

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“DESARROLLO DE SISTEMA DE TRANSPORTE MICROENCAPSULANTE COMO
ALTERNATIVA PARA LA SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE FÁRMACOS CLASE IV DEL
SCB”**

TESIS

Para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en C.Q. MARCO ANTONIO SALAZAR MIRANDA

Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa
Codirector de Tesis: Dr. César Pérez Alonso

Ciudad de México

Julio 2018

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Ciudad de México a 30 de Julio del 2018

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“ Desarrollo de Sistema de Transporte
Microencapsulante como Alternativa para la Solubilidad
y Estabilidad de Fármacos Clase IV del SCB ”**

Que presentó

M. en C.Q. MARCO ANTONIO SALAZAR MIRANDA

Comité Tutorial:

Director de tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa

Codirector: Dr. César Pérez Alonso

Asesor: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Jurado:

Presidente: Dra. Angelica Román Guerrero

Secretario: Dr. César Pérez Alonso

Vocal: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Vocal: Dra. Ana Guadalupe Estrada Fernández

A mí querida familia

AGRADECIMIENTOS

Familia, a ustedes les quiero agradecer todo el apoyo, sin esperar nada a cambio, han escuchado mis palabras, mis problemas y todos mis quebrantos. A ustedes quiero agradecer, lo maravillosos que han sabido ser con alguien que tuvo que ser fuerte cuando todo se estaba derrumbando.

A mis hijos Danna y Leo, ustedes son la razón por la cual me hice más fuerte, pero siguen siendo mi debilidad, con ustedes me di cuenta de que estoy orgulloso de todo lo que tengo en la vida, pero realmente solo mis hijos son mi mayor felicidad.

A mis padres Juani y Gilo, que me abrieron el camino para andar por él, a mis hermanos Oscar y César que, con su aliento y cariño, fueron de mí, presencia callada, gracias por dedicarme tiempo, tiempo para demostrar su preocupación por mí, tiempo para escuchar mis problemas y ayudarme a descubrir que a pesar de ellos puedo ser feliz.

A mi primo Pepe, gracias por todos los momentos que hemos vivido, momentos llenos de sentimientos y pensamientos compartidos, con tu presencia has cambiado mi forma de ver la vida, infinitamente estoy en deuda contigo.

Mi especial agradecimiento a quienes tanto han enriquecido mi vida.

De igual manera mi más sincero agradecimiento a mis Tutores, Dr. Francisco Cruz Sosa y Dr. Cesar Pérez Alonso, por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me han brindado, por escucharme y aconsejarme siempre.

A los Dres. César Pérez Alonso, Rubén Jiménez Alvarado, Angélica Román Guerrero, Ana Guadalupe Estrada Fernández, Araceli Amaya Chávez y María Dolores Hernández N. por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter, por los momentos en los que más que un profesor se comportó como un amigo, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo.

Y muy en especial a mis amigos, Ana Buenrostro, Enrique Álvarez, Luis Pimentel, Moisés Sánchez, que sin su “empujón” y apoyo estoy seguro de no haberlo hecho, por su amistad y camaradería al acompañarme en el camino Gracias.

Gracias a todos que directa o indirectamente formaron parte para que mis inquietudes de superación hubiesen podido realizarse y hablar de ellas, es casi un milagro y un motivo para dar gracias a Dios.

RESUMEN

La CH está indicada en el manejo de la hipertensión sola o en combinación con otros fármacos, pero presenta una baja solubilidad y estabilidad, limitando su uso en el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas. Se utilizaron tecnologías de secado por aspersión de emulsiones dobles (SDE) para mejorar la estabilidad de CH utilizando Eudragit L30D-55 (EUD), Opadry II (OPA) o Kollicoat IR (KIR) como materiales de pared. Las microcápsulas de SDE que contenían CH se evaluaron en cuanto al tamaño de partícula, morfología, perfiles de liberación, almacenamiento acelerado y estabilidad termo-oxidativa. Las microcápsulas mostraron mayor solubilidad ($> 80\%$ en 15 min), menor degradación ($<2\%$) en condiciones de almacenamiento acelerado y menor degradación termo-oxidativa que el CH. La confirmación de la estabilidad química de las sustancias por las técnicas convencionales no tiene en cuenta las variaciones en la energía de activación (E_a) de las microcápsulas, que pueden influir en el desempeño de los productos farmacéuticos. Se empleó el estudio de estabilidad térmica oxidativa para CH cuya estabilidad es crítica, fue útil para discriminar entre las formulaciones y evaluar las formulaciones que presenten mayores valores de E_a comparado con un estudio de estabilidad acelerada con éxito. En sólidos orales, es indispensable evaluar la liberación del fármaco de la formulación y su biodisponibilidad. La disolución y la permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales que describen la velocidad y el nivel de absorción. Estos análisis permiten evaluar los procesos de absorción por vía oral y son empleados como criterios para el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. En este proyecto, se trabajó con el modelo cinético continuo de disolución y permeabilidad *in vitro* para evaluar el efecto de la formulación sobre la absorción de CH microencapsulada de liberación inmediata. El análisis de resultados de la disolución y permeabilidad revelan que la microencapsulación ha mejorado la solubilidad del fármaco y por ende el paso a través de las membranas del epitelio intestinal. El tamaño promedio de las microcápsulas fue de $5 \mu\text{m}$. El perfil de disolución de la CH microencapsulada con respecto al fármaco mejoró en un 80% , la cantidad permeada (ABC_0^∞) y la velocidad de permeación (k_p) fue $7.35 \mu\text{g/mL}$ y 0.345 min , respectivamente. Basado en los resultados anteriores la técnica de microencapsulación puede ser un candidato potencial para mejorar la absorción oral de la CH en los seres humanos.

Palabras clave: Clortalidona, emulsiones dobles, microcápsulas, secado por aspersión, estabilidad.

ABSTRACT

Chlorthalidone (CH) is indicated in the management of hypertension either alone or in combination with other antihypertensive drugs, but it displays poor solubility and stability limiting its use in the development of new pharmaceutical alternatives. Spray-drying of double emulsions (SDE) technologies were used for enhancing the stability of CH by using Eudragit L30D-55 (EUD), Opadry II (OPA), or Kollicoat IR (KIR) as wall materials. SDE microcapsules containing CH were evaluated for particle size, morphology, release profiles, accelerated storage, and thermo-oxidative stability. Both types of microcapsules showed higher solubility (>80% in 15 min), lower degradation (<2%) under accelerated storage condition, and lower thermo-oxidative degradation than pure CH. However, SDE microcapsules showed smaller particle sizes (<16 μm), which widens the opportunity of incorporating microcapsules to dosage forms requiring different particle sizes for achieving their functionality. Confirmation of the chemical stability of the substances by conventional techniques does not consider the variations in E_a of the microcapsules, which may influence the performance of the pharmaceutical products. A study of oxidative thermal stability for drugs whose stability is critical, so that it can be discriminated between the formulations in a shorter time and only evaluate the formulations that present higher values of E_a , by an accelerated stability study with a high probability of success. In the development of solid oral dosage forms, it is indispensable to assess the release of the drug from the formulation and its bioavailability. Gastrointestinal dissolution and permeability are fundamental parameters that describe the rate and level of absorption. These analyzes allow the evaluation of oral absorption processes and are used as criteria for the Biopharmaceutical Classification System. In this project, we worked with the continuous kinetic model of in vitro dissolution and permeability to evaluate the effect of the formulation on the absorption of immediate release microencapsulated CH. Analysis of dissolution and permeability results reveal that microencapsulation has improved the solubility of the drug and thus the passage through the membranes of the intestinal epithelium. The average size of the microcapsules was 5 μ . The dissolution profile of the microencapsulated CH with the drug was improved by 80%, the permeated amount (ABC_0^∞) and the permeation rate (kp) was 7.35 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 0.345 min respectively. Based on the above results the microencapsulation technique may be a potential candidate to improve oral absorption of CH in humans.

Keywords: Chlorthalidone; double emulsions; microcapsules; spray-drying; stability

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC_0^∞	=	Área bajo la curva de cero a infinito
[]	=	Concentración
μL	=	Microlitros.
μm	=	Micrómetro.
ACN	=	Acetonitrilo
CIVIV	=	Correlaciones in vitro-in vivo
cm	=	Centímetros.
CV	=	Coeficiente de variación.
DE	=	Desviación estándar.
Ea	=	Energía de activación
EUD	=	Eudragit L30D-55
HPLC	=	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
Iny	=	Inyección.
K'	=	Factor de capacidad
KIR	=	Kollicoat IR
K_p	=	Velocidad de permeación
mg	=	Miligramos.
min	=	Minutos
mL / min	=	Mililitro por minuto
mL	=	Mililitros.
mm	=	Milímetro.
mtas	=	Muestras.
nm	=	Nanómetros.
NOM	=	Norma Oficial Mexicana.
NPT	=	Número de platos teóricos
OPA	=	Opadry II
r	=	Coeficiente de correlación.
r^2	=	Coeficiente de determinación.
SCB	=	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SDE	=	Secado por aspersión de emulsiones dobles
Vol	=	Volumen.
λ	=	Longitud de onda.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE	IV
TABLAS	VI
FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. CARACTERÍSTICAS EN LA ABSORCIÓN DE FÁRMACOS	7
2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE FÁRMACOS	9
2.3. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACEUTICA (SCB)	11
2.4. CLORTALIDONA	16
2.5. ALTERNATIVAS EN LA FORMULACIÓN DE FÁRMACOS	16
2.6. MICROENCAPSULACIÓN	18
2.6.1. <i>Materiales de pared utilizados en microencapsulación</i>	20
2.6.2. <i>Emulsiones</i>	23
2.6.3. <i>Emulsionantes</i>	27
2.6.4. <i>Biopolímeros como agentes emulsionantes</i>	28
2.6.5. <i>Mecanismos de inestabilidad en emulsiones</i>	28
2.7. SECADO POR ASPERSIÓN	31
2.8. MÉTODOS DE LIBERACIÓN	32
2.9. DISOLUCIÓN	34
2.10. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE SISTEMAS MICROENCAPSULANTES	36
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	45
5. OBJETIVOS	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS	53
6.1. MATERIALES	55
6.2. REACTIVOS	55
6.3. INFRAESTRUCTURA	56
6.3.1. <i>Laboratorios:</i>	56
6.3.2. <i>Equipos:</i>	56
6.4. DISEÑO DEL ESTUDIO	57
6.5. MÉTODOS PARA FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN:	57
6.5.1. <i>Formulación de emulsiones dobles</i>	57
6.5.2. <i>Tamaño de gota y morfología de las emulsiones dobles</i>	58
6.5.3. <i>Microencapsulación mediante secado por aspersion</i>	58
6.5.4. <i>Tamaño y morfología de microcápsulas</i>	59
6.5.5. <i>Rendimiento de microencapsulación</i>	59
6.5.6. <i>Eficiencia de microencapsulación</i>	59
6.5.7. <i>Dosificación de las microcápsulas en cápsulas de gelatina</i>	60
6.6. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	60

6.6.1.	<i>Estabilidad acelerada</i>	60
6.6.2.	<i>Estabilidad térmica-oxidativa</i>	60
6.7.	LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS MICROCÁPSULAS DE CH	61
6.8.	MÉTODOS PARA EVALUACIÓN DE PERMEABILIDAD DE CH MICROENCÁPSULADA	61
6.8.1.	<i>Preparación de soluciones.</i>	62
6.8.2.	<i>Disección del intestino de rata.</i>	63
6.8.3.	<i>Soluciones muestra de la permeabilidad</i>	64
6.8.4.	<i>Soluciones de referencia</i>	65
6.8.5.	<i>Condiciones cromatográficas:</i>	66
6.8.6.	<i>Metodología:</i>	67
6.8.7.	<i>Procedimiento.</i>	67
6.8.8.	<i>Cálculos</i>	67
6.8.9.	<i>Análisis estadístico</i>	70
7.	RESULTADOS	71
7.1.	CARACTERIZACIÓN DE CH	73
7.2.	TAMAÑO DE GOTA, MORFOLOGÍA Y ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES DOBLES.	75
7.3.	TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE MICROCÁPSULAS	77
7.4.	RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE MICROENCAPSULACIÓN	78
7.5.	ESTABILIDAD	79
7.5.1.	<i>Estabilidad acelerada</i>	79
7.5.2.	<i>Termooxidación DSC</i>	80
7.6.	LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS MICROCÁPSULAS DE CH	82
7.7.	EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD	83
7.7.1.	<i>Perfiles de Disolución y Permeabilidad</i>	85
8.	RECOMENDACIONES	87
9.	REFERENCIAS	91
10.	ARTÍCULO	105

TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de fármacos cuya absorción se ve afectada por primer paso hepático.	9
Tabla 2. Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB.	12
Tabla 3. Correlaciones in vitro-in vivo esperada para productos de liberación inmediata, sobre la base de la clasificación biofarmacéutica (Amidon y col., 1995).	13
Tabla 4. Técnicas de microencapsulación	20
Tabla 5. Materiales de pared utilizados en microencapsulación.	20
Tabla 6. Formulación de microcápsulas por SDE.	58
Tabla 7. Composición de fase para lavado del equipo.	67
Tabla 8. Interacción de CH con los excipientes.	74
Tabla 9. Rendimientos de Proceso y eficiencia de microencapsulación.	78
Tabla 10. Estudio de estabilidad acelerada 40°C/75% H.R.	80
Tabla 11. Estabilidad térmica oxidativa.	81
Tabla 12. Resultados de los parámetros de la estandarización.	84

FIGURAS

Figura 1. Mecanismo y distribución de fármacos.	10
Figura 2. Preparación en dos pasos de una emulsión doble del tipo $W_1/O/W_2$ (Jiménez-Alvarado y col., 2009).	24
Figura 3. Diagrama de clasificación de las emulsiones dobles (Garti y Bisperink, 1998)	25
Figura 4. Estructura típica de un emulsionante (Becher, 2001).	27
Figura 5. Mecanismos que favorecen a la inestabilidad de las emulsiones (McClements, 2005).	29
Figura 6. Representación global de los diferentes mecanismos de desestabilización de las emulsiones múltiples (McClements, 2005).	30
Figura 7. Sistema de Permeabilidad Intestinal.	64
Figura 8. Diseño del Sistema Continúo para Disolución y Permeabilidad.	65
Figura 9. Distribución de Tamaño de partícula de CH.	74
Figura 10. Microscopia óptica de CH en objetivo 40x.	74
Figura 11. Formulación de microcápsulas por SDE.	75
Figura 12. Micrografías de emulsiones simple y doble recién preparadas de CH: (a) EtOH ₁ /MO, (b) EtOH ₁ /MO/W _{KIR} , (c) EtOH ₁ /MO/W _{OPA} y (d) EtOH ₁ /MO/W _{EUD} .	76
Figura 13. Variación del tamaño de gota volumétrico promedio ($d_{4,3}$) con respecto al tiempo después de la fabricación: EtOH ₁ /MO/W _{EUD} (-□-), EtOH ₁ /MO/W _{OPA} (-O-), EtOH ₁ /MO/W _{KIR} (-Δ-) y EtOH ₁ /MO (-◇-).	76
Figura 14. Micrografías de microcápsulas de CH: a) SDE _{EUD} , b) SDE _{OPA} , c) SDE _{KIR} .	77
Figura 15. Termogramas de: a) N ₂ blanco y CH, b) EUD y c) SDE _{EUD} .	81
Figura 16. Perfil de disolución para CH y CH microencapsulada: CH (-■-), SDE _{EUD} (-O-), SDE _{OPA} (-Δ-) and SDE _{KIR} (-▽-).	83
Figura 17. Perfil de permeabilidad en intestino de rata de CH vs microcápsulas de CH.	85

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de absorción de fármacos comprende el paso desde el lugar de administración hasta la circulación sistémica. Existen múltiples factores que no solo condicionan el proceso de absorción, sino que también factores que pueden alterar el normal desarrollo del proceso. La tasa de absorción depende de los siguientes parámetros: características fisicoquímicas de la molécula, forma farmacéutica, lugar de absorción y eliminación pre-sistémica del fármaco.

Respecto a las características fisicoquímicas, la solubilidad y permeabilidad de fármacos juega un papel muy importante en el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas orales que garanticen dicha absorción y para ello se ha estudiado a los fármacos mediante el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) que es un marco científico para clasificar a los fármacos en base de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, considerando tres factores: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal que gobiernan la velocidad y cantidad de absorción del principio activo desde una forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata.

Conforme a dicha clasificación los fármacos caracterizados como baja solubilidad, baja permeabilidad (Clase IV) presentan poco interés en los procesos de desarrollo de medicamentos ya que resulta complicado caracterizar su absorción presentando problemas significativos para una liberación oral efectiva y por otro lado en la formulación de medicamentos genéricos la correlación *in vitro-in vivo* es limitada o simplemente puede no existir.

Otra característica importante en la investigación con fármacos es la estabilidad, ya que la calidad de las moléculas o medicamentos varía conforme el tiempo por la influencia de diferentes factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad y la luz, entre otros (radiaciones electromagnéticas, etc.). Para lo cual se han desarrollado estudios de estabilidad donde se incluye la evaluación de los factores relacionados con el producto mismo que influyen en su calidad, como, por ejemplo, la interacción del fármaco con los componentes del excipiente, con el sistema de envase y cierre y los materiales de empaque, así como la incompatibilidad entre diferentes fármacos dentro de una misma formulación, como por ejemplo entre las vitaminas de un producto multivitamínico.

Como una alternativa tecnológica para modificar la solubilidad, permeabilidad y estabilidad de fármacos, la microencapsulación que es aplicada para preservar y/o proteger (de la oxidación, interacción con otros compuestos, enmascaramiento de sabor, etc.) numerosos ingredientes comerciales se pueden emplear en la industria farmacéutica. La microencapsulación se compone de dos tipos de materiales, el que es cubierto refiere a la fase interna y el que recubre es llamado pared y se busca que no reaccione con el material a encapsular.

Las microcápsulas presentan una amplia variedad de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna y pared continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y con fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) y aunque hay diversas opiniones del intervalo de tamaño al que pertenecen, la mayoría se encuentran entre 0.2 a 5000 μm .

Para preparar las microcápsulas, hay numerosas técnicas y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes. No obstante, algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en: químicos y físicos. Como métodos químicos pueden citarse: coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento en liposomas, entre los métodos físicos se encuentran: secado por aspersión y encapsulación por granulación. La selección del método estará en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y los mecanismos de liberación.

Por tal motivo el interés de este trabajo fue: (1) Microencapsular fármacos tipo IV del sistema de clasificación biofarmacéutica (Clortalidona) mediante las técnicas de secado por aspersión, evaluando liberación *in vitro*, estabilidad, biodisponibilidad y optimización de la formulación y (2) Determinar y comparar el perfil cinético de permeabilidad en un modelo de intestino de rata de los microencapsulados de Clortalidona con respecto al fármaco cristalino.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Cuando un paciente se dirige a una farmacia y presenta una receta recibe a cambio de ésta medicamentos que se presentan en diferentes formas farmacéuticas. Estas diferentes formas o medios de transporte influirán en la actividad terapéutica de dichas sustancias (Alfonso R, 2007). Las formas farmacéuticas pueden ser preparadas por un farmacéutico conforme a la fórmula prescrita por un médico (fórmulas magistrales), preparadas de acuerdo con las reglas de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (formulaciones oficiales) y elaboradas con fórmulas autorizadas por la Secretaría de Salud en establecimientos de la industria farmacéutica (especialidades farmacéuticas) (Salud, 2008).

La elaboración de las formas farmacéuticas es de suma importancia para garantizar una utilización racional de los fármacos adaptándolos a la vía de administración adecuada, tiene además otros objetivos importantes tales como: favorecer la conservación de los fármacos y protegerlos contra factores de alteración (estabilidad), enmascarar y corregir las características organolépticas (olores o sabores desagradables, reacciones dolorosas, etc.), modificar su solubilidad, permeabilidad entre otras muchas otras funcionalidades (Lieberman y col., 1989).

2.1. Características en la absorción de fármacos

La acción de cualquier fármaco requiere que haya una concentración adecuada de este en el medio que baña el órgano diana, para la mayoría de los fármacos el efecto se relaciona con el tiempo entre el aumento y la disminución en la concentración en el tejido diana.

El proceso de absorción comprende los procesos de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, su disolución, la entrada de los fármacos en el organismo desde el lugar de administración, los mecanismos de transporte y la eliminación pre-sistémica, así como las características de cada vía de administración, la velocidad y la cantidad con que el fármaco accede a la circulación sistémica y los factores que pueden alterarla. El conocimiento de las características de absorción de un fármaco es útil para seleccionar la vía de administración y la forma farmacéutica óptimas para cada caso, así como para conocer las repercusiones que pueden tener sobre la respuesta la existencia de factores que alteran la velocidad de absorción o la cantidad absorbida.

La absorción de un fármaco depende de las siguientes características:

a) Características fisicoquímicas del fármaco. Comprenden el peso molecular que condiciona el tamaño de la molécula, la liposolubilidad y su carácter ácido o alcalino, que, junto con su pK_a , condicionan el grado de ionización. De estos factores depende el mecanismo por el cual se produce la absorción (difusión pasiva, filtración y transporte activo) y la velocidad a la que se realiza.

b) Características de la preparación farmacéutica. Para que el fármaco se absorba, debe estar disuelto. La preparación farmacéutica condiciona la velocidad con que el fármaco se libera, se disgrega y se disuelve. Algunas características son: la formulación (solución, polvo, cápsulas o comprimidos), el tamaño de las partículas, la presencia de aditivos y excipientes y el propio proceso de fabricación.

c) Características del lugar de absorción. Dependen de la vía de administración (oral, intramuscular o subcutánea). En general, la absorción será tanto más rápida cuanto mayor y más prolongado sea el contacto con la superficie de absorción. Algunas de estas características son: la superficie y el espesor de la membrana, el flujo sanguíneo que mantiene el gradiente de concentración; en la administración oral, el pH del medio y la motilidad gastrointestinal y en la administración intramuscular o subcutánea, los espacios intercelulares.

d) Eliminación presistémica y fenómeno «primer paso». Por cualquier vía que no sea la intravenosa puede haber absorción incompleta porque parte del fármaco administrado sea eliminado o destruido antes de llegar a la circulación sistémica. Por ejemplo, por vía oral, un fármaco puede eliminarse por las heces antes que se complete su absorción, puede ser quelado, degradado por la acción del pH ácido del estómago o de las enzimas digestivas y metabolizado por las bacterias de la luz intestinal; una vez absorbido, puede metabolizarse en el epitelio intestinal en el hígado (primer paso hepático) o en los pulmones antes de llegar a la circulación sistémica.

Se entiende por primer paso hepático la metabolización del fármaco absorbido en el tracto gastrointestinal que llega al hígado a través de la vena porta y que se metaboliza en él antes de llegar a la circulación sistémica. La fracción de extracción hepática es la fracción del fármaco que hay en el cuerpo que se metaboliza en un solo paso por el hígado. Los fármacos

con primer paso hepático (Tabla 1) poseen una fracción de extracción alta, mayor de 0,7, lo que significa que menos del 30% de la dosis absorbida alcanzará la circulación sistémica. El primer paso hepático explica que la biodisponibilidad de algunos β -bloqueantes sea inferior al 30% a pesar de que su absorción gastrointestinal es completa; también explica que la dosis por vía oral deba ser notablemente mayor que aquella por vía intravenosa.

Tabla 1. Ejemplos de fármacos cuya absorción se ve afectada por primer paso hepático.

Amitriptilina	Citarabina	Metilfenidato
Clorpromazina	Morfina	Dextropropoxifeno
Naloxona	Isosorbida	Nifedipino
5-Fluorouracilo	Hidralazina	Imipramina
Propranolol	Ketamina	Labetalol
Verapamilo	Lidocaína	Clortalidona

2.2. Características fisicoquímicas de fármacos

Siendo el proceso de absorción el componente fundamental para la formulación de nuevos e innovadores sistemas de transporte para fármacos es necesario considerar lo que le sucede al medicamento cuando es administrado por vía oral. Una vez ingerida la forma farmacéutica, el fármaco sufre diferentes procesos hasta llegar a disolverse en el fluido del tracto gastrointestinal (TGI) y posteriormente ser absorbido como se presenta en la Figura 1. El medicamento, en primer lugar, se desintegra en gránulos o agregados; a continuación, estos gránulos se rompen y originan partículas individuales, en las cuales posteriormente entran en solución las del fármaco. Estando en solución, el fármaco está en posibilidad de ser absorbido, para lo que debe sufrir un proceso de permeación y posterior conducción hacia la sangre (Amidon y col., 1995; El-Kattan A y col., 2011; Guerra P, 2005).

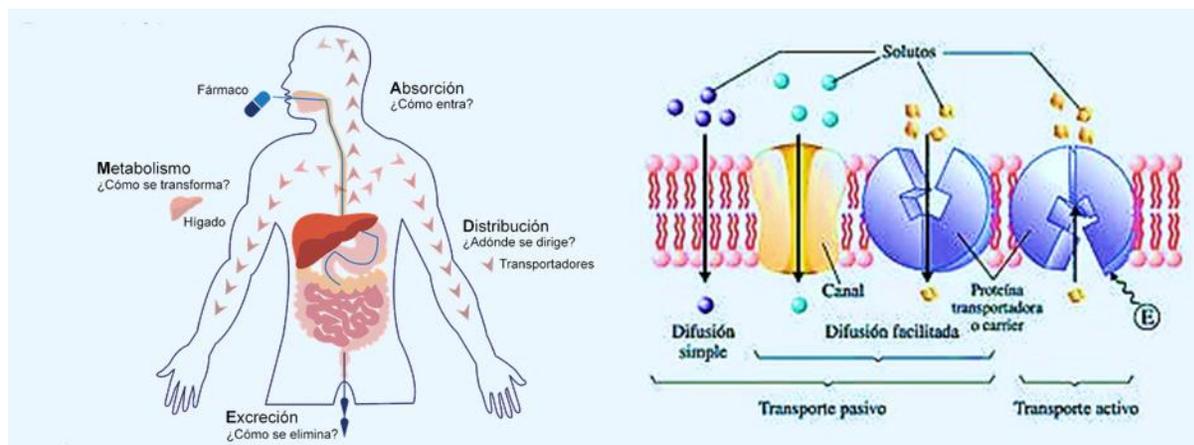


Figura 1. Mecanismo y distribución de fármacos.

(Contribución de <https://sandt.wikispaces.com/> are licensed under a Creative Commons Attribution Share-Alike 3.0 License).

La disolución representa el último paso de la liberación del fármaco a partir del sistema de entrega, estado que se requiere para que pueda ser absorbido y así ejerza su efecto farmacológico (la excepción serían aquellos fármacos que no requieren ser absorbidos por tener una acción local) (Guerra P, 2005). Cada uno de estos procesos involucra diferentes propiedades fisicoquímicas del fármaco que determinan la velocidad a la que estos eventos ocurren y por ende definen la velocidad de absorción. En el caso de la disolución, la solubilidad es la propiedad fundamental que la define, sin dejar de lado otros factores como la superficie y el coeficiente de difusión (El-Kattan A y col., 2011; Guerra P, 2005).

La permeación está determinada por el coeficiente de permeabilidad, el cual a su vez depende del coeficiente de reparto del principio activo. Sin embargo, no es el coeficiente de reparto una de las propiedades que permite la clasificación del fármaco, porque en términos generales, la permeabilidad refleja mejor el comportamiento *in vivo* ya que esta considera, además del coeficiente de reparto, al coeficiente de difusión y al espesor de la membrana (Guerra P, 2005).

La estimación de la permeabilidad a través del epitelio intestinal es una herramienta valiosa para determinar los factores que limitan el potencial de absorción y la biodisponibilidad, la cual está íntimamente relacionada con la estructura molecular del fármaco, las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana celular. Los niveles de complejidad para estos estudios son variados; en general, los métodos utilizados se dividen en biológicos (técnicas que

emplean órganos y tejidos aislados y cultivos celulares) y no biológicos (técnicas computacionales basados en parámetros fisicoquímicos) (Mahajan y col., 2012).

2.3. Sistema de clasificación biofarmaceutica (SCB)

El SCB es un marco científico para clasificar un fármaco considerando su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal y en combinación con la disolución del medicamento, considera los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida de un principio activo, a partir de formas farmacéuticas sólidas de administración oral (Guerra P, 2005). Para entender el papel que desempeña cada una de estas propiedades en el proceso de absorción y con objeto de desarrollar un modelo cuantitativo y predictivo de dicho proceso, a continuación, se presenta la fundamentación relacionada con este tema.

La biodisponibilidad sistémica de un fármaco depende de la fracción absorbida y del metabolismo intestinal o hepático que pueda darse (Liu Y y col., 2010; Reynoso M, 2003). Esta fracción absorbida corresponde a la cantidad de fármaco que pasa del lumen intestinal al torrente sanguíneo y que puede ser obtenida a partir de las concentraciones plasmáticas por diferentes métodos matemáticos como los de Wagner-Nelson, Loo-Riegelman y de deconvolución (Reynoso M, 2003) o estimadas a partir de valores de permeabilidad (Stavchansky S, 2006; Velicky M y col., 2011). Este paso del fármaco del sitio de administración a la sangre involucra su absorción, definida a su vez por los procesos de disolución y permeación de este. Existen muchos factores del TGI que limitan tanto la velocidad de disolución de un fármaco como su velocidad de permeación. Esto es especialmente crítico para fármacos poco solubles en agua, para los cuales la solubilidad puede verse influida por variables como el volumen de los fluidos gastrointestinales, el pH y la presencia de sales biliares y alimentos. Incluso el vaciado gástrico y el tránsito gastrointestinal son aspectos importantes que se han de considerar al hablar de la absorción de fármacos (Reynoso M, 2003; Stavchansky S, 2006; Velicky M y col., 2011).

De acuerdo con el SCB, los fármacos se pueden clasificar en cuatro categorías, basados en su solubilidad y permeabilidad, como se presenta en la Tabla 2 (Parrott N y Lave T, 2008; Amidon y col., 1995).

Tabla 2. Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB.

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Según sea la solubilidad o la permeabilidad del fármaco el factor limitante, se define cuál de ellas determina el proceso de absorción, lo cual permite relacionar la clasificación del fármaco con la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro-in vivo* (CIVIV) (Amidon y col., 1995; Katneni K y col., 2006).

Al momento de realizar la clasificación se deben conocer los límites a los que se hace referencia en cada uno de los casos, tanto para la solubilidad como para la permeabilidad y que se encuentran establecidos en las guías de la FDA y en el anexo 7 del informe 40 de la OMS (WHO, 2006):

- Solubilidad: se considera de alta solubilidad, cuando el fármaco en su mayor dosis (recomendada por la OMS o disponible en el mercado como forma sólida oral) es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1,2 - 7,5, según la FDA y de 1,2 - 6,8, según la OMS.
- Permeabilidad: se clasifica como altamente permeable, si la cantidad absorbida en humanos es mayor al 85%, según la OMS y 90%, según la FDA.

Es posible determinar la solubilidad por el método clásico (Avdeef A, 2003; Chitneni M y col., 2011) en el rango de pH establecido y a la temperatura de 37 °C. La permeabilidad se puede conocer a partir de la fracción absorbida, obtenida mediante parámetros farmacocinéticos *in vivo* en humanos, mediante estudios de perfusión en humanos o en animales (*in situ* o *ex vivo*) (Abrahamsson B. y Lennernas, 2003; Avdeef A, 2003; Baena y col., 2004) y evaluándola en cultivos celulares (Caco-2) (Artursson P y col., 2001), en membranas artificiales (Corti G y col., 2006; Kansy M y col., 1998) o mediante predicción *in silico* (Bermejo M y Amidon G. L., 2003; Mälkiä A y col., 2004). Los últimos dos métodos son objeto de varias investigaciones en los últimos años para evaluar su posible empleo futuro como métodos predictivos, por lo que aún se encuentran en fase de estudio.

Una vez clasificado el fármaco de acuerdo con estas propiedades, se evalúa la posibilidad de emplear los estudios de disolución *in vitro* como predictores del comportamiento *in vivo* del medicamento, siempre y cuando se puedan establecer las correlaciones requeridas, lo cual se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Correlaciones *in vitro-in vivo* esperada para productos de liberación inmediata, sobre la base de la clasificación biofarmacéutica (Amidon y col., 1995).

Clase	Correlación CIVIV esperada
I	CIVIV si la velocidad de disolución es menor que la velocidad de vaciamiento gástrico. De lo contrario la correlación es limitada* o puede no existir.
II	Se espera CIVIV si la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la velocidad <i>in vivo</i> , exceptuando los casos en que la dosis sea muy elevada.
III	La absorción (permeabilidad) es el paso determinante y la CIVIV limitada* o no por la etapa de disolución.
IV	La CIVIV es limitada*, o simplemente puede no existir.

* Una correlación limitada significa que la velocidad de disolución, mientras no esté controlada, puede ser similar a la velocidad de absorción y el grado de la correlación dependerá de las velocidades relativas.

Solamente cuando el proceso de absorción está limitado por la velocidad de disolución se pueden obtener correlaciones *in vitro-in vivo*. El objetivo final del SCB es tener la posibilidad de utilizar estas correlaciones para predecir el comportamiento de medicamentos de liberación inmediata de administración peroral (Abrahamsson B y Lennernas, 2003; Polli J. E. y col., 1996).

Con el fin de explicar la Tabla 2, es necesario aclarar los límites definidos para la disolución y los establecidos para la solubilidad, la permeabilidad y los tipos de CIVIV existentes.

- Medicamento de disolución muy rápida: se considera como tal, cuando no menos del 85% de la cantidad etiquetada del fármaco se ha disuelto en 15 min, a pH 1,2, 4,5 y 6,8, en las condiciones establecidas (WHO, 2006).
- Medicamento de disolución rápida: se considera tal, si no menos del 85% de la cantidad etiquetada del fármaco se ha disuelto en 30 min, a pH 1,2, 4,5 y 6,8, en las condiciones establecidas (WHO, 2006).

Las CIVIV se definen como un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una característica *in vitro* de la forma de dosificación y una variable respuesta *in vivo*. La

característica *in vitro* más utilizada es la fracción disuelta (F_d) a un determinado tiempo y la variable respuesta *in vivo* es la fracción absorbida (F_a) al mismo tiempo. Se han definido tres niveles diferentes de correlación: A, B y C (USP-NF, 2012; Sirisuth N. y Eddington N. D.).

Correlación nivel A; Representa una relación punto a punto entre la disolución *in vitro* y la fracción absorbida *in vivo* (F_a Vs. F_d). En general las correlaciones son lineales pero las no lineales, aunque menos habituales, también pueden ser apropiadas. Cualquiera que sea el método utilizado para establecer un nivel A, el modelo debe predecir los niveles plasmáticos a partir de los datos *in vitro*. Esta correlación es la que brinda más información en comparación con las demás y es la única posible de emplear para predecir el comportamiento de un fármaco *in vivo* a partir de los estudios de disolución *in vitro*.

Correlación nivel B; Utiliza la teoría de análisis de los momentos estadísticos. El tiempo medio de disolución *in vitro* (TMD) se compara, por ejemplo, con el tiempo medio de residencia *in vivo* (TMR). En este tipo de correlación, como en la de nivel A, se utilizan todos los datos, pero en este caso no se considera una correlación punto a punto. La correlación de nivel B no es única, porque diferentes curvas *in vivo* pueden producir valores similares de TMR.

Correlación nivel C; Establece la relación entre un parámetro de disolución *in vitro* y uno farmacocinético (ABC , C_{max} , T_{max}) para cada velocidad de disolución. Este tipo de correlación no refleja la forma completa de la curva plasmática.

Tanto las correlaciones de nivel B como las de nivel C se emplean en el campo de diseño de medicamentos como herramientas útiles para mejorar formulaciones.

La relación existente entre la clasificación dada al fármaco y la posibilidad de tener CIVIV se explica de la siguiente manera para cada caso (Amidon y col., 1995):

Clase I. Fármacos de alta solubilidad y alta permeabilidad; En este caso el principio activo se absorbe bien y el paso limitante de la velocidad de absorción es la velocidad de disolución o el vaciamiento gástrico, si la disolución es muy rápida. Controlando la velocidad de disolución es posible obtener CIVIV de nivel A. Para formas farmacéuticas de liberación inmediata que se disuelven muy rápidamente, la velocidad de absorción estará controlada por la velocidad del vaciamiento gástrico y en este caso no se espera que se presente correlación con la velocidad de disolución.

Clase II. Fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad; En esta clase la velocidad de absorción es mayor que la de disolución y es ésta la que controla la velocidad de absorción in vivo (con excepción de medicamentos con dosis muy elevadas). Para este grupo de fármacos, la absorción normalmente es más baja que para los de la clase I. Ya que los cambios de los contenidos luminales y de las membranas a lo largo del intestino y a que mayor porción de éste se encuentra expuesto al fármaco, el perfil de disolución determina el perfil de concentración a lo largo del intestino, durante un tiempo mucho mayor. Por tanto, el proceso de absorción ocurre durante un tiempo más prolongado. Los perfiles obtenidos son más dependientes del tipo de formulación que se tenga y de las condiciones in vivo, por lo que estos factores son incidentes a la hora de obtener una buena correlación. Para los medicamentos con esta clase de fármacos es posible obtener CIVIV lineales de nivel A, con medios biorrelevantes.

Clase III. Fármacos de alta solubilidad y baja permeabilidad; Para este tipo de principios activos, la permeabilidad es el paso limitante de la absorción. En este caso, tanto la velocidad como la cantidad absorbida del fármaco pueden ser muy variables, pero si la disolución es rápida esta fluctuación se deberá a la variabilidad en el TGI, los contenidos luminales y a la permeabilidad de la membrana, más que a factores dependientes de la forma farmacéutica. Es posible obtener CIVIV, según la velocidad de disolución.

Clase IV. Fármacos de baja solubilidad y baja permeabilidad; Los principios activos pertenecientes a esta clase presentan problemas significativos para una liberación oral efectiva. Difícilmente se pueden obtener CIVIV.

Considerando lo explicado, finalmente es importante definir cuándo un fármaco formulado en una forma farmacéutica de liberación inmediata, de administración peroral, puede ser eximido de los estudios in vivo (bioexención). Esto es deseable, por ejemplo, cuando se quiere establecer una bioequivalencia o cuando se quiere demostrar que algún cambio realizado a la formulación o al proceso de manufactura no tiene marcada incidencia en la biodisponibilidad, evaluada inicialmente in vivo (Lindenberg M. y col., 2004).

Al clasificar un fármaco en el SCB, se tiene la posibilidad de acceder a una bioexención, de acuerdo con su clasificación. Actualmente, según lo establecido en el anexo 7 del informe 40 de la OMS, se puede solicitar bioexención en los siguientes casos (WHO, 2006):

- Fármacos clasificados en la categoría 1.
- Fármacos clasificados en la categoría 2: para aquellos que son ácidos débiles, que requieran 250 mL o menos para disolver la dosis a pH 6,8, el medicamento debe ser de disolución rápida y los perfiles de disolución entre el comparador y el comparado, muy similares en el intervalo de pH establecido.
- Fármacos clasificados en la categoría 3, siempre y cuando la velocidad de disolución del medicamento (tanto el comparado como el comparador) sea muy rápida.

En el inicio del SCB solamente podían ser eximidos de estudios *in vivo* los fármacos incluidos en la clase 1 (Lindenberg M. y col., 2004). Hoy día, después de numerosas discusiones científicas y publicaciones realizadas respecto al tema (Polli J. E. y col., 2004), la bioexención se ha ampliado a las categorías explicadas anteriormente.

2.4. Clortalidona

Como modelos de evaluación se considera a el fármaco CH una bencenosulfonamida que tautomeriza a una forma benzofenona y es considerado un agente antihipertensivo y diurético clasificado como de baja solubilidad (120 mg/L a 20 °C) y baja permeabilidad por lo que pertenece a la clase IV del SCB. Dentro de sus características principales, comportamiento de fusión, aproximadamente a 239 °C, con descomposición (vira a naranja) y desprendimiento de gas, absorbe a la luz ultravioleta UV a 220 nm, pKa 9.4 y fórmula química $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$ por lo que se considera una molécula orgánica ácida de peso molecular 338.762, en la actualidad se dosifica en Tabletas orales de 15, 25, 50 y 100 mg.

2.5. Alternativas en la formulación de fármacos

El objetivo principal de los estudios de formulación es proporcionar la información para poder desarrollar formas de dosificación seguras, eficaces y estables, con la finalidad de obtener una alta biodisponibilidad, es decir la eficacia comprobada *in vivo* o bien disponibilidad o eficacia *in vitro*.

Dentro de las principales propiedades a considerar dentro de la formulación, es necesario establecer la relación entre las propiedades farmacológicas del fármaco antes y después del diseño de la forma farmacéutica, así como antes y después de la formulación

considerando el efecto biológico para ello es necesario conocer las propiedades físicoquímicas del fármaco en estudio.

La disposición externa que se da a la formulación puede estar formada por una o más sustancias medicamentosas, excipientes y aditivos para facilitar la administración, aunque en algunos casos servirá para modificar la acción, esto se consigue modificando la estructura del fármaco, al no tener una acción totalmente definida no se pueden excluir los efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo. La forma de dosificación también conocida como forma de aplicación, forma farmacéutica, forma medicamentosa o forma de administración puede ser de tres maneras:

- Vía oral: Sólidos: cápsulas, comprimidos, gránulos, granulados, microcápsulas.
 Líquidos: jarabes, gotas orales, pociones, emulsiones, suspensiones, soluciones, inyectables bebibles.
- Vía parenteral: Inyectables: intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa.
- Otras vías: Piel y mucosas: cremas, pomadas, ungüentos, supositorios, óvulos, comprimidos ginecológicos, colirios, aerosoles.

Interesa en primer lugar conocer las características físicoquímicas del fármaco y de todos los componentes de la formulación, el fármaco indicará la pauta para el resto de los componentes de la formulación. El fármaco y los excipientes son los componentes principales mientras que los aditivos serán secundarios. El excipiente será el encargado de dar la forma farmacéutica. Es importante conocer los datos farmacocinéticos obtenidos a partir de ensayos en fase preclínica y clínica. De la administración en animales, se detectarán problemas de biodisponibilidad del medicamento y de absorción en la forma farmacéutica elegida. En ocasiones, la absorción de una forma sólida es menor que la líquida, quizá no en magnitud sino en tiempo ya que la forma sólida debe disgregarse previamente, mientras que la líquida se solubiliza mayoritariamente en el fluido biológico. Para alcanzar la máxima biodisponibilidad, es necesario determinar previamente las propiedades del fármaco, como: Propiedades físicoquímicas, descripción del medicamento, estructura química: sal, ácido, base, punto de fusión, pureza, grupo terapéutico al que pertenece, técnicas analíticas para identidad, disolución, contenido, uniformidad, adecuadas para el estudio del medicamento, bibliografía sobre el fármaco, entre otros.

Por lo que es necesario plantear inicialmente la caracterización del fármaco que debe ser convertido en medicamento, desarrollar preceptivos estudios de formulación, diseñar formulaciones base a partir de las cuales se pueda definir una formulación final, establecer la tecnología de fabricación óptima y los controles en proceso a efectuar para asegurar la calidad del producto, validar dicha tecnología, establecer controles de producto terminado con sus correspondientes especificaciones y, finalmente desarrollar estudios de estabilidad del medicamento que den a conocer el período de caducidad del mismo.

Así, un tema de investigación en curso es el desarrollo de recubrimientos protectores para aislar y proteger fármacos contra ambientes nocivos que pueden causar su degradación, con la finalidad de mantener sus características fisicoquímicas, estabilidad y funcionalidad. Existen diversas técnicas que proporcionan recubrimientos protectores a compuestos bioactivos, sin embargo dos de ellas satisfacen las necesidades del presente trabajo, las cuales son: obtención de microcápsulas por SDE (Rodríguez-Huezo y col., 2004) a partir de la formación de emulsiones dobles del tipo agua/aceite/agua ($W_1/O/W_2$) (Carrillo-Navas y col., 2012; Pimentel-González y col., 2009) y la granulación por fusión apoyado de procesos de recubrimiento (Shitara y Sugiyama, 2006; Varma y col., 2011).

2.6. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica con una fuerte implantación en diversos ámbitos industriales, como el farmacéutico y alimentario, es una tecnología emergente en el desarrollo de polifármacos, cuya introducción total supondrá la apertura de nuevas oportunidades para la obtención de nuevos tratamientos con amplias posibilidades funcionales (Hu y col., 2006).

Una microcápsula posee una estructura morfológica relativamente simple, está compuesta por dos elementos claramente diferenciados, el núcleo activo y un delgado armazón polimérico que envuelve al primero (Fredenberg y col., 2011; Ré, 2006) con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de reacciones con otros compuestos y para incrementar su estabilidad a condiciones ambientales (Fu y col., 2011). Pero, el proceso de obtención es un procedimiento complejo por el cual ciertas sustancias activas (olores, aceites, aromas, fármacos, bactericidas, etc.) son introducidas en una matriz o sistema barrera de naturaleza polimérica que no sólo brinde protección, sino que además provea una liberación inmediata o gradual de estos agentes activos en función de los requerimientos concretos de aplicación (Lim y col., 2010; Swarbrick, 2007).

El núcleo de las microcápsulas puede estar compuesto por sustancias de naturaleza tanto líquida como sólida. En el primer caso se trata de una pequeña gota que contiene a un agente activo de naturaleza soluble. Por otra parte, si el agente es insoluble el núcleo está compuesto por una suspensión, emulsión o dispersión del dicho núcleo en el líquido portador. Ambos sistemas pueden modificarse o formularse en función del uso al que vaya a ser destinada (Siwale y col., 2009).

Los materiales formadores de pared para el núcleo pueden ser tanto de origen natural como sintético, el tipo de material tendrá influencia en la estabilidad, tamaño de partícula, propiedades de flujo y en la vida útil de las microcápsulas (Rodríguez-Huezo y col., 2004) y presentan la ventaja que de acuerdo a una selección específica pueden controlar las propiedades organolépticas eliminando la adición de saborizantes, así como reducir volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementando la estabilidad de los productos microencapsulados bajo condiciones ambientales adversas (Favaro y col., 2010).

En una primera fase, el material de pared se presenta en estado líquido por efecto de haber sido sometido a una fusión o disolución en un disolvente. Por su parte, la sustancia a encapsular se encuentra en este momento en forma de pequeñas partículas (en el caso de agentes de naturaleza sólida) o gotas (en caso de líquido) en el medio apropiado, que puede estar en fase líquida o gaseosa, atendiendo a las propiedades del agente a encapsular (Lim y col., 2010). En una fase posterior y por diversas técnicas, el material de pared se deposita sobre la sustancia a encapsular y en algunos casos finalmente se produce la solidificación.

Para la formación de las microcápsulas existen diferentes técnicas tanto físicas como químicas (Tabla 4), pero siempre el resultado final es una suspensión de microcápsulas con tamaños que oscilan entre uno a varios cientos de micrómetros (Lim y col., 2010; Wang y col., 2009). El proceso de microencapsulación depende de diversos factores y a pesar de existir varios métodos, el principio básicamente se fundamenta en la deposición por etapas del material de pared sobre el agente a ser encapsulado (Murua y col., 2008; Rabanel y col., 2009; Van-Zanten y De-Vos, 2010).

En general estas técnicas pueden ser agrupadas atendiendo a su naturaleza, en tres grupos, a continuación, se enuncian las técnicas más representativas de cada uno: (McClements, 2007; Swarbrick, 2007).

Tabla 4. Técnicas de microencapsulación

Procesos físicos	Procesos químicos	Procesos físico-químicos
Secado por aspersión	Coacervación simple	Polimerización interfacial
Extrusión	Coacervación compleja	Inclusión molecular
Recubrimiento por aspersión	Atrapamiento en liposomas	

En el caso de fármacos, el secado por aspersión y la granulación por fusión han sido desarrollados y utilizados con éxito en la industria (Borini y col., 2009; Sollohub y Cal, 2010; Vajna y col., 2009).

2.6.1. Materiales de pared utilizados en microencapsulación

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la selección de una matriz de encapsulación adecuada. Ver Tabla 5 (Wang y col., 2009).

Tabla 5. Materiales de pared utilizados en microencapsulación.

Tipo de material	Cobertura específica
Gomas	Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábiga.
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz.
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa.
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina.
Proteínas	Gelatina, gluten, caseína, albúmina.
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos.
Grasas	Cera de carnauba, alcohol estearílico.
Polímeros naturales	Polisacáridos animales y vegetales, dextrano, quitosano.
Semisintéticos	Derivados celulósicos, acetobutirato de celulosa (insolubles en agua), acetofalato de celulosa (soluble en función pH).
Sintéticos	Derivados acrílicos (solubilidad en función del pH), Poliésteres: poliláctico, polilácticoglicólico (biodegradables).

Estos materiales de pared no son tóxicos y se degradan bajo condiciones fisiológicas normales (Borini y col., 2009; Hu y col., 2006; Siwale y col., 2009; Swarbrick, 2007). Como materiales de pared utilizados para microencapsulación, podemos citar al alcohol polivinílico (polímero hidrofílico) (Leiman y col., 2009), también membranas de nylon han sido utilizadas para encapsular y atrapar enzimas como: la pepsina, pectina esterasa, invertasa para la inversión de sacarosa. Otro agente utilizado en la microencapsulación es el quitosano, su uso es bastante amplio en la industria, se destaca como antioxidante, antimicrobiano, recuperador de proteínas solubles, cubiertas (Marcuzzo y col., 2010).

Los copolímeros de esteres acrílicos (Eudragit) son un grupo de polímeros derivados del ácido metacrílico que están disponibles en diferentes formas iónicas. Son altamente solubles debido a su valor de pH alcalino y por la neutralización de los grupos carboxilo con la respectiva formación de la sal y por lo tanto, exhibiendo el carácter de polielectrolito aniónico en solución. Diferentes tipos de Eudragit se han utilizado en la elaboración de micropartículas, permitiendo la liberación de principios activos a nivel intestinal, evitando la inactivación de fármacos en el estómago, por ejemplo, en la preparación de micropartículas que permiten la administración oral de péptidos y proteínas (Villamizar y Martínez, 2008).

Lípidos: dentro de los principales agentes encapsulantes de carácter lipídico están: grasa láctea, lecitinas, ceras, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, parafinas, aceites hidrogenados como el aceite de palma, algodón y soya; son excelentes formadores de películas capaces de cubrir las partículas individuales, proporcionando una encapsulación uniforme (Yañez y col., 2002).

Carbohidratos: son extensivamente empleados en la encapsulación, se utiliza la técnica de secado por aspersión como soporte de encapsulamiento, dentro de este amplio grupo se encuentran los almidones, maltodextrinas y gomas (Madene y col., 2006; Murua y col., 2009).

Almidón: almidones basados en ingredientes (almidones modificados, maltodextrinas, β -ciclodextrinas) son muy utilizados (Madene y col., 2006; Murua y col., 2009); dentro de los almidones más importantes se destacan el de papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), tapioca (*Manihot esculenta*) (Fuchs y col., 2006; Yañez y col., 2002) e inulina (Sáenz y col., 2009).

Maltodextrinas: se elaboran por métodos de hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. En la selección de materiales de pared para encapsular, la maltodextrina es una buena solución entre el costo y la efectividad; tiene baja viscosidad a alta proporción de sólidos, son inodoras, incoloras y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original, está disponible en diferentes pesos moleculares y son extensivamente utilizados en la industria (Madene y col., 2006; Sáenz y col., 2009).

Gomas: son generalmente insípidas, pero pueden tener un efecto pronunciado en el gusto y sabor de moléculas con problemas organolépticos, son solubles, de baja viscosidad, poseen características de emulsificación y es muy versátil para la mayoría de los métodos de encapsulación (Madene y col., 2006; Murua y col., 2009). Como ejemplos se tienen goma de algarrobo, guar, goma de tamarindo, goma gelana y xantana (Morkhade y Joshi, 2007); una aplicabilidad ha sido en inmovilización de células bacterianas, para lo cual se han utilizado alginatos y carragenina (McMaster y col., 2005). Mezclas de goma arábica y maltodextrinas también han mostrado promesa como transportadores de sólidos, proporcionando viscosidad por ejemplo en la microencapsulación de aceite de cardamomo por secado por aspersión (Madene y col., 2006; McMaster y col., 2005).

Los alginatos han sido empleados como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes coloidales en la industria y gracias a sus propiedades, también se han podido aplicar en la contención y liberación de fármacos y microorganismos. Estas propiedades son (Das y Maurya, 2009):

- a). Permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente.
- b). No requerir solventes orgánicos tóxicos
- c). Elevado grado de porosidad
- d). Permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas y la posibilidad de controlar dicha difusión.
- e). Disolución y degradación bajo condiciones fisiológicas normales.

Proteínas: alimentos hidocoloides son ampliamente utilizados como microencapsulantes, por ejemplo: proteínas alimenticias como caseinato de sodio, proteína de lactosuero, aislados de proteína de soya (Madene y col., 2006; Murua y col., 2009), ceras

(Fuchs y col., 2006), gluten, gredina (Yañez y col., 2002), caseína, soya, trigo (Sáenz y col., 2009) y gelatina (Kwak y col., 2001), este último utilizado por sus buenas propiedades de emulsificación, formación de películas, solubilidad de agua y biodegradabilidad (Favaro y col., 2010).

Antioxidantes: vitaminas liposolubles (por ejemplo, vitamina A, D, E, K y carotenos) y vitaminas hidrosolubles como vitamina C pueden ser encapsuladas utilizando varias tecnologías. Para la encapsulación de vitamina C, la aspersion por enfriamiento, por congelamiento o recubrimiento de lecho frío, pueden ser utilizada, para posteriormente ser añadida a sólidos (Schrooyen y col., 2001).

2.6.2. Emulsiones

Las emulsiones son sistemas dispersos, termodinámicamente inestables, de un líquido (fase interna o dispersa) dentro de otro (fase externa o continua), ambos líquidos mutuamente inmiscibles (Becher, 2001). La fase dispersa está presente en forma de gotas pequeñas suspendidas en una fase continua. Dependiendo del proceso de emulsificación, el diámetro de la gota puede variar entre 0.1 μm y 0.1 mm (McClements, 2007). El comportamiento de las emulsiones está determinado por las tres fases existentes en el sistema: la fase oleosa, la fase acuosa y la interface. La fase oleosa puede ser parcial o totalmente cristalizada dependiendo de la temperatura. La fase acuosa puede contener iones, biomoléculas tales como polisacáridos y/o proteínas, polímeros biodegradables, etc., las cuales pueden tener un efecto estabilizante o desestabilizante. La interfase puede estar constituida de proteínas o de pequeños emulsificantes como monoglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos o alguna mezcla de ellos (Dickinson, 2009; Garti, 1997). Aunque las emulsiones se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, se pueden convertir en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensoactivos o emulsionantes que tienen la capacidad de adsorción en la superficie de las gotas (Huang y col., 2001).

Existen dos tipos importantes de emulsiones, simples y dobles, las cuales son ampliamente usadas tanto en preparaciones farmacéuticas, cosméticos, alimentos, entre otros (McClements, 2005) ver Figura 2 y 3.

Las emulsiones simples se clasifican en dos tipos: 1) Emulsión aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés: oil-in-water) en este tipo de emulsión las gotas de aceite son dispersadas en una fase acuosa continua. Estas emulsiones son las más versátiles y se pueden encontrar en diversos tipos de medicamentos (cremas ligeras, shampoo, productos dermatológicos, antibióticos, etc.) (McClements, 2005). 2) En las emulsiones agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés: water-in-oil) las gotas pequeñas de la fase dispersa son de agua y la fase continua son de aceite, algunos ejemplos característicos de medicamentos elaborados con este tipo de emulsiones son vacunas, vitaminas, cremas, pomadas y en general, todos los productos untables elaborados a base de grasas (Becher, 2001).

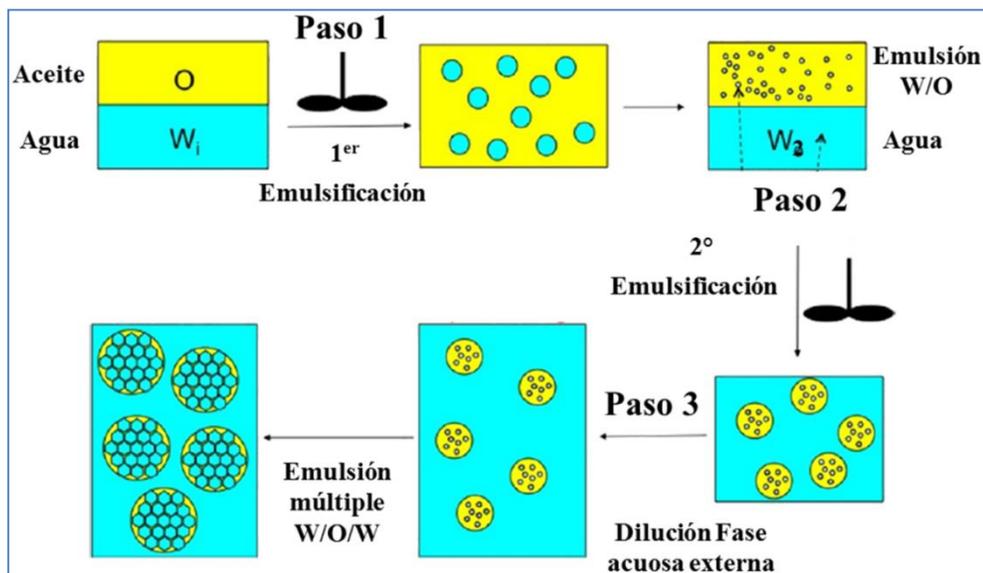


Figura 2. Preparación en dos pasos de una emulsión doble del tipo $W_1/O/W_2$ (Jiménez-Alvarado y col., 2009).

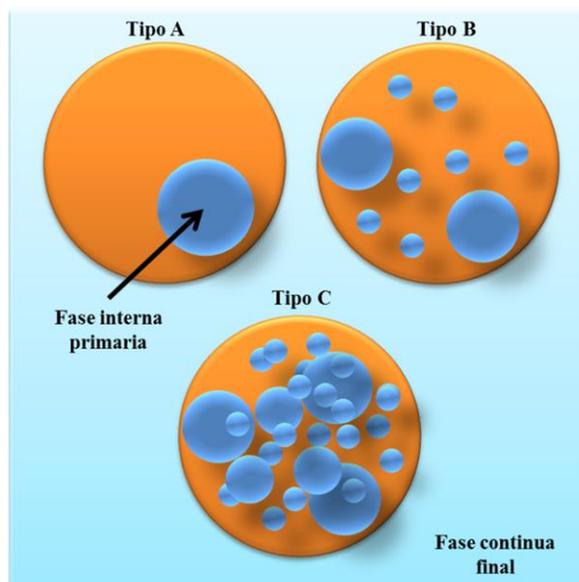


Figura 3. Diagrama de clasificación de las emulsiones dobles (Garti y Bisperink, 1998)

El tipo de emulsiones que se tiende a formar depende del balance entre las propiedades hidrofílicas e hidrofobas del agente emulsionante. Generalmente, se suele cumplir la regla de Bancroft: la fase continua es aquella que solubiliza al agente emulsionante (Garti, 1997).

Las emulsiones dobles (Figura 3) son también llamadas emulsiones múltiples o emulsión de emulsiones, en las cuales las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas mismas pequeñas gotas dispersas (Lobato-Calleros y col., 2006). Cada glóbulo en la emulsión múltiple está separado de la fase acuosa por una capa de la fase oleosa. Las emulsiones se clasifican como: emulsión agua en aceite en agua (W/O/W, por sus siglas en inglés: water-in-oil-in-water), en la cual una emulsión W/O es dispersada en forma de gotas dentro de una fase acuosa y como emulsión aceite en agua en aceite (O/W/O, por sus siglas en inglés: oil-in-water-in-oil), en la cual una emulsión O/W es dispersada en una fase oleosa (Vlaia y col., 2009). Debido a que la fase interna y externa de las emulsiones múltiples están separadas por una capa líquida inmiscible, son conocidas también como “membranas líquidas”. Las emulsiones W/O/W son las más comunes, pero para algunas aplicaciones específicas las emulsiones $O_1/W/O_2$ también pueden ser preparadas (Pérez-Orozco y col., 2011). (Figura 2).

En la mayoría de los casos las emulsiones dobles son preparadas en dos pasos, como se muestra en la Figura 2, utilizando dos tensoactivos; uno hidrofóbico designado para

estabilizar la interface de la emulsión interna W/O y uno hidrofílico para la interface interna de los glóbulos de grasa para una emulsión $W_1/O/W_2$. La emulsión primaria W/O es preparada dentro de condiciones de homogenización a altas velocidades de cizalla para la obtención de gotas pequeñas, mientras que la emulsión secundaria es llevada a cabo bajo condiciones de menor velocidad de homogenización para evitar la ruptura de las gotas internas. El tamaño de gota de una emulsión doble puede variar entre 10 a 50 μm (Garti y Bisperink, 1998).

Las emulsiones dobles pueden tener numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, debido a la capacidad que presentan para encapsular, proteger y liberar gradualmente compuestos activos, lábiles y volátiles. (Jiménez-Alvarado y col., 2009; Rodríguez-Huezo y col., 2004).

Las emulsiones dobles se caracterizan por tener fases acuosas interna y externa químicamente similares y una fase intermedia de lípidos inmisible, que separa en dos las fases acuosas (Rodríguez-Huezo y col., 2004) y presentan muchas posibilidades interesantes para la liberación controlada de fármacos a dosis bajas inicialmente atrapado en las gotas internas (Leal-Calderón y col., 2007 cita no incluida en las referencias). El área principal de aplicación es en el campo de los productos farmacéuticos humanos de compuestos solubles y sensibles al agua, tales como proteínas, péptidos, vacunas, u otras macromoléculas (Kissel y col., 2005), también han sido propuestas como posibles formulaciones para mejorar la biodisponibilidad oral de los fármacos poco absorbibles (Qi y col., 2011) y para controlar los perfiles de difusión de medicamentos a través de membranas sintéticas en la fase acuosa externa (W_2) hechas por macromoléculas hidrófilas (polisacáridos, proteínas, o mezclas de ambos) (Pulido y Beristain, 2010; Vlaia y col., 2009).

Las emulsiones múltiples se clasifican como tipo A, B y C. Esta clasificación es de acuerdo con la distribución y tamaño de gota presentes dentro de la emulsión. Como se representa en la Figura 3, las emulsiones múltiples de tipo A contienen una sola gota grande dentro de la fase interna, mientras que, las del tipo B contienen algunas gotas en la fase interna y en las de tipo C su fase interna contiene una gran cantidad de gotas (Garti y Bisperink, 1998).

2.6.3. Emulsionantes

La gran tensión interfacial entre el agua y el aceite junto con una gran área interfacial implica que la emulsión tiene una energía de Gibbs alta en comparación con la de las fases por separado. La adición de un agente emulsionante disminuye de forma considerable la tensión interfacial. De este modo puede disminuirse el requerimiento de energía de Gibbs para la formación de la emulsión. La tensión interfacial disminuye debido a la adsorción en la interface del agente emulsionante, con el extremo polar en el agua y el extremo hidrocarbonado en el aceite.

Los emulsionantes son compuestos anfipáticos, estas moléculas están constituidas por dos partes de naturaleza opuesta, hidrofílica (polar) e hidrofóbica (no polar). La parte polar o hidrófila es la que lleva la carga positiva o negativa y esta parte define al agente emulsionante como catiónico o aniónico. Los agentes tensoactivos sin carga iónica son conocidos como no iónicos (McClements, 2005). Cada material puede tener su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Los valores del HLB están asociados con la solubilidad que tiene el emulsionante, a valores menores de 8 es soluble en aceite, por otra parte, a valores de 10 ó más grandes es soluble en agua. Como una regla general, los emulsionantes de bajo y alto HLB son usados para formar emulsiones de tipo W/O y O/W, respectivamente (Becher, 2001). En la Figura 4 se muestra la estructura característica de un agente emulsionante.

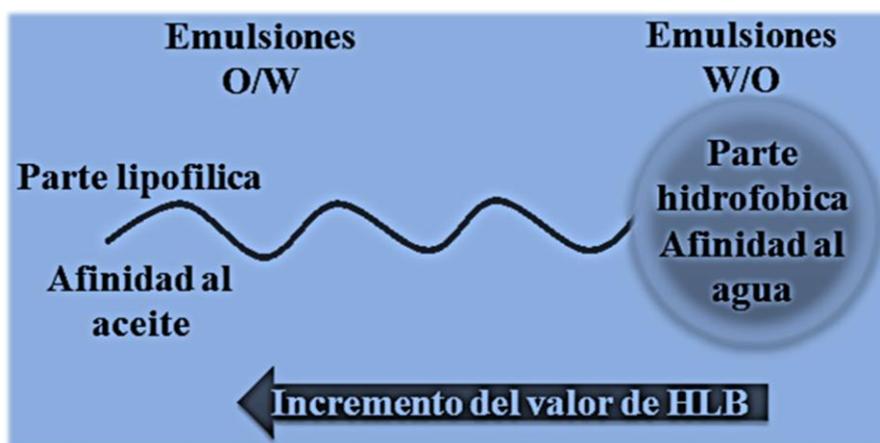


Figura 4. Estructura típica de un emulsionante (Becher, 2001).

2.6.4. Biopolímeros como agentes emulsionantes

Los biopolímeros, proteínas y polisacáridos, juegan un papel importante como emulsionantes macromoleculares en las emulsiones. Las propiedades funcionales de las proteínas y los polisacáridos están determinadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones. Las proteínas y los polisacáridos son ampliamente usados en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. Existen varios estudios reportados en la literatura sobre emulsiones estabilizadas con polisacáridos como pectina, goma arábica, entre otros (Garti y Reichman, 1993; Huang y col., 2001). Las proteínas derivadas de la leche y el huevo son las más comúnmente usadas como agentes emulsionantes (Dickinson, 2009). Las proteínas pueden ser superficies activas debido a la existencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en su estructura tales como el triptófano, la fenilalanina, leucina e isoleucina. Los grupos hidrofóbicos de las superficies de las proteínas penetran dentro de la gota de aceite, mientras que la porción hidrofílica de la cadena se extiende dentro de la fase acuosa.

La carga de las proteínas puede estabilizar las emulsiones debido a la repulsión entre las gotas cargadas, mientras que las proteínas pueden estabilizar a las emulsiones O/W, por otra parte, desestabilizan a las de tipo W/O, causando una inversión de la emulsión.

Las proteínas y los polisacáridos forman complejos electrostáticos dentro de condiciones donde pueden tener cargas eléctricas opuestas. Las cargas eléctricas en las moléculas de proteínas cambian de carga positiva a negativa cuando el pH del medio es alterado por abajo y encima de su punto isoeléctrico.

2.6.5. Mecanismos de inestabilidad en emulsiones

La concentración de surfactante requerida para la formación de una emulsión estable se determina en función del tamaño del glóbulo, su distribución unimodal y su permanencia en el tiempo. En años recientes, se ha demostrado que, altas concentraciones del emulsificante hidrofílico desestabilizan las emulsiones múltiples y altas concentraciones de emulsificante lipofílico estabilizan las emulsiones múltiples, debido al incremento de sus propiedades reológicas (Jager-Lezer y col., 1996; Jiao y Burgess, 2003; Wen y Papadopoulos, 2001).

La inestabilidad de las emulsiones múltiples se debe a la migración de los emulsificantes de bajo peso molecular de una interfase a otra. La obtención de emulsiones múltiples de mayor estabilidad se ha conseguido reemplazando el emulsificador hidrofílico de bajo peso molecular en la fase acuosa externa con emulsificantes biopoliméricos (Dickinson y McClements, 1996). Número o nombres, homogenizar

La incorporación de biopolímeros en la interfase externa, aumentada considerablemente la estabilidad de las emulsiones múltiples, debido a potenciales de repulsión estéricos y/o electrostático (Dickinson y McClements, 1996).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que el contacto entre las moléculas de agua y aceite no es favorable energéticamente, es decir, el estado de menor energía corresponde al sistema que presenta las dos fases separadas, sin embargo, es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables (metaestables) por un periodo razonable de tiempo (días, semanas, meses o años) mediante la incorporación de sustancias conocidas como agentes tensoactivos y/o emulsificantes (McClements, 2005).

Para una emulsión sencilla, los principales mecanismos de desestabilización son (Figura 5 y 6):

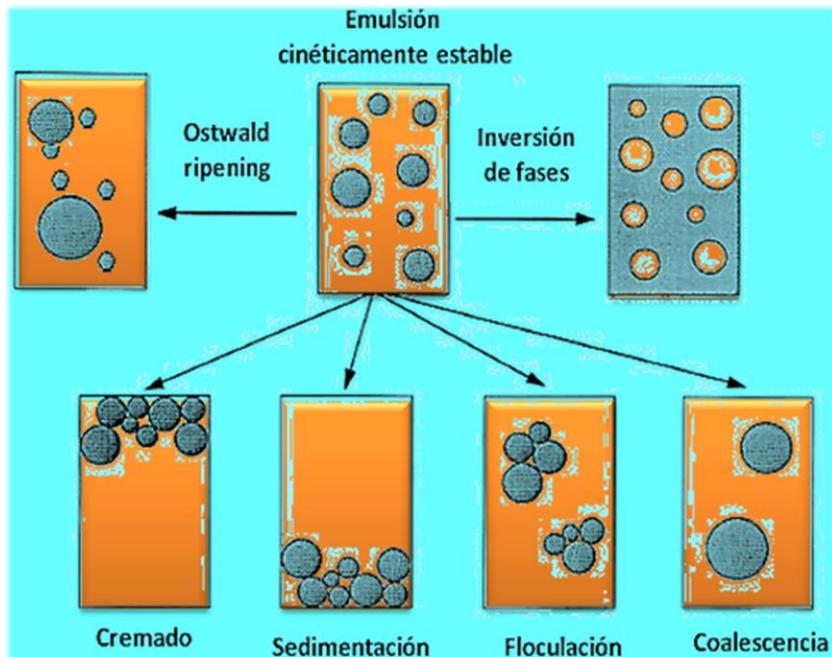


Figura 5. Mecanismos que favorecen a la inestabilidad de las emulsiones (McClements, 2005).

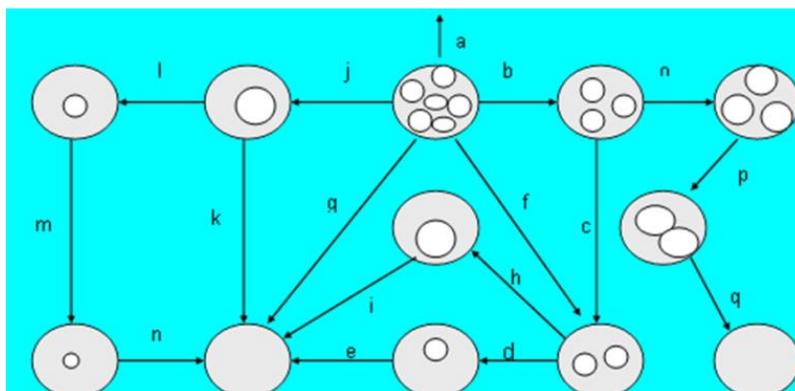


Figura 6. Representación global de los diferentes mecanismos de desestabilización de las emulsiones múltiples (McClements, 2005).

- a. La sedimentación y el cremado son dos formas de separaciones gravitatorias. El cremado describe el movimiento de las gotas hacia la parte superior del sistema, debido a que, la densidad de la fase dispersa es menor que la de la fase continua. Mientras que en la sedimentación ocurre un proceso inverso. En ninguna de estas situaciones, las gotas pierden su individualidad y el proceso es reversible.
- b. La floculación ocurre cuando dos o más glóbulos se agregan sin que éstos pierdan su individualidad y sin cambio en el diámetro promedio de los mismos, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano.
- c. La coalescencia es un proceso irreversible, que implica la unión de varias gotas para formar otras más grandes, lo que finalmente conduce a la separación de las fases. La coalescencia es descrita por un incremento lineal del logaritmo del radio promedio de glóbulo con el tiempo
- d. La inversión de fases es el proceso mediante el cual una emulsión W/O se convierte en una emulsión O/W, o viceversa. La inversión puede ser promovida por varios factores entre los cuales destacan la temperatura, cambios en la formulación del sistema y efectos de tipo mecánico, por mencionar algunos.

En una emulsión múltiple la variedad de mecanismos de desestabilización se incrementa, pues además de presentar los ya mencionados, existen otros que se esquematizan en la Figura 6.

En donde, por ejemplo, en el proceso (a) los glóbulos de la fase acuosa externa coalescen; el proceso (b-c-d-e) representa un mecanismo mediante el cual las gotas acuosas

internas son expulsadas de los glóbulos en forma individual y secuencial. También puede haber expulsiones simultáneas como los procesos (g) y (f). Pueden presentarse procesos donde dos o más glóbulos internos coalescen, como por ejemplo en (h), (j) y (p). Por otro lado, debido a la diferencia de presión osmótica entre la fase acuosa interna y externa, puede haber migración de agua de la fase interna a la externa, proceso (l-m-n), o viceversa, proceso (b-o-p-q), dependiendo la dirección del gradiente de presión. Además, pueden presentarse combinaciones de los mecanismos ya descritos (Florence y Whitehill, 1981). Número o nombres, homogenizar

El éxito de la formulación depende del bloqueo de cada una de estas rutas, por ejemplo: la selección adecuada de los emulsificantes (Rosano y col, 1981; Sajjadi y col, 2004), la reducción del tamaño de la emulsión interna, el incremento de la viscosidad de la fase acuosa interna (Rodríguez-Huezo y col., 2004; McClements, 2005) y la estabilización de las emulsiones interna y/o externa empleando materiales (biopolímeros) que formen películas fuertes y rígidas en la interface (Pérez-Alonso y col., 2003).

2.7. Secado por aspersión

El secado por aspersión (SD) constituye una técnica relativamente sencilla donde se convierten soluciones o dispersiones líquidas en polvo (Sollohub y Cal, 2010), en una etapa operacional continua, el cual puede ser utilizado directamente en la fabricación de diversas formas farmacéuticas. Consiste en lograr la disminución del contenido de humedad de un producto en un tiempo mínimo, de tal manera que no se produce deterioro. El producto es pulverizado por medio de un atomizador (presión, dos fluidos o centrífugo) y en forma simultánea entra en contacto con una corriente de aire caliente (medio convectivo); las partículas caen por gravedad y se secan en el trayecto de la cámara de secado donde posteriormente llegan al ciclón (se produce la separación del aire saturado con humedad y el producto seco) y se recolectan en forma de polvo (Pérez-Alonso y col., 2009; Souza y col., 2009).

Entre las características de este método está el producir partículas esféricas con un estrecho rango de distribución de tamaño y la versatilidad, ya que se puede trabajar con sustancias termosensibles por los bajos tiempos de residencia y el efecto refrigerante que se consigue a través de la evaporación y por último, su bajo costo (Sollohub y Cal, 2010).

Dependiendo de las propiedades físicas y químicas del material y del diseño y operación del secador, puede obtenerse un producto en polvo, en gránulos o en aglomerados (Sollohub y Cal, 2010). La velocidad de secado es crítica para la calidad y estabilidad del producto. Si es muy rápido puede generar partículas deformes, por el contrario, si es muy lento puede producir partículas húmedas (Collings y Schneider, 1970).

Esta velocidad está influenciada por varios factores como el caudal de alimentación (solución, suspensión, emulsión, etc.), presión de atomización, temperatura de entrada y temperatura de salida (Lobato-Calleros y col., 2008; McClements y col., 2007). Cada vez que se quiere emplear esta metodología es necesario estudiar cómo estos parámetros y la naturaleza del material a secar afectan las características de las partículas (porcentaje de humedad, forma y tamaño).

El secado por aspersión consiste en cuatro etapas principales: atomización del fluido para rociarlo, el contacto del producto con el aire, deshidratación y separación del producto seco. El material por encapsular es homogeneizado con el agente encapsulante, cuya mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco. Posteriormente, la mezcla se vierte en la cámara de secado que generalmente se encuentra en un intervalo de temperatura entre 120 y 270 °C para obtener de manera instantánea macropartículas con una distribución de tamaño de partícula entre 1 y 100 μm (Pérez-Alonso y col., 2009; Sollohub y Cal, 2010; Souza y col., 2009).

Una parte importante dentro del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión es la formulación de la emulsión, esta suele ser de naturaleza compleja y depende de las características requeridas del producto a obtener; para ello, se desarrollan emulsiones simples y/o dobles del tipo agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$) o aceite-agua-aceite ($O_1/W/O_2$) (Garti, 1997; Lobato-Calleros y col., 2008; McClements y col., 2007).

2.8. Métodos de liberación

Existe una amplia variedad de materiales que pueden ser usados para fase externa en encapsulación y en algunos casos se puede modificar el mecanismo de liberación de los fármacos ya sea por la concentración empleada y/o por la combinación sinérgica de estos, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones, gomas y proteínas.

Por otro lado, resulta de interés los nuevos sistemas poliméricos empleados en el recubrimiento de sólidos orales, los cuales permiten diseñar barreras contra cambios ambientales, modificar la liberación de fármacos, evitar interacciones y son maleables, estos ya se han empleado en la tecnología de microencapsulación con buenos resultados, tanto para liberación inmediata como para liberación modificada (Murua y col., 2008).

La liberación del contenido de microcápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la microcápsula o bien por medio de una membrana que recubra la pared (Shamma y col., 2011).

La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. Por todo esto, la selección de una matriz o membrana es importante, tiene también especial relevancia, la naturaleza química, morfológica, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación (Apu y col., 2009; Collings y Schneider, 1970).

Vistas las características de las diferentes técnicas de microencapsulación y conociendo las propiedades de nuestro material (PS), la elección del método de encapsulación depende de varios factores. En el caso de la encapsulación de fármacos son:

- a). Tamaño de partícula: El tamaño deseado oscila entre 100-900 μm , las microcápsulas mayores a 100 μm son detectables en la boca y las inferiores a 15 μm no dan la suficiente protección frente a los agentes externos.
- b). La técnica no debe emplear agentes externos agresivos que pudieran limitar la estabilidad de los fármacos.
- c). Se requerirá, además, un bajo consumo energético, de forma que los costos de la técnica sean rentables industrialmente (Hu y col., 2006; Sollohub y col., 2010).

De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, el secado por aspersión y la granulación por fusión, se perfilan como las mejores técnicas para la microencapsulación de

fármacos ya que son técnicas sencillas y económicas, que se puede emplear para producciones a gran escala. Los trabajos de diversos autores han demostrado que los fármacos microencapsulados con materiales de pared incrementan su estabilidad hasta en un 80-95%, frente a los no encapsulados.

2.9. Disolución

La disolución es un método para medir la liberación de un fármaco (Bai y col., 2011; Han y col., 2011), a partir de la forma farmacéutica que lo contiene y la disolución de éste, en el medio de prueba. En base a esta consideración, se utilizan las pruebas de disolución in vitro en formas farmacéuticas orales sólidas para:

- a). Evaluar la calidad de un producto farmacéutico lote a lote.
- b). Guiar el desarrollo de nuevas formulaciones.
- c). Asegurar la calidad y el rendimiento del producto después de ciertos cambios como en la formulación, el proceso y sitio de fabricación y el aumento en escala del proceso.

En un perfil de disolución se consideran diversos tiempos de muestreo, lo que permite establecer la velocidad de disolución. En estudios previos se demuestra que, si se obtienen similitudes al comparar las velocidades de disolución entre medicamentos, probablemente tendrán también una biodisponibilidad comparable (Bai y col., 2011; Han y col., 2011). De acuerdo con la “Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas” (Secretaría de Salud, 1998), se define un perfil de disolución como: “La determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica”. Las condiciones experimentales para realizar el perfil de disolución se encuentran establecidas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (Salud, 2008). Entre ellas se tiene:

- a). Seleccionarse por lo menos 5 tiempos de muestreo (excepto el tiempo cero) que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta.

Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión.

- b). Cuando el 85% del fármaco se disuelve en un tiempo menor o igual a 15 minutos, no es necesario caracterizar la curva ascendente, pero los tiempos de muestreo deben estar suficientemente espaciados a lo largo del perfil de disolución.
- c). Durante la realización del perfil de disolución, los muestreos deben realizarse dentro de los tiempos establecidos en el método de evaluación con una variación que no afecte los resultados de la prueba.
- d). Utilizar una curva de calibración de la sustancia de referencia para calcular por interpolación la concentración del fármaco disuelto.
- e). El volumen extraído puede o no remplazarse. Cuando no se sustituya el volumen, no se debe extraer más del 10% del medio de disolución. En cualquier caso, para el cálculo de porcentaje disuelto se debe considerar el volumen de la alícuota y la cantidad extraída en cada muestreo.
- f). El porcentaje disuelto debe calcularse con respecto a la dosis nominal del fármaco.
- g). Se deben reportar los porcentajes disueltos a cada tiempo de muestreo en cada unidad de dosificación, así como los porcentajes disueltos promedio, los coeficientes de variación y los valores máximo y mínimo.
- h). Se deben graficar los porcentajes disueltos promedio y los de cada unidad de dosificación contra el tiempo.

El factor de similitud f_2 es un valor puntual que proviene de un modelo matemático y permite relacionar a través de una transformación logarítmica la semejanza entre los dos perfiles; puede tener valores de 0 a 100. Si el valor de $f_2 > 50$, los perfiles son similares (Han y col., 2011).

Debido a que la prueba de f_2 es sensible al número de puntos de disolución, se recomienda que un solo punto se incluya después que se ha disuelto el 85% del fármaco (Bai y col., 2011). Cuando el 85% del fármaco se ha disuelto de manera muy rápida no es posible

realizar el cálculo de f_2 , como en el caso de las presentaciones orodispersables y algunos fármacos de liberación inmediata que presentan altas tasas de liberación por debajo de los 15 min.

2.10. Evaluación de la estabilidad de sistemas microencapsulantes

Un aspecto importante en todo estudio de formulación de productos y/o coprocesados es garantizar que desde el diseño el producto final cumpla con criterios de estabilidad durante todo el proceso de fabricación y en la administración al paciente, por lo tanto durante todo el periodo de validez del producto deben cumplir con las especificaciones técnicas y farmacológicas establecidas, esto es que los excipientes, procesos y condiciones de almacenamiento no tengan alguna incompatibilidad con el fármaco y este pueda sufrir algún cambio estructural y/o funcional. Una manera de lograr lo anterior es exponer los sistemas microencapsulantes a condiciones de estrés acelerado (temperatura, luz y humedad) para evaluar los cambios físicos del fármaco (Hu y col., 2006).

Los estudios de estabilidad comprenden las pruebas que se efectúan para determinar el período de caducidad y las condiciones de almacenamiento para los medicamentos en que sus características físicas, químicas, microbiológicas y biológicas permanecen dentro de límites especificados, bajo la influencia de diversos factores ambientales como temperatura, humedad y luz.

Los principales motivos para realizar los estudios de estabilidad son por requerimientos establecidos por las autoridades de salud para establecer el periodo de vida útil del producto (Legales), porque los productos de degradación del principio activo y/o excipientes no siempre suelen ser inocuos (Sanitarias) y si el producto sufre degradación física que afecten su presentación comercial, este ya no es aceptado por parte del consumidor (Económicas).

La inestabilidad de microcápsulas se produce cuando se alteran las propiedades físicas (separación de fases, permeación), químicas (hidrólisis) y microbiológicas (presencia de microorganismos) del mismo. Entre las principales causas para que las microcápsulas se vuelvan inestables están las siguientes:

- a). Temperatura. - Esta es una de las principales causas de alteración ya que las reacciones de degradación se incrementan al aumentar la temperatura. De manera

general, por cada 10 °C de incremento de temperatura, la velocidad de reacción se duplica, esto depende del orden de la reacción.

- b). Humedad. - Es un factor que se puede encontrar tanto en la formulación de las microcápsulas, como en el almacenamiento de este, por ejemplo, humedad en materia prima, o ambiental. La principal consecuencia es una reacción de hidrólisis.
- c). Oxígeno y otros gases. - La presencia de oxígeno el cual está en contacto con el fármaco, puede producir reacciones de oxidación degradando de esta manera a los compuestos de la formulación, el CO₂ en contacto con un medicamento puede causar alteraciones en el pH de este.
- d). Radiaciones. - Un fármaco expuesto a radiaciones puede causar lesiones fotolíticas generando productos de degradación los cuales puede catalizar otros procesos secundarios, como son oxidación, polimerización etc.
- e). Incompatibilidades. - Esto se produce cuando dos componentes de la formulación reaccionan generando una modificación de las propiedades físicas y químicas de la microcápsula.

Dentro de los estudios de estabilidad tenemos dos tipos:

- a). Estudios normales, los cuales consisten en someter la muestra a condiciones de temperatura y humedad de almacenamiento, determinando de forma periódica la degradación del fármaco, nos permite determinar una forma más exacta la vida útil de las microcápsulas, sin embargo, el gran inconveniente es el tiempo que demora el estudio.
- b). Estudio acelerado, basándose en el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción, consistiendo en someter la muestra a condiciones extremas de almacenamiento (Temperatura y humedad relativa), con el fin de acelerar a degradación química y modificación física se determina en forma periódica la concentración del fármaco.

Métodos para realizar el estudio de estabilidad

Existen métodos cualitativos y cuantitativos que permiten evaluar la estabilidad de sistemas microencapsulantes obtenidos por diferentes técnicas. Entre los métodos cualitativos se encuentran las determinaciones analíticas (identidad y valoraciones), físicas (reología de sólidos, viscosidad, etc.) y organolépticas simples (color, sabor, aroma); estas determinaciones no logran establecer de manera directa la mayor estabilidad del producto, solo reduce las alternativas de microencapsulación.

Una técnica cualitativa que infiere la estabilidad de los sistemas microencapsulantes es la microscopia electrónica de barrido, ya que permite evaluar la topología externa de las macropartículas, mediante la descripción de la superficie, homogeneidad e integridad de las cápsulas (Xu y col., 2011).

Entre los métodos cuantitativos que se emplean para caracterizar las microcápsulas es la distribución del tamaño de partícula, densidad, volumen y propiedades de flujo, de acuerdo con ensayos que aseguran su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento biofarmacéutico (Sun y col., 2009).

Uno de los métodos cuantitativos que en los últimos años ha tomado auge es el análisis térmico, el cual se caracteriza por ser simple y directo, se emplea para seguir el curso de una reacción mediante el monitoreo continuo de los efectos térmicos totales. La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que permite determinar la pureza, temperatura de transición, reacciones degradativas (oxidación), interacciones, etc. (Al-Haj y Rasedee, 2009; Das y Maurya, 2009; Nicoletti y Telis, 2009).

Se han realizado estudios para determinar la cinética de oxidación de diversos materiales mediante el método iso-conversional, Pérez-Alonso y col. (2008) describieron la propuesta de Flynn, Wall and Ozawa para evaluar matrices biopoliméricas en encapsulación. Adicionalmente, los parámetros cinéticos se describen en la Norma ASTM E698 (1984). El método de Arrhenius es muy utilizado en estudios de estabilidad, se basa: en una reacción química de las moléculas que tienen energía en exceso sobre un determinado nivel de energía denominada energía de activación; son las que intervienen en la reacción química y la magnitud de dicha energía depende de la naturaleza del proceso y el número de moléculas

activas varía de una reacción a otra, para que una molécula pueda adquirir energía adicional para reaccionar necesita de choque o intercambio entre las mismas.

La posibilidad de que una molécula tenga energía en exceso está dada por el factor de Boltzman:

$$k = Z e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde:

k = Constante de velocidad

Z = Frecuencia de colisión entre las moléculas.

E_a = Energía de activación

R = Constante de los gases (0.008314 kJ/kmol)

T = Temperatura absoluta en Kelvin

La DSC es una técnica en la cual la diferencia en el flujo de calor aplicado a una muestra y a una referencia es monitoreada contra el tiempo o temperatura, mientras la temperatura de la muestra, en una atmósfera, es programada (Hines, 1995). La energía requerida para mantener esta pequeña diferencia de temperaturas es una medida de los cambios en la entalpía o en la capacidad calorífica de la muestra con respecto a la referencia. Paralelamente se grafica el flujo de calor aplicado con respecto al incremento de la temperatura; a partir de este termograma se pueden calcular las temperaturas de transición y las transiciones cristalinas de diversos componentes, incluyendo los fármacos (Ulkowski y col., 2005).

La investigación sobre la oxidación requiere de mediciones altamente precisas de la cantidad de calor emitido. La técnica de DSC ofrece la ventaja de que se puede utilizar en régimen no isotérmico para evaluar la estabilidad térmica de sustancias químicas y para determinar parámetros cinéticos de reacciones simples o complejas (Pérez-Alonso y col., 2008; Smith y col., 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

La finalidad primordial de todo fármaco es la de alcanzar una eficacia terapéutica óptima, por lo que el sector farmacéutico tiene la misión fundamental de producir medicamentos con alta estabilidad y biodisponibilidad adecuada ofreciendo con ello eficacia y seguridad. Por lo que es necesario en todo proceso de investigación y desarrollo, la implementación de estudios rigurosos en las fases tempranas para descartar candidatos con características desfavorables.

Para el caso de fármacos clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), baja solubilidad, baja permeabilidad, se evalúa la microencapsulación como una alternativa para robustecer su estabilidad y aumentar su biodisponibilidad. Por lo anterior, en el presente proyecto se evalúa el efecto de encapsular fármacos con problemas de estabilidad, incompatibilidad química, solubilidad y su capacidad para atravesar el epitelio intestinal murino (permeabilidad), con la finalidad de predecir la absorción y biodisponibilidad en el ser humano sin presentar los problemas de hidrólisis e inestabilidad química, características de los fármacos clase IV.

4. HIPÓTESIS

Si los microencapsulados proporcionan un ambiente tanto hidrofóbico como hidrofílico a los fármacos tipo IV del SCB, entonces aumentará su estabilidad y velocidad de disolución y como consecuencia su biodisponibilidad será mayor a la forma cristalina del fármaco.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Microencapsular fármacos tipo IV del sistema de clasificación biofarmacéutica mediante la técnica de secado por aspersion, evaluando liberación *in vitro*, estabilidad, biodisponibilidad y optimización de la formulación.

Objetivos particulares

- Optimizar la formulación de emulsiones dobles cinéticamente estables como vehículo para el fármaco.
- Caracterizar física y de estabilidad de las emulsiones dobles.
- Obtener microcápsulas mediante secado por aspersion de las emulsiones dobles.
- Caracterizar los sistemas microencapsulados.
- Evaluar la dosificación, liberación *in vitro* y estabilidad de las microcápsulas.
- Determinar y comparar el perfil cinético de permeabilidad en un modelo de intestino de rata de los microencapsulados de CH con respecto al fármaco cristalino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo está dividido en tres fases experimentales. En la primera se optimizó la formulación y evaluarán los parámetros de calidad de las microcápsulas de CH así como su estabilidad. En la segunda se estableció la metodología analítica para la cuantificación del fármaco permeado y en la tercera se evaluó el perfil de disolución y permeabilidad de las microcápsulas de CH y se comparó usando el fármaco libre (cristales de CH) como control.

6.1. Materiales

Se utilizó cristales de CH como modelo de fármaco, el cual es donado por la compañía Zhejiang Jingxin Pharmaceutical Co. Ltd., (Xinchang, China). En la formulación se emplearon los siguientes materiales: Aceite mineral (MO) como diluyente lipófilo, de Sigma Chemical Co. (Poole, Reino Unido); Monoestearato de sorbitan (Span 60; SPA) y Monooleato de sorbitan y polioxietileno (Tween 80; TWE) se utilizaron como tensoactivos en la emulsión interna de EtOH en MO (Danisco Cultor Mexicana, SA de CV, Guadalajara, Jalisco, México); se manejó como material de pared: Kollicoat® IR (KIR), una mezcla de alcohol polivinílico y polietilenglicol (BASF, Mont Olive, Nueva Jersey, E.U.A.).

Las formulaciones fueron envasadas en cápsulas de gelatina dura N° 1 (Capsugel, Bornem, Bélgica) como un sistema de contenedor. Se utilizó agua bidestilada en todos los experimentos y fue proporcionado por el Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica UAM-Iztapalapa. (Ciudad de México).

Se utilizan los siguientes materiales, un matraz aforado de 50 mL, marca Duran®, 12 matraces aforados de 100 mL, marca Duran®, 1 matraz aforado de 500 mL, marca Duran®, 1 matraz aforado de 1000 mL, marca Duran®, Viales y tapones de cromatografía Waters de 1 mL, Tubos de vidrio de 15 cm x 2 cm, Cánulas de muestreo de acero inoxidable, 2 Pipetas volumétrica de 15 mL, marca Duran®, Sistema de recirculación, Tubo de vidrio de 13 cm x 3.5 cm, 2 Vasos de precipitado de 1 L, marca Pyrex, 2 Vasos de precipitado de 500 mL, marca Pyrex, Termómetros, de -10 a 110°C, Parrillas de calentamiento con agitación magnética, Soporte universal, Pinzas de tres dedos, Barras de agitación magnética.

6.2. Reactivos

Los reactivos utilizados para la estandarización de la metodología analítica y la cuantificación de CH fueron los siguientes: Acetonitrilo grado cromatográfico, Ácido clorhídrico

concentrado, Ácido fosfórico concentrado, Bicarbonato de sodio, Cloruro de calcio, Cloruro de magnesio, Cloruro de potasio, Cloruro de sodio, Éter etílico, Fosfato de potasio monobásico, Fosfato de sodio dibásico anhidro, Fosfato monobásico de amonio, Hidróxido de sodio, Lauril sulfato de sodio, Metanol grado cromatográfico (todos marca JT. Baker), Agua purificada grado Milli-Q, D-glucosa, marca Sigma Aldrichs, Gas carbógeno (Oxígeno – Bióxido de carbono (95:5)).

6.3. Infraestructura

6.3.1. Laboratorios:

Laboratorio del Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

Laboratorio del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

Laboratorio del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tolloccan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

Laboratorio y Bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tolloccan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

6.3.2. Equipos:

Los equipos e instrumentos fueron facilitados por el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (Ciudad de México, México) y por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química (Toluca, Estado de México, México) el Bioterio y las instalaciones para el manejo de animales de laboratorio (Ratas Wistar de ambos sexos con un peso comprendido entre 250 ± 50 g y 3 meses de edad) y las muestras biológicas fueron facilitadas por el Departamento de Biofarmacia de la Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química (Toluca, Estado de México, México).

6.4. Diseño del estudio

Se utilizaron tecnologías de secado por aspersion de emulsiones dobles (SDE) utilizando Eudragit L30D-55 (EUD), Opadry II (OPA) o Kollicoat IR (KIR) como materiales de pared. Las microcápsulas se evaluaron en cuanto al tamaño de partícula, morfología, perfiles de liberación, almacenamiento acelerado y estabilidad termo-oxidativa. Se empleó el estudio de estabilidad térmica oxidativa comparado con un estudio de estabilidad acelerada, por último se evaluó la liberación del fármaco de la formulación y su biodisponibilidad.

En este proyecto, se trabajó con el modelo cinético continuo de disolución y permeabilidad *in vitro* para evaluar el efecto de la formulación sobre la absorción de CH microencapsulada de liberación inmediata.

6.5. Métodos para formulación y caracterización:

6.5.1. Formulación de emulsiones dobles

Tres emulsiones dobles etanol-aceite mineral- agua (EtOH/MO/W_x) se prepararon a temperatura ambiente (~25 °C) utilizando un procedimiento de dos etapas de emulsificación (Pérez-Orozco y col, 2011; Pimentel- González y col., 2009). En la primera etapa, la emulsión interna EtOH / MO se formuló con una fracción de masa de 0.15 de la fase dispersa (ϕ EtOH/MO). La concentración total de agentes emulsionantes en EtOH/MO fue 2.62% (w/w), con una relación PAN:GRI de 1:4.5. La fase interior EtOH contiene CH y PAN, mientras que la fase oleosa contiene MO y GRI, en los porcentajes en peso que se muestran en la Tabla 6. La fase EtOH se añadió gota a gota a la fase MO utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T50 (IKA ®-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, EE.UU.) a 5200 rpm durante 8 minutos. En la segunda etapa la emulsión interna EtOH/MO fue re-emulsionada en diferentes materiales de pared en solución acuosa (W_x, donde X representa el material de pared EUD, OPA o KIR) a una concentración de 15% (w/w). En todos los casos la relación de EtOH/MO con los materiales de pared sólidos fue de 1:1, de modo que en las emulsiones dobles había una fracción de la fase dispersa en masa ϕ EtOH/MO/W_x de 0.3. La dispersión de la emulsión de EtOH/MO en el W_x se hizo utilizando el homogeneizador Ultra-Turrax T50 a 7600 rpm durante 5 min. Las emulsiones dobles resultantes fueron codificadas como EtOH/MO/EUD, EtOH/MO/WOPA y EtOH/MO/WKIR, respectivamente.

Tabla 6. Formulación de microcápsulas por SDE.

SDE		
Fase	Material	% (w/w)
Fase interna (EtOH)	CH	3.00
	EtOH	2.52
	PAN	0.48
Fase intermedia (MO)	MO	6.86
	GRI	2.14
Fase externa (W _x)	EUD, OPA ó KIR	15.00
	H ₂ O	70.00
(EtOH ₁ /MO/W _x)	Emulsión Total	100.00
	Sólidos Totales	30.00

SDE = Secado por aspersión de emulsiones dobles, CH = Clortalidona; EtOH = Etanol; PAN = Panodan SDK; MO = Aceite mineral; W_x = Fase acuosa externa; GRI = Grinsted PGPR; EUD = Eudragit® L30D-55, OPA = Opadry® II; KIR = Kollicoat® IR; CSD = Dióxido de silicio, Gre = Grenetina; LAC = Lactosa, CEL = Celulosa; TAL = Talco.
* El material de la pared se añadió en 3% como una ganancia en peso (w/w) en el proceso de recubrimiento.

6.5.2. Tamaño de gota y morfología de las emulsiones dobles

Las características morfológicas de las emulsiones dobles y el diámetro promedio de longitud de gota (d_{1,0}) de la emulsión interna y doble se determinó utilizando un microscopio óptico (Leica DMLB 100S, Leica, Nueva York, NY, E.U.A.) acoplado a un analizador de imágenes (Moticam 2300 Filmless Zoom Camera, Moticam, Xiamen, China e Image Pro-Plus versión de software 7.0, Media Cybernetics, Maryland, E.U.A.).

Adicionalmente, como una medida de estabilidad, la longitud en diámetro medio de volumen (d_{4,3}) de las emulsiones dobles se determinaron en un Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido), utilizando agua bidestilada como dispersante (índice de refracción = 1,333). Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la preparación de emulsiones y en intervalos de 24 horas durante 7 días (Lobato-Calleros y col., 2008).

6.5.3. Microencapsulación mediante secado por aspersión

La emulsión doble fue alimentada en un secador por aspersión Nichols/Niro Turbo (EPL, mod I, Nueva York, NY, E.U.A.) a una velocidad de 40 mL/min y 4 bares de presión de aire, con temperatura de entrada y salida de aire de ~150 + 5 °C y ~85 + 5 °C respectivamente

(Fu y col., 2011), para producir las microcápsulas codificadas como SDE_x donde el subíndice X denota el polímero (EUD, la OPA o KIR) que constituyen el material de la pared.

6.5.4. Tamaño y morfología de microcápsulas

El diámetro de las microcápsulas $d_{4,3}$ de SDE_x, se determinó con un analizador de tamaño de partícula de láser de difracción 320 LS13 (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, E.U.A.). Las microcápsulas se dispersaron utilizando aire como medio en el sistema Tornado Dry Powder System.

La morfología superficial (topología) de las microcápsulas se determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las microcápsulas se adhieren utilizando una cinta adhesiva de dos caras (Ted Pella, Redding, CA, E.U.A.) para el examen de su estructura externa. Las muestras fueron posteriormente recubiertas de oro (Lobato-Calleros y col., 2006) con una fina capa de iones Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Se analizó al alto vacío en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6510LV (Jeol Ltd., Akishima, Japón), a 20 kV, con una ampliación de 110 x y 5000 x.

6.5.5. Rendimiento de microencapsulación

Las microcápsulas se pesaron para calcular el porcentaje del rendimiento mediante la siguiente ecuación (Naeem y col., 2011):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso total de microcápsulas resultantes}}{\text{Peso total de sólidos iniciales utilizados en la formulación}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

6.5.6. Eficiencia de microencapsulación

La eficiencia de microencapsulación se calculó como el porcentaje de CH detectado en relación con la dosis inicial teórico de 50 mg en las formulaciones. Una cantidad apropiada de microcápsulas (cantidad de masa que disponga de una dosis de 50 mg teórico CH), se disolvió en metanol para obtener 0.2 mg/mL de CH. La cantidad de CH atrapado en microcápsulas se determinó por HPLC. Las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico Agilent Tecnologías 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania), utilizando una columna Zorbax SB-C18 columna, 50 mm x 4,6 mm id, de tamaño de partícula de 1.8 µm (Agilent Technologies, Newport, DE, E.U.A.), a 30 ± 2 °C. La fase móvil consistió en una mezcla de 0.08 M de ácido

fosfórico (pH 5,5) con Acetonitrilo (80:20) bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La detección por UV se realizó a 220 nm. La concentración analítica de CH se determinó a partir de una curva estándar realizada con CH ($r^2 = 0.999$). La eficiencia de fármaco de carga se determinó como la relación entre la concentración de CH analítica y la teórica mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{A_m}{A_r} * \frac{P_r}{P_m} * 0.1 * P * PP = \left(\frac{\text{CH mg microencapsulada}}{20} \right) * 20 * 100 = \%CH \quad (\text{Ec. 3})$$

En donde: A_m : Área del pico de CH obtenido en el cromatograma de la solución de la muestra; A_r : Área del pico de CH obtenidos en los cromatogramas de las soluciones de referencia; P_r : peso de CH, sustancia de referencia, en mg, P_m : peso de la muestra en mg, 0,1: factor de dilución, P : sustancia pura referencia CH / 100, PP : Promedio del peso de las cápsulas en mg; 20: el contenido teórico de CH y 100: factor de conversión a porcentaje. Los resultados se expresaron como porcentaje de CH.

6.5.7. Dosificación de las microcápsulas en cápsulas de gelatina

Las microcápsulas y CH se acondicionaron en cápsulas de gelatina # 1 a dosis teóricas de 166.7 mg de CH, basado en el contenido teórico de CH en la formulación propuesta. Estas cápsulas se utilizaron para la liberación *in vitro* y prueba de estabilidad en almacenamiento.

6.6. Estudios de estabilidad

6.6.1. Estabilidad acelerada

Las cápsulas acondicionadas en diferentes contenedores con CH y microcápsulas fueron almacenadas a 40 °C y 75% de humedad relativa (Estabilidad acelerada). La estabilidad química (contenido de la droga) se monitoreó por 3 meses para la estabilidad acelerada, como se describe en la guía de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, 2006) y se analizó por HPLC cada mes, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente en la sección de eficiencia de microencapsulación.

6.6.2. Estabilidad térmica-oxidativa

De 4 a 5 mg del fármaco, material de la pared, CH y las microcápsulas se colocaron en el horno de un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments DSC Q1000 (TA Instruments,

New Castle, DE, E.U.A.). Las muestras fueron sometidas a velocidades de calentamiento de (β) 2.5, 5, 7.5 y 10 °C/min desde 50 °C hasta 400 °C, utilizando una velocidad de flujo de oxígeno de 100 cm³/min. Por otro lado, se analizó un blanco utilizando N₂ con el fin de determinar si los picos exotérmicos de las muestras fueron causados por su oxidación. La estabilidad térmica de las microcápsulas se realizó utilizando un régimen dinámico no isotérmico por la técnica de DSC. Los parámetros cinéticos de oxidación de las microcápsulas se calcularon como se informó por (ASTM 1984, Pérez-Alonso y col.,2008).

6.7. Liberación *in vitro* de las microcápsulas de CH

Se llevaron a cabo pruebas de disolución *in vitro* para estimar la liberación de CH de las microcápsulas, utilizando el aparato USP 2 (paletas) (Pharmatest, Steinheim, Alemania) a 50 rpm. Se usaron 900 mL de agua bidestilada como medio de disolución a 37 ± 0.5 °C. Las cápsulas de CH y las microcápsulas se añadirán al medio de disolución asegurando condiciones de inmersión (C <0.2 C). Las soluciones se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm de diámetro de corte (Cameo filtro de acetato, Millipore Co., Bedford MA, E.U.A.) y bombeada continuamente a un flujo de 12.5 mL/min a un espectrofotómetro de flujo Varian Cary 50 UV-visible (Varian Palo Alto, CA, E.U.A.). La absorbancia de CH estándar o muestra se midió a 220 nm. El porcentaje de fármaco liberado se calculó con la cantidad de CH valorada en relación con la cantidad total de CH vs el tiempo.

6.8. Métodos para evaluación de Permeabilidad de CH Microencapsulada

En este proyecto se trabajó con un modelo biológico *in vitro* que consiste en un segmento de intestino no evertido de rata (en el cual se considera la absorción constante), técnica que presenta ventajas con respecto a otros modelos, en cuanto a tiempo de evaluación, implementación sencilla, costos bajos por ensayo; así mismo, el tejido intestinal se obtiene de animales de laboratorio que proliferan muy rápidamente y se adaptan fácilmente a la vida de bioterio, lo que permite controlar las variables ambientales en la experimentación, además al utilizar un mamífero como la rata, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al humano (Mahomoodally y col., 2007, Dixit y col., 2012).

Se emplearán 12 ratas Wistar de ambos sexos con un peso comprendido entre 250 ± 50 g y 3 meses de edad, que serán acondicionadas durante una semana en un cuarto cerrado

bajo temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y humedad relativa de $50 \pm 10\%$, se mantuvieron bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 horas (NOM 062 Z00-1999). Fueron alimentadas con pellets de alimento comercial (Lab Rodent Diet 5001) acorde con los requerimientos nutricionales de la rata. Se les proporcionó agua y el alimento *ad-libitum*. Al término de este periodo, se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos, cada grupo constituido por 6 ratas. En el primer grupo de animales se evaluó la permeabilidad de la CH microencapsulada y en el grupo restante la permeabilidad del fármaco de CH.

La evaluación de la permeabilidad se realizó por sextuplicado para cada muestra (fármaco y microencapsulado), utilizando segmento de intestino fresco.

6.8.1. Preparación de soluciones.

Solución buffer de fosfato pH 7.80

Se pesaron 0.58 g de fosfato de potasio monobásico y 8.86 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, se transfirieron a un vaso de precipitados de 1000 mL con agua purificada y se agitaron hasta completa disolución. Se ajustó el pH a 7.80 ± 0.05 con ácido fosfórico concentrado.

Solución de Lauril sulfato de sodio al 0.2 % en metanol

Se pesaron 2.0 g de Lauril sulfato de sodio y se transfirieron a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disolvieron y llevaron a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de Tyrode pH 6.80 ± 0.05

Se pesaron 1.0 g de *D*-glucosa, 1.0 g de bicarbonato de sodio, 0.05 g fosfato de potasio monobásico, 0.20 g de cloruro de calcio, 0.20 g de cloruro de potasio, 0.10 g de cloruro de magnesio y 8.00 g de cloruro de sodio. Se transfirieron a un vaso de precipitado de 1 L, se disolvieron con 900 mL de agua purificada, se mezclaron hasta completa disolución (no calentar). Se ajustó el pH a 6.80 ± 0.05 con hidróxido de sodio 0.1 N o ácido clorhídrico 0.1 N. Finalmente, se llevó a volumen con agua purificada. Se filtra a través de una membrana Millipore de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Finalmente, se almacena en refrigeración y se protege de la luz.

6.8.2. Disección del intestino de rata.

En la campana de extracción, se anestesian las ratas por saturación con éter etílico y luego de realizar una incisión desde el abdomen hasta el tórax extraer la sangre por punción cardiaca, posteriormente se disecciona una fracción de intestino de aproximadamente 10 cm de longitud correspondientes a la zona del duodeno, descartando los primeros 5 cm próximos al píloro.

Se mantiene sumergido el intestino aislado en solución de Tyrode pH 6.80 ± 0.05 a 37°C y aireada con gas carbógeno para evitar muerte celular. Se remueven los vasos mesentéricos y la grasa adherida al intestino, con ayuda de una cánula lavar con solución de Tyrode pH 6.80 ± 0.05 a 37°C la parte interna y externa del trozo de intestino aislado, cuidar de no provocar desprendimiento del tejido mucosal y/o romper el intestino mismo.

Se ata uno de los extremos al dispositivo de entrada del fármaco y el otro extremo al dispositivo de salida del fármaco del Sistema de Permeabilidad Intestinal. Finalmente, se sumerge el intestino en el compartimento serosal, el cual previamente contiene 50 mL de una solución de Tyrode pH 6.80 ± 0.05 a 37°C aireada con gas carbógeno de acuerdo con lo descrito en la Figura 7.

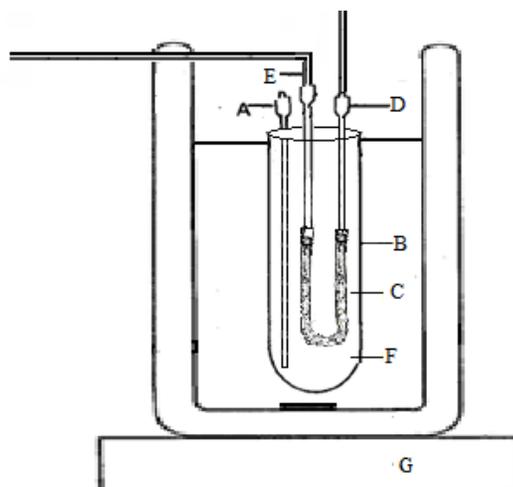


Figura 7. Sistema de Permeabilidad Intestinal.

Donde A: Aireación con carbógeno; B: tubo de vidrio de 50 mL, C: Intestino no evertido, D: entrada del fármaco disuelto, E: salida del fármaco disuelto, F: compartimento serosal, G: parrilla de agitación

6.8.3. Soluciones muestra de la permeabilidad

Se colocó en un vaso de disolutor (aparato II) 900 mL de la Solución buffer de fosfato pH 7.80 a 37 °C y una canastilla japonesa con una cápsula que contenga CH microencapsulada equivalente a 13.5 mg de CH y se realiza la disolución a una velocidad de agitación de 75 rpm durante 90 minutos. Se introduce la entrada y salida del Sistema de Permeabilidad Intestinal y recircular la CH disuelta a un flujo aproximado de 1.3 mL por min, tal como se muestra en el Diseño del Sistema Continuo para la Disolución y Permeabilidad, (Figura 8).

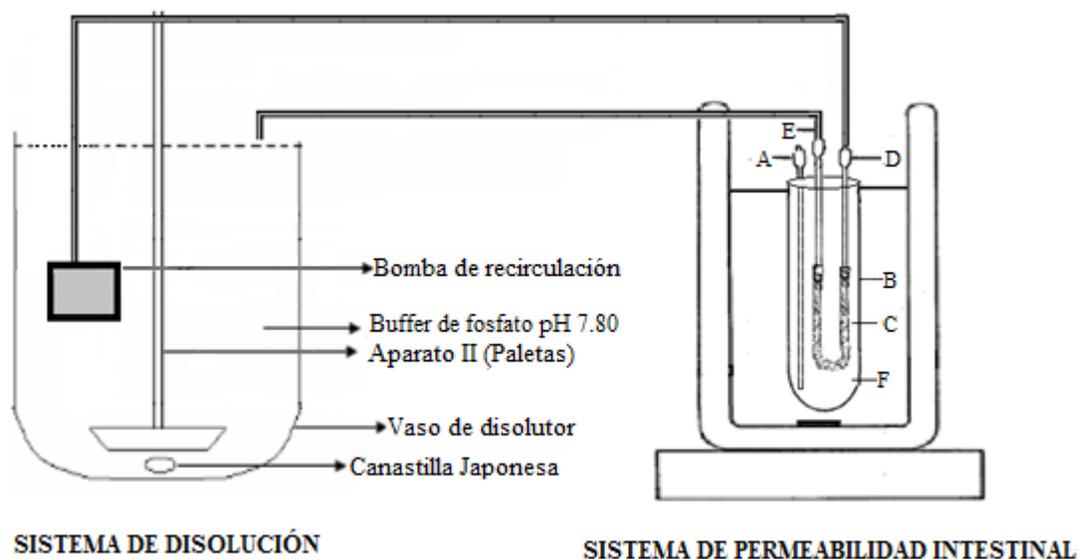


Figura 8. Diseño del Sistema Continuo para Disolución y Permeabilidad.

Los tiempos que se evalúan, son: (0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos), se toman de forma manual 15 mL de solución muestra del compartimento serosal con ayuda de una pipeta volumétrica de 15 mL y se repone el volumen con solución de Tyrode pH 6.80 ± 0.05 a 37°C .

Se transfieren las muestras por separado a un vaso de precipitado de 50 mL y se evaporan hasta sequedad en parrilla de calentamiento a una temperatura de aproximadamente 180°C , se deja que las muestras alcancen la temperatura ambiente y posteriormente reconstituir con 1.5 mL de solución de Lauril sulfato de sodio al 0.2% en metanol, sonicar por 10 minutos y finalmente mezclar en Vórtex. Ver nota 1

Nota 1. Se filtran las soluciones de referencia y soluciones muestra a través de filtros Millex de PVDF $0.45\ \mu\text{m}$, eliminando los primeros mililitros del filtrado y se reciben el filtrado en viales.

6.8.4. Soluciones de referencia

Se pesan por duplicado 10 mg de CH, sustancia de referencia y se adiciona por separado a matraces volumétricos de 100 mL, disolver y se llevan a volumen con Lauril sulfato de sodio al 0.2% en metanol, mezclar.

Se transfiere de manera independiente alícuotas de 1 mL de las soluciones anteriores a matraces volumétricos de 200 mL, diluir y llevar a volumen con el mismo diluyente, mezclar. (Soluciones R3 y R4, concentración $\pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ de CH). Ver nota 1.

6.8.5. Condiciones cromatográficas:

Fase móvil:

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA pH 2.4:

Se pesan 1.44 g de fosfato monobásico de amonio y se transfieren a un matraz volumétrico de 500 mL, disolver y se llevan a volumen con agua purificada. Se verifica que el pH se encuentre en un valor de 4.50 ± 0.05 , si es necesario, se ajusta el pH con solución de hidróxido de amonio 0.1 N o ácido fosfórico concentrado.

PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL:

Se transfiere a un vaso de precipitado de 1000 mL, 400 mL de la solución amortiguadora y 600 mL de acetonitrilo grado cromatográfico medidos de forma independiente y se mezclan. Se filtra la solución a través de membrana Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y se desgasifica por ultrasonido.

Columna:

De acero inoxidable, de 15 cm de longitud por 3.9 mm de diámetro interno, empacada con partículas de sílica de $5 \mu\text{m}$ de diámetro recubiertas con grupos octadecilsilano (C18), tipo Symmetry marca Waters.

Velocidad de flujo: 1.0 mL / min

Temperatura de columna: 25 °C

Detector: UV a 220 nm

Vol. de inyección: 20 μL

Tiempo de retención: Aproximadamente 3.8 minutos.

Tiempo de corrida: 6.0 minutos aproximadamente

6.8.6. Metodología:

Adecuabilidad: Se inyecta una vez 20 μ L de solución blanco (solución diluyente), posteriormente inyectar por quintuplicado 20 μ L de la solución de referencia (R3) y se obtienen los correspondientes cromatogramas, el coeficiente de variación no debe ser mayor de 2.00%

Se inyectan por duplicado 20 μ L de las soluciones de referencia (R3 y R4) al inicio de la corrida y a menos una vez al final. El coeficiente de variación entre todas las inyecciones de las dos soluciones de referencia no debe ser mayor de 2.00 % y el factor de coeio debe ser menor a 2.0

6.8.7. Procedimiento.

Ajustados los parámetros de operación, se inyectan una vez las soluciones muestra obtenidas en cada tiempo de muestreo (P1 a P7) y obtener los correspondientes cromatogramas.

Terminado el análisis, se lava el sistema cromatográfico con flujo de 1.0 mL/min de acuerdo con lo establecido en la siguiente tabla 7:

Tabla 7. Composición de fase para lavado del equipo.

Mezcla	Proporción	Volumen
Agua purificada / Acetonitrilo grado cromatográfica	40:60	15 mL
Agua purificada / Acetonitrilo grado cromatográfica	50:50	15 mL
Agua purificada / Acetonitrilo grado cromatográfica	60:40	15 mL

6.8.8. Cálculos

Se determinó con exactitud la respuesta en área de los picos de las soluciones de referencia y de las soluciones muestra. Se reportó para cada inyección el factor de capacidad (K'), Coleo (USP-NF, 2012) y Número de platos teóricos (NPT).

Se calcularon los microgramos de CH permeada en cada tiempo de muestro, mediante la siguiente formula:

$$\frac{A_m}{A_r} * Pr * 0.000075 * P * 1000 = \mu g \text{ de CH en los } 15 \text{ mL} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\frac{\mu g \text{ en los } 15 \text{ mL} * 50 \text{ mL}}{15 \text{ mL}} = \mu g \text{ de CH en los } 50 \text{ mL} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\mu g \text{ en los } 50 \text{ mL} + \sum A_{in-1} = \mu g \text{ Totales de CH permeada} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde:

A_m = Área del pico de la CH obtenido en el cromatograma de la solución muestra

A_r = Área promedio del pico de la CH obtenido en los cromatogramas de las soluciones de referencia

Pr = Peso de CH sustancia de referencia, en mg

0.000075 = Factor de dilución

P = Pureza de la CH sustancia de referencia / 100

1000 = Factor de conversión a microgramos

A_{in-1} = Microgramos de CH permeada en los tiempos de muestreo anteriores

Con los datos obtenidos, se graficó el promedio de los miligramos permeados de CH (y) contra el tiempo evaluado (x) para cada caso (CH microencapsulada como del fármaco puro).

Se determinó y comparo el perfil cinético de permeabilidad en un modelo de intestino de rata no evertido de los microencapsulados de CH con respecto al fármaco puro. El sistema para evaluar la permeabilidad intestinal se basa en la técnica descrita por Marano y Lufrano en 1991. Para ello, se emplean ratas Wistar hembra con peso de 250 g \pm 50 g de peso, alimentadas ad libitum, las cuales se sacrificarán por saturación con éter etílico y luego se realizó una incisión abdominal aislando un trozo de intestino de la zona del duodeno de 10 cm de longitud, descartándose previamente los primeros 5 cm próximos al píloro. Se lavó con solución de Tyrode pH 6.8 a 37°C. Posteriormente se ligó uno de los extremos del intestino y se adiciono en el interior (sitio mucosal) 1 mL de la solución muestra (equivalente a 20 μ g de CH disuelta en 1 mL de medio de disolución). Finalmente se cierra e introdujo el intestino al dispositivo de permeabilidad, que previamente contiene 50 mL de la solución de Tyrode pH 6.8, a 37°C, con burbujeo constante de gas carbógeno, O₂/CO₂ 95:5 y agitación magnética.

Se muestreo 15 mL de la solución serosal con reposición del volumen a los 0, 2.5, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 75 y 90 minutos, las muestras se colocaron en un vaso de precipitado

de 50 mL y se evaporo hasta sequedad. Posteriormente se reconstituyo con 1.5 mL de lauril sulfato de sodio al 0.2% en metanol. Después de sonicar por 5 minutos se homogenizo para su posterior cuantificación por HPLC/UV, las condiciones cromatográficas son las mismas que para la prueba de eficiencia de microencapsulación. Se determinó la respuesta de los picos de los cromatogramas y se calculó la cantidad de CH permeada de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\frac{Am}{Ar} * Pr * FD * P * 1000 = \mu g \text{ de PS en los 15 mL muestreado} \quad (\text{Ec. 7})$$

Dónde:

Am = Área del pico de CH obtenido en la solución muestra

Ar = Área promedio del pico de CH obtenido en las soluciones de referencia

Pr = Peso de CH, sustancia de referencia, en mg

FD = Factos de dilución, 0.006

P = Pureza de la CH sustancia de referencia /100

1000 = Factor de conversión a microgramos

$$\frac{\mu g \text{ en los } 15 \text{ mL} * 50 \text{ mL}}{15 \text{ mL}} = \mu g \text{ de PS en los } 50 \text{ mL} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$Si + \sum Ain^{-1} = \text{Microgramos totales de PS permeada} \quad (\text{Ec. 9})$$

Dónde:

Si = Microgramos de CH en los 50 mL de la solución serosal

Ain⁻¹ = Microgramos de CH permeada en los tiempos de muestreo anteriores

La disolución y permeabilidad simultánea se evaluó en base a la metodología descrita por Lala y Nandgaonkar, 2011. Para ello se montó un perfil de disolución con un solo vaso de disolutor bajo las condiciones descritas en la prueba de liberación *in vitro* de las microcápsulas de CH y por medio de una bomba de recirculación se pasó la CH disuelta por el sistema de permeabilidad.

6.8.9. Análisis estadístico

Todas las mediciones se llevaron a cabo en repeticiones por triplicado. Todos los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una comparación de medias a través de la prueba de Tukey utilizando el software estadístico SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, E.U.A.) con una significancia estadística de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de CH

En el desarrollo de nuevos procesos tecnológicos es importante conocer las características de los materiales que se van a trabajar, así que en el caso de la CH, las muestras proporcionadas se describen como; polvo cristalino blanco o blanco amarillento; inodoro o casi inodoro y temperatura eutéctica, con dicianidamida R, aproximadamente 174 °C, es prácticamente insoluble en agua (12 mg/100 mL a 20 °C), cloroformo o éter, ligeramente soluble en alcohol, soluble en metanol y soluble en carbonatos alcalinos o soluciones básicas, con punto de fusión cercano a 239 °C. El fármaco no presentó incompatibilidad a temperatura ambiente en ausencia y presencia de luz, pero a 60°C y 60°C/85% H.R., se detecta cambio físico aparente con los excipientes por efecto de la temperatura y humedad por lo que los cambios observados corresponden al fármaco y no a incompatibilidad fármaco-excipiente. Los resultados se presentan en la Tabla 8 y se respaldan por los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido donde sólo para el caso de la celulosa (CEL) se podría presentar incompatibilidad ya que no se define una sola respuesta para cada componente (Datos no mostrados), los demás excipientes presentan cambio de estado a diferente temperatura. En el análisis de tamaño de partícula por el método de difracción de rayos láser se obtuvo un tamaño promedio de 10.65 µm para CH con una distribución en la que el 100% de la muestra es menor a 15 µm (Figura 9). La forma de la partícula del fármaco se observó con objetivo 40x obteniendo que CH presenta partículas de forma columnar y acicular, ver Figura 10. Con las características anteriores se logró plantear una estrategia adecuada en la selección de procesos y componentes que nos ayudó a colocar en práctica la fabricación de microcápsulas que fomenten la conservación y características de solubilidad de la molécula, que es una base irrefutable de la necesidad de nuevas alternativas tecnológicas para protección contra su inestabilidad, que desde el punto de vista estructural presenta centros reactivos -SO₂- que sugiere la posible formación de benceno sulfonato dependiendo de las condiciones, por lo que es necesario proporcionar una protección para promover la estabilidad de la molécula activa.

Tabla 8. Interacción de CH con los excipientes.

Muestras: Principio activo / Excipiente (1:1)	Punto de fusión (°C)	Temperatura Ambiente sin luz (1 mes)	Temperatura Ambiente con luz (1mes)	60°C (1 mes)	60°C/85%H.R. (1mes)
CH	239.0				Polvo color grisáceo
CH + OPA	193.4				Mezcla homogénea de polvos de color ligeramente grisáceo
CH + CSD	---				Mezcla homogénea de polvos de color ligeramente grisáceo
CH + GRE	36.6				Mezcla homogénea de polvos de color amarillo ligeramente grisáceo
CH + LAC	203.0	Sin cambio			Mezcla homogénea de polvos de color ligeramente grisáceo
CH + CEL	148.0				Mezcla homogénea de polvos de color ligeramente grisáceo
CH + TAL	---				Mezcla homogénea de polvos de color ligeramente grisáceo
CH + EtOH	---				El líquido cambió a color gris oscuro
CH + PAN	263.1				El líquido cambió a color amarillo-gris
CH + OM	221.5				El líquido cambió a color gris claro
CH + GRI	249.9				El líquido cambió a color amarillo-gris
CH + EUD	212.7				El líquido cambió a color gris muy claro
CH + KIR	396.6				El líquido cambió a color gris claro

CH = Clortalidona; EtOH = Etanol; PAN = Panodan SDK; MO = Aceite mineral; W_x = Fase acuosa externa; GRI = Grinsted PGPR; EUD = Eudragit® L30D-55, OPA = Opadry® II; KIR = Kollicoat® IR; CSD = Dióxido de silicio, GRE = Grenetina; LAC = Lactosa, CEL = Celulosa; TAL = Talco.

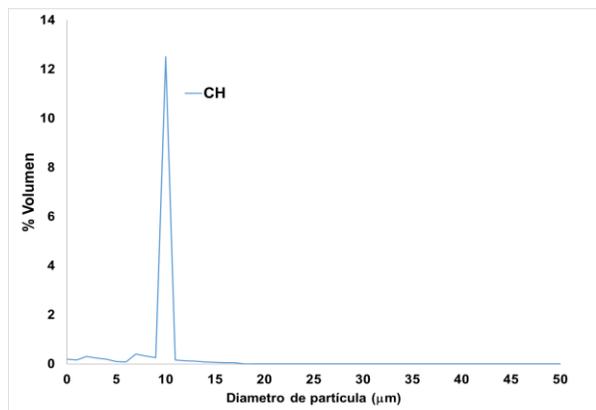


Figura 9. Distribución de Tamaño de partícula de CH.



Figura 10. Microscopia óptica de CH en objetivo 40x.

7.2. Tamaño de gota, morfología y estabilidad de las emulsiones dobles.

Todas las emulsiones dobles estaban formadas por gotitas de MO esféricas que contenían dentro de ellas un gran número de gotas de EtOH ($d_{1,0} = 0,12 \mu\text{m}$, conocida como morfología de tipo C (figura 12b, 12c, 12d; Garti, 1997). Las emulsiones dobles recién fabricadas ($\text{EtOH}_1 / \text{MO} / W_{\text{KIR}}$, $\text{EtOH}_1 / \text{MO} / W_{\text{OPA}}$ y $\text{EtOH}_1 / \text{MO} / W_{\text{EUD}}$) mostraron diferencias no significativas $d_{1,0} = 5,6 \pm 0,66 \mu\text{m}$, lo que indica que la composición del material de pared no afectó a el tamaño de gota inicial, Ver Figura 11. La estabilidad de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión depende en gran medida de la estabilidad de las emulsiones dobles alimentada por secador por aspersión. La Figura 13 muestra la variación de tamaño en volumen $d_{4,3}$ con el tiempo de fabricación para la emulsión interna de EtOH / MO y para las emulsiones dobles de EtOH / MO / W_x . Todas las emulsiones mostraron muy poca variación en tamaño de volumen $d_{4,3}$ hasta 120 h. En tiempos de fabricación más largos, todas las emulsiones mostraron un fuerte aumento en el tamaño de gota. Por lo tanto, si el secado por aspersión de las EtOH / MO / W_x se realiza dentro de las 120 h de la formación de las emulsiones dobles, ningún efecto adverso debería afectar al SDE promovido por la inestabilidad de las emulsiones dobles.

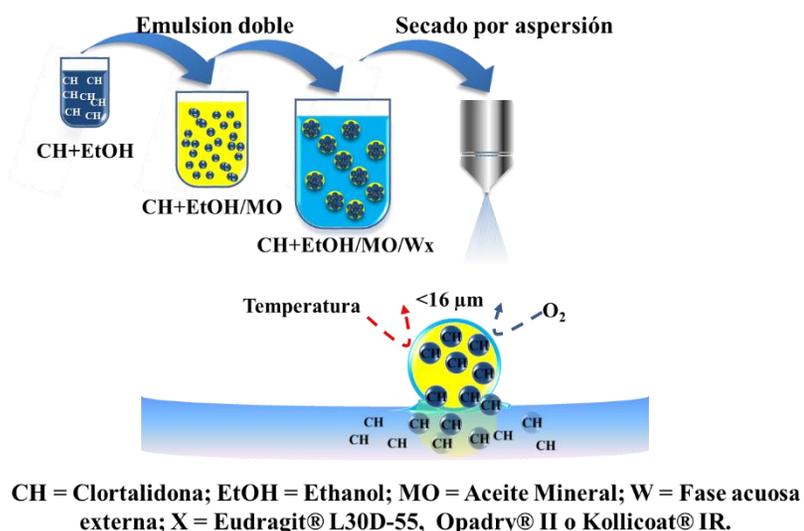


Figura 11. Formulación de microcápsulas por SDE.

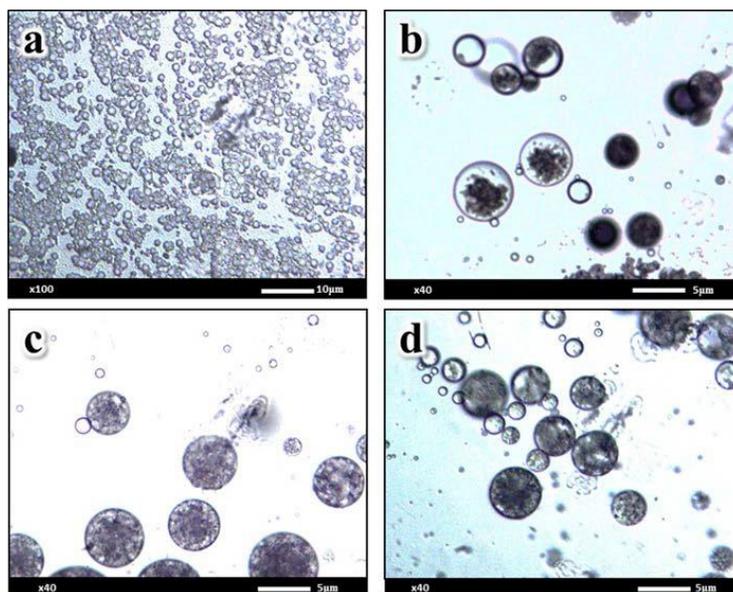


Figura 12. Micrografías de emulsiones simple y doble recién preparadas de CH: (a) EtOH₁/MO, (b) EtOH₁/MO/W_{KIR}, (c) EtOH₁/MO/W_{OPA} y (d) EtOH₁/MO/W_{EUD}.

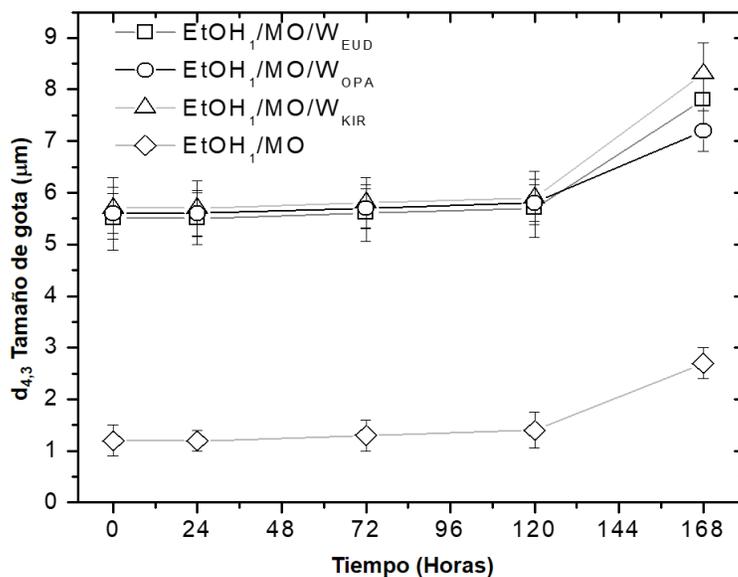


Figura 13. Variación del tamaño de gota volumétrico promedio (d_{4,3}) con respecto al tiempo después de la fabricación: EtOH₁/MO/W_{EUD} (-□-), EtOH₁/MO/W_{OPA} (-○-), EtOH₁/MO/W_{KIR} (-△-) y EtOH₁/MO (-◇-).

7.3. Tamaño y morfología de microcápsulas

La Figura 14 muestra la topografía de las microcápsulas SDE_x (figuras x3a-c). Las microcápsulas SDE_x se caracterizaron por mostrar una forma esférica definida, con una superficie homogénea y lisa, sin evidencia de agujeros y/o fracturas. Tampoco mostraron diferencias significativas en el tamaño de partícula que fue de $16.50 \pm 0.21 \mu\text{m}$ para SDE_{EUD} (figura 14a), $16.14 \pm 0.32 \mu\text{m}$ para SDE_{OPA} (figura 14b) y $16.42 \pm 0.32 \mu\text{m}$ para SDE_{KIR} (Figura 14c). Los tamaños de partículas de SDE_x fueron significativamente mayores que el tamaño de gota de las emulsiones de $\text{EtOH}_1 / \text{MO} / W_x$ de las que se originaron. Esto se debe a la naturaleza del proceso de secado por aspersión. La combinación de altas temperaturas que exceden el punto de ebullición del agua, EtOH y del aire atrapado provoca una expansión en forma de globo de las gotas en la emulsión, impulsadas por el aumento de la presión parcial de los gases disueltos al aumentar la temperatura. Esta expansión continúa hasta que se alcanza y excede un umbral de presión parcial de los gases y en este punto, la difusión selectiva de los gases atrapados ocurre a través de la red de material de la pared viscosa (Rodríguez-Huezo et al., 2004).

Se determinó la morfología de las microcápsulas mediante SEM encontrando estructuras simétricas con poca influencia del material de pared en la descripción de la pared, ver Figura 14.

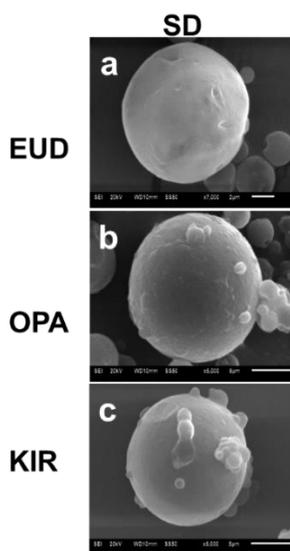


Figura 14. Micrografías de microcápsulas de CH: a) SDE_{EUD} , b) SDE_{OPA} , c) SDE_{KIR} .

7.4. Rendimiento y eficiencia de microencapsulación

Al variar el tipo de material de pared utilizada en la producción de microcápsulas, se observaron diferencias en la morfología y tamaño de las partículas, pero no se encontró diferencia en el rendimiento del proceso (> 85%) y la prueba de contenido (> 98%) para los materiales de pared, ver Tabla 9.

Como puede observarse en la Tabla 9, el proceso de microencapsulación logro un alto rendimiento del producto y una eficacia de encapsulación de CH. El rendimiento del producto fue superior al 86% para SDE_x , lo que indica que el proceso de microencapsulación tienen un rendimiento de producto eficiente. Las pérdidas de material se pueden atribuir a lo que ocurre normalmente en el secado por aspersión (adherencia a las paredes del secador). Estas pérdidas de materiales influyeron en los resultados de eficiencia de microencapsulación. En este punto, debe afirmarse que los cristales de CH tenían una pureza del 98,52%. La eficacia de encapsulación de CH fue superior al 98% (p / p) en todas las microcápsulas y en el caso particular de SDE_x se encontró que era superior al 100%. Estos resultados sugieren que la CH estaba bien integrada en la mayor parte de los ingredientes de la formulación y que las pérdidas de masa durante el procesamiento fueron sufridas principalmente por ingredientes de formulación distintos de la CH. Los rendimientos obtenidos por ambos procesos de microencapsulación fueron más altos que los reportados para otras técnicas de microencapsulación. Hu et al. (2006) informaron un rendimiento del 70% para Simvastatin encapsulado por el método de cristalización usando Eudragit® como material de pared. Alhnan et al. (2011) informaron rendimientos de 87% a 100% cuando encapsulaban prednisolona mediante secado por aspersión usando como materiales de pared el tipo S o L de Eudragit.

Tabla 9. Rendimientos de Proceso y eficiencia de microencapsulación.

Código	Rendimiento (%)	Eficiencia de Microencapsulación para CH Ci (%)
CH	----	98.52 ± 0.49 ^{d,e}
SDE_{EUD}	86.43 ± 1.24 ^x	102.55 ± 0.33 ⁱ
SDE_{OPA}	92.49 ± 1.60 ^y	102.18 ± 0.70 ^{h,i}
SDE_{KIR}	87.23 ± 0.83 ^x	102.50 ± 0.44 ⁱ

7.5. Estabilidad

La estabilidad de CH contenida en microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersion de emulsiones dobles se mejoró significativamente en comparación con la de CH cristalina, con el material de la pared evaluado. Se ha establecido que el secado por aspersion de emulsión doble usando etanol en lugar de agua en la fase interna es una buena alternativa a las técnicas de encapsulación estándar para la protección y para conseguir la liberación inmediata de CH.

El fármaco no presentó incompatibilidad a temperatura ambiente en ausencia y presencia de luz, pero a 60 °C y 60°C/85% H.R. se detectaron cambios físicos aparentes con los excipientes por efecto de la temperatura y humedad por lo que los cambios observados corresponden al fármaco y no a incompatibilidad fármaco-excipiente. Con las características anteriores se logró plantear una estrategia adecuada en la selección de procesos y componentes que nos ayudó a colocar en práctica la fabricación de microcápsulas que fomenten la conservación de la molécula.

7.5.1. Estabilidad acelerada

Las muestras de degradación fueron obtenidas bajo condiciones de estrés por temperatura (40 °C) y humedad (75%) y se observa que las microcápsulas tienen mayores ventajas en la estabilidad que la forma cristalina de la CH, las muestras fueron analizadas de igual forma que la muestra control (inicial, 1 mes, 2 meses y 3 meses), tanto la forma cristalina de la CH y cada formulación propuesta demostraron que en 3 meses de estrés la máxima degradación se presentó en la muestra de CH sin tratamiento previo pero en el caso de las microcápsulas la muestra obtenida por secado por aspersion con KIR fue la que presento el porcentaje de degradación más alto (1.76%) ver resultados en la Tabla 10, que en comparación con la forma cristalina que muestra un grado de degradación de más del 20.50%.

Tabla 10. Estudio de estabilidad acelerada 40°C/75% H.R.

Código	Eficiencia de Microencapsulación para CH Ci (%)	Estabilidad acelerada (40°C/75% R.H.)			
		1 mes C _{1m} (%)	2 meses C _{2m} (%)	3 meses C _f (%)	Perdida de CH Cf - Ci (%)
CH	98.52 ± 0.49 ^{d,e}	92.34 ± 0.65	85.32 ± 1.21	78.02 ± 1.81 ^a	-20.50
SDE _{EUD}	102.55 ± 0.33 ⁱ	101.98 ± 0.18	101.45 ± 0.24	101.22 ± 0.86 ^{g,h,i}	-1.33
SDE _{OPA}	102.18 ± 0.70 ^{h,i}	101.67 ± 0.06	100.87 ± 0.43	100.42 ± 0.34 ^{f,g,h}	-1.76
SDE _{KIR}	102.50 ± 0.44 ⁱ	102.08 ± 0.21	102.10 ± 0.32	101.55 ± 0.39 ^{h,i}	-0.95

7.5.2. Termooxidación DSC

La Figura 15a muestra los termogramas de flujo de calor como función de la temperatura de un blanco de N₂ y cristales de CH. La respuesta de fondo lineal corresponde a el gas N₂, mostrando sólo pequeñas fluctuaciones sin efectos exo-y endotérmico. Los cristales de CH presentaron fluctuaciones bien definidas de forma exotérmicas que corresponden a las temperaturas reportadas en la Tabla 8 para las diferentes tasas de calentamiento (β 's) 2,5, 5,0, 7,5 y 10 °C min⁻¹, respectivamente, lo que indica que estos picos son debidos a el proceso de oxidación. La figura 15b muestra el termograma del material de pared EUD a las mismas tasas de calentamiento (β 's), donde se reportan fluctuaciones exotérmicas mucho más altas (Tabla 11) que los descritos para los cristales de CH. Estos resultados indican que las fluctuaciones exotérmicas mostradas por dicho material de pared pueden ayudar a la estabilización de CH ya que presenta mayor energía de descomposición. Las temperaturas máximas exotérmicas (TMP) para las microcápsulas obtenidas con procesos de encapsulación (Tabla 11 y la figura 15c) se llevó a cabo entre 260 y 295 °C, estos intervalos están por encima los datos obtenidos para los cristales de CH, lo que indica que CH sin encapsular es menos estable que cuando está microencápsulada.

Tabla 11. Estabilidad térmica oxidativa.

β (°C min ⁻¹)	CH	SDE _{EUD}	SDE _{OPA}	SDE _{KIR}
	T _{MP} (°C)	T _{MP} (°C)	T _{MP} (°C)	T _{MP} (°C)
2.5	225.0 ± 0.23	280.1 ± 0.31	245.1 ± 0.56	250.4 ± 0.18
5	230.6 ± 0.28	285.0 ± 0.54	250.9 ± 0.38	255.7 ± 0.20
7.5	235.7 ± 0.12	290.3 ± 0.32	255.1 ± 0.28	260.2 ± 0.28
10	240.1 ± 0.34	295.6 ± 0.43	260.3 ± 0.47	265.3 ± 0.04
Parámetros cinéticos				
E _a (kJ/mol)=	186.1 ± 0.10 ^a	228.7 ± 0.08 ^d	201.1 ± 0.12 ^b	204.9 ± 0.09 ^c
r ²	0.96	0.98	0.95	0.97

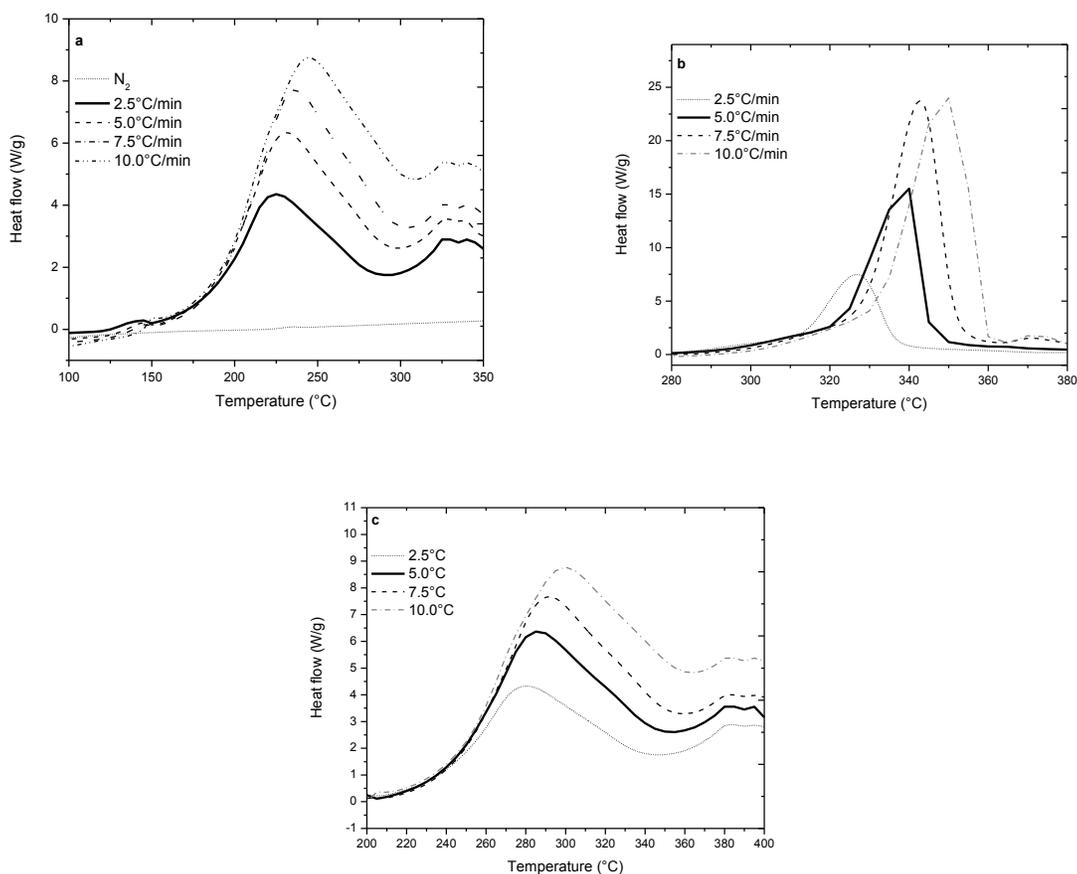


Figura 15. Termogramas de: a) N₂ blanco y CH, b) EUD y c) SDE_{EUD}.

La energía de activación (E_a) del proceso de oxidación para los cristales de CH y las SDE_x microcápsulas se presentan en la Tabla 11. Hay amplia evidencia que corrobora la idoneidad de KIR para la protección de los fármacos contra la degradación (Schoubben y col., 2009). Se ha reportado que el material de pared KIR presenta una buena protección contra la degradación de Simvastatina (familia de las estatinas) en condiciones de estrés (40 °C/75% H.R.) durante 3 meses (Hu y col., 2006). Del mismo modo, materiales derivados de celulosas y esteres acrílicos se consideran como agentes de barrera muy eficaces contra la humedad y su empleo dependerá de la solubilidad deseada en el producto final (Jeong y Park, 2008; Hamedelniei y col, 2011).

A partir de estos resultados se infiere que las microcápsulas con KIR como material de pared dificulta la difusión de oxígeno en la microcápsula y proporciona una mejor estabilidad frente a la oxidación para CH.

7.6. Liberación in vitro de las microcápsulas de CH

Una característica importante que se espera de las microcápsulas que contienen CH es su capacidad para liberar rápidamente el fármaco. Por lo tanto, los perfiles de disolución *in vitro* de CH de las microcápsulas SDE_x (figura 16) se determinaron y compararon con los de CH y se contrastaron con el valor deseado para CH > 80% en 20 min, (Oster y Kissel, 2005). El perfil de disolución de CH alcanzó 80% de solubilidad en 15 minutos. Todas las microcápsulas SDE_x liberaron al menos un 80% de CH en 10 minutos. Estos perfiles de liberación indican que todas las microcápsulas formuladas cumplieron con la especificación deseada de CH 80% liberador en 20 min, y presentaron perfiles de liberación equivalentes o superiores que CH, independientemente del material de la pared y el proceso de microencapsulación utilizado. En el caso de las microcápsulas SDE_x, las creadas con EUD mostraron una liberación de CH significativamente mayor (~ 93%), que cuando se usaron OPA (~ 86%) o KIR (~ 83%) como materiales de pared después de 10 minutos. Estos resultados indican que la microencapsulación mediante secado por aspersión de emulsiones dobles mejoran eficazmente la solubilidad de CH.

La disolución completa (100%) se obtuvo en aproximadamente 20 minutos para todas las formulaciones. La Figura 16 muestra los perfiles de disolución de las formulaciones de secado por aspersión para los diferentes polímeros. Independientemente del tipo de polímero

(EUD, OPA o KIR), la disolución o grado de liberación de CH en los procesos no se encontró afectada.

El tiempo para alcanzar la concentración máxima de la solución (T_{max}) para formulaciones con 15% (w/w) del polímero estuvo dentro de los 20 min, ver Figura 16, independientemente del tipo de polímero usado. La liberación del fármaco de las microcápsulas del polímero fue controlada por la formación de una suspensión que favoreció la difusión de la droga a través de la capa límite cerca de la superficie de disolución. Dado que la velocidad de disolución de CH fue similar que, en los procesos realizados, es razonable sugerir que la liberación inmediata fue el resultado de la formulación. Mezclando el fármaco con los polímeros (emulsión solida) y el desarrollo de las interacciones entre ellos puede también tomar lugar un rol en controlar la liberación del fármaco de las formulaciones.

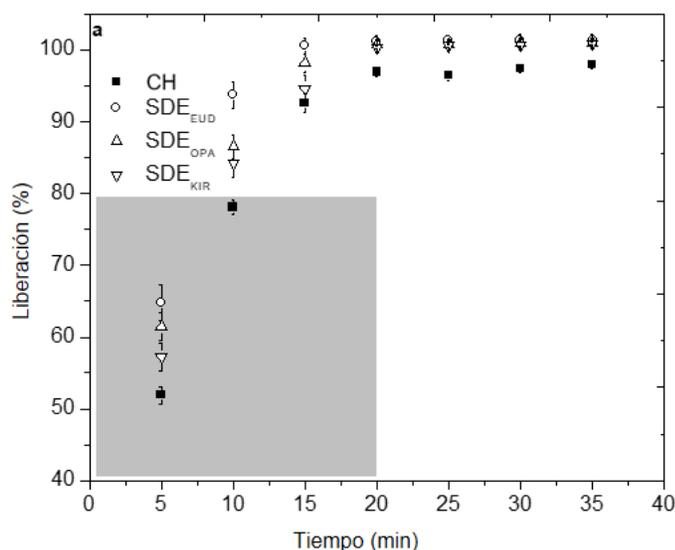


Figura 16. Perfil de disolución para CH y CH microencápsulada: CH (-■-), SDE_{EUD} (-○-), SDE_{OPA} (-△-) and SDE_{KIR} (-▽-).

7.7. Evaluación de la permeabilidad

La biodisponibilidad de fármacos administrados vía oral depende de su absorción y de su metabolismo. Entre los factores que determinan la absorción de un compuesto se encuentran la permeabilidad y las características de su transporte a través de la mucosa intestinal.

Antes de evaluar la cantidad de CH permeada se vio la necesidad de estandarizar la metodología de cuantificación debido a que las concentraciones trabajadas son a nivel de trazas, encontrando que el método es suficientemente sensible para su aplicación en la detección y cuantificación de CH permeada por la técnica de intestino de rata no evertido. La Tabla 12, muestra que los parámetros evaluados cumplen con las especificaciones para la estandarización de métodos con concentraciones \leq a 1 $\mu\text{g/mL}$ recomendadas en las guías de validación.

Tabla 12. Resultados de los parámetros de la estandarización.

Parámetro	Resultado	Criterios de aceptación
Linealidad	$r^2 = 0.9988$	$r^2 > 0.995$
Límite de detección	0.01169 $\mu\text{g/mL}$	Menor a la concentración del primer muestreo
Límite de cuantificación	0.03541 $\mu\text{g/mL}$	Menor a la concentración del primer muestreo
Eficiencia de recobro	$r^2 > 0.9986$ CV: 2.46% X: 102.66%	$r^2 > 0.995$ CV: 8.0% 70% a 120%
Reproducibilidad	CV < 5.95%	CV < 8.0%
Estabilidad de la muestra	101.6% CV: 6.5% 1 di 1: 1.62	70% a 120% CV < 8.0% 1 di 1 < 2

El método para la determinación de CH permeada por HPLC/UV fue lineal y reproducible con un límite de cuantificación menor a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (concentración del primer muestreo). El método analítico fue suficientemente sensible para su aplicación en estudios farmacocinéticos de CH.

Una vez corroborado que el método de cuantificación es confiable, se procedió a la evaluación de la permeabilidad in vitro en intestino de rata no evertido tanto de la CH microencapsulada, como de la CH y los resultados se observan en la Figura 17. La CH derivada de los sistemas especializados de microcápsulas atraviesan el epitelio intestinal murino en mayor magnitud (45.7 μg en 15 min) y en un menor tiempo a diferencia del fármaco libre (5.7 μg en 15 minutos).

La microencapsulación mostró importantes mejoras en la solubilidad que se vio refleja en la magnitud de la CH permeada.

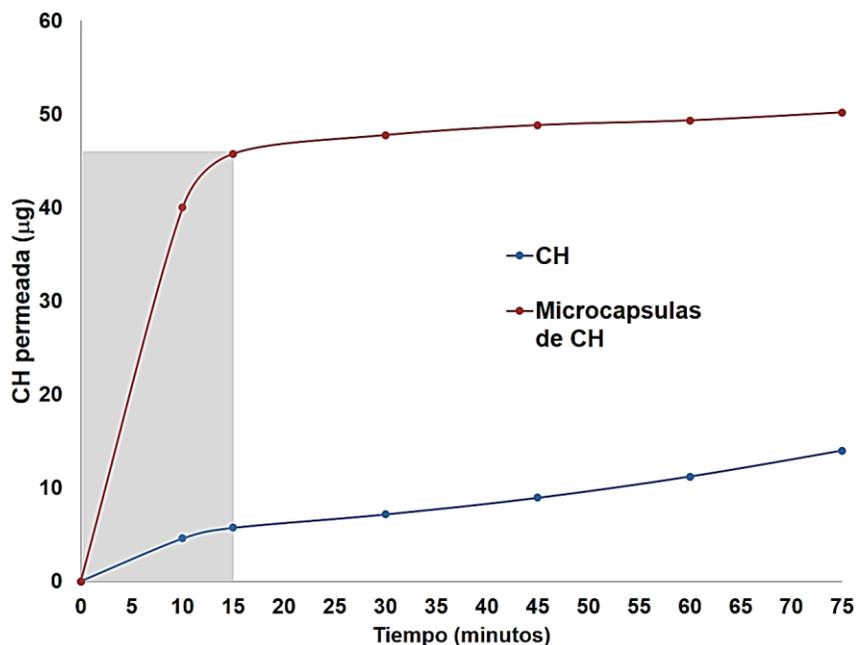


Figura 17. Perfil de permeabilidad en intestino de rata de CH vs microcápsulas de CH.

7.7.1. Perfiles de Disolución y Permeabilidad

La disolución y la permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales que describen la velocidad y el nivel de absorción. Estos análisis permiten evaluar los procesos de absorción por vía oral y son empleados como criterios para el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. En este proyecto, se trabajó con el modelo cinético continuo de disolución y permeabilidad in vitro para evaluar el efecto de la formulación sobre la absorción de CH microencapsulada de liberación inmediata.

El análisis de resultados de la disolución y permeabilidad revelan que la microencapsulación ha mejorado la solubilidad del fármaco (Figura 16) y por ende el paso a través de las membranas del epitelio intestinal, ver Figura 17.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de esta investigación reflejan que la tecnología de microencapsulación por secado por aspersión presenta gran impacto en la estabilidad de la CH, ya que son una alternativa en la industria farmacéutica; se puede determinar sus ventajas y características de los productos obtenidos mediante un correcto diseño de formulación. En primer lugar, el desarrollo de microcápsulas por secado por aspersión mediante la formulación de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ demuestra una correcta incorporación de los componentes ya que se determina las propiedades en morfología, tamaño y condiciones de proceso muy importante para las características reológicas de las microcápsulas obtenidas.

De las formulaciones propuestas, todas presentaron morfologías simétricas con un perfil de disolución adecuado para CH (>80% a los 15 min) con respecto a la referencia (>80% a los 20 min), con un rendimiento de proceso de 70% a 80% w/w y una prueba de contenido de fármaco superior a 98.5% para todas las evaluaciones.

Dentro de las diferencias encontradas, las características morfológicas de las microcápsulas son simétricas, lisa, sin poros y uniforme.

La confirmación de la estabilidad química de las sustancias por técnicas convencionales, no dan cuenta de las variaciones en la energía que presentan las microcápsulas, que pueden influir en el desempeño farmacéutico de los productos. Es importante que en el caso de fármacos cuya estabilidad sea crítica, se realice un estudio de Ea de manera que se pueda elegir la mejor formulación.

Para las microcápsulas de CH, donde utilizando la técnica de análisis térmico por CDB se evalúan diferentes polímeros formadores de pared y metodologías de fabricación se observa que algunas de ellas presentan una Ea mayor hasta de 59 KJ/mol de diferencia e inferior de 15 KJ/mol, sobre el valor de referencia.

La confirmación de la estabilidad química de las sustancias por las técnicas convencionales no tiene en cuenta las variaciones en Ea de las microcápsulas, que pueden influir en el desempeño de los productos farmacéuticos. Es importante realizar un estudio de estabilidad térmica oxidativa para los fármacos cuya estabilidad es crítica, para que su pueda discriminar entre las formulaciones en menor tiempo y solo evaluar las formulaciones que

presenten mayores valores de E_a , por un estudio de estabilidad acelerada con una alta probabilidad de éxito.

Los resultados muestran que el encapsulado micrométrico aumenta la solubilidad de la CH cumpliendo con las especificaciones que marca la USP-NF, 2012.

Los resultados obtenidos apoyan la aseveración de que al proporcionar un ambiente tanto hidrofóbico como hidrofílico a la CH, la cantidad absorbida es mayor que cuando se encuentra como fármaco puro.

Por lo tanto, la técnica de encapsulación representa una alternativa tecnológica capaz de mejorar la absorción de fármacos clase IV como la CH.

9. REFERENCIAS

- Abrahamsson B. y H. Lennernas, "Application of the Biopharmaceutic Classification System Now and in the Future", en: *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, editado por H.V. Waterbeemd, H. Lennernas y P. Artursson, Wiley-vch, Germany, 2003, Volumen 18, pp. 520-521.
- Alfonso R. Remington Pharmacy. Science and Practice of Pharmacy. 20va. Ed. Médica Panamericana, 2007: 345-76.
- Al-Haj, N., Rasedee, A., 2009. Solid Lipid Nanoparticles Preparation and Characterization. *Int. J. Pharm.* 5,90-93.
- Alhnan, M. A., E. Kidia., Basit, A. W., 2011. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 432-439.
- Amidon GL, Lennernas H, Shah VP and, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12, 413-420.
- Apu, A. S., Pathan, A. H., Shrestha, D., Kibria, G., Jalil, R. U., 2009. Investigation of In vitro Release Kinetics of Carbamazepine from Eudragit (R) RS PO and RL PO Matrix Tablets. *Trop. J. Pharmaceut. Res.* 8,145-152.
- Artursson P, K. Palm y K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 46, 27-43 (2001).
- ASTM., 1984. Arrhenius kinetic constants for thermally unstable materials. A. b. o. A. STANDARD. Filadelfia, EUA, American Society for Testing and Materials: 1021-1040.
- Avdeef A, "Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability and Charge State", editado por John Wiley & Sons, Inc, Wiley-Interscience, EE.UU., 2003, pp. 7-11.
- Baena Y, J. A. Pinzón, H. J. Barbosa y F. Martínez, Temperature-Dependence of the Solubility of Some Acetanilide Derivatives in Several Organic and Aqueous Solvents, *Physics and Chemistry of Liquids*, 42 (6), 603-613 (2004).

- Bai, G., Wang, Y., Armenante, P. M., 2011. Velocity profiles and shear strain rate variability in the USP Dissolution Testing Apparatus 2 at different impeller agitation speeds. *Int. J. Pharm.* 403,1-14.
- Becher, P. 2001. Emulsions: Theory and Practice, 3rd edition. Washington: American Chemical Society.
- Bermejo M y Amidon G. L., "Modern Biopharmaceutics", 6th version, TSRL inc., Michigan, U.S.A., 2003, Predicting Fa module.
- Borini, G. B., Andrade, T. C., Freitas, L. A. P., 2009. Hot melt granulation of coarse pharmaceutical powders in a spouted bed. *Powder Technol.* 189,520-527.
- Calderon, R. M., Cubeddu, L. X., Goldberg, R. B., Schiff, E. R., 2010. Statins in the treatment of dyslipidemia in the presence of elevated liver aminotransferase levels: a therapeutic dilemma. *Mayo. Clin. Proc.* 85,349-356.
- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J. F., Pérez-Alonso, C., 2012. Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polym.* 87,1231-1235.
- Chitneni M, Peh K, Darwis Y, Abdulkarim M, Abdullah GZ, Qureshi MJ. Intestinal permeability studies of sulpiride incorporated into self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *Pak. J. Pharm. Sci.* 2011; 24 (2): 113-21.
- Collings, A. J., Schneider, R., 1970. The multiple emulsion formulation for the slow release of drugs. *Brit. J. Pharmacol.* 38,469P.
- Corti G, F. Maestrelli, M. Cirri, S. Furlanetto y P. Mura, Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption I. Assessment of artificial membrane composition, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27, 346-353 (2006).
- Dickinson, E. 2009. Hydrocolloids as emulsifier and emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloid.* 23,1473-1482.

- Dickinson, E., McClements, D.J., 1996. Londres: Chapman & Hall. *Adv. Food. Colloid.*
- Dixit, P., D. K. Jain and J. Dumbwani., 2012. Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus. *J. Pharmacol. Toxicol.* 65(1): 13-17.
- El-Kattan A, Hurst S, Brodfuehrer J and Lot C-M. Oral Bioavailability: Anatomical and physiological factors affecting oral drug bioavailability in rats, dogs, and humans, primera edición, editado por Ming Hu and Xiaoling Li. Hoboken, New Jersey.2011: 253-65.
- Favaro, C., Santana, E., Monterrey, M., Netto, T., Netto, F., 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloid.* 24,336-340.
- Florence, A.T., Whitehill, D., 1981. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 79,243-256.
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *Int. J. Pharm.* 415,34-52.
- Fuchs, M., Turchiuli, C. M., Bohin, M., Cuvelier, C., Ordonnaud, M. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *J. Food Eng.* 75,27-35.
- Garti, N., 1997. Double emulsions -- scope, limitations and new achievements. *Colloids. Surface. A.* 123-124, 233-246.
- Garti, N., Bisperink, C., 1998. Double emulsions: Progress and applications. *Curr. Opin. Colloid. In. Sci.* 3,657-667.
- Garti, N., y Reichman, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Struct.* 12,411-426.
- Guerra, P., 2005. Interacciones farmacológicas. Retrieved 21 de Septiembre de 2009, from http://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/Enfermeria/Enf_T5.pdf.

- Hamedelniei, E. I., Bajdik, J., Sovány, T., Pintye-Hódi, K., 2011. Delayed release matrix pellet preparation containing an alkalizing pore-former agent". *Chem. Eng. Res. Des.* 89, 1006-1010.
- Han, X., Ghoroi, C., To, D., Chen, Y., Davé, R., 2011. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. *Int. J. Pharm.* 415,185-195.
- Hines, P. J. 1995. Thermal methods of analysis: principles, applications and problems. Great Britain: Blackie Academic and Professional.
- Hu, R., Zhu, J., Chen, G., Sun, Y., Li, M., Li, S., 2006. Preparation of sustained-release simvastatin microspheres by the spherical crystallization technique. *Asian. J. Pharm. Sci.* 47-52.
- Huang, X., Kakuda, Y., y Cui, W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloid.* 15,533–542.
- ICH, 2006. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). Q1A(R2), Quality Guidelines, In: International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland. 1–18.
- Jager-Lezer, N., Denine, R., Grossiord, J.L., Wepierre, J., Rault, S., Seiller, M. 1996. Formulating multiple emulsions with moisturizing actives. *Cosm. Toilet.* 111,53-58.
- Jeong, S. H., Park, K., 2008. Development of sustained release fast-disintegrating tablets using various polymer-coated ion-exchange resin complexes. *Int. J. Pharm.* 353, 195-204.
- Jiao, J., Burgess, D. J. 2003. Ostwald ripening of water-in-hydrocarbon emulsions. *J. Colloid. Interface. Sci.* 264,509–516.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Roman-Guerrero, A. y Vernon-Carter, E. J. 2009. Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complex. *Food Hydrocolloid.* 23,2425-2433.

- Kansy M, F. Senner y K. Gubernator, Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, *J. Med. Chem.*, 41 (7), 1007-1010 (1998).
- Katneni K, Charman SA, Porter CJ. Permeability assessment of poorly water soluble compounds under solubilizing conditions: The reciprocal permeability approach. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95 (10): 2170-85.
- Kissel, T., Maretschek, S., Packhäuser, C., Schnieders, J., Seidel, N., 2005. Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry, in: Benita, S. (Ed.), *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, 2nd Ed. Taylor & Francis, New York. 99-122.
- Kwak, H., Ihm, M., Ahn, J. 2001. Microencapsulation of β -galactosidasa with fatty acid esters. *J. Dairy Sci.* 84,1576-1582.
- Lala, R. Nandgaonkar, N., 2011. Absorption studies using inverted intestine segment: a tool for estimation of dissolution – absorption correlation of a controlled release formulation. *Ind J. Pharm. Edu. Res.* 45 (1): 54- 7.
- Leal-Calderon, F.; Schmitt, V.; Bibette, J. *Emulsion Science: Basic Principles*, 2nd Edn. Springer: New York, 2007.
- Leiman, F., Goncalves, O., Machado, R., Bolzan, A. 2009. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Mater. Sci. Eng.* 29,430-436.
- Lieberman, H. A., Lachman, L., Schwartz, J. B., 1989. *Pharmaceutical Dosege Forms: Tablets*. United States of America, New York.
- Lim, G. J., Zare, S., Van Dyke, M., Atala, A., 2010. Cell microencapsulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 670,126-136.
- Lindenberg M., Kopp S. y Dressman J., Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58, 265-278 (2004).

- Liu Y, Zhang M, Zhu J, Jia J, Liu Ym, Liu G, et al. Bioequivalence and Pharmacokinetic Evaluation of Two Formulation of Glimepiride 2 mg: A Single-Dose, Randomized-Sequence, Open-Label. Two-Way Crossover Study in Healthy Chinese Male Volunteers. *Clinthera*. 2010; 32(5):986-95.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., 2006. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from $W_1/O/W_2$ multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Res. Int.* 39,678-685.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E. J., 2008. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W_1/O/W_2$ emulsions and skim milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 41,1847-1856.
- Madene, A., Scher, J., Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 4,1-21, 2006.
- Mahajan, H. S., B. V. Tatiya and P. P. Nerkar., 2012. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. *Powder Technol.* 221(0): 168-176.
- Mahomoodally, M. F., A. Gurib-Fakim and A. H. Subratty., 2007. Effect of exogenous ATP on *Momordica charantia* Linn. (Cucurbitaceae) induced inhibition of d-glucose, l-tyrosine and fluid transport across rat everted intestinal sacs in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 110(2): 257-263.
- Mälkiä A, L. Murtomäki, A. Urtti y K. I. Kontturi, Drug permeation in biomembranes In vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 23, 13–47 (2004).
- Marano, C. G., Lufrano, P., 1991. Estudio de la Absorción in vitro de Ranitidina. I. Efecto del ayuno y el Ión Potasio. *Acta Pharm. Bonaerense.* 10 (3): 145-51.

- Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Debeaufort, F., Voilley, A. 2010. Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavor release. *J. Carbohydr. Polymer.* 80,984-988.
- McClements, D. J., 2005. Food Emulsion: Principles, practices, and techniques (2nd Ed.). Boca de Raton, FL: CRC Press.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Weiss, J., 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food. Sci.* 72,R109-124.
- McMaster, L., Kokott, S., Mazutti, P. 2005. Micro-encapsulation of Bifidobacterium lactis for incorporation into soft foods. *World J. Microb. Biot.* 21,723-728.
- Morkhade, D. Joshi, S. 2007. Evaluation of gum damar as a novel microencapsulating material for ibuprofen and diltiazem hydrochloride. *Indian J. Pharm. Sci.* 69,263-268.
- Murua, A., Portero, A., Orive, G., Hernandez, R. M., de Castro, M., Pedraz, J. L., 2008. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J. Control. Rel.* 132,76-83.
- Murua, B., Beristain, C., Martínez, F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J. Food Eng.* 91,380-386.
- Naeem-Aamir, M., Ahmad, M., Akhtar, N., Murtaza, G., Ali-Khan, S., Shahiq-uz-Zaman., Nokhodchi, A., 2011. Development and in vitro-in vivo relationship of controlled-release microparticles loaded with tramadol hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 407,38-43.
- Nicoletti, J. F., Telis, V. R. N., 2009. Viscoelastic and Thermal Properties of Collagen-Xanthan Gum and Collagen-Maltodextrin Suspensions During Heating and Cooling. *Food. Biophys.* 4,135-146.
- Nomura, S., 2008. Statin and endothelial cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemostasis.* 100,377-378.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Osborne, J. D., Sochon, R. P. J., Cartwright, J. J., Doughty, D. G., Hounslow, M. J., Salman, A. D., 2011. Binder addition methods and binder distribution in high shear and fluidised bed granulation. *Chem. Eng. Res. Des.* 89,553-559.
- Oster, C. G., Kissel, T., 2005. Comparative study of DNA encapsulation into PLGA microparticles using modified double emulsion methods and spray drying techniques. *J. Microencapsul.* 22, 235-244.
- Parrott N., Lave T. Applications of Physiologically Based Absorption Models in Drug Discovery and Development. *Mol. Pharmaceut.* 2008; 5(5): 760 - 75.
- Pérez-Alonso C., Báez-González J. G., Beristain C. I., Vernon-Carter E. J., Vizcarra-Mendoza M. G., 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for the use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr. Polym.* 53,197-203.
- Pérez-Alonso, C., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J. F., Rodríguez-Huezo, M. E., Báez-González, J. G., Vernon-Carter, E. J., 2008. DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *J. Food. Eng.* 85,613-624.
- Pérez-Alonso, C., Fabela-Moron, M. F., Guadarrama-Lezama, A. Y., Barrera-Pichardo, J. F., Alamilla-Beltran, L., Rodríguez-Huezo, M. E., 2009. Interrelationship between the structural features and rehydration properties of spray dried manzano chilli sauce microcapsules. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 8,187-196.
- Pérez-Orozco, J. P., Barrios-Salgado, E., Román-Guerrero, A., Pedroza-Islas, R., 2011. Interaction of mesquite gum-chitosan at the interface and its influence on the stability of multiple emulsions ($W_1/O/W_2$). *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10,487-499.
- Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E. J., 2009. Encapsulation of lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Intern.* 42,292-297.

- Polli J. E., J. R. Crison y G. L. Amidon, Novel Approach to the Analysis of in Vitro-in Vivo Relationships, *J. Pharm. Sci.*, 85 (7), 753-760 (1996).
- Polli J. E., L. X. Yu, J. A. Cook, G. L. Amidon, R. T. Borchardt, B. A. Burnside, P. S. Burton, M. Chen, D. P. Conner, P. J. Faustino, A. A. Hawi, A. S. Hussain, H. N. Joshi, G. Kwei, V. H. L. Lee, L. J. Lesko, R. A. Lipper, A. E. Loper, S. G. Nerurkar, J. W. Polli, D. R. Sanvordeker, R. Taneja, R. S. Uppoor, C. S. Vattikonda, I. Wilding y G. Zhang, Summary Workshop Report: Biopharmaceutics Classification System - Implementation Challenges and Extension Opportunities, *J. Pharm. Sci.*, 93 (6), 1375-1381 (2004).
- Pulido, A., Beristain, C.I., 2010. Spray-dried encapsulation of ascorbic acid using chitosan as wall material. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 9,189-195.
- Qi, X., Wang, L., Zhu, J., 2011. Water-in-oil-in-water double emulsions: An excellent delivery system for improving oral bioavailability of pidotimod in rats. *J. Pharm. Sci.* 100,2203-2211.
- Rabanel, J. M., Banquy, X., Zouaoui, H., Mokhtar, M., Hildgen, P., 2009. Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy. *Biotechnol. Progr.* 25,946-963.
- Ré, M. I., 2006. Formulating Drug Delivery System by Spray Drying. *Drying Technol.* 24,433-446.
- Reynoso, M. Modelos in vitro e in situ. Producción y Ensayo de Medicamentos, Departamento & Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 2003
- Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J., 2004. Microencapsulación by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *J. Food Sci.* 69,E351-E359.
- Rosano, H. L., Lan, T., Weiss. 1981. Unstable microemulsion. *J. Phys. Chem.* 85,468-473.
- Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 114,616-622.

- Sajjadi, S., Jahanzad, F., Yiannekis, M. 2004. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional inversion. *Colloid. Surf. A* 240,149-155.
- Salud, S. d., 2008. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Volumen I. S. d. Salud. México, Secretaria de Salud.
- Schoubben, A., Blasi, P., Giovagnoli, S., Perioli, L., Rossi, C., Ricci, M., 2009. Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 226-234.
- Schrooyen, P., Meer, R., Kruif, C. 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. *P. Nutr. Soc.* 60,475-479.
- Secretaría de Salud (SSA). 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas, México D.F.
- Shamma, R. N., Basalious, E. B., Shoukri, R. A., 2011. Development and optimization of a multiple-unit controlled release formulation of a freely water soluble drug for once-daily administration. *Int. J. Pharm.* 405,102-112.
- Shitara, Y., Sugiyama, Y., 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.* 112,71-105.
- Sirisuth N. y Eddington N. D., In-Vitro-in-Vivo Correlation Definitions and Regulatory Guidance, International Journal of Generic Drugs, URL: <http://www.locumusa.com>
- Siwale, R. C., Oettinger, C. W., Pai, S. B., Addo, R., Uddin, N., Siddig, A., D'Souza, M. J., 2009. Formulation and characterization of catalase in albumin microspheres. *J. Microencapsul.* 26,411-419.

- Smith, K.W., Cain, F.W., Talbot, G. 2005. Kinetic analysis of nonisothermal Differential Scanning Calorimetry of 1, 3-dipalmitoyl - 2-oleoylglycerol. *J. Agr. Food Chem.* 53,3031-3040.
- Sollohub, K., Cal, K., 2010. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *J. Pharm. Sci.* 99,587-597.
- Souza, A. S., Borges, S. V., Magalhaes, N. F., Ricardo, H. V., Cereda, M. P., Daiuto, E. R., 2009. Influence of spray drying conditions on the physical properties of dried pulp tomato. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 29,291-294.
- Stavchansky S. Experimental and Theoretical Methods to Study Drug Permeability. Edited by: Amidon G, Lesko L, Midha K, Shah V y Hilfinger J. International Bioequivalence Standards: A New Era. The United States of America. *TSRL Press, Ann Arbor.* 2006: 49-116.
- Sun, R. X., Lu, Y. P., Chen, K. Z., 2009. Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by spray drying method. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* 29,1088-1092.
- Swarbrick, J., 2007. Microencapsulation Technology. Encyclopedia of pharmaceutical technology. *I. Informa Healthcare USA.* New York, NY, USA, 13,2316-2325.
- Ulkowski, M., Musialik, M., Litwinienko, G. 2005. Use of Differential Scanning Calorimetry to study lipid oxidation. 1. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid. *J. Agr. Food Chem.* 53,9073-9077.
- USP-NF, The United States Pharmacopeial Convention, Farmacopea de los Estados Unidos de América 35/ Formulario Nacional 30, Edición Anual en Español, Rockville, Md., 2012, pp. 3191-3193.
- Vajna, B., Nagy, Z., Patyi, G., Zsigmond, Z., Antal, I., Marosi, G., 2009. [Application possibilities of chemical imaging in pharmaceutical technology]. *Acta. Pharmaceut. Hung.* 79,104-116.

- Varma, M. V., Rotter, C. J., Chupka, J., Whalen, K. M., Duignan, D. B., Feng, B., Litchfield, J., Goosen, T. C., El-Kattan, A. F., 2011. pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (Statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. *Mol. Pharm.* 8,1303–1313.
- Velicky M, Tam KY, Dryfe R A.W. In situ artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: Correlation between drug in vitro permeability and fraction absorbed in humans. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011; 08 (007) 110-16.
- Villamizar, L., Martínez, F., 2008. Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®. *Rev. Vitae* 15,123-131.
- Vlaia, L., Vlaia, V., Miclea, L. M., Olariu, I., Coneac, G., 2009. Topical W/O/W double emulsions of Piroxicam: in vitro drug release study. *Farmacia* 57,639-647.
- Wen, L., Papadopoulos, K.D. 2001. Effects of osmotic pressure on water transport in $W_1/O/W_2$ emulsions. *J. Colloid Interf. Sci.* 235,398-404.
- World Health Organization, Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series, fortieth report, Geneva, Annex 7, 2006, pp. 358-413
- Xu, X.-q., Zhu, L.-q., Li, W.-p., Liu, H.-c., 2011. Microstructure and deposition mechanism of electrodeposited Cu/liquid microcapsule composite. *T. Nonferr. Metal. Soc.* 21, 2210-2215.
- Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, M., Ramos, E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Rev. Avan. Pers.* 21,313-319.

10. ARTÍCULO



Microencapsulation of chlorthalidone by spray-drying of double emulsion and melt granulation coating

Marco Antonio Salazar-Miranda, Francisco Cruz-Sosa, María Eva Rodríguez-Huezo, Ruben Jiménez-Alvarado & César Pérez-Alonso

To cite this article: Marco Antonio Salazar-Miranda, Francisco Cruz-Sosa, María Eva Rodríguez-Huezo, Ruben Jiménez-Alvarado & César Pérez-Alonso (2016) Microencapsulation of chlorthalidone by spray-drying of double emulsion and melt granulation coating, *Drying Technology*, 34:9, 1118-1128, DOI: [10.1080/07373937.2015.1095205](https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1095205)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2015.1095205>



Accepted author version posted online: 29 Oct 2015.
Published online: 29 Oct 2015.



[Submit your article to this journal](#) ↑



Article views: 33



[View related articles](#) ↑



[View Crossmark data](#) ↑

Microencapsulation of chlorthalidone by spray-drying of double emulsion and melt granulation coating

Marco Antonio Salazar-Miranda^a, Francisco Cruz-Sosa^a, María Eva Rodríguez-Huezo^b, Ruben Jiménez-Abarado^c, and César Pérez-Alonso^d

^aDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, México; ^bDepartamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec, Estado de México, México; ^cCIQTA, CAP-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, México; ^dDepartamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

ABSTRACT

Chlorthalidone (CH) is indicated in the management of hypertension either alone or in combination with other antihypertensive drugs, but it displays poor solubility and stability limiting its use in the development of new pharmaceutical alternatives. Spray-drying of double emulsions (SDE) and melt granulation coating (MGC) technologies were used for enhancing the stability of CH by using Eudragit[®] L30 D-55 (EUD), Opadry[®] II (OPA), or Kollicoat[®] IR (KIR) as wall materials. SDE and MGC microcapsules containing CH were evaluated for particle size, morphology, release profiles, accelerated storage, and thermo-oxidative stability. Both types of microcapsules showed higher solubility (>80% in 20 min), lower degradation (<2%) under accelerated storage condition, and lower thermo-oxidative degradation than pure CH. However, SDE microcapsules showed smaller particle sizes (<16 µm) than MGC microcapsules (>700 µm), which widens the opportunity of incorporating microcapsules to dosage forms requiring different particle sizes for achieving their functionality.

KEYWORDS

Chlorthalidone double emulsions; melt granulation coating microcapsules; spray-drying stability

Introduction

Chlorthalidone (CH) is an antihypertensive/diuretic supplied as 15 mg tablets for oral use. It is a monosulfamyl diuretic that differs chemically from thiazide diuretics in that a double-ring system is incorporated in its structure. It is a racemic mixture of 2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isoindolinyl) benzene sulfonamide.^[1] Four CH crystalline forms are known, namely, form I, form II, form III, and form IV, with form I being the clinically preferred solid-state for drug product manufacturing.^[2] CH has low bioavailability and is administered orally.^[3,4] CH inhibits sodium ion transport in the distal tubule^[5] and indirectly increases potassium excretion, which may cause hypokalemia^[6] depending on the amount of CH administered.^[9] Thus, the drug amount to be delivered from solid formulations should be rigorously controlled to minimize health risks resulting from undesirable bioavailability. The mean plasma half-life of chlorthalidone is about 40–60 h. It is eliminated primarily as unchanged drug in the urine. In the blood, approximately 75% of the drug is bound to plasma proteins. In the case of tablets,

the CH specification for the dissolution test is 70% in 60 min.^[11] Thus, an ongoing research topic is to develop protective coatings for isolating and protecting CH against deleterious environments that may cause its degradation, contributing to maintain its physico-chemical characteristics, stability, and functionality. There are two techniques that seem well suited for providing protective coatings to CH: (1) water-in-oil-in-water double emulsions (DE),^[6,7] which can be spray-dried for obtaining microcapsules (SDE),^[8,9] and (2) the melt granulation coating process (MGC).^[10]

Double emulsions are characterized by having chemically similar internal and external aqueous phases, and an intermediate immiscible lipid phase, which separates the two aqueous phases.^[8] DE present many possibilities for the controlled release of low-dose drugs initially entrapped in the internal droplets.^[11] DE have been proposed as potential formulations for improving the oral bioavailability of poorly absorbable drugs^[12] and for controlling the diffusion profiles of drugs through synthetic membranes in the external aqueous phase (*W₂*) made by hydrophilic macromolecules

CONTACT César Pérez-Alonso cperez@uasmmex.mx Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Toluca s/n CP 50120, Toluca, Estado de México, México.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/doi.

© 2016 Taylor & Francis

(polysaccharides or proteins).^[13,14] However, when bioactives are susceptible to degradation in water, for example, CH, an alternative is to substitute the inner aqueous phase of the DE by a solvent with high polarity, such as ethanol (EtOH). Spray-drying of DE evaporates the solvent and produces microcapsules (SDE) with chemical and physical properties quite different from those displayed by the DE. It has been reported that although DE tend to show continuous release rates, SDE tend to display high-burst releases, such as those desired with CH (>80% in 20min).^[15] SDE also form relatively small microcapsules (<50 μm), which permits administering them in different ways: as oral capsules and tablets, ultra fine powders for pulmonary administration, aerosols, and injectable formulations.^[14]

The MGC technique presents many advantages: (1) It does not require aqueous or organic solvents. (2) It involves only three processing steps: mixing, granulation-spheronization, and cooling.^[17] MGC is widely used to encapsulate molecules unstable to moisture. The microcapsules are generally formed in a high-shear mixer by adding polymers such as fatty acids (esters, waxes) of low melting point or polymers that gel at low temperature (gennetin, glycols), allowing the formation of bonds between molecules while mixing with the drug at a temperature above the transition of the polymer ($\sim 60^\circ\text{C}$). The main characteristic of the products obtained by MG is that the sizes are directly dependent on the process design; usually these products are separated by sifting, for greater homogenization in size (>400 μm). It is necessary to add a coating phase (layer of wall material) on the surface of the particles to obtain microcapsules with cores that contain and isolate the drug. This technique can be used to prepare microcapsules with immediate or controlled-release properties,^[17] good flowability, and resistance to processes compression. Wall materials used for MGC providing immediate release properties include methacrylic acid copolymer, cellulose-based polymers, and mixtures of polyvinyl alcohol and polyethylene glycol.^[18,19]

The aims of this work were to (1) obtain chlorothalidone microcapsules using two techniques: spray-drying of double emulsion and MGC; (2) evaluate the microcapsules surface morphological characteristics, particle size, yield, and encapsulation efficiency; and (3) determine the *in vitro* release, storage stability, and thermooxidative stability of the CH microcapsules.

Materials and methods

Crystalline CH (form I) was used as model drug (Huntsman, Pamplona, Spain). For SDE materials used

were mineral oil (MO; Sigma Chemical Co., Poole, UK); ethanol (EtOH; Solvaco Chemicals AB, Rosersberg, Sweden); polyglycerol esters of polyricinoleate (GRI; Grinsted PCGR) and esters of mono- and di-acetyl tartaric acid diglyceride (PAN; Panodan SDK; Danisco Cultor Mexicana, S.A. de C.V; Guadalajara, State of Jalisco, Mexico); Eudragit[®] L30D-55 (EUD; dispersion of methacrylic acid copolymer; Evonik Röhm, GmbH, Darmstadt, Germany); Opadry[®] II (OPA; hypromellose-polydextrose-triacetin/glycerol triacetate macrogol-6000-titanium dioxide E171; Colcon Ltd; Dartford, England); and Kollicoat[®] IR (KIR; mixture of polyvinyl alcohol and polyethylene glycol, BASF, Mont Olive, NJ, USA).

For MGC the materials used were lactose (LAC; α -lactose monohydrate; DMV-Fonterra Excipients, Goch, Germany); cellulose (CEL; FMC Biopolymer, Cork, Ireland); silicon dioxide (CSD; Wacker Chemical Corporation, CA, USA); gennetin (GRE; Celco, S.A.; Barranquilla, Colombia); EUD, OPA and KIR; and talc (TAL; Neelkanth Healthcare Pvt. Ltd; Mumbai, India). All formulations were packed in hard gelatin capsule # 1 (Capsugel, Bornem, Belgium). All materials were used without any pre-treatment. Bi-distilled water was used in all the experiments.

Formation of double emulsions

Three ethanol-in-mineral oil-in-water double emulsions (EtOH/MO/ W_x) were prepared at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) using a two-stage emulsification procedure.^[20] In the first stage, the EtOH/MO inner emulsion was formulated with a 0.15 dispersed-phase mass fraction ($\phi_{\text{EtOH/MO}}$). Total emulsifier concentration in EtOH/MO was 2.62% (w/w) with a PAN:GRI ratio of 1.4.5. The inner EtOH phase contained CH and PAN, and the MO phase contained GRI, in the weight percentages shown in Table 1. The EtOH phase was added drop-wise to the MO phase using an Ultra-Turrax T90 Basic homogenizer (IKA[®]-WERKE Works, Inc.; Wilmington, NC, USA) at 5200rpm for 8 min. In the second stage, the EtOH/MO inner emulsion was re-emulsified in different wall materials aqueous solutions (W_x , where X stands for the EUD, OPA, or KIR wall material) at a concentration of 15% (w/w).^[21,22] In all cases the ratio of EtOH/MO to wall materials solids was 1:1, so that the DE had a disperse-phase mass fraction of $\phi_{\text{EtOH/MO}/W_x}$ of 0.30. Dispersion of the EtOH/MO emulsion in the W_x was done using the Ultra-Turrax T90 Basic homogenizer at 7600rpm for 5 min. The resulting double emulsions were coded as EtOH/MO/ W_{EUD} , EtOH/MO/ W_{OPA} , and EtOH/MO/ W_{KIR} , respectively.

Table 1. SDE and MGC microcapsules formulations.

SDE			MGC		
Phase	Material	% (w/w)	Phase	Material	% (w/w)
Inner phase (EtOH)	CH	3.00	Granulation	CH	16.67
	EtOH	2.52		CSD	0.13
	PAN	0.48		GRE	20.71
Intermediate phase (MO)	MO	6.86	LAC	22.92	
	GR	2.14	CEL	22.92	
Outer phase (W ₂)	EUD, OPA or KIR	15.00	Coating	EUD, OPA or KIR	2.43*
	H ₂ O	7.00		TAL	0.08
(EtOH/MO/W ₂)	Total emulsion	100.00	Total formulation	H ₂ O	14.14
	Total solids	30.00		Total solids	100.00
				Total solids	85.86

SDE, Spray-dried double emulsion; MGC, Melt granulation coating; CH, Chlorhexidine; EtOH, Ethanol; PAN, Panodan SDK; MO, Mineral oil; W₂, External aqueous phase; GR, Grinset PGPR; EUD, Eudrag[®] L30D-55; OPA, Opady[®] II; KIR, Kollicoat[®] IR; CSD, Silicon dioxide; GRE, Gantrel[®]; LAC, Lactose; CEL, Cellulose; TAL, Talc.

*The wall material was added in 3% as a gain in weight (w/w) in the coating process.

Microencapsulation by spray-drying

The EtOH/MO/W₂ double emulsions were fed into a Nichols/Niro Turbo Spray-Drier (PLA, mod I, New York, NY, USA) at a rate of 40 mL/min, 4 bars air pressure, inlet air temperature of 150 ± 5°C, and outlet air temperature of 85 ± 5°C.^[23] For producing microcapsules coded as SDE_x where the subscript X denotes the polymer (EUD, OPA, or KIR) making up the wall material.

Microencapsulation by melt granulation coating process

A laboratory-scale high-shear mixer (Collette Ultima GEA, model 25, Columbia, MD, USA), equipped with an electric-heated jacket, three-blade impeller, a top chopper, a product temperature probe (±1°C) was used. The process included the following steps: (1) The excipients (LAC, CEL, GRE, and CSD) and drug (CH) (in the percentages shown in Table 1) were blended at room temperature (~25°C) with a the high-shear mixer, using an impeller speed of 44 rpm and a chopper speed of 600 rpm; (2) the impeller speed was increased to 90 rpm and the heating jacket was heated to 60°C (heating phase); and (3) the cooling phase was performed utilizing a bowl-tilt system and setting an automatic impeller cycle (20 s on, 40 s off) at 90 rpm for 18 min.^[24]

At the end of the MGC process the microcapsules were collected and sifted using a vibrating shaker (Octagon Digital, Endecotts, London, UK) and two standard sieves (Scientific Instruments S.R.L., Milan, Italy) in the range 600–850 µm.

Microcapsules were coated using 100g batches in an Erweka Drum Mixer Model AR400 (Schimadzu Erweka, Mexico City, Mexico). The coating solution consisted of 2.43% (w/w) wall material (EUD, OPA, and KIR), 0.08% (w/w) TAL, and 14.14% (w/w) H₂O. The coating condition was inlet air temperature between 30 and

40°C. The amount of coating solution applied to the microcapsules was 2.85, 2.92, and 2.84 g for the EUD, OPA, and KIR, respectively, producing the microcapsules coded as MGC_x, where the subscript X refers to the EUD, OPA, or KIR polymers.

Droplet size and morphology of emulsions

Morphological characteristics of the DE and the number-length mean droplet diameter (d_{10}) of the inner emulsion and DE were determined using an optical microscope (Leica DMLB 100S, Leica, New York, NY, USA) coupled to an image analyzer system (Moticam 2300 Filmless Zoom camera, Moticam, Xiamen, China, and Image Pro-Plus version 7.0 software, Media Cybernetics, Maryland, USA).

In addition, as a measure of stability, volume fraction-length mean diameter (d_{43}) of the EtOH/MO/W₂ double emulsions was determined with a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK), using bi-distilled water as dispersant (refractive index = 1.333). d_{43} of the inner droplets was obtained from the micrographs by difference from d_{43} of the DE. Measurements were made immediately after emulsions preparation and at 24 h intervals for 7 days.^[25,26]

Particle size and morphology of microcapsules

d_{43} of SDE_x and MGC_x was determined with a laser diffraction particle size analyzer (LS13 320; Beckman Coulter, Inc., Miami, FL, USA). The microcapsules were dispersed using air as dispersion medium in the unique Tornado Dry Powder System.

Surface morphology (topology) of the microcapsules was determined by scanning electron microscopy (SEM). Microcapsules were attached to SEM stubs using a two-sided adhesive tape (Ted Pella, Redding, CA).

USA) for examination of their outer structure. Specimens were subsequently gold-coated with a Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd, Akishima, Japan).^[27] A high vacuum Jeol JSM-6510LV (Jeol Ltd, Akishima, Japan) electron microscope, at 20 kV, was used to view each sample at a magnification of 110x and 5000x. Representative micrographs were selected for presentation. Image processing was carried out according to Quintanilla-Carvajal et al.^[28]

Yield

All the microcapsules were weighed to calculate the percentage yield using the following equation.^[29]

$$\text{Yield(\%)} = \left(\frac{\text{Total weight of resulting microcapsules}}{\text{Total weight of initial solids used in the formulation}} \right) \times 100$$

CH microencapsulation efficiency

Microencapsulation efficiency was calculated as the percentage of CH detected in microcapsules with respect to the initial theoretical dose of 20 mg put into the formulations (Table 1). An appropriate amount of microcapsules (mass quantity providing a theoretical dose of 20 mg CH) was dissolved in methanol to obtain 0.2 mg/mL of CH. The amount of CH entrapped into microcapsules was determined by HPLC. The samples were injected into a balanced Agilent Technologies 1100 Chromatographic system (Agilent, Waldbronn, Germany), using a Zorbax SB-C18 column, 50 mm × 4.6 mm id, particle size 1.8 μm (Agilent Technologies, Newport, DE, USA), at 30 ± 2°C. The mobile phase consisted in a mixture of 0.08 M phosphoric acid solution (pH 5.5) with acetonitrile (80/20) with an isocratic flow rate of 1 mL/min. UV detection was performed at 238 nm. The analytical concentration of CH was determined from a standard curve ($r^2 = 0.999$). The drug-loading efficiency was determined as the ratio between the analytical and theoretical CH concentration using the following equation:

$$\begin{aligned} & \left(\frac{A_m}{A_r} \right) \times \left(\frac{P_r}{P_m} \right) \times 0.1 \times P \times PP \\ & = (\text{CH mg microencapsulated}/20) \times 100 = \% \text{CH} \end{aligned}$$

where A_m is the CH peak area obtained in the chromatogram of the sample solution, A_r is the mean peak area of CH obtained in the chromatograms of reference solutions, P_r is the weight of CH (reference substance, in mg), P_m is the weight of sample in mg, 0.1 is the dilution factor, P is pure substance reference (CH/100), PP is the average weight of capsules in mg, 20 is

the theoretical content of CH, and 100 is the conversion factor to percentage.

Microcapsules dosage in gelatin capsules

The SDEx and MGCx microcapsules and pure CH were packed into hard gelatin capsules #1. The capsules contained 20 mg CH, based on the theoretical CH content in the formulations reported in Table 1. These capsules were used for the *in vitro* release and accelerated storage stability test.

In vitro release of CH from microcapsules

In vitro dissolution assays were performed for estimating the CH release from microcapsules, using a USP Apparatus 2 (paddle; Pharmatest, Steinheim, Germany) rotating at 50 rpm. 900 mL of bi-distilled water was used as dissolution medium at 37 ± 0.5°C. Capsules of pure CH, SDEx or MGCx microcapsules, assuring sink conditions ($C < 0.2$ G) were added to the dissolution medium. The solution was filtered through a 0.45-μm pore-size cameo acetate membrane filter (Millipore Co., Bedford, MA, USA) and continuously pumped at 12.5 mL/min to a flow cell in a Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer Varian (Varian, Palo Alto, CA, USA). Absorbance of pure CH, SDEx or MGCx dissolutions was measured at 238 nm. Percentage released was calculated with the amount of CH titrated in relation to the overall amount of CH in the sample vs. time.

Stability studies

Accelerated storage stability test

Capsules containing pure CH and microcapsules with SDEx or MGCx were stored at 40°C and 75% relative humidity. The chemical stability (drug content) was monitored up to 3 months as described by the International Conference on Harmonisation^[30] and analyzed by HPLC every month following the procedure mentioned above in the section discussing CH microencapsulation efficiency.

Thermo-oxidative stability

A quantity of 4 to 5 mg of the excipients, wall materials, SDEx and MGCx microcapsules were placed in the furnace of a TA Instruments DSC Q1000 calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples were subjected to heating rates of (β) 2.5, 5.0, 7.5, and 10°C/min from 50 to 400°C, using an oxygen flow rate of 100 cm³/min. A blank was run using N₂ in order to determine whether the exothermic peaks of the samples

were caused by their oxidation. Thermal stability of the microcapsules was studied using a dynamic regime non-isothermal differential scanning calorimetry (DSC) technique. The kinetic parameters of the microcapsules oxidation were calculated as reported by Pérez-Alonso et al. and Pu et al.^[24,22]

Statistical analyses

All measurements were carried out in three replicate experiments. All quantitative data were expressed as means \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test using SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) statistical software. Significance was determined with a value of $p < 0.05$.

Results and discussion

Droplet size, morphology, and stability of emulsions

All the fresh double emulsions were made up by spherical MO droplets containing within them a large number of EtOH droplets ($d_{1,0} = 0.12 \pm 0.2 \mu\text{m}$, Fig. 1a), known as type C morphology (Fig. 1b, 1c, 1d).^[33] The fresh DE formed (EtOH₁/MO/W_{KR}, EtOH₁/MO/W_{CPA}, and EtOH₁/MO/W_{ED}) exhibited nonsignificantly different

$d_{1,0} = 5.6 \pm 0.66 \mu\text{m}$, indicating that the composition of the wall material did not affect initial droplet size.

The stability of microcapsules obtained by spray-drying depends to a large extent on the stability of the DE fed to the spray-drier. Figure 2 shows the $d_{4,3}$ variation with aging time for the EtOH/MO inner emulsion and for the EtOH/MO/W_x double emulsions. All the emulsions displayed very little variation in $d_{4,3}$ up to 120 h. At longer aging times all the emulsions showed a sharp increase in droplet size. Thus, the stability of microcapsules can be ensured if spray-drying of DE is performed within 120 h of formation.

Morphology and particle size of microcapsules

Figure 3 shows the topography of the SDE_x (Fig. 3a–3c) and MGC_x (Fig. 3d–3f) microcapsules. The SDE_x microcapsules showed a defined spherical shape, with homogeneous and smooth surface, devoid of holes and/or fractures. Nonsignificant differences in particle size were exhibited by SDE_{ED} ($16.90 \pm 0.21 \mu\text{m}$, Fig. 3a), SDE_{CPA} ($16.14 \pm 0.32 \mu\text{m}$, Fig. 3b), and SDE_{KR} ($16.42 \pm 0.32 \mu\text{m}$, Fig. 3a). SDE_x particle sizes were significantly larger than the droplet size of EtOH₁/MO/W_x emulsions from which they originated. This is due to the nature of the spray-drying process. The combination of high temperatures exceeding the boiling point of water and EtOH and of entrapped air causes a

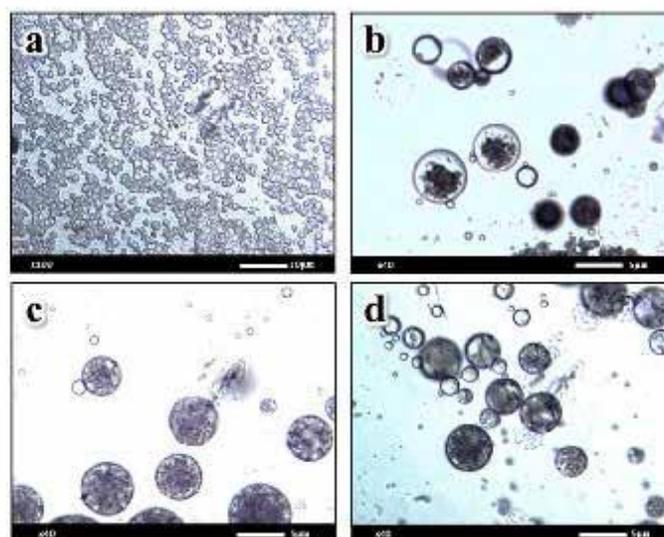


Figure 1. Micrographs of the fresh inner and double emulsions CH: (a) EtOH₁/MO, (b) EtOH₁/MO/W_{KR}, (c) EtOH₁/MO/W_{CPA}, and (d) EtOH₁/MO/W_{ED}.

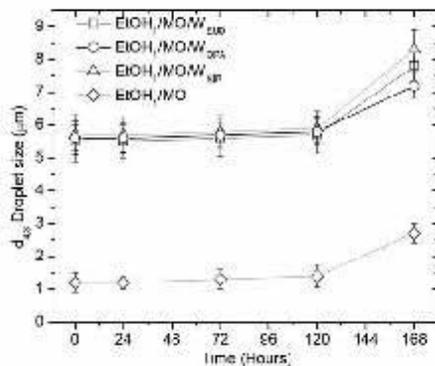


Figure 2. Volume fraction-length mean size ($d_{4,3}$) variation with aging time of emulsions: EtOH/MOW_{EUD} (□), EtOH/MOW_{OPA} (○), EtOH/MOW_{NP} (△), and EtOH/MO (◇).

balloon-like expansion of the emulsion droplets, driven by increasing partial pressure of the dissolved gases with increasing temperature. This expansion continues until a threshold partial pressure of the gases is reached and exceeded, and at this point, selective diffusion of the entrapped gases occurs through the viscous wall material network.^[6]

On the other hand, the MGCx microcapsules were characterized for presenting more irregular shapes with high surface roughness, where the fusion of different material strata and embedded particles led to the formation of flaws in the form of cracks, craters, and pinholes. The MGCx microcapsules presented nonsignificant differences in $d_{4,3}$ among themselves but had significant larger $d_{4,3}$ than the SDEx microcapsules. MGC_{EUD} had $d_{4,3}$ of $750.00 \pm 10.07 \mu\text{m}$ (Fig. 3d), MGC_{OPA} of $733.33 \pm 1534 \mu\text{m}$ (Fig. 3e), and MGC_{NP} of $740.00 \pm 12.23 \mu\text{m}$ (Fig. 3f). In this microencapsulation process, the particle size is governed by the layer-by-layer deposition mechanism of components on the CH surface.^[9,43]

Downloaded by [Universitat Autònoma de Barcelona] at 06:46 03 June 2016

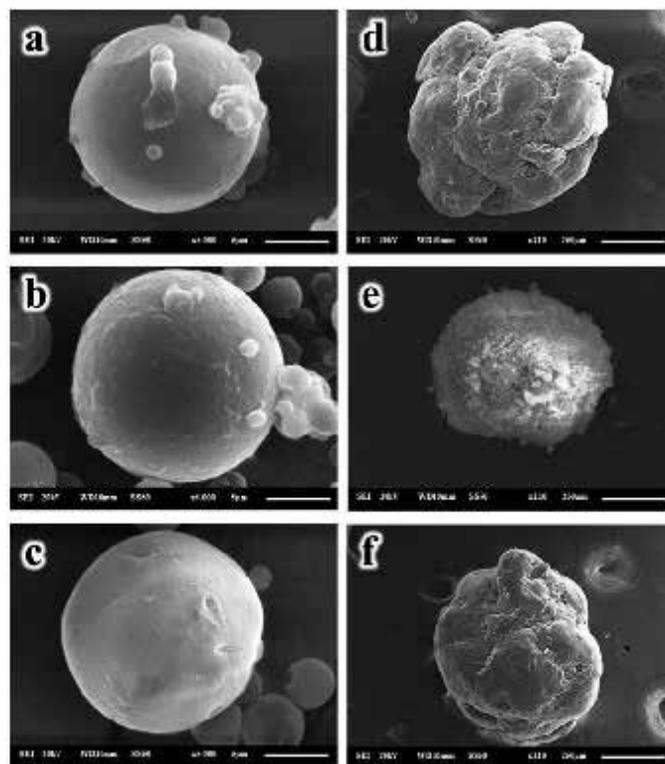


Figure 3. Micrographs of CH containing microcapsules: (a) SDE_{EUD}, (b) SDE_{OPA}, (c) SDE_{NP}, (d) MGC_{EUD}, (e) MGC_{OPA}, and (f) MGC_{NP}.

Table 2. Product yield, CH microencapsulation efficiency, and long storage stability of microencapsulated CH.

Code	Yield (%)	Microencapsulation efficiency of CH-C (%)	Long storage stability (40°C/75% RH.)			
			1 month C_{1m} (%)	2 months C_{2m} (%)	3 months C_3 (%)	Loss of CH C_3-C_0 (%)
CH	–	9852 ± 0.49 ^{de}	85.48 ± 0.75 ^c	82.45 ± 0.95 ^b	78.02 ± 1.81 ^a	2050 ^a
SDE _{EUD}	86.43 ± 1.24 ^f	102.55 ± 0.23 ^f	101.80 ± 0.23 ^h	101.55 ± 0.32 ^h	101.22 ± 0.86 ^{gh}	123 ^b
SDE _{OPA}	92.49 ± 1.60 ^f	102.18 ± 0.07 ^h	101.49 ± 0.40 ^h	101.30 ± 0.39 ^{gh}	100.42 ± 0.24 ^{gh}	176 ^b
SDE _{KR}	87.23 ± 0.82 ^f	102.50 ± 0.44 ^f	102.10 ± 0.27 ^h	101.68 ± 0.18 ^h	101.55 ± 0.29 ^h	0.95 ^c
MGC _{EUD}	92.29 ± 0.92 ^f	98.27 ± 0.26 ^{de}	98.80 ± 0.76 ^{de}	97.63 ± 0.56 ^{de}	97.04 ± 0.82 ^d	123 ^b
MGC _{OPA}	95.42 ± 1.07 ^f	98.56 ± 0.46 ^{de}	98.03 ± 0.18 ^{de}	97.44 ± 0.52 ^d	97.37 ± 0.80 ^d	1.19 ^c
MGC _{KR}	94.53 ± 0.99 ^f	99.48 ± 0.49 ^{de}	98.71 ± 0.76 ^{de}	98.67 ± 0.27 ^{de}	98.48 ± 0.47 ^{de}	1.00 ^c

Data are presented as means ± SD (n = 3).

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Superscripts with different letters in same line indicate significant differences (p < 0.05).

C: Microencapsulation efficiency (% CH in crystals or microcapsules respect to initial mass input in formulation); C_{1m} : Amount of drug recovered after 1 month; C_{2m} : Amount of drug recovered after 2 months; C_3 : Amount of drug recovered after 3 months.

CH, Chlorothalidone; SDE, Spray-dried double emulsion; MGC, Melt granulation coating; EUD, Eudragit® L30D-55; OPA, Opady® II; KR, Kollicon® SR.

The negative sign indicates the amount unrecovered drug.

Product yield and CH microencapsulation efficiency

As can be observed from Table 2, both microencapsulation processes achieved high product yield and CH encapsulation efficiency. Product yield was above 86% for SDE_{Ex} and above 92% for MGC_{Ex}, indicating that both microencapsulation processes have an efficient product output. Material losses can be attributed to those normally occurring in spray-drying (adherence to spray-drying walls) and melting granulation (adherence to high-shear mixer and mixing drum walls). These material losses had a bearing on the microencapsulation efficiency results. At this point it must be stated that CH crystals had a purity of 98.52%. CH encapsulation efficiency was higher than 98% (w/w) in all the microcapsules, and in the particular case of SDE_{Ex}, it was found to be exceeding 100%. These results suggest that CH was well integrated into the bulk of the formulation ingredients and that mass losses during processing were mainly suffered by formulation ingredients other than CH. The yields obtained by both microencapsulation processes were higher than those reported for other microencapsulation techniques. Hu et al.^[39] reported a yield of 70% for Simvastatin encapsulated by the crystallization method using Eudragit® as wall material. Albertini et al.^[27] obtained yields higher than 94% using high-shear MGC with Eudragit® as wall material. Alhnan et al.^[3] reported yields of 87–100% when encapsulating prednisolone by spray-drying using as wall materials either S or L type of Eudragit.

In vitro dissolution studies of encapsulated and unencapsulated CH

An important feature expected from microcapsules containing CH is their ability to quickly release the drug. Thus, the *in vitro* dissolution profiles of CH from the SDE_{Ex} (Fig. 4a) and MGC_{Ex} (Fig. 4b) microcapsules were

determined and compared to that of pure CH and contrasted with the desired value for CH (>80% in 20 min).^[45] The dissolution profile of pure CH reached 80% solubility in 15 min. All the SDE_{Ex} microcapsules

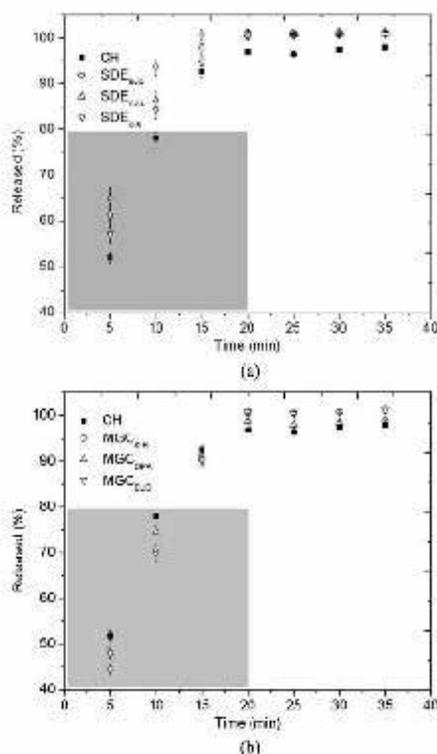


Figure 4. Dissolution profile for pure CH and CH containing microcapsules: (a) pure CH (■), SDE_{EUD} (○), SDE_{OPA} (△), and SDE_{KR} (▽); (b) CH (■), MGC_{KR} (○), MGC_{OPA} (△), and MGC_{EUD} (▽).

liberated at least 80% CH in 10min, and all the MGCx microcapsules released at least 80% CH in 15min. These release profiles indicate that all the microcapsules formulated complied with the desired specification of liberating 80% CH in 20 min and displayed equivalent or superior release profiles than pure CH, independently of the wall material and microencapsulation process used. In the case of SDEx microcapsules, those made with EUD showed significantly higher CH release (~93%), than when OPA (~86%) or KIR (~83%) were used as wall materials after 10 min, and all the MGCx microcapsules showed similar dissolution profiles (88–92%) in 15 min. These results indicate that microencapsulation by spray-drying of double emulsions and by MGC techniques effectively enhances the bioavailability of CH. MGC offered better thermo-oxidative stability to CH than SDE microcapsules, probably due to their significantly smaller surface area (significantly bigger particle size). Martins et al.^[38] confirmed the high potential of the spray-drying technique to obtain microparticulate hydrochlorothiazide with enhanced

pharmaceutical and dissolution properties. Nerkar and Cattani^[39] demonstrated an improved bioavailability of venlafaxine compared to the oral solution.

Accelerated stability

In view of the potential utility of formulations for microencapsulating CH, stability studies were carried out at 40 ± 2°C / 75 ± 5% RH for 1, 2, and 3 months (accelerated testing) to assess their long-term stability,^[30,36] in comparison to pure, nonencapsulated CH stored under the same experimental conditions (Table 2). The pure CH crystals suffered a loss of 20.50% in 3 months, whereas the maximum loss experienced by whichever microcapsule studied in the same time period was 1.76%. All the microcapsules, independently of wall material used, provided CH a very good protection against deleterious environmental factors and contributed to extend its shelf-life. None of the microcapsules showed changes in physical appearance after 3 months of storage.

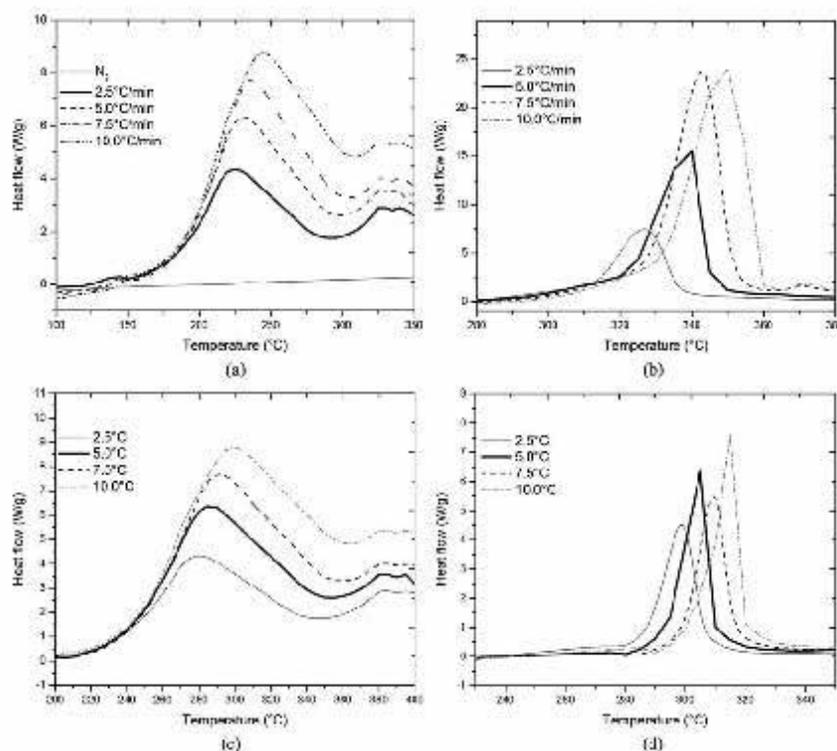


Figure 5. Thermograms for (a) N₂ blank and pure CH, (b) pure EUD, (c) SDE_{EUD}, and (d) MGC_{EUD}.

Table 3. Kinetic parameters for the pure CH and for CH contained in SDE and MGC microcapsules.

β (°C min ⁻¹)	CH T_{Exp} (°C)	SDE _{EUD} T_{Exp} (°C)	SDE _{OPX} T_{Exp} (°C)	SDE _{KIR} T_{Exp} (°C)	MGC _{EUD} T_{Exp} (°C)	MGC _{OPX} T_{Exp} (°C)	MGC _{KIR} T_{Exp} (°C)
2.5	225.0 ± 0.23	280.1 ± 0.31	245.1 ± 0.56	250.4 ± 0.18	300.3 ± 0.12	295.6 ± 0.11	285.3 ± 0.42
5	230.6 ± 0.28	285.0 ± 0.54	250.9 ± 0.38	255.7 ± 0.20	305.7 ± 0.23	300.4 ± 0.09	290.3 ± 0.51
7.5	235.7 ± 0.12	290.3 ± 0.32	255.1 ± 0.28	260.2 ± 0.28	310.2 ± 0.09	305.5 ± 0.31	295.5 ± 0.26
10	240.1 ± 0.34	295.6 ± 0.43	260.3 ± 0.47	265.3 ± 0.04	315.3 ± 0.52	310.1 ± 0.30	300.4 ± 0.31
Statistical and kinetic parameters							
E_a (kJ/mol)	186.1 ± 0.10 ^a	228.7 ± 0.08 ^a	201.1 ± 0.12 ^a	204.9 ± 0.09 ^a	245.3 ± 0.19 ^a	228.7 ± 0.11 ^a	232.8 ± 0.13 ^a
r^2	0.96	0.98	0.95	0.97	0.94	0.96	0.95

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Superscripts with different letters in same line indicate significant differences ($p < 0.05$).

SDE, Spray-dried double emulsion; MGC, Mel granulation coating; CH, Chlorzaldone; EUD, Eudragit® L30D-55; OPA, Opady® I; KIR, Kollicoat® SR; β , Heating rates; T_{Exp} , Maximum exothermal temperature; E_a , Activation energy; r^2 , Coefficient of linear determination.

Thermo-oxidative stability

Figure 5a shows the thermograms of the heat flow as a function of temperature of the N₂ blank and of the pure CH. The bottom flat line corresponds to that of the N₂ blank, showing only small fluctuations without significant exo- and endo-thermic effects. The pure CH showed well-defined exothermal peaks that corresponded to temperatures reported in Table 3 for different heating rates (β 's) of 2.5, 5, 7.5, and 10°C/min, respectively, indicating that these peaks are due to the oxidation process. Figure 5b displays the thermogram for the EUD as wall material at different values of the heating rates (β 's). The exothermal peaks occurred at a much higher temperatures (Table 3) than those for the pure CH for the same values of heating rates (β 's). These results indicate that the exothermic peaks shown by this wall material are likely to be due to its degradation. The other wall materials OPA and KIR showed similarly shaped thermograms (data not shown). The maximum exothermal temperatures (T_{Exp}) for the microcapsules obtained with both encapsulation processes (Table 3 and Fig. 5c and 5d) took place between 245 and 295°C for SDEx microcapsules and between 295 and 315°C for MGCx microcapsules; these ranges are above the data obtained for pure CH, indicating that pure CH is less stable un-encapsulated than when it is microencapsulated.

The activation energy (E_a) of the oxidation process for pure CH and the SDEx and MGCx microcapsules are given in Table 3. The MGCx microcapsules exhibited higher E_a than SDEx microcapsules using the same wall materials. Highest E_a was shown by microcapsules made with EUD, followed in descending order by KIR and by OPA for both encapsulation processes. There is ample evidence corroborating the suitability of EUD for protecting drugs against degradation.^[40] EUD has been reported as offering a good protection to simvastatin against degradation stored in environments with 40°C/75% RH for 3 months.^[41] Likewise, KIR and OPA are considered as very effective moisture-barrier agents.^[41,42]

The difference in E_a values for the MGC and SDE made with the same wall material is probably due to the differences in the microcapsules particle sizes. Larger particles present significantly smaller surface areas and require the input of higher activation energy for achieving oxidation. From these results it is inferred that the microcapsules with EUD as wall material retarded the diffusion of oxygen into the microcapsule and provided CH with better stability against oxidation.

Conclusion

The stability and immediate release of CH contained in microcapsules obtained by spray-drying of double emulsions or by MGC techniques was significantly improved compared to that of pure CH, independently of the different wall materials of the microcapsules used: EUR, OPA, or KIR. Better CH-release profiles were achieved with SDE than with MGC microcapsules, but similar long-term stability was provided by both microencapsulation techniques. Best wall material against thermo-oxidative degradation was EUD. This work clearly establishes that spray-drying of double emulsion using ethanol instead of water in the inner phase is a good alternative to standard encapsulation techniques for protecting and achieving immediate release of CH.

Funding

The authors wish to thank the partial financing of this research to the Universidad Autónoma del Estado de México through grant 3457/2013U.

References

- [1] USP-NF. Test solutions. United States Pharmacopoeia 35/National Formulary 30. 2012. <http://www.usp.org>
- [2] Bonfilio, R.; Leal, J.S.; Santos, O.M.M.; Pereira, G.R.; Doniquetto, A.C.; de Araújo, M.B. Analysis of chlorzaldone polymorphs in raw materials and tablets and the effect of forms I and II on the dissolution properties of drug products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014, 68, 562–570.

- [3] Sica, D.A. Chlorthalidone: Has it always been the best thiazide-type diuretic? *Hypertension* 2006, 47, 321-322.
- [4] Vázquez, N.; Monroy, A.; Dorantes, E.; Muñoz-Clares, R.A.; Gamba, G. Functional differences between flounder and rat thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 2002, 282, F599-F607.
- [5] Sunjpe, L.; Vitan, A.S.; Frisof, K.B.; Podany, E.C. Potassium loss associated with hydrochlorothiazide versus chlorthalidone. *Clinical Therapeutics* 1981, 4, 308-320.
- [6] Carrillo-Navas, H.; Cruz-Olivares, J.; Barrera-Pichardo, J.F.; Pérez-Alonso, C. Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers* 2012, 87, 1231-1235.
- [7] Pimentel-González, D.J.; Campos-Montiel, R.G.; Lobato-Calleros, C.; Pedraza-Isks, R.; Vernon-Carter, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 2009, 42, 292-297.
- [8] Rodríguez-Huezo, M.E.; Pedraza-Isks, R.; Prado-Barragán, L.A.; Benstain, C.I.; Vernon-Carter, E.J. Microencapsulación by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science* 2004, 69, E851-E859.
- [9] Souza, C.R.F.; Oliveira, W.P. Microencapsulation of Ketoprofen in blends of acrylic resins by spray drying. *Drying Technology* 2012, 30(3), 263-275.
- [10] Vanna, M.V.; Rotter, C.J.; Chupla, J.; Whalen, K.M.; Duignan, D.B.; Feng, B.; Lithfield, J.; Goosen, T.C.; El-Kattan, A.F. pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (Statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. *Molecular Pharmacology* 2011, 8, 1303-1313.
- [11] Leal-Calderon, F.; Schmitt, V.; Ribette, J. *Emulsion Science: Basic Principles*, 2nd Edn. Springer: New York, 2007.
- [12] Qi, X.; Wang, L.; Zhu, J. Water-in-oil-in-water double emulsions: An excellent delivery system for improving oral bioavailability of piflomedin in rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 100, 2203-2211.
- [13] Pulido, A.; Benstain, C.I. Spray-dried encapsulation of ascorbic acid using chitosan as wall material. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2010, 9, 189-195.
- [14] Vhaia, L.; Vhaia, V.; Miclea, L.M.; Okru, I.; Conzac, G. Topical W/O/W double emulsions of Piroxicam: *In vitro* drug release study. *Ramaria* 2009, 57, 639-647.
- [15] Oster, C.G.; Kessel, T. Comparative study of DNA encapsulation in to PLGA microparticles using modified double emulsion methods and spray drying techniques. *Journal of Microencapsulation* 2005, 22, 235-244.
- [16] Bé, M.I. Formulating drug delivery system by spray drying. *Drying Technology* 2006, 24, 433-446.
- [17] Passerini, N.; Calogerá, G.; Albertini, B.; Rodríguez, L. Melt granulation of pharmaceutical powders: A comparison of high-shear mixer and fluidised bed processes. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 392, 177-186.
- [18] Schilling, S.U.; McGinity, J.W. Novel application of hot-melt extrusion for the preparation of monolithic matrices containing enteric-coated particles. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 400, 24-31.
- [19] Wagdare, N.A.; Marels, A.T.M.; Boom, R.M.; van Rijn, C.J.M. Porous microcapsule formation with microsieve emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 2011, 355, 453-457.
- [20] Dzul-Cauch, J.G.; Lobato-Calleros, C.; Pérez-Orozco, J.P.; Alvarez-Ramírez, J.; Vernon-Carter, E.J. Stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions: Influence of the interfacial properties of milk fat globule membrane. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2013, 12, 425-436.
- [21] Carrillo-Navas, H.; González-Rodea, D.A.; Cruz-Olivares, J.; Barrera-Pichardo, J.F.; Román-Guerrero, A.; Pérez-Alonso, C. Storage stability and physicochemical properties of passion fruit juice microcapsules by spray-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2011, 10, 421-430.
- [22] Sánchez-Sienz, E.O.; Pérez-Alonso, C.; Cruz-Olivares, J.; Román-Guerrero, A.; Baéz-González, J.G.; Rodríguez-Huezo, M.E. Establishing the most suitable storage conditions for microencapsulated Allspice essential oil entrapped in blended biopolymer matrices. *Drying Technology* 2011, 29(8), 863-872.
- [23] Adamiec, J.; Borompichaichartkul, C.; Szrednicki, G.; Panket, W.; Piriyapunsakul, S.; Zhao, J. Microencapsulation of Kaffir lime oil and its functional properties. *Drying Technology* 2012, 30(9), 914-920.
- [24] Kowalski, J.; Kalb, O.; Joshi, Y.M.; Senajuddin, A.T.M. Application of melt granulation technology to enhance stability of a moisture sensitive immediate-release drug product. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 382, 56-61.
- [25] Cortés-Rojas, D.F.; Oliveira, W.P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. *Drying Technology* 2012, 30(9), 921-934.
- [26] Lobato-Calleros, C.; Sara-Pérez, A.; Rodríguez-Tafaya, J.; Sandoval-Castilla, O.; Pérez-Alonso, C.; Vernon-Carter, E.J. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W₁/O/W₂ emulsions and skim milk. *LWT Food Science and Technology* 2008, 41, 1847-1856.
- [27] Lobato-Calleros, C.; Rodríguez, E.; Sandoval-Castilla, O.; Vernon-Carter, E.J.; Alvarez-Ramírez, J. Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W₁/O/W₂ multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International* 2006, 39, 678-685.
- [28] Quintanilla-Carvajal, M.X.; Menz-Torres, L.S.; Ahnilla-Beltrán, L.; Chanca-Pérez, J.J.; Teres-Rojas, E.; Hernández-Sánchez, H.; Jiménez-Aparicio, A.R.; Gutiérrez-López, G.F. Morphometric characterization of spray-dried microcapsules before and after α -tocopherol extraction. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2011, 10, 301-312.
- [29] Naem-Aamir, M.; Ahmad, M.; Akhtar, N.; Murtaza, G.; Khan, S.A.; Shahiq-uz-Zaman; Nokhodchi, A. Development and *in vitro-in vivo* relationship of controlled-release microparticles loaded with tramadol

- hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 407, 38–43.
- [30] ICH. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), Q1A(R2), quality guidelines. In *International Conference on Harmonization*, Geneva, Switzerland, 2006, 1–18.
- [31] Pérez-Alonso, C.; Cruz-Olivares, J.; Barrena-Pichardo, J.F.; Rodríguez-Huezo, M.E.; Biez-González, J.G.; Vernon-Carter, E.J. DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *Journal of Food Engineering* 2008, 85, 613–624.
- [32] Pu, J.; Banjston, J.D.; Sathivel, S. Production of microencapsulated crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin in oil by spray drying technology. *Drying Technology* 2011, 29(10), 1150–1160.
- [33] Alhnan, M.A.; Kida, E.; Basit, A.W. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011, 79, 432–439.
- [34] Albertini, B.; Passerini, N.; Gonzalez-Rodriguez, M.L.; Cavallari, C.; Cini, M.; Rodriguez, L. Wet granulation as innovative and fast method to prepare controlled release granules based on an ion-exchange resin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 97, 1313–1324.
- [35] Borini, G.B.; Andrade, T.C.; Freitas, L.A.P. Hot melt granulation of coarse pharmaceutical powders in a spouted bed. *Powder Technology* 2009, 189, 520–527.
- [36] Hu, R.; Zhu, J.; Chen, G.; Sun, Y.; Li, M.; Li, S. Preparation of sustained-release simvastatin microspheres by the spherical crystallization technique. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 1, 47–52.
- [37] Albertini, B.; Cavallari, C.; Passerini, N.; Voinovich, D.; Gonzalez-Rodriguez, M.L.; Magarotto, L.; Rodriguez, L. Characterization and taste-masking evaluation of acetaminophen granules: Comparison between different preparation methods in a high-shear mixer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 22, 295–303.
- [38] Martins, R.M.; Machado, M.O.; Pereira, S.V.; Nosari, A.B.F.L.; Tacon, L.A.; Freitas, L.A.P. Microparticulated hydrochlorothiazide solid dispersion: Enhancing dissolution properties via spray drying. *Drying Technology* 2012, 30(9), 956–967.
- [39] Nerkar, P.; Gattani, S. Spray-dried buccal mucoadhesive microparticles of venlafaxine based on cross seed mucilage: In vitro, in vivo evaluation in rabbits. *Drying Technology* 2012, 30(9), 968–978.
- [40] Schoubben, A.; Blasi, P.; Giovagnoli, S.; Penoli, L.; Rossi, C.; Ricci, M. Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 36, 226–234.
- [41] Hamedehiel, H.I.; Bajlik, J.; Sovány, T.; Pinye-Hódi, K. Delayed release matrix pellet preparation containing an alkalinizing pore-former agent. *Chemical Engineering Research and Design* 2011, 89, 1006–1010.
- [42] Jeong, S.H.; Park, K. Development of sustained release fast-disintegrating tablet using various polymer-coated ion-exchange resin complexes. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 353, 195–204.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DESERTACIÓN PÚBLICA

FOLIO 002
MEXICO, D.F. 2016

DESARROLLO DE SISTEMA DE
TRANSPORTE MICROENCAPSULANTE
COMO ALTERNATIVA PARA LA
SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE
FARMACOS CLASE IV DEL SCS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 30 de mes de julio del año 2016 en la Ciudad Interoptima de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO
DR. RUBEN JIMENEZ ALVARADO
DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERRANDEZ
DR. GERAR PÉREZ ALONSO

Bajo la presidencia de la primera y con comparendo de Secretaría el último, se reunieron a la presentación de la disertación pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: MARCO ANTONIO SÁENZ MIRANDA

y de acuerdo con el artículo 78 Fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acta notifica, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aplicativo, le fue tomada la protesta.




MARCO ANTONIO SÁENZ MIRANDA
ALUMNO

REVISÓ



LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMACHO RICARDE

PRESENTA



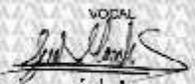
DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO

VOCAL



DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

VOCAL



DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERRANDEZ

SECRETARIO



DR. GERAR PÉREZ ALONSO