

# Micro y Nanopartículas poliméricas biofuncionales para liberación controlada de ivermectina

Proyecto final presentado por Lucas David Matilla para  
aspirar al grado de Ingeniero en Materiales

Director: Dr. Pablo Cortez Tornello  
Codirectora: Dra. Agustina Aldana

Mar del Plata, 8 de mayo de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL  
de MAR DEL PLATA  
.....



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

# Micro y Nanopartículas poliméricas biofuncionales para liberación controlada de ivermectina

Proyecto final presentado por Lucas David Matilla para  
aspirar al grado de Ingeniero en Materiales

Director: Dr. Pablo Cortez Tornello  
Codirectora: Dra. Agustina Aldana

Mar del Plata, 8 de mayo de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA  
.....



# Índice

Listado de Siglas	4
Listado de Figuras	4
Listado de Tablas	6
Agradecimientos	8
Resumen	9
1. Introducción	10
1.1. Biomateriales y biomateriales poliméricos	12
1.1.1. Biomateriales	12
1.1.2. Biomateriales poliméricos	13
1.2. Micro y Nanopartículas en el campo biomédico	17
1.2.1. Regulación en la fabricación de medicamentos	23
1.3. <i>Electrospray</i> monoaxial y coaxial	24
1.4. Liberación controlada a partir de partículas	27
1.4.1. Modelos matemáticos de cinética de liberación	29
1.4.1.1. Modelo de Orden Cero	30
1.4.1.2. Modelo de Higuchi	31
1.4.1.3. Modelo de Korsmeyer-Peppas	32
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo general	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. Materiales	35
4. Métodos	38
4.1. Preparación de partículas de PCLp y PCL- <i>Ip</i>	38
4.2. Preparación de partículas core-shell de PCL/ChFp y PCL-I/ChFp	38
4.3. Caracterización morfológica de las partículas de PCLp y PCL/ChFp con y sin Ivermectina	39
4.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	39
4.3.2. Medición de tamaño de partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS)	42
4.4. Caracterización fisicoquímica de partículas core-shell con ivermectina	46
4.4.1. Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)	46
4.4.2. Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	48
4.5. Determinación del contenido de ivermectina en las partículas PCL- <i>Ip</i> y PCL-I/ChFp	50
4.6. Estudio del proceso de liberación de ivermectina a partir de las partículas core-shell	52
4.7. Estudio de escalado del sistema de producción de partículas core-shell mediante <i>electrospray</i>	53
4.8. Estudio de mercado respecto de Sistemas de Liberación de Ivermectina existentes en el país	55
5. Resultados y discusión	56
5.1. Obtención de partículas y caracterización morfológica	56
5.2. Caracterización fisicoquímica de las partículas de PCL y PCL/ChF con y sin ivermectina	59
5.2.1. Propiedades térmicas y cristalinidad de las partículas	59
5.2.2. Estudio de la composición superficial	62
5.2.3. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	64
5.3. Estudio del proceso de liberación de ivermectina	65
5.3.1. Influencia del medio liberación y del recubrimiento en los sistemas de nanopartículas	65
5.3.2. Estudio de liberación de Ivermectina a partir de las partículas PCL- <i>Ip</i>	67

5.3.3. Estudio de liberación de Ivermectina a partir de las partículas PCL-Ip/ChF	70
5.4. Escalado del sistema de producción de partículas core-shell mediante electrospray	72
5.5 Sistemas de liberación de ivermectina en el mercado nacional	76
6. Conclusiones	79
7. Dificultades	80
8. Trabajos de investigación futuros	81
9. Referencias	83

## Listado de Siglas

**EHDA:** *Electrohydrodynamic atomization* o *electrospray*.

**EE:** *Electrospray* o *electrospraying*.

**PCL:** poli( $\epsilon$ -caprolactona).

**Ch:** Quitosano.

**I:** Ivermectina.

**F:** Ácido fólico.

**PCLp:** partículas de PCL.

**PCL-Ip :** Partículas de PCL con Ivermectina.

**PCL/Chp :** Partículas de PCL con recubrimiento de quitosano.

**PCL-I/ChFp:** Partículas de PCL con recubrimiento de quitosano funcionalizadas con ácido fólico.

## Listado de Figuras

**Figura 1.** Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo en liberación controlada de agentes terapéuticos.

**Figura 2.** Clasificación de Biopolímeros de acuerdo a su origen.

**Figura 3.** Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico.

**Figura 4.** Esquema proceso de *electrospray* coaxial para preparación de partículas core-shell biofuncionales PCL-I-QF.

**Figura 5.** Imagen del cono de Taylor obtenida en la práctica experimental.

**Figura 6.** Difusión de agente terapéutico a partir de una matriz polimérica.

**Figura 7.** Sistema de liberación de agente terapéutico por activación del solvente: a) sistema controlado por hinchamiento, b) sistema reservorio.

**Figura 8.** Sistema de liberación a partir de polímeros biodegradables: a) degradación de masa, b) erosión superficial.

**Figura 9.** Sistema de liberación controlada por ambiente fisiológico. Esquema de bomba osmótica.

**Figura 10.** a) Estructura química de poli( $\epsilon$ -caprolactona), según nomenclatura IUPAC (1,7)-

polioxepan-2-ona. Los extremos de cadena suelen tener grupos hidroxilos. b) Estructura química de la molécula de Quitosano.

**Figura 11.** Estructura química de la molécula de ácido fólico.

**Figura 12.** Estructura de la Ivermectina.

**Figura 13.** Esquema de un equipo característico de microscopía electrónica de barrido (SEM). Fuente Principio de análisis instrumental Mc Graw Hill, Madrid 2002.

**Figura 14.** Diagrama de las señales obtenidas mediante SEM.

**Figura 15.** Microscopio Electrónico de Barrido.

**Figura 16.** Esquema de un equipo DLS.

**Figura 17.** Función de autocorrelación de la función de intensidad respecto del tiempo.

**Figura 18.** Esquema de un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido.

**Figura 19.** Gráfico de flujo de calor en función de la temperatura, obtenido mediante DSC.

**Figura 20.** Equipo de Espectroscopia infraroja por transformada de Fourier (FTIR).

**Figura 21.** Curva de calibración de ivermectina en AA:DCM (7:3).

**Figura 22.** Espectrofotómetro UV/Visible.

**Figura 23.** Esquema de sistema de liberación en solución buffer

**Figura 24.** Imágenes SEM de partículas (a) PCL  $d= 15 \mu\text{m}$  y  $v= 14 \text{ kV}$ ; (b) PCL  $d= 15 \mu\text{m}$  y  $v= 17 \text{ kV}$ ; (c) PCL-ivermectina,  $d= 15 \mu\text{m}$  y  $v= 17 \text{ kV}$ ; y (d) PCL-I-QF ( $d= 15 \mu\text{m}$  y  $v= 17 \text{ kV}$ ).

**Figura 25.** Termogramas de PCL, quitosano (Ch), quitosano-ácido fólico (ChF), ivermectina, y partículas PCLp (7:3), PCL-Ip, y PCL-I/ChFp.

**Figura 26.** a) Espectros FTIR de PCL, Ch, F, PCLp, PCL-Ip, PCL/ChF, PCL-I/ChF, e Ivermectina, b) Espectros amplificados de Ch, F, ChF, e Ivermectina

**Figura 27.** Perfil de liberación de Ivermectina en los sistemas de PCL-Ip y PCL-Ip/ChFp.

**Figura 28.** Perfil inicial (0-14hs) de liberación de Ivermectina en los sistemas de PCL-Ip y PCL-Ip/ChFp.

**Figura 29.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip (entre 0 y 120 h).

**Figura 30.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip (entre 0 y 14 h).

**Figura 31.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip/ChF (entre 0 y 140 h).

**Figura 32.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip/ChF (entre 0 y 14 h)

## Listado de Tablas

**Tabla 1.** Aplicaciones micro y nanopartículas.

**Tabla 2.** Mecanismos de liberación difusional para sistemas no hinchables de diferentes geometrías.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales para la obtención de partículas de PCL.

**Tabla 4.** Diámetro medio de partícula ( $D_m$ ) e índice de polidispersidad promedio ( $PDI_m$ ) medidos por DLS, diámetro medio ( $d_m$ ) y dispersión ( $S_m$ ) determinados mediante Image PP a partir de imágenes SEM.

**Tabla 5.** Propiedades térmicas de ivermectina, PCL, Ch, y partículas.  $\Delta H_m$ , calor de fusión de PCL;  $\Delta H_{mCh}$ , calor de fusión de quitosano;  $\Delta H_{mI}$ , calor de fusión de ivermectina;  $T_m$ , temperatura de fusión;  $X_cPCL$ , grado de cristalinidad de PCL;  $X_{cI}$ , grado de cristalinidad de ivermectina.

**Tabla 6.** Contenido de ivermectina encapsulada en las partículas por unidad de masa, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

**Tabla 7.** Coeficientes y parámetros de modelos de difusión para partículas PCL-Ip.

**Tabla 8.** Coeficientes y parámetros de modelos de difusión para partículas PCL-Ip/ChF.

**Tabla 9.** Factores de inversión directa.

**Tabla 10.** Factores de inversión indirecta.

**Tabla 11.** Costos de materias primas.

**Tabla 12.** Costos de producción para una solución de 10 ml.

**Tabla 13.** Costos fijos y variables de producción de partículas.

**Tabla 14.** Empresas que comercializan equipos de electrospinning/*electrospraying* en el mundo.

**Tabla 15.** Productos comerciales en Argentina.

## Agradecimientos

La palabra “Gracias” proviene del latín *gratia*, la cual deriva de *gratus* (agradable, agradecido), y en origen en latín significa la honra o la alabanza que sin más se tributa a otro. En esa palabra quiero compendiar un sin fin de emociones, pensamientos y actitudes de cada uno de aquellos que me acompañaron en este “capítulo” que cierra este proyecto final.

A mi familia, pilar y fundamento de quien hoy soy. Mi madre que me impulsó a seguir adelante cuando los miedos y las dudas me derribaban, a mi padre, fiel oyente de mis inseguridades. A mi hermana, eterna soñadora, de la cual no concibo el mundo sin su mirada. A mis abuelos, de los cuáles me he empapado el alma con sus experiencias, historias e infinito amor y cariño.

Al Dr. Pablo Cortez Tornello y la Dra. Agustina Aldana, directores, docentes, amigos y guías de este proyecto final que sin ninguna duda nunca hubiese llegado a concretar sin el gran profesionalismo y más aún, su inmensa calidad como seres humanos. Me llevo un gran honor de haber podido crecer con ellos a mi lado para hacer de mi un mejor profesional y persona.

A la División de Polímeros Biomédicos de INTEMA en cabeza del Dr. Gustavo Abraham por recibirme como tesista de grado y preocuparse por el proceso alcanzado. A la Dra. Nayla Lores y al Dr. Matthäus Popov por cada momento compartido de risas, consejos de vivencias, palabras de aliento y muchas experiencias difíciles de poner en palabras.

A mis amigos y mi familia de TaeKwonDo, con los cuales aprendí un poco más de lo que es crecer individual y colectivamente. Viajes que guardo en la memoria, reuniones que atesoro fuertemente y cada recuerdo que han dejado en mi y que nunca borraré.

## Resumen

El desarrollo de micro y nanopartículas poliméricas resulta de gran interés en el ámbito farmacéutico, dado que permiten reducir los costos de las terapias y riesgos de toxicidad para el paciente; aumentan la eficacia, evitan la degradación prematura de los agentes terapéuticos, y mejoran la interacción con el medio biológico. La ingeniería de partículas comprende el estudio de diferentes técnicas con el fin de obtener partículas de tamaño, morfología, estabilidad y funcionalización deseada, para aplicaciones específicas en el ámbito farmacéutico, alimenticio, cosmético y agroindustria. *Electrospray* o *electrospraying* (EE) es una técnica novedosa para la preparación de partículas poliméricas, que permite un control más eficiente en la distribución de tamaño de las partículas y su morfología, respecto de las técnicas de emulsión tradicionales. El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un nuevo material bicapa y la optimizar las condiciones de procesamiento de partículas biofuncionales obtenidas mediante *electrospray* coaxial, para su empleo como vectores de liberación controlada de ivermectina, y realizar su caracterización morfológica y fisicoquímica. Para ello, se plantea un sistema de partículas bicapa con un interior hidrofóbico (poli( $\epsilon$ -caprolactona), PCL) que contenga al agente antiparasitario, y un exterior hidrofílico de quitosano funcionalizado con ácido fólico. De modo tal que favorezca la biodisponibilidad, regule la liberación, y actúe como target por su funcionalización. Los receptores folato son conocidos por ser sobreexpresados en células cancerígenas, y en células infectadas con parásitos en enfermedades tales como Malaria y Leishmaniasis. La ivermectina es un antiparasitario de amplio espectro aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos) ampliamente empleada en medicina veterinaria, pero aún con pocos avances en aplicaciones en humanos debido a su toxicidad a nivel sistémico. En los últimos años ha demostrado actividad antiviral frente a una amplia gama de virus, tales como el de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), inhibición de las proteínas virales en el virus simio SV40 (T-ag) y virus del dengue (DENV) entre otros. Recientemente se ha demostrado actividad de la ivermectina en virus COVID 19, tanto a nivel extra como intracelular.

## 1. Introducción

El desarrollo de micro y nanopartículas resulta de gran interés en el área de la Salud, dado que permite obtener sistemas de gran funcionalidad con aplicación en diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades. Las partículas de polímeros biodegradables son motivo de una intensa investigación por parte de la Bioingeniería e Ingeniería de Materiales, encontrando importantes aplicaciones como biomateriales para liberación de agentes terapéuticos. En el ámbito farmacéutico las partículas poliméricas resultan muy atractivas, dado que permiten mejorar la biodisponibilidad, solubilidad y tiempo de retención de agentes terapéuticos solubles o poco solubles en agua <sup>1, 2</sup>. Las formulaciones de partículas poliméricas con agentes terapéuticos permiten reducir los costos de las terapias y riesgos de toxicidad para el paciente <sup>3</sup>; aumentan la eficacia, especificidad, tolerabilidad y degradación prematura de los agentes terapéuticos <sup>4</sup>, y mejoran la interacción con el medio biológico, su absorción en los tejidos y penetración intracelular <sup>5, 6</sup>. Los avances en ingeniería y ciencia de materiales han contribuido a mejorar radicalmente algunos de los inconvenientes farmacéuticos asociados al uso de agentes terapéuticos tales como, baja solubilidad en agua, inestabilidad fisicoquímica, corta vida media, biodistribución inadecuada y toxicidad <sup>7, 8, 9</sup>. La liberación localizada de agentes terapéuticos directamente en el sitio de acción, evitando la exposición sistémica, ha mejorado notoriamente coeficientes de seguridad de muchos medicamentos. Al mismo tiempo, el desarrollo de métodos de producción que sean rentables, escalables y reproducibles a escala industrial, se vuelve crucial para asegurar la práctica clínica de cualquier desarrollo <sup>7</sup>. Con este objetivo, la técnica de atomización electrohidrodinámica (EHDA, *electrospraying*), está avanzando rápidamente como una tecnología prometedora dentro de la ingeniería de partículas, para la producción de partículas poliméricas bioactivas. En comparación con las técnicas de fabricación de emulsión tradicionales, la EHDA tiene el potencial de reducir la desnaturalización de fármacos y biomacromoléculas, proporcionando un control más eficiente sobre la distribución de tamaño de las partículas y su morfología <sup>10</sup>. Estas partículas pueden prepararse a partir de polímeros naturales, sintéticos o sistemas híbridos naturales/sintéticos, y administrarse a través de la mayoría de las rutas de administración de drogas: oral, parenteral, inhalatoria y oftálmica, con capacidad de facilitar tanto la vectorización activa como pasiva. Sin embargo, cada material requiere de la optimización del procesamiento para la obtención de partículas uniformes y reproducibles. Con la selección del agente terapéutico y la funcionalización apropiada del sistema portador, es posible desarrollar sistemas biofuncionales sofisticados que optimicen considerablemente las terapias farmacológicas tales como

para tratamientos de cáncer <sup>11, 12, 13</sup>, hormonales <sup>14, 15</sup> y antimicrobianos <sup>16, 17</sup>, entre otros.

El principal objetivo del presente trabajo es diseñar y optimizar las condiciones de procesamiento de partículas *core-shell* obtenidas por EHDA para su empleo como sistema de liberación controlada de fármacos. Se plantea un sistema bicapa con un interior hidrofóbico que contenga el agente terapéutico, y un exterior hidrofílico que favorezca la biodisponibilidad, regule la liberación, y actúe como *target* debido a su funcionalización. El interior o núcleo de las partículas estará compuesto de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), un poliéster lineal alifático de carácter hidrofóbico, con morfología semicristalina, buena solubilidad en solventes orgánicos y compatibilidad para la formación de mezclas. La PCL está aprobada por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para aplicaciones específicas usadas en seres humanos tales como dispositivos de liberación de fármacos, hilos de sutura, o barreras de adhesión. Estas características han estimulado la investigación de la PCL, sus copolímeros y mezclas en numerosas aplicaciones biomédicas en liberación controlada de fármacos de tiempo prolongado <sup>11, 12, 13</sup>. Su biocompatibilidad ha sido muy estudiada y ha dado lugar a productos comerciales, tales como el Capronor<sup>TM</sup>, dispositivo que permite la liberación controlada del anticonceptivo levonorgestrol a partir de cápsulas subcutáneas <sup>18</sup>.

La cubierta o capa superficial de las partículas será de quitosano, un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de numerosos organismos vivos, y resulta además como subproducto importante de varias industrias como la pesquera y cervecera, generando un valor agregado en la utilización de residuos. La gran importancia del quitosano en el campo biomédico está dada por sus excelentes propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, es hemostático y promotor de absorción, posee actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante <sup>14</sup>.

En este trabajo se modificará el quitosano con ácido fólico para la funcionalización de las micro y nanopartículas, a fin de conseguir la vectorización activa del agente terapéutico. Los receptores folato son conocidos por ser sobreexpresados en células cancerígenas de diferentes órganos, tales como ovario, mama, colon, riñón, pulmón y cerebro. Sin embargo, difícilmente se encuentren en la superficie de células sanas. Se conoce que la unión covalente de ácido fólico a través de su grupo carboxílico a un material empleado como *carrier*, conserva una alta afinidad de unión al receptor folato de la célula cancerígena <sup>15</sup>. Por otro lado, se sabe que las células infectadas con parásitos en enfermedades tales como Malaria y *Leishmaniasis*, presentan una fase reproductiva y proliferativa fuertemente dependiente de ácido fólico. De tal manera que el metabolismo del ácido fólico en estas células infectadas con parásitos, actúa como diana para el tratamiento de las mismas. Las células hepáticas en el caso de Malaria, y dendríticas en el caso de *Leishmaniasis*, son las principales células

en donde se alojan las larvas, para luego proliferar y reproducirse rápidamente. En esta etapa es cuando justamente las larvas se multiplican, y las células poseen gran cantidad de receptores folatos ya que requieren y captan mayor cantidad de ácido fólico respecto de las células no infectadas<sup>19, 20</sup>. Por lo tanto, las partículas funcionalizadas con ácido fólico podrían ser adheridas a la superficie de las células infectadas y fagocitadas, permitiendo la liberación de un agente antiparasitario de manera selectiva.

La *Leishmaniasis* constituye un espectro de enfermedades causadas por especies del protozoo flagelado *Leishmania*, intracelular obligado del humano y otros mamíferos, que produce lesiones a niveles cutáneo, mucocutáneo y visceral<sup>21, 22</sup>. En los mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel). Se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembra infectados<sup>23</sup>. En América el vector es el mosquito *Lutzomyia*, y en Europa el *Phlebotomus*. Esta parasitosis se contempla dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) y es prevalente en 98 países y 5 continentes. Se estiman unos 1,3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta la mitad. Unos 300.000 casos corresponden a la enfermedad visceral (90% en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) y 1 millón a la forma cutánea (principalmente en Brasil, Argentina, Colombia, Perú, Afganistán, Argelia, Irán, Pakistán, Arabia Saudita, Siria y Túnez) o a la mucocutánea (sobre todo en Brasil, Perú y Bolivia)<sup>24</sup>.

La ivermectina, descubierta por William Campbell en 1975, es un agente antiparasitario derivado de la avermectina B1, un compuesto producido por el *Streptomyces avermitilis*<sup>25</sup>. Actúa contra endo y ectoparásitos, se une selectivamente y con gran afinidad a los canales de cloruro de apertura regulada por glutamato de los nervios y de las células musculares de los invertebrados, produciendo un aumento de la permeabilidad de la membrana celular a los iones cloro e hiperpolarización de las células musculares y nerviosas, causandoles parálisis de la faringe, inanición y muerte<sup>26</sup>. La ivermectina oral es usada en endoparasitosis como ascaridiasis, estrogiloidiasis, tricuriasis y enterobiasis, y puede resultar muy útil para tratamiento de pacientes inmunodeprimidos por virus de VIH, HTLV1 o HTLV2. Se ha demostrado la actividad de ivermectina para tratamiento de *Leishmaniasis*<sup>27, 28</sup>. Posee una vida media en plasma de 16 h, pero su efecto es mayor especialmente en el intestino. La ivermectina y sus metabolitos son excretados principalmente por materia fecal y orina. En la intoxicación por ivermectina pueden presentarse erupciones, cefaleas, edema, mareos, náuseas, vómito, diarrea, disnea, urticaria, parestesias y dolor abdominal<sup>25</sup>.

Actualmente se ha demostrado el efecto de ivermectina sobre el virus SARS-Cov-2, sobre el cual actuaría tanto de manera extra como intracelular. El mecanismo de acción extracelular es a través de interacción con cavidades o canales de ionóforos presentes en el sarcolema de la membrana celular, que atrapan electrolíticamente a la corona de la cápside del virus (conjunto de proteínas que envuelven

el material genético del virus) e impiden el acceso a la célula. En cuanto al mecanismo intracelular, se ha demostrado que la ivermectina produce una desestabilización de complejo heterodimero Imporina (IMPA  $\alpha/\beta 1$ ), un cotransportador que llevaría al virus al núcleo. Al desestabilizarse se bloquea la entrada del virus al núcleo y con ello impide la replicación viral <sup>29</sup>.

La vectorización de ivermectina en partículas biofuncionales se propone como una estrategia para aumentar su vida media en circulación, potenciar su actividad contra *Leishmaniasis*, y disminuir los efectos secundarios de toxicidad hasta alcanzar el sitio de acción. Por otro lado, la administración de ivermectina vectorizada en forma de micro y nanopartículas se propone como una alternativa eficiente, ante los numerosos esfuerzos a nivel mundial por minimizar los problemas de toxicidad y efectos secundarios no deseados, asociados a los agentes comúnmente empleados para el tratamiento de *Leishmaniasis*, estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina (glucantime). Además, la versatilidad de EHDA asegura diversas vías de administración en función del diámetro medio de partículas tales como, micropartículas para administración por vía inhalatoria y oral y nanopartículas para administración oftálmica e inhalatoria.

## **1.1. Biomateriales y biomateriales poliméricos**

### **1.1.1. Biomateriales**

La Ciencia de los Biomateriales es una disciplina emergente de considerable desarrollo y enorme interés social y económico, de tal forma que constituye uno de los sectores estratégicos en los programas de investigación y desarrollo tanto a nivel nacional como internacional. El desarrollo de esta ciencia claramente interdisciplinar ha ido produciéndose de forma paralela al avance en el conocimiento de los materiales, y estudio de la micro y nanoescala. Muchos de ellos fueron diseñados inicialmente para aplicaciones que tenían poca relación con el organismo humano, pero que han supuesto la base del desarrollo de técnicas, metodologías, instrumentación y dispositivos de muy variada naturaleza, diseño y morfología <sup>30</sup>.

Los biomateriales en su concepción moderna, *son sustancias diseñadas para tomar una forma en la que, sola o como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de sistemas vivos, el curso de un procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria* <sup>31</sup>. Este concepto de biomaterial permite incluir muchas sustancias que tradicionalmente no eran pensadas como biomateriales (tejidos ingenierilmente diseñados, células, órganos, virus, y materiales bioactivos y biofuncionales), y que deben ahora ser

consideradas como tales, dado que sus prestaciones están directamente controladas por las interacciones con los tejidos y los componentes tisulares.

Según su origen, los biomateriales pueden clasificarse en:

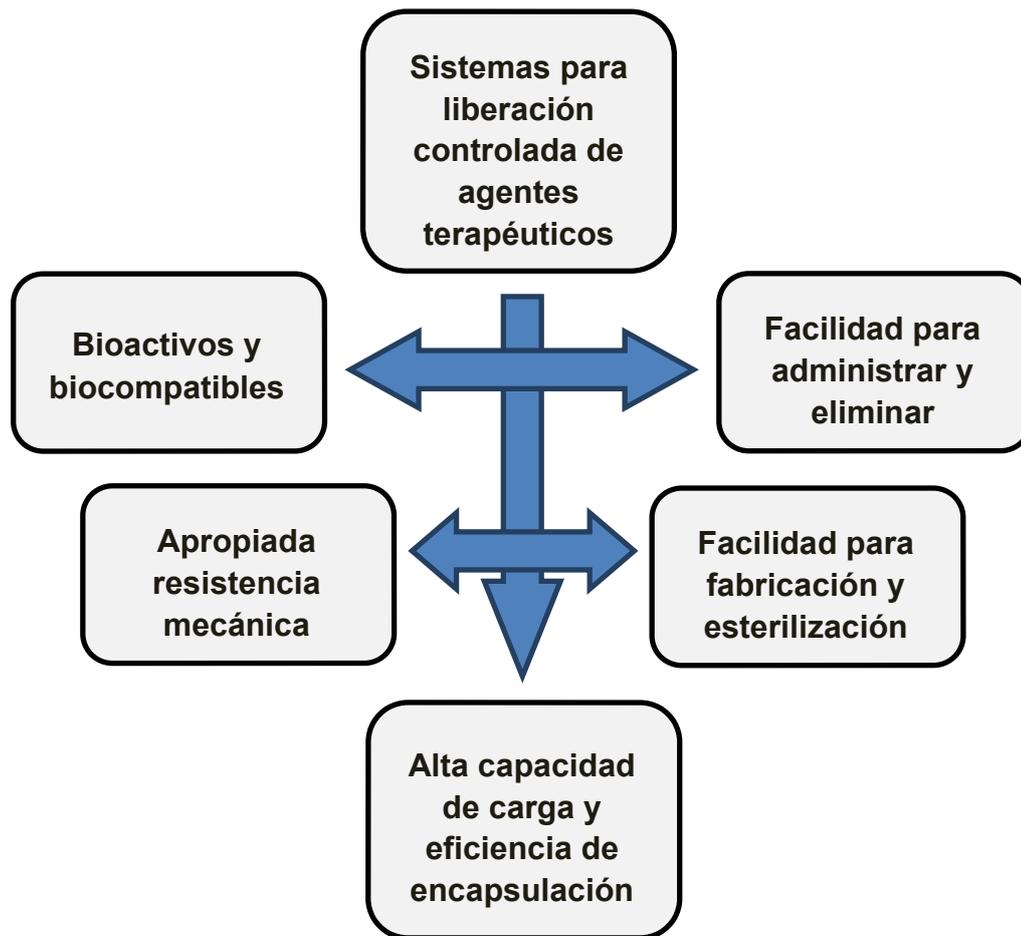
- ❖ **Naturales:** Son materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables. Algunos ejemplos son las proteínas, como la keratina, la seda, el colágeno y los polisacáridos como la celulosa, el almidón y la quitina.
- ❖ **Sintéticos:** Son materiales obtenidos a partir de la modificación o transformación de los biomateriales naturales, u obtenidos industrialmente a partir de monómeros o compuestos puros. Los biomateriales sintéticos pueden ser metales, cerámicos o polímeros, y algunos ejemplos son acero inoxidable 316 L, y aleaciones CrCo, hidroxiapatita, caucho vulcanizado, nylon, cloruro de polivinilo (PVC), entre otros.
- ❖ **Híbridos:** Son aquellos compuestos por materiales de distinta naturaleza, cuyas propiedades son superiores a las de sus componentes por separados. Suelen estar compuestos por un material base llamado matriz, al que se añaden algunos materiales de distinta naturaleza, que permiten modificar las características y/o propiedades de la matriz, tales como flexibilidad, dureza, resistencia, etc. Algunos ejemplos son: sistemas poliméricos (matrices y partículas) con nanopartículas metálicas de oro, plata, o cobre, para aplicaciones antimicrobianas y/o fotoactivas (terapias fotodinámicas); matrices porosas para regeneración de tejidos óseos a partir de ácido poliláctico o alginato con hidroxiapatita, etc.

### 1.1.2. Biomateriales poliméricos

Desde fines del siglo XIX y durante el siglo XX, se produjo un incremento en el número y variedad de polímeros, que permitieron una gran variedad de propiedades y aplicaciones, consiguiendo desarrollar materiales de gran importancia en la ingeniería. En la actualidad existen numerosos polímeros de origen natural y sintético utilizados en el campo biomédico, algunos de ellos poseen gran estabilidad y se utilizan para aplicaciones permanentes, como el polimetilmetacrilato o el polietileno. Mientras que otros son biodegradables, y se los emplea para aplicaciones temporales .

Durante la última década, el uso de polímeros para la administración de agentes terapéuticos en el campo farmacéutico y agrícola se ha incrementado de manera sostenida. Los avances previstos para la próxima década posicionan a la tecnología de liberación controlada a partir de polímeros

biodegradables, como una de las áreas de mayor consecuencia práctica en la terapia médica. Estos polímeros ofrecen grandes ventajas, permitiendo la administración de agentes terapéuticos de manera sistémica o en sitios específicos, sin la necesidad de recuperar el sistema de entrega luego de la terapia<sup>32</sup>. La aplicación de estos materiales en el campo de la biomedicina requiere el cumplimiento de algunas características, para su empleo como sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos. En la **Figura 1.**, se mencionan estas características:



**Figura 1.** Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo en liberación controlada de agentes terapéuticos.

**Bioactivo:** los sistemas poliméricos bioactivos son sustancias que al ponerse en contacto con los tejidos vivos, provocan un efecto positivo sobre los mismos induciendo una respuesta biológica específica en la interfase material-tejido.

**Biocompatible:** el sistema polimérico debe ser aceptado por parte del sistema inmunológico del individuo sin generar reacciones adversas, tales como resistencia a la coagulación sanguínea, resistencia a la colonización de bacterias y alteraciones en el proceso de cicatrización, etc <sup>33</sup>.

**Requerimientos mecánicos:** los materiales poliméricos que actúan como vectores para liberación controlada de agentes terapéuticos constituyen sistemas de entrega estables. Algunos mantienen su integridad dentro del organismo durante el tiempo de acción y otros se van degradando conforme se libera el agente.

**Alta capacidad de carga y eficiencia de encapsulación:** el sistema polimérico debe ser capaz de contener una cantidad de agente terapéutico tal que permita mantener durante un período de tiempo prolongado un nivel efectivo de agente en circulación o sitio de acción.

**Facilidad para administrar y eliminar:** el método de administración del sistema en el organismo debe ser lo menos invasivo posible a fin de no generar complicaciones adicionales a las que se pretenden tratar. Los sistemas generalmente se preparan a partir de materiales poliméricos biodegradables, biorreabsorbibles, bioerosionables o bioabsorbibles <sup>34</sup>.

**Biodegradable:** material polimérico sólido o dispositivo se descompone debido a degradación macromolecular con dispersión *in vivo* pero sin eliminación del cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, por hongos o bacterias).

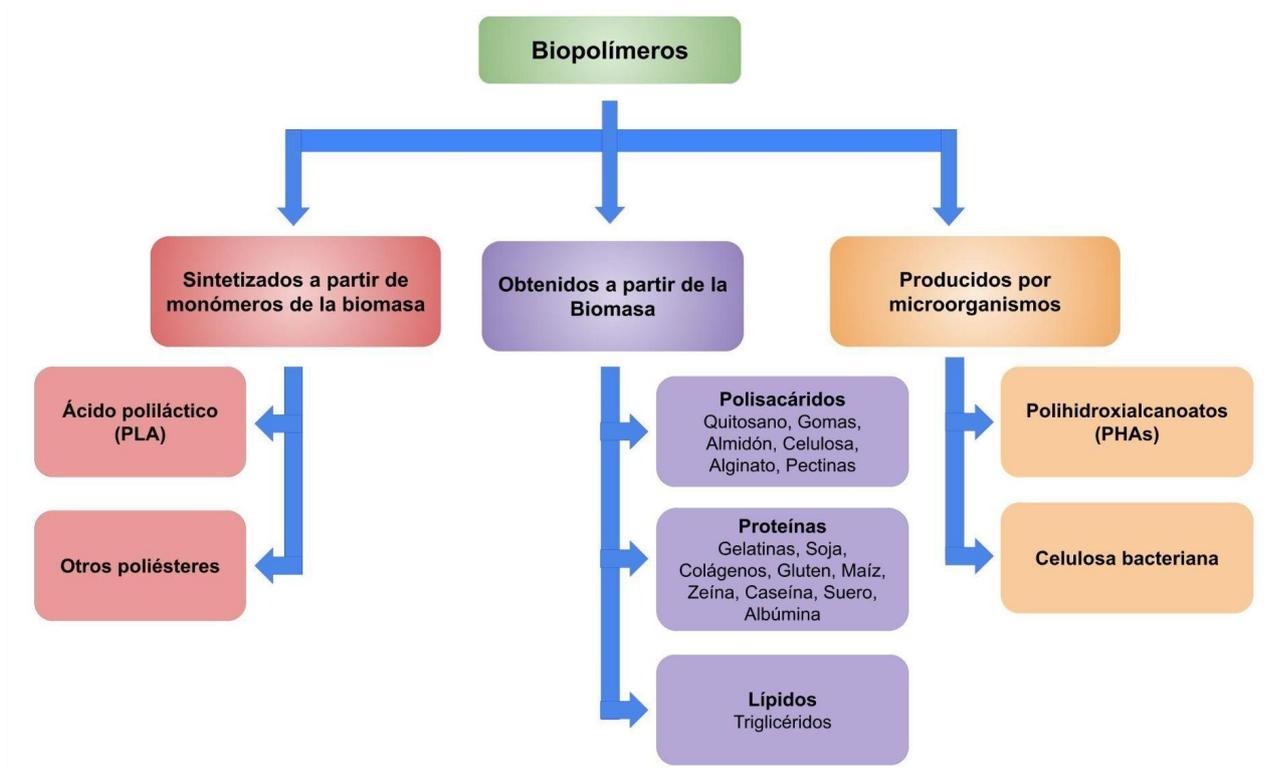
**Biorreabsorbible:** material que experimenta una degradación en masa y además se reabsorbe *in vivo* mediante eliminación por rutas metabólicas. La biorreabsorción implica la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales.

**Bioerosionable:** material que se degrada en superficie y además se reabsorbe *in vivo*. La bioerosión también implica eliminación total del material.

**Bioabsorbible:** material que puede disolverse lentamente en los fluidos corporales sin ninguna escisión de la cadena polimérica o disminución del peso molecular. Un polímero bioabsorbible puede ser biorreabsorbible si las macromoléculas dispersadas se eliminan completamente.

**Facilidad para fabricación y esterilización:** el biomaterial polimérico debe ser de fácil obtención, y debido a que cumple su función en contacto con un medio biológico, debe ser esterilizable para evitar posibles contaminaciones en el sitio de acción.

Los polímeros naturales o biopolímeros han emergido como uno de los más ampliamente investigados para mejorar el efecto terapéutico de fármacos existentes. Ofrecen ventajas sobre los polímeros sintéticos dadas su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja antigenicidad y que son renovables <sup>36</sup>. Comprenden una gran gama de moléculas con propiedades fisicoquímicas particulares que son aprovechados en campos como la biomedicina, en el diseño de sistema de liberación controlada de fármacos, inmovilización enzimas, productos que promueven la cicatrización y en implantes, aprovechando de esta manera su biocompatibilidad <sup>37</sup>. Los biopolímeros pueden clasificarse por su origen como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Clasificación de Biopolímeros de acuerdo a su origen

## 1.2. Micro y Nanopartículas en el campo biomédico

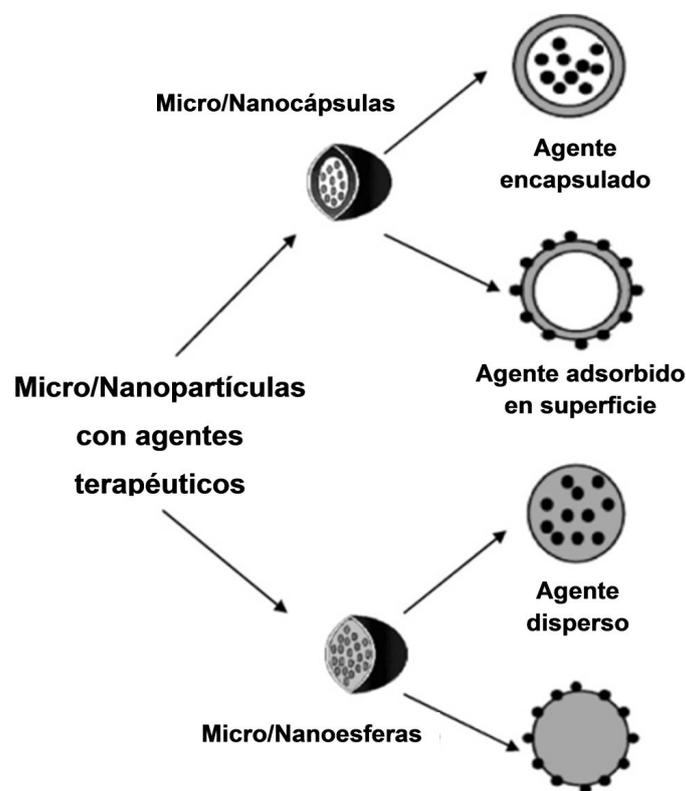
La nanotecnología desde su concepción clásica se define como el estudio, la síntesis, el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación a niveles atómicos y moleculares del orden de 1 a 100 nm de estructuras, dispositivos y sistemas. Dentro de un contexto multidisciplinario, su fin primordial es mejorar la calidad de vida y promover el desarrollo humano. Esta nueva ciencia ofrece soluciones en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, reduce el consumo de materias primas, organiza y desarrolla procesos productivos, y diseña y crea nuevos productos con características novedosas, entre muchos nuevos usos, mediante procedimientos sostenibles para el medio ambiente. El primero en hacer referencia al concepto de nanotecnología y visualizar sus alcances fue Richard Feynman en su discurso de 1959 titulado “*There is plenty of room at the bottom*”, en el cual plantea la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular. En la actualidad la nanotecnología constituye una herramienta que favorece el rápido avance de la ciencia con aplicaciones en química, biología, física, ingeniería y medicina <sup>38</sup>.

Las propiedades físicas y químicas de algunos nanomateriales suelen ser las mismas o similares a las del material en la escala convencional; sin embargo, en algunos casos estas características se modifican de acuerdo con el tamaño de la partícula. Hay varias razones por las cuales ocurre este cambio en el comportamiento físico y químico. En primer lugar, las distintas propiedades termodinámicas pueden ser alteradas por la presencia de curvaturas, por el área superficial y por la energía superficial libre, entre otros factores. Además, debe considerarse el simple hecho de que a medida que disminuye el tamaño de las partículas la proporción de átomos que se encuentran en su superficie aumenta drásticamente <sup>39</sup>.

Las nanopartículas desde su concepción moderna pueden ser definidas como partículas sólidas coloidales con tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , pueden ser obtenidas por diferentes métodos y generalmente presentan tamaños entre 100 y 500 nm. Las micro y nanopartículas de polímeros biodegradables son motivo de una intensa investigación en particular en el campo biomédico, donde encuentran importantes aplicaciones como sistemas de liberación de agentes terapéuticos. Las formulaciones de micro y nanopartículas poliméricas biodegradables permiten administrar de manera controlada y sostenida la liberación de un agente terapéutico. Entre las características más notables se encuentran: alta biocompatibilidad con células y tejidos, estabilidad en circulación sanguínea, no son tóxicas, no son trombogénicas, no presentan respuesta inmune, no inducen efectos inflamatorios, no activan los neutrófilos, evitan el sistema reticuloendotelial y permiten la incorporación de diversos agentes tales como fármacos, proteínas, péptidos, y ácidos nucleicos <sup>4, 5, 7</sup>.

Los sistemas particulados que pueden actuar en liberación controlada de agentes terapéuticos, se pueden clasificar en función de su tamaño y distribución, e interacción de la partícula y el agente. Estas características resultan muy importantes, dado que definen la interacción de las partículas con la

membrana celular y su penetración a través de las barreras fisiológicas naturales. En la **Figura 3.** se observan los diferentes tipos de sistemas particulados, y las posibles interacciones con el agente terapéutico. Conforme a la composición y organización estructural las micro y nanopartículas pueden ser clasificadas en micro y nanoesferas y en micro y nanocápsulas. Las micro y nanoesferas no presentan núcleo en su composición y están constituidas de una matriz polimérica que tiene en el interior la sustancia activa retenida, o adsorbida en su superficie. Por otro lado, las micro y nanocápsulas presentan un núcleo en que se encuentra la sustancia activa, rodeado por una cubierta o coraza polimérica.



**Figura 3.** Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico

Las investigaciones con sistemas micro y nanoparticulados portadores de agentes terapéuticos, han sido enfocados principalmente en optimizar la velocidad de rendimiento en el régimen de dosificación del agente. Estas partículas presentan mayor estabilidad en fluidos biológicos y al almacenamiento de las materias primas, comparadas con otros sistemas coloidales.

En la actualidad existen diversas aplicaciones de micro y nanopartículas en el campo de la biomedicina y farmacia, algunas de las aplicaciones se muestran en imágenes en la **Tabla 1** y se

describen a continuación:

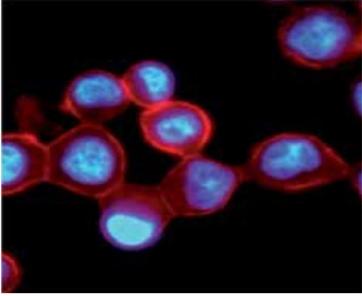
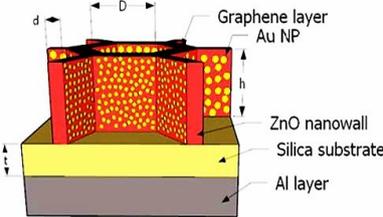
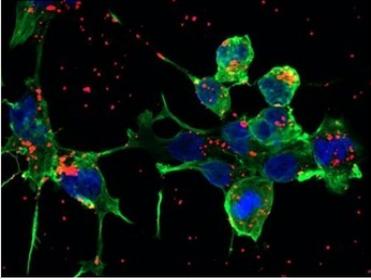
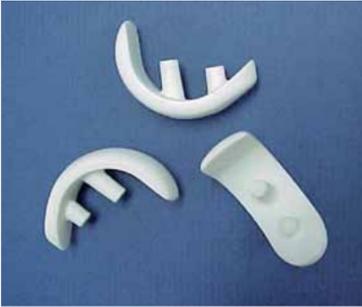
- 1) ***Nanodiagnóstico por Quantum Dots***: Son nanoconductores (Por ej: CdSe, PbS) que se caracterizan por su pequeño tamaño de entre 2 nm y 10 nm. Una de las aplicaciones más prometedoras consiste en su empleo como marcadores de células dañinas, dado que por su emisión de fluorescencia facilita la detección. Los quantum dots comienzan a ser comerciales actualmente y diversos grupos de investigación han demostrado su efectividad en la detección de tumores en estadios primarios, lo que permite su rápida identificación y extracción <sup>39</sup>.
- 2) ***Detectores de CO<sub>2</sub> y sistemas de monitorización del sistema respiratorio***: Los sensores para detectar CO<sub>2</sub> en las vías respiratorias basados en nanopartículas permiten mayores y mejores prestaciones de los sistemas actuales, basados en tecnología infrarroja dispersiva o calorimetría. Siendo estos últimos más costosos y con un mayor requerimiento energético. Las aplicaciones más próximas se prevén en el sector sanitario, sobre todo en la monitorización de pacientes con patologías respiratorias <sup>40</sup>.
- 3) ***Liberación controlada de fármacos***: La biotecnología y biomedicina permiten el uso de micro y nanopartículas para administrar agentes terapéuticos de manera vectorizada. De modo tal, que resulte posible suministrar dosis específicas de diferentes agentes, en órganos que se encontraban fuera de la acción terapéutica, o en los que su acción era nociva o tóxica. Se mejoran de esta manera, la biodistribución de numerosos fármacos, su solubilidad, coeficiente de partición y dosificación.
- 4) ***Medicina regenerativa. Sustitutos óseos***: En la actualidad, para realizar sustituciones óseas predomina la utilización de tejido dominante. Estos, frente a su buena biocompatibilidad presentan una serie de desventajas, ya que son costosos, escasos y presentan riesgo de transmisión de enfermedades frente a los materiales sintéticos. Una línea de investigación actual es el desarrollo de nanopartículas a base de hidroxiapatita, con un gradiente de porosidad en función de la proporción de hueso que se desea sustituir, de forma de obtener un alto rendimiento mecánico y una buena regeneración ósea.
- 5) ***Implantes de rodilla y caderas***: Un implante es una estructura artificial cuyo propósito es reemplazar o estabilizar funciones dañadas del cuerpo, siendo la biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, resistencia a la fatiga, y tenacidad (resistencia a la fractura), requisitos fundamentales en aplicaciones de reemplazo óseo. Las prótesis de rodilla y de cadera que se están investigando en la actualidad se basan en compuestos cerámicos de alúmina-circona con microestructuras de tipo micro-nano es decir, una matriz de alúmina en el rango micrométrico y nanopartículas de circona, o de tipo nano-nano. Estos nuevos materiales poseen valores de resistencia a la fractura

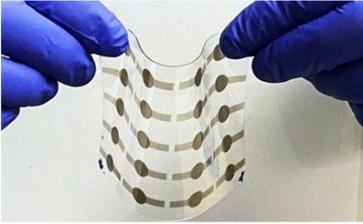
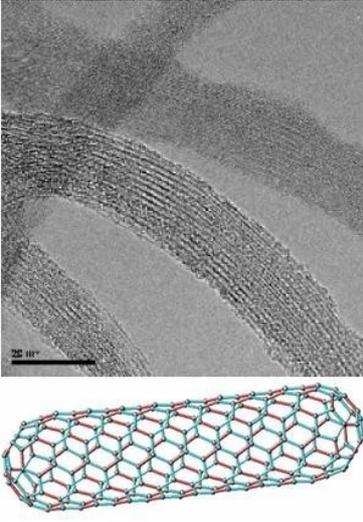
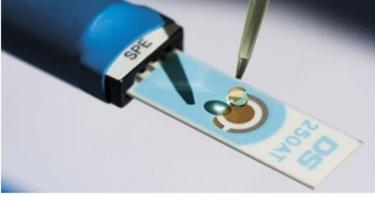
nunca antes alcanzados por ningún óxido cerámico, mejoran la osteointegración de las prótesis, ya que la estructura cristalina de los huesos está formada por cristales nanométricos y favorecen la adhesión de las células óseas. Todas estas cualidades hacen que la vida útil de estas prótesis pueda llegar a superar la esperanza de vida del paciente.

- 6) **Modificación de sueros en medicamentos:** Uno de los aspectos importantes que introduce la nanotecnología es la modificación de las propiedades físicas del agua mediante dopaje con nanopartículas. A modo de ejemplo tratar de reproducir la propiedades del agua en el interior de las células utilizando disolución de nanopartículas inorgánicas dando por ejemplo propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas. Además se puede utilizar, ya sea como agente biocatalizador, surfactante y medio de soporte para el crecimiento de células.
- 7) **Polímeros electroactivos:** En la última década se han diseñado polímeros denominados electroactivos (EAP) que responde a un estímulo eléctrico con un cambio significativo de volumen o tamaño lo cual se asimila mucho al comportamiento de los músculos. La propiedad más interesante de estos polímeros es la capacidad de emular los músculos biológicos, sin embargo como tecnología emergente, se deben mejorar todavía algunos aspectos técnicos como son la intensidad de las fuerzas desarrolladas, su baja eficiencia, y la baja disponibilidad de materiales a nivel comercial <sup>41</sup>.
- 8) **Sensores de ADN:** La aparición en el mercado de nanotubos de carbono amplió considerablemente la posibilidad de nanoestructuración de superficies como es el caso de los electrodos serigrafiados de oro o grafito. Los nanotubos de carbono aportan, desde el punto de vista superficial, nuevas propiedades con respecto a la adsorción, aumento del área superficial y transferencia electrónica. Estas propiedades, darán lugar al desarrollo de transductores que podrían ser aplicados en la construcción de sensores de ADN de alta sensibilidad. Las aplicaciones más inmediatas de este tipo de sensores serían en sectores de sanitarios, agroalimentario, medioambientales o cualquier otro que tenga necesidades de identificación y cuantificación de ADN. Investigadores del CSIC han participado en el desarrollo de un biosensor de ADN que permite detectar secuencias genéticas gracias a la señal eléctrica que se genera cuando se unen dos cadenas de ADN complementarias (hibridación). Un sistema así podría ser aplicado en el futuro para el diagnóstico médico, para la detección de mutaciones genéticas u otras aplicaciones en las que se requiera detectar ADN de forma inmediata <sup>42</sup>.
- 9) **Sensores de antígenos:** La tecnología de serigrafiado, conocida como de capa gruesa (Aproximadamente como de 10  $\mu\text{m}$  de espesor), facilita la posibilidad de usar circuitos electrónicos como transductores de inmunosensores. Con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio es posible conseguir una superficie microestructurada con un gran poder

adsorbente para cualquier material proteico y disponer de una herramienta para fabricar inmunosensores específicos para cualquier tipo de antígeno y con elevada sensibilidad.

**Tabla 1.** Aplicaciones micro y nanopartículas

Tecnología	Imagen	Descripción
<p><b>Quantum Dots</b></p>		<p>Células cancerígenas identificadas mediante incorporación quantum dots.</p>
<p><b>Detectores de CO<sub>2</sub></b></p>	 <p>The diagram shows a cross-section of a detector structure. From bottom to top, it consists of an Al layer, a Silica substrate, a ZnO nanowall, and a Graphene layer. Gold nanoparticles (Au NP) are embedded within the ZnO nanowall. Dimensions are labeled: 'd' for the width of the nanowall, 'D' for the distance between nanowalls, and 'h' for the height of the nanowall.</p>	<p>Registran el nivel de dióxido de carbono en ppm, en los espacios cerrados habitados y miden la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire.</p>
<p><b>Liberación Controlada de Fármacos</b></p>		<p>Nanopartículas de oligoquitosano para liberación controlada intracelular.</p>
<p><b>Medicina Regenerativa</b></p>		<p>Nanopartículas de hidroxiapatita incluida en matriz polimérica porosa para regeneración de tejido óseo. Fuente: <i>Lawrence Berkeley Nacional Laboratory</i></p>
<p><b>Implantes de rodillas</b></p>		<p>Prótesis de rodilla unicompilar mínimamente invasiva. Fuente: <i>Cerámica Industrial Montgatina.</i></p>

<p><b>Modificación de sueros</b></p>		<p>Productos comercializados por la empresa <i>Neowater</i>, que pueden otorgar propiedades hidrófilas o hidrófobas sueros. Ej. uso como solvente de sustancias que son insolubles en agua.</p>
<p><b>Polímeros Electroactivos</b></p>		<p>Película de músculo artificial hecha de 10 capas de elastómero dieléctrico de alto rendimiento apiladas con 20 actuadores.</p> <p>(Soft Materials Research Lab, UCLA)</p>
<p><b>Sensores de ADN</b></p>		<p>Imagen TEM de biosensor constituido por un chip de 1 centímetro cuadrado en el que se integran 896 transistores de efecto de campo construidos con nanotubos de carbono de capa única.</p>
<p><b>Sensores de antígenos</b></p>		<p>Electrodo usado en la concepción de dispositivos para la detección de antígenos y anticuerpos</p>

### 1.2.1. Regulación en la fabricación de medicamentos

De acuerdo con el artículo 3 del decreto N° 1490/92, es la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T) quien tiene la competencia en todo lo que refiere a control y fiscalización sobre sanidad y calidad, entre otros productos, de las especialidades medicinales y al control de las actividades, procesos y tecnologías que se realicen en función del aprovechamiento, producción, elaboración, fraccionamiento, importación y/o exportación

de productos, sustancias, elementos y materiales consumidos o utilizados en la medicina humana.

Las buenas prácticas de fabricación (BPF) constituyen el factor que asegura que los productos se fabrican de una forma uniforme y controlada de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretenda dar al producto y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Por otra parte las verificaciones que realiza la Administración Nacional es solo para verificar la adecuación de la empresa a la BPF sino también a orientarlas en la modificación de procedimientos de producción, distribución y comercialización que pueden resultar riesgoso para la salud, promoviendo un impacto positivo en el aseguramiento de la calidad de los medicamentos

Los requisitos de las BPF son los siguientes:

- i) Todos los procesos de fabricación se definen claramente, se revisan sistemáticamente en función de la experiencia adquirida y son capaces de producir de forma uniforme medicamentos de la calidad requerida y con la especificaciones.
- ii) Se validan los pasos críticos del proceso de fabricación y los cambios significativos del proceso
- iii) Se proporcionan todos los medios necesarios para cumplir con las BPF:
  - a) Personal adecuadamente formado y calificado
  - b) Instalaciones y espacios adecuados
  - c) Equipos y servicios necesarios
  - d) Materiales, envases y rótulos correctos
  - e) Procedimientos e instrucciones, aprobadas conforme al sistema de calidad farmacéutico

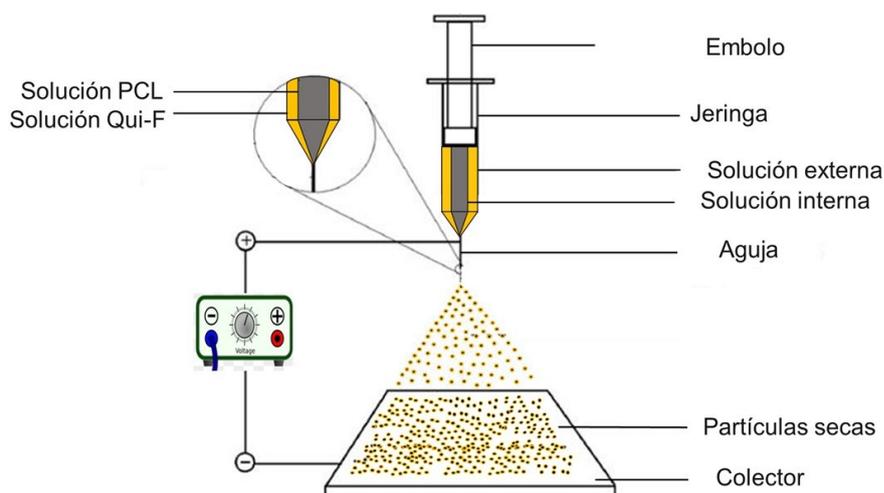
### **1.3. *Electrospray* monoaxial y coaxial**

La ingeniería de partículas comprende el estudio de diferentes técnicas con el fin de obtener partículas de tamaño, morfología, estabilidad y funcionalización deseada, para aplicaciones específicas en el ámbito farmacéutico, alimenticio, cosmético y agroindustria. *Electrohydrodynamic atomization* o *electrospray* (EHDA) es una técnica que ha sido estudiada por más de un siglo, sin embargo recién en la década de 1990 ha comenzado a ser usada para procesar y producir nano y micro materiales estructurados. Debido a la simplicidad y la flexibilidad en el esquema experimental del EHDA, ha sido

exitosamente utilizada para la obtención de partículas con composición, estructura, tamaño, morfología, y forma controlada. También ha sido usado para realizar recubrimiento de superficies con nano y micropartículas. La EHDA es una técnica fascinante para la preparación de un gran rango de micro y nano partículas ampliamente usadas en el campo farmacéutico, alimentos y medicina entre otros.

La **Figura 4.** muestra el típico esquema experimental de EHDA. Una solución de polímero (artificial o natural) es infundida de manera controlada y a un caudal conocido  $Q$ , a través de un tubo capilar o aguja. La aguja es mantenida a un alto potencial  $V$  respecto a un electrodo cercano (colector), por acción de una fuente de alta tensión aplicada. En la figura se observa el electrodo colector como una placa plana conectada a tierra. Por la aplicación de un elevado potencial  $V$  del orden de los *Kilovolts* y un caudal  $Q$ , la solución polimérica en la punta de la aguja adopta una forma estacional cónica cuyo vértice expulsa de manera continua un microchorro que rompe en gotas. La estabilidad cónica del menisco puede ser sólo producida con valores de potencial y caudal bien definidos, los cuales dependen de las propiedades fluidomecánicas y electrostáticas de la solución.

En este tipo de procesamiento, el menisco electrificado es cónico y usualmente llamado “cono de Taylor” en honor de Sir. Geoffrey I. Taylor (1886-1975), físico y matemático británico, que demostró matemáticamente que las interfaces cónicas con cargas eléctricas a potencial constante pueden estar en equilibrio hidrostático y equilibrio electrostático <sup>46</sup>. En la **Figura 5** se registró una imagen del proceso experimental que muestra el cono obtenido durante el procesamiento de las partículas de este trabajo.



**Figura 4.** Esquema proceso de *electrospray* coaxial para preparación de partículas core-shell biofuncionales PCLi-QF



**Figura 5.** Imagen del cono de Taylor obtenida en la práctica experimental

Existen algunos modelos físicos que se usan para describir la electrohidrodinámica de la región de transición entre el cono y el microchorro <sup>47</sup>. Estos modelos predicen el tamaño medio de la gota  $d_d$  y la corriente eléctrica  $I$  en función del caudal  $Q$  y de las propiedades del líquido: densidad  $\rho$ , tensión superficial  $\gamma$ , conductividad eléctrica  $K$  y la constante dieléctrica  $\epsilon$ . Estas relaciones son llamadas “leyes de escalamiento de *electrospray*” <sup>48</sup>, y fueron Fernández de la Mora y col. los pioneros en plantear un modelo que predice las siguientes relaciones para el diámetro medio del microchorro y la corriente, según las ecuaciones:

$$d_d \approx \left( \frac{Q \epsilon_0 \epsilon}{K} \right)^{1/3} \quad \text{Ec.1}$$

$$I = f(\epsilon) \left( \frac{\gamma Q K}{\epsilon} \right)^{1/2} \quad \text{Ec.2}$$

Otra alternativa para la ley de escalado fue propuesta por Gañan-Calvo y col. <sup>69</sup>:

$$d_d = 3.78 x^{-2/3} 0.6 Q^{1/2} \left( \frac{\rho \varepsilon_0}{\gamma K} \right)^{1/6} \quad \text{Ec.3}$$

$$I = 4.25 \left( \frac{QK\gamma}{\ln \left( \frac{Q}{Q_0} \right)} \right) \quad \text{Ec.4}$$

Donde  $Q_0$  es definido como  $\gamma\varepsilon/(K\rho)$ . Experimentalmente, se predice mejor la corriente que el diámetro de gota, en parte porque la relación entre el diámetro del chorro y de la gota dependen de factores no relacionados con estas leyes.

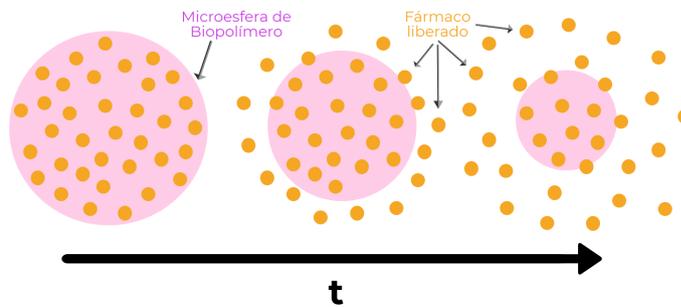
*Electrospray* o *electrospraying* es una fina dispersión de gotas líquidas en un medio gaseoso, típicamente a presión atmosférica, en donde las gotas sufren la evaporación superficial del solvente (o medio líquido) y experimentan fuerzas repulsivas entre ellas. La elevada carga eléctrica superficial de las partículas evita su aglomeramiento, aunque se han observado diferentes situaciones en las que la presencia de solvente residual genera el aglomeramiento de las micro y nanopartículas. Los fluidos newtonianos forman microchorros convectivamente inestables que rompen en microgotas, algunos ejemplos de estos son agua, solventes orgánicos, una solución diluida o nanopartículas dispersas en estos solventes. También los microchorro de líquidos viscoelásticos, como soluciones poliméricas concentradas, pueden resistir la tensión superficial y formar filamentos continuos gracias al entrecruzamiento de las cadenas.

#### 1.4. Liberación controlada a partir de partículas

Los sistemas de liberación controlada establecen un control temporal, y pueden ser de tipo prolongado, retardado, o pulsátil; y en referencia al control espacial pueden ser sitios-específicos y sistemas diana o vectorizados. Los sistemas de liberación controlada pueden agruparse en: sistemas controlados por difusión, sistemas controlados por activación del solvente, sistemas controlados por reacción química o enzimática y sistemas controlados por el ambiente fisiológico.

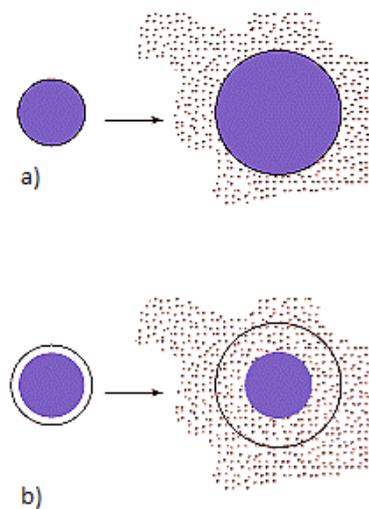
**Sistema de liberación controlada por difusión:** La difusión se produce cuando el agente terapéutico disperso o contenido en un reservorio, se libera del polímero contenedor (**Figura 6.**). Esta forma se presenta en implantes, sistemas transdérmicos y dispositivos de administración oral, como sistemas

matriciales. La cinética de liberación del agente terapéutico está gobernada por sus propiedades físicas, particularmente por su peso molecular y su solubilidad en la matriz polimérica y en agua, por la propiedad física de la matriz, por su geometría y por la cantidad de fármaco incorporado.



**Figura 6.** Difusión de agente terapéutico a partir de una matriz polimérica

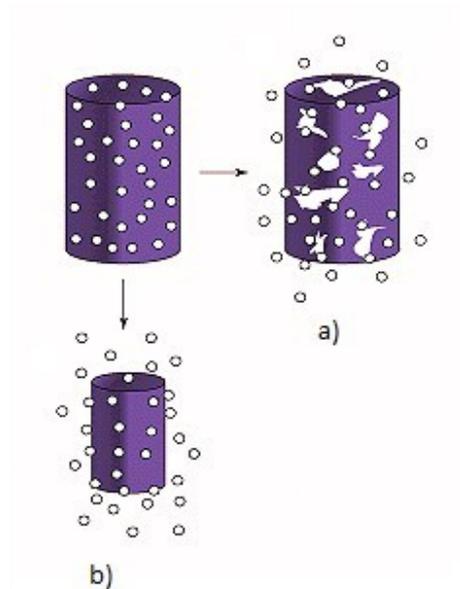
**Sistema de liberación controlada por activación del solvente:** La liberación del agente terapéutico está controlada por la velocidad de difusión del medio acuoso interior (Figura 7). El sistema puede hincharse, generando canales o poros para la salida del agente, o en otros casos impulsarlo por un sistema osmótico que emplea membranas rígidas semipermeables.



**Figura 7.** Sistema de liberación de agente terapéutico por activación del solvente: a) sistema

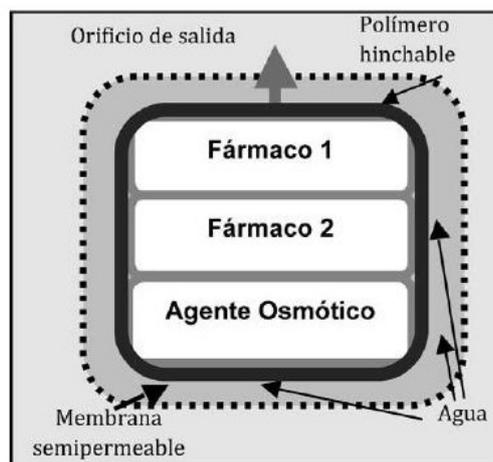
controlado por hinchamiento, b) sistema reservorio.

**Sistemas de liberación controlada por reacción química o enzimática:** La liberación del agente terapéutico está determinada por una reacción química de tipo hidrolítica o enzimática, que tiene lugar en polímeros biodegradables y biocompatibles, que se eliminan del organismo por rutas fisiológicas convencionales.



**Figura 8.** Sistema de liberación a partir de polímeros biodegradables: a) degradación de masa, b) erosión superficial

**Sistemas de liberación controlada por el ambiente fisiológico:** Son aquellos formados por polímeros que responden súbitamente a modificaciones de las condiciones físicas o químicas en un ambiente con cambios pronunciados de sus propiedades, dichos estímulos pueden ser físicos, químicos o bioquímicos.



**Figura 9.** Sistema de liberación controlada por ambiente fisiológico. Esquema de bomba osmótica.

#### 1.4.1. Modelos matemáticos de cinética de liberación

La cinética de liberación está relacionada con la comprensión e interpretación de complejos fenómenos de liberación que están relacionados con factores tales como la química, cristalinidad, solubilidad, cantidad y tamaño de partículas, factores independientes del medio de liberación, transporte de masa a través de la matriz polimérica, y técnicas de preparación, entre otros. Los modelos que describen la cinética de liberación se pueden clasificar en:

- a) Modelos mecanicistas o reales, en los que la ecuación  $M = f(t)$  tiene sentido real y los parámetros que los constituyen se explican como resultado de un análisis teórico.
- b) Modelos empíricos o no mecanicistas, basados en ecuaciones cuyo éxito reside en la capacidad para ajustar curvas experimentales.

El modelado matemático intenta predecir el comportamiento de agente terapéutico minimizando el número de ensayos y optimizando el desarrollo de productos farmacéuticos.

Los mecanismos cinéticos más importantes en el proceso de liberación controlada son la difusión, el hinchamiento y la erosión. Los casos de difusión se describen mediante la segunda ley de Fick, estrechamente relacionados con la geometría del sistema que determina la aplicación de la ecuación. Así mismo, es igual de importante conocer la constante de difusión y como se ve influenciada por la concentración del polímero. La interacción entre la matriz polimérica y el flujo ingresante determinará la mejor aproximación o menor afinidad con los modelos cinéticos. Si es posible considerar que el fenómeno principal que afecta la velocidad de liberación es el gradiente de concentración y se considera la constante de difusión independiente de la concentración, responderá a la primera ley de Fick<sup>43</sup>. Contrariamente, a mayor afinidad con el fluido ingresante, la expresión dependerá de las características fisicoquímicas del polímero (peso molecular, viscosidad, etc), en este caso la difusividad depende del hinchamiento del polímero, proceso controlado por la segunda ley de Fick.

Los mecanismos pueden afectarse por la existencia de recubrimientos que modifican la velocidad

de liberación al relajar las cadenas poliméricas, pero manteniendo la velocidad de difusión del agente terapéutico inalterada. Permitiendo desarrollar sistemas que empiezan a actuar luego de un tiempo determinado, que se relaciona con el tipo y espesor de recubrimiento.

Finalmente, los procesos fisicoquímicos relacionados con la solubilidad del agente terapéutico en el medio acuoso de liberación, permiten distinguir tres casos <sup>43</sup>:

**Agentes muy solubles (> 5 mg.ml<sup>-1</sup>):** la disolución depende del tiempo de infiltración del medio en la matriz, es decir el tiempo en que el medio penetra e hincha la matriz polimérica.

**Agentes poco solubles (< 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>):** la liberación dependerá de la erosión de la matriz polimérica, dado que el agua que ingresa e hincha el polímero no alcanza para solubilizar el agente terapéutico.

**Agente parcialmente soluble (entre 0,5 y 5 mg.ml<sup>-1</sup>):** es un comportamiento intermedio entre los anteriores, es decir que la velocidad de liberación dependerá de la velocidad de infiltración e hinchamiento de la matriz, y por lo tanto de la velocidad de erosión de la matriz polimérica.

Por todo lo mencionado, se puede concluir que la liberación de un agente a partir de un sistema polimérico depende tanto de la composición como de la geometría del sistema. Se presentan a continuación algunos de los modelos mecanicistas mayormente empleados en el ajuste de la cinética de liberación.

#### 1.4.1.1. Modelo de Orden Cero

Este modelo surge del desarrollo teórico del estudio cinético de las reacciones químicas, en las que el término “orden” de reacción se refiere a la forma en que la concentración de una sustancia influye en la velocidad. De manera que se denomina “cinética de orden cero”, a aquella en la cual la velocidad es independiente de la concentración. Es decir que la velocidad de difusión del agente terapéutico es constante e independiente de la concentración inicial, asumiendo que el área permanece invariable. La ecuación del modelo se expresa como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = A + k \cdot t \quad \text{Ec.5}$$

siendo:

$M_t$ : cantidad absoluta del agente terapéutico liberado en un tiempo  $t$

$M_{\infty}$ : Cantidad total del agente terapéutico liberado a tiempo infinito

A: cantidad inicial de agente terapéutico en solución

k: constante de velocidad

Este sistema se emplea satisfactoriamente para el ajuste de datos de liberación obtenidos a partir de sistemas osmóticos y reservorios, también son aptos para describir parcialmente la liberación en sistemas matriciales.

#### 1.4.1.2. Modelo de Higuchi

Es uno de los modelos matemáticos más frecuentemente usados para describir la velocidad de liberación del agente terapéutico de un sistema material, con modificación posterior y extendido a diferentes geometrías, el modelo responde a la **Ec. 6**

$$M_t = A \cdot [D \cdot (2 \cdot C_0 - C_s) \cdot C_s \cdot t]^{1/2} \quad \text{para } C_0 < C_s$$

que puede expresarse como fracción de masa liberada

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K_H \cdot t^{1/2} \quad \text{Ec.6}$$

con  $K_H = [D (2 \cdot C_0 - C_s) \cdot C_s]^{1/2}$ , la constante de velocidad y siendo:

$M_t$ : cantidad absoluta del agente terapéutico liberado en un tiempo t

$M_{\infty}$ : Cantidad total del agente terapéutico liberado a tiempo infinito

A: Área superficial del sistema de liberación

D: coef. de difusión en la matriz polimérica

$C_0$ : concentración inicial

$C_s$ : La soldabilidad del agente terapeutico

$M_{\infty}$ : Cantidad total del agente terapéutico liberado a tiempo infinito

Este modelo presenta alguna consideraciones a tener en cuenta, las cuales son:

- a) La concentración inicial del agente terapéutico en el sistema es mucho mayor que la solubilidad del agente en el mismo (Condiciones Sink)
- b) El análisis matemático se basa en la difusión unidireccional (se desprecian las condiciones de contorno)
- c) El tamaño de partícula de agente terapéutico disperso en el sistema polimérico no es significativa frente al espesor
- d) El hinchamiento y disolución del polímero son despreciables
- e) La difusividad del agente es constante.
- f) En todo proceso de liberación se mantiene las condiciones sink

Este modelo se puede aplicar con mayor exactitud a matrices unidireccionales tales como películas poliméricas poco solubles que no sufran hinchamiento y donde el agente es muy soluble <sup>43</sup>.

### 1.4.1.3. Modelo de Korsmeyer-Peppas

Los primeros modelos desarrollados en los años 70 explicaban la liberación con mecanismos basados en la difusión a través de matrices inertes o membranas, intercambios iónicos, osmosis, hinchamiento, etc., resultando inapropiado dado que en numerosos casos un solo mecanismo no describe fehacientemente el comportamiento de liberación.

Peppas y colaboradores desarrollaron un modelo que tiene en cuenta no solo la difusión del agente terapéutico, sino también la relajación de las cadenas del polímero como determinantes de la liberación. En este modelo la dependencia de la velocidad de liberación con el tiempo se denomina también ley de potencia <sup>44</sup>.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} + t^n \quad \text{Ec.7}$$

siendo:

$K_{KP}$ : constante que refleja las características estructurales y geométricas

$n$ : exponente de liberación, que indica el mecanismo de liberación.

Esta ecuación puede analizarse como el resultado de la combinación de dos procesos aparentemente independientes: el transporte del agente terapéutico que obedece la ley de Fick, y el hinchamiento de la matriz que involucra la transición de un estado semirrígido a otro más flexible (transporte caso II). De acuerdo a los valores de  $n$ , puede identificarse los siguientes mecanismos de liberación:

**Orden cero ( $n = 1$ ):** Se dice que hay un hinchamiento controlado en la liberación del agente. El mecanismo que prevalece es el que corresponde al **transporte caso II** en polímeros, en el cual se considera la relajación de la matriz polimérica cuando el agua embebe el polímero, siendo esta la responsable del control de la velocidad de liberación.

**Difusión Fickiana ( $n = 0,5$ ):** Se refiere al caso en que la rapidez de penetración del medio acuoso es inferior a la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas.

**Difusión anómala ( $0,5 < n < 1$ ):** En este caso coexisten los mecanismos de difusión y expansión de la matriz polimérica, es decir que durante el hinchamiento, el fenómeno de difusión está simultáneamente acompañado por relajación viscoelástica de las cadenas poliméricas.

**Difusión cuasi-Fickiana ( $n < 0,5$ ):** ocurre cuando la velocidad de penetración del medio acuoso es mucho menor que la velocidad de relajación de las cadenas del polímero.

**Super caso tipo II ( $n > 1$ ):** Se asocia a la presencia de poros en la matriz polimérica, que permite mayor área superficial e ingreso de medio acuoso, y que sirve como una vía para que el medio difunda a través de la matriz.

Los valores de los exponentes de difusión característicos  $n$  para diferentes geometrías se encuentran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Mecanismos de liberación difusional para sistemas no hinchables de diferentes geometrías

Film	Cilindro	Esfera	Mecanismo de liberación
$n < 0,5$	$n < 0,45$	$n < 0,43$	Difusión cuasi-Fickiana
0,5	0,45	0,43	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Difusión anómala
1	0,89	0,85	Transporte caso II
$n > 1$	$n > 0,89$	$n > 0,85$	Transporte super caso II

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consiste en la obtención de partículas poliméricas de tipo core-shell a partir de un polímero sintético biodegradable y biorreabsorbible como *core*, y un biopolímero funcionalizado como *shell*, que permitan la vectorización y liberación controlada de un agente terapéutico pobremente soluble en agua (clase II y IV, clasificación biofarmacéutica).

## 2.2. Objetivos específicos

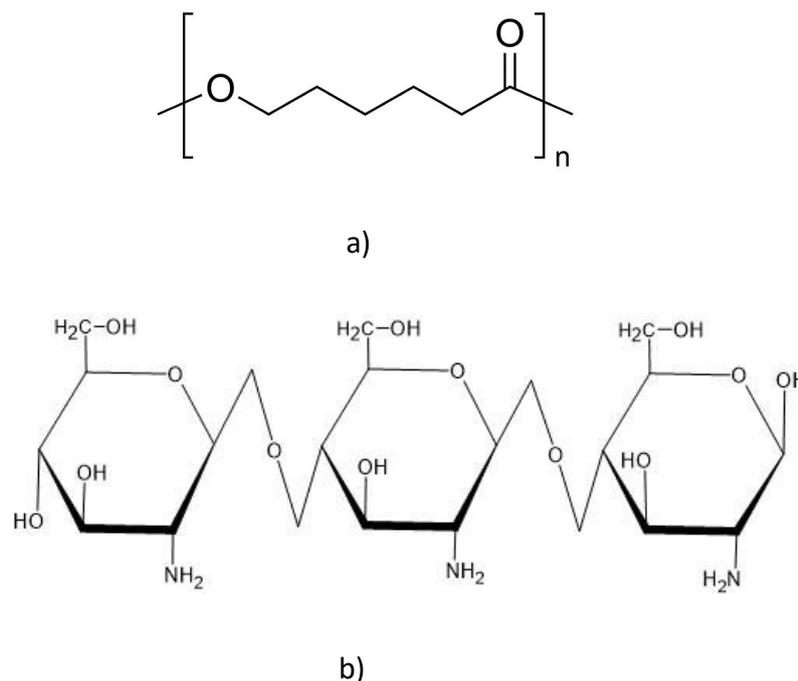
- Optimizar los parámetros del proceso para la preparación de partículas *core-shell* de PCL-Quitosano mediante la técnica de *electrospray*.
- Realizar la caracterización fisicoquímica y morfológica de los materiales mediante análisis térmico (DSC), infrarrojo (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), y dispersión dinámica de la luz (DLS).
- Estudiar el contenido de fármaco incorporado en las partículas *core-shell* y la cinética de liberación del fármaco mediante espectroscopía ultravioleta/visible (UV-Vis). Analizar la relación estructura-propiedad del sistema *core-shell*.
- Proponer un escalado del sistema óptimo de liberación obtenido.
- Realizar un estudio de mercado del sistema de liberación controlada de fármacos.

## 3. Materiales

Para el presente trabajo se utilizó poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (Aldrich) con un peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) 14 kDa. La PCL es un poliéster alifático, lineal semicristalino biocompatible, biodegradable y biorreabsorbible con temperatura de fusión ( $T_f$ ) baja (entre 58 y 64 °C) y temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de aproximadamente 60 °C. En condiciones fisiológicas, se degrada mediante hidrólisis de sus enlaces éster, dando lugar al ácido 6-hidroxicaproico, y la velocidad de este proceso depende de la forma, tamaño y aditivos del sistema estudiado. Este proceso de degradación primero ocurre ruptura de la cadena de forma que disminuye el peso molecular, y posteriormente estas cadenas más pequeñas, son transportadas fuera del sitio de implantación por los fluidos del cuerpo o por fagocitosis. El carácter hidrofóbico de la PCL, debido a la cadena de cinco grupos metilos por unidad repetitiva, se aprovecha para el diseño de sistemas para liberación controlada de fármacos de acción prolongada. Tal es el caso del dispositivo de liberación controlada Capronor<sup>TM</sup>, que permite la liberación del anticonceptivo progestágeno levonorgestrol a partir de cápsulas de administración subcutáneas, por un período de 18 meses. Se ha demostrado que el

polímero no es tóxico, excepto por una pequeña irritación en lugar del implante. Entre otras aplicaciones biomédicas, tales como apósitos de heridas, dispositivos anticonceptivos, dispositivos de fijación, odontología y en ingeniería de tejidos (ósea, de cartílago, de tendones y ligamentos, cardiovascular, de vasos sanguíneos, de piel, y de nervios).

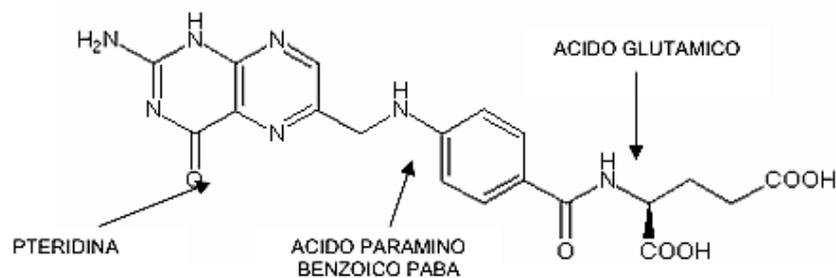
Las partículas de PCL se recubrieron con una cubierta superficial del polímero de origen natural quitosano de peso molecular medio, obtenido de Aldrich. Desde el punto de vista fisicoquímico es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medios ácidos suaves. Además, el carácter policatiónico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (insulina, pADN, siARM, heparina, etc.) y antigénica, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica.



**Figura 10.** a) Estructura química de poli(ε-caprolactona), según nomenclatura IUPAC (1,7)-polioxepan-2-ona. Los extremos de cadena suelen tener grupos hidroxilos. b) Estructura química de la molécula de Quitosano.

Para la funcionalización de las partículas se usó ácido fólico, obtenido de Droguería Saporiti, que en

conjunto con el folato son formas de la vitamina B solubles en agua. El folato está presente en los alimentos y el ácido fólico es la forma sintética de esta vitamina. El ácido fólico se usa tanto en la prevención y el tratamiento de los bajos niveles de folato como para las complicaciones que resultan, como por ejemplo la anemia y la inhabilidad del intestino para absorber los nutrientes de manera adecuada. Todos los folatos tienen en común la estructura del ácido pteroilglutámico (PteGlu), molécula constituida por un anillo de pteridina unida por un puente de metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico que a su vez se une a un enlace amida a un residuo de enlace glutámico.



**Figura 11.** Estructura química de la molécula de ácido fólico

El fármaco utilizado fue Ivermectina, un agente semisintético derivado de las avermectinas con actividad contra helmintos y ectoparásitos. Las avermectinas son lactonas del actinomiceto *Streptomyces avermectinius* y son similares a los de los antimicrobianos macrólidos, pero no poseen actividad antibacteriana. La ivermectina es un análogo semisintético de la Avermectina BI a (Abamectina). Hoy en día se conocen varias avermectinas:

- Ivermectina
- Abamectina
- Doramectina
- Moxidectina
- Emamectina
- Nemadectina
- Eprinomectina
- Selamectina

De todas ellas, la única indicada y probada en humanos es la Ivermectina. La ivermectina es un polvo cristalino blanco a blanco amarillento insoluble en agua, pero soluble en metanol y etanol al 95%. En cuanto a su toxicidad, en general, es bien tolerada y las reacciones adversas son



Muestra	Conc. PCL (% p/v)	Conc. I* (%p/p)	Solvente (v:v) (AA:DCM)	Aguja	Potencial (kV)	Caudal Interno (mL.h <sup>-1</sup> )	Caudal Externo (mL.h <sup>-1</sup> )	Distancia (cm)
PCLp (9:1)	7	-	9:1	Mono	17	0,25	-	15
PCLp (7:3)	7	-	7:3	Mono	17	0,25	-	15
PCLp (5:5)	7	-	5:5	Mono	17	0,25	-	15
PCL-Ip	7	7,14	7:3	Mono	17	0,25	-	15
PCL-I/ChFp	7	7,14	7:3	Coax	20	0,25	0,50	15
PCL/Chp	7	-	7:3	Coax	20	0,25	0,50	15

AA: Ácido acético; DCM: Diclorometano; \*:Concentración en función de masa de PCL

#### 4.2. Preparación de partículas core-shell de PCL/ChFp y PCL-I/ChFp

Para la preparación del núcleo (*core*) de las partículas se emplearon soluciones como las descritas en la sección 4.1. Para la cubierta o *shell* de las partículas se sintetizó quitosano-fólico (ChF). El ácido fólico (F) se unió al quitosano por ataque nucleofílico del grupo amino de Ch al carbono electrofílico del grupo ácido de F activado. Para ello, se preparó una solución de ácido fólico (F, 0,9 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 0,9 mmol) en 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), con una relación molar 1:1 de F y EDC. Por otro lado, se colocó 1 g de Ch en una solución de ácido acético 1,5% V/V. Una vez disuelto el polímero, se le agregó la solución de ácido fólico y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. Posteriormente, se dializó durante 4 días en agua destilada (2 cambios de agua destilada por día), y por último se liofilizó, obteniéndose un polvo de coloración amarilla debido los anillos aromáticos del ácido fólico. Se preparó una solución de ChF al 2 % p/v en ácido acético 1 M para su posterior procesamiento.

Mediante el empleo de la técnica de *electrospray* coaxial, se estudiaron diferentes condiciones de procesamiento para la obtención de partículas bicapa biofuncionales con de PCL/ChF y PCL-I/ChF. Se evaluaron distintas condiciones experimentales tales como, diferencias de potencial (15, 17, 20 kV), distancia aguja-colector (10, 15, 20 cm) y velocidades de flujo relativas entre la solución exterior (*core*,  $\phi_{in}$ ) y la solución interior (*shell*,  $\phi_{ext}$ ) ( $\phi_{ext}/\phi_{in} = 1; 1,5; 2; 2,5; 3$ ). A partir de los resultados obtenidos se determinaron las condiciones de procesamiento más adecuadas para la preparación de las partículas *core-shell* sin ivermectina (PCL/ChFp) y con ivermectina (PCL-I/ChFp) como se observa en

la **Tabla 3**.

### **4.3. Caracterización morfológica de las partículas de PCLp y PCL/ChFp con y sin Ivermectina**

Resulta fundamental el estudio de la forma y tamaño de las partículas elaboradas en este trabajo, es por ello que se empleó la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para realizar la caracterización morfológica de las partículas preparadas. Se aplicaron técnicas de análisis digital de imágenes a las micrografías SEM, para determinar el diámetro medio de partículas y la distribución de diámetros de las mismas. Por otro lado, se empleó la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para determinar el diámetro medio de las partículas e índice de polidispersidad.

#### **4.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

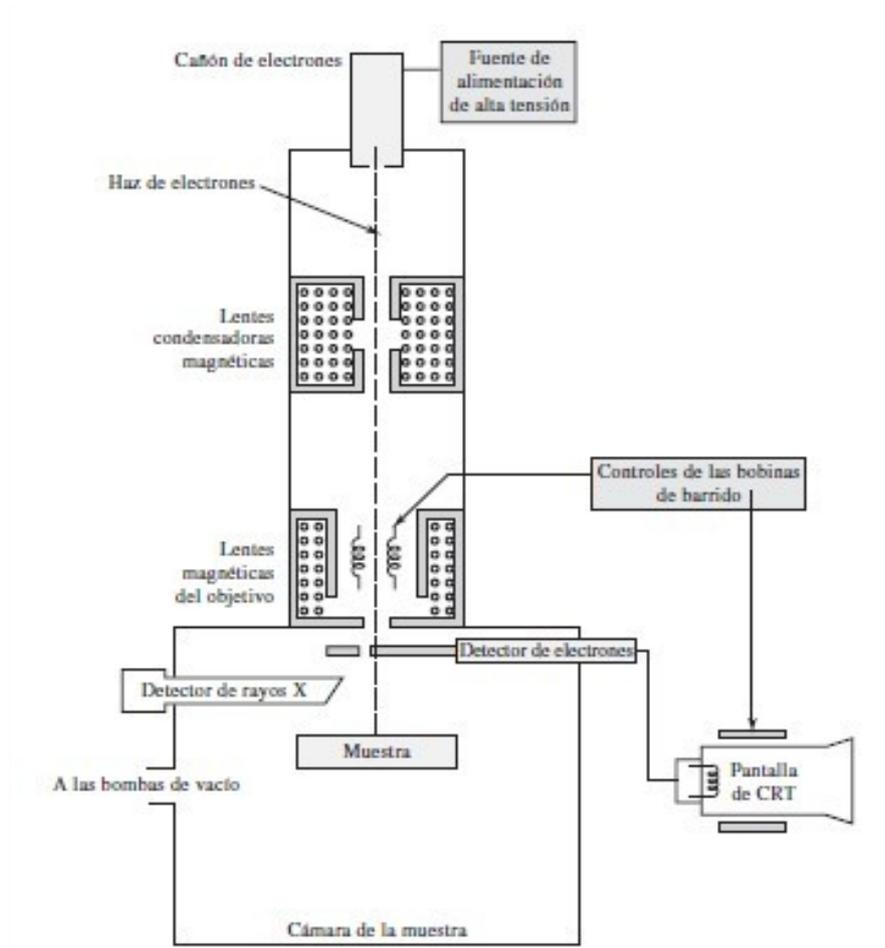
El ojo humano tiene la capacidad de distinguir dos puntos separados 0,1 mm, considerando condiciones de iluminación adecuada y a 30 cm de distancia, lo que se conoce como poder de resolución del ojo humano. Es decir que si los dos puntos estuvieran más próximos, sería imposible para el ojo distinguirlos y se reconocería una única imagen. Para poder aumentar el poder de resolución se han empleado instrumentos tales como la lupa o microscopía óptica, que permiten magnificar esta distancia y distinguir con mayor resolución distancias menores a los 0,1 mm. El microscopio óptico permite magnificar hasta 2000 veces (2000x) el tamaño de un objeto y resolver detalles hasta 0,2  $\mu\text{m}$ .

Con el objetivo de sobrepasar los límites de un microscopio óptico es necesario emplear instrumentos que usan radiaciones diferentes a la luz para formar la imagen. Los microscopios electrónicos de barrido permiten obtener imágenes mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Dichas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura en tres dimensiones, y variar su orientación según dos ejes de rotación.

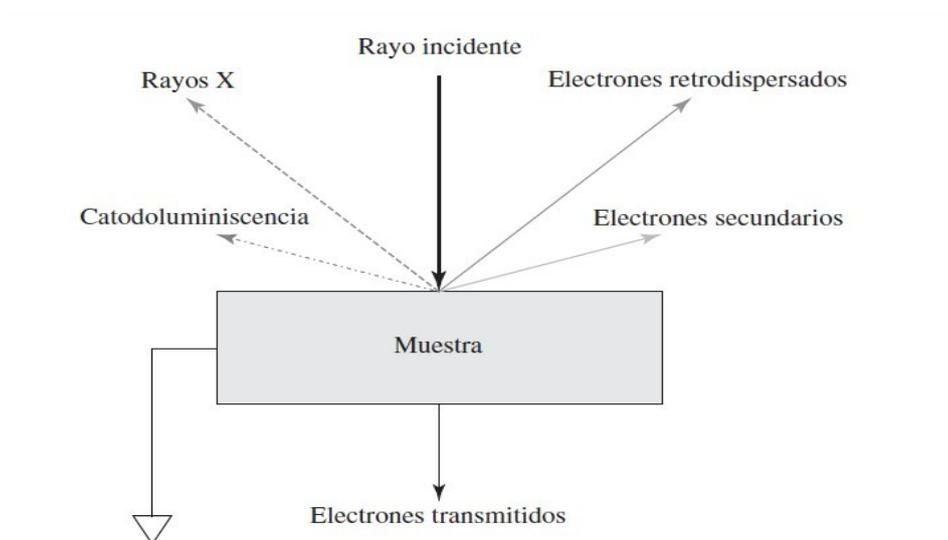
En la **Figura 13** puede observarse un esquema de un microscopio electrónico de barrido, en el que los electrones son generados mediante un cañón de electrones, que consiste en un filamento caliente de tungsteno de diámetro aproximado de 0,1 mm. Dicho filamento catódico se mantiene a un potencial de 1 a 50 kV respecto al ánodo colocado en el cañón, y rodeando al filamento hay una cápsula o cilindro

de Wehnelt, que está cargado negativamente respecto al filamento. El efecto del campo eléctrico en el cañón es el que provoca que los electrones emitidos converjan sobre un punto minúsculo llamado la zona de paso ( $d_0$ ). El equipo cuenta con un sistema de lentes magnéticas, condensadores y sistemas de enfoque, que sirven para reducir la imagen en la zona de paso ( $d_0 = 10-50 \mu\text{m}$ ) a un tamaño final sobre la muestra de 5 a 200 nm. En el equipo de SEM el barrido se lleva a cabo mediante los dos pares de bobinas localizadas entre las lentes del objetivo, uno de los pares desvía el haz en la dirección X hacia la muestra y el otro lo desvía hacia la dirección Y. En contraste con otras formas de microscopía, en la de barrido no existe una imagen verdadera de la muestra, toda la información se obtiene directamente del mapa de la superficie de la muestra <sup>45</sup>.

La versatilidad de la microscopía SEM en el estudio de sólidos proviene de la amplia variedad de señales que se generan cuando el haz de electrones interactúa con el sólido. En la **Figura 14** se observa un esquema de las señales que pueden obtenerse, luego de la interacción de un haz de electrones con la materia. Estas interacciones se consideran en dos categorías: *interacciones elásticas*, que afectan la trayectoria del haz sin que se altere de manera significativa sus energías, e *interacciones inelásticas*, que resultan de la transferencia total o parcial de la energía de los electrones al sólido. La señal de electrones secundarios surge de una región que es del mismo orden que el diámetro del haz incidente de electrones, y por esta razón son capaces de proporcionar resoluciones espaciales mucho más altas que las otras señales, y son las más ampliamente usadas en los sistemas de microscopía electrónica de barrido.



**Figura 13.** Esquema de un equipo característico de microscopía electrónica de barrido (SEM). Fuente Principio de análisis instrumental <sup>45</sup>.



**Figura 14.** Diagrama de las señales obtenidas mediante SEM

En este trabajo se empleó microscopía SEM (Microscopio JEOL, Modelo JSM-6460LV Denton Vacuum Desk II, JEOL USA Inc.) para el análisis de las partículas, dado que permite obtener imágenes con buenas resoluciones en el orden submicrométrico y nanométrico, acorde al tamaño de las estructuras que se pretendía medir. En la **Figura 15**, se muestra una imagen del equipo empleado.

A fin de evaluar las características morfológicas se tomaron muestras de las partículas preparadas a partir de las diferentes condiciones de procesamiento detalladas en las secciones **4.1** y **4.2**. A partir de las imágenes obtenidas se determinó el diámetro medio de partícula y la distribución de tamaño de partícula mediante el *software Image Pro Plus*. Para ello se obtuvieron imágenes de diferentes sectores de la muestra y de diferentes lotes de muestra, midiendo un promedio de 80 partículas por imagen. Con toda la información recolectada, se determinó el diámetro promedio y la desviación estándar del tamaño de las partículas.

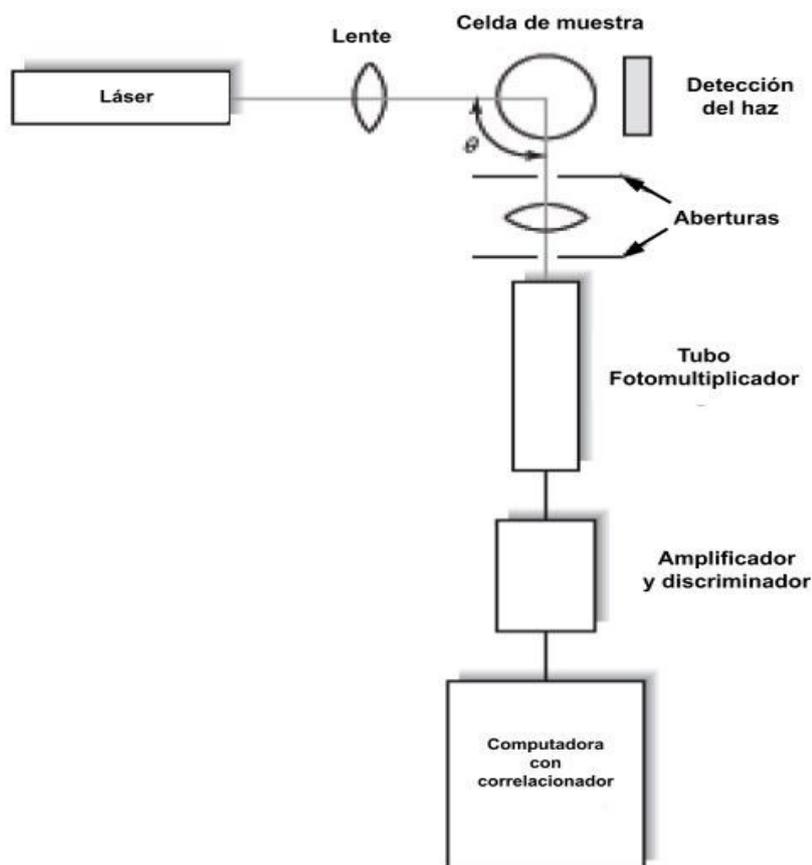


**Figura 15.** Microscopio Electrónico de Barrido

#### **4.3.2. Medición de tamaño de partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DLS), conocida como espectrometría de correlación de fotones y dispersión de luz casi elástica, es una técnica muy eficaz para estudiar la dinámica de soluciones y medir tamaños de partículas. La técnica de DLS permite obtener información de tamaño en pocos minutos, a partir de dispersiones de partículas en medio líquido, con diámetros de partículas que van de algunos nanómetros hasta casi 5  $\mu\text{m}$ . La **Figura 16**, muestra un esquema del equipo de DLS.

La dispersión de luz es un fenómeno mediante el cual la radiación electromagnética, al chocar con partículas pequeñas de tipo coloidal o incluso molecular, es desviada en su dirección de propagación de forma “caótica”, de acuerdo con el índice de refracción del medio de dispersión. Este fenómeno se conoce como efecto Tyndall, quien lo describió por primera vez en 1854. Sin embargo fue Rayleigh en 1871 quien propuso el primer modelo físico que interpreta de forma notable el fenómeno de dispersión en sistemas diluidos <sup>66</sup>. Durante la propagación de la luz en un medio cualquiera, la acción del campo eléctrico de la onda electromagnética produce la polarización del medio, es decir, las moléculas adquieren un momento dipolar cuya polaridad cambia de forma oscilante con la misma frecuencia que la del campo. De acuerdo con la leyes de la electrodinámica clásica, los dipolos oscilantes se convierten en fuentes de emisoras de radiación. La radiación emitida, sin embargo, puede tener la misma o distinta frecuencia que la radiación incidente.

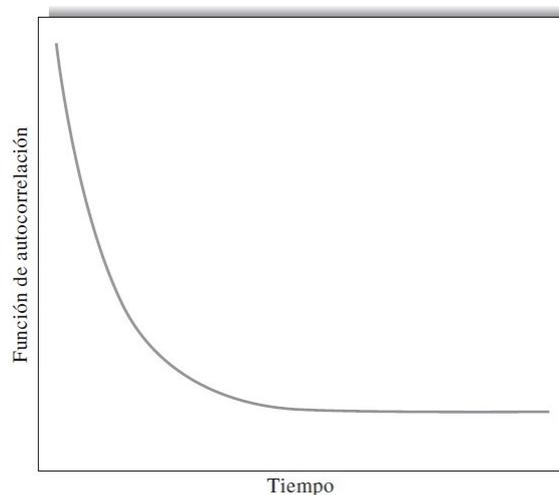


**Figura 16.** Esquema de un equipo DLS

En un medio homogéneo, las ondas reemitidas se producen en la dirección de propagación de la luz incidente, en un medio no homogéneo, constituido por partículas en suspensión, macromoléculas,

diferencias de densidades, etc, parte de la radiación sufre difracción en estos puntos lo que da lugar a la aparición de opalescencia típicas del efecto Tyndall. El caso más simple es el de la dispersión de luz por partículas aproximadamente esféricas con tamaños muchos menores que la longitud de onda de la luz ( $< \lambda/10$ ). Si se utiliza luz visible, como es habitual, esto corresponde a partículas de tamaño del orden de 50 nm o inferiores. En este caso, dado que la partícula es tan pequeña estará sometida a un campo eléctrico de la misma magnitud, y el momento dipolar inducido será proporcional al volumen de la partícula (a través de su polarización). En un experimento de dispersión de luz dinámica se mide la luz dispersada en intervalos de tiempo, pudiéndose observar que la intensidad fluctúa alrededor de un valor medio, como consecuencia del movimiento aleatorio de las partículas.

Debido a que las partículas dispersadas están en continuo movimiento térmico, la intensidad dispersada observada  $I(t)$  fluctúa con el tiempo. La tasa de intensidad en función del tiempo se asemeja a un patrón de ruido, en el que la variación de intensidad ocurre con mayor rapidez debido a partículas pequeñas que en el caso de partículas grandes. El siguiente paso en el proceso es determinar la función de autocorrección de la señal, que corresponde con la transformada de Fourier del espectro de potencia. Debido a que la radiación dispersada tiene la forma de una línea lorentziana, su transformada de Fourier debe ser una disminución exponencial, como se muestra en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Función de autocorrección de la función de intensidad respecto del tiempo

De acuerdo con la teoría de la dispersión dinámica de la luz, la constante de tiempo de la disminución exponencial  $\tau$ , está relacionada directamente con el coeficiente de difusión traslacional de las partículas esféricas, isotrópicas en movimiento browniano (**Ec.4**).

$$\tau = Dtq^2 \quad \text{Ec. 4}$$

donde  $q$  se llama módulo del vector de dispersión y se determina mediante la **Ec. 5**

$$q = 4 \pi n \lambda \sin(\theta/2) \quad \text{Ec. 5}$$

donde  $n$  es el índice de refracción del líquido en suspensión,  $\theta$  es el ángulo de dispersión y  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación láser.

Finalmente, el tamaño de la partícula se obtiene a partir del coeficiente de difusión translacional  $D_t$  y de la información de la forma de la partícula. Para una partícula esférica se usa la relación de Stokes-Einstein, para calcular su diámetro hidrodinámico  $d_h$ .

$$d_h = kT / 3 \pi \eta D_t \quad \text{Ec. 6}$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad del medio. La **Ec. 6** se cumple para partículas de forma esférica que no interactúan. La técnica de DLS permite además obtener el índice de polidispersidad (PDI), que establece una medida de la dispersión de tamaño de las partículas respecto del valor promedio medido, lo requiere una preparación cuidadosa de la muestra y tiempos de medición más largos.

En este trabajo se usó la técnica de DLS dado que permite medir con gran precisión el tamaño medio de partículas y la distribución de tamaño de las mismas. Esta información resulta muy importante dado que no sólo permite la caracterización morfológica de las partículas preparadas, sino también las posibles modificaciones de tamaño debidas a la incorporación del agente terapéutico ivermectina, y la funcionalización superficial mediante la cubierta de quitosano - ácido fólico. Las mediciones se realizaron utilizando un equipo DLS (Nano-ZS, Malvern Instruments,

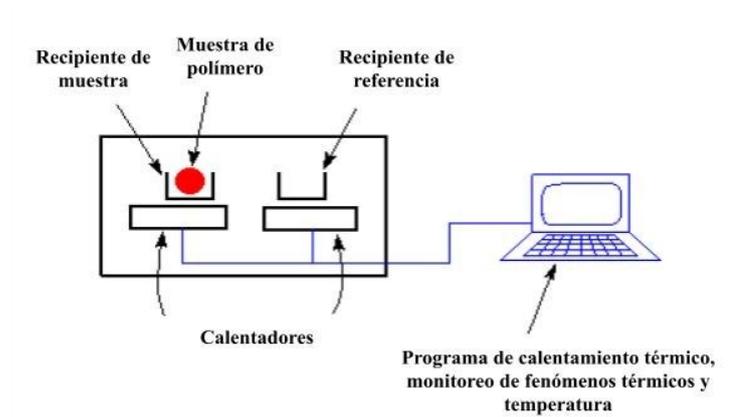
Malvern, UK) que dispone la División Cerámicos de INTEMA, a partir de cinco muestras diferentes obtenidas bajo las mismas condiciones. Se efectuaron 6 mediciones con 18 iteraciones en cada muestra. Las partículas se redispersaron en agua destilada empleando vortex durante 5 min antes de cada medición. Los resultados de diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad se expresaron como  $D_m \pm d.e.$  y  $PDI \pm d.e.$  respectivamente.

#### **4.4. Caracterización fisicoquímica de partículas core-shell con ivermectina**

##### **4.4.1. Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

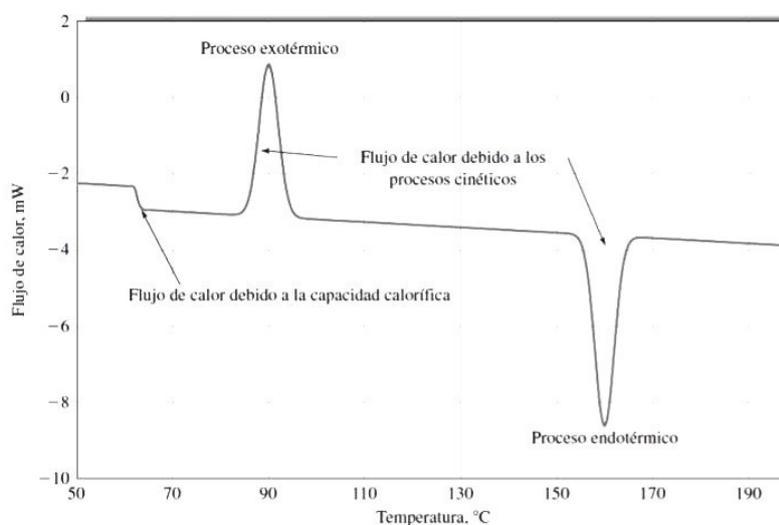
La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry* o DSC) es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. Es uno de los métodos de análisis más usado por su rapidez, sencillez y disponibilidad. Puede ser utilizada para medir varias propiedades características de una muestra, permite caracterizar procesos tales como fusión y cristalización, así como temperaturas de transiciones vítreas ( $T_g$ ). Es usada ampliamente en la industria como instrumento de control de calidad, debido a su aplicabilidad en la valoración de pureza de las muestras y el estudio del curado de los polímeros<sup>56, 57</sup>. Es de utilización frecuente en las industrias farmacéuticas y de polímeros<sup>58, 59, 60</sup>. Puede también usarse para estudiar la oxidación, así como otras reacciones químicas<sup>61</sup>.

DSC ha encontrado aplicaciones en el establecimiento de rutas metabólicas<sup>62</sup>, en taxonomía bacteriana y fúngica<sup>63</sup>. DSC es una técnica que se emplea para estudiar las transiciones térmicas que experimenta un material cuando es sometido a un proceso de calentamiento controlado. En la **Figura 18**, se observa un esquema del equipo de DSC. La muestra a analizar junto a una referencia se colocan en recipientes especiales en el equipo, los calentadores suben la temperatura a una velocidad constante determinada ( $5^\circ - 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) o bien, mantienen el ensayo a una temperatura constante. De este modo, el equipo mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia. En otras palabras, se registra el flujo extra de calor que el calorímetro debe suministrar a la muestra o a la referencia para mantener a la misma temperatura en ambos recipientes, en función de la temperatura.



**Figura 18.** Esquema de un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido

Esta técnica permite determinar las transiciones endo y exotérmicas que experimentan las muestras a medida que el proceso térmico sucede. En la **Figura 19.** se observa un termograma típico de un ensayo DSC. A partir de los termogramas es posible obtener información respecto de las propiedades de la muestra estudiada tales como capacidades caloríficas, temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ), y además permite el cálculo de efectos térmicos, pureza, cinéticas de reacción y cristalización, entalpías de fusión y cristalización ( $\Delta H_m$  y  $\Delta H_c$ , respectivamente) de las cuales se obtiene el grado de cristalinidad ( $X_c$ ) y diagramas de fase entre muchas otras.



**Figura 19.** Gráfico de flujo de calor en función de la temperatura, obtenido mediante DSC

La elección de esta técnica en el presente proyecto permitirá determinar las características térmicas de los materiales empleados, y a su vez analizar posibles modificaciones de esas características luego del procesamiento de las partículas e incorporación del agente terapéutico. En este proyecto la Tg, transición de segundo orden, se midió en el inicio de la transición y la Xc se calculó mediante la relación (Ec. 7):

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_m \text{ experimental}}{\Delta H_m \text{ teórico}} 100 \quad \text{Ec. 7}$$

donde se tomó como valor de  $\Delta H_m$  teórico el de la entalpía de fusión para PCL 100% cristalina (148,05 J.g<sup>-1</sup>)<sup>55</sup>. Se evaluaron las propiedades térmicas de PCL, ivermectina, quitosano, partículas de PCL con y sin ivermectina, y partículas con recubrimiento del complejo quitosano-ácido fólico, empleando un calorímetro TA instruments, Q-2000 (New Castle, DE, USA), con velocidad de calentamiento 10 °C.min<sup>-1</sup> y barrido de nitrógeno.

#### 4.4.2. Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía vibracional, en particular la espectroscopía infrarroja (FTIR) brinda información acerca de la estructura molecular. El espectro infrarrojo se origina por la absorción de radiación de frecuencia que está en resonancia con una transición vibracional determinada.

Las moléculas tienen frecuencias características en las cuales poseen movimientos de rotación y vibración con niveles de energía discretos (modos normales de vibración). Las frecuencias resonantes o frecuencias de vibración son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibratorio asociado. Para que un modo de vibración en una molécula sea activo al infrarrojo, debe estar asociado con cambios en el dipolo eléctrico de la molécula. Sin embargo, las frecuencias resonantes pueden estar en una primera aproximación relacionadas con la fuerza de enlace y la masa de los átomos a cada lado del mismo. Así, la frecuencia de las vibraciones puede ser asociada con un tipo particular de enlace<sup>64</sup>. Es

posible entonces obtener información de la composición química de la superficie de las muestras (0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de profundidad), mediante la irradiación del material con radiación electromagnética en el rango del infrarrojo (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta zona de radiación electromagnética se denomina “huella digital”, dado que permite la identificación de sustancias de manera unívoca<sup>65</sup>.

La reflectancia total interna atenuada (ATR-FTIR) es la aplicación de este método espectroscópico a la observación de superficies acoplado con el fenómeno físico de reflexión total interna (reflexión y refracción de radiación electromagnética en la interfase de dos medios de diferente índice de refracción) para restringir el volumen de análisis a la región superficial de la muestra. El haz infrarrojo es reflejado en la cara interna de un prisma transparente y con alta reflectancia, mientras que la superficie a ser examinada es colocada en perfecto contacto con la cara del prisma en el que ocurre la reflexión, limitando el volumen de análisis a la región superficial de la muestra.



**Figura 20.** Equipo de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El estudio de las características y composición de las partículas de PCLp y PCL/ChFp con y sin ivermectina, se realizó empleando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) como el que se muestra en la **Figura 20**.

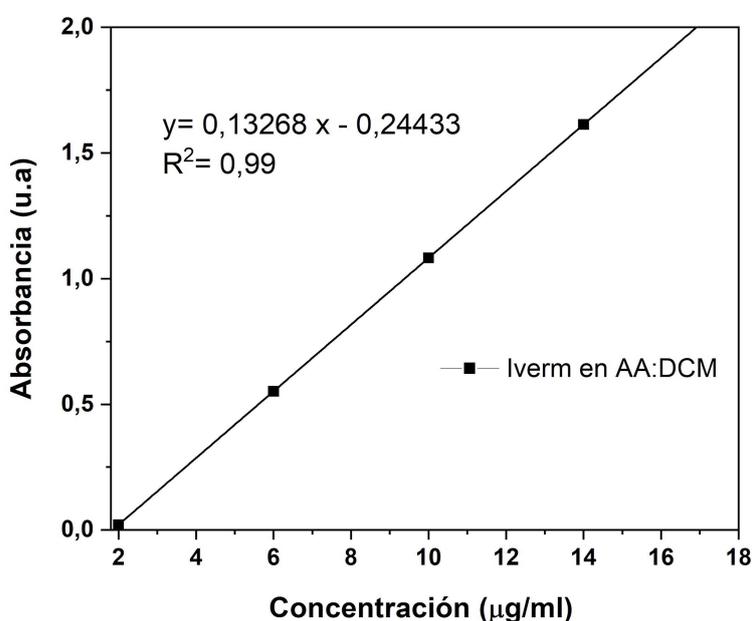
#### 4.5. Determinación del contenido de ivermectina en las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp

A fin de determinar el contenido de ivermectina incorporada en las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp, se realizó la curva de calibración de ivermectina en la mezcla de solventes AA:DCM. Se prepararon soluciones de ivermectina en AA:DCM en relación 7:3 en un matraz aforado, pesando 2 mg de ivermectina y disolviendo posteriormente en 10 ml de solución. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas, a partir de las cuales se determinaron los valores de absorbancia mediante UV/Visible, siendo el pico de absorbancia para la longitud de onda  $\lambda = 295$  nm. En la **Figura 20**, puede observarse la curva de calibración resultante, a partir de la cual se obtiene la ecuación (Ec. 8):

$$y = 0,13268 \cdot x - 0,24433$$

Ec. 8

donde  $y$  representa el valor de la Absorbancia (u.a), mientras que  $x$  representa el correspondiente valor de concentración en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Figura 21.** Curva de calibración de ivermectina en AA:DCM (7:3)

Se determinó la cantidad de ivermectina incorporada en las partículas mediante espectroscopía ultravioleta-visible, empleando un equipo SQ 2800 Unico (Dayton, NJ, USA), como el que se muestra

en la **Figura 22**. Además, se determinó la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de los sistemas vectores. Se disolvieron muestras de 3 mg de partículas en mezcla de solventes AA:DCM (7:3), y posteriormente se determinaron los valores de absorbancia considerando la intensidad de la banda de absorción  $\lambda = 295 \text{ nm}$ . Finalmente, se determinó su concentración a partir de la curva de calibración correspondiente (**Figura 21**) de ivermectina en la mezcla de solventes mencionada ( $R^2 = 0,99$ ). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  desviación estándar (d.e.).



**Figura 22.** Espectrofotómetro UV/Visible

La capacidad de carga (CC) y eficiencia de encapsulación (EE) se calcularon mediante las **Ec. 9** y **Ec. 10**, respectivamente.

$$CC (\%) = \frac{m_{if}}{m_{pf}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 9}$$

Donde  $m_{if}$  representa la masa de ivermectina incorporada en la matriz y  $m_{pf}$  es la masa de partículas de PCLI.

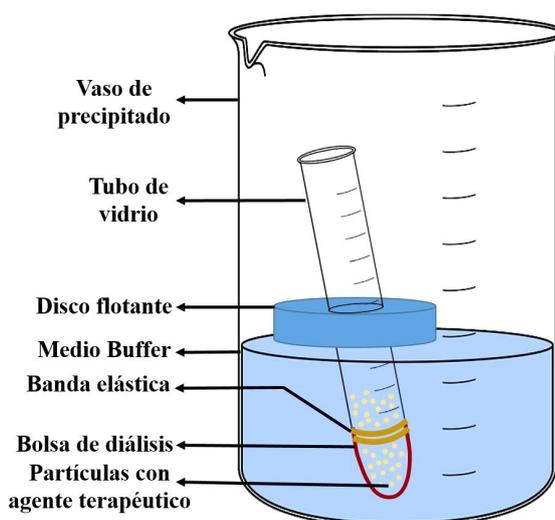
$$EE (\%) = \frac{\left( \frac{m_{if}}{m_{PCLf}} \right)}{\left( \frac{m_{ii}}{m_{PCLi}} \right)} \cdot 100 \quad \text{Ec. 10}$$

Donde  $m_{if}$  representa la masa de ivermectina incorporada y  $m_{ii}$  es la masa de ivermectina inicial, y  $m_{PCLf}$  y  $m_{PCLi}$  son las masas de PCL inicial y final.

#### 4.6. Estudio del proceso de liberación de ivermectina a partir de las partículas *core-shell*

El estudio de liberación de ivermectina a partir de las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp se realizó en solución reguladora (buffer) fosfato (PBS) a pH= 7,4. Los ensayos se realizaron por triplicado en vasos de precipitado conteniendo 100 ml de PBS a 37 °C, como se muestra en la **Figura 23**. La partículas se colocaron en tubos de vidrio de 1,2 cm de diámetro y 10 cm de longitud, recubiertos en uno de sus extremos con una bolsa de diálisis (peso molecular de corte 14.000 kg.mol<sup>-1</sup>, Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) y sellados perfectamente. En el interior de los tubos se introdujeron 2 ml de PBS. El número de extracciones no superó el 15 % del volumen total, y se efectuaron 20 extracciones de 0,5 ml, con reposición de 0,5 ml de medio fresco. Las extracciones se realizaron a los 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, y cada una hora hasta las 12 horas, posteriormente se extrajo una muestra por día durante 6 días.

La cantidad de ivermectina liberada se determinó mediante espectroscopía ultravioleta-visible, evaluando la intensidad de la banda de absorción a  $\lambda = 280$  nm. El porcentaje de ivermectina liberada se calculó dividiendo la cantidad de ivermectina liberada acumulada en cada tiempo de muestreo por la cantidad de ivermectina inicial.



**Figura 23.** Esquema de sistema de liberación en solución buffer

#### 4.7. Escalado del sistema de producción de partículas core-shell mediante *electrospray*

Para la producción de la nanopartículas para liberación controlada de ivermectina se planea usar un equipo Electrospinner YFlow 2.2D-350, con una velocidad de procesamiento de 1,25 ml/h para un volumen de producción de partículas de 0,5 g/h, valuado en 68422 USD. Considerando una instalación de ingeniería inmediata (factor 1,2) para un proceso de fluidos, parcialmente automatizado, en una unidad comercial pequeña de edificación cerrada, con una escasa planta de servicios auxiliares y para el cual no se necesita conexiones a otras unidades, a lo que se le agrega una contemplación para contingencia. Para ello se aplicó para la estimación de la inversión el método de los factores directos e indirectos (adaptación de Chilton), este es un método mediante el cual se puede extrapolar la inversión fija de un sistema completo a partir del precio de los equipos principales del proceso y determinar una estimación con un error de 10-15% del valor real <sup>49,50</sup>. Para la determinación de la inversión fija, se empleó la siguiente ecuación:

$$If = IE \cdot (1 + fi) \cdot (1 + fd) \quad \text{Ec. 11}$$

Donde:

**If:** Inversión Fija (sin considerar el terreno)

**IE:** Valor de los equipos principales instalados

**fi:** Factores para la estimación de los componentes de la inversión directa (cañerías, instrumentos, construcciones, etc)

**fd:** factores de multiplicación para la estimación de los componentes de la inversión indirecta (ingeniería y supervisión, contingencias, etc)

La mayoría de los bienes pierden su valor a medida que crece la antigüedad, esto se conoce en contabilidad como depreciación y se reconoce en prácticas de contabilidad como un gasto de operación. En lugar de cargar el precio de la compra completa de un nuevo bien como gasto de una sola vez, la forma de operar es distribuir su costo de compra durante la vida en los registros contables. Los principales objetivos para cargar un costo de depreciación pueden resumirse en:

- 1) recuperación del capital invertido

- 2) determinar con seguridad costos indirectos de producción como registros de costos
- 3) para incluir el costo de depreciación en gastos de operación con propósitos de impuestos

Algunas de las causas de depreciación de los equipos son:

- a) Depresión física: desgaste debido a la utilización cada día de operación
- b) Depreciación funcional: debido al incremento de la capacidad de producción
- c) Depreciación tecnológica: medios novedosos desarrollados para llevar a cabo una misma función haciendo antieconómico a los presentes
- d) Depreciación monetaria: Un cambio en los niveles de los precios es una causa problemática de decrecimiento en el valor de las reservas de depreciación.

Existen cinco diferentes métodos de depreciación, todos se basan estrictamente en el tiempo es decir, un bien usado todos los días tiene la misma carga de depreciación que uno usado una sola vez por año. Un método por medio del cual el total del dinero invertido se recupera tempranamente en la vida de un bien es un punto de vista conservador, a estos métodos se los conoce como métodos acelerados. Por otro lado, los métodos en los cuales la carga anual se incrementa hacia el final de la vida útil, es decir se recupera tardíamente, se los conoce como métodos desacelerados.

En general el comportamiento deseable de un método de depreciación obedece a recuperar el capital invertido, mantener un valor de libro cercano al verdadero valor del bien a lo largo de su vida, ser fácil de aplicar y ser aceptado por la legislación vigente (Ley N° 20.628).

Los costos de depreciación anuales responden a la **Ec. 12**

$$\text{Costos de depreciación} = e \cdot (I_f - L) \quad \text{Ec. 12}$$

siendo:

$e$ : Factor de depreciación anual;  $e = \frac{1}{n}$ , siendo  $n$  el número de años de vida útil

$I_f$ : Inversión Fija

$L$ : Valor residual o de reventa al final de la vida útil del bien

Para esta estimación se consideró el método de línea recta que contempla un valor constante anual de depreciación, en este caso se consideró una vida útil de 10 años y el valor residual se estimó

en un 20% de la inversión fija. En cuanto a la declaración de impuestos según el marco legal vigente los mismos se estiman considerando una depresión por el método de línea recta.

#### **4.8. Estudio de mercado respecto de Sistemas de Liberación Controlada de Ivermectina existentes en el país**

La ivermectina es un antiparasitario de uso veterinario y en humanos de gran eficacia, utilizado para tratar endoparásitos de difícil control. El uso de ivermectina en veterinaria es ampliamente conocido, ya que es un fármaco de elección para prevenir diversas enfermedades como la sarna y la filariosis <sup>50</sup>. Este medicamento está considerado como un antiparasitario con gran eficacia para destruir diferentes tipos de parásitos, tanto externos como internos del organismo de los seres vivos. El gran interés por este agente terapéutico se basa en el buen funcionamiento, el bajo costo y la rápida obtención. En la actualidad puede encontrarse en el mercado en forma de pastillas (comprimidos), inyectable o tópica (cremas y ungüentos), siendo la primera la más utilizada frecuentemente. En veterinaria la ivermectina se usa de dos formas:

- 1) Contra parásitos externos: destruye garrapatas y ácaros, un tipo de parásitos externos responsable de la sarna de los perros. Sirve para tratar la sarna sarcóptica como la demodécica <sup>51</sup>.
- 2) Contra parásitos internos: que pueden provocar problemas estomacales, cardíacos, metabólicos y respiratorios, como la filariosis, que además puede resultar peligrosa para los seres humanos ya que se puede transmitir mediante agentes vectores tales como mosquitos infectados (zoonosis) <sup>52</sup>.

En medicina humana se utiliza en forma de comprimidos y gotas de administración por vía oral para el tratamiento de algunos procesos producidos por parásitos, y en forma de crema para el tratamiento de la rosácea. La ivermectina puede disminuir la replicación *in vitro* del coronavirus 2 (SARS-CoV-2) del síndrome respiratorio agudo, pero en los ensayos controlados no han demostrado ningún beneficio clínico en la prevención o el tratamiento de la enfermedad Covid 2019.

En este trabajo, se realizó un relevamiento de los productos disponibles para administración de ivermectina que se encuentran en el mercado nacional, con el objetivo de conocer los modos de administración conocidos, tipos de aplicaciones, y determinar el nivel de innovación de los sistemas nanoparticulados preparados.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Obtención de partículas y caracterización morfológica

Se estudiaron soluciones de polímero y polímero-agente antiparasitario a fin de determinar las condiciones adecuadas para el procesamiento de las partículas mediante *electrospray*, como se detalló en los incisos 4.1 y 4.2 y mediante las condiciones experimentales detalladas en la Tabla 3. En la **Figura. 22** pueden observarse micrografías SEM de partículas de PCL obtenidas mediante distintas condiciones de procesamiento por *electrospray*. En la **Figura 22. a** se observan partículas obtenidas a partir de una solución de PCL 7 % p/v en mezcla de AA:DCM (7:3) y condiciones de procesamiento  $\phi = 0,5$  ml/h y  $v/d = 1,07$  kV/cm. Estas condiciones permitieron obtener partículas de tamaño micrométrico, poco definidas y con un alto nivel de aglomeración. Por otro lado, las **Figuras 22. b, c y d** muestran partículas obtenidas a partir de soluciones de PCL 7 % p/v en mezcla de AA:DCM, variando las cantidades relativas de los solventes en relaciones 9:1, 5:5, y 7:3 respectivamente, pero manteniendo constante las condiciones de procesamiento  $\phi = 0,5$  ml/h y  $v/d = 1,13$  kV/cm. A partir de estas imágenes puede observarse que en los tres casos mejoró la definición de las partículas respecto de las observadas en la **Figura 22. a**, sin embargo en los casos **b** y **c** se observan tamaños de partículas aparentemente mayores, y mayor dispersidad de tamaños respecto de las observadas en la **Figura 22. d**. Es por este motivo que se decidió continuar estudiando esta última condición para la incorporación del antiparasitario ivermectina.

La **Figura 22. e** muestra la micrografía SEM de las partículas de PCL con el agente terapéutico ivermectina incorporado. Estas partículas se prepararon a partir de soluciones de PCL al 7 % p/v en mezcla de AA:DCM (7:3), con incorporación de ivermectina en 7,14 % p/p respecto de PCL. Las condiciones de procesamiento fueron  $\phi = 0,5$  ml/h y  $v/d = 1,13$  kV/cm. Estas partículas presentan características morfológicas similares a las observadas en las partículas sin el antiparasitario incorporado y procesadas bajo las mismas condiciones (**Figura 22. d**), sin embargo puede observarse un ligero nivel de aglomeración mayor que podría deberse a la presencia de ivermectina en la superficie.

Finalmente a partir de la **Figura 22. f**, es posible observar las partículas *core-shell* con núcleo (*core*) de PCL con ivermectina incorporada y cubierta (*shell*) de quitosano funcionalizado con ácido fólico (PCLI-QF). Las condiciones de procesamiento optimizadas se establecieron en  $v/d = 1,33$  kV/cm, y  $\phi_{ext}/\phi_{in} = 2$ . Estas partículas se observan más definidas y menos aglomeradas, de menor

tamaño y más homogéneas.

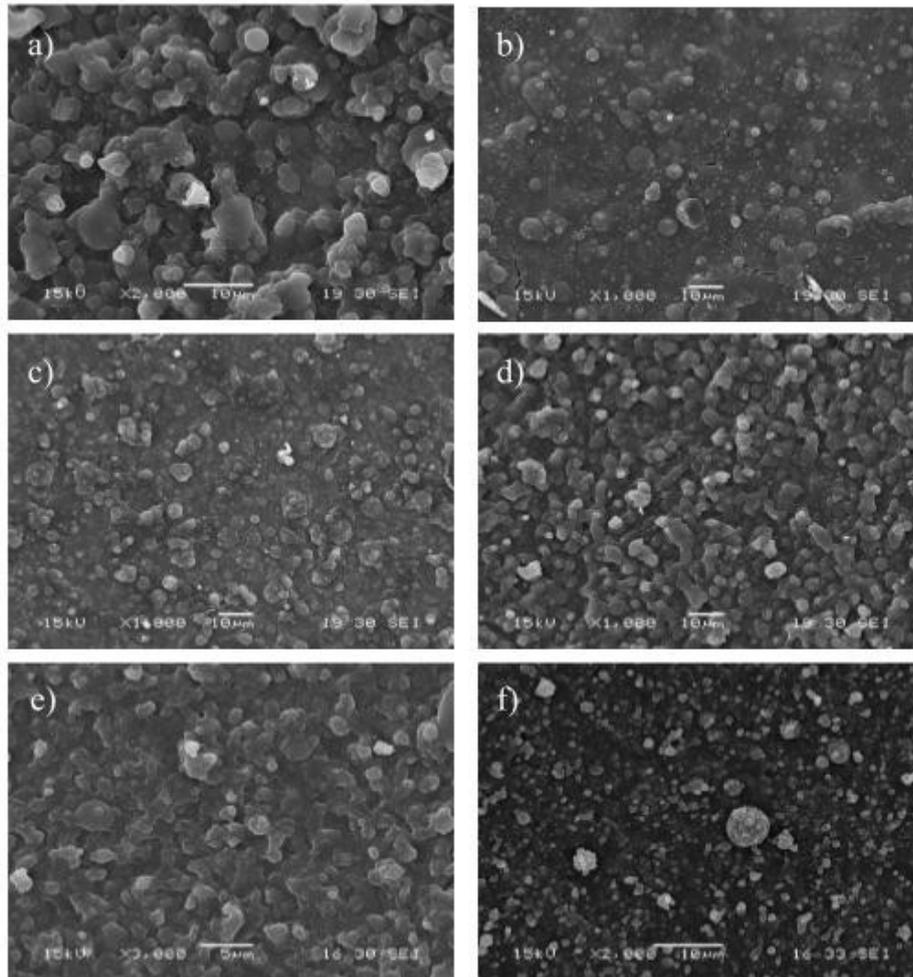
A fin de establecer los valores de diámetro medio de las partículas obtenidas y los valores del índice de polidispersidad de las partículas, se realizaron mediciones mediante DLS de acuerdo a lo indicado en la **sección 4.4.2**. Por otro lado, a partir de las micrografías SEM obtenidas, se realizaron mediciones de diámetro medio de partículas y determinación de dispersión mediante el software Image Pro Plus, a partir de mediciones de partículas al azar, a razón de 80 mediciones por cada imagen para obtener un volumen de información estadística relevante. La **Tabla 4** indica los valores de diámetro medio de las partículas de PCL preparadas a partir de diferente mezcla de solventes (PCLp 9:1, PCLp 7:3 y PCLp 5:5), las partículas de PCL con ivermectina incorporada (PCL-I), y finalmente las partículas biofuncionales sin ivermectina (PCL/ChF) y con ivermectina (PCL-I/ChF). En todos los casos, los diámetros medios de partículas ( $D_m$ ) e índice de polidispersidad promedio (PDI<sub>m</sub>) se determinaron mediante DLS; y el diámetro medio ( $d_m$ ) y dispersión ( $S$ ) determinados mediante el software ImagePP a partir de imágenes SEM obtenidas previamente.

Las partículas PCLp 7:3 mostraron el menor tamaño y la menor desviación estándar, con un índice de polidispersidad que las define como monodispersas, respecto de las PCLp 9:1 y PCLp 5:5. Es por este motivo y por las condiciones de mayor estabilidad durante el procesamiento, que se seleccionó esta condición para preparar las partículas con incorporación del antiparasitario ivermectina, y la posterior funcionalización con Quitosano - Ácido Fólico. Los valores de  $D_m$  y  $d_m$  de las partículas PCL-Ip (**Tabla 4**) muestran que la incorporación del fármaco disminuye levemente el tamaño y modifica la morfología de las partículas (**Figura 3.d**), esto puede deberse al aumento de la conductividad de la solución polimérica, y a la posible presencia de ivermectina en la superficie de las partículas. Existen antecedentes de trabajos previamente reportados, que demuestran la modificación en la morfología de las partículas de PCL luego de la incorporación de un agente terapéutico, asociado a la modificación de la conductividad de la solución polimérica y a la tasa de evaporación del solvente durante el atomizado <sup>16, 53</sup>. Las partículas PCL-I/ChFp muestran mayor esfericidad y una marcada disminución de la aglomeración (**Figura 3.f**) respecto de las PCLp 7:3 y PCL-Ip, debido a la presencia del recubrimiento de Quitosano - Ácido Fólico. Los valores de polidispersidad (PDI) de las PCL-ChFp y PCL-I/ChFp indican mayor monodispersidad de las partículas respecto de las PCLp y PCL-Ip.

A partir de los valores de diámetro medio medido mediante DLS ( $D_m$ ) y los valores determinados mediante micrografías SEM ( $d_m$ ), puede observarse que los valores obtenidos a partir del análisis digital de las imágenes SEM muestran valores ligeramente mayores a los obtenidos mediante DLS, posiblemente debido a distorsiones de las imágenes 2D obtenidas a partir de estructuras 3D de las partículas.

**Tabla 4.** Diámetro medio de partícula ( $D_m$ ) e índice de polidispersidad promedio ( $PDI_m$ ) medidos por DLS, diámetro medio ( $d_m$ ) y dispersión ( $S_m$ ) determinados mediante Image PP a partir del análisis de las imágenes SEM.

<b>Muestra</b>	<b><math>D_m</math> (<math>\pm</math> d.e.)(nm)</b>	<b><math>PDI_m</math> (<math>\pm</math> d.e.)</b>	<b><math>d_m</math> (nm)</b>	<b><math>S_m</math> (nm)</b>
<b>PCLp 9:1</b>	708 $\pm$ 70	0,47 $\pm$ 0,03	714	200
<b>PCLp 7:3</b>	376 $\pm$ 19	0,34 $\pm$ 0,02	404	95
<b>PCLp 5:5</b>	633 $\pm$ 40	0,38 $\pm$ 0,02	646	120
<b>PCL-Ip</b>	352 $\pm$ 18	0,22 $\pm$ 0,02	365	60
<b>PCL-ChFp</b>	350 $\pm$ 15	0,12 $\pm$ 0,01	355	50
<b>PCL-I/ChFp</b>	352 $\pm$ 15	0,13 $\pm$ 0,01	357	55



y (d) PCL d= 15 cm y v= 17 kV, AA:DCM (7:3); (e) PCL-I, d= 15 cm y v= 17 kV, AA:DCM (7:3); (f) PCL-I/QF d= 15 cm y v= 17 kV,  $\phi_{ext}/\phi_{in} = 2$ .

## 5.2. Caracterización fisicoquímica de las partículas de PCL y PCL/ChF con y sin ivermectina

### 5.2.1. Propiedades térmicas y cristalinidad de las partículas

En la **Figura 25** se presentan los termogramas obtenidos mediante DSC de los diferentes materiales puros (PCL, Ch, Ivermectina), el complejo ChF, y las partículas PCLp, PCL-*Ip* y

PCL-I/ChFp, mientras que en la **Tabla 5** se muestran los valores de las diferentes propiedades térmicas (temperaturas de fusión, calores de fusión y grado de cristalinidad).

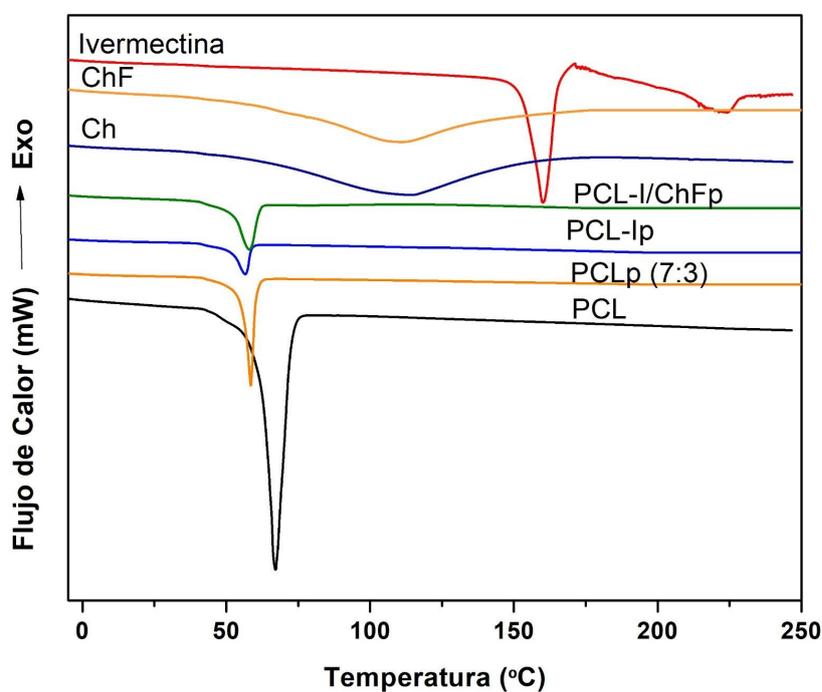
Puede observarse que la PCL pura presenta un pico de fusión característico con una temperatura de fusión de 67,12 °C, tal como lo reportado en bibliografía <sup>16</sup>. Por otro lado se obtuvo el termograma de la ivermectina, que muestra un pico de fusión endotérmico a 160,15 °C, y los termogramas de Chitosano y el complejo Ch-F, con picos de fusión endotérmicos de 113,87 y 109,89 °C respectivamente.

El valor de cristalinidad de PCL se determinó de acuerdo a la **Ec. 7**, evidenciando en las partículas PCLp una disminución respecto del polímero puro en un 11,57 %. Esta disminución de la cristalinidad puede asociarse a la técnica de procesamiento de las partículas mediante *electrospray*, dado que la rápida evaporación del solvente por aplicación de una elevada diferencia de potencial limita la movilidad de las cadenas poliméricas, y por lo tanto la formación de cristales <sup>16</sup>. De igual manera, las cristalinidades de las partículas PCL-Ip y PCL-Ip/ChF disminuyeron aún más luego de la incorporación del agente ivermectina, alcanzando valores de 34,63 % y 35,04 % respectivamente. Esto puede deberse a dos motivos o a la combinación de ambos, por un lado que la incorporación del agente ivermectina en la solución polimérica podría dificultar el ordenamiento de las cadenas de PCL, y por otro lado que la incorporación de ivermectina podría generar mayor conductividad de la solución inicial, lo que permitiría un aumento en la velocidad de evaporación del solvente y mayor dificultad en el ordenamiento de las cadenas del polímero durante el procesamiento.

En los termogramas de las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp no se observaron picos de ivermectina, por lo que se puede concluir que el agente se encuentra incorporado en la matriz polimérica distribuido de manera eficiente, o que la técnica de DSC no es lo suficientemente sensible para detectar la cantidad de ivermectina encapsulada.

**Tabla 5.** Propiedades térmicas de ivermectina, PCL, Ch, y partículas.  $\Delta H_m$ , calor de fusión de PCL;  $\Delta H_{mCh}$ , calor de fusión de quitosano;  $\Delta H_{mI}$ , calor de fusión de ivermectina;  $T_m$ , temperatura de fusión;  $X_cPCL$ , grado de cristalinidad de PCL;  $X_cI$ , grado de cristalinidad de ivermectina.

Muestra	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J.g <sup>-1</sup> )	$X_cPCL$ (%)	$\Delta H_{mCh}$ (J.g <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{mI}$ (J.g <sup>-1</sup> )	$X_cI$ (%)
PCL	67,12	101,90	68,83	--	--	--
PCLp (7:3)	58,52	84,77	57,26	--	--	--
PCL-Ip	56,63	51,27	34,63	--	--	--
PCL-I/ChFp	56,34	51,87	35,04	--	--	--
Ch	113,87	--	--	225,60	--	--
ChF	109,89	--	--	215,00	--	--
Ivermectina	160,15	--	--	--	89,93	100,00



**Figura 25.** Termogramas de PCL, quitosano (Ch), quitosano-ácido fólico (ChF), ivermectina, y partículas PCLp (7:3), PCL-Ip, y PCL-I/ChFp.

### 5.2.2. Estudio de la composición superficial

A fin de estudiar la composición superficial de las muestras se obtuvieron los espectros de los compuestos puros y partículas preparadas. La **Figura 26. a** muestra los espectros de FTIR-ATR de los materiales puros (PCL, Ch, F, Ivermectina), del complejo (Ch-F), y los diferentes sistemas de partículas obtenidos (PCLp, PCL-Ip, PCL-I/ChFp). Para mejor claridad en la observación se muestran en la **Figura 26. b** los espectros de los compuestos puros Ch, F, Ivermectina, y del compuesto Ch-F.

El espectro de la Ivermectina muestra picos característicos en 2866, 2964 y 3035  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, C-H<sub>2</sub> y C-H<sub>3</sub>), en 1730  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) y entre 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C). Por otro lado, los espectros de PCL exhiben las señales típicas a 2943 y 2864  $\text{cm}^{-1}$  (C-H y C-H<sub>2</sub>), 1720  $\text{cm}^{-1}$  (C=O en ester), 1398  $\text{cm}^{-1}$  y 1368  $\text{cm}^{-1}$  (C-H en CH<sub>2</sub>), 1246  $\text{cm}^{-1}$  y 1194  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C en ester) y 1108  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C en eter).

El espectro de Quitosano mostró picos característicos a 1692 y 1654  $\text{cm}^{-1}$  y a 1554 a 1510  $\text{cm}^{-1}$  que se asignan a los grupos NHCOCH<sub>3</sub> (amida I) y -NH<sub>2</sub> (amida II), respectivamente. Por otro lado se observaron picos a 3594  $\text{cm}^{-1}$  (-OH), 2865  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>), 1174  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C) y 711  $\text{cm}^{-1}$  (N-H) <sup>67</sup>.

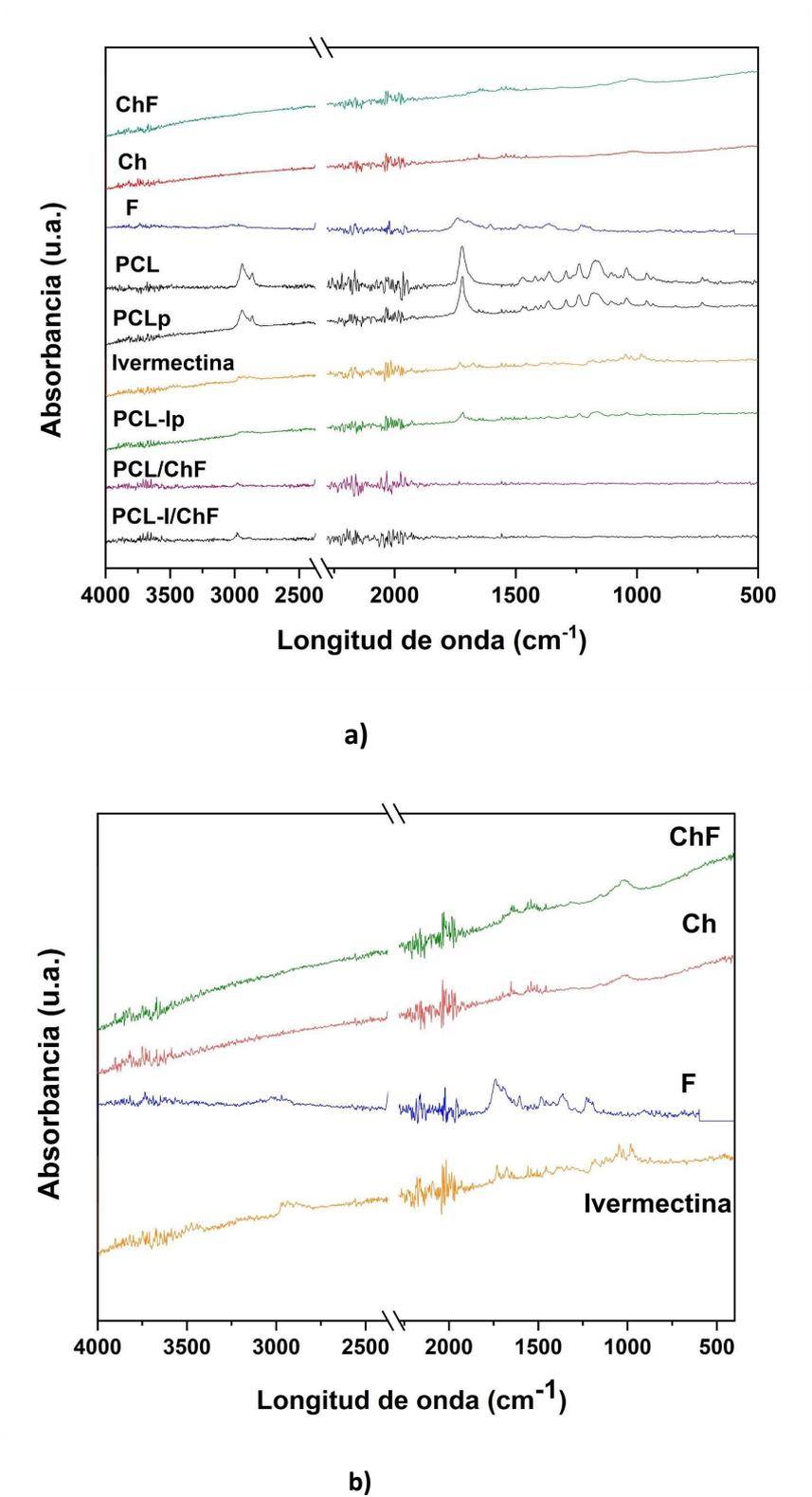
Respecto del ácido fólico (F) presenta una estructura química conformada por dos compuestos aromáticos, un benceno y una pteridina, los cuales presentan grupos funcionales sustituyentes tales como un grupo amida, dos aminas secundarias, dos ácidos carboxílicos y un alcohol, estos dos últimos grupos funcionales se superponen en el espectro. De este modo se observaron picos en 1693  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, carboxílico), 1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=O en amidas), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=N), 1619  $\text{cm}^{-1}$  (C=C en aromáticos), 1604  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 1483  $\text{cm}^{-1}$  y 1519  $\text{cm}^{-1}$  (Fenilo y anillo de Pterina), en 1422  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de alargamiento de O-H) <sup>68</sup>.

El espectro del complejo Ch-F mostró picos característicos quitosano a 1690 y 1652  $\text{cm}^{-1}$  y a 1558 a 1508  $\text{cm}^{-1}$ , además mostró un pico en 1358  $\text{cm}^{-1}$  presente en el ácido fólico.

En las partículas PCLp el espectro muestra los picos característicos de PCL, lo que indica que la estructura del polímero no sufre cambios durante el procesamiento. En las partículas PCL-Ip también se observan picos característicos de PCL, mientras que no se observan picos propios de la ivermectina, esto indicaría que el agente no se encuentra presente en superficie o al menos no de manera significativa, como para ser detectado mediante esta técnica.

Finalmente en los espectros de las partículas PCL/ChF y PCL-I/ChF se observan picos en el rango de los 3000  $\text{cm}^{-1}$  propios de la PCL. Por otro lado se observan picos de baja intensidad

correspondientes a las bandas propias de las amidas primarias y secundarias presentes en el quitosano, lo que indica la presencia de quitosano recubriendo la superficie de las partículas.



**Figura 26:** a) Espectros FTIR de PCL, Ch, F, PCLp, PCL-Ip, PCL/ChF, PCL-I/ChF, e Ivermectina, b) Espectros amplificados de Ch, F, ChF, e Ivermectina

### 5.2.3. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

En la **Tabla 6** se muestran los valores correspondientes de masa de ivermectina presente en las partículas PCL-I<sub>p</sub> y PCL-I/ChFp por unidad de masa de muestra ( $M_i$ ), la capacidad de carga, CC(%), y la eficiencia de encapsulación o carga de ivermectina incorporada en las micropartículas, EE(%).

Los valores de capacidad de carga indican que la cantidad de ivermectina contenida en las partículas de PCL-I<sub>p</sub> fue de 6,13 % de la masa total de las partículas, mientras que en las PCL-I/ChFp el valor fue de 6,16 % de la masa total de partículas. Esto indica que el procesamiento coaxial de las partículas biofuncionales de estructura *core-shell* no modifica la cantidad de ivermectina encapsulada.

Tanto en las partículas PCL-I<sub>p</sub> como en las PCL-I/ChFp los valores de  $M_i$  resultaron superiores a los 60 mg por cada gramo de muestra, lo que permite concluir que se alcanzaron valores de encapsulación del agente ivermectina acorde a los valores de MIC esperados.

Los valores de eficiencia de encapsulación en las partículas PCL-I<sub>p</sub> y PCL-I/ChFp fueron superiores al 90 % (91 y 92 % respectivamente), lo que indica una buena capacidad de la PCL para encapsular al agente ivermectina. Otros estudios realizados en sistemas particulados de PCL arrojaron valores de eficiencia de encapsulación del orden del 86%<sup>54</sup>.

**Tabla 6.** Contenido de ivermectina encapsulada en las partículas por unidad de masa, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Muestra	$M_i$ ( $\pm$ d.e.) (mg.g <sup>-1</sup> )	CC ( $\pm$ d.e.) (%)	EE ( $\pm$ d.e.) (%)
PCL-I <sub>p</sub>	61,32 $\pm$ 0,50	6,13 $\pm$ 0,12	91,44 $\pm$ 0,07
PCL-I/ChFp	61,66 $\pm$ 0,43	6,16 $\pm$ 0,11	92,00 $\pm$ 0,05

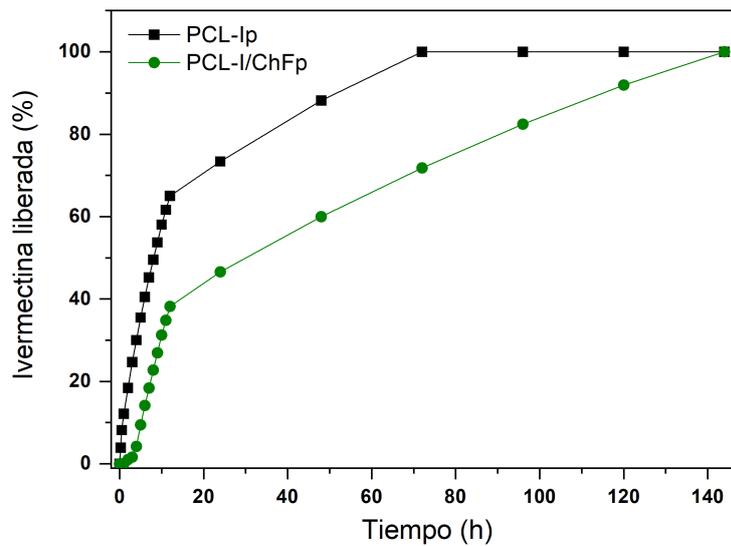
### 5.3. Estudio del proceso de liberación de ivermectina

#### 5.3.1. Influencia del medio liberación y del recubrimiento en los sistemas de nanopartículas

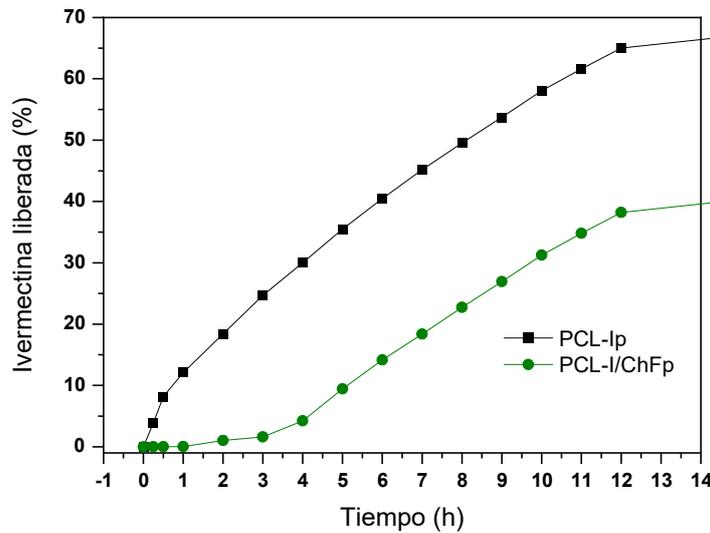
En el proceso de preparación de partículas mediante *electrospray*, resulta de vital importancia la correcta selección del solvente o mezcla, de acuerdo a sus propiedades tales como el momento dipolar, la conductividad y temperatura de evaporación, entre otros, quien a su vez determina las condiciones de procesamiento, como así también la solubilidad del sistema y del agente terapéutico, su capacidad de carga, y la velocidad de secado de las partículas. Estas condiciones determinan el tamaño y las características morfológicas finales de las partículas. La velocidad de secado de las partículas es inversamente proporcional a la temperatura de evaporación del solvente o mezcla, lo que influye directamente en la morfología final de las partículas que alcanzan el colector. Además, la velocidad de evaporación del solvente determina el ordenamiento de las cadenas poliméricas de las partículas, lo que condiciona la cristalinidad de la matriz polimérica e influye en los perfiles de liberación de los agentes encapsulados.

Los ensayos de liberación de ivermectina a partir de las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp se realizaron de acuerdo al procedimiento detallado en la **sección 4.7**, en medio buffer fosfato pH= 7,4.

En la **Figura 27** se observan los perfiles de liberación de Ivermectina de los sistemas particulados PCL-Ip y PCL-Ip/ChFp, y en la **Figura 28** se observa los mismos perfiles acotados a las primeras 14 hs de liberación. A partir de los perfiles de liberación (**Figura 27**) es posible observar tres etapas bien definidas. Una primera etapa de 0 a 4 h, una segunda de 4 a 12 h y finalmente una última etapa de 12 a 120 h.



**Figura 27.** Perfil de liberación de Ivermectina en los sistemas de PCL-Ip y PCL-Ip/ChFp



**Figura 28.** Perfil inicial (0-14hs) de liberación de Ivermectina en los sistemas de PCL-Ip y PCL-Ip/ChFp

En la primera etapa se observa una marcada diferencia entre las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp, dado que en las partículas sin recubrimiento puede verse una liberación del 31,03 % de la ivermectina encapsulada a las 4 h, mientras que en las partículas PCL-I/ChFp la liberación apenas alcanza 4,23 % en ese tiempo. Es por esto que en este último caso consideramos prácticamente nula la liberación de

ivermectina en esta etapa. Esta diferencia en la liberación de las partículas podría deberse a la capa superficial de complejo Quitosano-Ácido Fólico que recubre las partículas PCL-I/ChFp, y que al estar en contacto con el medio acuoso posiblemente experimenta un hinchamiento que impide la difusión del agente ivermectina en esta primer etapa. En el caso de las partículas PCL-*Ip* la marcada liberación inicial se relaciona con el fenómeno conocido como "*burst effect*", que implica una liberación inicial rápida asociada en este caso a la liberación de ivermectina contenida en las capas superficiales de las partículas sin recubrimiento, cuando están en contacto con el medio líquido <sup>16</sup>.

La segunda etapa muestra que tanto en las partículas como en las PCL-I/ChFp la liberación tiene una relación lineal respecto del tiempo o dicho de otra forma, que la tasa de liberación del agente ivermectina es constante entre las 4 y las 12 hs. En el caso de las partículas PCL-I el porcentaje de ivermectina liberada alcanza un valor de 65,02 %, mientras que en las partículas de PCL-I/ChFp sólo se libera un 38,22 %. En las partículas PCL-I/ChFp este efecto puede deberse a que el hinchamiento de las cadenas poliméricas de Ch y la posible formación de microcanales en la capa de recubrimiento (*shell*), permite un mayor ingreso de medio acuoso y que el agente terapéutico difunda con mayor libertad. En el caso de las partículas PCL-*Ip*, esta etapa de liberación a tasa constante podría deberse a que el proceso de liberación de ivermectina se encuentra controlado por la difusión de la misma a través de las cadenas del polímero hacia el medio *buffer*.

En la tercera y última etapa se observa una liberación mediada por difusión, en la cual los perfiles experimentan un menor gradiente de liberación, posiblemente asociado a la disminución de la cantidad agente terapéutico en el *bulk* de las partículas, lo que disminuye la fuerza impulsora para la difusión. En el caso de las partículas PCL-I se alcanza el 100 % de agente liberado en un tiempo de 72 h (3 días), mientras que las partículas PCL-I/ChFp permiten modular los valores de ivermectina en el medio durante un período de 144 h (6 días).

### **5.3.2. Estudio de liberación de Ivermectina a partir de las partículas PCL-*Ip***

Las **Figuras 29 y 30** muestran los ajustes realizados a las curvas de liberación de las partículas PCL-*Ip* durante 120 h y 12 h respectivamente. Se estudiaron por separado las tres regiones de liberación descritas en la **sección 5.3.1**, aplicando los modelos de Orden Cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas (**sección 1.4.1**). En la **Tabla 7** se muestran los diferentes parámetros de los modelos aplicados

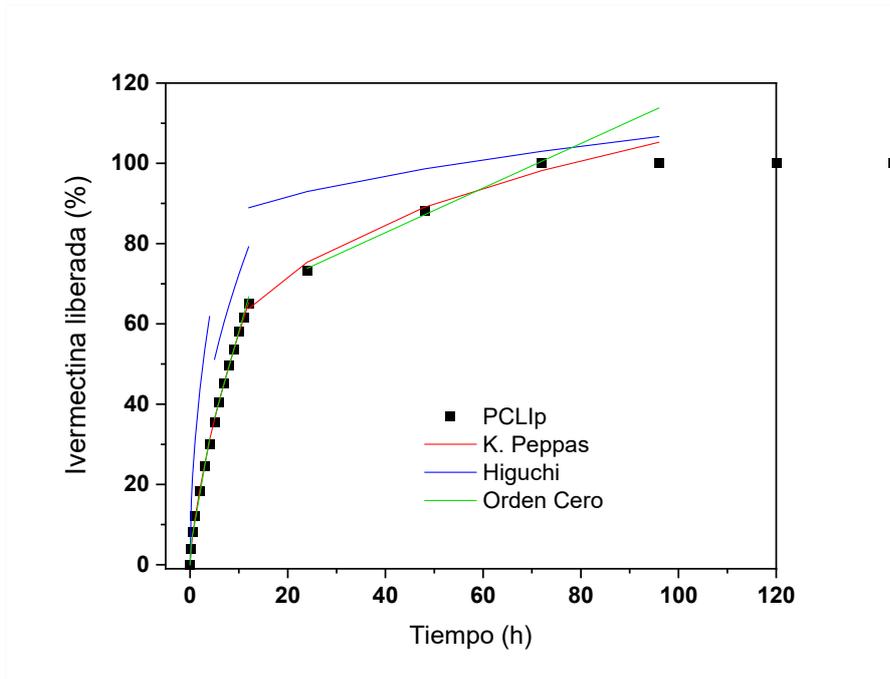
con su respectivos coeficientes de correlación ( $R^2$ ).

**Tabla 7.** Coeficientes y parámetros de modelos de difusión para partículas PCL-*Ip*

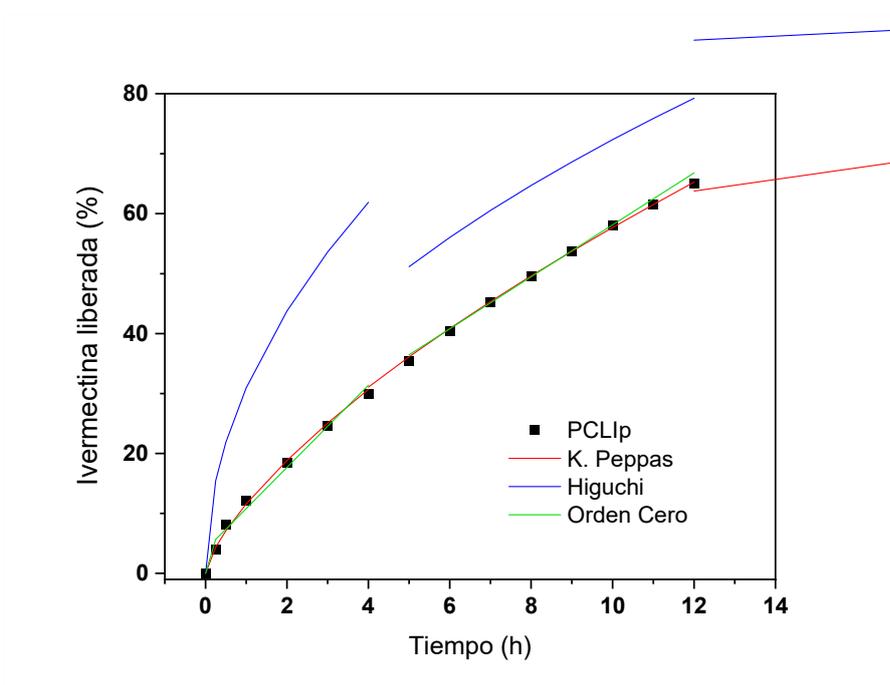
Tiempo (h)	Orden Cero		Higuchi		Korsmeyer y Peppas			Mecanismos de Liberación
	$K_C$	$R^2$	$K_H$ ( $n = \frac{1}{2}$ )	$R^2$	$K_{kp}$	$n$	$R^2$	
0 - 4	6,85	0,985	30,94	0,937	11,59	0,70	0,987	Difusión anómala
4 - 12	4,33	0,987	22,87	0,925	12,19	0,67	0,999	Difusión anómala
12 - 120	0,55	0,978	2,79	0,844	35,09	0,24	0,986	Difusión cuasi-Fickiana

Para este sistema se observa que en el primer periodo (de 0 a 4 h) y en el segundo periodo (de 4 a 12 h), los modelos de Orden Cero y Korsmeyer-Peppas ajustaron de forma eficiente respecto del modelo de Higuchi. Sin embargo y de acuerdo a los valores de  $R^2$ , es posible considerar que el modelo que permite el mejor ajuste es Korsmeyer-Peppas, y por comparación de los valores de  $n$  se puede concluir que el mecanismo de liberación predominante es el de **Difusión Anómala**. Es decir que coexisten los fenómenos de difusión del agente terapéutico en simultáneo con la relajación de las cadenas poliméricas, en la medida que el medio acuoso toma contacto con la matriz de PCL. En este fenómeno se excluye el hinchamiento del *bulk*, debido a que la absorción del medio por parte de la PCL en 12 h es inferior a 0,5 %.

En el tercer período (de 12 a 140 h) el ajuste de los modelos de Orden Cero y Korsmeyer-Peppas son nuevamente más eficientes que el modelo de Higuchi, siendo el modelo Korsmeyer-Peppas el que permite un valor de  $R^2 = 0,986$  y de acuerdo al valor del coeficiente  $n = 0,24$  el mecanismo predominante es la **Difusión Cuasi-Fickiana**. Esto puede explicarse dado que en las primeras dos etapas de liberación la migración del agente terapéutico contenido en las capas exteriores de las partículas al medio de liberación, podría generar microcanales que permitirían el mayor ingreso del medio acuoso al interior de la matriz polimérica.



**Figura 29.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip (entre 0 y 120 h)



**Figura 30.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip (entre 0 y 14 h)

### 5.3.3. Estudio de liberación de Ivermectina a partir de las partículas PCL-Ip/ChF

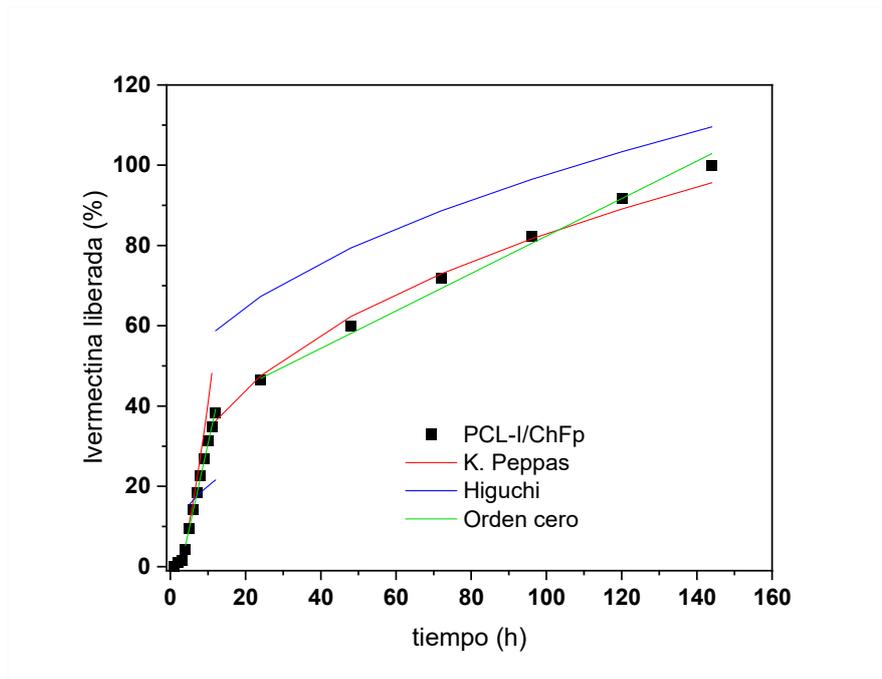
Las **Figuras 31 y 32** muestran los ajustes de los perfiles de liberación de ivermectina en los sistemas PCL-Ip/ChF. De la misma manera que se hizo en el sistema PCL-Ip, el estudio del perfil de liberación se dividió en tres secciones y se ajustó con los modelos de Orden Cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. En la **Tabla 8** se observan los diferentes parámetros de los modelos aplicados (**sección 1.4.1**) con sus respectivos coeficientes de correlación ( $R^2$ ).

**Tabla 8.** Coeficientes y parámetros de modelos de difusión para partículas PCL-Ip/ChF

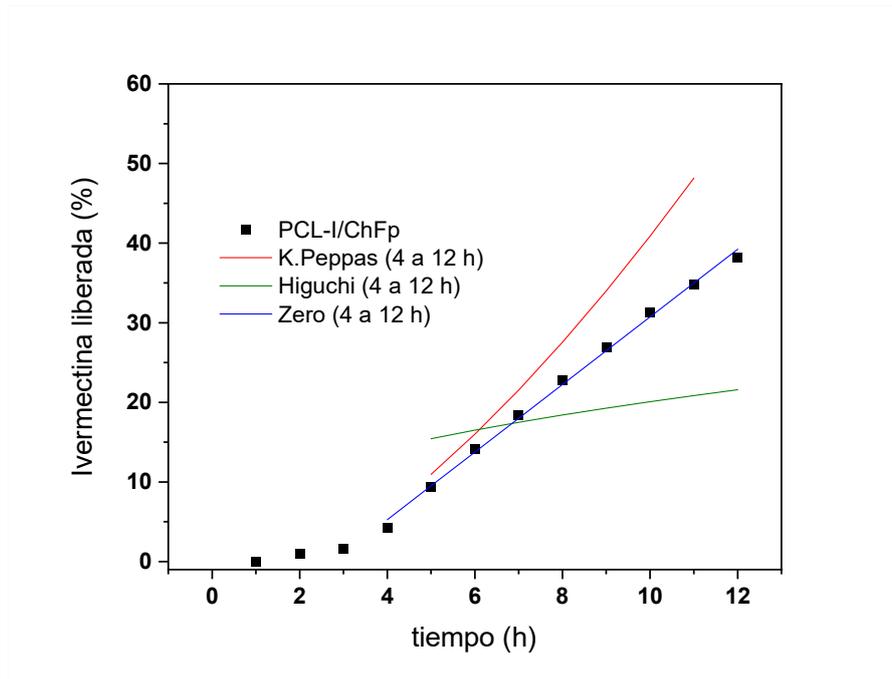
Tiempo (h)	Orden Cero		Higuchi		Korsmeyer y Peppas			Mecanismos de Liberación
	$K_C$	$R^2$	$K_H$ ( $n= \frac{1}{2}$ )	$R^2$	$K_{kp}$	$n$	$R^2$	
0 - 4	–	–	–	–	–	–	–	No hay liberación
4 - 12	4,25	0,997	5,01	–	1,21	1,57	0,987	Orden Cero
12 - 120	0,47	0,988	5,94	–	13,77	0,39	0,990	Difusión cuasi-Fickiana

En este sistema se observa en el primer periodo (de 0 a 4 h) que la liberación es prácticamente nula, por lo que no es posible ajustar con ningún modelo. En esta etapa podemos considerar que la liberación de ivermectina se dificulta por el proceso de hinchamiento de la cubierta superficial de Quitosano. En la segunda etapa (de 4 a 12 h) el ajuste de los modelos de Orden Cero y Korsmeyer-Peppas mostraron una mejor correspondencia con los valores experimentales, mientras que el ajuste mediante el modelo de Higuchi no mostró correspondencia para ser considerado en el análisis. De acuerdo a los valores de  $R^2$  tanto el modelo de Orden Cero como el de Korsmeyer-Peppas mostraron valores superiores a 0,9; mientras que el mejor ajuste se observó con el modelo de **Orden Cero** con un  $R^2 = 0,997$ . Esto indica que la velocidad de difusión del agente terapéutico ivermectina es constante e independiente de la concentración inicial, asumiendo que el área de interacción de la partícula con el medio permanece invariable y que existen *condiciones sink* durante todo el ensayo.

En este período (12 a 120 h) los modelos que mejor ajustaron nuevamente fueron Orden Cero y Korsmeyer-Peppas, con valores de  $R^2$  cercanos a 1. Sin embargo el modelo de **Korsmeyer-Peppas** permitió un valor de  $R^2 = 0,990$  con un valor de  $n = 0,39$ , lo que indicó una liberación mediada por **Difusión Cuasi-Fickiana**. Lo que permite explicar los valores de velocidades de liberación por difusión prácticamente constantes e independientes del gradiente de concentración de ivermectina en el medio, lo que permitió modular el perfil de liberación de ivermectina durante un período de 6 días.



**Figura 31.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip/ChF (entre 0 y 140 h)



**Figura 32.** Ajuste de la curva de liberación de Ivermectina en PCL-Ip/ChF (entre 0 y 12 h)

#### 5.4. Escalado del sistema de producción de partículas core-shell mediante electrospray

A partir del procedimiento detallado en la sección 4.7, se analizó el escalado del sistema de producción de partículas mediante *electrospray*. En la **Tabla 9 y 10** se observan los valores de los diferentes factores directos e indirectos respectivamente, con los que se realizó el cálculo de la estimación de la inversión, conjuntamente con el precio del equipo principal.

**Tabla 9.** Factores de inversión directa

<b>Valor de Equipo instalado (USD)</b>	82106,45
<b>Factores de estimación directa</b>	<b>Fd</b>
Tuberías de procesos	0,45
Instrumentación	0,075
Edificio de fabricación	0,8
Planta de servicios	0,025
Conexiones entre unidades	0
<b>Factores de inversión directa</b>	<b>2,35</b>
<b>Inversión directa (USD) *</b>	<b>192950,04</b>

\*El cálculo de inversión directa se realizó de acuerdo con la **Ec. 11**

**Tabla 10.** Factores de inversión indirecta

<b>Factores para la inversión indirecta</b>	<b>Fi</b>
Ingeniería y Construcción	0,275
Factores de tamaño	0,025
Contingencias	0,25
<b>Factores de la inversión indirecta</b>	<b>1,55</b>
<b>Inversión Fija (USD)</b>	<b>299072,5</b>

Una vez obtenida la estimación en inversión fija en base a los precios de los equipos instalados, se procedió al cálculo de los costos fijos para la producción. Para eso, se tomaron los siguientes costos en materias primas que se observan en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Costos de materias primas

<b>Materia Prima</b>	<b>Marca</b>	<b>Precio (USD)</b>
Policaprolactona (5 g)	Aldrich	132
Quitosano (50 g)	Aldrich	165
Ácido Acético (1 l)	Anedra	18
Diclorometano (1 l)	Biopack	14
Acido Folico (50 g)	Sigma-Aldrich	6
Ivermectina (10 g)	Parafarm (Drogueria Saporiti)	5

A partir de los costos de mercado de las diferentes materias primas se estimó el costo de producción de una solución de 10 ml para la obtención de las partículas (**Tabla 12**)

**Tabla 12.** Costos de producción para una solución de 10 ml

<b>Materia Prima</b>	<b>Precio (USD)</b>
Quitosano (0,2 g)	0,66
PCL (0,7 g)	5,28
Ácido Acético (7 ml)	0,13
Diclorometano (3 ml)	0,04
Ivermectina (0,05 g)	0,03
Acido Folico (0,03 g)	0,01
<b>Total</b>	<b>6,15</b>

Con las cotizaciones del mercado actual de las materias primas se estimaron los costos variables y fijos de producción de partículas, que se observan en la **Tabla 13**

**Tabla 13.** Costos fijos y variables de producción de partículas.

<b>Costos variables</b>	<b>USD/año</b>
Materia Prima	1500
Mano de Obra	13800
Servicios	11000
Mantenimiento	18000
Suministros	2250
<b>Costos Fijos</b>	<b>USD/año</b>
Depreciación de equipamiento	54000
Impuestos	4500
Seguros	2300
<b>Total</b>	<b>107350</b>

A partir del estudio económico para la obtención del volumen establecido de partículas, resultó un costo total anual en dólares de USD 107350. Este presupuesto fue estimado para un nivel de producción a escala de laboratorio y una jornada laboral de 8 hs al día, 40 hs semanales <sup>50</sup>.

En la actualidad existen cada vez más empresas dedicadas al diseño y producción de equipos de *electrospinning/electrospraying* y servicios vinculados. Esto corresponde al gran auge y versatilidad que presentan las técnicas de procesamiento, que permiten un interés creciente en diversos campos como la bioingeniería y biotecnología, medicina, farmacia, agricultura, remediación y saneamiento ambiental, industria textil, entre algunos de ellos. En la **Tabla 14** se pueden ver algunas de las empresas más importantes que desarrollan equipos comerciales y/o servicios afines.

**Tabla 14.** Empresas que comercializan equipos de electrospinning/*electrospraying* en el mundo

Empresa	País	Producto/Servicio
MECC Co. Ltd	Japón 	Proveedor de equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para nivel laboratorio y semi industrial
Fnm Co. (Fanavaran Nano-Meghyas)	Irán 	Proveedor de equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para nivel laboratorio y semi industrial
Inovenso	Turquía 	Proveedor de equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para nivel laboratorio e industrial
Yflow	España 	Proveedor de equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para nivel laboratorio e industrial
IME Technologies	Países Bajos 	Manufactura de equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para investigación e industria
Leonardino S.r.l	Italia 	Equipos de <i>electrospinning/electrospraying</i> para escala laboratorio pequeña e industrial

## 5.5 Sistemas de Liberación de ivermectina en el mercado nacional

En la **Tabla 15.** se mencionan los productos comercializados en la actualidad según la confederación farmacéutica argentina (CoFA), con aprobación de A.N.M.A.T. De acuerdo la información de la Tabla 10 es posible observar que si bien existen en el mercado nacional diferentes productos para la administración de ivermectina, tanto en comprimidos, cremas y lociones, que permiten diferentes posologías del agente, aún no existen sistemas de administración controlada que permitan dosificaciones prolongadas y/o controladas. Sistemas de administración controlada de ivermectina, como los propuestos en este trabajo, permitirían disminuir la dosificación, minimizar la toxicidad de ivermectina a nivel sistémico, y mejorar la biodisponibilidad del agente en el sitio de acción deseado.

**Tabla 15.** Productos comerciales en Argentina

<b>Nombre</b>	<b>Presentación</b>	<b>Laboratorio</b>
<i>Dermoper IV</i>	Comprimidos	Raymos
<i>Detebencil</i>	Comprimidos ranurados	Roux Ocefa
<i>Evanix</i>	Loción al 0,5 %	Elea
<i>Iver P</i>	Comprimidos, cremas	Elea
<i>Ivertal</i>	Comprimidos, cremas	Panalab
<i>Licend</i>	Loción al 0,5%	Cassara
<i>Securo</i>	Comprimidos	Raymos

## 6. Conclusiones

A partir de este trabajo y en concordancia con los objetivos planteados, se obtuvieron partículas monocapa de PCL (PCLp) y partículas biofuncionales de tipo *core-shell* (PCL/ChFp), con un núcleo (*core*) de PCL y una cubierta biofuncional (*shell*) compuesta por el biopolímero Quitosano funcionalizado con Ácido Fólico, mediante la técnica de *electrospray* (*electrospraying*) monoaxial y coaxial respectivamente. Fue posible además incorporar el agente antiparasitario ivermectina tanto en las nanopartículas monocapa PCL-Ip, como en las partículas *core-shell*, PCL-I/ChFp.

Las partículas PCLp 7:3 mostraron el menor tamaño y la menor desviación estándar, con un índice de polidispersidad que las define como monodispersas, por lo que fueron seleccionadas para continuar con el avance del trabajo. Las partículas PCL-I/ChFp y PCL-Ip presentaron valores de diámetros medios del orden de 350 nm con valores de índice de polidispersidad inferiores a 0,22, lo que indica que la distribución de tamaños en ambos casos es monodispersa y adecuada para la aplicación buscada. La incorporación del agente ivermectina disminuyó levemente el tamaño y modificó la morfología de las partículas, lo que puede deberse al aumento de la conductividad de la solución polimérica, y a la posible presencia de ivermectina en la superficie de las partículas.

Respecto de la capacidad de las nanopartículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp para encapsular ivermectina, los valores de **eficiencia de encapsulación** obtenidos fueron **superiores al 90 %**, lo que indica una

buena capacidad de la PCL para encapsular al agente ivermectina. Los valores de **capacidad de carga** indicaron que la cantidad del agente antiparasitario contenido en las nanopartículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp fue **superior al 6,13 %** en ambos casos, lo que indicó que el procesamiento coaxial de las partículas biofuncionales de estructura *core-shell* no modificó la cantidad de ivermectina encapsulada. Finalmente, los **valores de cantidad de agente antiparasitario por cada gramo de muestra ( $M_i$ )** resultaron **superiores a 60 mg.g<sup>-1</sup>**, lo que permitió concluir que se alcanzaron valores de encapsulación del agente ivermectina acorde a los valores de MIC esperados.

El análisis térmico permitió evidenciar la **disminución de la cristalinidad del polímero PCL** en las nanopartículas luego del procesamiento mediante *electrospray*, y una disminución aún mayor de la cristalinidad luego de la incorporación del agente antiparasitario a la solución polimérica, lo que puede asociarse a que tanto el procesamiento de las nanopartículas como el aumento de la conductividad de la solución inicial, dificultan el ordenamiento de las cadenas del polímero durante el procesamiento. En los termogramas de las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp no se observaron picos de ivermectina, por lo que se puede concluir que el agente se encuentra homogéneamente distribuido en la matriz polimérica, o que la técnica de DSC no es lo suficientemente sensible para detectar la cantidad de ivermectina presente.

El estudio de la composición superficial de las nanopartículas permitió evidenciar picos característicos de PCL en la superficie de las partículas PCLp y PCL-Ip, lo que indicó que la estructura del polímero no experimentó cambios debido al procesamiento mediante *electrospray*. No se observaron picos propios de ivermectina en las partículas PCL-Ip, lo que indicaría que el agente ivermectina no se encuentra presente masivamente en la superficie de las partículas o que la cantidad presente no es significativa como para ser detectada mediante la técnica de FTIR. Las nanopartículas PCL/ChF y PCL-I/ChF mostraron picos característicos de quitosano, lo que indica la **presencia del biopolímero recubriendo la superficie**.

Los ensayos de liberación de ivermectina en medio buffer fosfato (pH= 7,4) a partir de las partículas PCL-Ip y PCL-I/ChFp evidenciaron la liberación del agente en **tres etapas bien definidas**. Una **primera etapa de 0 a 4 h**, en la que se observó una marcada diferencia en la liberación a partir de las partículas **PCL-Ip (31,03 %)** y **PCL-I/ChFp**, en las que la liberación fue **prácticamente nula** (4,23 %). Una **segunda etapa de 4 a 12 hs** en la que se observó que en ambos tipos de nanopartículas la liberación tiene una relación lineal respecto del tiempo o dicho de otra forma, que **la tasa de**

**liberación del agente ivermectina es constante**, alcanzando valores de liberación de 65,02 % en las PCL-Ip y 38,22 % en las PCL-I/ChFp. Finalmente la última **etapa de 12 a 120 h** se observó una liberación mediada por difusión, en la cual los perfiles experimentan un menor gradiente de liberación, posiblemente asociado a la disminución de la cantidad del agente terapéutico en el *bulk* de las partículas. En el caso de las partículas **PCL-Ip** se alcanzó el 100 % de liberación de ivermectina en un tiempo de **72 h (3 días)**, mientras que las partículas **PCL-I/ChFp** permitieron modular los valores de ivermectina en el medio durante un período de **144 h (6 días)**.

El estudio de la **Cinética de Liberación** en las nanopartículas **PCL-Ip** indicó que tanto en el primer período (0 - 4 h) como en el segundo período (4 a 12 h), el mejor ajuste se alcanzó mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas, y de acuerdo a los valores de **n** se puede concluir que el mecanismo de liberación predominante es el de **Difusión Anómala**. En el tercer período (12 a 140 h) el modelo que mejor permitió el mejor ajuste fue también Korsmeyer-Peppas y de acuerdo al valor del coeficiente **n (0,24)** el mecanismo predominante es la **Difusión Cuasi-Fickiana**.

Por otro lado, el estudio de la Cinética de Liberación en las nanopartículas **PCL-I/ChFp** mostró un **primer período (0 - 4 h)** de liberación prácticamente **nula**. Una **segunda etapa (4 a 12 h)** en la que el mejor ajuste se observó con el modelo de **Orden Cero** ( $R^2 = 0,997$ ), y finalmente una tercera etapa (12 a 120 h) en la que el modelo de **Korsmeyer-Peppas** ( $R^2 = 0,990$ ) con un valor de **n = 0,39**, indicó una liberación mediada por **Difusión Cuasi-Fickiana**.

El proceso de preparación de partículas **PCL-Ip** y **PCL-I/ChFp** presentó una limitación en el tiempo de producción, debido a que el solvente remanente en la superficie de las partículas que alcanzan el colector requiere de una recolección de partículas o cambio del medio de recolección (papel aluminio sobre el colector) cada un tiempo de aproximadamente 40 min, con el objetivo de evitar que las partículas se aglomeren o fusionen entre sí. Por otro lado, el **control de temperatura y humedad relativa** durante el procesamiento se vuelven cruciales, dado que condicionan la eficiencia del proceso, pudiendo incluso alterar la morfología final de las nanopartículas obtenidas.

La rentabilidad de este proyecto se encuentra condicionada a corregir la capacidad de producción de las partículas pasando de un sistema *batch* a un sistema continuo y también en un control más exacto de la humedad del ambiente de trabajo en condiciones operacionales.

## 7. Dificultades

Como todo nuevo trabajo, en este caso la elaboración de un proyecto final de grado, los desafíos a afrontar son grandes, los alumnos nos encontramos en un momento de desarrollar un trabajo que sea integrador pero a la vez técnico y profesional. Las principales problemáticas que podemos destacar es el desarrollo de todo el trabajo con un orden que nos permita mantener un horizonte claro en cada etapa en la que nos encontramos, de esta forma aprendemos a economizar tiempo y recursos.

El trabajo con equipamiento de gran complejidad, y comprendiendo los parámetros críticos propios de la actividad emprendida son la primera gran barrera que se debe superar. Además, la asimilación de conceptos teóricos nuevos, dificultan un abordaje práctico de esta jerarquía.

Este proyecto final también estuvo marcado por la pandemia del SARS-COV-2 durante los años 2020 y 2021, las medidas de salud pública aplicadas en todo el país para la prevención y control del contagio de la enfermedad COVID-19 también jugaron un rol preponderante en el desarrollo experimental establecido por los directores. Esta quizás fue la mayor complicación operativa en términos de tiempo y esfuerzos.

Finalmente, el último gran desafío fue plasmar por escrito un desarrollo experimental científico-tecnológico, lo cual conlleva un trabajo exhaustivo de interpretación de fenómenos reales complejos y expresarlos de una forma clara y concisa.

Las dificultades varían con cada persona y cada proyecto, las variables son múltiples y aprender a sobrellevarlas es parte del aprendizaje de cada alumno.

## 8. Trabajos de investigación futuros

El presente trabajo abre nuevas posibilidades y desafíos en cuanto al desarrollo y optimización del proceso productivo de nano y micropartículas biofuncionales a partir de polímeros biodegradables y biorreabsorbibles, de origen sintético y natural, para la encapsulación y vectorización de agentes antiparasitarios, permitiendo modular la liberación de estos agentes a la medida de diferentes terapias y pacientes. Estos sistemas permiten el tratamiento de diferentes enfermedades de una forma menos invasiva para el organismo, disminuyendo de esta forma la cantidad de fármacos a nivel sistémico, así como la necesidad de múltiples dosis del agente terapéutico, para lo cual la optimización de los sistemas particulados multicapas abre una gran oportunidad para el desarrollo de trabajos de mayor complejidad.

El control de la humedad y temperatura se identificaron como parámetros de extrema importancia durante la puesta a punto y preparación de las partículas de este trabajo, por lo que resultó de gran importancia la adecuación del laboratorio de técnicas Electrohidrodinámicas de la Div. Polímeros Biomédicos. La eliminación del solvente residual en ambiente de humedad controlada permitirá disminuir los tiempos post procesamiento, así como la recolección de las partículas desde el colector. Como una propuesta de trabajo futuro en relación a estos aspectos, se propone un trabajo de simulación numérica que permita optimizar condiciones de procesamiento, eliminación de solvente residual, y mecanismo de recolección de las partículas. Mediante el uso de modelos matemáticos sería posible ajustar las variables del proceso con el objetivo de reducir el porcentaje remanente de solvente en las partículas, y mejorar su recolección para lograr mayor eficiencia en el proceso de preparación de las nanopartículas.

También se plantea como trabajo futuro, continuar avanzando en el estudio de la interacción superficial *core-shell* del sistema de liberación, la composición del mismo y biofuncionalización, para lograr mayor conocimiento y control de los mecanismos que determinan y condicionan la difusión del agente terapéutico desde el núcleo o *core*. Entre los aspectos a explorar se encuentran el estudio de las interacciones que se generan entre las superficies de ambos polímeros en contacto (PCL-Quitosano), el espesor de la cubierta de quitosano y su funcionalización con Ácido Fólico, ya que podría lograrse un mayor control en el tiempo de retardo en la liberación del agente terapéutico, estableciendo dosificaciones a la medida de cada paciente o patología.

Respecto del escalado, mejorar la técnica de recolección y futura preparación a partir de sistemas

de agujas multijets, permitiría mejorar el volumen de producción. Pasar de un sistema monoaguja a un multijet requiere el estudio de un sistema complejo de distintos microchorros actuando de manera conjunta. Mientras que un sistema de recolección de tipo continuo o lo más próximo a él, permitiría superar el proceso tipo *batch*, optimizando los tiempos y recursos, disminuyendo los costos operacionales y aumentando las ganancias por hora de producción.

A partir de los prometedores resultados obtenidos a partir de los ensayos de liberación *in vitro*, planteamos la realización de ensayos en medios biológicos controlados en especímenes vivos. En colaboración con investigadores del Instituto de Biotecnología de la Fac. de Ingeniería de la UNSJ, se determinará la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las nanopartículas con ivermectina, mediante microdilución en caldo según (CLSI, 2015). Se emplearán cepas bacterianas y fúngicas tipificadas ATCC y de aislados clínicos provenientes del Hospital Marcial Quiroga de la Prov. de San Juan. Se estudiará el efecto de la combinación de nanopartículas con ivermectina y agentes comerciales (antibióticos y antifúngicos) frente a bacterias ATCC seleccionadas y a hongos levaduriformes del género *Candida albicans* (ATCC) a través del método del tablero de ajedrez.

Respecto a la caracterización de los sistemas nanoparticulados, se espera continuar con el estudio y análisis de la distribución del agente terapéutico en el interior y superficie de las partículas de PCL. Se espera poder continuar con el estudio de la cubierta superficial y funcionalización mediante mediciones de potencial Z o potencial de superficie, como una medida de la estabilidad de las partículas.

## 9. Referencias

1. Mehta, P. *et al.* Pharmaceutical and biomaterial engineering via electrohydrodynamic atomization technologies. *Drug Discovery Today* vol. 22 157–165 (2017).
2. Braz, A. L. *et al.* Manufacturing processes for polymeric micro and nanoparticles and their biomedical applications. *AIMS Bioengineering* vol. 4 46–72 (2017).
3. Kamaly, N., *et al.* Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* **116**, 2602–2663 (2016).
4. Vauthier, C. & Ponchel, G. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development*. Springer (2017).
5. Suri, K. *et al.* Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Platforms and Novel Drug Delivery Systems. *Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies* 41–58 (2015).
6. Islan, G. A., Tornello, P. C., Abraham, G. A., Duran, N. & Castro, G. R. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* vol. 143, 168–176 (2016).
7. Sosnik, A. Production of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles by Electro spraying Technology. *Journal of Biomedical Nanotechnology* vol. 10, 2200–2217 (2014).
8. Paul, S. M. *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 9, 203–214 (2010).
9. Basavaraj, S. & Betageri, G. V. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 4, 3–17 (2014).
10. Bock, N., Dargaville, T. R. & Woodruff, M. A. Electro spraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progress in Polymer Science* vol. 37, 1510–1551 (2012).
11. Albertsson, A.-C. & Varma, I. K. Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications. *Advances in Polymer Science* 1–40 (2002).
12. Chandra, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* vol. 23, 1273–1335 (1998).
13. Tornello, P. R. C. *et al.* Dispersion and release of embelin from electro spun, biodegradable, polymeric membranes. *Polymer Journal* vol. 44, 1105–1111 (2012).
14. Abyadeh, M., Karimi Zarchi, A. A., Faramarzi, M. A. & Amani, A. Evaluation of Factors Affecting Size and Size Distribution of Chitosan-Electrosprayed Nanoparticles. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 9, 126–132 (2017).
15. Yang, S.-J. *et al.* Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells. *Bioconjug. Chem.* 21, 679–689 (2010).
16. Tornello, P.R.C. *et al.* Effect of processing techniques on new poly( $\epsilon$ -caprolactone)-embelin microparticles of biomedical interest. *Advances in Polymer Technology* vol. 37, 1570–1580 (2018).
17. Arya, N., Chakraborty, S., Dube, N. & Katti, D. S. Electro spraying: A facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* vol. 88B, 17–31 (2009).
18. New biodegradable contraceptive capsule Ory S, Hammond C, Yancy S, *et al.*: The effect of a biodegradable contraceptive capsule (Capronor) containing levonorgestrel on gonadotropin, estrogen, and progesterone levels. *Am J Obstet Gynecol* 145:600, 1983. *Journal of Nurse-Midwifery* vol. 28, 42–43 (1983).
19. Metz, J. Folic acid metabolism and malaria. *Food Nutr. Bull.* 28, S540–9 (2007).
20. Vickers, T. J. & Beverley, S. M. Folate metabolic pathways in Leishmania. *Essays Biochem.* 51, 63–80 (2011).
21. Lindoso, J. A. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3136 (2014).
22. Giavedoni, P. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a patient with Sézary syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* vol. 71 e213–e214 (2014).
23. World Health Organization. *Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases*. (World Health Organization, 2013).

24. *Leishmaniasis en las Américas*. Recomendaciones para el tratamiento. Recomendaciones para el tratamiento. (2013).
25. Burnham, G. & Mebrahtu, T. Review: The delivery of ivermectin (MectizanR). *Tropical Medicine and International Health* vol. 9, A26–A44 (2004).
26. Hanafi, H. A. *et al.* Effects of ivermectin on blood-feeding *Phlebotomus papatasi*, and the promastigote stage of *Leishmania major*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 43–52 (2011).
27. Khaled al Rasheid, A. T. M. Efficacy of ivermectin on the infectivity of *leishmania major* promastigotes. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 18, 207–2012 (1998).
28. dos Santos, A. R. *et al.* Ivermectin-derived leishmanicidal compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 496–502 (2009).
29. Luque Espino, J.C., Pareja Cruz, A. Safety and efficacy of ivermectin in times of COVID-19. *Horiz. Med.* 21(1), e1331 (2021).
30. San Román, J. *Biomateriales: retos y alternativas*. Nuevos Materiales en la sociedad del Siglo XXI. Ed. Carmen Mijangos y José S. Moya. ISBN: 978-84-00-08453-0. CSIC, 63-72 (2007).
31. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30, 5897–5909 (2009).
32. Taylor, G. I. . Disintegration of water drops in electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 280, 383-397 (1964).
33. Chasin M., Langer R. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, New York - Basel - Hong Kong: Marcel Dekker, Inc. (1990).
34. Satturwar, P.M., Filzele, S.V. Biodegradation and In vivo Biocompatibility of Rosin: a natural film forming polymer. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 55(4), 1 - 6 (2003).
35. Vert, M., Li, S.M., Spenlehauer, G., Guerin, P., Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mat. Sci.: Mater. Med.*, 6(3), 432 - 446 (1992).
36. Sahana, T.G., Rekha, P.D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2857-2867 (2018).
37. Rodriguez-Gomez, D., López-Ramirez, V., Alpizar-Negrete, A.G., Calixto-Olalde, M.E. Chapter 9 Biopolymers: from beginning to end. *Handbooks-@ECORFAN- Mexico*, Querétaro, 107-129 (2020).
38. a) Feyman, R.P. There is plenty of room at the bottom. *Engineering and Science Magazine*. (1959). b) Powers, K.W., Brown, S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M., Roberts, S.M. . “Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation”. En *Toxicol Sci.* 90(2), 296-303 (2005).
39. Pombo Barros, V., Goyanes Villaescusa, V. Quantum Dots:: The New Contribution of Nanotechnology to Research and Medicine. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(1), 69-102 (2011).
40. Elrashidi, A., Traversa, E., Elzein, B. Highly sensitive ultra-thin optical CO<sub>2</sub> gas sensors using nanowall honeycomb structure and plasmonic nanoparticles. *Front. Energy Res.* 10, 1-11 (2022).
41. Shi, Y., Askounis, E., Plamthottam, R., Libby, T., Peng, Z., Youssef, K., PU, J., Pelrine, R., Pei, Q., A processable, high-performance dielectric elastomer and multilayering process. 377 (6602), 228-232 (2022).
42. Martinez, M.T., Tseng, Y-Ch., Ormategui, N., Loinaz, I., Eritja, R., Bokor, J. Label-Free DNA Biosensors Based on Functionalized Carbon Nanotube Field Effect Transistors. *Nano Letters* 9(2), 530-536 (2009).
43. Tahara, K., Yamamoto, K., Nishihata, T. “Application of model-independent and model analysis for the investigation of effect of drug solubility on its tablets”. *International Journal of Pharmaceutics*, 133, 17-27 (1996).
44. Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A. “Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs”. *J. Membr. Sci.* 9, 211-227 (1981).
45. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. *Principles of Instrumental Analysis*, Seventh Edition. Cengage Learning (2016).
46. Higuera, F. J. Flow rate and electric current emitted by a Taylor cone. *J. Fluid Mech.*, 484, 303-327 (2003).
47. Gamero-Castaño, M. Energy dissipation in electrosprays and the geometric scaling of the transition region of cone-jets. *J. Fluid Mech.*, 662, 493–513 (2010).
48. Fernández de la Mora, J. F., Loscertales, I. G. The current emitted by highly conducting Taylor cones. *Journal of Fluid Mechanics* 260, 155-184 (1994).
49. Zugarramurdi, A., Parin, M.A. *Costos de Producción* (2003).

50. Rudd, D., Watson, Ch. Estrategias en ingeniería de procesos. Ed. Alhambra. 139-148 (1976).
51. CD55.R9. Plan de Acción para la eliminación de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas y las Medidas Posteriores a la Eliminación 2016-2022. 55 ° Consejo directivo, 68ª Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas. Washington, D.C., EUA, del 26 al 30 de septiembre (2016).
52. Ginel Pérez, P.J., Lucena Solis, MdR., Gutiérrez, P. L. Tratamiento de la demodicosis canina generalizada con dosis reducidas de ivermectina oral. *AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales*. ISSN: 1130-7064. 18 (1), 26-33 (1998).
53. Kiparissides, C., Kammona, O. "Nanoscales carriers for targeted delivery of drugs and therapeutic biomolecules". *Can J Chem Eng*, 91(4), 638-651 (2013).
54. Dorati, R., Genta, I., Colzani, B., Tripodo, G., Conti, B., "Preliminary investigation on the design of biodegradable microparticles for ivermectin delivery: set up of formulation parameters". *Drug Dev Ind Pharm*. 41(7), 1182-92 (2015).
55. Van Krevelen, D.W., "Properties of polymers", Amsterdam: Elsevier, 121 (1990).
56. Dean, J. A. *The Analytical Chemistry Handbook*. New York. McGraw Hill, Inc. pp. 15.1–15.5 (1995).
57. Pungor, E. *A Practical Guide to Instrumental Analysis*. Boca Raton, Florida. pp. 181–191 (1995).
58. De Andrés-Santos A.I., Velasco-Martín A., Hernández-Velasco E., Martín-Gil J. y Martín-Gil F.J. "Thermal behaviour of aqueous solutions of sodium hyaluronate from different commercial sources". *Thermochim. Acta*, 242, 153-160 (1994).
59. Ramos-Sánchez M.C., Barrio-Arredondo M.T., De Andrés-Santos M.I., Martín-Gil J. y Martín-Gil F.J. "Thermal analysis of aqueous solutions of heparins". *Thermochim. Acta*, 262, 109-115 (1995).
60. Martín-Gil J., Martín-Gil F.J., De Andrés-Santos A.I., Barrio-Arredondo M.T., Ramos-Sánchez M.C. y Chebib-Abuchala N. "Thermal behaviour of medical grade silicone oils". *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 262, 109-115 (1995).
61. Skoog, Douglas A., F. James Holler and Timothy Nieman. *Principles of Instrumental Analysis*. Fifth Edition. New York. pp. 905–908 (1998).
62. Sánchez-Valiente M., Martín-Gil F.J., Martín-Gil J., Siguenza A.F. y Miguel J.L. "DSC study of a metabolic pathway (biosynthesis of pineal indoles)". *Thermochim. Acta*, 195, 251-259 (1992).
63. Ramos-Sánchez M.C., Rodríguez-Torres A., Leal-Ojeda A., Martín-Gil F.J. y Martín-Gil J. "Thermolytical techniques to characterize fungal polysaccharides and bacterial lipopolysaccharides". *Biotechnol. Prog.*, 7, 526-533 (1991).
64. Hirschmugl, C. "Frontiers in infrared spectroscopy at surfaces and interfaces". *surf. Sci*, 500,507 - 604 (2002).
65. Abraham, G.A., Cuadrado, T.R., "Métodos de caracterización de biomateriales", de Biomateriales, S. A. J. S. R. R. Sastre, Ed., Faenza, Italia, Faenza Editrice S.L., 173 - 196 (2004).
66. Serway, R., Vuille, C. "Fundamentos de física". Novena Edición. Ed. Cengage Learning. (2012).
67. Elhefian E. A. "Preparation and Properties of Non-Crosslinked and Ionically Crosslinked Chitosan/Agar Blended Hydrogel Films". *E-Journal of Chemistry*, 8(S1), S409-S419 (2011).
68. He, M., Ro, L., Liu, J., Chu, C. "Folate Decorated Arginine Based Poly (ester urea urethane) Nanoparticles As Carriers for Gambogic Acid And Effect On Cancer Cells". *J Biomed Mater Res Part A*, 105A: 475–490 (2017).
69. Gañan-Calvo, A.M., Rebollo-Muñoz, N. y Montanero, J.M. "The minimum or natural rate of flow and droplet size ejected by Taylor coneject: Physical symmetries and scaling laws", *New J. Phys.*, 15 (2013)