). Moreover, the combination of bottom-up and top-down technologies has also been developed (30). Among the top-down techniques, the wet bead milling is one of the most frequently used for drug nanocrystals production (31) and is currently reported as a high efficiency and low cost technique (32–34). The drug, stabilizer, milling media, and solvent are stirred under controlled temperature, allowing to obtain drug suspensions highly uniform in particle sizes and within the sub-micrometer range. It is interesting to note that as a part of the process of wet bead milling, the obtained nanosuspension, properly stabilized, could be used as a liquid formulation in the form of injectables, oral suspensions, etc. (35). Otherwise, the obtained nanosuspension can be dried and converted into redispersible powders, being the spray-drying technique one of the most cost-effective processes commonly used to this purpose (25,36,37).

Recently, we have reported the manufacturing and characterization of solid dispersions of a poorly watersoluble drug, fenbendazole (FBZ), in order to improve its dissolution rate, with promising results (8). This drug belongs to the broad-spectrum benzimidazole (BZ) anthelmintic class, worldwide used for the treatment of parasitic diseases in human and veterinary medicine, despite their low bioavail-ability (38–40).

In this work, we report for the first time a strategy to overcome the solubility problems of FBZ and valerofenbendazole (VAL-FBZ, one of the new compounds patented by the group, Fig. 1, (41)). FBZ and VAL-FBZ NCs were prepared by wet bead milling followed by a spray-drying step, and a comprehensive physicochemical characterization was carried out, including confocal Raman microscopy, thermal analysis, X-ray powder diffraction FTIR spectroscopy, and dissolution assays.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fenbendazole (FBZ, pharmaceutical grade) and its marketed suspension (MS) were kindly provided by Laboratorio Uruguay S.A. (LUSA, Montevideo, Uruguay). Poloxamer 188 (P188) and poloxamer 407 (P407) were provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). For the milling process, Zirmil® Yttria-stabilized zirconia beads of two different sizes (0.15–0.28 and 0.4–0.6 mm) (Saint-Gobain ZirPro Kölh, Germany) were used. Mannitol, lactose,



Fig. 1. Fenbendazole and valero-fenbendazole structures

AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, METHOCEL[™] E5 Premium LV), and polyvinylpyrrolidone (PVP-k30) were of pharmaceutical grade. Valero-fenbendazole (VAL-FBZ) was produced by the collaboration between the groups of Medicinal Chemistry and Pharmacology from Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay (DNPI, n° 14,424) (9); a brief scheme of the chemical synthesis is described in supplementary data. All other reagents were of analytical grade.

Methods

Preparation of FBZ and VAL-FBZ Nanosuspensions (NSs)

Drug nanosuspensions (NSs) were prepared by wet bead milling using a NanoDisp® laboratory-scale mill (NanoDisp, Córdoba, Argentina). The device consisted of a sealed jacketed grinding chamber and a shaft coupled to a motor. First, mixtures of drug and different carriers (HPMC, PVP, Lactose, Mannitol, P407 or P188) in 1:1 ratio (Table 1) were grounded in a mortar and ultrapure water was gradually added up to 200 mL to form a homogeneous suspension. Also, for P188 different NSs were prepared by decreasing the amount of stabilizer (33, 20, and 10%). Afterwards, drug suspensions and zirconia beads (particle size 0.5 mm or 0.1 mm) were placed in the milling chamber and processed at approximately 1600 rpm for 2 h, according to the previous experiences reported (42,43). Samples were taken every 30 min for particle size and polydispersity index (PDI) evaluation.

Preparation of Self-Dispersible Nanocrystals (SDNCs)

The spray-drying process was performed on a laboratory-scale Mini Spray-dryer Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) equipped with a dehumidifier module, following an experimental set-up reported previously (25). A two-fluid nozzle with a cap orifice diameter of 1.5 mm was used, and the operating conditions were atomization air (L/h), 50; aspiration (m^3 /h), 75%; temperature (°C), 45; and pump (mL/min), 5.

Preparation of Drug Physical Mixtures (PMs)

Control physical mixtures of drug and carrier were prepared in order to compare the SDNCs against the simple mixture of its components. PMs were prepared by manually mixing the appropriate amount of FBZ or VAL-FBZ and carrier previously pulverized and sieved to a maximum particle size of $250 \ \mu m$.

Characterization

Process Yield Determination. Full process (FP) yield was determined by weighting the powder obtained after the drying step and comparing it with the weight of the starting material (100%). These FP yield estimations help assess the global mass loss produced during the different manufacturing steps (e.g., product separation from the milling bed, transfers among containers, and drying). Specifically, the drying step yield was calculated weighting the suspensions before drying

237 Page 3 of 15

to consider the amount of solid in it as 100% and comparing it with the weight of dry powder obtained after the spray-drying process.

Particle Size and Polydispersity Index (PI) Measurements

The particle size and PI values of FBZ and VAL-FBZ nanocrystal suspensions and their corresponding redispersed SDNCs (approximately 1 mg of SDNCs were resuspended in 5 mL of water) were determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano-Zs®, Malvern Instruments, UK). Before taking measurements, the samples were properly diluted with deionized water in order to standardize nanocrystal concentration.

Moisture Content

The powder moisture content was measured immediately after the spray-drying step in a moisture analyzer with halogen heating (OHAUS M45VR).

Scanning Electron Microscopy

Scanning electron microscopy images of pure components, the SDNCs, and the PMs were taken by scanning electron microscopy (SEM). Samples were attached to adhesive conducting tape and sputtered with Au before examination using a scanning electron microscope (ZEIZZ, Sigma, Germany).

Confocal Raman Microscopy

Confocal Raman microscopy was performed using WITec Alpha 300-RA confocal Raman spectrometer equipment. The excitation laser wavelength corresponds to $\lambda = 532$ nm, and the power was adjusted to 45 mW to avoid sample decomposition. Raman spectra were obtained by averaging a set of 3.600 spectra with 0.133 s integration time for each spectrum. The spectrometer operating with a grating of 600 lines/mm allowed us to obtain spectrums with resolution of ~4 cm⁻¹ in the range of 70–4000 cm⁻¹. All the images were collected at the resolution optical limit of ~300 nm.

Principal component analysis (PCA) and peak to peak intensity ratio normalization, adapted from Karavas *et al.* (44), were used for analyzing the spatial distribution of FBZ and VAL-FBZ in the samples.

X-Ray Powder Diffraction (XRPD)

X-ray powder diffraction (XRPD) was performed using Rigaku Ultima IV diffractometer operating in a Bragg-Brentano geometry, with CuK α (λ =1.5418 Å) radiation measuring the 2 θ = 2.00–60.00° range using 2 θ steps of 0.02° with a 10 s integration time per step.

237 Page 4 of 15

AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

Table 1. Composition of the Prepared Fenbendazole and Valero-Fenbendazole Nanosuspensions

Formulation	FBZ (g)	VAL-FBZ (g)	P188 (g)	HPMC (g)	P407 (g)	PVP-k30 (g)	Lactose (g)	Mannitol (g)	Zirconia beads size (mm)
NS1	5.0	-	5.0	_	-	_	-	-	0.5
NS2	5.0	-	2.5	_	-	-	-	-	0.5
NS3	5.0	-	1.2	_	-	-	-	-	0.5
NS4	5.0	-	0.5	-	-	-	-	-	0.5
NS5	5.0	-	-	5.0	-	-	-	-	0.5
NS6	5.0	-	-	-	5.0	-	-	-	0.5
NS7	5.0	-	-	-	-	5.0	-	-	0.5
NS8	5.0	-	2.5	-	-	-	2.5	-	0.5
NS9	5.0	-	2.5	-	-	-	-	2.5	0.5
NS10	2.5	-	2.5	-	-	-	-	-	0.1
NS11	-	2.5	2.5	-	-	-	-	-	0.1

Thermal Analysis

Thermogravimetric (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained using a Jupiter STA 449, Netzch simultaneous thermal analysis equipment. A sample of around 5 mg was placed in sealed aluminum crucibles with pierced lids. Measurements were made from 30° C up to 300° C using a heating rate of 5° C/min. The sensors and the crucibles were under a constant flow of nitrogen (50 mL/min) during the experiment. The fusion and decomposition temperatures were taken as the extrapolated onset temperature of the endothermic/exothermic peak.

FBZ and VAL-FBZ Saturation Solubility Experiments

Excess amounts of pure drug, PMs and SDNCs containing 50% of P188 (equivalent to approximately 5 mg of drug) were dispersed in 5 mL of 0.1 N HCl (6 replicates) and stirred at 37°C for 72 h using a shaker incubator (MRC-LM 570, MRC Ltda). The filtered sample solutions were analyzed using a UV-visible spectrophotometer at 296 nm after appropriate dilution.

RESULTS

Preparation of FBZ and VAL-FBZ Nanosuspensions

Drying and FP yields, moisture content, and drug particle size before and after the spray-drying process are

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed using FTIR spectrometer IR-Prestige 21 (Shimadzu, Japan). The formulations were characterized using KBr disks from 4000 to 500 cm⁻¹, at a resolution of 2 cm^{-1} .

FBZ and VAL-FBZ Dissolution Assay

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

In vitro drug release studies of pure drugs, SDNCs, and their respective PMs were performed under sink conditions (equivalent to 5 mg of FBZ or 8 mg of VAL-FBZ, according to saturation solubility experiments), in a USP dissolution apparatus 2 (SR6 SR11-6-Flask Dissolution Test Station, Hanson Research), using 900 mL of HCl 0.1 N as dissolution medium, stirred at 50 rpm and at 37.0°C. The filtered sample solutions (0.45 µm) were collected at 3, 5, 10, 15, 30, and 60 min, filtered again through 0.22 μm pore membranes, and analyzed for drug content using a UV-visible spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) at 289.5 nm and 296 nm for FBZ and VAL-FBZ, respectively, according to our previous communication (8). The dissolution efficiency (DE) of each formulation was estimated at different dissolution times (5, 30 and 60 min) according to the equation described by Khan and Rhodes (45).

 Table 2.
 Process Yields, Moisture Content of the SDNCs Prepared, and FBZ and VAL-FBZ Particle Size Before and After the Spray-Drying Process

Formulation Yield		ld (%)	Moisture content (%)	NS drug particle size before drying		SDNCs particle size (after drying and redispersing)	
	FP	Drying step		D (nm)	PI	D (nm)	PI
SDNC1	53	74	1.08	466.8	0.3	418.5	0.3
SDNC2	34	44	0.33	537.5	0.1	791.0	0.5
SDNC3	18	20	0.59	580.7	0.3	1258.3	0.3
SDNC4	15	21	1.18	540.0	0.2	2033.3	0.3
SDNC5	39	61	2.5	783.8	0.2	693.4	0.2
SDNC6	44	60	0.79	511.5	0.3	307.0	0.2
SDNC7	41	56	5.76	432.7	0.2	757.2	0.5
SDNC8	1	1	**	521.1	0.3	612.3	0.3
SDNC9	33	39	0.89	411.5	0.2	363.9	0.2
SDNC10*	60	73	1.35	265.9	0.2	258.1	0.2
SDNC11*	63	72	2.08	215.4	0.2	217.0	0.2

*Prepared with a zirconium bed of 0.1 mm size (see experimental section) **Not measured





Fig. 2. a VAL-FBZ particle size (nm) and PI of the nanosuspension (NS) during the 2-h grinding process and VAL-FBZ particle size after drying and redispersion of the SDNC. b Idem for FBZ size and PI in the NS and redispersed SDNC

summarized in Table 2. From the first set of FBZ SDNCs prepared with a bead size of 0.5 mm, the spray-dried formulation containing 50% of P188 showed the best drying yield (74%), followed by those containing HPMC, P407 and PVP-k30 (61, 60, and 56%, respectively).

(2020) 21:237

AAPS PharmSciTech

During the 2-h milling time, particle size and IP of all the different formulations were found to follow a decreasing trend (Fig. 2), and submicron drug particles were obtained with all stabilizers.

According to the mentioned results, P188 was selected among the stabilizers used for further studies. The influence of different amounts of polymer on the nanocrystal production was assessed preparing FBZ nanosuspensions decreasing the amounts of P188 (33, 20, and 10%, NS2, NS3, and NS4, respectively). Variations in the polymer concentration did not impact the FBZ particle size in the NS (after the milling process), but they markedly decreased the yield of the drying step and affected the size of the FBZ redispersed SDNCs (after the drying step, Table 2).

Once selected the carrier and its optimal concentration (P188 at 1:1 ratio), FBZ and VAL-FBZ SDNCs, were prepared using a bead milling of 0.1 mm. Drying and FP yields, moisture content, and drug particle size before and after the spray-drying process are also summarized in Table 2.

Focusing on the final particle size of the FBZ P188 1:1 formulations (SDNC1 and SDNC10), the outcome of varying the size of the zirconium milling bead is clear: smaller drug nanoparticles were obtained with the 0.1-mm zirconium bead (SDNC10) compared with the same composition formulation prepared with a 0.5 mm bead (SDNC1).

Confocal Raman Microscopy

Raman spectra of pure FBZ, VAL-FBZ, and P188 were collected (Fig. 3). The Raman analysis of pure components aided in the identification of differential Raman signals, some specific to the drugs (around 1550 cm^{-1}), and others to the carrier (around 841 cm⁻¹).

The procedure to obtain two-dimensional (2D) confocal Raman microscopy images was performed on both FBZ and VAL-FBZ SDNCs with 50% P188 (SDNC10 and SDNC11) and the corresponding PMs at random locations in areas of 10×10 um, with a grid of 60×60 points defining the bitmap image. Single Raman spectra for every pixel of the selected areas were collected. The obtained Raman mapping of both components of each formulation are shown in Fig. 4. These images show the high homogeneity achieved in the NCs during the nanonization process compared with the corresponding PMs.

The processing of the collected spectral data included the generation of a normalized image in terms of peak intensity ratios to avoid point-to-point variations produced by height differences on the sample surface (8) and a principal component analysis image.

In order to obtain the normalized image of VAL-FBZ SDNCs and PM, the selected signals were 1571 cm⁻¹ for VAL-FBZ and 841 cm⁻¹ for P188, and the ratio was calculated as I_{1571}/I_{841} (Fig. 5). We proceeded with scripts prepared in our group to obtain the histograms of the different intensity ratio distributions (8). The normalized image for the VAL-FBZ SDNCs showed homogeneous distribution of the VAL-FBZ PINCs showed homogeneous distribution of the sample was very similar in each pixel of the selected area (down to the diffraction limit of 300 nm). The



Fig. 3. Raman spectra for P188, VAL-FBZ, and FBZ

237 Page 6 of 15

AAPS PharmSciTech

(2020) 21:237



Fig. 4. Reconstructed Confocal Raman mapping images showing de active zone (red) and PMs region (blue) for a NC VALFBZ, b PM VAL-FBZ, c NC FBZ, and d PM FBZ

histogram shows a distribution of the density of ratios with normallike distribution. The VAL-FBZ PM normalized image shows areas where P188 predominates and others richer in VAL-FBZ.

For the FBZ SDNC10 and PM, the selected signals to obtain the normalized image were 1591 cm^{-1} for FBZ and 841 cm-1 for P188, and the ratio was calculated as I1591/I841 (Fig. 6). The FBZ SDNC10 and PM normalized analysis was analogous to that described for VAL-FBZ.

The principal component analysis (PCA) images of the samples were obtained by processing the same spectral data used to calculate the normalized I_{1591}/I_{2878} 2D confocal Raman mapping images. In the analysis of the FBZ PM, PCA imaging allowed us the identification of areas containing mainly FBZ or P188 and a small zone where both components are detected. In the FBZ SDNC10 formulation, even though PCA detects some differences in the image, the mean spectrum calculated is the same for the different areas, indicating that the sample is highly homogeneous.

In the analysis of VAL-FBZ PM, the PCA reconstructed image allowed us the identification of areas containing mainly VAL-FBZ or P188 and a small zone where both components are detected (Fig. 7). The PCA of the VAL-FBZ SDNCs was not able to find statistical differences among the pixels (data not shown).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

VAL-FBZ formulations SEM results are shown in Fig. 8. SEM images of VAL-FBZ showed a regular needle-shaped crystalline solid with a distribution size of 2–20 μ m and a

smooth surface, while the carrier micrographs showed smooth surface spherical particles of 200–500 μ m. On the other hand, the VAL-FBZ SDNCs consist of spherical particles with homogeneous diameter in the range of 2–5 μ m. FBZ SEM results are shown in supplementary data.

FTIR, XRPD, and Thermal Analysis

DSC and TGA results showed that P188 melts at 50°C and FBZ melts with decomposition at 210°C (Fig. 9); this makes measuring the heat of fusion above 200°C intricated. In fact, there are no differences among the TGA thermograms for the PM and SDNCs' formulations of equal composition, suggesting that there are no relevant interactions between polymer and drug. The thermal characterization of the VAL-FBZ and P188 formulation was analogous to the one described for FBZ. This complementary information is shown in supplementary data.

From the more relevant infrared signals corresponding to pure FBZ (3336.12; 1630.31; 742.28; 685.11 cm-1) and P188 (2881.43; 1281.52; 1117.75 cm-1), those that were exclusive signals of each component remain clearly unaltered in the SDNCs and the respective PM collected spectra, suggesting the absence of chemical interactions between the components in the different formulations (Fig. 10).

This observation was confirmed by XRPD (Fig. 11) where the diffractograms of the FBZ SDNCs and PM showed the signals assigned to each pure component unchanged (FBZ: $2\theta(^{\circ}) = 6.68$, 11.16, 13.36; P407: 2theta($^{\circ}) = 19.18$, 23.36).

AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

237 Page 7 of 15

VAL-FBZ SDNC



Fig. 5. XY confocal Raman microscopy mapping images of VAL-FBZ PM and SDNC; the corresponding histograms of the distribution of VAL-FBZ/P188 ratios are shown on the right. Scale bars indicate the intensity ratio I_{1571}/I_{840} . All images include the number of grid points in X and Y axis and the corresponding bar length

For VAL-FBZ, XRPD studies showed some changes in the relative intensity, and the position of some of the VAL-FBZ peaks in the VAL-FBZ SDNCs diffractogram (pure VAL-FBZ: $2\theta(^{\circ}) = 4.31$, 8.71, 8.84, 10.79, 12.45, 15.51), suggesting that possible changes occur in the crystal structure (Fig. 12).

Thus, experiments were performed by mixing pure VAL-FBZ and water in a mortar and drying the suspension in a heater. The analysis of this water-processed sample showed the same XRPD pattern of VAL-FBZ SDNCs (pure VAL- FBZ-water-processed: $2\theta(^{\circ}) = 4.35$, 4.64, 8.72, 9.30, 11.50, 12.43, 13.56, 15.41, 16.25), suggesting that a new (or modified) crystalline phase structure of VAL-FBZ was obtained after the water treatment in a very reproducible way (Fig. 13).

the water treatment in a very reproducible way (Fig. 13). The signals around 3300 cm⁻¹ present in pure VAL-FBZ and the VAL-FBZ P188 1:1 PM shifted to lower wavenumbers after the nanomilling process (VAL-FBZ SDNCs sample, Fig. 14). Moreover, the FTIR spectrum of the water-processed sample showed the same FTIR shift observed for the SDNCs' sample (Fig. 15).

237 Page 8 of 15 AAPS PharmSciTech (2020) 21:237 FBZ SDNC - cocientes data 0.7 0.6 0.5 30 0.4 0.3 40 0.2 50 0.1 50 Data FBZ PM 0.8 - cocientes data 10 0.7 0.6 20 0.5 30 0.4 0.3 40 02 50 0. 2 µm 30 40 50 10 12 Ŕ Data

Fig. 6. XY confocal Raman microscopy mapping images of FBZ PM and SDNC; the corresponding histograms of the distribution of FBZ/P188 ratios are shown on the right. Scale bars indicate the intensity ratio I_{1591}/I_{841} . All images include the number of grid points in X and Y axis and the corresponding bar length

The signals corresponding to P188 do not present any changes neither in the SDNCs' XRPD pattern nor in their FTIR spectrum respect to the pure P188 studies, reinforcing the idea that there is no interaction between polymer and drug, but there is a change in the drug crystalline structure. This fact is also supported by the Raman spectroscopy analysis, where no relevant changes were observed for VAL-FBZ and VAL-FBZ SDNCs' sample.

Saturation Solubility Experiments

The results of the saturation solubility experiments are shown in Table 3. As it was reported previously for

albendazole, another compound of the benzimidazole family, the final concentration of P188 achieved during the solubility assay (lower than 0.1% w/v) does not affect the drug solubility in HCl 0.1 N, at the temperature tested (25,26,46). However, the solubility of the SDNCs' preparation was significantly higher than both the pure drugs and the respective PMs.

Dissolution of FBZ and VAL-FBZ Formulations

The dissolution assays were carried out for pure drugs (not formulated), FBZ and VAL-FBZ SDNCs' formulations,



237 Page 9 of 15



Fig. 7. Example of PCA-reconstructed image of VAL-FBZ PM considering PC1. The shown spectra were the calculated mean spectrum of the blue colored area and red colored area

the corresponding PMs and a conventional FBZ-marketed suspension (MS).

Dissolution profiles of VAL-FBZ, FBZ and their 1:1 poloxamer formulations are shown in Fig. 16. During the first 15 min of the assay, the amount of pure drug could not be quantified, while FBZ and VAL-FBZ dissolved from SDNCs reached around 85% of the total amount of assayed drug. The amount of drug dissolved from the nanocrystal formulations doubled the amounts dissolved from the PMs during the complete assay. For the marketed suspension, scarcely 40% of the FBZ contained was dissolved in the same period.

The profiles were statistically compared using a model independent approach, calculating the difference factor (F1) and the similarity factor (F2). The calculated factors for the FBZ curves showed that all the formulations presented different dissolution profiles (data not shown).

The dissolution efficiency (DE) of each formulation was estimated at different dissolution times (5, 30 and 60 min) and is summarized in Table 4. As it shows, SDNCs of both drugs presented the highest DE for the different dissolution times selected.



Fig. 8. SEM images for a Pure VAL-FBZ 4.00 K X, b Pure P188 24 X, c SDNC VAL-FBZ 1.00 K X, d SDNC VAL-FBZ 8.00 K X





Fig. 9. Thermal analysis. a TGA analysis for FBZ:P188 formulations and pure components. b DSC analysis for FBZ:P188 formulations and pure components

DISCUSSION

Preparation of SDNCs of FBZ and VAL-FBZ

The milling process was successful since all nanosuspensions presented drug particle sizes above the submicron range, independently of the amount or type of stabilizer used. However, from the results of drying yields presented in Table 2, it can be understood that the type of stabilizer plays a major role during the spray-drying step, for the selected drying conditions. In this work, the drying conditions during the spray-drying process were selected based on previous experiences of the group (25),



Fig. 10. FTIR of FBZ:P188 1:1 formulations and pure components

where it was demonstrated that these conditions are crucial for obtaining high process yields. Further studies could be done in order to optimize the spray-drying operating conditions for each particular stabilizer.

Besides the influence of the type of stabilizer in the process yield, the amount of excipient used also plays a major role in the redispersion process. It was noticed how decreasing the amount of P188 from 50 to 10% makes the redispersion process less efficient. This remarks the importance of optimizing the amounts of these kinds of stabilizers which act as soluble covers for the nanocrystals and have a protective effect during the spraying. Higher proportions of stabilizer may prevent irreversible aggregation of drug particles, acting as a stronger soluble links during the drying process, protecting particles from aggregating due to the high kinetic energy and shear forces that take place during the drying step (25,47).

These findings are in line with reports by other authors who have been able to elucidate how stabilizers can impact stability of nanocrystals and improve drying and redispersion performance. The use of P188 as a stabilizer is not trivial since, in addition to promoting the stability of the system, this polymer can increase the dissolution rate of drugs by modifying the hydrodynamic environment (48,49).

The results of transferring the SDNCs' preparation procedure optimized with FBZ to its hybrid drug VAL-FBZ were as expected. VAL-FBZ P188 1:1 SDNCs were obtained with the same process yields and particle size as it was achieved for FBZ, and the redispersion behavior of the VAL-FBZ SDNCs was analogous to those of FBZ.

Physicochemical Characterization

For FBZ, chemical interactions among the components of the formulations were discarded since FTIR and Raman spectroscopic studies, thermal analysis, and XRPD showed no differences between the SDNCs and the corresponding PM samples. In the case of the formulations containing VAL-FBZ, it was found that some changes occur in the XRPD pattern of the SDNCs vs the PM, accompanied by a slight





Fig. 11. XRPD. Formulations containing FBZ:P188 in the ratio 1:1 and pure components

shift of one of the FTIR spectroscopic signals. This fact could be attributed to some polymorphic transformation or a possible hydrate formation during the NC formulation process. In order to assess the effect of the NC formation process in the crystalline structure of the original VAL-FBZ, we evaluated the potential incorporation of water molecules to the structure or its possible changes performing mechanical



Fig. 12. XRPD. Formulations containing VAL-FBZ:P188 in the ratio 1:1 and pure components

237 Page 11 of 15

activation in the presence of water by wet bead milling. This hypothesis is totally aligned with the shift observed in the signals assigned to the N-H vibrations in the FTIR spectra. This shift could be explained in terms of hydrogen bond formation in the new crystal lattice. It is well documented that the formation of hydrogen bonds results in changes of the vibrational spectra of the molecules involved where the absorption band of the stretching mode of the X – H donor group (being X an electronegative atom, in this case N) displays the most prominent modifications, a shift to lower wavenumbers, and in most cases a substantial spectral broadening and reshaping (50).

Saturation Solubility and Dissolution Performance

The saturation solubility of the SDNCs' preparation was significantly higher than both the pure drugs and the respective PMs. This phenomena of saturation solubility being a function of particle size was already reported and explained by Keck and Müller (2006) for compounds with particle size below 1 mm (23), based in the Ostwald-Freudlich and Prandtl equation.

Weak bases as benzimidazole drugs, including FBZ, largely depend on their dissolution in the acid environment of the stomach to later assure their absorption in the first part of the duodenum (51,52). In terms of dissolution performance, the SDNCs formulations doubled the amount of drug released and dissolved compared with the respective control PM and a commercially available FBZ conventional suspension. In this sense, SDNCs count with many advantages that contribute to their improved dissolution rate, besides the known positive effect of the enlarged surface area of the drug powder. It was verified the increased saturation solubility of both drugs when formulated as NCs, which has been previously related to an improved dissolution velocity,





237 Page 12 of 15 AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500 Wavenumber (cm⁻¹)

Fig. 14. FTIR of VAL-FBZ:P188 1:1 formulations and pure components

explained in terms of the Noyes-Whitney equation (23). Additionally, it has also been confirmed the beneficial effect in dissolution rate of simply dispersing these benzimidazole drugs in a poloxamer matrix (8) and the importance of achieving a homogeneous distribution, proved by Raman mapping imaging, which is crucial for ensuring a proper wetting and redispersion of hydrophobic nanoparticles. All of these mentioned aspects gathered in the SDNCs contribute to the improvement of the in vitro dissolution rate of the drugs. This last comparative parameter is proposed to be theoretically related to in vivo data, since the absorption of a drug is proportional to its concentration and the time it remains in a suitable absorptive region of the gastrointestinal tract (45) and both variables are included in the dissolution efficiency calculation. Therefore, the higher dissolution efficiency values achieved with the SDNCs result encouraging to



Fig. 15. FTIR of VAL-FBZ:P188 1:1 formulations and pure components

test the new formulations *in vivo*, since the enhance in bioavailability of benzimidazole drugs is strongly related to an increase in their efficacy (53,54).

CONCLUSIONS

Self-dispersible FBZ nanocrystals with markedly improved dissolution profiles were successfully obtained by a relatively simple process that included wet bead milling followed by a spray-drying step. Different stabilizers were tested and P188 was selected as the best excipient to assist during the drying process. Furthermore, results suggested the importance of the bead milling size in determining the suspension drug particle size which appears to be not influenced by either the stabilizer type or amount. The technology applied to FBZ was successfully transferred to produce self-dispersible VAL-FBZ nanocrystals, a new promising compound with in vitro anthelmintic activity, improving the in vitro dissolution performance of both drugs which suggests the potential of the process to be adapted to different compounds. The exhaustive characterization of the final products was critical in order to understand the systems and their behavior. It was possible to discard interactions between carrier and drug; however this characterization allowed to identify changes in the VAL-FBZ crystalline structure after the milling process that need to be study further in order to get a deeper understanding of the compound crystalline behavior.

Table 3. Solubility of FBZ and VAL-FBZ Physical Mixtures (PMs) and SDNCs Containing 50% of P188 (SDNC10 and SDNC11) in HCl 0.1 N at 37° C

	Pure drug	PM	SDNCs
FBZ (mg.L ⁻¹)	$\begin{array}{c} 36.5 \pm 1.9 \\ 173.5 \pm 19.9 \end{array}$	33.2 ± 2.5	45.3 ± 1.1
VAL-FBZ (mg.L ⁻¹)		201.5 ± 27.1	325.9 ± 48.2



Fig. 16. a Dissolution profile of VAL-FBZ SDNC and PM. VAL-FBZ was not quantifiable during the assay of the pure drug. b Dissolution profile of FBZ and SDNC, the corresponding PM, the FBZ-marketed suspension, and pure FBZ

Table 4. Dissolution Efficiency (DE) of the FBZ and VAL-FBZ Formulations at Different Dissolution Times

	DE% 5 min	SD	DE% 30 min	SD	DE% 60 min	SD
FBZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.4
FBZ-marketed suspension	3.7	2.1	35.7	3.7	53.9	5.8
SDNC10 (FBZ)	60.6	1.1	89.7	1.4	92.1	2.9
PM FBZ	13.5	0.3	37.2	1.1	46.7	1.2
VAL-FBZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SDNC11 (VAL-FBZ)	50.7	1.5	79.4	2.2	85.4	3.9
PM VAL-FBZ	2.6	0.8	13.9	0.9	21.0	1.0

237 Page 14 of 15

ACKNOWLEDGMENTS

The authors especially thank Q.F. Antonio Malanga (BIOTEFA-Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay) for kindly providing access to necessary equipment and Fernando Pignanelli (Facultad de Química, UdelaR, Uruguay) for the help in the implementation of PCA and the peak-to-peak computational scripts for the data analysis. The financial support provided from ANPCyT, Agencia Nacional de Promoción Cientificas y Tecnologicas, Argentina, is really appreciated. We would like to acknowledge Egbert Kleinert from Saint-Gobain Ceramics for the advice and the kind donation of zirconia beads. The technical assistance of Lamarx-UNC in the scanning electron microscopy assays is also acknowledged. EM, BM, RT, EM, RF, and LD acknowledge CSIC, PEDECIBA and ANII (FMV_1_2017_1_136597) Uruguayan's Organizations, for financial support.

REFERENCES

- Waller P. From discovery to development: current industry 1. perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. Vet Parasitol. 2006;139(1-3):1-14.
- Torres-Acosta J, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero A, Cuéllar-Ordaz J. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. Vet Parasitol. 2012;189(1):89-96.
- Martin RJ, Wolstenholme AJ, Caffrey CR. Anthelmintics: from discovery to resistance II (san Diego, 2016). Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2016;6(3):297–8.
- Kotze A, Prichard R. Anthelmintic resistance in Haemonchus contortus: history, mechanisms and diagnosis. Adv Parasitol. 2016:93: Elsevier:397-428
- Lambert SM, Nishi SM, Mendonça LR, da Silva Souza BMP, da Silva JF, da Silva GP, et al. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of Haemonchus contortus of goats. Vet Parasitol. 2017;8:28-34.
- Nari A, Salles J, Gil A, Waller P, Hansen J. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Uruguay. Vet Parasitol. 1996;62(3-4):213-22
- Mederos A, Carracelas B, Lara S, Pimentel S, Banchero G. 7. Situación actual de la resistencia a las drogas antihelmínticas en ovinos en Uruguay. Rev INIA Urug. 2016;44:10–2.
- Melian ME, Munguía AB, Faccio R, Palma S, Domínguez L. The impact of solid dispersion on formulation, using confocal micro Raman spectroscopy as tool to probe distribution of components. J Pharm Innov. 2018;13(1):58–68.
- Munguía B, Michelena M, Melian E, Saldaña J, Ures X, Manta E, et al. Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. Exp Parasitol. 2015;153:75-
- Munguía B, Mendina P, Espinosa R, Lanz A, Saldaña J, Andina 10. JM, et al. synthesis and anthelminitic evaluation of novel valerolactam-benzimidazole hybrids. Lett Drug Des Discov. 2013:10(10):1007-14.
- Ku MS, Dulin W. A biopharmaceutical classification-based 11. right-first-time formulation approach to reduce human pharma-cokinetic variability and project cycle time from first-in-human to clinical proof-of-concept. Pharm Dev Technol. 2012;17(3):285-302.
- Fenske DB, Cullis PR. Liposomal nanomedicines. Exp Opin 12. Drug Deliv. 2008;5(1):25-44.
- Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures:

AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur J Pharm Biopharm. 2007;65(3):259-69.

- 14 Schultheiss N, Newman A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. Crystal Growth Des.
- 2009;9(6):2950–67. Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicol Pathol. 2008;36(1):30– 15.
- Lee J, Choi J-Y, Park C. Characteristics of polymers enabling nano-comminution of water-insoluble drugs. Int J Pharm. 16. 2008:355(1-2):328-36.
- Van Drooge D, Hinrichs W, Visser M, Frijlink H. Characteriza-17. tion of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning Calorimetry and gravimetric value, using unreferrat scalining Int J Pharm. 2006;310(1–2):220–9. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK. Self-emulsifying
- drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavail-ability. Drug Discov Today. 2010;15(21-22):958-65.
- Zhang T, Yang R, Yang S, Guan J, Zhang D, Ma Y, et al. Research progress of self-assembled nanogel and hybrid hydro-19. gel systems base 2018;25(1):278–92. based on pullulan derivatives. Drug Deliv.
- Miller R, Keck C. Twenty years of drug nanocrystals: where are we, and where do we go? Eur J Pharm Biopharm. 2012;80(1):1– 20.
- 21. Liu T. Yu X. Yin H. Möschwitzer JP. Advanced modification of drug nanocrystals by using novel fabrication and downstream approaches for tailor-made drug delivery. Drug Delivery. 2019;26(1):1092-103.
- Liversidge GG, Cundy KC, Bishop JF, Czekai DA. Surface modified drug nanoparticles. Google Patents; 1992. Keck CM, Müller RH, Drug nanocrystals of poorly soluble 22
- 23. drugs produced by high pressure homogenisation. Eur J Pharm Biopharm. 2006;62(1):3-16.
- Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals-24. Special features, production, nanotoxicology aspects and intra-cellular delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2011;78(1):1–9. Paredes AJ, Llabot JM, Sánchez Bruni S, Allemandi D, Palma
- 25. SD. Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by high pressure homogenization and spray-drying. Drug Dev Indust Pharm. 2016;42(10):1564–70.
- Paredes AJ, Bruni SS, Allemandi D, Lanusse C, Palma SD. Albendazole nanocrystals with improved pharmacokinetic per-26
- formance in mice. Ther Deliv. 2018;9(2):89–97. Morales J, Watts A, McConville J. Formulating poorly water soluble drugs. In: Williams III RO, Watts AB, Miller DA, editors. 22. Springer; 2016. p. 165–213. Choi J-Y, Yoo JY, Kwak H-S, Nam BU, Lee J. Role of rolumenic tchilizers for drug appropriate dispersione. Curr 27.
- 28 polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. Curr Appl Phys. 2005;5(5):472-4.
- 29 Van Eerdenbrugh B. Van den Mooter G. Augustiins P. Topdown production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. Int J Pharm. 2008;364(1):64-75.
- Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: industrially feasible 30. multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. Int J Pharm. 2010;399(1–2):129–39.
- Möschwitzer JP. Drug nanoczystals in the commercial pharma-ceutical development process. Int J Pharm. 2013;453(1):142–56. 31.
- Yao J, Cui B, Zhao X, Wang Y, Zeng Z, Sun C, et al. Preparation, characterization, and evaluation of azoxystrobin 32. nanosuspension produced by wet media milling. Appl Nanosci. 2018;8(3):297-307.
- Ghosh I, Schenck D, Bose S, Ruegger C. Optimization of 33. formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: effect of vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. Eur J Pharm Sci. 2012;47(4):718–28.
- Li M, Azad M, Davé R, Biglii E. Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process 34
- programation enhancement: a notstic formulation-process perspective. Pharmaceutics. 2016;8(2):17. Cooper ER. Nanoparticles: a personal experience for formulat-ing poorly water soluble drugs. J Control Release. 2010;141(3):300–2. 35.

AAPS PharmSciTech (2020) 21:237

- Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. Asian J 36.
- Pharm Sci. 2015;10(1):13–23. Yang H, Teng F, Wang P, Tian B, Lin X, Hu X, et al. Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. Int J Pharm. 2014;477(1–2):88–95. 37.
- McKellar Q, Galbraith E, Baxter P. Oral absorption and 38. bioavailability of fenbendazole in the dog and the effect of concurrent ingestion of food. J Vet Pharmacol Ther. 1993;16(2):189-98.
- 39. McKellar Q, Gokbulut C, Muzandu K, Benchaoui H. Fenbendazole pharmacokinetics, metabolism, and potentiation in horses. Drug Metab Dispos. 2002;30(11):1230–9.
- 40. Gokbulut C, Bilgili A, Hanedan B, McKellar Q. Comparative plasma disposition of fenbendazole, oxfendazole and albendazole in dogs. Vet Parasitol. 2007;148(3-4):279-87.
- Mendina P, Munguía B, Espinosa R, Saldaña J, Domínguez L, Manta E. Inventorsderivados de la 2-amino-ô-valerolactama y 41.
- benzimidazoles que presentan actividad antiparasitaria y en particular antihelmíntica de amplio espectro. Uruguay. 2014. Paredes AJ, Camacho NM, Schofs L, Dib A, del Pilar ZM, Litterio N, et al. Ricobendazole nanocrystals obtained by media 42.
- milling and spray drying: pharmacokinetic comparison with the micronized form of the drug. Int J Pharm. 2020;119501. Camiletti BX, Camacho NM, Paredes AJ, Allemandi DA, Palma SD, Grosso NR. Self-dispersible nanocrystals of azoxystrobin and cyproconazole with increased efficacy against 43. soilborne fungal pathogens isolated from peanut crops. Powder Technol. 2020.
- Karavas E, Georgarakis M, Docoslis A, Bikiaris D. Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate 44. between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. Int J Pharm. 2007;340(1-2):76-83.
- 45 Khan K. The concept of dissolution efficiency. J Pharm Pharmacol. 1975;27(1):48–9.

- Paredes AJ, Litterio N, Dib A, Allemandi DA, Lanusse C, Bruni SS, et al. A nanocrystal-based formulation improves the
- pharmacokinetic performance and therapeutic response of albendazole in dogs. J Pharm Pharmacol. 2018;70(1):51–8. Freitas C, Müller RH. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). Eur J Pharm Biopharm. 1998;46(2):145–51. 47

46.

- (SLIM). Eur J Pharm Biopharm. 1998;46(2):143–51. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. J Control Release. 2013;172(3):1126–41. Sharma OP, Patel V, Mehta T. Design of experiment approach in development of febuxostat nanocrystal: application of 48
- 49 Soluplus® as stabilizer. Powder Technol. 2016;302:396-405.
- Nibbering ET, Dreyer J, Kühn O, Bredenbeck J, Hamm P, Elsaesser T. Vibrational dynamics of hydrogen bonds. Analysis 50 and control of ultrafast photoinduced reactions. Springer; 2007. p. 619–87. Lanusse CE, Prichard RK. Clinical Pharmacokinetics and
- 51. Metabolism of Benzimidazole Antheliminities in Ruminants. Drug Metab Rev. 1993;25(3):235–79.
- McKellar Q, Scott E. The benzimidazole anthelmintic agents-a 52 review. J Vet Pharmacol Ther. 1990;13(3):223–47. Pensel P. Paredes A, Albani CM, Allemandi D, Bruni SS, Palma
- 53. SD, et al. Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical effi-cacy in infected mice. Vet Parasitol. 2018;251:78-84.
- Pensel PE, Gamboa GU, Fabbri J, Ceballos L, Bruni SS, Alvarez LI, et al. Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-54. loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta Trop. 2015;152:185–94.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations

Apéndice 7

Improving the in vitro dissolution rate and pharmacokinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals

Melian, M. E., Ibarra, M., Ceballos, L., Paredes, A. J., Munguía, B., Faccio, R., Palma, S., Álvarez, L., Domínguez, L. (2022). *Improving the in vitro dis*solution rate and pharmacokinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals. Research in Veterinary Science, 142, 110-116.

Research in Veterinary Science 142 (2022) 110-116



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



Improving the in vitro dissolution rate and pharmacokinetic performance of fenbendazole in sheep using drug nanocrystals

María Elisa Melian^{a,b}, Manuel Ibarra^c, Laura Ceballos^d, Alejandro J. Paredes^e, Beatriz Munguía^a, Ricardo Faccio^f, Santiago Palma^g, Luis Ignacio Álvarez^d, Laura Domínguez

^a Área de Farmacología, CIENFAR, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
^b Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay
^d Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET, Tandil, Argentina

- ^e School of Pharmacy, Queen's University Belfast, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, UK
 ^f Área Física & Centro NanoMat, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar), Montevideo, Uruguay

⁸ Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET and Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Kevwords: Fenbendazole Nanocrystals Population pharmacokinetics Dissolution rate Bioavailability Sheep

ABSTRACT

Benzimidazole methylcarbamate anthelmintics, including fenbendazole (FBZ), have only limited water solubility and small differences in drug solubility may have a major influence on their absorption, pharmacokinetic behavior and anthelmintic efficacy. To improve FBZ water solubility and dissolution rate, novel self-dispersible nanocrystals (SDNCs) of FBZ were recently described. In this work, the pharmacokinetic behavior of the SDNCs of FBZ and Poloxamer 188 was compared against a physical mixture (PM) of its components. The experiment was conducted following a crossover design with two different experimental phases. In phase I, sheep were treated with the SDNC (n = 3) or the PM (n = 3) formulations by the intraruminal route at the same dose rate (5 mg/kg). The treatment groups were reversed after a 7-days washout period. A non-compartmental analysis of the concentration in plasma *versus* time results showed that the calculated Cmax and AUC_{0-T} were significantly higher (p < 0.05) for FBZ and its metabolites after the SDNC treatment compared to the PM (for FBZ: Cmax 0.346 µg/mL and AUC0-T 10.1 µg.h/mL after the SDNC vs Cmax 0.157 µg/mL and AUC0-T 5.1 µg.h/mL after the PM treatment). Additionally, population pharmacokinetic parameters of FBZ were estimated for the first time in sheep. In conclusion, the formulation of FBZ as SDNCs is a promising approach to improve FBZ dissolution reaching a higher drug plasma exposure in ruminants.

1. Introduction

Gastrointestinal nematode infections are one of the main challenges in small ruminant farming, causing significant health problems which result in serious morbidities and consequently constant economic losses (Charlier et al., 2020; Charlier et al., 2014; Kaplan and Vidyashankar, 2012; Torres-Acosta et al., 2012). Chemotherapy is still the main tool to control these infections today, but the misuse and abuse of anthelmintic drugs has rapidly led to the development of widespread parasitic resistance throughout the world (Jabbar et al., 2006; Papadopoulos, 2008; Rose et al., 2015).

Despite the worldwide phenomenon of resistance to marketed anthelmintics and although some alternative approaches have been recognized to control gastrointestinal nematodes such as vaccines or biological control of infected ruminants resistant to parasites (Hewitson and Maizels, 2014; Waller, 2006; Waller, 2003; Zhan et al., 2014), chemotherapy remains today as the most widely available strategy. Moreover, it will probably continue to be the main strategy used in the

E-mail addresses: emelian@fq.edu.uy (M.E. Melian), mibarra@fq.edu.uy (M. Ibarra), lauceballosf@gmail.com (L. Ceballos), a.paredes@qub.ac.uk (A.J. Paredes), munguia@fq.edu.uy (B. Munguía), rfaccio@fq.edu.uy (R. Faccio), sdpalma@gmail.com (S. Palma), lalvarez@vet.unicen.edu.ar (L.I. Álvarez), ldoming@fq.edu.uy (L. Domínguez).

https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.001

Received 19 July 2021; Received in revised form 24 November 2021; Accepted 1 December 2021 Available online 7 December 2021 0034-5288/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Área de Farmacología, CIENFAR, Facultad de Ouímica, Universidad de la República (Udelar), Av. General Flores 2124, P.C. 11800 Montevideo, Uruguay.

near future, integrated with the novel treatments mentioned (Hennessy, 1997). However, since the first reports of parasitic resistance, the development of new classes of anthelmintic drugs, with new mechanisms of action, has been scarce and immediately followed by reports of parasite resistance (Fleming et al., 2006; Kaminsky et al., 2011; Mederos et al., 2016; Mederos et al., 2014; Van den Brom et al., 2015).

In this scenario, a more efficient use of the existing active ingredients is mandatory to sustain the efficacy of parasite treatments. In this sense, re-formulating poorly water-soluble anthelmintic drugs, using innovative delivery systems, is a necessary approach to maximize dissolution of commercial drugs and preserve their efficacy (Hennessy, 1997; Lanusse et al., 2014). Optimizing the drug formulation and therefore its bioavailability may improve its efficacy against parasite resistant strains, since drug concentration and exposure time may be enhanced at the parasite location (Alvarez et al., 2012; Lanusse et al., 2014).

The application of nanotechnology has been recently introduced into medicine, including veterinary, showing a great progress in recent years, where a growth trend predicts that more products will be commercially available over time (Chariou et al., 2020; Meena et al., 2018; Underwood and Van Eps, 2012). Among the strategies used to enhance the dissolution rate of poorly soluble drugs, the formulation of nanocrystals (NCs) has become one of the most preferred techniques due to its flexibility, scalability and high drug loading capacity, which is reflected in the fact that more than 20 products are already available on the market (Mohammad et al., 2019). These formulations consist of solid nano-sized drug particles with crystalline properties that are normally obtained in suspension (nanosuspensions) or in the form of solid self-dispersible nanocrystals (SDNC) (Paredes et al., 2016; Van Eerdenbrugh et al., 2008). One of the main benefits of formulating crystalline drugs as NCs results from the increased in specific surface produced by the decrease in particle size, which impacts directly on drug dissolution rate and saturation solubility, along with an increased in its mucoadhesiveness (Kesisoglou et al., 2007). In this sense, the oral administration of poorly soluble drug NCs presents many advantages such as improved absorption, rapid action onset and reduced intersubject variability (Shegokar and Müller, 2010). The use of NCs-based formulations in the veterinary field has shown to be an effective approach, increasing the bioavailability and therapeutic response of benzimidazole methylcarbamate (BZM) anthelmintic drugs (Paredes et al., 2018a; Paredes et al., 2020; Paredes et al., 2018b; Pensel et al., 2018).

Fenbendazole (FBZ) belongs to the broad-spectrum anthelmintic family of the BZM and is worldwide used for the treatment of nematode infections in ruminants. Within the Biopharmaceutical Classification System, FBZ is classified as a class II drug (low solubility/high permeability), which means that the *in vivo* dissolution rate has a major impact on its oral bioavailability (Campbell, 1990; Lanusse and Prichard, 1993). Crucially, an increase in the dissolution rate of such drugs may lead to an enhanced bioavailability and, consequently, to an increased therapeutic efficacy (Alvarez et al., 1999; Lanusse et al., 1993; Pensel et al., 2018; Pensel et al., 2015). In this sense, it was previously communicated the preparation and characterization of FBZ selfdispersible nanocrystals (FBZ SDNC) with enhanced *in vitro* dissolution performance (Melian et al., 2020). However, the pharmacokinetic performance of this novel formulation, and of NCs in general in ruminants still remains unexplored.

In this work, the comparative plasma pharmacokinetic behavior of FBZ (and its metabolites) intraruminally (i.r.) administered to sheep as either an SDNC or a PM formulation was assessed for the first time. A parent-metabolite joint population pharmacokinetic (PopPK) model was developed to characterize the absorption and disposition of FBZ and its active metabolite fenbendazole sulfoxide (FBZ-SO) in sheep, focusing on quantifying the effect of SDNC formulation on systemic drug exposure.

2. Materials and methods

2.1. Materials

FBZ and flubendazole (FLU) of pharmaceutical grade were kindly provided by Laboratorio Uruguay S.A. (LUSA, Montevideo, Uruguay). Poloxamer 188 (P188) was provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). Pure reference standards of FBZ-SO and fenbendazole sulphone (FBZ-SO2) were synthesized and purify in-house according to Soria-Arteche et al., 2005, with minor modifications (Soria-Arteche et al., 2005). HPLC grade solvents (acetonitrile and methanol) were bought from Baker, Mallinckrodt (Baker, 119 Phillipsburg, 120 USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of SDNCs of FBZ and in vitro dissolution assay

The methodology of preparation of the SDNCs was already reported in a previous work along with the formulations characterization (Melian et al., 2020). Briefly, the preparation of the FBZ SDNCs used in this work included a step for reducing FBZ particle size by wet bead milling using a NanoDisp® laboratory-scale mill (NanoDisp, Córdoba, Argentina) followed by spray-drying. The FBZ SDNC formulation selected to use in the *in vivo* studies consisted of FBZ and P188, as a stabilizer, in 1:1 proportion.

A control consisting of a physical mixture (PM) of the components of the SDNCs (FBZ and P188 in 1:1 proportion) was prepared by manually mixing the materials in a mortar.

The dissolution tests performed for the pure drug, FBZ SDNC and the corresponding PM were under SINK conditions (equivalent to 5 mg of FBZ), in a USP dissolution apparatus 2 (SR6 SR11–6-Flask Dissolution Test Station, Hanson Research), using 900 mL of HCl 0.1 N as dissolution medium, stirred at 50 rpm (37.0 °C). The filtered (0.45 μ m) were collected at 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min, filtered again through 0.22 μ m pore membranes and analyzed for drug content using a UV–visible spectrophotometer (Genesys 10S UV–Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific) at 289.5 nm.

2.2.2. In vivo pharmacokinetic study

2.2.2.1. Experimental animals. Six (6) parasite-free Corriedale male sheep (average weight: 21.0 ± 2.3 kg) were used in this experiment. During the experiment and for 20 days before, animals were kept indoors, fed with a commercial balanced concentrate diet and supplied with water *ad libium*.

Animal procedures and management protocols were approved by the Ethics Committee according to the Animal Welfare Policy (act 087/02) of the Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina (http://www.vet.unicen.edu.ar).

2.2.2.2. Experimental design, treatment and sampling. The study was conducted following a single-dose, 2-period, 2-sequence, 2-treatment crossover design in 6 parasite-free Corridale male sheep. Animals were randomly assigned to a treatment administration sequence, receiving 5 mg/kg of both FBZ SDNC and FBZ PM 2 % w/v suspensions by the i.r. route separated by a washout period of 7 days. The 2 % w/v formulation suspensions were prepared *in situ*, right before the administration by adding the proper amount of water to the previously weighted solid formulation and agitating vigorously by 5 min.

Blood was collected prior to treatment and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 28, 32, 48, 60 and 72 h post-treatment. Immediately after collection, plasma was separated by centrifugation at 3000 xg for 15 min. Plasma samples were placed into plastic vials and stored at -20 °C until HPLC analysis.

2.2.2.3. Plasma samples extraction. Plasma samples (1 mL) were spiked with 20 μ L of FLU (stock solution 26 μ g/mL) as internal standard. FBZ and its metabolites were extracted by solid-phase extraction using disposable cartridges (Strata C18-T, Phenomenex, CA, USA) previously conditioned with 1 mL of methanol, followed by 1 mL of ultrapure water. All samples were injected into cartridges and then sequentially washed with 1 mL of ultrapure water and eluted with 2 mL of HPLC grade methanol. The eluent was evaporated to dryness at 40 °C under N₂ flow (TurboVap LV Evaporator, Zymark), then reconstituted with 250 μ L of methanol and analyzed by HPLC.

2.2.2.4. *HPLC analysis.* The liquid chromatography analysis was performed using a Shimadzu LC-20AT HPLC System (Kyoto, Japan), with loop of injection of 50 µL, an auto sampler (SIL-10AF Schimadzu, Kyoto, Japan) and a UV-VIS detector (SPD-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan). Data and chromatograms were collected and analyzed using the Class LC10 software (SPD-10A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A reverse phase Cl8 separation column was used (Zorbax Eclipse XBD, Agilent, 4.6 mm × 150 mm, 5 µm) with detection at 289 nm. A mobile phase with a mixture of acetic acid (0.5 % v/v)-acetonitrile (80:20), at a flow rate of 1 mL/min was used to elute the analytes at 35 °C. Initial condition (80:20) was maintained for 3 min, then changed in 7 min to 30:70, modified to 80:20 in 2 min, and finally maintained for 3 min. The retention times under these chromatographic conditions were: 8.9, 10.9, 11,7 and 12,9 min for FBZ-SO2, FLU and FBZ respectively.

A calibration curve was performed by mean of spiked plasma with known concentrations of pure standards of FBZ and its metabolites (fortified samples). The range of calibration curves was between 0.05 and 1.00 µg/mL. This showed good linearity with correlation coefficients greater than 0.999. Recovery of the three molecules under study was estimated by comparison of the peak areas from spiked plasma, resulting from direct injections of standards in methanol. The absolute recovery for FBZ-SO, FBZ-SO2, FLU and FBZ ranged between 77 and 91 % with coefficients of variation (CV) ≤ 6 %. The limit of quantification was defined as the lowest measured concentration of the calibration curve with a CV < 20%, accuracy of ± 20 % and absolute recovery ≥ 70 %. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 9.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA).

2.2.2.5. Population pharmacokinetics modeling. A nonlinear mixedeffects model was developed to characterize the pharmacokinetics of FBZ and FBZ-SO in blood plasma with a population approach and to assess the formulation effect on drug bioavailability and disposition. Parameter estimation was conducted in the MonolixSuite® 2019 R2 (Lixoft, SimulationsPlus) using the Stochastic Approximation Expectation Maximization (SAEM) algorithm (Savic et al., 2011). A simultaneous parent-metabolite fit was performed during model building to reach the base model, given that rich data was collected for both compounds. FBZ-SO2 was not considered in this analysis given its null contribution to the pharmacodynamic outcome. Model development was guided with both metrics and graphical diagnostics. The Akaike Information Criterion (AIC) was used as the main metric to assess the overall fit weighting by the complexity of the model and thus following the principle of parsimony. Uncertainty in parameter estimation and biological plausibility of typical pharmacokinetic parameter estimates for the parent drug and the metabolite were also considered to guide the analysis. Goodness of fit plots based on parameter estimates such as the distribution of individual weighted residuals (IWRES) and the population weighted residuals (PWRES), IWRES and PWRES versus concentration and versus time plots, observation versus individual and population predictions, and correlation of random effects were evaluated. Finally, the Visual Predictive Check (VPC) was implemented as a key simulation-based diagnostic plot (Mo and Savic, 2007).

One- and two-compartment pharmacokinetic models were evaluated

Research in Veterinary Science 142 (2022) 110-116

to describe FBZ and FBZ-SO disposition. All quantified drug transference processes were assumed to follow first-order kinetics. To ensure parameter identifiability, the fraction of metabolized FBZ leading to FBZ-SO was assumed to be 1. Different models were evaluated to characterize FBZ oral absorption: immediate zero-order absorption; immediate first-order absorption; lagged first-order absorption; and transit model absorption. Between-subject variability (BSV) and between occasion variability (BOV) were assessed in all pharmacokinetic parameters assuming a log-normal distribution in the random effects (*i. e.*, the discrepancies between the individual and the population estimate), as described below:

$$\theta_i = \theta_{pop} \cdot e^{\eta_i}$$
(1)

where θ_i is the parameter estimate for the i-th subject, θpop the typical value for the population and η_i the subject discrepancy from θ assumed to be normally distributed with mean zero and variance ω^2 . BSV and BOV were expressed as coefficient of variation (CV), estimated from the respective variance as:

$$CV = 100\sqrt{e^{\omega^2} - 1}$$
 (2)

The effect of body weight on pharmacokinetic disposition parameters was included at the beginning of the analysis according to the allometric model. Hence, the population estimates (θ_{pop}) for the elimination clearance (CL) and the volume of distribution (Vd) of both FBZ and FBZ-SO were parametrized as follows:

$$\theta_{pop} = \theta pop_{20} \cdot \left(\frac{\mathrm{WT}_{\mathrm{i}}}{20}\right)^{\mathrm{b}} \tag{3}$$

being θpop_{20} the typical estimate for a 20 kg animal, WT_i the individual bodyweight and b the allometrics scaling parameter, which was fixed to 0.75 and 1 for CL and Vd, respectively.

Residual variability was described for both compounds using a combined error model:

$$Y_{ij} = C_{ij}(1 + e, prop_{ij}) + e, add_{ij}$$

$$\tag{4}$$

Where Y_{ij} stands for the observed concentration and C_{ij} denotes the predicted concentration for the i-th subject at time j. Residual error for each observation has therefore an additive (e, add_{ij}) and a proportional $(e, prop_{ij})$ component which are normally distributed with mean of 0 and variances σ_{add}^2 and σ_{prop}^2 , respectively.

Once the base model was defined, the formulation effect on pharmacokinetic population parameters was evaluated using the following parametrization:

$$\theta_{SDNC} = \theta_{PM} \cdot \mathbf{e}^{\beta_{SDNC}} \tag{5}$$

being θ_{SDNC} and θ_{PM} the parameter estimates for the FBZ SDNC and PM formulations, respectively, and β_{SDNC} the formulation effect linked to the SDNC formulation (fixed to 1 for the PM formulation). To assess the statistical significance of a formulation effect on a given parameter, the fit improvement measured with the objective function value (OFV) provided by Monolix was considered. This metric corresponds to the twice negative logarithm of the log-likelihood function. Assuming a chisquared distribution for the difference in OFV, a single covariate effect was regarded significant (P < 0.05) when the OFV was reduced in at least 3.84 units (log-likelihood ratio test). In addition, the significance in the magnitude of each covariate effect (β_{SDNC}) was assessed through a Wald Test. Significant covariate-parameter relationships were kept and included in a full model. Then, these effects were evaluated again by backward deletion, confirming the significance of each formulationparameter relationship when an increase in the OFV of at least 10.9 units (P < 0.01) was observed after its removal from the full model. The final model was re-evaluated using goodness-of-fit plots and other relevant metrics, as mentioned above.

3. Results

3.1. In vitro dissolution performance of FBZ formulations

FBZ SDNC formulation containing 50 % of P188 was selected to be evaluated in vivo among other FBZ formulations reported in previous works since it presented an excellent in vitro dissolution performance and the highest formulation process yields (Melian et al., 2018; Melian et al., 2020). This formulation presented a FBZ mean particle size of 266 nm and was successfully obtained by a relatively simple wet bead milling process followed by a spray-drying step. The in vitro dissolution profiles of the FBZ SDNCs, its corresponding PM and pure FBZ are depicted in Fig. 1. This figure shows how, during the first 15 min of the assay, the amount of drug dissolved from pure FBZ could not be quantified, while FBZ dissolved from the SDNCs reached around 85 % of the total amount of assayed drug. Furthermore, the amount of drug dissolved from the SDNCs was significantly higher than the amount dissolved from the PM during the complete assay. FBZ SDNCs presented higher values of dissolution efficiency (DE) compared to the PM (data not shown) (Melian et al., 2020) for the different dissolution times evaluated (5, 30 and 60 min). For the SDNCs the DE was estimated in 61 % during the first 5 min of the dissolution assay and 92 % at 60 min, while for the PM the DE values were 14 % and 47 %, respectively.

3.2. In vivo pharmacokinetic study

FBZ is extensively metabolized in the ruminant host. FBZ main metabolite, FBZ-SO, retains anthelmintic activity and is also a commercialized compound. The comparative mean plasma concentration profiles of FBZ (a), FBZ-SO (b) and FBZ-SO2 (c) quantified after the i.r. administration of FBZ in the form of a SDNC or PM suspensions are depicted in Fig. 2. For both experimental groups (SDNC or PM), FBZ-SO was the main analyte recovered in plasma, followed by the parent drug (FBZ) and finally the inactive sulphone metabolite (FBZ-SO2) was quantified in lower concentrations.

The results of mean pharmacokinetics metrics after performing a non-compartmental analysis of the data for FBZ and FBZ-SO are shown in Table 1. The estimated AUC_{0-T} and Cmax were statistically higher (p < 0.05) for the SDNC compared to the PM formulation. Both FBZ and FBZ-SO reach a peak concentration significantly earlier (p < 0.05) when FBZ was administered as SDNC compared to the PM formulation.

The plasma pharmacokinetic behavior of FBZ and FBZ-SO was best described by a one-compartment disposition model, parametrized with the apparent volume of distribution (Vd) and the elimination clearance



Fig. 1. Dissolution profile of fenbendazole self-dispersible nanocrystals (FBZ SDNC), physical mixture (PM) and pure fenbendazole (FBZ). FBZ was not quantifiable during the assay of the pure drug before 60 min.

(CL). FBZ absorption was characterized by first-order kinetics (ka) with a lag time (Tlag). BSV was estimated for FBZ Vd and CL, while a significant BOV was quantified in the absorption parameters ka, Tlag and the extent of FBZ absorbed (F). All parameters were estimated with acceptable precision. Parameter estimates are shown in Table 2. A VPC stratified by formulation is included in Fig. 3 to illustrate the goodness of fit.

Formulation differences were found to be significant in FBZ bioavailability and lag time. In fact, the bioavailability achieved by FBZ SDNC was found to be 1.92 times higher than after the FBZ PM formulation, and the lag time was significantly lower (0.54 *versus* 3.3 h).

4. Discussion

As it was discussed in Melian et al. (2020), the SDNCs presented many advantages that contributed to their improved dissolution rate: the enlarged surface area produced by the nanometrization process, an increased saturation solubility of the drug and a highly homogeneous distribution of FBZ in the polymeric matrix, corroborated by Confocal Raman Microscopy. The results obtained in the pharmacokinetic study correlate with the in vitro dissolution profiles obtained and the DE values estimated. The DE parameter obtained from in vitro data is theoretically related to in vivo data, since it reflects the amount of drug that persist dissolved during a certain period of the dissolution assay (Khan and Ka, 1975). In this sense, the absorption of a drug is proportional to its concentration and the time it remains dissolved in a certain region of the gastrointestinal tract, both variables included in the DE calculation. The results demonstrate an improved absorption of FBZ after the administration of the SDNC-based formulation. In addition, disposition parameters of both FBZ and FBZ-SO were not affected by the formulation. The pharmacokinetic population model allowed the estimation of the absorption half-life for FBZ (18.6 h) and elimination half-lives for FBZ (2.8 h) and FBZ-SO (4.3 h). The relatively faster disposition process of FBZ in contrast to the estimated absorption rate indicates the presence of flipflop pharmacokinetics after oral administration in sheep, a phenomenon previously observed in studies assessing FBZ exposure after oral and intravenous administration in pigs and alpacas (Lakritz et al., 2015; etersen and Friis, 2000). Both studies reported an increase in the mean terminal FBZ half-live after oral administration: 2.59 to 8.38 h in pigs; and 5.9 to 23 h in alpacas. In accordance with these estimations, the decline in both FBZ and FBZ-SO concentrations at the terminal phase of the concentration versus time curve in sheep would be mainly driven by FBZ absorption rate. This behavior could be explained by a limited in vivo drug dissolution rate at the gastrointestinal tract. However, the magnitude of the absorption half-life estimated in this study (18.6 h) plus the fact that no formulation-related differences were found in this aspect, suggest the presence of other processes taking place at a presystemic level. Enteric reabsorption has been previously demonstrated for both FBZ and FBZ-SO (Hennessy et al., 1993). In addition, the metabolic conversion of FBZ to FBZ-SO is reversible by reductive metabolism within the rumen of sheep and cattle (Lakritz et al., 2015). Taken together, the enterohepatic cycling of FBZ-SO, produced in a higher proportion by pre-systemic metabolism after oral administration, and its conversion to FBZ, could lead to a sustained input of the latter to the systemic circulation. This effect might be masking formulationrelated differences in FBZ in vivo dissolution rate, only evidenced in the lower lag time of the SNDC formulation. Nonetheless, the higher extent of absorbed FBZ shown by this formulation is likely achieved by a more efficient in vivo dissolution profile.

As previously mentioned, BZMs as FBZ are potent anthelmintic molecules with very low water-solubility. This limitation affects directly their dissolution and absorption process in both monogastric and ruminant organisms and, consequently, restrains their systemic bioavailability and clinical efficacy, contributing to the resistance phenomena (Lanusse and Prichard, 1993). Even though, several technological approaches have been developed to increase the bioavailability

Research in Veterinary Science 142 (2022) 110–116



Fig. 2. Fendendazole and its metabolites plasma concentrations. Mean (\pm SD) plasma concentration profiles (n = 6) for a) fendendazole (FBZ); b) fendendazole sulfoxide (FBZ-SO) and c) fendendazole sulphone (FBZ-SO2), after intraruminal administration of a 5 mg/kg FBZ dose as either fendendazole self-dispersible nanocrystals (FBZ SDNC) or physical mixture (PM) suspension to sheep.

Table 1

Plasma pharmacokinetic metrics (mean \pm SD) for FBZ and FBZ-SO, obtained after the intraruminal administration of FBZ (5 mg/kg, n=6) formulated as SDNC or PM to sheep.

PK METRIC	FBZ		FBZ-SO		
	FBZ SDNC	FBZ PM	FBZ SDNC	FBZ PM	
Cmax (µg/mL)	0.35 ± 0.15^a	$0.1\;6\pm0.03$	0.64 ± 0.19^{a}	0.32 ± 0.05	
Tmax (h)	8.3 ± 2.3	17.0 ± 9.4	20.3 ± 7.8	$\textbf{27.7} \pm \textbf{10.5}$	
AUC _{0-T} (µg.h/mL)	$10.1\pm2.2^{ m b}$	5.1 ± 0.5	25.9 ± 6.1^{b}	13.1 ± 1.2	
T½el (h)	14.0 ± 8.2	13.1 ± 6.4	18.2 ± 6.4	17.1 ± 4.1	

Pharmacokinetic metrics with different superscript letters are statistically different at p < 0.05. FBZ: fenbendazole; FBZ-SO: fenbendazole sulfoxide; SDNC: self-dispersible nanocrystal; PM: physical mixture; Cmax: peak plasma concentration; Tmax: time to the Cmax; AUC_{0-T} : area under the plasma concentration ws. time curve from 0 up to the quantification time; T'_{sel} : elimination half-life (obtained by noncompartmental analysis of the data).

of poorly water-soluble drugs in monogastric organisms by improving aqueous drug solubility and *in vitro* dissolution, these approaches may not necessarily ensure improved drug bioavailability in ruminants. For instance, the use of cyclodextrins, which results successful to increase BZM bioavailability in monogastric organisms such as mice, may not be an optimal formulation for ruminants due to cyclodextrin ruminal degradation (Ceballos et al., 2012). For the SDNC preparation, the dissolution improvement correlates with an enhanced plasma drug exposure, confirming the potential of nanotechnology applications on the rational delivery of therapeutic compounds with limitations of aqueous solubility.

Even though work has been done in order to look for alternative pharmaceutical strategies to improve the systemic availability of poorly

Table 2 FBZ and FBZ-SO population pharmaco

Parameters (unit)	Final estimates (RSE %)
ka (h ⁻¹)	0.0373 (9.6)
Tlag (h)	3.3 (29.2)
Vd (L)	75.0 (22.3)
CL (L.h ⁻¹)	18.5 (8.7)
Vdm (L)	43.0 (9.7)
CLm (L.h ⁻¹)	6.97 (7.9)
Formulation effect on Tlag ($\beta_{SDNC-Tlag}$)	-1.800 (25.4)
Formulation effect on F (BSDNC-F)	0.66 (16.7)
BSV Vd (%)	48.66 (33.5)
BSV CL (%)	7.77 (42.7)
BOV ka (%)	31.33 (22.7)
BOV Tlag (%)	80.81 (23.7)
BOV F (%)	18.24 (22.5)
a1 (μg/mL)	0.0094 (21.3)
b ₁	0.1290 (10.8)
a ₂ (μg/mL)	0.0103 (8.9)
b ₂	0.1180 (2.0)

Estimates for the FBZ and FBZ-SO population pharmacokinetic parameters and the formulation effects on Tlag ($\beta_{\text{SDNC-Tlag}}$) and F ($\beta_{\text{SDNC-p}}$) are reported as mean (RSE %). The RSE % accounts for the estimation of uncertainty. Between-subject variability (BSV) and between occasion variability (BOV) are reported as coefficient of variation. a_1 and b_1 : estimates of the additive and proportional parameters of the residual error model for FBZ, respectively; a_2 and b_2 : estimates of the additive and proportional parameters of the residual error model for FBZ-SO, respectively; FBZ: fenbendazole; FBZ-SO: fenbendazole sulfoxide; ka: FBZ firstorder absorption rate; CL: FBZ elimination clearence for a 20 kg sheep; CLm: FBZ-SO aparent volume of distribution for a 20 kg sheep; Tlag: lag time in FBZ absorption; F: FBZ bioavailability.

Research in Veterinary Science 142 (2022) 110-116



Fig. 3. Visual predictive check (VPC) plots for fenbendazole (FBZ) stratified by formulation type, including the observed FBZ concentrations (black dots), the median of the observed concentrations at the different time-points (black line), the corresponding model-predicted median (dashed red line) and the 95 % prediction interval for the median (blue area).

water-soluble anthelmintics for use in ruminant species, generally, these compounds are commercially available for veterinary use as suspensions for oral administration. In a previous work (Melian et al., 2020), a commercial suspension of FBZ was studied along with the FBZ SDNC and PM. *In vitro* dissolution tests were performed and DE estimated for the three formulations at different dissolution times. As proposed in this previous report, the higher DE values achieved with the SDNC suggested an enhanced drug bioavailability compared with the results of the PM, and, even though, the commercial suspension was not tested *in vivo* in this work, its dissolution profile and calculated DE were strongly similar to those obtained for the PM (Melian et al., 2020), suggesting that the *in vivo* performance of the SDNC formulation would probably be significantly superior compared to this marketed suspension.

It was previously demonstrated for albendazole (ABZ), another compound of the BZM family, that a higher systemic exposure to the drug, achieved with increasing doses of ABZ, was correlated with a significant increase in the efficacy of the drug, in lambs infected with an Haemonchus contortus resistant isolate (Alvarez et al., 2012). In addition, Barrere et al. evaluated the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the β -tubulin gene of H. contortus after an ABZ treatment at three dose rates (5, 15 and 45 mg/kg) (Barrère et al., 2012). This investigation corroborated a strong relation between the presence of SNPs at codons 167 and 200 in the isotype 1 of the $\beta\text{-tubulin}$ and the survival of H. contortus individuals at a high doses of ABZ, showing that heterozygosity at both codons 167 and 200 conferred resistance with treatments of up to three times the recommended ABZ dose rate (Barrère et al., 2012). These discoveries could suggest that an increase in FBZ bioavailability achieved with the SDNC formulation could be promising for treating certain BZM resistant populations of H. contortus.

Finally, as part of an ongoing research project to search for new anthelmintics, several novel valerolactam-benzimidazole hybrids compounds were reported (Munguía et al., 2013; Munguía et al., 2015) with low water solubility as their commercial benzimidazole precursors. The results obtained in this work using FBZ as a drug model, encourage us to confirm the suitability of the SDNC formulation also for the new hybrid molecules in new *in vivo* studies.

5. Conclusion

It was possible to achieve a significant bioavailability enhancement for FBZ and its metabolites in sheep by improving the *in vitro* dissolution rate of the parent drug, formulated as a SDNC. Additionally, for the first time, FBZ and FBZ-SO population pharmacokinetics parameters were estimated in sheep. In fact, the relatively shorter elimination process of FBZ in contrast to its absorption suggests a flip-flop kinetics of this compound, therefor the ability of the formulation to achieve greater and longer systemic exposure of the drug could be essential in attaining a greater effect.

Funding

This work was financially supported by grants from the Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay; Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República (CSIC-Udelar), Uruguay; Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM); Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT) - FCQ UNC, Argentina; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT),

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Acknowledgments

The authors especially thank Prof. Dr. Eduardo Manta for his guidance on the chemical synthesis of the reference standards of fenbendazol sulfoxide and sulphone and Q.F. Ramiro Teixeira for their preparation and purification; Dario O. Weitmann, Business Coordinator BCS in BASF Argentina S.A for the Poloxamer samples and Dr. Diver Sellanes (SIQUIMIA - Parque Científico y Tecnológico de Pando) for kindly providing access to necessary equipment.

References

- Alvarez, L., Sanchez, S., Lanusse, C., 1999. In vivo and ex vivo uptake of albendazole and Harden, L., Smither M. S., Lamsse, J. 1995, in 1995 in the and extended and an extended of the state of th
- systemic exposure of albendazole metabolites in lambs. J. Vet. Pharmacol. Ther. 35, 365-372.
- Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R.K., 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in ire and changes in 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β-tubulin isotype 1 encoding gene in Haemonchus contortus. Vet. Parasitol. 186, 344–349.
 Campbell, W.C., 1990. Benzimidazoles: Veterinary uses. Parasitol. Today 6, 130–133.
 Ceballos, L., Moreno, L., Torrado, J.J., Lanusse, C., Alvarez, L., 2012. Exploring flubendazole formulations for use in sheep. Pharmacokinetic evaluation of a cyclodextrin-based solution. BMC Vet. Res. 8, 1–10.
 Charlou, P.L., Ortega-Rivera, O.A., Steinmetz, N.F., 2020. Nanocarriers for the delivery actioned internet understanding user and anomalyment action internet internet internet.

- edical, veterinary, and agricultural active ingredients. ACS Nano 14, 2678-2701.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruysse, J., 2014. Cha nths and their econo mic impact on farmed ruminants, Trends Parasitol, 30 361_367
- Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H.W., Chartier, C., Vineer, H.R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerena, G., Bäcescu, B., Mickiewicz, M., 2020. Initial assessor of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. Prev. Vet. Med. 182, 105103. ning, S.A., Craig, T., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Navarre, C., Rings, M., 2006.
- Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. J. Vet Intern Med 20 435-444
- Intern. Med. 20, 435-444.
 Hennessy, D., 1997. Modifying the formulation of delivery mechanism to increase the activity of anthelminitic compounds. Vet. Parasitol. 72, 367-390.
 Hennessy, D.R., Steel, J.W., Prichard, R.K., 1993. Biliary secretion and enterohepatic recycling of fenbendrazole metabolites in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 16, 132-140.
 Hewitson, J.P., Maizels, R.M., 2014. Vaccination against helminth parasite infections. Exp. Rev. Vacc. 13, 473-487.
 Jabbar, A., Ipdal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M., 2006. Anthelminitic resistance: the state of play revisited. Life Sci. 79, 2413-2431.
 Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P.A., Strehlau, G.A., Allan, B.A., Hosking, B.C., Rolfe, P.F., Sayer, H. 2011. Differences in efficacy of momentel. derountel and abametin

- Kaminasy, K., Depai, D., Otem, F.A., Otema, O.A., Pinan, D.A., Itokang, D.C., Itome, F.A., Sager, H., 2011. Differences in efficacy of monepartel, derquantel and abametin against multi-resistant nematodes of sheep. Parasitol. Res. 109, 19–23.Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelimintic resistance. Vet. Parasitol. 186, 70–78.

- anthelmintic resistance. Vet. Parasitol. 186, 70–78.
 Kesisogiou, F., Panmai, S., Wu, Y., 2007. Nanosizing—oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. Adv. Drug Del. Rev. 59, 631–644.
 Khan, K., Ka, K., 1975. The Concept of Dissolution Efficiency.
 Lakritz, J., Linden, D., Anderson, D.E., Specht, T.A., 2015. Plasma concentrations of fenbendazole (FBZ) and oxfendazole in alpacas (Lama paccos) after single intravenous and oral dosing of FBZ. Veter. Med.: Res. Reports 6, 71.
- Lanusse, C., Gascon, L., Prichard, R., 1993, Gastrointestinal distribution of albendazole Lanusse, C., Gascon, L., Prichard, R., 1993. Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. J. Vet. Pharmacol. Ther. 16, 38-47.
 Lanusse, C., Alvarez, L., Lifschitz, A., 2014. Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. Vet. Parasitol. 204, 18-33.
 Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. Drug Metab. Rev. 25, 235–279.
 Mederos, A., Carracelas, B., Lara, S., Pimentel, S., Banchero, G., 2016. Situación actual de la presidencia a luc drager antihelminica en a lurayur. Pau. INIA Una 44.

- ncia a las dros as antihelmínticas en ovinos en Uruguay. Rev. INIA Urug 44,
- 10-12 Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchero, G.E., 2014, First report of monepantel Haemonchus contortus resistance on sheep farms in Uruguay. Parasit. Vectors 7, 598

- Meena, N., Sahni, Y., Thakur, D., Singh, R., 2018. Applications of nanotechnology in veterinary. Vet. World 3, 477–480.
 Melian, M.E., Munguta, A.B., Faccio, R., Palma, S., Domínguez, L., 2018. The impact of solid dispersion on formulation, using confocal Micro Raman spectroscopy as tool to probe distribution of components. J. Pharm. Inn. 13, 58–68. Meli
- prote distribution of components, S. Friann, nn. 15, 58–66.
 ian, M.E., Paredes, A., Munguia, B., Colobbio, M., Ramos, J.C., Teixeira, R., Manta, E., Palma, S., Faccio, R., Domínguez, L., 2020. Nanocrystals of novel Valerolactam-Fenbendazole hybrid with improved in vitro dissolution performance.
- AAPS PharmSciTech 21, 1-15. Mo, K., Savic, R.M., 2007. Diagnosing model diagnostics. Clin. Pharmacol. Ther 82, 17–20.
- Mohammad, I.S., Hu, H., Yin, L., He, W., 2019. Drug nanocrystals: fabrication methods
- and promising therapeutic applications. Int. J. Pharm. 562, 187–202. nguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., Andina, J., Ures, X. López, A., Manta, E., Domínguez, L., 2013. Synthesis and anthelminic evaluat novel valerolactam-benzimidazole hybrids. Lett. Drug Design Discov. 10, 1007-1014
- Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., Domínguez, L., 2015. Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. Exp.
- . montol. 100, 70-80. adopoulos, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Rumin. Res. 76, 99-103. Paredes, A.J., Llabot, J.M., Sanchez Bruni, S., Allemandi, D., Palma, S.D., 2016, Self-
- Paretes, A.J., Labot, J.M., Sanchez Dun, S., Alemann, D., Pania, S.D., 2010. Self-dispersible nanocrystals of albendazole produced by high pressure homogenizatior and spray-drying. Drug Dev. Ind. Pharm. 42, 1564–1570.Paredes, A.J., Bruni, S.S., Allemandi, D., Lanusse, C., Palma, S.D., 2018a. Albendazole
- nanocrystals with improved pharmacokinetic performance in mice. Ther. Deliv. 9,
- 89–97.
 Paredes, A.J., Litterio, N., Dib, A., Allemandi, D.A., Lanusse, C., Bruni, S.S., Palma, S.D.,
- Paredes, A.J., Litterio, N., Dib, A., Allemandi, D.A., Lanusse, C., Bruni, S.S., Palma, S.D., 2018b. A nanocrystal-based formulation improves the pharmacokinetic performance and therapeutic response of albendazole in dogs. J. Pharm. Pharmacol. 70, 51–58. Paredes, A.J., Camacho, N.M., Schofs, L., Dib, A., del Pilar Zarazaga, M., Litterio, N., Allemandi, D.A., Bruni, S.S., Lanusse, C., Palma, S.D., 2020. Ricobendazole nanocrystals obtained by media milling and spray drying: pharmacokinetic comparison with the micronized form of the drug. Int. J. Pharm. 119501. Pensel, P., Paredes, A., Albani, C.M., Allemandi, D., Bruni, S.S., Palma, S.D., Elissondo, M.C., 2018. Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. Ver. Parasitol. 251. 78–84.
- Vet. Parasitol. 251, 78–84.
 Pensel, P.E., Gamboa, G.U., Fabbri, J., Ceballos, L., Bruni, S.S., Alvarez, L.I.
- Allemandi, D., Benoit, J.P., Palma, S.D., Elissondo, M.C., 2015. Cystic echinococcosis therapy: albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta Trop. 152, 185–194.
 Petersen, M.B., Friis, C., 2000. Pharmacokinetics of fenbendazole following intravenous
- and oral administration to pigs. Am. J. Vet. Res. 61, 573-576.
 Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., De Waal, T., Skuce, P., Charlier, J., Torgerson, P., Hertzberg, H., Hendrickx, G., 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. Vet. Rec. 176, 546.
- resistance in European farmed ruminantis: a systematic review. Vet. Rec. 176, 546. Savic, R.M., Menrić, F., Lavielle, M., 2011. Implementation and evaluation of the SAEM algorithm for longitudinal ordered categorical data with an illustration in pharmacokinetics-pharmacodynamics. AAPS J. 13, 44–53. Shegokar, R., Müller, R.H., 2010. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. Int. J. Pharm. 399, 129–139. Soria-Arteche, O., Castillo, R., Herrández-Campos, A., Hurtado-de la Peña, M., Navarrete-Vázquez, G., Medina-Franco, J.L., Gómez-Flores, K., 2005. Studies on the exhetine 5 catedring of albundenella. Explandencela. trielobenelaenela media there.
- Navarrete-Vázquez, G., Medina-Franco, J.L., Gómez-Flores, K., 2005. Studies on the selective S-oxidation of albendazole, fenbendazole, triclabendazole, and other benzimidazole suffaces. J. Mex. Chem. Soc. 49, 353–358.
 Torres-Acosta, J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A., Cuéllar-Ordaz, J., 2012. Anthelminite resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. Vet. Parasitol. 189, 89–96.
 Underwood, C., Van Eps, A., 2012. Nanomedicine and veterinary science: the reality and the practicality. Vet. J. 193, 12–23.
 Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. Haemonchus contortus resistance to monepantel in sheep. Vet. Parasitol. 209, 278–280.
 Van Eerdenbrugh, B., Van den Mooter, G., Augustijns, P., 2008. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. Int. J. Pharm. 364, 64–75.

- Waller, P., 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. Vet. Parasitol. 139, 1-14
- Waller P. J. 2003. Global Perspectives on Nematode Parasite Control in Ruminant Livestock: The Need to Adopt Alternatives to Chemotherapy, with Emphasis of Biological Control.
- Zhan, B., Beaumier, C.M., Briggs, N., Jones, K.M., Keegan, B.P., Bottazzi, M.E., Hotez, P J., 2014. Advancing a multivalent 'Pan-anthelmintic'v: nematode infections. Expert Rev. Vacc. 13, 321–331. against soil-t

ANEXOS

Ĭ		- 530	-	
	12.94	and the second		
EC	ACU QUI	LTA		A

ACTA DEFENSA DE TESIS

v 01. 2022/06/28

CARRERA DE POSGRADO	Doctorado en Química	di ch	in is 4
ESTUDIANTE	NOMBRE: María Elisa Melian Furest	A. I.	c.i. 5064531-1
DEFENSA	LUGAR Montevideo	FECHA 6/9/2022	нока 2 15:00
TÍTULO DE TESIS	Desarrollo y caracterización de dispersi nanocristales de fenbendazol como pro antihelmínticos	ones sólida totipo de be	as y enzimidazoles
DICTAMEN ¹	CALIFICACIÓN Excelente	NOT.	A 2

JUSTIFICACIÓN²

- El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:
- El trabajo presentado por la tesista se muestra muy bien planteado y excelentemente desarrollado, se trata de un trabajo con un enfoque moderno y multidisciplinario, generando aportaciones valiosas en relación con la metodología empleada y los resultados obtenidos.
- La bibliografía se encuentra correctamente citada, actualizada y puesta en contexto.
- Asimismo, en el marco de esta tesis se han generados varias publicaciones de alto impacto en la temática, confirmando la calidad del trabajo y sus resultados.
- En cuanto a la presentación oral la misma fue dinámica, concisa y muy claramente presentada, respetando el tiempo estipulado.

La tesista respondió en forma acertada y bien desarrollada las preguntas que les fueron formuladas por el tribunal.

Por tanto, se destaca la excelente calidad tanto del trabajo que desarrolló, como de su escritura y presentación.

DIRECTORES DE TESIS (nombres y firmas)

au

Dra. Laura Domínguez Dr. Santiago Palma Dr. do Faccio

TRIBUNAL (nombres y firmas)

Dra. Helena Pardo Dra. Marta Vázquez

Dra. Daniela Quinteros

1 La Tesis podrá resultar: a) Aprobada con las siguientes calificaciones (notas): Excelente (10, 11 ó 12); Muy Bueno (8 ó 9); Bueno (5, 6 ó 7); Aceptable (3 ó 4). b) Reprobada con las siguientes calificaciones: Insuficiente (1 ó 2); Muy Insuficiente (0). ² La justificación es requisito para la calificación de Excelente o en caso de reprobación.

Página 1 de 1