



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DISPERSIÓN SÓLIDA AMORFA DE
DOXICICLINA EN MICROESFERAS DE GELATINA PARA MEJORAR LA
SOLUBILIDAD DEL FÁRMACO A NIVEL PULMONAR**



Unidad de Investigación II
para optar al título de Química Farmacéutica

Camila Galdavini

Director: Daniel Moraga Espinoza

Julio, 2024

Dedicatoria

Le dedico esta unidad de investigación II a todos los estudiantes foráneos que dejan a sus familias, amigos y comodidades para perseguir un sueño, un objetivo, y un mejor futuro. No es fácil salir del hogar y llegar a otra ciudad esperando encontrar compañía en el camino, no es sencillo concentrarse en los deberes académicos y al mismo tiempo tener una lista del supermercado en la mochila, una despensa vacía y pocas horas en el día para abarcar todas las responsabilidades.

Sé muy bien cómo te sientes y si yo lo logré, tú también.

Solo recuerda, hazlo todo con amor y los sueños que tengas se van a cumplir. Confía en ti y no dejes que tus miedos te aparten de tus objetivos.

Camila Alejandra Galdavini.

Agradecimientos

En primer lugar, deseo agradecerle a mi madre Giovanna Galdavini por su apoyo incondicional. Gracias por darme fuerza en los momentos difíciles, por celebrar conmigo los triunfos, y por no dejar que mis problemas de salud limitasen mi camino.

También le quiero dar las gracias a mis amistades, tanto en Valparaíso como en Iquique, por entregarme momentos inolvidables a lo largo de la carrera. Por las risas, el apoyo mutuo y los momentos de desahogo durante el desarrollo de esta tesis.

Le agradezco a Claudia Soza y Sofía Rojas, tesistas de LATEFAR que vivieron conmigo cada momento de incertidumbre en el laboratorio, que rieron y compartieron su conocimiento conmigo. Entre las tres logramos resolver muchas dudas, entregándonos apoyo mutuo, consejos y aprendizaje.

Le agradezco igualmente a Camilo Parra. Amigo, tú fuiste un pilar fundamental en el desarrollo de esta investigación. Viste mis crisis, socorriste mis cuadros de ansiedad y nunca soltaste mi mano. Le diste alegría a ese laboratorio y llenaste de luz mis días oscuros.

A mi director, Daniel Moraga, le quiero agradecer toda su paciencia, dedicación, enseñanzas y confianza. Vencí mis miedos con su apoyo y sus palabras de ánimo fueron un impulso para seguir persiguiendo mi objetivo. Gracias.

Finalmente, y no menos importante, me quiero dar las gracias a mí por no dejar que mi salud mental limitara mi aprendizaje. Enfrenté cada obstáculo y no me dejé vencer, aunque estuve a punto de renunciar no lo hice, me aferré a mis sueños y con el apoyo de la gente antes mencionada llegué a esta instancia. Éste no es el fin, esto recién está comenzando.

Resumen

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica es una patología que compromete la funcionalidad de los pulmones y la salud del paciente. Una de las características más relevantes de esta enfermedad es el desarrollo de exacerbaciones que ocasionan inflamación del tejido y que pueden ser de origen infeccioso. La doxiciclina es un antibiótico que ha demostrado tener potencial como agente antiinflamatorio; por ende, es una opción viable para abordar las exacerbaciones de origen infeccioso. Sin embargo, su eficacia se ve limitada por su absorción sistémica y distribución en el cuerpo. Para mejorar el tratamiento, se planteó el desarrollo de una dispersión sólida amorfa de doxiciclina usando gelatina como matriz dispersable para administrar el activo a través de un inhalador, esto permitiría una concentración pulmonar más alta y menos efectos adversos sistémicos. La gelatina, un polímero biodegradable, tiene la ventaja de que está aprobada para ser utilizada en productos de inhalación. Las microesferas inhalables fueron elaboradas mediante secado por atomización y se caracterizó su desempeño aerodinámico, disolución *in vitro*, estabilidad química, eficiencia de encapsulación y la eficacia antimicrobiana de las formulaciones. Las microesferas de doxiciclina-gelatina fueron aerodinámicamente dispersables y mostraron velocidad de disolución y solubilidad. En base a estas propiedades, las microesferas tienen el potencial de entregar y retener el antibiótico en las zonas más profundas del pulmón y de aumentar la eficacia del tratamiento al mejorar la tasa de disolución de doxiciclina. El uso de gelatina y la formación de microesferas corresponden a una plataforma prometedora para mejorar la liberación pulmonar de principios activos, administrados por la vía inhalatoria para el tratamiento de afecciones pulmonares crónicas.

DESIGN AND CHARACTERIZATION OF AMORPHOUS SOLID DISPERSION OF DOXYCYCLINE IN GELATIN MICROSPHERES TO IMPROVE DRUG SOLUBILITY AT PULMONARY LEVEL

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease is a pathology that compromises the functionality of the lungs and the patient's health. One of the most relevant characteristics of this disease is the development of exacerbations that cause tissue inflammation and may be of infectious origin. Doxycycline is an antibiotic that has shown potential as an anti-inflammatory agent; therefore, it is a viable option to address exacerbations of infectious origin. However, its efficacy is limited by its systemic absorption and distribution in the body. To improve treatment, the development of an amorphous solid dispersion of doxycycline using gelatin as a dispersible matrix to deliver the active via an inhaler was proposed, which would allow a higher pulmonary concentration and fewer systemic adverse effects. Gelatin, a biodegradable polymer, has the advantage of being approved for use in inhalation products. Inhalable microspheres were prepared by spray drying and their aerodynamic performance, in vitro dissolution, chemical stability, encapsulation efficiency and the antimicrobial efficacy of the formulations were characterized. The doxycycline-gelatin microspheres were aerodynamically dispersible and showed enhanced dissolution rate and solubility. Based on these properties, microspheres have the potential to deliver and retain the antibiotic deeper into the lung and to increase treatment efficacy by improving the dissolution rate of doxycycline. The use of gelatin and the formation of microspheres correspond to a promising platform to improve the pulmonary release of active ingredients, administered by the inhalation route for the treatment of chronic pulmonary conditions.

Glosario

- 1. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica:** Patología pulmonar progresiva caracterizada por la obstrucción crónica del flujo de aire, generalmente causada por la exposición prolongada a gases irritantes o partículas. Los síntomas incluyen disnea, tos, esputo y sibilancias.
- 2. Dispersión Sólida Amorfa:** Técnica de formulación farmacéutica donde un fármaco de baja solubilidad se dispersa en forma amorfa dentro de una matriz polimérica que retarda su reordenamiento y cristalización, mejorando así la solubilidad y biodisponibilidad del activo.
- 3. Secado por atomización:** Método para producir un polvo seco a partir de una solución o suspensión al secarlo rápidamente con un gas caliente, utilizado frecuentemente para crear partículas finas y uniformes.
- 4. Exacerbación de EPOC:** Empeoramiento agudo de los síntomas respiratorios, como el aumento de la disnea, tos y la producción de esputo, que requiere una terapia urgente e incluso hospitalización del paciente.
- 5. Aerosolización:** Proceso que convierte una sustancia sólida en partículas finas con un diámetro inferior a 5 micras, se utiliza a menudo para administrar fármacos por inhalación hacia las zonas más profundas del pulmón.
- 6. Microesferas:** Pequeñas partículas esféricas hechas de polímeros con un fármaco disperso en su interior. Se utilizan en sistemas de liberación para controlar la tasa de disolución de un fármaco.
- 7. Impactación en cascada:** Técnica que permite conocer la distribución del tamaño de partículas de un aerosol. Las partículas se separan según su diámetro aerodinámico al pasar por una serie de etapas con puntos de corte de tamaño decreciente.

Abreviaciones

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

DOX: Doxiciclina

pKa: Constante de disociación ácida

ASD: Dispersión sólida amorfa

GA: Gelatina

SD: Secado por atomización (*Spray Drying*)

DPI: Inhalador de polvo seco

MMAD: Diámetro aerodinámico medio de masa

FPF: Fracción de partículas finas

GSD: Desviación geométrica estándar

RF: Fracción respirable

EE: Eficiencia de encapsulación

k_H : Constante de disolución de Higuchi

NGI: *Next Generation Impactor*

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

Índice

Introducción	9
Objetivos	14
General:	14
Específicos:.....	14
Metodología.....	15
Materiales	15
Métodos	15
1. Producción de microesferas de doxiciclina-gelatina mediante la técnica de SD.	15
2. Evaluar la eficiencia de encapsulación física de las matrices de gelatina.....	17
3. Evaluar el perfil de liberación de doxiciclina desde las microesferas.....	18
4. Evaluación de las propiedades aerodinámicas y del estado sólido del principio activo luego del proceso de SD.	19
5. Análisis estadísticos de datos.	21
Resultados.....	22
1. Se comprobó que doxiciclina es fotosensible en buffer fosfato a pH 7,4.	22
2. Las matrices de GA presentaron una alta eficiencia de encapsulación de DOX.	22
3. Microesferas de DOX-GA producidas por SD aumentaron la disolución de DOX y la solubilidad de la misma.	23
4. Las microesferas de DOX-GA obtuvieron un alto rendimiento aerodinámico.....	25
5. Las formulaciones 16%DOX-GA y 64% DOX-GA presentaron picos de fusión en DSC similares a los de DOX pura.....	26
Discusión	28
Conclusión.....	31
Bibliografía.....	32

Introducción

Las enfermedades pulmonares de origen infeccioso son abordadas con antimicrobianos indicados según el tipo de agente que esté generando la infección. Sin embargo, estos tratamientos son administrados por vía oral, se absorben a nivel gastrointestinal y se distribuyen a través de la sangre hacia los pulmones, lo que conlleva al desarrollo de tres problemáticas importantes: 1) baja concentración del fármaco a nivel pulmonar, 2) reacciones adversas a nivel sistémico, y 3) destrucción de la microbiota intestinal del paciente. Por ende, el desafío cuando se trata de infecciones pulmonares es **diseñar tecnologías para administrar los antibióticos a través de inhaladores y para mejorar la solubilidad de éstos en el tejido pulmonar**, alcanzando así una mayor eficacia del tratamiento con menos complicaciones en el resto de los tejidos.

Un sector de la población que se vería beneficiado con el desarrollo de formulaciones inhalables de antibióticos son los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), ya que suelen presentar exacerbaciones de origen infeccioso 2-3 veces al año que son difíciles de abordar debido a la misma complejidad de la patología, y que pueden ser ocasionadas por un solo microorganismo que vuelve a colonizar el pulmón a pesar de ser abordado con anterioridad⁽¹⁾. Es aquí donde el médico tratante debe recurrir a otros algoritmos de tratamiento para erradicar la infección y preservar la escasa funcionalidad pulmonar del paciente, que ya se encuentra comprometida por la enfermedad de base.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por una inflamación de las vías respiratorias que provoca un aumento de la resistencia al flujo aéreo y síntomas sistémicos notables. A medida que la enfermedad progresa, afecta a los músculos esqueléticos, al sistema cardiovascular y al sistema nervioso por los bajos niveles crónicos de oxígeno; lo que repercute gravemente en la calidad de vida. Por lo tanto, es crucial evaluar y tratar estas complicaciones desde el principio para enfrentar de mejor manera el avance de la patología⁽²⁾. Asimismo, las exacerbaciones son la causa más frecuente de hospitalización y fallecimiento de los pacientes con EPOC. Éstas se definen como un acontecimiento que incrementa los síntomas de la enfermedad como la disnea, la tos y/o expectoración; dentro de los posibles desencadenantes se encuentran las infecciones bacterianas⁽³⁾.

El algoritmo de tratamiento de la infección dependerá del agente infeccioso, del grado de agudización y de los antibióticos disponibles en el mercado; dentro de los cuales se encuentran los betalactámicos, las fluoroquinolonas y los macrólidos. Según la orientación técnica para el uso de antibióticos entregada por el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), la primera línea de tratamiento es amoxiciclina + ácido clavulánico o azitromicina/claritomicina en caso de alergia a los betalactámicos, de ser necesario se pueden prescribir cefalosporinas, como ceftriaxona y ceftazidima, o fluoroquinolonas como levofloxacino y ciprofloxacino⁽⁴⁾. Sin embargo, la terapia antimicrobiana solo tiene como objetivo erradicar la infección de forma oportuna y eficaz, no considera la inflamación subyacente ni la funcionalidad comprometida del pulmón, lo que deriva en el requisito de añadir otros fármacos al tratamiento como hidrocortisona, prednisona, salbutamol, entre otros⁽²⁾.

Es aquí donde nace la necesidad de diseñar alguna alternativa farmacológica que permita combatir la infección, reducir la inflamación y disminuir el número de exacerbaciones al año en los pacientes. En base a esta premisa, diversos miembros de la comunidad científica

han volcado su interés en la doxiciclina, un antibiótico de la familia de las tetraciclinas que ha demostrado tener actividad antiinflamatoria sobre el tejido pulmonar (**Tabla 1**), ya que logra disminuir los niveles séricos de marcadores proinflamatorios y de enzimas proteolíticas (metaloproteinasas de matriz) que participan en la destrucción de la membrana interalveolar, lo que conduce al desarrollo de enfisema e inflamación pulmonar⁽⁵⁻⁷⁾. consiguiente, en base a la evidencia disponible, la doxiciclina es un buen coadyuvante para ser utilizado en las exacerbaciones de EPOC por su potencial como agente antiinflamatorio y sus propiedades antimicrobianas.

Tabla 1. Estudios científicos que evalúan el efecto antiinflamatorio de doxiciclina a nivel pulmonar, en el contexto de enfermedad obstructiva crónica.

Autores	Metodología	Resultados
Bhattacharyya et al. (2021) ⁽⁵⁾	Dos grupos: pacientes con EPOC con y sin 200 mg/día de doxiciclina añadida al tratamiento por 3, 6, 9 y 12 meses.	Mejoría a los 6 y 12 meses en los parámetros de función pulmonar: FEV1 y FVC. Reducción global en un 26,69% de las exacerbaciones. Disminución de los niveles séricos de MMP-9, MMP-2 y hs-CRP a los 3 meses.
Hadzic et al. (2021) ⁽⁶⁾	4 grupos de ratones adultos: expuestos al aire ambiente, expuestos al aire ambiente con doxiciclina, expuesto al humo de cigarrillo por 8 meses, y expuestos al humo de cigarrillo con tratamiento de doxiciclina por 3 meses.	Doxiciclina disminuyó la expresión de MMP-2, MMP-9 y de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1b. Sin embargo, no mejoró los síntomas de enfisema e hipertensión pulmonar ocasionada por el humo de cigarrillo.
Singh et al. (2019) ⁽⁷⁾	Dos grupos de pacientes con EPOC, uno con el tratamiento estándar y el otro con 200 mg/día de doxiciclina más la terapia base, por 3 meses.	Grupo con doxiciclina reflejó un descenso en los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-8) y en la expresión de MMP-2 y MMP-9. Se evidenció una reducción significativa en los marcadores de estrés oxidativo, tales como: LHP, TOS, NOx y peroxinitrato.

FEV1: Volumen espiratorio forzado en 1 segundo. FVC: Capacidad vital forzada. MMP-2 y MMP-9: Metaloproteinasas de matriz. hs-CRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad. TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa. IL-1b, IL-6, IL-8: Interleucinas 1b, 6 y 8. LHP: Hidroperóxidos lipídicos. TOS: Estado oxidante total. NOx: Nitrito y nitrato.

La doxiciclina (DOX) es un antibiótico bacteriostático que presenta una amplia actividad antimicrobiana sobre diversos microorganismos grampositivos y gramnegativos como, por ejemplo: *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*. Es un fármaco altamente lipofílico, lo que facilita su distribución en los tejidos y fluidos corporales, incluyendo los fluidos pleurales y las secreciones bronquiales⁽⁸⁾. Se absorbe casi por completo a nivel duodenal y presenta una biodisponibilidad que oscila entre 80 y 95%, una vida media entre 16-18 h, una unión a proteínas plasmáticas entre 80-90%, y un volumen de distribución de $0,7 \pm 0,1$ L/Kg⁽⁹⁾.

Dentro de los parámetros fisicoquímicos del fármaco se destacan sus valores de constante de disociación ácida (pKa), equivalentes a 3,02, 7,97 y 9,15; los cuales **determinan que su solubilidad sea pH-dependiente**⁽¹⁰⁾ (Figura 1). Entonces, cuando el medicamento se encuentra en un ambiente a pH inferior a tres, sus grupos funcionales están protonados y le otorgan carga positiva, favoreciendo así su máxima solubilidad. Cuando el rango de pH se encuentra entre 5,5 y 8,6, que corresponden a los puntos isoeléctricos de la molécula, la solubilidad disminuye considerablemente ya que las cargas se neutralizan y el medicamento existe como *zwitterión*. Asimismo, cuando el rango de pH se encuentra sobre nueve, el medicamento adquiere carga negativa y vuelve a ser soluble⁽¹⁰⁾. Por ende, a pH gastrointestinal, la doxiciclina tendría una alta solubilidad y alcanzaría su máxima absorción a nivel duodenal. Sin embargo, aunque estos atributos son una ventaja para su administración oral pues favorecen altas concentraciones plasmáticas, no dan una solución eficiente cuando la infección e inflamación ocurren a nivel pulmonar.

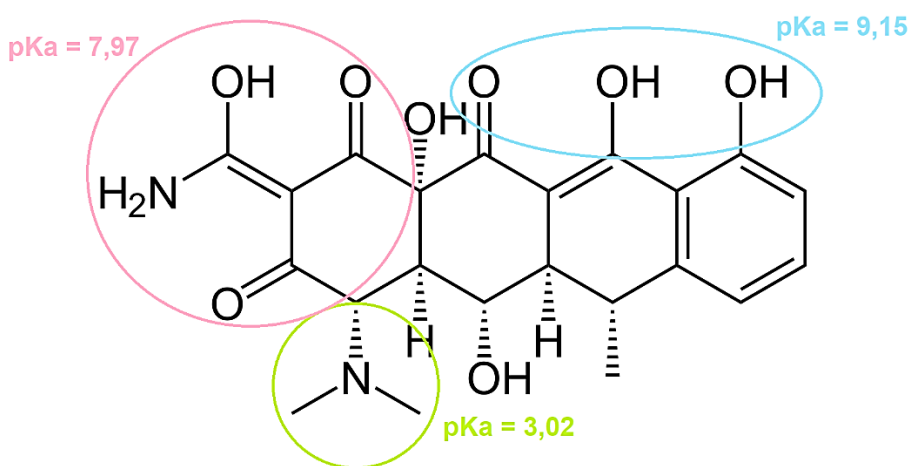


Figura 1. Estructura química de doxiciclina con sus respectivos valores de pKa.

De esta manera, la desventaja de usar doxiciclina es que actúa a nivel sistémico y tiene una amplia distribución entre los tejidos del organismo, lo que limita su concentración a nivel respiratorio. Esto último conlleva a la necesidad de evaluar un incremento en la dosis de doxiciclina para alcanzar el objetivo terapéutico a nivel pulmonar, con el riesgo de aumentar las probabilidades de que el paciente presente alteración de la microbiota intestinal y/o una reacción adversa al medicamento; tales como: náuseas, vómitos, diarrea, fotosensibilidad, entre otros⁽⁸⁾. De aquí surge el desafío de este proyecto de diseñar formulaciones inhalables que aseguren una mayor concentración del principio activo en los pulmones, aumentando la eficacia del tratamiento, disminuyendo los efectos laterales y reduciendo la dosis necesaria para alcanzar el éxito terapéutico.

El desarrollo de una formulación de doxiciclina apta para ser aplicada a través de un inhalador permitiría tener un mayor control de la inflamación subyacente en pacientes con EPOC, además de ayudar a erradicar la infección. Sin embargo, esta estrategia farmacéutica presenta una limitación que está asociada a las propiedades fisiológicas del tejido pulmonar, ya que se ha establecido que el pulmón posee un pH entre 7,35 a 7,45; rango que facilita el predominio de la forma no ionizada del medicamento alterando su solubilidad⁽¹¹⁾. Por ende, es necesario diseñar una formulación que permita mejorar la biodisponibilidad de la doxiciclina a nivel pulmonar, ya sea añadiendo un coadyuvante a la

formulación o generando un vehículo para mejorar la disolución del fármaco. Un buen candidato para alcanzar este objetivo es la gelatina, ya que existe evidencia de permitir la formación de dispersiones sólidas amorfas (ASD) en nuestro laboratorio cuando se usa como polímero de dispersión junto con ciprofloxacino⁽¹²⁾.

La gelatina (GA) es un polímero natural biodegradable y biocompatible que deriva de la hidrólisis de colágeno. Existen dos tipos de gelatina: tipo A que se produce por hidrólisis ácida, y tipo B que se obtiene por hidrólisis alcalina. Ha sido ampliamente utilizada por la industria farmacéutica para la elaboración de formulaciones de liberación prolongada, y ha demostrado ser un vehículo viable para la formulación de dispersiones sólidas amorfas^(13, 14,15). Las ASD son una estrategia valiosa para aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de medicamentos poco solubles, mejorando así su velocidad y grado de disolución. Consiste en un sistema binario compuesto por un principio activo disperso en un portador polimérico soluble, cuyo objetivo es desordenar las partículas del fármaco cambiando sus características para mejorar su humectabilidad, y con ello aumentar su solubilidad cuando el activo se seca y reestructura como un sólido amorfo. Asimismo, el proceso de formación de una ASD por secado por atomización reduce el tamaño de partícula y aumenta el área superficial, lo que se traduce en una mayor velocidad de disolución del fármaco. Los métodos de fabricación más comunes son el secado por atomización (*Spray Drying*) y la extrusión por fusión en caliente⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

La técnica de *Spray Drying* (SD) o secado por atomización se utiliza para producir dispersiones sólidas amorfas y como proceso de microencapsulación para generar micropartículas respirables. Su función es transformar una solución del activo en polvo seco mediante un procesamiento continuo de partículas en un solo paso^(20, 21). Cabe mencionar que esta técnica presenta dificultades vinculadas con las variables de la operación, las cuales deben ser controladas para eludir inconvenientes como un bajo rendimiento, porcentaje parcial de amorfización o un alto contenido de humedad en el producto final; por ende, para optimizar el proceso de SD se deben evaluar las características tanto del atomizador como de la formulación de alimentación⁽²⁰⁻²²⁾. El principal propósito del diseño de polvos secos por atomización es lograr un tamaño de partícula que permita su administración a través de un inhalador de polvo seco (DPI); es decir, el objetivo es obtener un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) menor a 5 micras para garantizar una llegada eficiente a las regiones bronquiales o alveolares del pulmón^(23, 24). Además, se ha demostrado que el SD es capaz de generar micropartículas con una fracción de partículas finas (FPF) entre 40-75%, lo que facilita la llegada del principio activo a las zonas más profundas del pulmón y una mejor solubilidad⁽²⁵⁾.

El proceso de microencapsulación a través de SD puede dar origen a dos tipos de partículas: microcápsulas y microesferas. Se utiliza el término microcápsulas cuando el núcleo que contiene el principio activo está circundado por una capa polimérica continua, con o sin poros. En cambio, se define como microesferas cuando el principio activo está disperso en una matriz polimérica que facilita una liberación más prolongada de la droga⁽²⁶⁾. Tanto las microcápsulas como las microesferas pueden ser administradas a través de un inhalador de polvo seco, que corresponde a un dispositivo que permite la aerosolización y entrega de medicamentos a través de la vía respiratoria, sin necesidad de propelentes⁽²⁷⁾. Los DPI se pueden clasificar según su mecanismo de fluidificación en dos categorías: activos o pasivos. Los activos requieren una fuente externa de energía como aire comprimido o una batería para la administración del medicamento; sin embargo, no están aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA). En cambio, los pasivos dependen

del flujo de inspiración del paciente y de su capacidad pulmonar para administrar el fármaco^(27, 28).

A la fecha, se han reportado estudios que aplican la técnica de SD para generar partículas inhalables a través de DPI, como la investigación realizada por Sham et al. (2004) que utilizó gelatina como matriz polimérica⁽²⁵⁾. A su vez, existen estudios que han expuesto el uso de polvos amorfos para administrar fármacos a través de la vía inhalatoria, como Chen et al. (2016) que propusieron la elaboración de una dispersión sólida amorfa aplicando la técnica de SD para ser administrada a través de un DPI⁽²⁹⁾. Para terminar, también existe un estudio elaborado por Douafer et al. (2021), que planteó un diseño experimental para mejorar el efecto de la doxiciclina sobre una cepa resistente de *Pseudomonas aeruginosa* al incorporar un adyuvante (derivado poliaminoisoprenilo NV716). El objetivo era elaborar un polvo seco para inhalación a través de un DPI. Utilizaron liofilización para producir los polvos de los dos principios activos, y partículas portadoras inhalables de lactosa para mejorar su aerosolización. Finalmente, en base a los valores obtenidos para las propiedades aerodinámicas (MMAD y FPF), los autores concluyen que la estrategia planteada es viable para conseguir la concentración requerida de doxiciclina a nivel pulmonar⁽³⁰⁾.

En base a la información recopilada, el diseño de microesferas de gelatina para transportar doxiciclina hacia el tejido pulmonar podría disminuir la inflamación característica de las exacerbaciones en EPOC y colaborar para erradicar de forma eficiente la infección. Igualmente, la técnica de secado por atomización es idónea para obtener un polvo seco que cumpla con las propiedades aerodinámicas adecuadas para ser administrado de forma local a través de un inhalador DPI, reduciendo así la incidencia de efectos adversos y la destrucción de la microbiota intestinal del paciente.

Objetivos

General:

Desarrollar una formulación en base a polvos amorfos para mejorar la solubilidad de doxiciclina utilizando gelatina como matriz polimérica.

Específicos:

1. Preparar una dispersión sólida amorfa de doxiciclina y gelatina utilizando la técnica de Spray Drying, optimizando las condiciones del proceso.
2. Determinar la capacidad de microencapsulación de la matriz de gelatina.
3. Evaluar la velocidad de difusión de la doxiciclina desde las microesferas de gelatina en condiciones simuladas del tracto respiratorio.
4. Evaluar las propiedades aerodinámicas y las características morfológicas del polvo seco obtenido.

Metodología

Materiales

Se usó doxiciclina como monohidrato de doxiciclina (DOX H₂O) y gelatina de tipo A (300g Bloom). Se usó agua destilada, ácido clorhídrico (HCl), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), hidróxido de sodio (NaOH); cápsulas de gelatina n°3 (Capsugel Lonza), placas de 96 pocillos, placas de 12 pocillos y filtros 0,45 µm de nitrocelulosa.

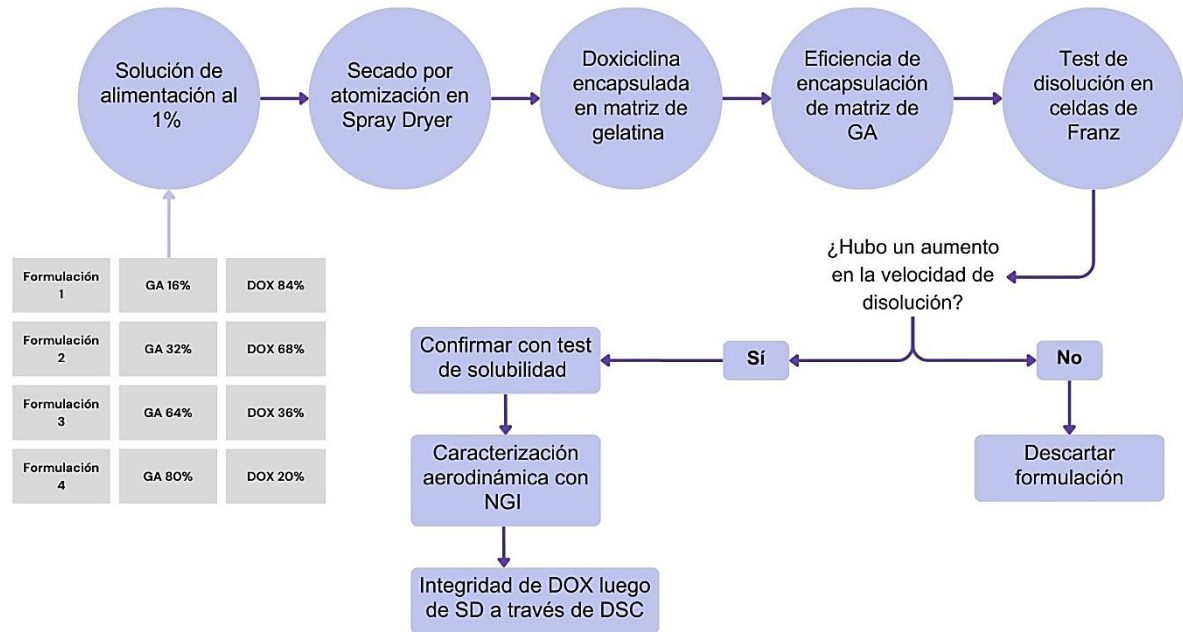


Figura 2. Resumen de la metodología a utilizar en la investigación.

Métodos

1. Producción de microesferas de doxiciclina-gelatina mediante la técnica de SD.

1.1. Preparación de solución de alimentación para el Spray Drying: Las partículas de tamaño aerodinámico deseado ($>0,1\mu\text{m}$ y $<5\mu\text{m}$), se elaboraron basadas en una solución de alimentación al 0,5% en peso de sólidos. Para mejorar la solubilidad del principio activo y asegurar que tanto la DOX como la GA se encuentren disueltos, se usó como solvente una solución acuosa de ácido clorhídrico a pH 2,0, preparada a partir de agua destilada más ácido clorhídrico 1M. La solución de alimentación se mezcló constantemente hasta alcanzar una solución real y se mantuvo a una temperatura de 40°C para asegurar la solubilidad en el medio, y así lograr la microencapsulación de la DOX al finalizar el proceso de secado en la cámara de secado del SD⁽³¹⁾ (**Figura 3**).

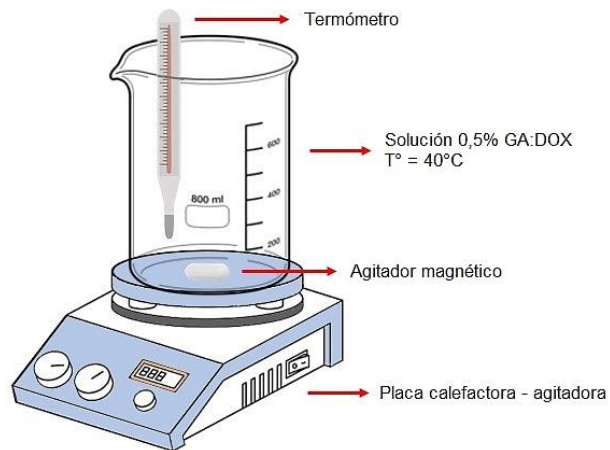


Figura 3. Elaboración de solución de alimentación DOX-GA para SD.

Evidencia de fotosensibilidad: Durante el ensayo de curva de calibrado, se encontró evidencia de fotodegradación. Esto significó que todas las muestras fueran protegidas de la luz, natural y artificial, para no afectar los ensayos de cuantificación posteriores. Se utilizó material de vidrio ámbar y cubiertas de plástico impresas en 3D para cubrir los equipos.

1.2. Proceso de atomización mediante SD: La solución de alimentación fue atomizada a 3 mL/min a una temperatura a 40°C para evitar alteraciones en la viscosidad de la solución. Parámetros como la velocidad de la bomba de suministro, el flujo de atomización y la temperatura de entrada fueron establecidos según la labor previa en el laboratorio realizada para optimizar el FPF de las microesferas de gelatina. La temperatura de entrada y la presión de atomización se regularon a 130°C y 60 mmHg, respectivamente (**Figura 4**). Una vez concluido el proceso de atomización, se aguardó hasta que disminuyese la temperatura residual del equipo para facilitar la recolección de las partículas.



Figura 4. Mini Spray Dryer B-290 (Buchi) disponible en el laboratorio utilizado para producir microesferas DOX-GA.

- 1.3. Conservación de muestras:** Posterior a la recolección de las muestras desde el vaso colector, éstas fueron rápidamente pesadas para evaluar el rendimiento del proceso de SD; las muestras se guardaron en un desecador con el objetivo de minimizar la absorción de peso en agua e hinchamiento de las microesferas.
- 2. Evaluar la eficiencia de encapsulación física de las matrices de gelatina:** La capacidad de encapsulación de las matrices de gelatina se estableció mediante la prueba de eficiencia de encapsulación (EE), para la cual se masó una cantidad conocida de muestra y se disolvió en una solución ácida a pH 2,0. Para asegurar la completa salida de DOX tras el hinchamiento de la matriz de gelatina, se dejó el aforo con la muestra en 50 mL a 40°C durante 2 h, utilizando matraces de ámbar. Posteriormente, se tomó una muestra y se determinó la concentración de DOX al comparar su absorbancia con la de la curva de calibrado de DOX-H₂O. Para medir la absorbancia se utilizó espectrofotometría UV a $\lambda = 400\text{nm}$ con un espectrofotómetro Synergy H1M (Biotek Instruments, Santa Clara, CA, US). Utilizando los valores obtenidos, se calculó la eficiencia de encapsulación a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Masa experimental de DOX en la muestra}}{\text{Masa teórica de DOX en la formulación}} \times 100$$

3. Evaluar el perfil de liberación de doxiciclina desde las microesferas

3.1. Test de disolución en celdas de Franz: En esta investigación, se usaron las celdas de difusión de Franz para determinar la velocidad de disolución de DOX desde su matriz de gelatina, ya que su sistema de armado permite simular la disolución de partículas a nivel del epitelio alveolar⁽³²⁾ (**Figura 5.A**). En este ensayo, se masó una cantidad de formulación sobre membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm , las cuales fueron cerradas mediante la compresión del compartimiento superior sobre el compartimiento inferior. Se empleó un buffer fosfato a pH 7,4 como medio de disolución en el compartimiento receptor y se mantuvo a 37°C a través del sistema de control de temperatura de las celdas de Franz. Una vez posicionada la membrana sobre el compartimiento receptor y sellada con la tapa superior, se cubrió el sistema proteger la solución de la luz artificial y natural (**Figura 5.B**). Se recolectaron muestras del compartimiento receptor a los 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 180 minutos. En el último intervalo de tiempo, se realizó el retiro del filtro y se lavó con una solución ácida a pH 2,0 para disolver cualquier sustancia activa que no se hubiese disuelto durante la prueba. Se calculó el porcentaje de droga liberada de la matriz en el tiempo en base al porcentaje de droga disuelta acumulado. Se utilizó el modelo de cinética de liberación Higuchi para las formulaciones DOX-GA, ya que se ha establecido que es el ideal para sistemas matriciales⁽³³⁾. Éste se basa en el supuesto de que la liberación del principio activo ocurre por difusión. El parámetro T_{80} y la constante de disolución de Higuchi (k_H) se determinación en base a la predicción del modelo utilizando *DDsolver*. El T_{80} describe el tiempo que tarda en liberarse el 80% de la droga desde la matriz; mientras que la constante de disolución indica la tasa de liberación del activo⁽³³⁾.

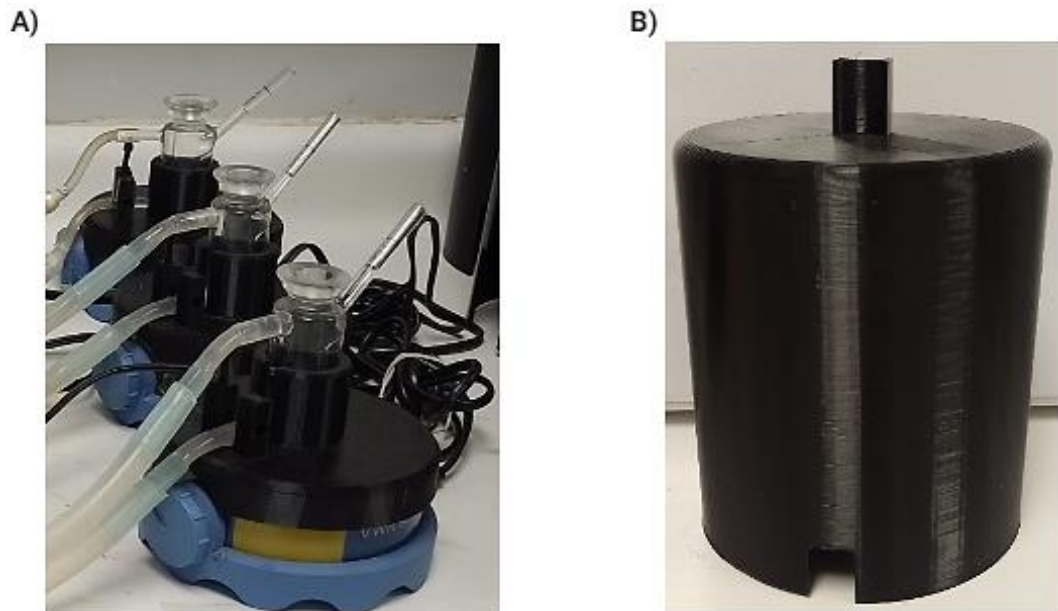


Figura 5. Celdas de difusión de Franz. A) Sistema ensamblado de celdas de Franz con cámara de recubrimiento térmico montado en LATEFAR. B) Cubierta de plástico impresa en 3D para prevenir exposición a la luz natural y artificial.

- 3.2. Evaluar la solubilidad de las formulaciones con mejor perfil de liberación:** Con el objetivo de determinar si la solubilidad de DOX aumento, se procedió a diluir una cantidad conocida de cada lote en buffer fosfato a pH 7,4 bajo las siguientes condiciones: matraz de 10 mL cubierto con papel aluminio, 50 rpm de agitación por 17 h y una temperatura de 40°C. La cantidad masada de cada formulación se calculó con la premisa de que la solución de DOX pura al 0,5 mg/mL es insoluble. Por lo tanto, en cada solución se buscó alcanzar esa misma concentración de DOX.
- 4. Evaluación de las propiedades aerodinámicas y del estado sólido del principio activo luego del proceso de SD.**
- 4.1. Evaluación de propiedades aerodinámicas:** El MMAD, FPF, la desviación geométrica estándar (GSD) y la fracción respirable (RF) se determinaron mediante impactación en cascada en el equipo *Next Generation Impactor* (NGI) (**Figura 6**). Antes de cada ensayo, la bomba de vacío fue ajustada para generar un diferencial de presión igual a 4 kPas. Posteriormente, se cuantificó el flujo con un flujómetro electrónico para ajustar la válvula solenoide de dos direcciones, y se estableció un intervalo de tiempo para mantener la bomba de vacío activada y así simular una inhalación de 4L de aire. Por cada replicado de este ensayo se evaluó 1 cápsula cargada con una masa conocida de formulación, cercana a los 20 mg. Para todos los replicados se utilizó el mismo dispositivo de DPI (High-Resistance RS01 Monodose DPI, Plastiape, Berry) y la recolección de muestra en los platillos se hizo con una solución ácida a pH 2,0 para facilitar la disolución y el desprendimiento de la matriz de gelatina. En acto seguido, se midió la absorbancia de una muestra de cada platillo para ser comparada con la curva de calibrado diseñada previamente, así se determinó la concentración de DOX por medio de interpolación sobre la ecuación de la recta de dicha curva.

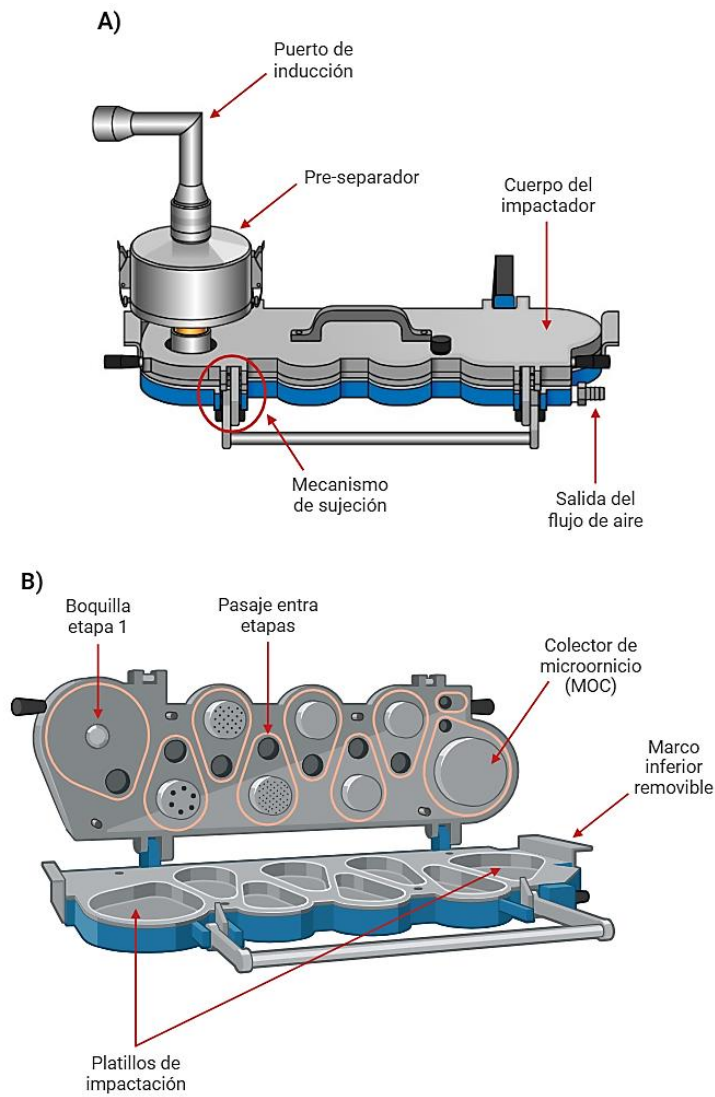


Figura 6. Ilustración del equipo *Next Generation Impactor* (NGI). A) Configuración cerrada con el puerto de inducción y el pre-separador. B) Interior del NGI con 7 etapas de boquillas, los platillos correspondientes y el colector MOC.

4.2. Caracterización de estado sólido de la formulación con Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): El objetivo del estudio es encontrar evidencia de amorfización desde el estado cristalino de DOX pura al estado amorfo de las microesferas DOX-GA. DSC es una técnica termoanalítica utilizada para medir el flujo de calor necesario para cambiar las propiedades de estado sólido de un material cuando se calienta o se enfría⁽³⁴⁾. El DSC se utiliza ampliamente para caracterizar dispersiones sólidas, proporcionando datos precisos sobre puntos de fusión, temperaturas de transición vítrea y cambios de energía durante transiciones de fase como la cristalización y la fusión.^(35, 36). El análisis se llevó a cabo en un calorímetro DSC131 (SETARAM Inc., Cranbury, NJ, EE.UU.). Primero se pesaron entre 3 a 5 mg de cada formulación, de DOX y de GA en crisoles de aluminio

sellados. Después se procedió con la lectura en el calorímetro con un intervalo de temperatura de 0 a 250°C a una velocidad constante de calentamiento de 10°C/min. Finalmente, se compararon los termogramas obtenidos y se registraron parámetros claves como temperaturas máximas, cambios de entalpía y eventos de transición.

- 5. Análisis estadísticos de datos:** Todos los resultados están representados como el valor promedio +/- la desviación estándar de al menos tres replicados. Las diferencias significativas han sido evaluadas por análisis de varianza aplicando ANOVA *one way*, con un estudio post-hoc de Tukey HSD $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism versión 9.1.

Resultados

Para un mejor entendimiento de los resultados expuestos en esta sección, se define X% DOX-GA como una formulación que contiene X% de doxiciclina monohidrato dispersa en una matriz de gelatina tipo A.

1. Confirmación de fotosensibilidad de doxiciclina en buffer fosfato a pH 7,4 en presencia de luz de laboratorio.

Al preparar una solución de DOX en buffer fosfato a pH 7,4 y dejarla sobre el mesón expuesta a la luz, se observó un cambio de color que no se evidenció al disolver la droga en solución ácida a pH 2,0. Debido a esta observación, se planificó un experimento para corroborar si DOX era o no fotosensible. De esta manera, se repitió el procedimiento con diferentes concentraciones de DOX expuestas intencionalmente a la luz de día dentro del laboratorio, y en todas las circunstancias se evidenció el cambio de tonalidad, pasando de amarillo tenue a un rojo cada vez más intenso (**Figura 7**). Sin embargo, al utilizar un matraz ámbar y repetir las condiciones de disolución, se observó que DOX era capaz de disolverse en buffer fosfato manteniendo el mismo tono amarillo que al disolverse en solución ácida (**Figura 7**).



Figura 7. Estudio de fotosensibilidad de doxiciclina en solución a buffer fosfato pH 7,4 y solución ácida pH 2,0 expuesta a la luz solar o protegida en matraz ámbar.

2. Las matrices de GA presentaron una alta eficiencia de encapsulación de DOX.

Todas las formulaciones presentaron una EE mayor o igual al 80%, lo que refleja una alta eficiencia en el proceso de SD para formar las microesferas de DOX-GA (**Figura 8**). Los resultados de la EE reportados a continuación, fueron utilizados para hacer el ajuste de masa correspondiente en experimentos posteriores.

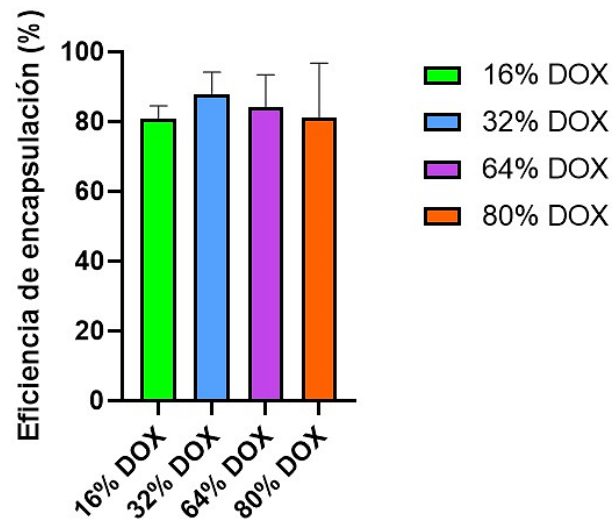


Figura 8. Eficiencia de encapsulación de las matrices de DOX-GA. Todas las formulaciones alcanzaron valores entre el 80 y 90% de eficiencia de encapsulación. No hubo diferencias significativas.

3. Microesferas de DOX-GA producidas por SD aumentaron la velocidad de disolución y solubilidad de DOX.

Las formulaciones de DOX-GA demostraron un mejor perfil de disolución en comparación a DOX pura (**Figura 9**). Las proporciones que lograron una mejor disolución de DOX a la hora fueron: la formulación con 64%DOX-GA que liberó el 101% del fármaco y la formulación con 32%DOX-GA que por su parte liberó el 91% de la droga. En tercer lugar, quedó el preparado con 80%DOX-GA que presentó una liberación del 75% a la hora y, en cuarto lugar, la formulación con 16%DOX-GA que mostró una disolución similar a la de DOX pura con tan solo 5% disuelto a la hora (**Figura 9**). La constante de disolución de Higuchi de 32%, 64% y 80%DOX-GA fueron significativamente mayores que DOX pura (**Figura 10.A**). El T_{80} calculado para 32% y 64%DOX-GA fue aproximadamente de 1,2 y 0,8 h, respectivamente; sí hubo una diferencia significativa entre ambas formulaciones (**Figura 10.B**).

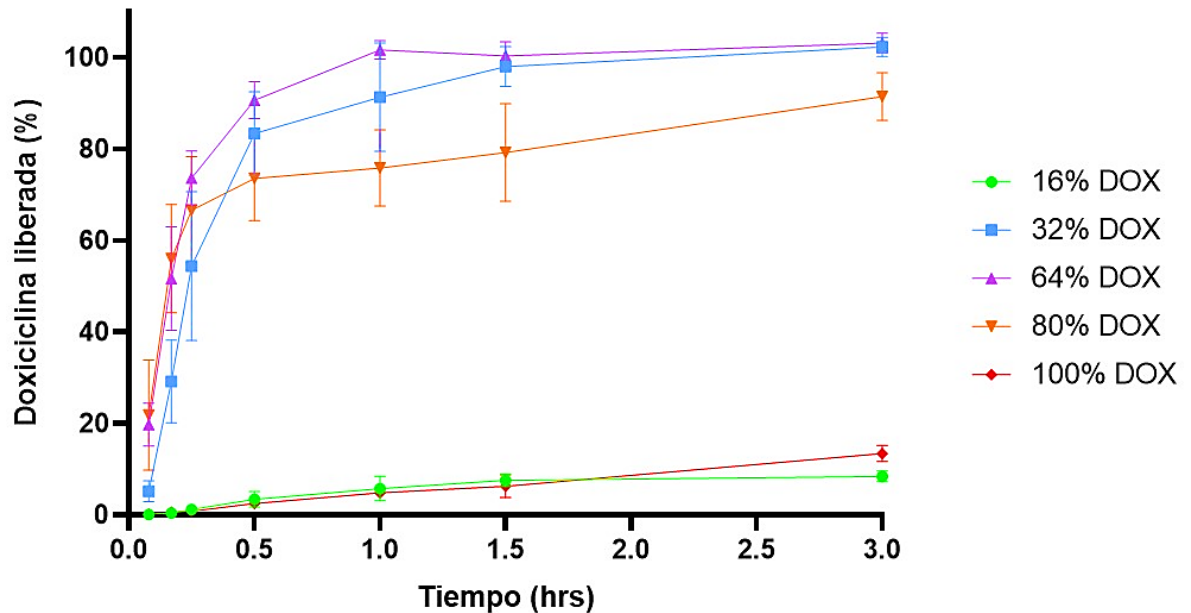


Figura 9. Perfil de disolución de las microesferas de DOX-GA a varias concentraciones del principio activo comparado con DOX pura, a través del test de disolución en celdas de Franz.

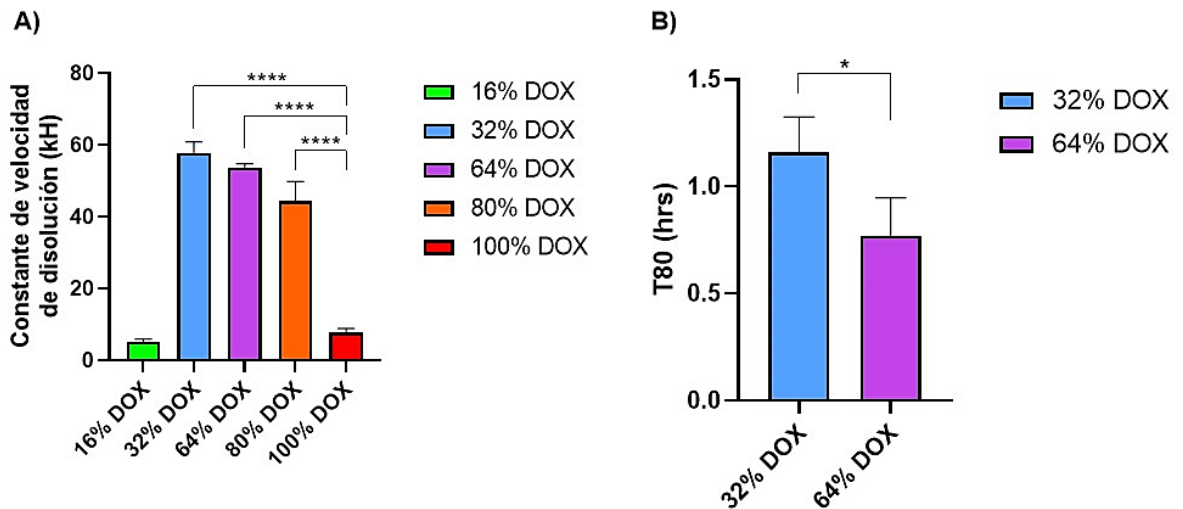


Figura 10. Cinética de liberación de DOX desde las microesferas de GA. A) Constantes de disolución obtenidas a través del modelo Higuchi. Las formulaciones 32%DOX-GA y 64%DOX-GA presentaron valores de k_H más altas en comparación con el resto de las formulaciones y con DOX pura. (**** $p < 0,0001$). B) T_{80} de las formulaciones 32%DOX-GA y 64%DOX-GA. La predicción del tiempo necesario para alcanzar el 80% del fármaco liberado para las formulaciones fue de 1,2 y 0,8 h, respectivamente. (* $p < 0,5$).

Asimismo, se encontró que los preparados 32%DOX-GA y 64%DOX-GA mejoraron visiblemente la solubilidad de la droga en comparación a una muestra de DOX pura (**Figura 11**). La muestra 100%DOX (0,5 mg/mL) presentó una notoria dispersión de la luz laser debido a la presencia de sólidos de droga no soluble. Mientras que, las formulaciones con 32%DOX-GA (0,6 mg/mL) y 64%DOX-GA (0,6 mg/mL) presentaron visualmente dispersión de la luz sin presencia de partículas, solo evidenciando el efecto Tyndall. El cual ocurre cuando se hace visible la trayectoria del haz de luz a través de una suspensión coloidal, ya que ésta se dispersa por las partículas suspendidas⁽³⁷⁾.

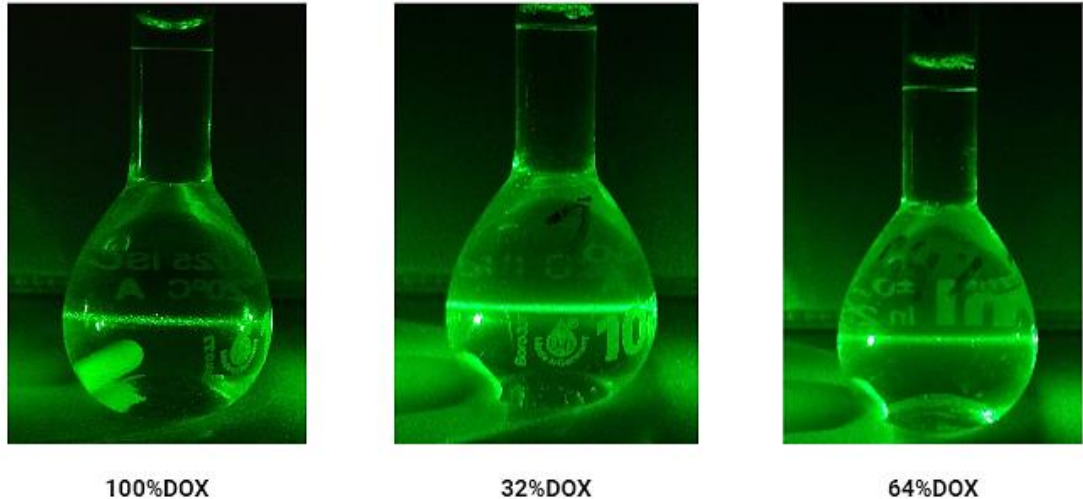


Figura 11. Test de solubilidad. Los preparados con mejor perfil de disolución (32%DOX-GA y 64%DOX-GA) solo mostraron dispersión de la luz por efecto Tyndall y carecían de material particulado suspendido, en comparación con DOX pura.

4. Las microesferas de DOX-GA obtuvieron un alto rendimiento aerodinámico.

Las características aerodinámicas de los preparados inhalables se expresan en base a los parámetros de distribución del tamaño de partícula (MMAD, FPF, GSD) y de la fracción respirable (RF). Las formulaciones 32%DOX-GA y 64%DOX-GA presentaron un buen rendimiento aerodinámico (**Figura 12**).

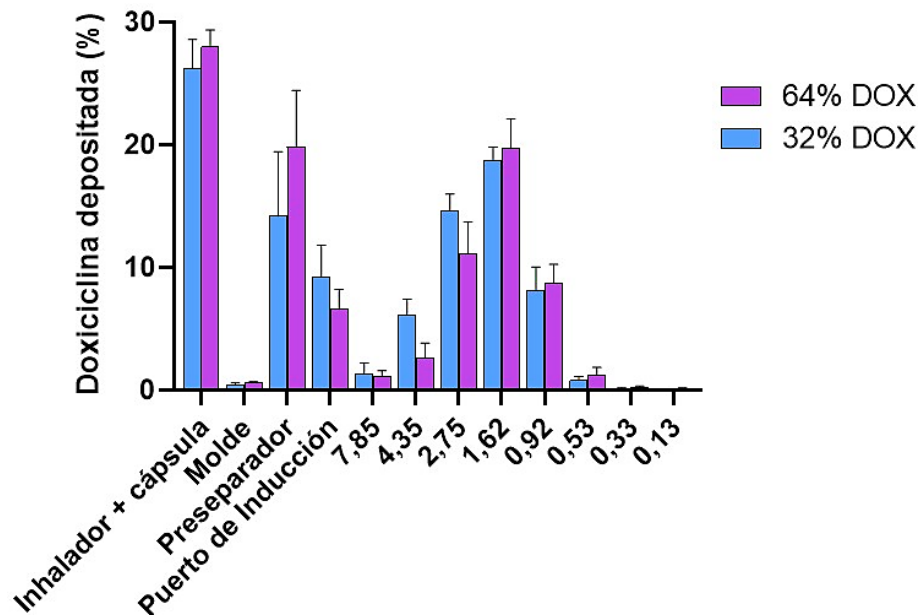


Figura 12. Desempeño aerodinámico de microesferas DOX-GA por NGI. El gráfico ilustra la distribución por masa en cada platillo del impactador y el punto de corte aerodinámico correspondiente al flujo de aire de 60 L/min. No hubo diferencias significativas entre las formulaciones.

El análisis de parámetros aerodinámicos provenientes de la distribución del tamaño de partícula se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros aerodinámicos de microesferas DOX-GA.

Preparado	MMAD (μm)	FPF (%)	GSD	RF (%)
32%DOX	$2,68 \pm 0,04$	$66,12 \pm 3,79$	$1,70 \pm 0,06$	$48,70 \pm 4,55$
64%DOX	$2,26 \pm 0,18$	$61,45 \pm 4,21$	$1,79 \pm 0,04$	$44,04 \pm 5,41$

MMAD: Diámetro aerodinámico medio de masa. FPF: Fracción de partículas finas. GSD: Desviación geométrica estándar. RF: Fracción respirable.

5. Las formulaciones 16%DOX-GA y 64% DOX-GA presentaron picos de fusión en DSC similares a los de DOX pura.

En los termogramas DSC se obtuvieron los siguientes resultados. Para doxiciclina monohidrato, se observó un pico endotérmico alrededor de los $166,94^{\circ}\text{C}$ que correspondería a la fusión del antibiótico y un pico exotérmico alrededor de $206,32^{\circ}\text{C}$ correspondiente a la descomposición de doxiciclina⁽³⁸⁾ (**Figura 13.A**). Para gelatina tipo A, se obtuvo un amplio pico endotérmico que ocultó la señal asociada a la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero, la cual corresponde a 77°C según la literatura; además, se evidenció un segundo pico endotérmico que estaría asociado a su descomposición⁽³⁹⁾ (**Figura 13.B**). Con respecto a las microesferas DOX-GA, la formulación 16%DOX-GA manifestó a lo menos 3 eventos: liberación de agua, un pico endotérmico ($205,26^{\circ}\text{C}$) seguido de un pico exotérmico ($229,70^{\circ}\text{C}$) y un desplazamiento del pico de descomposición

asociado a doxiciclina (de los 206, 32°C a los 229,70°C) (**Figura 13.C**). La formulación 64%DOX-GA presentó eventos similares a los reportados en 16%DOX-GA, solo se destaca el aumento de tamaño del pico exotérmico asociado a doxiciclina (**Figura 13.D**).

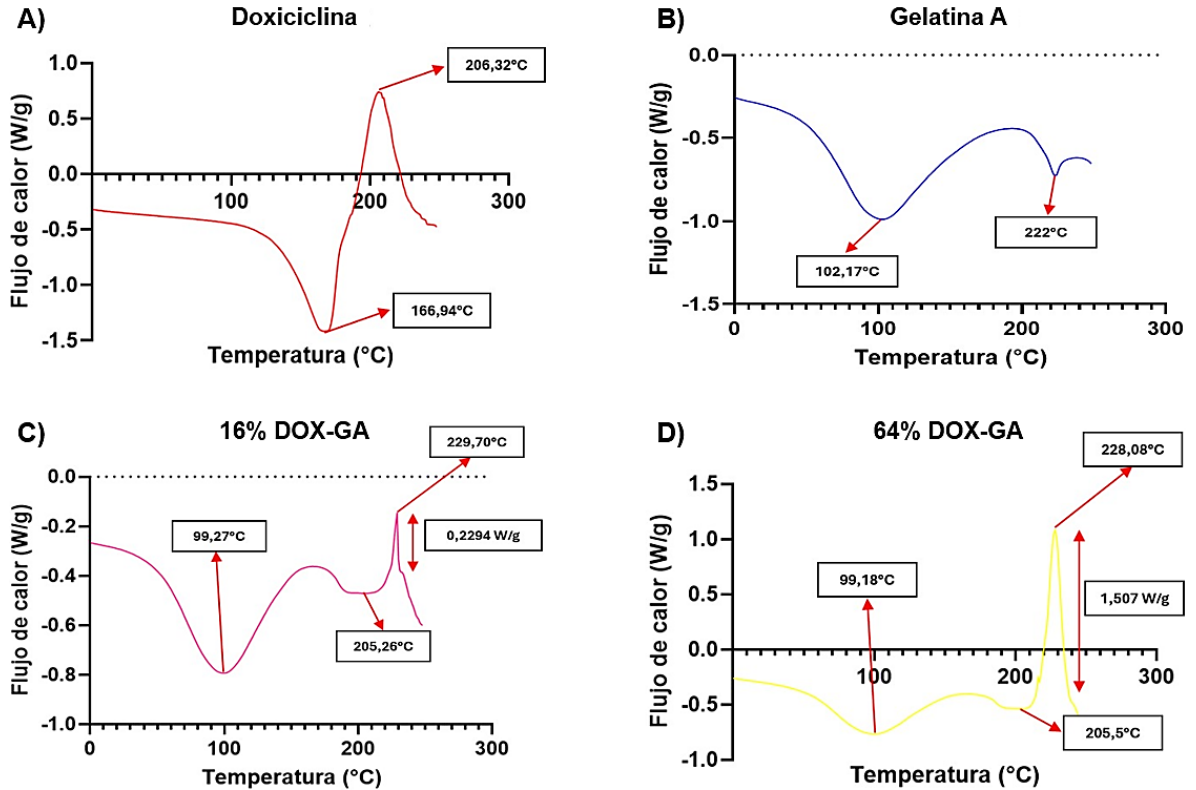


Figura 13. Termogramas de microesferas DOX-GA, DOX pura y gelatina tipo A elaborados a través de DSC. A) Doxiciclina monohidrato. Se observaron dos eventos térmicos: un pico endotérmico alrededor de los 166,94°C y un pico exotérmico alrededor de 206,32°C. B) Gelatina tipo A. Se observó un amplio pico endotérmico (inicio: 51,27°C – máximo: 102,17°C – final: 169,03°C) y un segundo pico endotérmico (222°C) que estaría asociado a su descomposición. C) Microesferas 16%DOX-GA. Fue posible observar a lo menos 3 eventos: liberación de agua (99,27°C), un pico endotérmico (205,26°C) seguido de un pico exotérmico (229,70°C), y un desplazamiento del pico exotérmico asociado a doxiciclina (de los 206,32°C a los 229,70°C). D) Microesferas 64%DOX-GA. En esta formulación se repiten los eventos reportados en 16%DOX-GA, con un pico endotérmico de 205,50°C y exotérmico de 228,08°C.

Discusión

1. El aumento de la velocidad de disolución de doxiciclina favorece su biodisponibilidad pulmonar.

Con respecto al perfil de disolución de las microesferas DOX-GA, las formulaciones 32%DOX-GA y 64%DOX-GA evidenciaron un incremento en la velocidad de disolución del principio activo desde la matriz de gelatina, alcanzando sobre un 90% de la droga liberada a la hora para las dos formulaciones. Mientras que, para la muestra de doxiciclina monohidrato pura, solo se alcanzó un 5% de liberación de la droga en el mismo período de tiempo. Por ende, el uso de GA como polímero estabilizador y medio sólido de dispersión en las proporciones utilizadas, permitió formar un sistema matricial capaz de incrementar sobre 18 veces la fracción disuelta de DOX a pH 7,4. Asimismo, la velocidad de disolución se vio aumentada al menos 7,6 veces respecto a la DOX pura. Estos resultados permiten predecir que la DOX administrada por la vía inhalatoria como una dispersión sólida amorfa es más eficiente, ya que estaría rápidamente disuelta evitando así el clearance alveolar por macrófagos, que suelen fagocitar entre el 50-75% de las partículas a las 2-3 horas⁽⁴⁰⁾. La biodisponibilidad aumentada de DOX no solo favorece su efecto antiinflamatorio, sino que también tiene el potencial de favorecer su efecto antimicrobiano.

2. Es viable administrar las microesferas DOX-GA a través de la vía inhalatoria en vez de la ruta oral.

Los resultados obtenidos en las celdas de Franz, donde el polvo se disuelve en una pequeña fracción de buffer que solo permite humedecer el filtro, muestran que DOX puede disolverse rápidamente en condiciones fisiológicamente relevantes o similares al pulmón. Estos resultados permiten proyectar que es viable el uso de DOX en el sistema respiratorio, ya que no necesitaría de altos volúmenes de medio y que su solubilidad a dejado de ser pH dependiente, siendo ahora soluble más allá del ácido del estómago.

3. Las microesferas DOX-GA presentan propiedades aerodinámicas sobresalientes para ser administradas a través de un inhalador de polvo seco.

Los resultados mostraron un sobresaliente desempeño aerodinámico que se ve reflejado en la alta dispersión del polvo contenido en la cápsula (RFs > 44%) y un potencial de dispersión pulmonar destacable reflejado en la gran cantidad de masa de la formulación que tiene un tamaño de partícula inferior a 5 μm (FPFs > 60%).

Se ha establecido en la literatura que para que un producto de inhalación oral sea considerado eficiente, el MMAD debe ser menor a 5 micras para garantizar una óptima llegada del fármaco a las regiones más profundas de los pulmones⁽²⁴⁾, el valor de FPF debe estar entre 40-75% para permitir una mayor concentración del activo en las áreas bronquiales o alveolares⁽²⁵⁾, y el GSD debe ser menor o igual a uno para que todas las partículas tengan un tamaño similar, lo que se conoce como aerosol monodisperso, sobre este valor las partículas tendrían diferentes tamaños (aerosol heterodisperso)⁽⁴¹⁾. Siguiendo esta premisa, los resultados de las propiedades aerodinámicas de las microesferas DOX-GA, tanto para 32% como para 64%, cumplieron con los rangos expuestos en la literatura. En ambos casos, se obtuvo un MMAD inferior a 5 μm , un FPF sobre el 60% y un GSD entre 1,7 y 1,8 que refleja un tamaño de partícula acotado.

En sí, las formulaciones presentaron una buena aerosolización que podría facilitar la adherencia del paciente al tratamiento y una mayor eficacia de éste. Si un producto de inhalación llega con facilidad al pulmón y en cantidades aceptables, se necesitarían menos aplicaciones para alcanzar las concentraciones terapéuticas del fármaco; lo que se traduce en menos cápsulas utilizadas, menor incidencia del error humano al repetir la técnica de inhalación más de una vez, y menor gasto monetario para el paciente. Es así como las propiedades aerodinámicas de la formulación, la tecnología del dispositivo, las características morfológicas de las vías respiratorias y la técnica de inhalación del paciente determinan la eficacia del tratamiento farmacológico⁽⁴²⁾.

Por otro lado, estos resultados fueron comparables con un estudio realizado por Douafer et al. (2021), que incorporaron un polímero (derivado poliaminoisoprenilo NV716) a una formulación de DOX para mejorar la aerosolización de la droga, alcanzando valores de MMAD y FPF equivalentes a 4,1 μm y 38%, respectivamente⁽³⁰⁾. Además, la gelatina es un polímero natural biocompatible aprobado por la FDA para su uso en preparaciones inhalables; mientras que el polímero NV716 no lo es⁽⁴³⁾. Por consiguiente, las microesferas obtenidas a través del proceso de SD usando gelatina como matriz polimérica, presentaron mejores características aerodinámicas que el estudio comparativo y tienen la ventaja de ser comercializables, ya que contienen un polímero aprobado para su uso en pulmón.

Entonces, al comparar las características aerodinámicas de las formulaciones con inhaladores presentes en el mercado chileno para el tratamiento de EPOC (**Tabla 3**), el MMAD de 32%DOX-GA y 64%DOX-GA resultó ser inferior o cercano a los productos comparados; por ende, el activo tendría una llegada a las zonas profundas de los pulmones similar a los productos disponibles en Chile. Por otro lado, el FPF de ambas formulaciones fue superior a tres de los inhaladores, lo que indica que el activo alcanzaría una mayor concentración en las regiones bronquiales o alveolares que los dispositivos revisados.

Tabla 3. Productos de inhalación disponibles en el mercado chileno para el tratamiento de EPOC.

Producto	Composición	MMAD (μm)	FPF (%)	Dispositivo
<i>Spiolto Respimat</i> ⁽⁴⁴⁾	tiotropio + olodaterol	4,2 – 4,6 ⁽⁴⁵⁾	66 – 72 ⁽⁴⁵⁾	SMI
<i>Anoro Ellipta</i> ⁽⁴⁸⁾	umeclidinio + vilanterol	1,8 – 3,2 ⁽⁴⁶⁾	24 – 40 ⁽⁴⁷⁾	DPI
<i>Trelegy Ellipta</i> ⁽⁴⁹⁾	furoato de fluticasona + umeclidinio + vilanterol	1,8 – 3,2 ⁽⁴⁶⁾	24 – 40 ⁽⁴⁷⁾	DPI
<i>Ultibro Breezhaler</i> ⁽⁵⁰⁾	Indacaterol + glicopirronio	2,5 – 2,7 ⁽⁴⁶⁾	43 – 45 ⁽⁴⁷⁾	DPI

SMI: Inhalador de niebla suave. DPI: Inhalador de polvo seco.

4. Los resultados obtenidos en DSC no fueron concluyentes para confirmar la formación de una dispersión sólida amorfa de doxiciclina.

Los resultados obtenidos en los termogramas DSC no permitieron dilucidar si las formulaciones DOX-GA evaluadas corresponden a una dispersión sólida amorfa del principio activo, ya que se obtuvieron picos de fusión y de descomposición característicos de un sólido en su forma cristalina. Además, no se observó un cambio escalonado de transición vítrea (Tg) en las muestras, la cual es indispensable en un termograma de polvos amorfos o dispersiones sólidas amorfas^(35, 36).

Se evaluó la formulación con menor rendimiento en el test de disolución (16%DOX-GA) y se observó un aparente pico endotérmico seguido inmediatamente de un pico exotérmico (**Figura 13.C**), cuyos eventos son cercanos a los presentados por doxiciclina pura. Asimismo, al evaluar la formulación con mejor rendimiento en el test de disolución (64%DOX-GA), se obtuvieron eventos similares a los reportados en 16%DOX-GA y solo se destaca un aumento en el tamaño del pico exotérmico asociado a doxiciclina, lo cual hace sentido si se considera que la formulación 64%DOX-GA presenta una mayor cantidad del antibiótico (**Figura 13.D**). Entonces, al comparar las microesferas con los resultados alcanzados por doxiciclina pura, se evidenció un desplazamiento del pico exotérmico en ambas formulaciones, lo que sugiere un cambio en el estado físico de doxiciclina; sin embargo, al haber presencia de picos de fusión y descomposición, no se puede concluir que las muestras de 16%DOX-GA y 64%DOX-GA correspondan a una dispersión sólida amorfa del activo.

Se sabe que el proceso de formación de una dispersión sólida amorfa por SD reduce el tamaño de partícula y aumenta el área superficial, lo que se traduce en una mayor velocidad de disolución del fármaco⁽¹⁶⁾. Esto se vio reflejado en los resultados obtenidos para la formulación 64%DOX-GA en las celdas de Franz. Por consiguiente, la caracterización de las microesferas a través de DSC no concuerda con lo planteado en la literatura y con los eventos presenciados en el laboratorio, siendo necesario utilizar otras técnicas para identificar de forma certera si las condiciones de atomización por SD generaron una dispersión sólida amorfa o un polvo cristalino. Se podría realizar una prueba de Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC) o una Espectroscopía de Raman para darle respuesta a esta incógnita.

Además, otro resultado que pone en duda la certeza de los termogramas DSC, es la eficiencia de encapsulación de las formulaciones. En base a los valores obtenidos, las condiciones de atomización utilizadas en la técnica de SD fueron óptimas para alcanzar una alta eficiencia de encapsulación, de las microesferas DOX-GA, entre 80 y 90% en las 4 proporciones evaluadas. Esto indica que la gelatina es un buen candidato como matriz polimérica para dispersar una gran cantidad de doxiciclina monohidrato en estado sólido amorfo, permitiendo la formación de una dispersión sólida amorfa.

Conclusión

En resumen, las microesferas de doxiciclina-gelatina (DOX-GA) presentan una biodisponibilidad pulmonar significativamente mejorada debido a su rápida disolución y óptimas propiedades aerodinámicas. Las formulaciones de 32%DOX-GA y 64%DOX-GA demostraron una velocidad de disolución mucho mayor que la doxiciclina pura, lo que sugiere una mayor eficiencia cuando se administra por vía inhalatoria, evitando así el clearance pulmonar por macrófagos. Estas microesferas logran liberar más del 90% del principio activo en una hora, favoreciendo su eficacia al llegar rápidamente a las regiones profundas de los pulmones, y mostrando un rendimiento aerodinámico sobresaliente, con un tamaño de partícula adecuado y una dispersión efectiva, comparable o incluso superior a los inhaladores disponibles en el mercado chileno.

Desde un punto de vista de seguridad, entre las formulaciones 32% y 64%DOX-GA, se prefiere continuar los estudios con 64% debido a que tiene una mayor concentración de DOX, lo que reduciría el número de capsulas necesarias para el tratamiento. De igual forma, la mejora en la velocidad de disolución usando una menor concentración de gelatina se puede asociar a disminuir la exposición del pulmón a este potencial viscosante, aun cuando su aporte tras disolverse en el líquido pulmonar sea muy bajo.

Por lo tanto, la administración de microesferas DOX-GA a través de inhaladores de polvo seco podría mejorar la adherencia del paciente al tratamiento y reducir los costos, proporcionando una alternativa viable y eficiente para el uso de doxiciclina en Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Aunque los resultados de la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) no fueron concluyentes para confirmar la formación de una dispersión sólida amorfa, se destaca la alta eficiencia de encapsulación y el potencial de la gelatina como matriz polimérica. Se recomienda el uso de técnicas adicionales como la Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC) o la Espectroscopía de Raman para confirmar el estado físico de la doxiciclina en las formulaciones.

Bibliografía

- (1) González Del Castillo, J., Candel, F. J., de la Fuente, J., Gordo, F., Martín-Sánchez, F. J., Menéndez, R., Mujal, A., & Barberán, J. (2018). Manejo integral del paciente con exacerbación aguda de la enfermedad pulmonar. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31(5), 461–484.
- (2) Subsecretaría de Salud Pública. División Prevención y Control de Enfermedades. Secretaría Técnica AUGÉ. (2013). Guía Clínica: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica de tratamiento ambulatorio. *Ministerio de Salud, Gobierno de Chile*. <http://www.repositoriodigital.minsal.cl/handle/2015/558>.
- (3) Celli, B., MacNee, W., Agusti, A., Anzueto, A., Berg, B., Buist, A., Calverley, P., Chavannes, N., Dillard, T., Fahy, B., Fein, A., Heffner, J., Lareau, S., Meek, P., Martinez, F., McNicholas, W., Muris, J., Austegard, E., ZuWallack, R. (2004). Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *European Respiratory Journal*, 23(6), 932-946. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00014304>
- (4) Herrera Martínez, T. & Subsecretaría de Salud Pública. División de Prevención y Control de Enfermedades. Departamento de Enfermedades Transmisibles. (2021). Orientación técnica para el uso de antibióticos en infecciones comunitarias de manejo ambulatorio. *Ministerio de Salud, Gobierno de Chile*. <https://diprece.minsal.cl/programas-de-salud/programas-enfermedades-transmisibles/>
- (5) Di Caprio, R., Lembo, S., Di Costanzo, L., Balato, A., & Monfrecola, G. (2015). Anti-Inflammatory Properties of Low and High Doxycycline Doses: An In Vitro Study. *Mediators Of Inflammation*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/329418>
- (6) Hadzic, S., Wu, C., Gredic, M., Kojonazarov, B., Pak, O., Kraut, S., Sommer, N., Kosanovic, D., Grimminger, F., Schermuly, R. T., Seeger, W., Bellusci, S., & Weissmann, N. (2021). The effect of long-term doxycycline treatment in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension. *American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology*, 320(5), L903-L915. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00048.2021>
- (7) Singh, B., Ghosh, N., Saha, D., Sarkar, S., Bhattacharyya, P., & Chaudhury, K. (2019). Effect of doxycycline in chronic obstructive pulmonary disease - An exploratory study. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 58, 101831. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.101831>
- (8) Hilal-Dandan, R., Knollman, B., & Brunton, L. (2017). Chapter 59. Protein synthesis inhibitors and various antibacterial agents. En *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13.a ed., p. 1049). McGraw-Hill Education/Medical.
- (9) Saivin, S., & Houin, G. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*, 15(6), 355-366. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815060-00001>
- (10) Bogardus, J. B., & Blackwood, R. K. (1979). Solubility of doxycycline in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(2), 188-194. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680218>

- (11) Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2021). Capítulo 43. Insuficiencia respiratoria: fisiopatología, diagnóstico, oxigenoterapia. En *Tratado de Fisiología Médica* (14.a ed., p. 541). Elsevier.
- (12) Monrreal Ortega, L. (2023). *Diseño y evaluación de un sistema de liberación a base de microesferas de gelatina para aumentar la eficacia de terapias antibiopelícula inhalables*. [Unidad de Investigación II]. Universidad de Valparaíso.
- (13) Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., & Ramakrishna, S. (2008). Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34), 4532-4539. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.08.007>
- (14) Mustafa, A., Tomescu, A., Mustafa, E., Cherim, M. and Sîrbu, R., 2016. Polyelectrolyte Complexes Based on Chitosan and Natural Polymers. *European Journal of Interdisciplinary Studies*, 2(1), pp.100-107.
- (15) Pas, T., Vergauwen, B., & Van Den Mooter, G. (2018). Exploring the feasibility of the use of biopolymers as a carrier in the formulation of amorphous solid dispersions – Part I: gelatin. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.050>
- (16) Van Den Mooter, G. (2012). The use of Amorphous solid Dispersions: a formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(2), e79-e85. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.10.002>
- (17) Al-Obaidi, H., Peng, K., Brocchini, S., & Buckton, G. (2011). Characterization and stability of ternary solid dispersions with PVP and PHPMA. *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.052>
- (18) Yu, L. (2001). Amorphous Pharmaceutical Solids: Preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 27-42. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00098-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00098-9)
- (19) Leuner, C. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 47-60. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00076-x](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00076-x)
- (20) Billon, A., Bataille, B., Cassanas, G., & Jacob, M. V. (2000). Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 159-168. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(00\)00448-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00448-8)
- (21) Sham, J. O., Yu, Z., Finlay, W. H., Roa, W., & Löbenberg, R. (2004b). Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(2), 457-467. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.041>
- (22) Broadhead, J., Rouan, S. K. E., & Rhodes, C. T. (1992). The spray drying of Pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18(11-12), 1169-1206. <https://doi.org/10.3109/03639049209046327>
- (23) Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., & Elofsson, U. (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray

- drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(4), 900-910. <https://doi.org/10.1002/jps.10352>
- (24) Finlay, W. H. (2001). Particle Deposition in the Respiratory Tract. En *The mechanics of inhaled pharmaceutical aerosols: an introduction* (pp. 158-159). Academic Press.
- (25) Sham, J. O., Yu, Z., Finlay, W. H., Roa, W., & Löbenberg, R. (2004c). Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(2), 457-467. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.041>
- (26) Herranz Gómez, G., & Lis Arias, M. (2016). *Estudio de los mecanismos de reticulación en la obtención de microcápsulas de gelatina-goma arábiga* [Proyecto final de grado]. Universidad Politécnica de Cataluña.
- (27) Muñoz Cernada, A. (2006). Inhaladores de polvo seco para el tratamiento de las enfermedades respiratorias: Parte II. *Revista Cubana de Farmacia*, 40(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152006000200009
- (28) Hoppentocht, M., Hoste, C., Hagedoorn, P., Frijlink, H. W., & De Boer, A. H. (2014). In vitro evaluation of the DP-4M PennCentury™ insufflator. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.06.014>
- (29) Chen, L., Okuda, T., Lu, X., & Chan, H. (2016b). Amorphous powders for inhalation drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 100, 102-115. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016>
- (30) Douafer, H., Andrieu, V., Wafo, E., Sergent, M., & Brunel, J. M. (2021). Feasibility of an inhaled antibiotic/adjuvant dry powder combination using an experimental design approach. *International Journal of Pharmaceutics*, 599, 120414. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120414>
- (31) Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2017). Characteristics and gelling properties of gelatin from goat skin as affected by drying methods. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1646-1654. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2597-5>
- (32) Salama, R., Traini, D., Chan, H., & Young, P. M. (2008). Preparation and characterisation of controlled release Co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation 2: Evaluation of in vitro release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1), 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.04.009>
- (33) Paul. (2011). Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International Journal Of Pharmaceutics*, 418(1), 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.037>
- (34) Paredes Gallo, R. (2021). *Caracterización de biomasa mediante uso y aplicación de calorimetría diferencial de barrido* [Proyecto Fin de Grado, Ingeniería de los Recursos Energéticos, Combustibles y Explosivos, Universidad Politécnica de Madrid]. <https://oa.upm.es/68383/>

- (35) Vo, C. L., Park, C., & Lee, B. (2013). Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 85(3), 799-813. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.007>
- (36) Shah, B., Kakumanu, V. K., & Bansal, A. K. (2006). Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 95(8), 1641-1665. <https://doi.org/10.1002/jps.20644>
- (37) Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, May 17). *Tyndall effect*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/Tyndall-effect>
- (38) Kogawa, A. C., Zoppi, A., Quevedo, M. A., Salgado, H. R. N., & Longhi, M. R. (2014). Increasing Doxycycline Hyclate Photostability by Complexation with β -Cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1209-1217. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0150-7>
- (39) Mukherjee, I., & Rosolen, M. (2013). Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 114, 1161-1166.
- (40) Geiser, M. (2010). Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles. *Journal Of Aerosol Medicine And Pulmonary Drug Delivery*, 23(4), 207-217. <https://doi.org/10.1089/jamp.2009.0797>
- (41) O'Callaghan, C., & Barry, P. W. (1997). The science of nebulised drug delivery. *Thorax*, 52(Supplement 2), S31-S44. <https://doi.org/10.1136/thx.52.2008.s31>
- (42) Hastedt, J. E., Bäckman, P., Cabal, A., Clark, A., Ehrhardt, C., Forbes, B., Hickey, A. J., Hochhaus, G., Jiang, W., Kassinos, S., Kuehl, P. J., Prime, D., Son, Y., Teague, S., Tehler, U., & Wylie, J. (2022). iBCS: 1. Principles and Framework of an Inhalation-Based Biopharmaceutics Classification System. *Molecular Pharmaceutics*, 19(7), 2032-2039. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00113>
- (43) *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products*. (s. f.). FDA. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
- (44) Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2015, 12 agosto). *Ficha producto: SPIOLTO RESPIMAT SOLUCIÓN PARA INHALACIÓN*. Sistema de Consulta de Productos Registrados. Recuperado 17 de junio de 2024, de <https://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=F-22053/20>
- (45) Wachtel, H., & Ziegler, J. (2002). Improved assessment of inhaler device performance using laser diffraction. *Respir Drug Deliv*, 2, 379-382.
- (46) Ciciliani, A., Langguth, P., & Wachtel, H. (2017). In vitro dose comparison of Respimat[®] inhaler with dry powder inhalers for COPD maintenance therapy. *International Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/International Journal Of COPD*, Volume 12, 1565-1577. <https://doi.org/10.2147/copd.s115886>
- (47) Lavorini, F., Janson, C., Braido, F., Stratelis, G., & Løkke, A. (2019). What to consider before prescribing inhaled medications: a pragmatic approach for evaluating the current inhaler landscape. *Therapeutic Advances In Respiratory Disease*, 13, 175346661988453. <https://doi.org/10.1177/1753466619884532>

(48) Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2018, 2 febrero). *Ficha producto: ANORO ELLIPTA 55/22 POLVO PARA INHALACIÓN ORAL*. Sistema de Consulta de Productos Registrados. Recuperado 17 de junio de 2024, de <https://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=F-23707/23>

(49) Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2018, 26 junio). *Ficha producto: TRELEGY ELLIPTA 92/55/22 POLVO PARA INHALACIÓN ORAL*. Sistema de Consulta de Productos Registrados. Recuperado 17 de junio de 2024, de <https://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=F-23862/23>

(50) Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2020, 31 marzo). *Ficha producto: ULTIBRO BREEZHALER 110/50 POLVO PARA INHALACIÓN EN CÁPSULAS*. Sistema de Consulta de Productos Registrados. Recuperado 17 de junio de 2024, de <https://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=F-25355/20>